

Aus dem Zentrum für Innere Medizin der Philipps-Universität Marburg
Schwerpunkt Gastroenterologie, Endokrinologie und Stoffwechsel
Geschäftsführender Direktor Prof. Dr. T. M. Gress
Arbeitsgruppe PD Dr. Dieter Hörsch

Rap1 als zentrale Schaltstelle GLP-1 regulierter, mitogener Signalwege in pankreatischen beta-Zellen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg vorgelegt

von

Donata Schrader, geb. Ross

aus Kassel

Marburg 2007

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg
am 29. Oktober 2007

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. med. M. Rothmund

Referent: PD Dr. med. D. Hörsch

Korreferent: Prof. Dr. med. E. Weihe

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Diabetes mellitus Typ 2	2
1.1.1	Definition, Klinik und Epidemiologie	2
1.1.2	Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 2	3
1.1.3	Therapiestrategien	6
1.2	Das Inkretinhormon GLP-1	7
1.3	GLP-1-abhängige mitogene Signaltransduktionswege in pankreatischen beta-Zellen	9
1.3.1	Die cAMP-regulierte Aktivierung der Protein Kinase A	9
1.3.2	Phosphatidylinositol 3-Kinase und Protein Kinase B	10
1.3.3	Mitogen aktivierte Proteinkinasen: ERK1/2 MAPK	11
1.4	Fragestellung	14
2	Material und Methoden	16
2.1	Material	17
2.2	Methoden	18
2.2.1	Zellkultur	18
2.2.2	Experimente	18
2.2.3	Immunpräzipitation	19
2.2.4	Westernblot	20
2.2.5	Transfektionen und Luziferaseassay	21
3	Ergebnisse	23

3.1	Glukose- und GLP-1 regulierte Bindungspartner von Rap1	24
3.2	Bindung von Rap1 an den Crk II / C3G Komplex	28
3.3	Glukose- und GLP-1 regulierte Bindungspartner von Crk II	33
3.4	Glukose- und GLP-1 regulierte Bindungspartner von Pyk2	35
3.5	Das Adapterprotein Shc	39
3.6	Zusammenfassung der Ergebnisse	41
4	Diskussion	43
4.1	Mitogene Signaltransduktion in beta-Zellen	44
4.2	GLP-1 abhängige ERK1/2-Aktivierung via Rap1: Einfluß des Adapterproteins Crk II	44
4.3	Komplexbildung der Signaltransduktionsmodule ERK1/2 und PI3K/PKB via Rap1 und IRS2	47
4.4	Pyk2 als potentielle Schaltstelle GLP-1- abhängiger Signaltransduktionskaskaden	49
4.5	Shc: ein GLP-1 reguliertes Adapterprotein	52
4.6	Schlussfolgerung	53
	Literaturverzeichnis	55
	A Schaubildlegende	65
	B Abkürzungen und Einheiten	66
	B.1 Abkürzungen	66
	B.2 Einheiten	69
	Zusammenfassung	70
	Summary	72
	Publikationsverzeichnis	74
	Verzeichnis der akademischen Lehrer	75
	Danksagung	76

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Diabetes mellitus Typ 2

1.1.1 Definition, Klinik und Epidemiologie

Der Diabetes mellitus Typ 2 wird nach den Leitlinien der Deutschen Diabetes-Gesellschaft als chronisch progredient verlaufende Erkrankung definiert, die zu dem Leitbefund Hyperglykämie führt und sowohl durch vererbte als auch erworbene Insulinresistenz und Insulinsekretionsstörung charakterisiert ist. Kennzeichnend für die betroffenen Patienten ist, dass die Störung der Glukosehomöostase gehäuft im Rahmen eines metabolischen Syndroms, das durch Adipositas, Dyslipoproteinämie, Hypertonie und Glukosetoleranzstörung bzw. Diabetes mellitus Typ 2 definiert ist, auftritt [28]. Die Manifestation des Diabetes mellitus Typ 2 erfolgt schleichend, häufig treten Müdigkeit, Leistungsminderung und eine Anfälligkeit für Infektionen auf. Im Vergleich zum Diabetes mellitus Typ 1 sind die klassischen Symptome wie Polyurie, Polydipsie und Nykturie dagegen nur selten zu beobachten [28]. Zur Diagnosestellung einer Diabetes mellitus können Gelegenheitsblutzucker, Nüchternplasmaglukose und der orale Glukosetoleranztest herangezogen werden. Dabei ergeben sich nach Empfehlung der Amerikanischen Diabetes-Gesellschaft und WHO folgende Richtwerte:

Stadium	Nüchternplasmaglukose	Gelegenheitsblutzucker	Orale Glukosetoleranztest (oGTT, 75g)
Diabetes mellitus	≥ 126 mg/dl (7,0 mmol/l)	≥ 200 mg/dl (11,1 mmol/l) und Symptome	2-h-Wert ≥ 200 mg/dl (11,1 mmol/l)
Gestörte Glukosehomöostase („impaired fasting glucose“)	$\geq 110 < 126$ mg/dl (6,1 - 7,0 mmol/l)		Pathologische Glukosetoleranz 2-h-Wert ≥ 140 bis < 200 mg/dl (7,8 mmol/l)
Normal	< 110 mg/dl (6,1 mmol/l)		< 140 mg/dl (7,8 mmol/l)

Weltweit hat die Erkrankung Diabetes mellitus epidemische Ausmaße angenommen und betrifft circa 194 Millionen Menschen [2]. Davon entfallen ungefähr 85-90% auf den Diabetes mellitus Typ 2 [51]. Die medizinischen und sozioökonomischen Probleme, die mit dieser Erkrankung einhergehen, werden durch die assoziierten Folgeerkrankungen hervorgerufen [71]. Die Komplikationen des Diabetes mellitus Typ 2 entstehen auf der Basis einer diabetesspezifischen Mikroangiopathie und einer unspezifischen diabetesspezifischen Makroangiopathie [51]. Diese Gefäßschäden führen zu koronarer Herzkrankheit, peripherer arterieller Verschlusskrankheit, arterieller Verschlusskrankheit der Hirnarterien, diabetischer Nephropathie mit chronischem Nierenversagen, diabetischer Polyneuropathie und diabetischer Retinopathie mit Erblindung [71]. Da für das Jahr 2010 eine Zunahme der Zahl an Diabetes mellitus Erkrankter auf über 250 Millionen Menschen weltweit erwartet wird [83], ist es wichtig, neue therapeutische Ansätze und effektive pharmakologische Konzepte zu entwickeln.

1.1.2 Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 2

Bei der Entstehung des Diabetes mellitus Typ 2 spielen sowohl Lebensstilfaktoren als auch genetische Determinierung eine Rolle [39]. So kann bei Studien mit monozygoten Zwillingen nachgewiesen werden, dass in circa 90% der Fälle beide Geschwister an Diabetes mellitus Typ 2 erkranken [7]. Ist ein Elternteil an Diabetes mellitus Typ 2 erkrankt, so weisen die Kinder ein Lebenszeitrisiko von 38% auf, ebenfalls eine Störung des Glukosestoffwechsels zu entwickeln [57]. Als Lebensstilfaktoren begünstigen Adipositas, fehlende körperliche Aktivität und falsche Ernährung das Auftreten eines Diabetes mellitus Typ 2 [39]. Pathogenetisch stehen zwei Störungen im Vordergrund, die das Risiko, einen Diabetes mellitus Typ 2 zu entwickeln, erhöhen: die verminderte Wirkung des Insulins an den Zielzellen (Insulinresistenz) [43] und/oder eine unzureichende Insulinsekretion (beta-Zelldysfunktion) [22].

Eine Insulinresistenz liegt vor, wenn die normale biologische Wirkung des Insulins vor allem an Leber, Skelettmuskel und Fettgewebe vermindert ist und es zu einer geringeren Aufnahme von Glukose in die Zellen und einer erhöhten endoge-

nen Glukoseproduktion in der Leber kommt [71]. Die Mechanismen, die zu dieser Fehlfunktion führen, sind verschiedenartig und nicht vollständig geklärt. Neben genetischen Risikofaktoren, die eine Insulinresistenz begünstigen, wie zum Beispiel der Polymorphismus des PPAR γ Gens [47], gibt es einige Ursachen die im Zusammenhang mit Adipositas stehen und die an dieser Stelle kurz erläutert werden sollen.

Es konnte gezeigt werden, dass freie Fettsäuren dosisabhängig [9] zu einer peripheren und hepatischen Insulinresistenz [10] führen. Diese freien Fettsäuren entstehen im Fettgewebe und sind somit bei adipösen Patienten in erhöhten Mengen im Blut nachweisbar [71].

Eine weitere Verbindung zwischen Adipositas und Insulinresistenz stellen inflammatorische Zytokine dar, die im Fettgewebe vermehrt produziert werden [61]. Ein erhöhter Blutspiegel des Tumornekrosefaktor alpha [TNF α] beeinflusst die Signaltransduktionskaskade von Insulin negativ, indem die Tyrosinkinaseaktivität des Insulinrezeptors durch Serin-Phosphorylierung von „insulin receptor substrate 1“ [IRS1] gehemmt wird [34]. Das proinflammatorische Interleukin 6 [IL-6] kann bei Patienten mit adipositasassoziiierter Insulinresistenz ebenfalls in höheren Konzentrationen im Blut nachgewiesen werden [38]. Es wird angenommen, dass IL-6 über die Expression von Proteinen der „suppressors of cytokine signaling“ [SOCS] Familie bei der Entstehung insbesondere der hepatischen Insulinresistenz eine Rolle spielt [68].

Während zirkulierende freie Fettsäuren und inflammatorische Zytokine bei viszeraler Fettsucht erhöht sind, liegen für das Protein Adiponektin, das fettgewebespezifisch ist, erniedrigte Plasmakonzentrationen vor [71]. Adiponektin stimuliert sowohl die Glukoseutilisation als auch die Oxidation freier Fettsäuren [80], sodass die Erniedrigung von Adiponektin eng mit dem Ausmaß der Insulinresistenz korreliert [61]. Da viele Abläufe bei der Entstehung einer Insulinresistenz noch unklar sind, wird dieses Gebiet auch weiterhin Gegenstand intensiver Forschung sein.

Der zweite Pathomechanismus, der eine sine qua non bei der Entstehung eines Diabetes mellitus Typ 2 darstellt, ist die Dysfunktion der pankreatischen beta-Zelle [58]. Diese Fehlfunktion beinhaltet zwei verschiedene Aspekte: zum einen liegt ei-

ne funktionelle Störung der beta-Zellen vor, zum anderen wird eine verminderte Masse der pankreatischen beta-Zellen registriert. Die funktionelle Störung äußert sich in einem Verlust der ersten Phase der biphasischen Insulinsekretion nach einer Glukosebelastung und in einer abnormalen Oszillation der basalen Insulinsekretion. Ursächlich für beide Aspekte der Betazellfunktion sind neben einer genetischen Prädisposition die toxische Wirkung dauerhaft erhöhter Glukose- und Fettsäurespiegel [19].

Als genetische Risikofaktoren, die zu einer Einschränkung der Insulinsekretion führen, sind zum Beispiel der Arg(972) IRS1 Polymorphismus [59] oder die E23K Variante des KIR 6.2 Gens [26], das eine Untereinheit des KATP Kanals der pankreatischen beta-Zellen codiert, zu nennen. Es sind noch weitere Gene und genetische Polymorphismen bekannt, die mit Diabetes mellitus Typ 2 assoziiert sind [52, 46], allerdings ist der Wirkmechanismus häufig noch ungeklärt.

Die chronische Hyperglykämie im Rahmen eines Diabetes mellitus Typ 2 ist nicht nur ein Marker für die diabetische Stoffwechsellage, sondern auch ein eigenständiger Faktor, der die metabolische Situation des Organismus weiter verschlechtert [81]. Die chronisch erhöhte Glukosekonzentration führt zu einer verminderten Insulinsekretion, indem sie die für die Insulinproduktion notwendigen Zellkompartimente im Laufe der Zeit irreversibel schädigt. Diese Schädigung wird über freie Radikale vermittelt, die im Verlauf des oxidativen Glukosemetabolismus entstehen und zu oxidativem Stress der beta-Zellen führen. Es resultiert eine Erniedrigung des für den Insulinpromotor wichtigen Transkriptionsfaktors „pancreas duodenum homeobox-1“ [PDX-1] [66]. Möglicherweise sind die freien Radikale auch verantwortlich für die verminderte beta-Zellmasse, indem sie über Erhöhung der „nuclear factor κ B“ [NF κ B] Aktivität eine gesteigerte Apoptoserate der beta-Zellen induzieren [71].

Die über lange Zeit erhöhten Spiegel von unveresterten freien Fettsäuren, die durch Lipolyse in den Adipozyten bei übergewichtigen Patienten entstehen, haben ebenfalls schädliche Einflüsse auf die pankreatischen beta-Zellen, sie vermindern die glukoseinduzierte Insulinsekretion, schränken die Insulin-Gen-Expression ein und führen zu einer gesteigerten Apoptoserate. Die genauen Ursachen für diesen

schädlichen Effekt sind noch nicht geklärt. Eine Theorie beinhaltet, dass die Akkumulation von Metaboliten aus dem Lipidstoffwechsel die Funktion der beta-Zellen einschränkt. Diese Akkumulation ist nur dann zu beobachten, wenn sowohl Glukose als auch freie Fettsäuren langfristig in unphysiologisch erhöhten Konzentrationen im Blut vorliegen [65].

1.1.3 Therapiestrategien

Die Therapieziele bei der Behandlung eines Diabetes mellitus umfassen neben der Vermeidung akuter Komplikationen (hyperglykämische Stoffwechsellentgleisungen) vor allem die Prävention der diabetesassoziierten Spätfolgen. Verschiedene Studien wie z.B. die UKPDS 33 haben gezeigt, dass durch eine langfristig normnahe Stoffwechseleinstellung das Risiko für die Entwicklung von Langzeitkomplikationen signifikant gesenkt wird [74]. Basis der Therapie des Diabetes mellitus Typ 2 stellt die Gewichtsreduktion und somit Ernährung und körperliche Aktivität dar. Erst wenn durch entsprechenden Maßnahmen eine Normoglykämie nicht erreichbar ist, erfolgt eine medikamentöse Behandlung. Die in einem Stufenplan zunächst eingesetzten oralen Antidiabetika haben unterschiedliche Angriffspunkte. Ihre blutzuckersenkenden Wirkungen beruhen auf den Mechanismen, die Glukoseresorption zu verzögern (Glukosidasehemmer), die periphere Glukoseutilisation zu verbessern bzw. die hepatische Glukoneogenese zu hemmen (Metformin), die Insulinsekretion zu steigern (Sulfonylharnstoffe, Glinide) oder die periphere Insulinresistenz zu vermindern (Glitazone). Die letzte Stufe des Therapieplans beinhaltet die exogene Insulinzufuhr, die dann indiziert ist, wenn mit oralen Antidiabetika und Diät keine ausreichend zufriedenstellende Stoffwechseleinstellung erreicht wird oder Komplikationen auftreten [64]. Neue Therapieoptionen werden zur Zeit rund um das Inkretinhormon „glucagon-like peptide-1“ [GLP-1] entwickelt [71], da es im Gegensatz zu den Wirkstoffen der oben genannten Antidiabetika mehrere blutzuckersenkende Wirkmechanismen auf sich vereint.

1.2 Das Inkretinhormon GLP-1

Der zwischen 1960 und 1970 erstmalig beschriebene „Inkretin-Effekt“ beinhaltet die Beobachtung, dass die orale Aufnahme von Glukose die Insulinsekretion stärker stimuliert als die intravenöse Glukosezufuhr [23, 75]. Die Peptidhormone GLP-1 und „glucose-dependent insulintropic polypeptide“ [GIP] sind die wichtigsten, für diesen Effekt verantwortlichen Inkretinhormone des Magen-Darm-Traktes [23, 31]. Beide Hormone haben wirkungsvolle insulintrope Effekte auf die pankreatischen beta-Zellen und werden physiologischerweise bei oraler Aufnahme von Glukose oder gemischten Mahlzeiten freigesetzt [31]. GIP besteht aus 42 Aminosäuren und wird hauptsächlich in den neuroendokrinen K-Zellen des Duodenums produziert [23]. Nach Aufnahme einer Mahlzeit steigt die Plasmakonzentration von GIP auf das 10 bis 20fache an und es kommt zu einem Anstieg der „cyclic adenosin mono phosphate“ [cAMP] Spiegel in den beta-Zellen durch Interaktion von GIP mit seinem Rezeptor. Dieser cAMP Anstieg führt über eine Erhöhung zellulärer Calciumkonzentrationen zur Exozytose der Insulin-enthaltenden Granula [31] und somit zu einer vermehrten Freisetzung von Insulin. Bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 ist der beschriebene insulintrope Effekt von GIP deutlich vermindert [48], so dass GIP in der Therapie des Diabetes mellitus Typ 2 nicht wirkungsvoll eingesetzt werden kann. Im Gegensatz dazu ist die biologische Wirkung des Inkretinhormons GLP-1 auch bei Vorliegen eines Diabetes mellitus Typ 2 erhalten [48]. GLP-1 ist ein Peptidhormon, das aus 30 Aminosäuren besteht und ein Derivat von Proglukagon ist [56]. GLP-1 wird durch Stimulation mit den im Darmlumen befindlichen Nährstoffen aus ileal und colorektal lokalisierten enteroendokrinen L-Zellen sezerniert [23, 56, 30]. Die Plasmahalbwertszeit von GLP-1 beträgt lediglich 5 min., da es durch das Enzym Dipeptidyl Peptidase IV [DPP IV] rasch inaktiviert wird [56]. Der GLP-1 Rezeptor, der zu der Familie der 7-transmembranösen G-Protein gekoppelten Rezeptoren gehört [33], wird auf der Zelloberfläche von pankreatischen beta-Zellen stark exprimiert. Bindet GLP-1 an seinen Rezeptor so wird durch Stimulation der cAMP Bildung und Induktion eines intrazellulären Calciumanstiegs die Sekretion von Insulin glukoseabhängig gesteigert. Weitere blutzuckersenkenden Effekte des In-

cretinhormons GLP-1 werden durch Steigerung der Insulinbiosynthese, Inhibition der pankreatischen Glukagonsekretion und somit Hemmung der hepatischen Glukoneogenese, Verzögerung der Magenentleerung, Hemmung der Magensäuresekretion und Förderung des Sättigungsgefühls vermittelt [56]. *In vitro* und *in vivo* Studien der letzten Jahre zeigen, dass GLP-1 zusätzlich wachstumsfaktorähnliche Eigenschaften besitzt [32] und über drei verschiedene Mechanismen die Inselzellmasse expandieren kann [15]:

1. GLP-1 steigert die Betazellproliferation
2. GLP-1 senkt die Apoptoserate der Beta-Zellen
3. GLP-1 fördert die Differenzierung von duktalem Stammzellen zu Inselzellen (Neogenese)

Die Tatsache, dass sich GLP-1 aufgrund seiner Eigenschaften exzellent für die Therapie des Diabetes mellitus Typ 2 eignet, seine extrem kurze Halbwertszeit allerdings den medikamentösen Einsatz des natürlichen Peptidhormons verhindert, hat dazu geführt, dass Inkretin-Mimetika und Inhibitoren der DPP IV als Therapeutika entwickelt wurden. Inkretin-Mimetika sind Substanzen, die den gleichen insulinotropen Effekt wie das natürliche GLP-1 haben, aber deutlich langsamer metabolisiert werden, DPP IV-Inhibitoren hemmen den Abbau des physiologisch sezernierten GLP-1 [31]. In den USA ist der GLP-1 Agonist „Exenatide“, das synthetische Gegenstück zu dem im Speichel der Gila Echse produzierten Peptid Exendin-4, bereits in der Kombinationstherapie des Diabetes mellitus Typ 2 zugelassen, die Zulassung für Europa wurde im Jahr 2006 beantragt, das Präparat ist voraussichtlich ab Mitte 2007 im europäischen Raum erhältlich [3]. Vor allem durch ihre Eigenschaft, die beta-Zellmasse zu expandieren, eröffnen GLP-1 und seine Analoga neue Perspektiven für die Behandlung des Diabetes mellitus, da die Abnahme der beta-Zellmasse in der Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 2, aber auch im fortgeschrittenen Stadium eines Diabetes mellitus Typ 1 eine entscheidende Rolle spielt und nicht nur die *in vivo* Regeneration der beta-Zellen sondern auch die *ex vivo* Expansion von beta-Zellen

für Inselzelltransplantationen Hoffnung auf wirkungsvollere Therapien des Diabetes mellitus weckt [12].

1.3 GLP-1-abhängige mitogene Signaltransduktionswege in pankreatischen beta-Zellen

Die Mechanismen Zellteilung, Zellwachstum und Zelltod, die prinzipiell die Größe eines Organs bestimmen, werden nicht nur von intrazellulären Programmen vorgegeben, sondern auch von extrazellulären Signalmolekülen gesteuert [1]. Das Inkretinormon GLP-1 kann als extrazelluläres Signal das Wachstum von pankreatischen beta-Zellen auf verschiedene Weise fördern, es regt die Zellteilung an, wirkt antiapoptotisch, besitzt wachstumsfaktorähnliche Eigenschaften und trägt zur Differenzierung von Stammzellen bei [32, 15]. An dieser Stelle sollen drei wichtige GLP-1 abhängige Signaltransduktionswege der beta-Zellen dargestellt werden, die bei der Vermittlung der antiapoptotischen, mitogenen und wachstumsfaktorähnlichen Eigenschaften von GLP-1 einbezogen werden.

1.3.1 Die cAMP-regulierte Aktivierung der Protein Kinase A

Die spezifische Bindung von GLP-1 an seinen 7-transmembranösen G-Protein gekoppelten Rezeptor führt über die Aktivierung der Adenylatcyclase durch die stimulatorische $G\alpha$ Untereinheit des Rezeptors zu einem Anstieg der intrazellulären cAMP Konzentration [72, 78]. Dieser Anstieg führt zu einer Aktivierung der PKA, indem cAMP an die regulatorische Untereinheit der PKA bindet, und bewirkt, daß die zwei regulatorischen Untereinheiten des inaktiven Tetramers dissoziieren und somit zwei katalytischen Untereinheiten freigesetzt werden [69]. Diese katalytischen Untereinheiten sind nun in der Lage, Zielproteine zu phosphorylieren und vermitteln so eine Vielfalt von zellulären Antworten [69, 42]. In vielen Zellsystemen hat die PKA hemmende Effekte auf die Proliferation durch Inhibition von Raf-1 [27]. Jedoch ist gerade in neuroendokrinen Zellen zu beobachten, dass cAMP über PKA-abhängige Signaltransduktionskaskaden proliferatorische bzw. antiapoptotische Ef-

fekte haben kann [17, 42]. Dieser Effekt wird unter anderem über den Transkriptionsfaktor „cyclic-AMP-response-element-[CRE-] binding-protein“ [CREB] vermittelt, der von der PKA phosphoryliert wird und eine große Rolle in der Vermittlung von Wachstumsfaktor-induzierter Genexpression spielt [69]. So konnte gezeigt werden, dass Exendin-4, ein langwirksames GLP-1-Analogon, über die cAMP/PKA abhängige Phosphorylierung von CREB die Expression von Cyclin D1 steigert, indem phosphoryliertes CREB an CRE im Promoterbereich des Cyclin D1 Gens bindet. Cyclin D1 ist ein wichtiger Zellzyklus-Regulator, der den Übergang der Zellen von der G1- in die S-Phase vermittelt [40].

1.3.2 Phosphatidylinositol 3-Kinase und Protein Kinase B

Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass eine Langzeitbehandlung mit dem GLP-1-Analogon Exendin-4 eine Zunahme der Betazellmasse bewirkt. Untersucht man die stimulierten beta-Zellen näher, so kann eine erhöhte Expression der Protein Kinase B [PKB] festgestellt werden, woraus zu schließen ist, dass diese Kinase eine Rolle bei der Vermittlung der wachstumsfaktorähnlichen Effekte von GLP-1 spielt [76]. Die PKB ist eine Serin-/Threonin-Kinase, deren drei Isoformen (PKB α , PKB β , PKB γ) weit verbreitet sind, wobei in beta-Zellen hauptsächlich die Isoform PKB α vorkommt. Die PKB α wird in Antwort auf Stimulation der Beta-Zellen mit GLP-1, Insulin oder anderen Wachstumsfaktoren vermittelt durch die Phosphatidylinositol 3-Kinase [PI3K] aktiviert [76]. So führt zum Beispiel die Stimulation des Wachstumsfaktors „insulin-like growth factor-1“ [IGF-1] über die Phosphorylierung von Proteinen der Insulin-Rezeptor Substrat [IRS]-Familie zu einer Interaktion des IGF-Rezeptors mit p85 α , der regulatorischen Untereinheit der PI3K. Die hierdurch aktivierte katalytische Untereinheit der PI3K (p110 α) bewirkt einen Anstieg der 3-D-phosphorylierten Phosphatinositole, die als „second messenger“ zu einer Lokalisationsänderung der PKB vom Zytosol zur Zellmembran via Bindung an ihre Pleckstrin-Homologie-[PH-] Domäne führen. Zur vollen Aktivierung der PKB ist eine Phosphorylierung an Thr-308 und Ser-473 notwendig, die an der Zellmembran durchgeführt wird. Die Kinase, die den Threoninrest phosphoryliert, konnte als

„Phosphoinositol dependent kinase-1“ [PKB] identifiziert werden, wohingegen bei der Phosphorylierung des Serinrestes von einer Autophosphorylierung auszugehen ist [20, 21]. Die aktivierte PKB kontrolliert nun eine Vielzahl zellulärer Prozesse, die positiven Einfluß auf Zellgröße (via „mammalian target of rapamycin“ [mTOR]), Neogenese (via Foxo-1; CREB), Mitose (via Cyclin D1) und Überleben von beta-Zellen (via p53; Procaspase 9) haben (Abb. 1.1) [21].

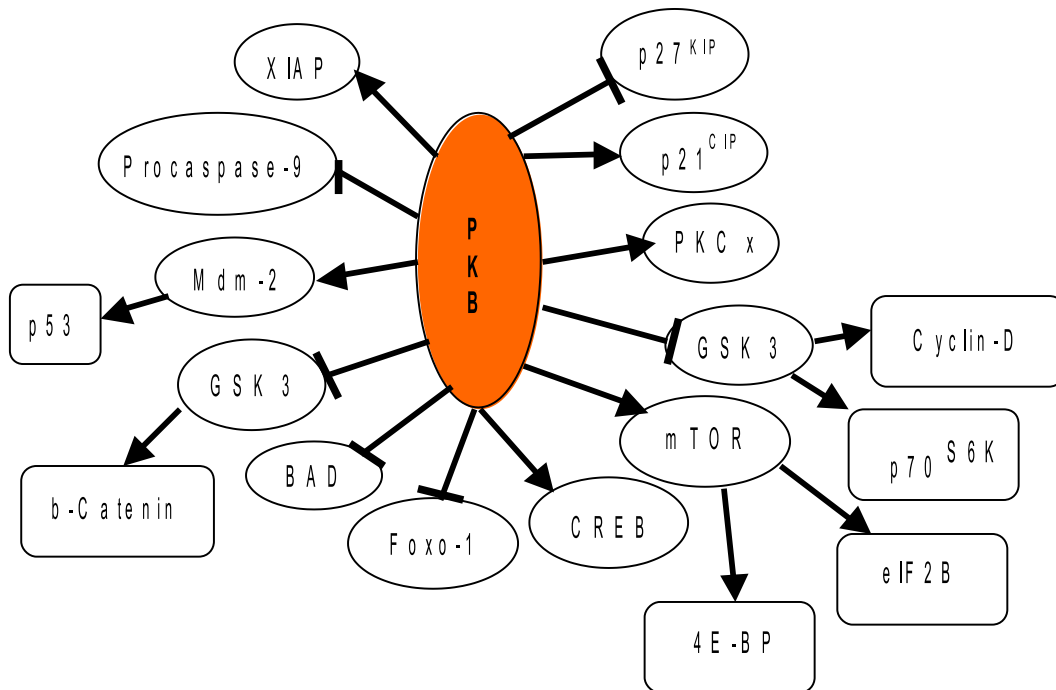


Abbildung 1.1: „PKB: Kontrolle von Wachstum und Überleben von beta-Zellen“ modifiziert nach [21] [XIAP = „X linked inhibitor of apoptosis protein“, BAD = „Bcl-2/Bcl-XL antagonist causing cell death“, Cdk-4 = „cyclin D-dependent protein kinase“, 4E-BP = „eukaryotic initiation factor-binding protein-1“, p70S6K = „70-kDa ribosomal subunit S6 protein kinase“, GSK-3 = „glycogen synthase kinase“]

1.3.3 Mitogen aktivierte Proteinkinasen: ERK1/2 MAPK

Mitogen aktivierte Proteinkinasen [MAPK] sind zentrale Komponenten von Signaltransduktionskaskaden, die für die Koordination einer spezifischen zellulären Antwort auf eine extrazelluläre Informationen verantwortlich sind [4]. Unter den Eukaryoten ist diese Familie von Serin/ Threonin-Kinasen hochkonserviert und hat

Einfluß auf Zellproliferation, Differenzierung, Zellbewegung und Apoptose. Zur Zeit sind fünf MAPK Module bekannt, wobei die p42/44 „extracellular signal-regulated kinase 1 and 2“ [ERK1/2], „c-Jun N-terminal kinase“/„stress-activated protein kinase“ [JNK/SAPK] und die p38 MAPK die wichtigsten Vertreter darstellen. Während die JNK und die p38 MAPK ihre Funktion hauptsächlich in dem Bereich der Stressantwort wie Entzündung oder Apoptose hat, reguliert ERK1/2 vor allem Wachstum und Differenzierung [67]. In pankreatischen beta-Zellen konnte gezeigt werden, dass die ERK1/2 durch Glukose aktiviert wird und diese Wirkung durch die Stimulation mit GLP-1 potenziert werden kann [4]. Die ERK1/2 Signaltransduktionskaskade hat den gleichen schematischen Aufbau wie alle übrigen MAPK-Kaskaden, der Kernkomplex besteht aus drei Elementen: der MAPK (ERK1/2), einem MAPK Aktivator (MAPK Kinase; MEK) und einem MEK Aktivator (MAPK Kinase Kinase) [67]. Daneben nimmt die Familie der Ras-GTPasen eine wichtige Position ein, da sie die Aktivierung des Kernkomplex durch Bindung an die MAPK Kinase Kinasen (Familie der Raf-Kinasen) ermöglicht. Weiterhin wichtig sind „guanine-nucleotide-exchange-factors“ [GEFs], die für die Aktivierung der kleinen GTPasen der Ras-Familie verantwortlich sind, und Adaptermoleküle, die die Rezeptoren (Rezeptortyrosinkinasen, Ionenkanäle, Integrine) mit den GEFs verbinden [55].

ERK1/2 entfaltet schließlich seinen Einfluß auf die Proliferation von Zellen über den Transkriptionsfaktor Elk-1, der als Heterodimer an andere Transkriptionsfaktoren, z.B. „serum-response-factor“ [SRF], bindet. Hierdurch wird die Expression von „immediate early genes“, Fos, Jun und ATF-Untergruppen von Transkriptionsfaktoren induziert, die die Synthese von Cyclin D1 und D3 durch Bindung an die Promoterregion des Gens fördern [25].

Die Ras-Familie der kleinen GTPasen, die einen zentralen Schalterpunkt der ERK1/2 Signaltransduktionskaskade darstellt, umfasst eine Anzahl von 13 GTPasen, wobei Ras und Rap1 die beiden wichtigsten Vertreter darstellen [14]. Die Konformation dieser GTPasen wechselt zwischen einem aktiven und inaktiven Zustand je nachdem ob „guanine nucleotide triphosphate“ [GTP] oder „guanine nucleotide

diphosphate“[GDP] gebunden ist [13]. Der GDP-GTP- Zyklus wird durch GEFs reguliert, die das gebundene GDP („off“) der GTPasen freisetzen und somit eine Interaktion mit GTP („on“) ermöglichen. Eine Gruppe von Proteinen genannt „GTPase-activating-proteins“[GAPs] stimuliert nun die hydrolytische Aktivität der GTPasen und vollendet somit den Zyklus (Abb. 1.2) [14].

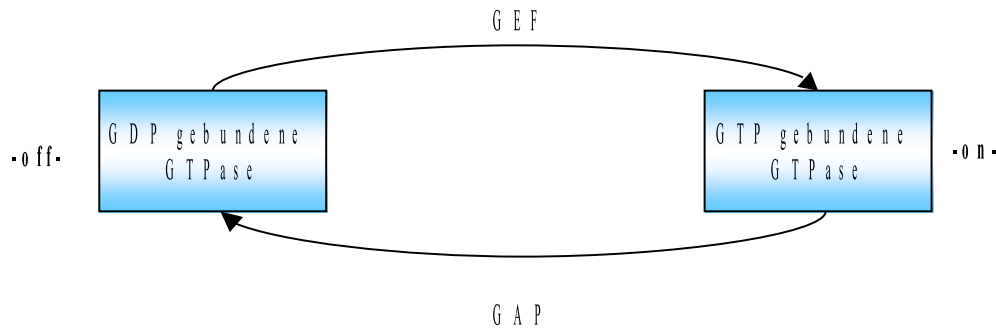


Abbildung 1.2: Aktivierungs- und Deaktivierungszyklus der GTPasen

Der mitogene Signaltransduktionsweg über das Modul Ras/ERK1/2 ist in der Vergangenheit gut untersucht worden, da in 15-30 % aller malignen Tumore eine Ras-Genmutation nachzuweisen ist [14, 79]. Rap1 wiederum wurde im Jahr 1989 erstmals als ein Protein beschrieben, das den Phänotyp einer durch Ras-Genmutation entarteten Zelle unterdrückt und somit eine antagonistische Funktion gegenüber Ras einnimmt. Dieser hemmende Effekt wird dadurch vermittelt, dass Rap1 und Ras nahezu identische Effektor-domänen besitzen und Rap1 die Downstreamkinase von Ras, die Serin/ Threonin-Kinase Raf-1, in einen inaktiven Komplex bindet und somit der Kaskade Ras/Raf-1/Erk1/2 entzieht [13, 14, 70]. Im Gegensatz dazu haben erst Untersuchungen der letzten Jahre gezeigt, dass Rap1 nicht nur proliferationshemmende Effekte durch Inhibition des Ras/Raf-1/ERK1/2 Komplex vermittelt, sondern dass mitogene Signale auch über die Aktivierung der GTPase Rap1 weitergeleitet werden [77]. Lokalisiert im Bereich der Zellmembran und an intrazellulären Membranen wird Rap1 durch Rezeptortyrosinkinasen, G-protein gekoppelte Rezeptoren, Zytokinrezeptoren und Zelladhäsionsmoleküle aktiviert [14].

Den Prozess der selektiven Aktivierung von Rap1 vermitteln Rap-spezifische GEFs, die für die Konversion des inaktiven, GDP-gebundenen Rap1 in das akti-

ve, GTP-gebundene Rap1 verantwortlich sind [77]. Durch die Bindung von GTP kommt es zu einer Konformationsänderung, die die Bindung von Effektoren an Rap1 ermöglicht [70]. Zu den Rap- spezifischen „guanine- nucleotide- exchange factors“ [RapGEFs] gehören „Crk-SH3-guanine-nucleotide-releasing-factor“ [C3G], RapGRP/CalDAG-GEF und Epac/cAMP-GEF [63, 14]. Da Rap1 eine sehr niedrige intrinsische GTPase-Aktivität besitzt, sind Rap1 spezifische „GTPase-activating-proteins“ [RapGAPs] notwendig, um Rap1 von der aktiven schnell in die inaktive, GDP-gebundene Form zu versetzen. Hierzu zählen Rap1GAP, Rap1GAPII, die Spa1 Familie der RapGAPs und GAP^{IP4BP} [14].

Eine der wichtigen biologischen Funktionen von Rap1 stellt die Kontrolle des ERK1/2 Signaltransduktionsweges dar [29]. Ob Rap1 einen antiproliferativen oder mitogenen Effekt ausübt, ist davon abhängig, welche Downstreamkinasen der Raf-Familie in den Zellen vorrangig exprimiert werden. Liegt in den Zellen hauptsächlich die Isoform Raf-1 der Raf-Familie vor, so hat aktiviertes Rap1 in erster Linie proliferationshemmende Effekte [70]. Im Gegensatz dazu hat Rap1 in Zellen, die vor allem die Isoform B-Raf exprimieren (z.B. neuronale oder neuroendokrine Zellen), einen positiven Einfluß über B-Raf auf die ERK1/2 Signaltransduktionskaskade [14, 36]. Der Grund, warum Rap1 Raf-1 hemmt und B-Raf wiederum aktiviert, liegt in der Cystein-reichen Region der beiden Raf-Kinasen verborgen. Die Assoziation von GTP-gebundenem Rap1 an Raf-1 ist sehr viel stärker als die Bindung an B-Raf und erklärt so das differierende Verhalten [29]. Vertauscht man diese Bereiche so verkehrt man den Effekt von Rap1 auf die Raf-Kinasen jeweils ins Gegenteil [14]. In den endokrinen Zellen des Pankreas kann eine starke Expression von Rap1 sowie die Aktivierung der ERK1/2 Signaltransduktionskaskade über die Serin/Threonin-Kinase B-Raf nachgewiesen werden [36], sodass Rap1 eine große Bedeutung für diesen mitogenen Signaltransduktionsweg in beta-Zellen besitzt.

1.4 Fragestellung

Das Inkretinhormon GLP-1 und Glukose aktivieren synergistisch mitogene Signaltransduktionskaskaden in pankreatischen beta-Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass

in humanen Inselzellen die Stimulation des ERK1/2 Signaltransduktionswegs im Gegensatz zu anderen Zellsystemen vorrangig durch das Modul Rap1/B-Raf erfolgt [73]. Ziel dieser Arbeit war es, Erkenntnisse über die Aktivierung von Rap1/B-Raf in Abhängigkeit von Glukose und GLP-1 Stimulation zu gewinnen und die Vernetzung unterschiedlicher mitogener Signaltransduktionskaskaden durch die GTPase Rap1 darzustellen.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Material

Bovines Serum Albumin [BSA], Temed, Glycerol 99+%, RPMI-1640, Triton X 100, Na₃VO₄, Phenylmethylsulfonylfluorid [PMSF], Aprotinin, Leupeptin, Benzamidine und Bromphenolblau wurde von **Sigma (Sigma-Aldrich Chemie GmbH; St. Louis, MO)** geliefert. Von der Firma **Serva (Heidelberg, Deutschland)** kam Towbin, Ammoniumpersulfat [APS] und Glukose. Methanol, NaCl, MgCl₂, CaCl₂, Na- Pyruophosphat, Ethylendiamintetraessigsäure [EDTA] und Tris Base erhielten wir von **Merck (Darmstadt, Deutschland)**. Tween 20 wurde vom **FLUKA (Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Buchs, Schweiz)** bezogen. **Gibco (Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland)** lieferte α -Mercaptoethanol, Lipofectamin und Foetales Kälber Serum [FCS]. Hapes und Natriumpyruvat wurde von **PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)** bezogen. Ciprobay kam von **Bayer (Leverkusen, Deutschland)** und RPMI-1640 ohne Glukose von **Pan Biotech (Aidenbach, Deutschland)**. Die Firma **Bio-Rad Laboratories GmbH (Hercules, CA)** lieferte prestained SDS-PAGE standards [„broad range“] und den Bio-RAD Protein Assay. Milchpulver „blotting grade“, „sodium dodecyl sulfate“ [SDS] und Acrylamid [rotiphorese^R Gel 30] kam von der Firma **Roth (Karlsruhe, Deutschland)**. „Detection Reagent 1+2“ wurde von **Amersham (GE Healthcare; Chalfont St. Giles, Großbritannien)** und „Luziferase Reporter Assays“ von **Promega (Madison, WI)** bezogen. Die verwendeten Nitrocellulose Membranen stammten von **Schleicher& Schuell, Dassel, Deutschland** und es wurden Biomax MR Röntgenfilme von **Kodak (Rochester, NY)** verwand. **Bachem (Bubendorf, Schweiz)** lieferte GLP-1 (7-37amid). Die verwendeten Antikörper Rap1, PY-HRP, Crk II , C3G, Pyk2, „anti-goat AK“ und die Protein-G-Agarose wurden von **Santa Cruz Biotchnology (Santa Cruz, CA)** bezogen. **Upstate Biotechnology (Lake placid, NY)** lieferte IRS2, P85alpha, P110alpha und den „phosphotyrosine“ [PY]-Antikörper. Von **Cell Signaling (New England Biolabs GmbH, Boston, MA)** kamen die Antikörper „anti-rabbit“ AK, „anti-mouse“ AK, pPyk2 (pY402) und pShc. Zu den verwendeten Pasmiden gehören C3G-CBR, Rap Gap-, PFR-Luc, PFA Elk.2 und pcDNA3.1lacz.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Für alle durchgeführten Versuche wurde eine Insulinoma-Zelllinie der Ratte (INS 1E, Passage 20-70) als Modell für eine glukosesensitive beta-Zelllinie verwendet. Die Zellen wurden in Inkubatoren bei 37°C und 5% CO₂ Atmosphäre kultiviert. Als Standardmedium wurde RPMI-1640 mit Glukose (11mM) und L-Glutamin (2mM) benutzt, das mit 10% FCS, 1mM Natriumpyruvat, 10mM Hepes, 50mM α -Mercaptoethanol und 1% Ciprofloxacin (400mg/Infusionsfläche) versetzt worden war. In der Standardzellkultur wurden die Zellen einmal pro Woche passagiert. Für Immunopräzipitationen und Westernblots wurden die INS 1E Zellen bei ca. 80%iger Konfluenz in 10 cm Petrischalen ausgesät, für Transfektionen wurden 6-„well“-Platten verwendet.

2.2.2 Experimente

Da unser Interesse dem Einfluss von Glukose und GLP-1 auf mitogene Signaltransduktionskaskaden von beta-Zellen galt, wurden INS 1E Zellen mit unterschiedlichen Glukosekonzentrationen und GLP-1 stimuliert. Hierzu wurden INS 1E Zellen in 10 cm Petrischalen unter den beschriebenen Standardbedingungen kultiviert bis eine Konfluenz des Zellrasens von 70-80% erreicht war. Anschliessend wurden die INS 1E Zellen für 4-12 Stunden in einem Medium inkubiert, das als Basis RPMI-1640 ohne Glukose, 10mM Hepes und 50 mM α -Mercaptoethanol enthielt und dem jeweils unterschiedliche Glukosekonzentrationen (2,5mM und 15mM) hinzugefügt worden waren. Im Anschluss an die Inkubationszeit wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, um sezerniertes Insulin, das die Auswertungen stören könnte, zu entfernen. Nach einer weiteren Stunde erfolgte nun die Stimulation mit GLP-1. Das Medium in den entsprechenden Schalen wurde mit 100 nM GLP-1 versetzt und die Zellen für 10 min. bei 37°C inkubiert. Anschliessend wurde das Medium aus sämtlichen Schalen vollständig abgesaugt und die Zellen lysiert. Der hierzu benötigte Lysepuffer (50mM Hepes [pH 7,4], 140mM NaCl, 1mM MgCl₂, 1mM CaCl₂, 10mM Natriumpyrophos-

phat, 100mM NaF, 2mM EDTA, 10% Glycerol, 1% Triton X 100, 2mM Na₃VO₄, 2mM PMSF, 10⁻⁷/ml Aprotinin, 10⁻⁷/ml Leupeptin, 10mM Benzamidine) wurde eisgekühlt auf den Zellrasen aufgebracht (500µl) und die Zellen mit einem Schaber von dem Boden der Schale abgelöst. Das Zellysate wurde in ein Eppendorfröhrchen pipettiert, anschliessend sonifiziert und zentrifugiert. Die Zellysate wurden für die Weiterverarbeitung auf Eis gelagert. Die Proteinbestimmung erfolgte mit dem „Bio-RAD Protein Assay“. Der Proteingehalt der Proben wurde bei 560nm photometrisch gemessen und die Proteinkonzentration anhand einer Standardreihe aus bovinem Serumalbumin errechnet. Die Aufbewahrung der Proben für weitere Versuche erfolgte bei -20°C.

2.2.3 Immunpräzipitation

Mit Hilfe einer Immunpräzipitation war es möglich, spezifische Proteine und deren Bindungspartner aus dem Zellysate zu isolieren. Das Grundprinzip dieser Methode bestand darin, dem Zellysate einen gegen das gewünschte Protein gerichteten Antikörper, der an Protein-G-Agarose gebunden war, zuzufügen und anschliessend die Protein-G-Agarose zu separieren. Für eine Immunpräzipitation wurde Zellysate mit einem Proteingehalt von 1000-1200µg benötigt und dieses in ein Eppendorfröhrchen pipettiert. Hinzugefügt wurden nun 40µl Protein-G-Agarose, 5µg des gewünschten Antikörpers und Lysepuffer (Rezept siehe oben), sodass die Gesamtmenge der Proteinlösung 1ml betrug. Nun wurden die Eppendorfröhrchen verschlossen, in einen Rotator eingespannt und 12h über Kopf bei 4°C gedreht. Im Folgenden wurden die Agarosekügelchen abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet zweimal mit Lysepuffer gewaschen. Nach Abpipettieren des letzten Überstandes wurden die mit Zellproteinen immunpräzipitierten Protein-G-Agarose Kügelchen mit 40µl 2xLämli (Rezept 5xLämli siehe unten) bedeckt und für 10 min. bei 95°C erhitzt. Es erfolgte nun die Abzentrifugation der Agarosekügelchen, sodass der Überstand, in dem sich die denaturierten Proteine befanden, in einem Westernblot weiterverarbeitet werden konnte.

2.2.4 Westernblot

Der Westernblot dient dazu, Proteine aufgetrennt nach ihrer Grösse durch spezifische Antikörper sichtbar zu machen. Zur Auftrennung der Proteine nach ihrer Grösse wurden 10%ige Tris-HCl SDS-Gele hergestellt. Die Zellysate wurden auf einen Proteingehalt von 30-50µg eingestellt und mit 5xLämli (625 mM Tris [pH 6,8], 10% SDS, 25% Glycerol, 5% Mercaptoethanol, 0,015% Bromphenolblau) versetzt. Im Hitzeblock wurden die Proben nun bei 95°C für 10min. erhitzt und anschliessend zentrifugiert. Die Vorbereitung der Immunpräzipitationen für einen Westernblot ist im vorangehenden Teil beschrieben worden. Die Proben und ein Grössenmarker („broad range“) wurden nun in die Taschen des Gels geladen und bei 160mV über 1 Stunde in einer Gelkammer, die mit 1xLaufpuffer gefüllt war (Laufpuffer [10x]: 30,3g Tris Base, 144g Glycerin, 10g SDS auf 1l aqua dest.), aufgetrennt. Im Anschluss daran wurden die Proteine aus dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran transferiert (12h bei 20V, Transferpuffer: 100ml 10x Towbin, 200ml Methanol, 700ml aqua dest.). Um unspezifische Proteinbindungsstellen zu blocken, wurden die Membranen in 5%iger Trockenmilchlösung (Milchpulver „blotting grade“ + TBS-T Puffer) 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschliessend wurden die Membranen in je 10ml 5%ige Trockenmilchlösung gelegt und der Antikörper in der gewünschten Konzentration (wenn nicht anders beschrieben 1: 1000) hinzugefügt. Die Inkubation der Membranen mit dem Antikörper erfolgte auf einer Schüttelplatte bei 4°C für 4-12h. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die Membranen dreimal á 10min. mit TBS-T Puffer (100ml 10x TBS, 200µl Tween 20, 900ml aqua dest.; 10x TBS: 24,22g Tris Base, 175,32g NaCl auf 2l [pH 7,6]) gewaschen. Anschliessend wurden die Membranen erneut in 10ml 5%ige Trockenmilchlösung gelegt, der entsprechende Zweitantikörper („anti rabbit“, „anti mouse“ oder „anti goat“) hinzugefügt und 1 Stunde auf der Schüttelplatte bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem die Membranen erneut mit TBS-T Puffer gewaschen worden waren (dreimal á 10min.), erfolgte nun die Detektion der Banden. Die Membranen wurden hierfür je 1min. in „enhanced chemiluminescence“ [ECL]-Reagenz („Detection Reagent 1+2“, je 5ml) geschwenkt und

die lumineszierende Banden mit einem Röntgenfilm aufgenommen. Die Röntgenfilme wurden automatisch entwickelt.

2.2.5 Transfektionen und Luziferaseassay

Eine Transfektion hat das Ziel, genetisch verändertes Material mit Hilfe von Vektoren in Zellen einzuschleusen. Durch dieses Verfahren können Informationen über den normalen Funktionsablauf der Zelle gewonnen werden. Für die Transfektionen wurden die INS 1E Zellen auf 6-,well“-Platten ausgesät und unter den Standardbedingungen kultiviert bis die Konfluenz des Zellrasens ca. 60% betrug. Dann wurde das Nährmedium abgesaugt und die Zellen mit 1ml Transfektionsmedium gewaschen (RPMI 1640 ohne Glukose mit 50mM α -Mercaptoethanol, 10mM HEPES und 10mM Glukose). Für fünf 6-,well“-Platten wurden 30ml Transfektionsmedium mit 300 μ l Lipofectamin gemischt. Weitere 30ml Transfektionsmedium wurden mit 30 μ g PFR-Luc (Luciferase-Reportergenkonstrukt), 3 μ g PFA Elk-2 (Transaktivator-domänenkonstrukt) und 3 μ g pcDNA3.1lacZ versetzt. Diese Plasmide sind für die Auswertung im Luziferaseassay erforderlich. Nun wurde das Transfektionsmedium (+ PFR-Luc, PFA Elk.2, pcDNA3.1lacZ) auf 6 Röhrrchen verteilt, in jedes Röhrrchen 1 μ g des gewünschten Plasmids (z.B. C3G CBR) hinzugefügt, mit 5ml Transfektionsmedium (+Lipofectamin) aufgefüllt und auf die 6-,well“-Platten verteilt. Es folgte nun eine Inkubation bei 37°C für maximal 12h. Nach dieser Zeit wurde das Transfektionsmedium entfernt und die Zellen mit Inkubationsmedium (RPMI 1640 ohne Glukose+ 50mM α -Mercaptoethanol, 10mM HEPES, 5% FCS und 5mM Glukose) über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurde das Inkubationsmedium abgesaugt und Stimulationsmedium (RPMI 1640 ohne Glukose+ 50mM α -Mercaptoethanol, 10mM HEPES, 1% FCS, 2,5mM bzw. 15mM Glukose) auf die Zellen gegeben. Die Stimulation erfolgte je Platte mit 2,5mM Glukose, 2,5mM Glukose+GLP-1, 15mM Glukose oder 15mM Glukose+GLP-1 über 4-8h. Danach wurde das Stimulationsmedium entfernt, 100 μ l Reporter Lysisbuffer auf den Zellrasen gegeben und das „well“ mit einem Zellschaber ausgekratzt. Das Zellysate wurde nun in Eppendorfröhrrchen

pipettiert (auf Eis), sonifiziert und zentrifugiert. Anschliessend erfolgte die Auswertung der Luziferaseaktivität in einem Luminometer.

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 Glukose- und GLP-1 regulierte Bindungspartner von Rap1

Die kleine GTPase Rap1 nimmt eine entscheidende Position in diversen Funktionen einer Zelle ein. Sie beeinflusst nicht nur Wachstum und Differenzierung, sondern auch Sekretion, Zelladhäsion und Morphogenese [14]. Stimuliert man humane Inselzellen mit Glukose und GLP-1 so spielt der Rap1/B-Raf Weg durch Aktivierung der MAPK ERK1/2 eine wichtige Rolle in der mitogenen Signaltransduktionskaskade [73]. Wenig bekannt ist allerdings, wie die Aktivität von Rap1 in beta-Zellen in Abhängigkeit von extrazellulärer Stimulation, zum Beispiel durch Glukose und GLP-1, reguliert wird.

Unser Interesse galt zunächst der Frage, welche Proteine in INS 1E Zellen (als beta-Zell Modell) mit Rap1 assoziiert sind und welchen Einfluss die Stimulation mit Glukose und GLP-1 auf sie hat. Zu diesem Zweck wurden INS 1E Zellen mit niedriger (2,5mM) und hoher (15mM) Glukose stimuliert und anschliessend mit GLP-1 inkubiert. Die Konzentration mit 2,5mM Glukose entspricht der niedrigsten Konzentration Glukose, bei der ein Überleben der beta-Zellen gewährleistet ist. Nach Herstellung des Zellysats wurden Rap1 und seine Bindungspartner durch eine Immunpräzipitation von den restlichen Zellbestandteilen getrennt und im Westernblot tyrosinphosphorylierte Proteine nachgewiesen, die mit Rap1 assoziiert sind (Abb. 3.1). Es fanden sich tyrosinphosphorylierte Proteine bei 40, 60, 85 und 200 kDa. Die Stimulation mit 15mM Glukose bewirkte eine deutliche Zunahme der Phosphorylierung der Proteine bei 60, 85 und 200 kDa, die bei Zugabe von GLP-1 nochmals verstärkt wurde. Die Phosphorylierung des 40 kDa grossen Proteins hingegen erfolgte Glukose- und GLP-1-unabhängig und blieb bei allen Stimulationsbedingungen (2,5mM Glukose, 15mM Glukose, mit bzw. ohne GLP-1) konstant.

Bei gleichen Versuchsbedingungen und nach Durchführung einer Rap1 Immunpräzipitation wurden nun diese Rap1 assoziierten, tyrosinphosphorylierten Proteine im Westernblot mit spezifischen Antikörpern bestimmt. Das Protein bei 200 kDa konnte als IRS2 identifiziert werden (Abb. 3.2 A+C). Die Stimulation mit 15mM

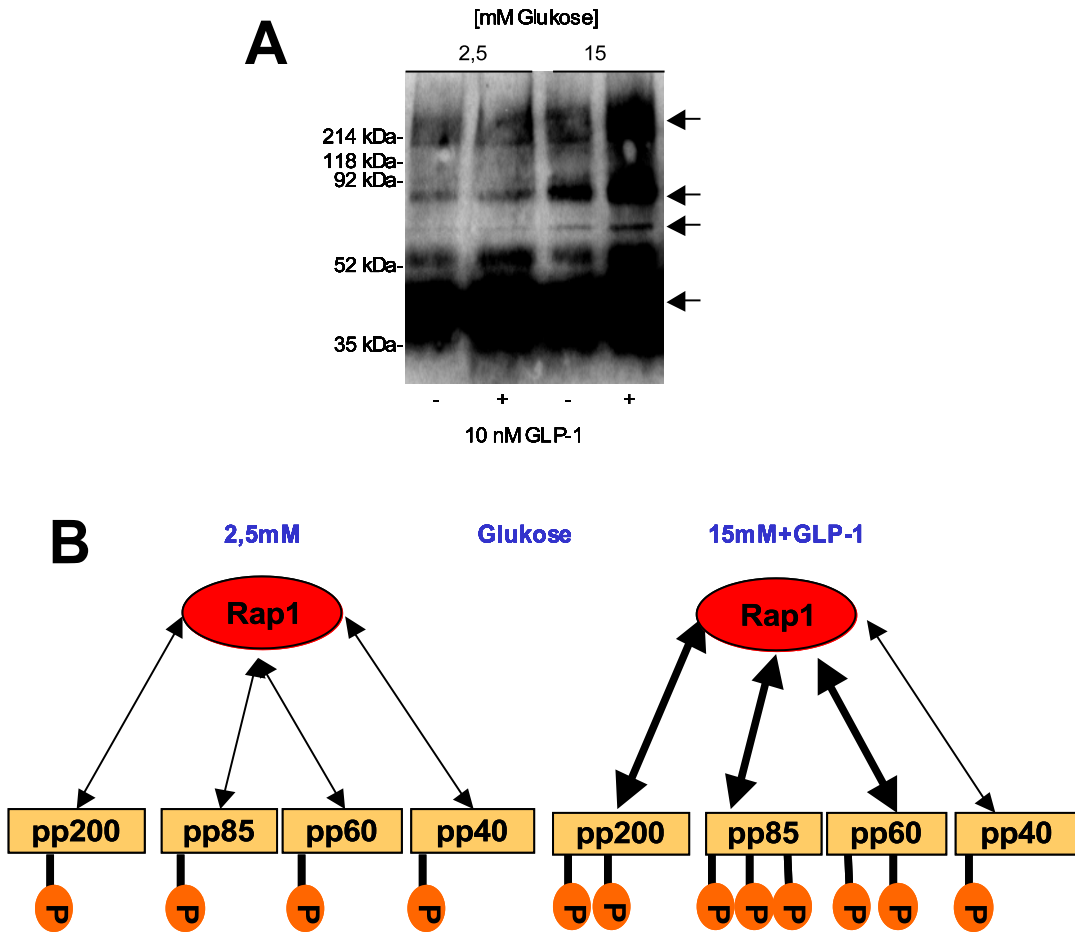


Abbildung 3.1: INS 1E Zellen wurden mit niedriger (2,5mM) und hoher (15mM) Glukosekonzentration und GLP-1 (+) stimuliert. Nach Durchführung einer Rap1 Immunpräzipitation wurden im Westernblot phosphorylierte Tyrosine mit einem PY- Antikörper dargestellt. Rap1 ist mit tyrosinphosphorylierten Proteinen bei 35, 60, 85 und 200 kDa assoziiert. Eine Zunahme der Phosphorylierung ist für die Proteine bei 60, 85 und 200 kDa zu erkennen

A: IP: Rap1 IB: PY, B: Schaubild (Legende siehe Anhang)

Glukose resultierte in einer Zunahme der Assoziation von IRS2 und Rap1, die allerdings durch GLP-1 nicht weiter gesteigert werden konnte.

Weiterhin konnte eine Interaktion von Rap1 mit p85 α , der regulatorischen Untereinheit der PI3K, nachgewiesen werden (Abb. 3.2 B+D). Somit entsprach p85 α dem Protein bei 85 kDa in dem unter Abb. 3.1 gezeigten Phosphotyrosinblot. Die Bindung von p85 α an Rap1 unterlag nicht dem Einfluss von Glukose oder GLP-1. Die Interaktion von Rap1 mit der katalytischen Untereinheit der PI3K p110 α wurde

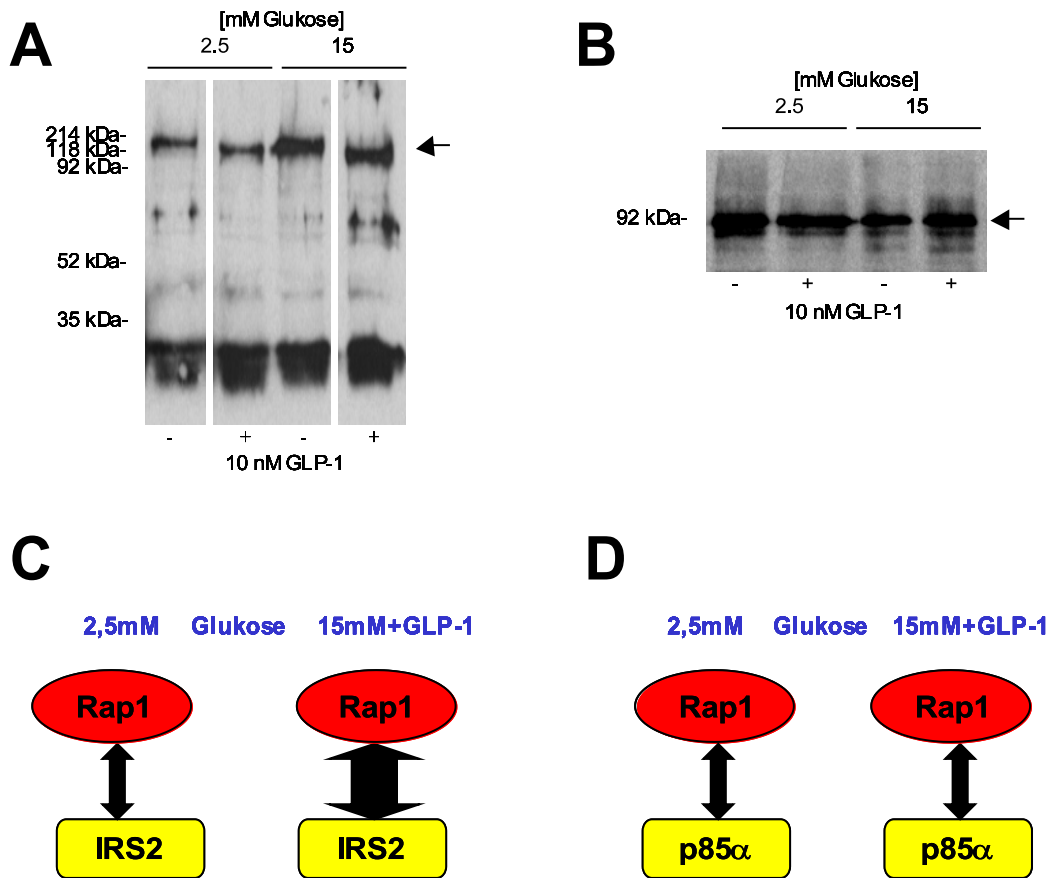


Abbildung 3.2: INS 1E Zellen wurden mit niedriger (2,5mM) und hoher (15mM) Glukosekonzentration und GLP-1 (+) stimuliert. Nach der Zellyse wurden Rap1 und seine gebundenen Proteine durch eine Immunpräzipitation isoliert. Anschliessend wurden IRS2 und p85α durch spezifische Antikörper im Westernblot nachgewiesen.

Abbildung A + C: Rap1 interagiert mit IRS2. Es zeigt sich eine Zunahme der Interaktion bei hoher Glukose (15mM) und GLP-1 Stimulation (+).

Abbildung B + D: Rap1 bindet unabhängig von den Stimulationsbedingungen an p85α (regulatorische Untereinheit der PI3K).

A: IP: Rap1 IB: IRS2, B: IP: Rap1 IB: p85α, C + D: Schaubild (Legende siehe Anhang)

ebenfalls nachgewiesen (Abb. 3.3 A+C), auch sie war unabhängig von der Stimulation mit Glukose oder GLP-1.

Desweiteren konnte das mit Rap1 assoziierte Protein, das eine Grösse von 40 kDa aufwies (Abb. 3.1), als „CT10 regulator of kinase II“ [Crk II] identifiziert werden (Abb. 3.3 B+D). Die Interaktion von Crk II mit Rap1 wurde durch den Einfluss

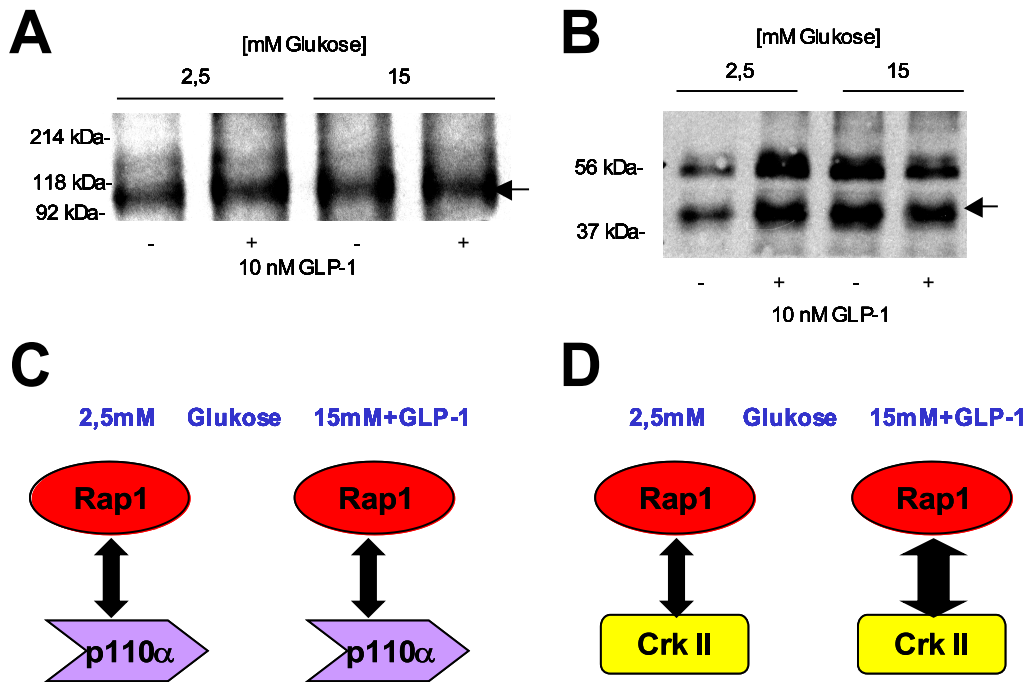


Abbildung 3.3: INS 1E Zellen wurden mit niedriger (2,5mM) und hoher (15mM) Glukosekonzentration und GLP-1 (+) stimuliert. Nach der Zellyse wurden Rap1 und seine gebundenen Proteine durch eine Immunpräzipitation isoliert. Anschliessend wurden p110 α und Crk II durch spezifische Antikörper im Westernblot nachgewiesen.

Abbildung A + C: Glukose und GLP-1 Stimulation haben keinen Einfluss auf das Bindungsverhalten der katalytischen Untereinheit der PI3K (p110 α) an Rap1.

Abbildung B + C: Rap1 ist mit Crk II in einem Komplex gebunden, es zeigt sich einen leichte Zunahme der Assoziation bei hoher Glukose und GLP-1 Stimulation.

A: IP: Rap1 IB: p110 α , **B:** IP: Rap1 IB: Crk II, **C + D:** Schaubild (Legende siehe Anhang)

von Glukose und GLP-1 variiert: bei niedriger Glukose konnte durch zusätzliche Stimulierung mit GLP-1 eine vermehrte Bindung nachgewiesen werden, auch hohe Glukosekonzentrationen (15mM) führten zu einer verstärkten Assoziation, die nach Zugabe von GLP-1 geringfügig abgeschwächt wurde. Das an Rap1 gebundene Protein mit einer Grösse von 60 kDa (Abb. 3.1) konnte bisher noch nicht eindeutig identifiziert werden, möglicherweise liegt hier eine Interaktion von Rap1 mit Src (ein Sarcome verursachendes Onkoprotein) vor. Nachgewiesen wurde somit, dass Rap1 mit IRS2, p85 α , p110 α und Crk II assoziiert ist, wobei die Bindung von IRS2 und

Crk II an Rap1 sowie der Phosphorylierungszustand von p85 α Glukose- und GLP-1 abhängig reguliert wird.

3.2 Bindung von Rap1 an den Crk II / C3G Komplex

Das Protein Crk II, das in einem Komplex mit Rap1 nachgewiesen wurde, ist ein Adapterprotein, an dem „Crk SH3-domain-binding guanine-nucleotide-releasing-factor“ [C3G] bindet. C3G gehört zu der Gruppe der GEFs für Rap1. Sie regulieren den Aktivitätszustand von Rap1, indem sie die Freisetzung des gebundenen GDP fördern, um der energiereicheren Form GTP die Bindung zu ermöglichen. Durch diesen Mechanismus wird Rap1 in die aktive Form versetzt. C3G enthält eine katalytische Region, die für den Wechsel zwischen GDP und GTP verantwortlich ist, und mehrere prolinreiche Regionen, die mit der ersten „Src homology region 3“ [SH3]-Domäne von Crk-Adapterproteinen assoziieren [14].

Um das Bindungsverhalten von Rap1 und C3G zu untersuchen wurden INS 1E Zellen mit niedriger (2,5mM) und hoher (15mM) Glukose sowie GLP-1 stimuliert. Nach Durchführung einer Rap1-Immunpräzipitation zeigte sich im anschliessenden Westernblot eine Interaktion von Rap1 mit C3G, die bei hoher Glukose (15mM) und GLP-1 Stimulation leicht verstärkt wurde (Abb. 3.4 A+C). Untersuchte man unter denselben Versuchsbedingungen die Verbindung von C3G und Crk II, so stellte sich nach Anfertigung einer C3G-Immunpräzipitation die Bindung von Crk II gleichmässig und ohne Einfluss von Glukose und GLP-1 dar (Abb. 3.4 B+D).

Unter den Standardversuchsbedingungen wurden nun die an C3G gebundenen tyrosinphosphorylierten Proteine ermittelt. Nach Durchführung von C3G-Immunpräzipitationen und Phosphotyrosinblots zeigten sich Banden bei einer Grösse von 85 und 120 kDa (Abb. 3.5). Eine deutliche Kinetik der Phosphorylierung ergab sich hierbei für das Protein bei 85 kDa, das bei hoher Glukosekonzentration (15mM) und Zugabe von GLP-1 vermehrt tyrosinphosphoryliert wurde. Unabhängig von Glukose und GLP-1 stellte sich die Phosphorylierung des Proteins bei 120 kDa dar.

Es erfolgte nun die Bestimmung dieser tyrosinphosphorylierten Proteine im Westernblot, nachdem INS-1E Zellen standardmässig mit Glukose und GLP-1 stimuliert

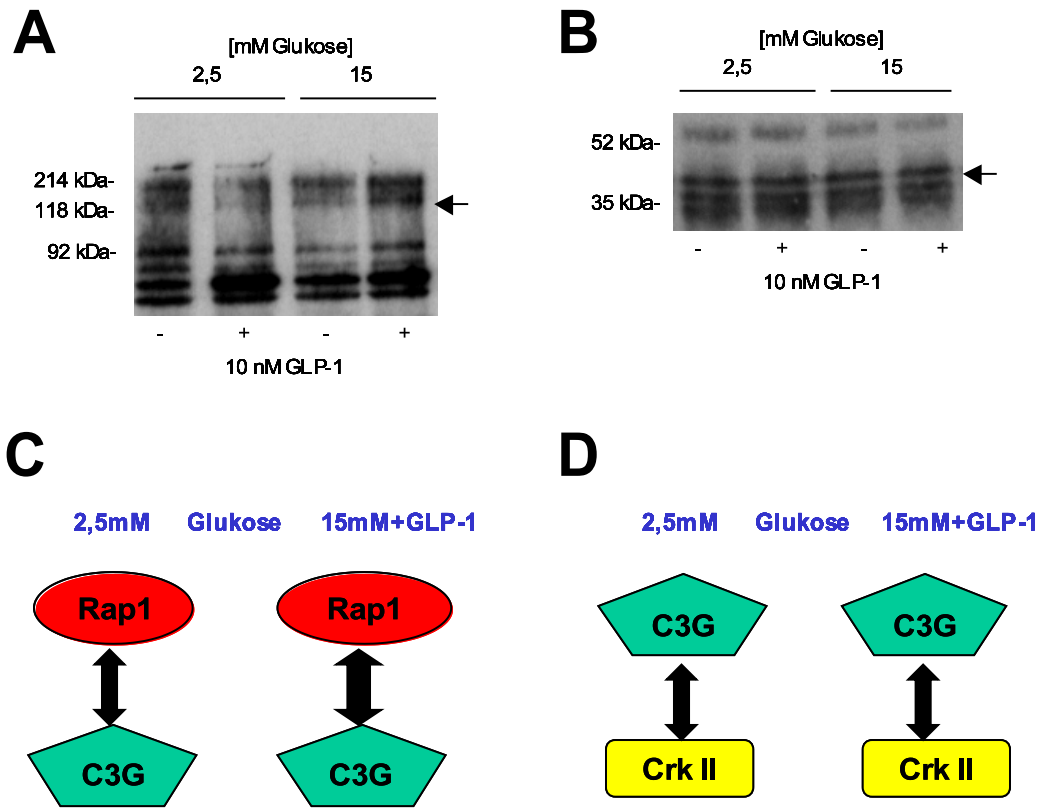


Abbildung 3.4: INS 1E Zellen wurden mit niedriger (2,5mM) und hoher (15mM) Glukosekonzentration und GLP-1 (+) stimuliert. Nach Lysierung der Zellen wurde eine Immunpräzipitation mit Rap1 (A) bzw. mit C3G (B) durchgeführt, um die Proteine mit ihren Bindungspartnern zu separieren. Im Westernblot wurden dann C3G (A) und Crk II (B) dargestellt.

Abbildung A + C: Die Interaktion von C3G und Rap1 wird nur bei hoher Glukose und GLP-1 Stimulation leicht verstärkt.

Abbildung B + C: Die Bindung von C3G an Crk II stellt sich in INS 1E Zellen konstant ohne Einfluss von Glukose oder GLP-1 dar.

A: IP: Rap1 IB: C3G, B: IP: C3G IB: Crk II, C + D: Schaubild (Legende siehe Anhang)

und eine C3G-Immunpräzipitation durchgeführt worden war. Das Protein bei 85 kDa konnte als p85 α (regulatorische Untereinheit der PI3K) identifiziert werden (Abb. 3.6 A+C). Die Interaktion von C3G mit p85 α war unter allen Versuchsbedingungen konstant. Weitere Immunblots ergaben, dass es sich bei dem tyrosinphosphorylierten Protein bei 120 kDa um C3G selbst handelte (Abb. 3.6 B+D).

Um den Einfluss des Crk II / C3G Komplex auf die mitogene ERK1/2 Signal-

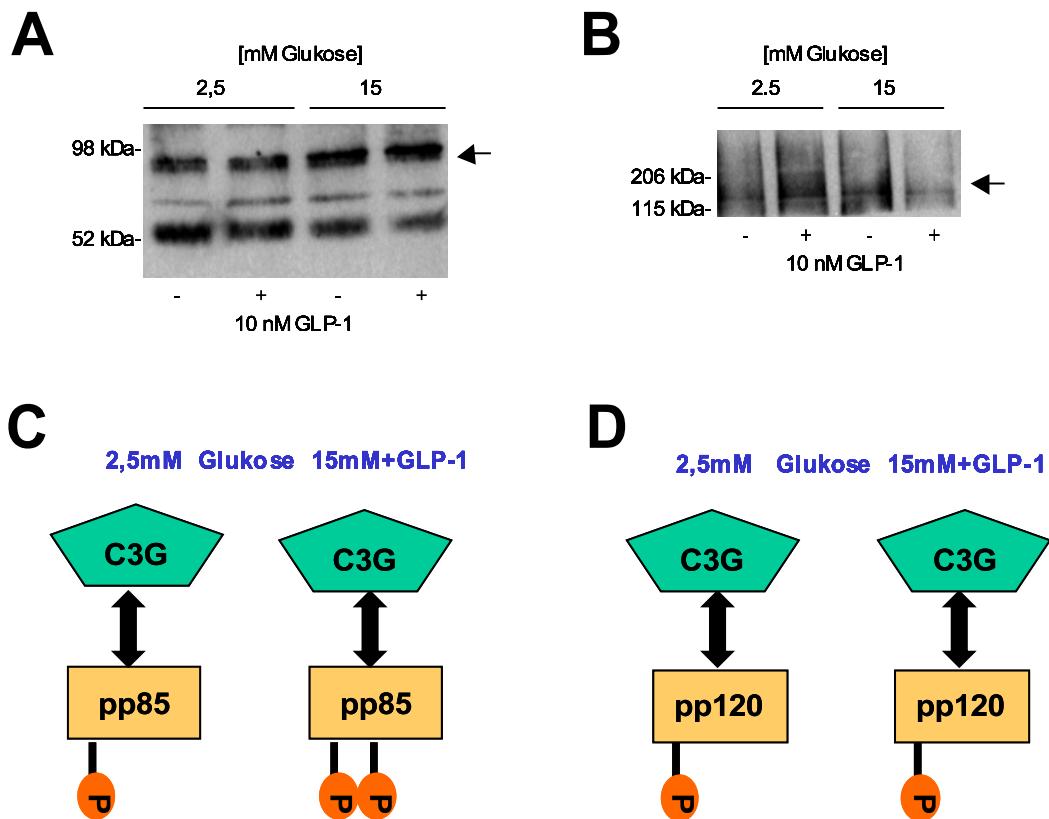


Abbildung 3.5: INS 1E Zellen wurden mit niedriger (2,5mM) und hoher (15mM) Glukosekonzentration und GLP-1 (+) stimuliert. Durch eine Immunpräzipitation wurde C3G und seine assoziierten Proteine von den restlichen Bestandteilen des Zelllysats getrennt. Im Westernblot wurden dann tyrosinphosphorylierte Proteine nachgewiesen. C3G ist mit tyrosinphosphorylierten Proteinen bei 85 und 120 kDa assoziiert. Die Phosphorylierung von p85 nimmt bei hoher Glukose (15mM) und GLP-1 Stimulation deutlich zu, während p120 unabhängig von den Stimulationsbedingungen phosphoryliert wird.

A: IP: C3G IB: PY, **B:** IP: C3G IB: PY, **C + D:** Schaubild (Legende siehe Anhang)

transduktionskaskade zu untersuchen, wurde C3G CBR, das die Komplexbildung zwischen C3G und Crk II verhindert, in INS 1E Zellen transfiziert und als Marker für die mitogene Aktivität der Zellen die Aktivierung des Elk-1-abhängigen Promoters in einem Luziferaseassay gemessen. Nach der Transfektion mit C3G „Crk-binding region“ [C3G CBR] erfolgte die Stimulation der Zellen mit 2,5mM bzw. 15mM Glukose und GLP-1. Nach Lysierung der Zellen wurde der Luziferaseassay durchgeführt. Es konnte im Vergleich zur Kontrolle eine signifikante Erniedrigung der Aktivierung des

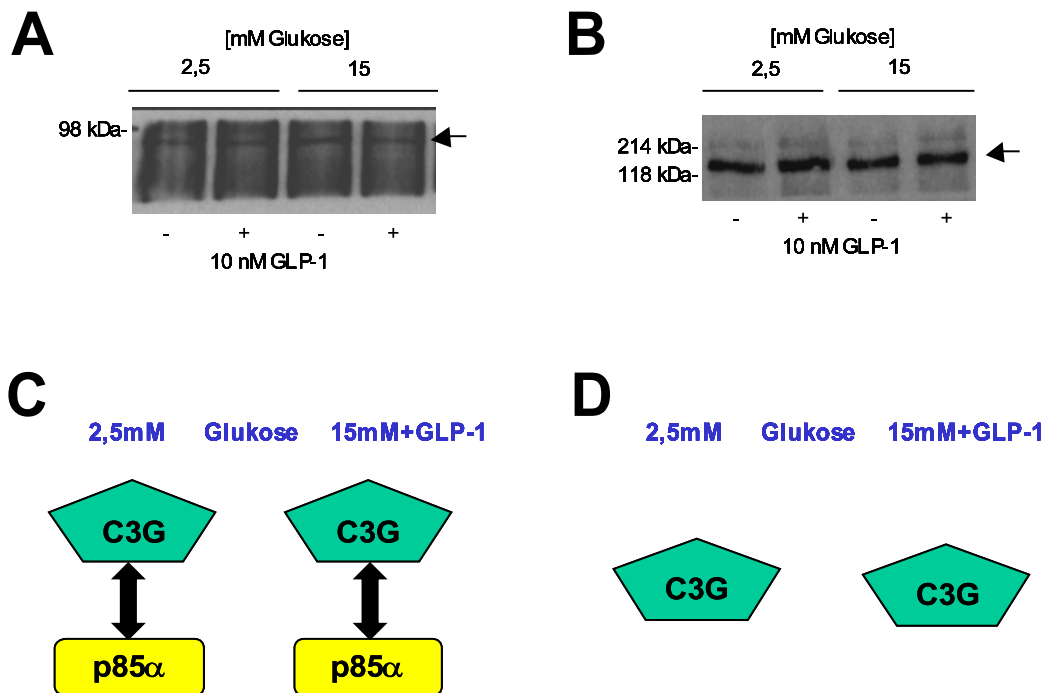


Abbildung 3.6: INS 1E Zellen wurden mit niedriger (2,5mM) und hoher (15mM) Glukosekonzentration und GLP-1 (+) stimuliert. Durch eine Immunpräzipitation wurden C3G und seine assoziierten Proteine jeweils von den restlichen Bestandteilen des Zellysats getrennt. Durch spezifische Antikörper erfolgte die Identifizierung von p85 α und C3G.

Abbildung A + C: C3G bindet an die regulatorische Untereinheit der PI3K (p85 α). Diese Assoziation wird durch Glukose oder GLP-1 nicht beeinflusst.

Abbildung B + D: Es handelt sich um C3G selbst, das bei 120 kDa tyrosinphosphoryliert wird (Abb. 3.5 B).

A: IP: C3G IB: p85 α , B: IP: C3G IB: C3G, C + D: Schaubild (Legende siehe Anhang)

Elk-1 abhängigen Promoters bei einer Stimulation mit 2,5mM Glukose und GLP-1 sowie bei 15mM Glukose und GLP-1 registriert werden (Abb. 3.7). Da die negative Wirkungsweise von C3G CBR auf einer Behinderung der Interaktion zwischen C3G und Crk II beruhte [60], konnte geschlossen werden, dass die Adapterfunktion von Crk II bei der Aktivierung von Rap1 durch C3G eine entscheidende Rolle spielt.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass der GEF C3G bei hoher Glukose (15mM) und GLP-1 Stimulation vermehrt an Rap1 bindet. Die Phosphorylierung von C3G und die Assoziation von C3G an Crk II und p85 α stellten sich im Gegensatz dazu

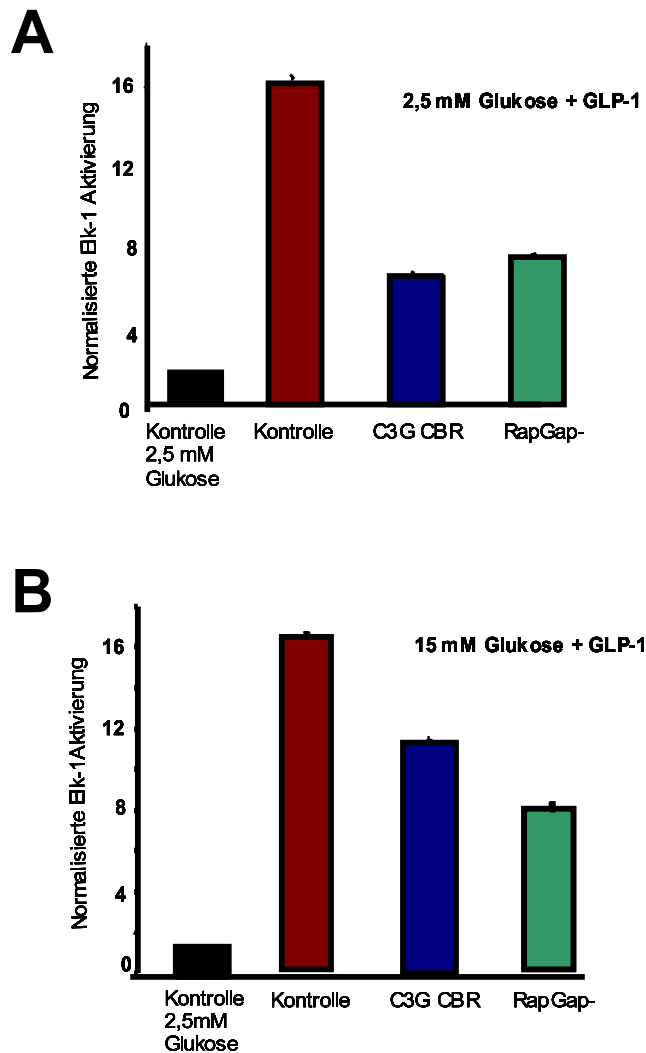


Abbildung 3.7: C3G CBR, ein Protein, das die reguläre Protein-Protein Interaktion zwischen C3G und Crk II hemmt, wurde in INS 1E Zellen transfiziert. Nach Stimulation der Zellen mit niedriger (2,5mM) und hoher (15mM) Glukosekonzentration und GLP-1 (+) wurde die Elk-1 Aktivierung als Marker für die mitogene Aktivität über den ERK1/2 MAPK Weg der Zellen in einem Luziferaseassay gemessen. Zu erkennen ist, dass C3G CBR sowohl bei niedriger (2,5mM) Glukose als auch bei hoher (15mM) Glukose und GLP-1 Stimulation die Aktivierung von Elk-1 hemmt. Somit spielt Crk II eine entscheidende Rolle in der mitogenen ERK1/2 Signaltransduktionskaskade von INS 1E Zellen.

unabhängig von den Stimulationsbedingungen dar. Ein Transfektionsversuch in INS 1E Zellen zeigte, dass Crk II deutlichen Einfluss auf die mitogene ERK1/2 Signaltransduktionskaskade hat.

3.3 Glukose- und GLP-1 regulierte Bindungspartner von Crk II

Crk II gehört zu einer Familie von Adapterproteinen (c-Crk I, c-Crk II, Crk-like), die für eine Reihe von Zellfunktionen wie Zelldifferenzierung und Zellmigration wichtig ist. Crk II ist 38-42 kDa groß und enthält eine „Src homology domain 2“ [SH2]-Region und zwei SH3-Regionen. Zusätzlich verfügt es über einen Tyrosinrest, der zwischen den beiden SH3-Regionen liegt und durch Phosphorylierung die Faltung des Proteins verändert. Dieser Mechanismus ermöglicht die Bildung von Komplexen mit C3G [24].

Unser Interesse galt zunächst den Proteinen, die mit Crk II in INS 1E Zellen interagieren. Zur Bestimmung von tyrosinphosphorylierten Proteinen, die mit Crk II assoziiert sind, wurden INS 1E Zellen mit 2,5mM und 15mM Glukose inkubiert und mit GLP-1 stimuliert. Nach Durchführung einer Crk II-Immunpräzipitation konnten im Phosphotyrosinblot Banden bei 35, 85 und 120 kDa detektiert werden (Abb. 3.8). Die Phosphorylierung der Proteine bei 120 kDa und 85 kDa war bei hoher Glukose (15mM) und GLP-1 Stimulation deutlich zunehmend. Im Gegensatz dazu nahm die Bande bei 35 kDa unter Stimulation mit 15mM Glukose und GLP-1 signifikant ab.

Zur Identifizierung dieser tyrosinphosphorylierten Proteine wurden nach Herstellung einer Crk II-Immunpräzipitation Westernblots mit spezifischen Antikörpern angefertigt. Das tyrosinphosphorylierte Protein bei 85 kDa konnte als p85 α identifiziert werden, das unabhängig von den Stimulationsbedingungen konstant mit Crk II in einem Komplex gebunden war (Abb. 3.9 A+C). Die Bestimmung der Bande bei 35 kDa im Phosphotyrosinblot ergab, dass es sich hierbei um Crk II selbst handelte (Abb. 3.9 B+D).

Weiterhin konnte die Interaktion von Crk II mit „Proline rich/ Ca²⁺-activated tyrosine kinase“ [Pyk2] nachgewiesen werden (Abb. 3.10), das dem tyrosinphosphorylierten Protein mit der Bande bei 120 kDa entsprach (Abb. 3.8). Die Stimulation mit unterschiedlichen Glukosekonzentrationen und GLP-1 blieben ohne Einfluss auf diese Verbindung.

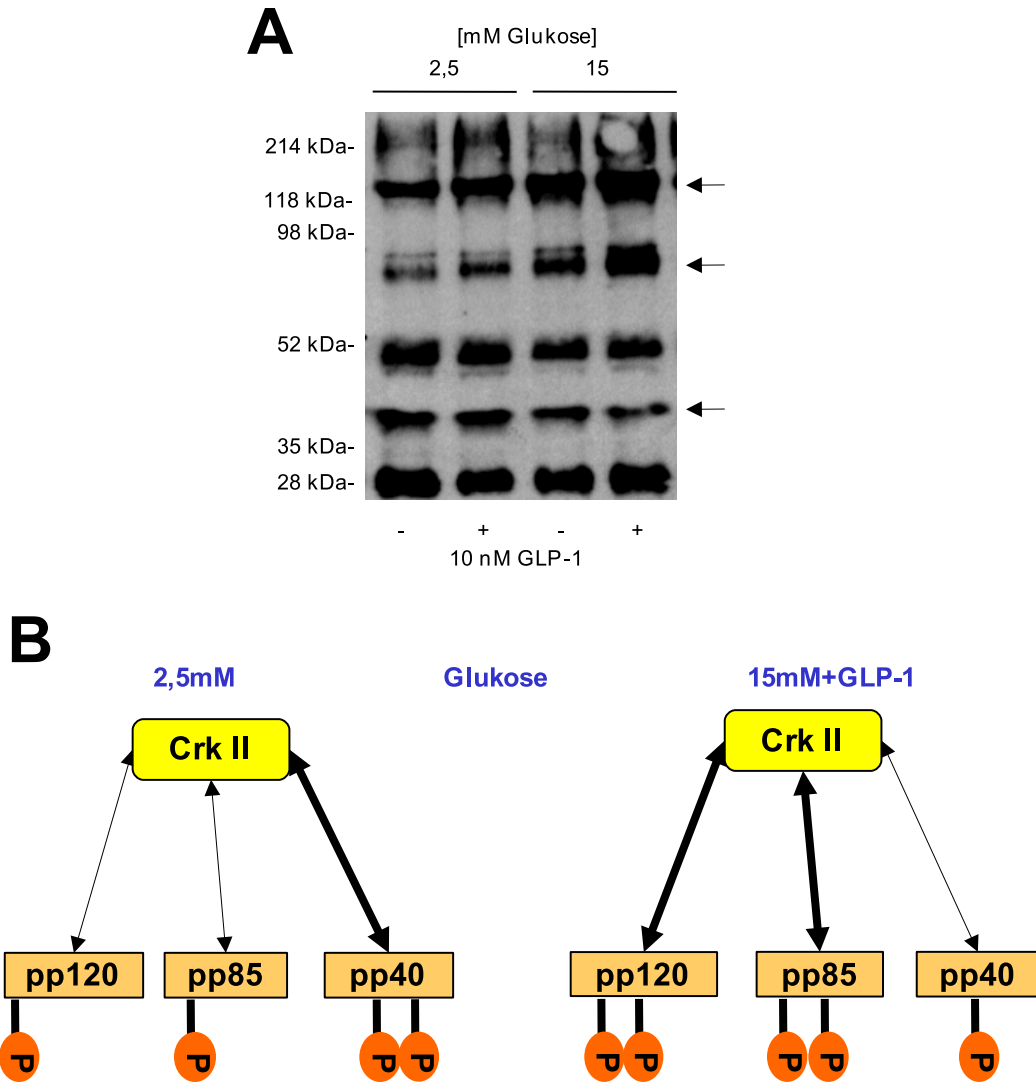


Abbildung 3.8: INS 1E Zellen wurden mit niedriger (2,5mM) und hoher (15mM) Glukosekonzentration und GLP-1 (+) stimuliert. Nach Lysierung der Zellen wurde eine Immunpräzipitation mit Crk II durchgeführt und tyrosinphosphorylierte Proteine im Westernblot nachgewiesen. Crk II interagiert mit tyrosinphosphorylierten Proteinen bei 35, 85 und 120 kDa. Die Phosphorylierung von p85 und p120 ist bei hoher Glukose (15mM) und GLP-1 Stimulation deutlich zunehmend, während p35 bei niedriger Glukose (2,5mM) verstärkt tyrosinphosphoryliert und bei hoher Glukose (15mM) und GLP-1 Stimulation dephosphoryliert wird.

A: IP: Crk II IB: PY, B: Schaubild (Legende siehe Anhang)

In Bezug auf das Adapterprotein Crk II konnte somit gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von Crk II bei hoher Glukose und GLP-1 Stimulation deutlich

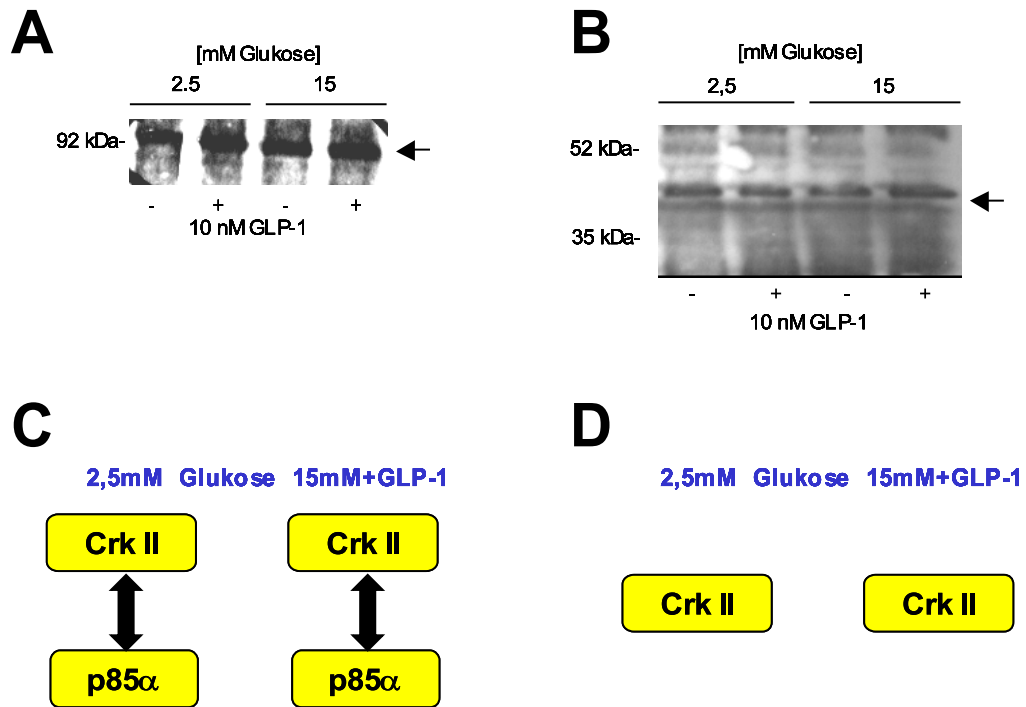


Abbildung 3.9: INS 1E Zellen wurden mit niedriger (2,5mM) und hoher (15mM) Glukosekonzentration und GLP-1 (+) stimuliert. Nach Lysierung der Zellen wurde eine Immunpräzipitation mit Crk II durchgeführt und im Westernblot p85α und Crk II durch spezifische Antikörper identifiziert.

Abbildung A + C: Crk II bindet unabhängig von den Stimulationsbedingungen an die regulatorische Untereinheit der PI3K (p85α).

Abbildung B + D: Das tyrosinphosphorylierte Protein bei 35kDa (Abb. 3.8) entspricht Crk II selbst, das bei hoher Glukose (15mM) und GLP-1 Stimulation dephosphoryliert wird.

A: IP: Crk II IB: p85α, **B:** IP: Crk II IB: Crk II, **C + D:** Schaubild (Legende siehe Anhang)

abnimmt. Die Interaktion von Crk II mit p85α und Pyk2 ist unabhängig von den Stimulationsbedingungen, allerdings werden beide Proteine bei hoher Glukosekonzentration und unter GLP-1 Stimulation vermehrt tyrosinphosphoryliert.

3.4 Glukose- und GLP-1 regulierte Bindungspartner von Pyk2

Pyk2 gehört zu den nicht-rezeptorabhängigen, prolinreichen Tyrosinkinassen der „focal adhesion kinase“ [FAK] Familie und weist eine Grösse von 125 kDa auf. Pyk2 wird

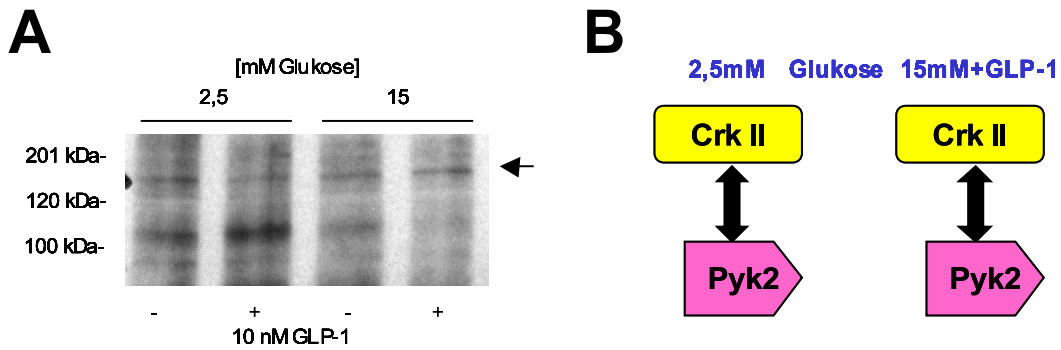


Abbildung 3.10: INS 1E Zellen wurden mit niedriger (2,5mM) und hoher (15mM) Glukosekonzentration und GLP-1 (+) stimuliert. Nach Lysierung der Zellen wurde eine Immunpräzipitation mit Crk II durchgeführt und Pyk2 im Westernblot dargestellt. Crk II interagiert unabhängig von den Stimulationsbedingungen mit der Tyrosinkinase Pyk2.

A: IP: Crk II IB: Pyk2, **B:** Schaubild (Legende siehe Anhang)

durch verschiedene extrazelluläre Stimuli, die den Calciumspiegel der Zellen erhöhen, aktiviert. Wachstumsfaktoren, Hormone, Neurotransmitter oder inflammatorischen Cytokine führen über eine Tyrosinphosphorylierung von Pyk2 zu einer Aktivierung der unterschiedlichen MAPK Signaltransduktionswege [5].

In INS 1E Zellen konnte nach Stimulation der Zellen mit niedriger (2,5mM) und hoher (15mM) Glukose und Zugabe von GLP-1 Pyk2 nachgewiesen werden (Abb. 3.11 A+C). Das Protein wurde bei hoher Glukosekonzentration (15mM) vermehrt exprimiert. Beim Nachweis der Phosphorylierung des Tyrosinrestes an Position 402 zeigte sich unter gleichen Stimulationsbedingungen der INS 1E Zellen eine verstärkte Phosphorylierung bei einer Glukosekonzentration von 15mM und bei Stimulation mit GLP-1 (Abb. 3.11 B+D).

Unser Interesse galt nun den Proteinen, die mit Pyk2 assoziiert sind. Hierzu wurden INS 1E Zellen mit Glukose und GLP-1 stimuliert und nach der Zellyse eine Immunpräzipitation mit Pyk2 durchgeführt. Im Westernblot wurden anschliessend assoziierte Proteine mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Die Interaktion von Pyk2 mit Crk II nahm sowohl bei hoher Glukosekonzentration (15mM) als auch bei Zugabe von GLP-1 ab (Abb. 3.12 A+C). Auf das Bindungsverhalten von Pyk2

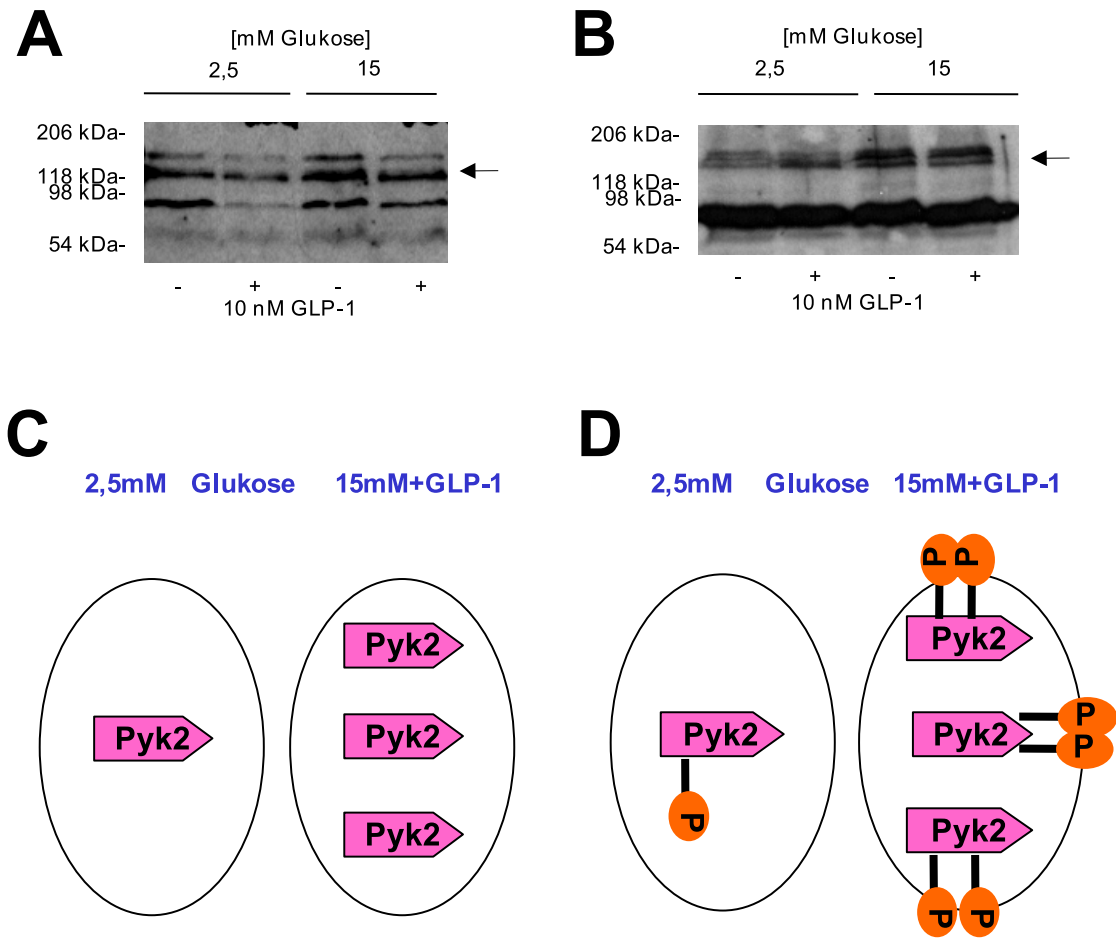


Abbildung 3.11: INS 1E Zellen wurden mit niedriger (2,5mM) und hoher (15mM) Glukosekonzentration und GLP-1 (+) stimuliert. Nach Lysierung der Zellen wurden Westernblots mit Pyk2 bzw. Phospho-Pyk2 Antikörpern durchgeführt.

Abbildung A + C: Pyk2 wird durch Stimulation mit hoher Glukose vermehrt exprimiert.

Abbildung B + D: Die Phosphorylierung von Pyk2 wird sowohl durch GLP-1 Stimulation als auch durch hohe Glukosekonzentration (15mM) verstärkt.

A: IB: Pyk2, B: IB: p-Pyk2, C + D: Schaubild (Legende siehe Anhang)

an p85 α hatte die Stimulation der INS 1E Zellen mit Glukose und GLP-1 keinen Einfluss, die Assoziation stellte sich gleichmässig dar (Abb. 3.12 B+D).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Pyk2 mit IRS2 interagiert (Abb. 3.13 A+C). Diese Bindung blieb bis auf eine leichte Abschwächung bei niedriger Glukose (2,5mM) konstant. Im Phosphotyrosinblot zeigte sich allerdings, dass an Pyk2 ge-

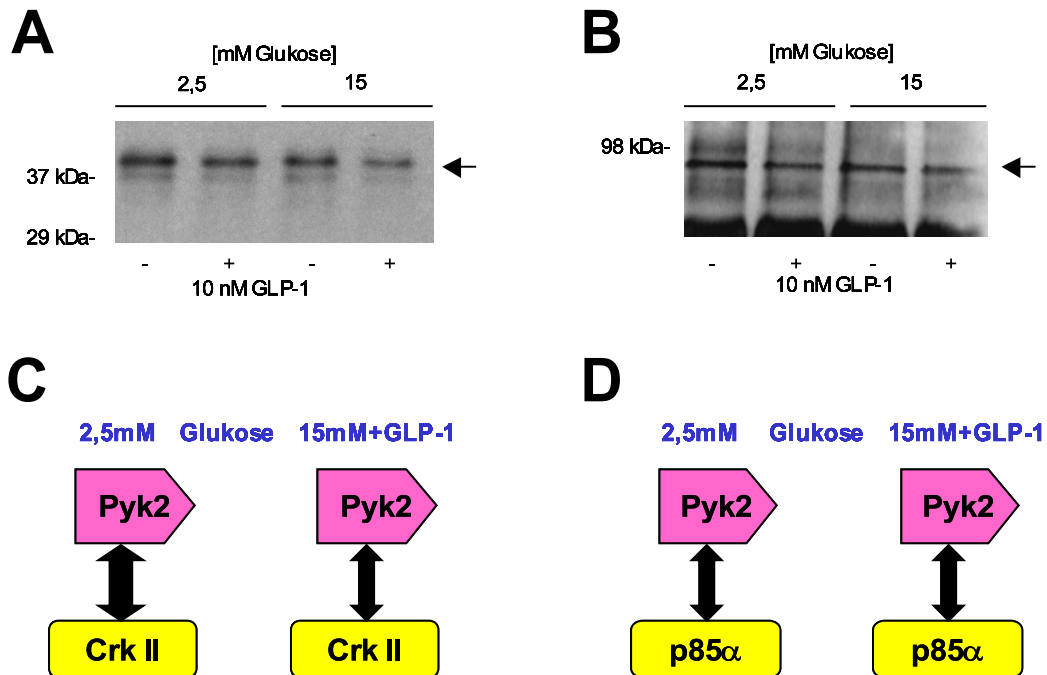


Abbildung 3.12: INS 1E Zellen wurden mit niedriger (2,5mM) und hoher (15mM) Glukosekonzentration und GLP-1 (+) stimuliert. Nach Lysierung der Zellen wurde zunächst eine Immunpräzipitation mit Pyk2 erstellt und anschliessend Crk II und p85α im Westernblot nachgewiesen.

Abbildung A + C: Die Interaktion von Pyk2 mit Crk II nimmt bei GLP-1 Stimulation bzw. bei hoher Glukosekonzentration ab.

Abbildung B + D: Die Assoziation von p85α an Pyk2 stellt sich unabhängig von den Stimulationsbedingungen dar.

A: IP: Pyk2 IB: Crk II, **B:** IP: Pyk2 IB: p85α, **C + D:** Schaubild (Legende siehe Anhang)

bundenes IRS2 bei hoher Glukose und GLP-1 Stimulation verstärkt phosphoryliert wird (Abb. 3.13 B+D).

Die Tyrosinkinase Pyk2 steht also in Verbindung mit der regulatorischen Unter-einheit der PI3K (p85α) und mit IRS2. Diese Komplexbildungen sind bis auf eine leichte Abnahme der Bindung von IRS2 an Pyk2 bei niedriger Glukose unabhängig von der Stimulation mit Glukose und GLP-1. Allerdings wird IRS2 bei hoher Glukose und Zugabe von GLP-1 vermehrt tyrosinphosphoryliert. Die Bindung von Pyk2 an Crk II nimmt sowohl bei hoher Glukosekonzentration (15mM) als auch bei GLP-1 Stimulation ab.

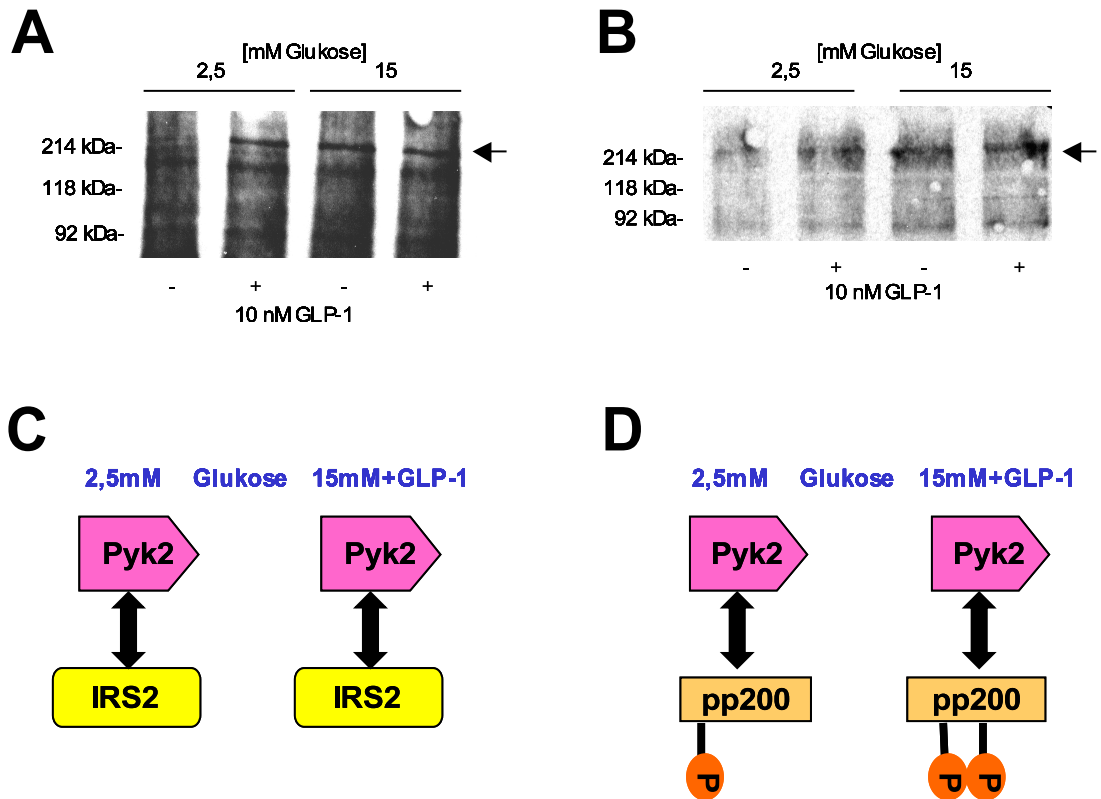


Abbildung 3.13: INS 1E Zellen wurden mit niedriger (2,5mM) und hoher (15mM) Glukosekonzentration und GLP-1 (+) stimuliert. Nach Herstellung des Zelllysats wurde eine Immunpräzipitation mit Pyk2 durchgeführt und anschliessend im Westernblot IRS2 bzw. die Phosphorylierung von IRS2 dargestellt.

Abbildung A + C: Die Zugabe von GLP-1 bei niedriger Glukosekonzentration (2,5mM) verstärkt die Assoziation von Pyk2 und IRS2. Bei Stimulation mit hoher Glukosekonzentration (15mM) bleibt die Assoziation konstant.

Abbildung B + D: IRS2, das in einem Komplex mit Pyk2 gebunden ist, wird bei hoher Glukosekonzentration (15mM) und durch GLP-1 Stimulation vermehrt tyrosinphosphoryliert.

A: IP: Pyk2 IB: IRS2, B: IP: Pyk2 IB: PY, C + D: Schaubild (Legende siehe Anhang)

3.5 Das Adapterprotein Shc

Neben Crk II und IRS2 ist „Src-homolgy/collagen“ [Shc] ein weiteres Adapterprotein, das für die GLP-1 stimulierte, mitogene Signaltransduktionskaskade der beta-Zellen wichtig zu sein scheint. Shc wurde als ein Proto-Onkogen identifiziert, das in verschiedene Wachstumsfaktor-abhängige Signaltransduktionswege involviert ist.

Neben Signalen, die über Hormon-, Zytokin-, Antigen- oder Wachstumsfaktorrezeptoren weitergeleitet werden, lösen auch Impulse über G-Protein gekoppelte Rezeptoren eine Phosphorylierung von Shc aus [62]. In pankreatischen beta-Zellen konnten wir zeigen, dass die Stimulation mit Glukose und GLP-1 eine signifikante Zunahme der Phosphorylierung von Shc sowohl durch hohe Glukosekonzentration (15mM) als auch durch GLP-1 Stimulation bewirkte (Abb. 3.14).

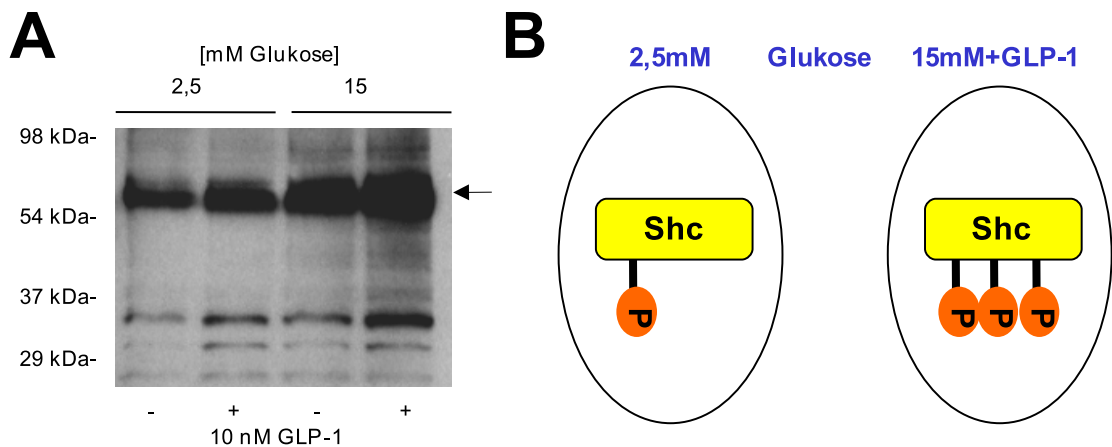


Abbildung 3.14: INS 1E Zellen wurden mit niedriger (2,5mM) und hoher (15mM) Glukosekonzentration und GLP-1 (+) stimuliert. Nach Lysierung der Zellen wurde ein Westernblot mit einem Phospho-Shc Antikörper durchgeführt. Es zeigt sich hierbei, dass die Phosphorylierung von Shc sowohl durch GLP-1 Stimulation als auch durch Zugabe hoher Glukosekonzentrationen (15mM) deutlich verstärkt wird.

A: IB: p-Shc, **B:** Schaubild (Legende siehe Anhang)

3.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

Betrachtet man zusammenfassend die GLP-1 abhängige ERK1/2-Aktivierung via Rap1, so scheint das Adapterprotein Crk II diesen Signaltransduktionsweg entscheidend zu beeinflussen. Konstitutiv an den RapGEF C3G gebunden, wird es unter der Stimulation mit Glukose und GLP-1 vermindert phosphoryliert. Trotzdem erscheint es in dem Komplex mit Rap1 gleichmässig gebunden, was auf eine verstärkte Interaktion des vermindert phosphorylierten Crk II mit Rap1 unter Glukose und GLP-1 Stimulation hinweist. Weiterhin konnten wir in dem Transfektionsversuch mit C3G CBR zeigen, dass es zu einer signifikant erniedrigten Aktivierung des Transkriptionsfaktors Elk-1 kommt, wenn die Adapterfunktion von Crk II, die für eine normale Aktivierung von Rap1 durch C3G benötigt wird, gestört ist.

In Bezug auf das PI3K/PKB Signaltransduktionsmodul konnten wir eine Komplexbildung mit der ERK1/2-Signaltransduktionskaskade via Rap1 und IRS2 zeigen. Stimulation der INS 1E Zellen mit hoher Glukosekonzentration bewirkt eine Zunahme der Interaktion von Rap1 mit IRS2. Die Interaktion von Rap1 mit der regulatorischen und katalytischen Untereinheit der PI3K (p85 α , p110 α) stellt sich hingegen unabhängig von den Stimulationsbedingungen dar. Ebenso konstant liegt eine Bindung des Crk II / C3G Komplexes mit der regulatorischen Untereinheit der PI3K (p85 α) vor. Betrachtet man nun den Phosphorylierungs- und somit Aktivierungszustand von IRS2 und der PI3K, so ist bei hoher Glukosekonzentration sowie bei GLP-1 Stimulation eine Steigerung zu verzeichnen. Hieraus ist zu schliessen, dass durch die verstärkte Interaktion des Rap1/Crk II/C3G/PI3K Komplexes mit IRS2 in Zusammenhang mit der verstärkten Phosphorylierung von IRS2 und p85 α eine gesteigerte Aktivierung der antiapoptotischen PI3K/PKB Signaltransduktionskaskade erreicht wird.

Untersuchungen der Tyrosinkinase Pyk2 zeigen, dass sie in pankreatischen beta-Zellen glukoseabhängig exprimiert und durch zusätzliche GLP-1 Stimulation vermehrt phosphoryliert wird. Zusätzlich lässt die Tatsache, dass Pyk2 in Komplexen mit Crk II, IRS2 und der regulatorischen Untereinheit der PI3K (p85 α) nachzuweisen ist, vermuten, dass Pyk2 eine potentielle Schaltstelle GLP-1- abhängiger Signaltrans-

duktionskaskaden darstellt. Abschliessend konnte mit dem Protein Shc ein glukose- und GLP-1-reguliertes Adapterprotein in INS 1E Zellen identifiziert werden.

Kapitel 4

Diskussion

4.1 Mitogene Signaltransduktion in beta-Zellen

Die Auffassung, dass eine differenzierte pankreatische beta-Zelle in ihrem „post-mitotischen Zustand“ nur ein sehr geringes Potential zur Proliferation besitzt, war in der Wissenschaft lange Zeit vorherrschend. Erkenntnisse der letzten Jahre zeigen allerdings, dass die beta-Zellreplikation je nach metabolischem Bedarf bzw. in Abhängigkeit von Wachstumsfaktoren und Hormonen steigerbar ist [25]. Das Inkretinhormon GLP-1 ist einer der Botenstoffe, der die Eigenschaft besitzt, synergistisch mit Glukose mitogene Signaltransduktionskaskaden der Inselzellen zu stimulieren [45, 16]. Zu den wichtigsten mitogenen Signaltransduktionsmodulen, die von GLP-1 dosisabhängig aktiviert werden, gehören cAMP/PKA, PI3K/PKB und die ERK1/2 MAPK [25]. Eine Besonderheit endokriner Zellen ist, dass der ERK1/2 Weg nicht durch den Prototyp der kleinen GTPasen Ras aktiviert wird, sondern durch Rap1 und B-Raf (MAPK Kinase Kinase). Dies konnte auch für beta-Zellen nach Stimulation mit Glukose und GLP-1 gezeigt werden [73].

4.2 GLP-1 abhängige ERK1/2-Aktivierung via Rap1: Einfluß des Adapterproteins Crk II

Rap1 gehört zu der Ras-Familie der kleinen GTPasen und wird durch Rezeptortyrosinkinasen, G-Protein gekoppelte Rezeptoren, Zytokinrezeptoren und Zelladhäsionsmoleküle aktiviert. Im Jahr 1989 wurde Rap1 erstmals als ein Protein beschrieben, das den Phänotyp einer durch Ras-Genmutation entarteten Zelle unterdrückt und somit eine antagonistische Funktion gegenüber Ras einnimmt [14]. Untersuchungen der letzten Jahre zeigen allerdings, dass Rap1 auch eine große Bedeutung in den Bereichen ERK1/2-Aktivierung und Integrin-vermittelte Signaltransduktion hat und dass seine Funktion stark mit dem zellulären Kontext variieren kann [29]. Den Prozess der selektiven Aktivierung von Rap1 vermitteln Rap-spezifische GEFs, die für die Konversion des inaktiven, GDP-gebundenen Rap1 in das aktive, GTP-gebundene Rap1 verantwortlich sind [77]. Zu den RapGEFs gehören C3G, RapGRP/CalDAG-GEF und Epac/cAMP-GEF, wobei C3G der erste identifizierte

RapGEF ist [63, 14]. C3G wird durch Bindung an Crk-Adapterproteine rekrutiert und durch Phosphorylierung aktiviert [29]. Entsprechend den Ergebnissen von Ling et al. für Wachstumshormon-stimulierte NIH 3T3 Zellen [44] konnten wir zeigen, dass C3G in pankreatischen beta-Zellen konstitutiv an Crk II gebunden ist und unabhängig von der Stimulation mit Glukose und GLP-1 phosphoryliert ist (Abb. 3.4, 3.5, 3.6). Unsere Untersuchungen weisen jedoch darauf hin, dass die Aktivierung von Rap1 durch das konstitutiv aktive C3G dennoch Glukose- und GLP-1-abhängig reguliert wird, und zwar durch den Phosphorylierungszustand des Adapterproteins Crk II. Crk II wird unter Stimulation mit hoher Glukosekonzentration und GLP-1 vermindert phosphoryliert (Abb. 3.8, 3.9). In der Rap1-Immunpräzipitation zeigt sich jedoch ein unter allen Stimulationsbedingungen gleichmässig phosphoryliertes Crk II (Abb. 3.1). Diese zunächst widersprüchlichen Ergebnisse lassen sich darauf zurückzuführen, dass das vermindert phosphorylierte Crk II vermehrt in Interaktion mit Rap1 steht und somit die Phosphorylierung gleichmässig imponiert (Abb. 3.3). Unsere Schlussfolgerung aus diesen Ergebnissen ist, dass die verminderte Phosphorylierung von Crk II vermutlich durch eine Konformationsänderung zu einer gesteigerten Interaktion von Rap1 mit dem konstitutiv aktiven C3G führt (Abb. 3.4), das nun in der Lage ist, die GTPase Rap1 vermehrt zu aktivieren (Abb. 4.1).

Untersuchungen dieser Proteine in anderen Zellsystemen wie den „chinese hamster ovary cells/insulin receptor“ [CHO/IR] ergaben im Gegensatz zu den GLP-1-stimulierten INS 1E oder Wachstumshormon-stimulierten NIH-3T3 Zellen ein anderes Verhalten. Hier wurde unter Stimulation mit Insulin eine vermehrte Phosphorylierung von Crk II registriert, was eine Dissoziation von Crk II und C3G im Gegensatz zu dem konstanten Komplex in endokrinen bzw. in NIH-3T3 Zellen zur Folge hatte. Diese Dissoziation führte zu einer Inaktivierung von Rap1 unter Insulin Stimulation. Allerdings nimmt Rap1 in CHO/IR Zellen eine andere Position ein als z.B. in endokrinen Zellen. Rap1 agiert in CHO/IR Zellen primär als Antagonist zu Ras, indem es Raf-1 bindet [50]. Die Wirkungsweise von Rap1 kann so abhängig vom Zellkontext sehr unterschiedlich sein, was eventuell durch das differierende Verhalten des Crk II/C3G Komplexes vermittelt wird.

Den Einfluß des Adapterproteins Crk II via C3G/Rap1 auf die Aktivierung der mitogenen Signaltransduktionkaskade ERK1/2 in INS 1E Zellen konnten wir auch durch Transfektionen der Zellen mit C3G CBR zeigen. Dieses Protein bindet spezifisch an Crk II und blockt somit die reguläre Protein-Protein Interaktion von Crk II und C3G. In den C3G CBR transfizierten Zellen konnten wir eine signifikant erniedrigte Aktivierung des Transkriptionsfaktors Elk-1 im Vergleich zur Kontrolle registrieren (Abb. 3.7). Den gleichen Effekt konnten wir für Zellen zeigen, in denen RapGap überexprimiert wird. RapGap ist ein GAP, das Rap1 in den inaktiven Zustand versetzt und somit die Elk-1 Aktivierung hemmt (Abb. 3.7). Somit spielt das Adapterprotein Crk II eine entscheidende Rolle in der GLP-1 abhängigen Aktivierung der mitogenen ERK1/2 Signaltransduktionskaskade.

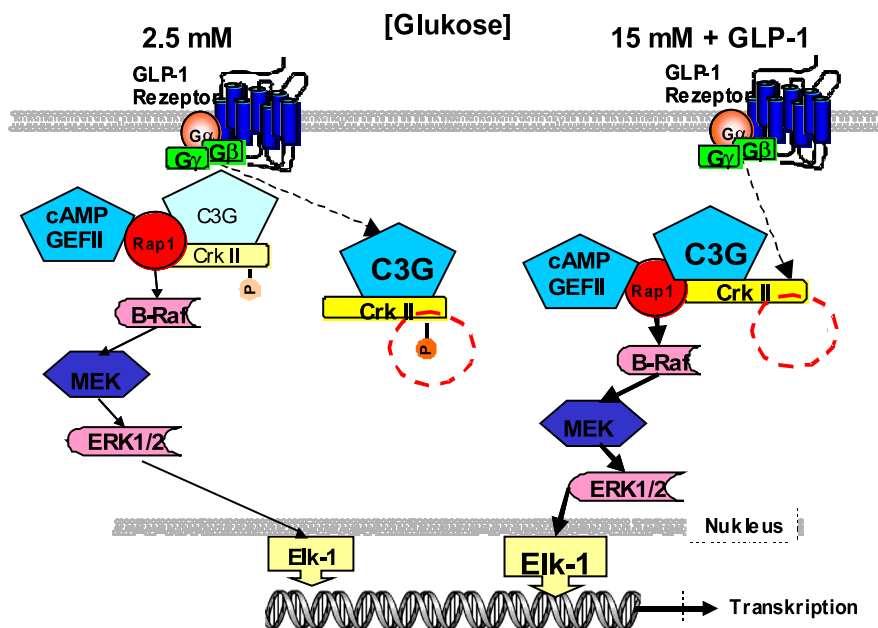


Abbildung 4.1: Crk II wird durch Stimulation mit GLP-1 vermindert phosphoryliert und erlaubt dem konstitutiv aktiven C3G vermutlich durch eine Konformationsänderung eine verstärkte Aktivierung von Rap1.

4.3 Komplexbildung der Signaltransduktionsmodule ERK1/2 und PI3K/PKB via Rap1 und IRS2

Der ERK1/2 Signaltransduktionsweg vermittelt entgegen früheren Erkenntnissen keinen linearen Informationsfluß von „aussen nach innen“, sondern ist mit den anderen mitogenen Signaltransduktionsmodulen so vernetzt, daß extrazelluläre Signale auch an die parallel agierenden Signaltransduktionskaskaden weitergeleitet werden und somit komplexe Reaktionen durch eine geringe Anzahl an Komponenten ausgelöst werden können [67]. Für pankreatische beta-Zellen konnten wir zeigen, dass der ERK1/2 Signaltransduktionsweg über die GTPase Rap1 in Verbindung mit der PI3K/PKB Kaskade steht und Rap1 in der Lage ist, die PI3K Glukose- und GLP-1 abhängig zu aktivieren. Rap1 bindet bei niedriger und hoher Glukosekonzentration an „insulin receptor substrate 2“ [IRS2]. IRS2 ist ein essentieller Bestandteil der PI3K/PKB Signaltransduktionskaskade und agiert als Vermittler der Insulin und IGF-1 Rezeptortyrosinkinasen. IRS2 ist in der Lage über SH2-Domänen in Interaktion mit Lipidkinasen (z.B. PI3K) oder Adapterproteinen (z. B Crk II) zu treten [53]. Untersuchungen an IRS2^{-/-} Knock-Out Mäusen ergaben, dass diese Tiere einen Diabetes mellitus Typ 2, verursacht durch defekte Insulinsignaltransduktion der Leber, inadäquate beta-Zellhyperplasie und Adipositas durch hypothalamische Leptinresistenz, entwickeln. Der hepatische Defekt nimmt hierbei die entscheidende Position ein [41]. Stimuliert man IRS2^{-/-} Mäuse mit Exendin-4, so kann man feststellen, dass hier vor allem die langfristigen positiven Effekte des GLP-1 Agonisten auf das beta-Zellwachstum und Überleben gestört und somit abhängig von der IRS2-vermittelten Signaltransduktion sind [53].

Unsere Untersuchungen von IRS2 in INS 1E Zellen unter Glukose- und GLP-1 Stimulation ergaben nach Zugabe hoher Glukosekonzentrationen eine vermehrte Interaktion von IRS2 mit Rap1 (Abb. 3.2). Zusätzlich kann die Phosphorylierung und somit Aktivierung von IRS2 durch die Stimulation mit GLP-1 gesteigert werden (Abb. 3.1). Bezüglich der Downstreamkinase von IRS2, der PI3K, konnte schon in anderen Zellsystemen wie z.B. in thyroidalen Zellen gezeigt werden, dass Rap1 eine Bindung mit der PI3K eingeht und diese möglicherweise aktiviert [14]. Betrachtet

man nun die Komplexbildung der PI3K mit Rap1 in INS 1E Zellen, so kann im Gegensatz zu der Interaktion Rap1/IRS2 eine konstante Bindung von Rap1 mit der PI3K verzeichnet werden (Abb. 3.3). Dies konnte sowohl für die regulatorische Untereinheit p85 α als auch für die katalytische Untereinheit p110 α gezeigt werden (Abb. 3.3). Ebenfalls konstant und unabhängig von den Stimulationsbedingungen liegt eine Bindung des Crk II / C3G Komplex mit der regulatorischen Untereinheit der PI3K p85 α vor (Abb. 3.6, 3.9). Untersucht man jedoch den Funktionszustand der PI3K, so wird dieser in dem stimulationsunabhängigen, konstanten Komplex mit Rap1, C3G und Crk II nicht nur von Glukose sondern auch durch die Stimulation mit GLP-1 reguliert. Sowohl hohe Glukosekonzentration als auch GLP-1 Stimulation fördern die PI3K Aktivierung durch Phosphorylierung der regulatorischen Untereinheit p85 α (Abb. 3.1, 3.5, 3.8), da phosphoryliertes p85 α seine inhibierende Wirkung auf die katalytische Untereinheit der PI3K (p110 α) verliert [82].

In Zusammenschau der Untersuchungsergebnisse ist davon auszugehen, dass unter Stimulation mit hoher Glukosekonzentration und GLP-1 der Rap1/Crk II/C3G/PI3K Komplex vermehrt an IRS2 bindet, was in Zusammenhang mit der verstärkten Phosphorylierung von IRS2 und p85 α die gesteigerte Aktivierung der antiapoptotischen PI3K/PKB Signaltransduktionskaskade zur Folge hat (Abb. 4.2).

Somit fördert GLP-1 die Aktivierung der PI3K/PKB nach unserer Ansicht über zwei unterschiedliche Mechanismen: zum einen steigert GLP-1 die Expression des IRS2 Gens über Rekrutierung der PKA/CREB Signaltransduktionskaskade [35], zum andern übt GLP-1 durch Komplexbildung der GTPase Rap1 mit IRS2 direkten positiven Einfluß auf die Aktivierung der PI3K/PKB aus.

Diese Position von Rap1 als positiver Regulator der PI3K/PKB in INS 1E Zellen spiegelt wiederum die Bedeutung von Rap1 neben Ras bezüglich mitogener Signaltransduktionskaskaden in beta-Zellen wider. Betrachtet man im Gegensatz zu endokrinen oder neuronalen Zellen (z.B. „C6 rat glioma cells“) B-Lymphozyten, in denen Rap1 hauptsächlich als Antagonist zu Ras agiert, so hat Rap1 in diesen Zellen einen inhibierenden Effekt auf die PI3K. Wird in B-Lymphozyten die Funktion von Rap1 gehemmt, so resultiert eine verstärkte Aktivierung des PI3K/PKB

Signaltransduktionsweges [18]. Somit finden wir auch bezüglich des PI3K/PKB Signaltransduktionsmoduls je nach Zellkontext und Bedeutung gegenüber Ras eine differierende Wirkungsweise der GTPase Rap1.

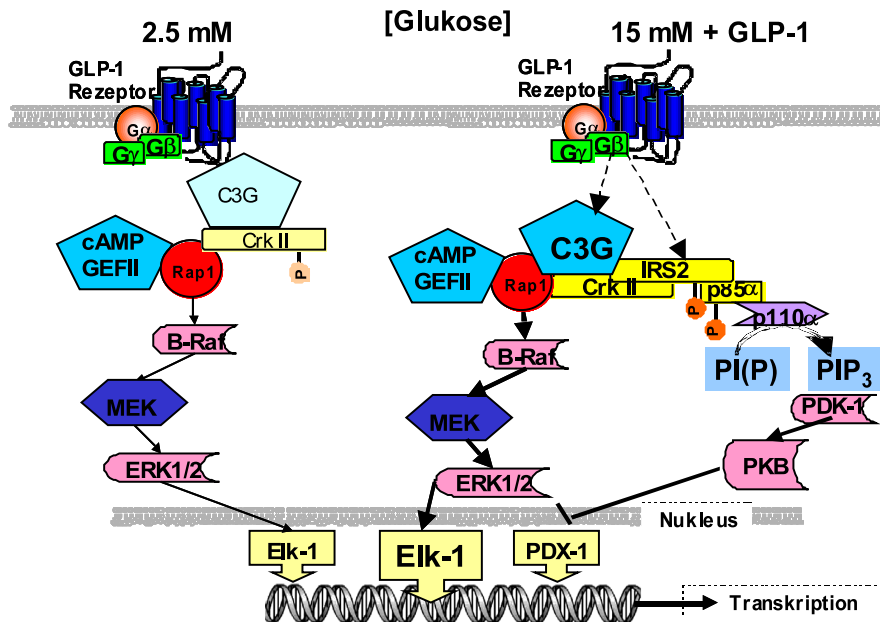


Abbildung 4.2: Unter GLP-1 Stimulation kann eine verstärkte Interaktion zwischen den ERK1/2 MAPK und PI3K/PKB Signaltransduktionsmodulen am ehesten durch Komplexbildung von Rap1 mit IRS2 verzeichnet werden. Weiterhin kommt es zu einer gesteigerten Aktivierung des PI3K/PKB Signaltransduktionswegs unter GLP-1 Stimulation (hier nicht im Vergleich dargestellt).

4.4 Pyk2 als potentielle Schaltstelle GLP-1- abhängiger Signaltransduktionskaskaden

Pyk2 gehört zu den nicht-rezeptorabhängigen, prolinreichen Tyrosinkinasen der FAK-Familie und kann unter anderem durch Stresssignale, G-Protein gekoppelte Rezeptoren, Membrandepolarisation und extrazelluläre Signale, die die Calciumkonzentration der Zellen erhöhen, aktiviert werden [5, 8]. Pyk2 wird hauptsächlich im zentralen Nervensystem und in Zellen hämatopoetischen Ursprungs exprimiert und ist durch seine Eigenschaft, Tyrosinreste zu phosphorylieren, in verschiedene physiologische Prozesse wie Zellwachstum, Differenzierung und Zytoskelettfunktion

involviert. Wird Pyk2 phosphoryliert, so führt dies über Rekrutierung von Kinasen der Src-Familie zu einer Aktivierung der MAPK ERK1/2 und JNK/SAPK [5]. Die molekularen Mechanismen, die Pyk2 nutzt, um extrazelluläre Stimuli spezifisch an die unterschiedlichen MAPK-Signaltransduktionskaskaden weiterzuleiten, sind nur teilweise bekannt. So konnte zum Beispiel in embryonalen 293T Zellen gezeigt werden, dass zur Aktivierung der JNK/SAPK durch Pyk2 der Crk II/p130Cas Komplex benötigt wird, während Pyk2 zur Aktivierung von ERK1/2 den Komplex „growth factor receptor-bound protein 2“ [Grb2]/„Son-of-sevenless“ [Sos] rekrutiert [8].

Obwohl Pyk2 hauptsächlich in neuronalen und hämatopoetischen Zellen vorkommt, ergaben unsere Untersuchungen, dass Pyk2 auch in pankreatischen beta-Zellen exprimiert wird und dass die Expression durch Stimulation mit hoher Glukosekonzentration gesteigert werden kann (Abb. 3.11). Entsprechend der Zeit- und Dosis-abhängigen Phosphorylierung von Pyk2 durch den Wachstumsfaktor „nerve growth factor“ [NGF] in neuronalen PC12 Zellen [54], konnten wir weiterhin zeigen, dass die Stimulation mit dem Inkretinhormon GLP-1 bzw. mit hoher Glukosekonzentration eine vermehrte Phosphorylierung der Pyk2 zur Folge hat (Abb. 3.11), was einer verstärkten Kinaseaktivierung entsprechen könnte [5]. Die Protein-Tyrosin-Kinase Pyk2 nimmt also potentiell eine Schlüsselposition in der GLP-1 vermittelten Signaltransduktion ein. Da ERK1/2 in pankreatischen beta-Zellen GLP-1-abhängig über das Rap1/B-Raf Modul aktiviert wird, haben wir die Assoziation mit dem entscheidenden Adaptermolekül Crk II untersucht und Pyk2 in einem Komplex mit Crk II darstellen können. Pyk2 wird in diesem Komplex verstärkt durch Glukose und GLP-1 Stimulation phosphoryliert (Abb. 3.8). Diese vermehrte Phosphorylierung bleibt allerdings ohne Einfluß auf das Bindungsverhalten zwischen Crk II und Pyk2 (Abb. 3.10). Widersprüchlich zu diesen Daten zeigt sich bei der Durchführung einer Pyk2-Immunpräzipitation ein durch die Stimulation mit hoher Glukosekonzentration und GLP-1 vermindert bindendes Crk II (Abb. 3.12).

Nach unseren Ergebnissen entfaltet Pyk2 ihren Einfluß auf die ERK1/2 MAPK nicht über das Adapterprotein Crk II, wird allerdings in dem Komplex mit Crk II abhängig von der Glukose und GLP-1 Stimulation vermehrt aktiviert, sodass es zu

untersuchen gilt, an welcher Position des ERK1/2 Signaltransduktionswegs Pyk2 regulierend eingreift.

Betrachtet man den Einfluss von Pyk2 auf die PI3K/PKB Signaltransduktionskaskade, so ist Pyk2 sowohl mit IRS2 als auch mit der regulatorischen Untereinheit der PI3K in einem Komplex assoziiert (Abb. 3.12, 3.13). Bei gleichmäßiger Bindung zwischen IRS2 und Pyk2 wird IRS2 unter Glukose und GLP-1 Stimulation vermehrt tyrosinphosphoryliert (Abb. 3.13). Dieser Effekt könnte durch die unter Glukose und GLP-1 Stimulation gesteigerten Kinaseaktivität der Pyk2 ausgelöst werden, sodass zu vermuten ist, dass Pyk2 als Rezeptor-unabhängige Tyrosinkinase zur GLP-1- und Glukose-abhängigen Aktivierung des PI3K/PKB Signaltransduktionswegs benötigt wird (Abb. 4.3).

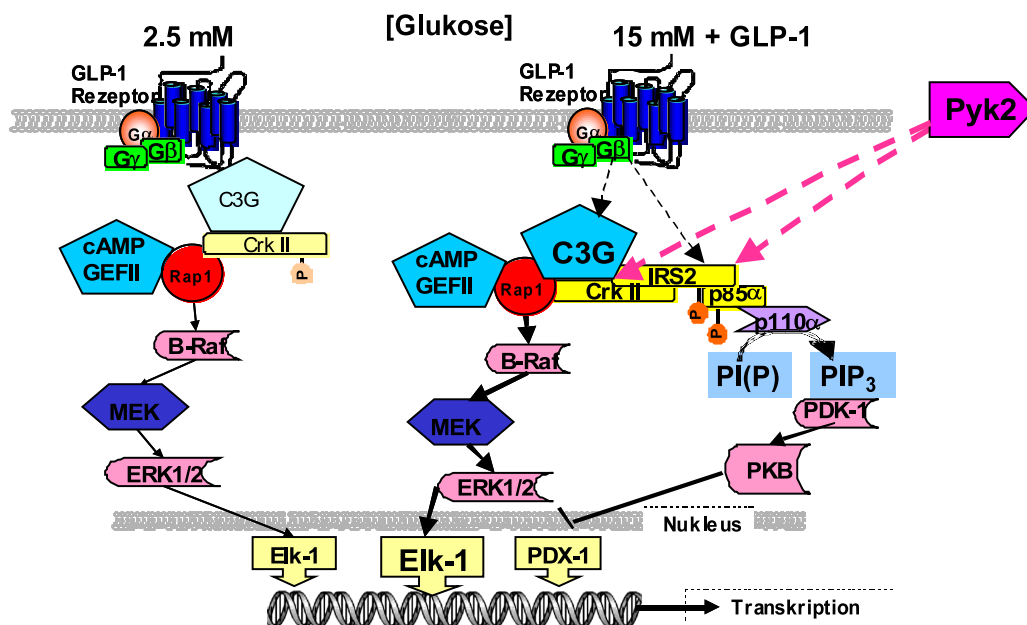


Abbildung 4.3: Die rezeptorunabhängige Tyrosinkinase Pyk2 konnte als Element GLP-1 regulierter Signaltransduktionskaskaden identifiziert werden. Pyk2 scheint über Phosphorylierung von IRS2 Einfluß auf das PI3K/PKB Modul zu nehmen. Welchen Stellenwert Pyk2 in der ERK1/2 MAPK Kaskade einnimmt, bleibt derzeit noch unklar, es konnte lediglich eine Komplexbildung mit Crk II gezeigt werden.

4.5 Shc: ein GLP-1 reguliertes Adapterprotein

Shc ist ein Adapterprotein, das zwei phosphotyrosinbindende Domänen (SH2 und „phospho-tyrosin binding domain“ [PTB]) und eine CH1-Region, die zur Tyrosinphosphorylierung von Shc benötigt wird, enthält [62]. Mit Hilfe der SH2- und PTB-Domäne bindet Shc an aktivierte Rezeptoren und löst durch Rekrutierung zytoplasmatischer Substrate an die Zellmembran verschiedene Signaltransduktionskaskaden aus. Über den Mechanismus der Rezeptortyrosinkinasen ist Shc in die Signaltransduktion verschiedener Wachstumsfaktoren wie „epidermal growth factor“ [EGF], NGF, „platelet-derived growth factor“ [PDGF] oder Insulin, die in einer Aktivierung von Ras resultieren, involviert. Das nach Bindung an eine Rezeptortyrosinkinase phosphorylierte Shc bildet über Grb2 einen Komplex mit Sos, das als GEF Ras aktiviert [11].

Über die Funktion, die Shc in pankreatischen beta-Zellen einnimmt, existieren verschiedene Ansichten. Während einerseits eine Beteiligung von Shc bei der Proliferation von beta-Zellen abgelehnt wird [49], ergaben Untersuchungen an pankreatischen Epithelzellen im Tiermodell, dass in der Regenerationsphase der Inselzellen erhöhte Konzentrationen von phosphoryliertem Shc vorliegen [37]. In pankreatischer beta-Zellen konnten wir zeigen, dass die Stimulation mit dem Wachstumsfaktor-ähnlichen, mitogenen GLP-1 eine gesteigerte Phosphorylierung und somit Aktivierung von Shc zur Folge hat (Abb. 3.14). Dies lässt darauf schließen, dass Shc in der mitogenen Signaltransduktionskaskade von GLP-1 eine Rolle spielt (Abb. 4.4).

Es gilt nun weiterhin zu untersuchen, ob Shc entsprechend der Integrin-vermittelten ERK1/2-Aktivierung in Swiss 3T3 Zellen den Signaltransduktionsweg über das Modul Rap1/B-Raf wählt [6]. Dies würde bedeuten, dass die Theorie von Ras/Raf-1 als „Downstreamkinasen“ des Adapterproteins Shc in beta-Zellen [37] nicht aufrecht erhalten werden kann, sondern ebenfalls von Rap1/B-Raf abgelöst wird.

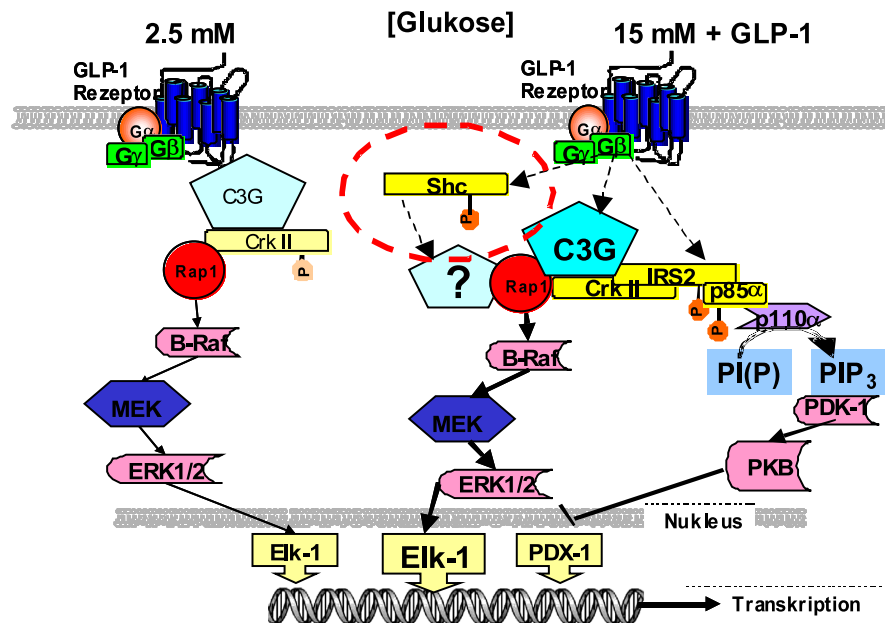


Abbildung 4.4: Das Adapterprotein Shc wird GLP-1-abhängig phosphoryliert. Dies lässt darauf schließen, dass Shc in der Signaltransduktionskaskade von GLP-1 eine Rolle spielt. Ob Shc durch Bindung mit einem Rap1-spezifisches GEF den Signaltransduktionsweg über das Modul Rap1/B-Raf wählt, ist Gegenstand zukünftiger Experimente.

4.6 Schlussfolgerung

Da die Abnahme der beta-Zellmasse in der Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 2 eine wichtige Position einnimmt, stellt gerade die Expansion von beta-Zellen eine bedeutende Eigenschaft des Inkretinhormons GLP-1 dar [12]. Bei der Aktivierung mitogener Signaltransduktionskaskaden durch GLP-1 kommt der kleinen GTPase Rap1 als Aktivator der MAPK Kinase Kinase B-Raf eine Schlüsselrolle zu [73]. In dieser Arbeit wurden die Regulationsmodalitäten von Rap1 unter GLP-1 Stimulation näher untersucht und festgestellt, dass die Aktivierung von Rap1 durch das Adapterprotein Crk II gesteuert wird. Weiterhin konnte die Verbindung des ERK1/2 MAPK Weges mit der PI3K/PKB Signaltransduktionskaskade über Rap1 bzw. IRS2 aufgezeigt werden. Diese Erkenntnisse haben für die Behandlung des Diabetes mellitus insofern Bedeutung, da die Modulation von Adapterproteinen einen neuen therapeutischen Ansatz zur *in vivo* Steigerung der beta-Zellmasse darstellen

kann bzw. die *in vitro* Expansion von Inselzellen neue Perspektiven in dem Bereich Inselzelltransplantation eröffnet.

Weiterhin konnten die Tyrosinkinase Pyk2 sowie das Adapterprotein Shc als Bestandteile GLP-1 regulierter Signaltransduktionswege identifiziert werden. In wie weit sich auch diese Proteine als molekulare Angriffspunkte für beta-Zellproliferation eignen, muss durch weitere Untersuchungen im Bereich der mitogenen Signaltransduktion geklärt werden.

Literaturverzeichnis

- [1] Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molekularbiologie der Zelle*. Wiley-VCH, 4 edition, 2004.
- [2] Allgot B, Cockram CS, Dahlquist G, Fezeu L, Gan D, Hynes K, James WPT, Leach R, Mbanya JC, Patterson C, Regniers C, Rigby N, Shaw J, Sicree R, Singh R, Soltsz G, Tapp R, Williams R, Zimmet P. Diabetes atlas 2nd edition. *www.eatlas.idf.org*, 2003.
- [3] Anonymus. Neue therapie des diabetes mellitus. *www.aerztezeitung.de*, 23.11.2006.
- [4] Arnette D, Gibson TB, Lawrence MC, January B, Khoo S, McGlynn K, Vanderbilt CA, Cobb MH. Regulation of erk1 and erk2 by glucose and peptide hormones in pancreatic beta cells. *Journal of Biological Chemistry*, 278(35):32517–32525, 2003.
- [5] Avraham H, Park SY, Schinkmann K, Avraham S. Raftk/pyk2-mediated cellular signalling. *Cell Signaling*, 12(3):123–133, 2000.
- [6] Barberis L, Wary KK, Fiucci G, Liu F, Hirsch E, Brancaccio M, Altruda F, Tarone G, Giancotti FG. Distinct roles of the adaptor protein shc and focal adhesion kinase in integrin signaling to erk. *Journal of Biological Chemistry*, 275(47):36532–36540, 2000.
- [7] Barnett AH, Spiliopoulos AJ, Pyke DA, Stubbs WA, Burrin J, Alberti KG. Metabolic studies in unaffected co-twins of non-insulin-dependent diabetics. *British Medical Journal (Clinical Research Edition)*, 282(6277):1656–1658, 1981.

- [8] Blaukat A, Ivankovic-Dikic I, Gronroos E, Dolfi F, Tokiwa G, Vuori K, Dikic I. Adaptor proteins grb2 and crk couple pyk2 with activation of specific mitogen-activated protein kinase cascades. *Journal of Biological Chemistry*, 274(21):14893–14901, 1999.
- [9] Boden G. Pathogenesis of type 2 diabetes. insulin resistance. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 30(4):801–815, 2001.
- [10] Boden G, Shulman GI. Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and beta-cell dysfunction. *European Journal of Clinical Investigation*, 32(Supplement 3):14–23, 2002.
- [11] Bonfini L, Migliaccio E, Pelicci G, Lanfrancone L, Pelicci PG. Not all shc's roads lead to ras. *Trends in Biochemical Sciences*, 21(7):257–261, 1996.
- [12] Bonner-Weir S, Weir GC. New sources of pancreatic beta-cells. *Nature Biotechnology*, 23(7):857–861, 2005.
- [13] Bos JL. All in the family? new insights and questions regarding interconnectivity of ras, rap1 and ral. *EMBO Journal*, 17(23):6776–6782, 1998.
- [14] Bos JL, de Rooij J, Reedquist KA. Rap1 signalling: adhering to new models. *Nature Reviews Molecular and Cellular Biology*, 2(5):369–377, 2001.
- [15] Brubaker PL, Drucker DJ. Minireview: Glucagon-like peptides regulate cell proliferation and apoptosis in the pancreas, gut and central nervous system. *Endocrinology*, 145(6):2653–2659, 2004.
- [16] Buteau J, Roduit R, Susini S, Prentki M. Glucagon-like peptide-1 promotes dna synthesis, activates phosphatidylinositol 3-kinase and increases transcription factor pancreatic and duodenal homeobox gene 1 (pdx-1) dna binding activity in beta (ins-1)-cells. *Diabetologia*, 42(7):856–864, 1999.
- [17] Cass LA, Summers SA, Prendergast GV, Backer JM, Birnbaum MJ, Meinkoth JL. Protein kinase a-dependent and -independent signaling pathways contri-

- bute to cyclic amp-stimulated proliferation. *Molecular and Cellular Biology*, 19(9):5882–5891, 1999.
- [18] Christian SL, Lee RL, McLeod SJ, Burgess AE, Li AH, Dang-Lawson M, Lin KB, Gold MR. Activation of the rap gtpases in b lymphocytes modulates b cell antigen receptor-induced activation of akt but has no effect on mapk activation. *Journal of Biological Chemistry*, 278(43):41756–41767, 2003.
- [19] Del Prato S, Marchetti P. Beta- and alpha-cell dysfunction in type 2 diabetes. *Hormon and Metabolic Research*, 36(11-12):775–781, 2004.
- [20] Dickson LM, Lingohr MK, McCuaig J, Hugl SR, Snow L, Kahn BB, Myers MG Jr, Rhodes CJ. Differential activation of protein kinase b and p70(s6)k by glucose and insulin-like growth factor 1 in pancreatic beta-cells (ins-1). *Journal of Biological Chemistry*, 276(24):21110–21120, 2001.
- [21] Dickson LM, Rhodes CJ. Pancreatic beta-cell growth and survival in the onset of type 2 diabetes: a role for protein kinase b in the akt? *American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism*, 287(2):E192–198, 2004.
- [22] Eriksson J, Franssila-Kallunki A, Ekstrand A, Saloranta C, Widen E, Schalin C, Groop L. Early metabolic defects in persons at increased risk for non-insulin-dependent diabetes mellitus. *New England Journal of Medicine*, 321(6):337–343, 1989.
- [23] Fehmann HC, Goke R, Goke B. Cell and molecular biology of the incretin hormones glucagon-like peptide-1 and glucose-dependent insulin releasing polypeptide. *Endocrine Reviews*, 16(3):390–410, 1995.
- [24] Feller SM, Posern G, Voss J, Kardinal C, Sakkab D, Zheng J, Knudsen BS. Physiological signals and oncogenesis mediated through crk family adapter proteins. *Journal of Cellular Physiology*, 177(4):535–552, 1998.
- [25] Friedrichsen BN, Neubauer N, Lee YC, Gram VK, Blume N, Petersen JS, Nielsen JH, Moldrup A. Stimulation of pancreatic beta-cell replication by incretins

- involves transcriptional induction of cyclin d1 via multiple signalling pathways. *Journal of Endocrinology*, 188(3):481–492, 2006.
- [26] Gloyn AL, Weedon MN, Owen KR, Turner MJ, Knight BA, Hitman G, Walker M, Levy JC, Sampson M, Halford S, McCarthy MI, Hattersley AT, Frayling TM. Large-scale association studies of variants in genes encoding the pancreatic beta-cell katp channel subunits kir6.2 (kcnj11) and sur1 (abcc8) confirm that the kcnj11 e23k variant is associated with type 2 diabetes. *Diabetes*, 52(2):568–572, 2003.
- [27] Hafner S, Adler HS, Mischak H, Janosch P, Heidecker G, Wolfman A, Pippig S, Lohse M, Ueffing M, Kolch W. Mechanism of inhibition of raf-1 by protein kinase a. *Molecular and Cellular Biology*, 14(10):6696–6703, 1994.
- [28] Häring HU, Matthei S. Awmf leitlinie: Behandlung des diabetes mellitus typ 2. *AWMF Leitlinienregister*, NR 057/012K, 2002.
- [29] Hattori M, Minato N. Rap1 gtpase: functions, regulation, and malignancy. *Journal of Biochemistry (Tokyo)*, 134(4):479–484, 2003.
- [30] Holst JJ. Glucagon-like peptide 1 (glp-1): An intestinal hormone, signalling nutritional abundance, with an unusual therapeutic potential. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 10(6):229–235, 1999.
- [31] Holst JJ, Orskov C. The incretin approach for diabetes treatment: modulation of islet hormone release by glp-1 agonism. *Diabetes*, 53(Supplement 3):S197–204, 2004.
- [32] Holz GG, Chepurny OG. Glucagon-like peptide-1 synthetic analogs: new therapeutic agents for use in the treatment of diabetes mellitus. *Current Medicinal Chemistry*, 10(22):2471–2483, 2003.
- [33] Hörsch D, Schrader J, Göke R. Glucagon-like peptide 1 receptor. *Nature AfCS Molecule Pages*, page (doi:10.1038/mp.a001042.01), 2005.

- [34] Hotamisligil GS, Spiegelman BM. Tumor necrosis factor alpha: a key component of the obesity-diabetes link. *Diabetes*, 43(11):1271–1278, 1994.
- [35] Jhala US, Canettieri G, Sreaton RA, Kulkarni RN, Krajewski S, Reed J, Walker J, Lin X, White M, Montminy M. camp promotes pancreatic beta-cell survival via creb-mediated induction of irs2. *Genes and Development*, 17(13):1575–1580, 2003.
- [36] Karhoff D, Sauer S, Schrader J, Arnold R, Fendrich V, Bartsch K, Horsch D. The rap/b-raf signaling complex is a putative therapeutic target in neuroendocrine tumors of the digestive tract. *Neuroendocrinology*, in press, 2007.
- [37] Kayali AG, Stotland A, Gunst KV, Kritzik M, Liu G, Dabernat S, Zhang YQ, Wu W, Sarvetnick N. Growth factor-induced signaling of the pancreatic epithelium. *Journal of Endocrinology*, 185(1):45–56, 2005.
- [38] Kern PA, Ranganathan S, Li C, Wood L, Ranganathan G. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism*, 280(5):745–751, 2001.
- [39] Kerner W, Brückel J, Böhm BO. Definition, klassifikation und diagnostik des diabetes mellitus. *Evidenzbasierte Leitlinie DDG*, 2004.
- [40] Kim MJ, Kang JH, Park YG, Ryu GR, Ko SH, Jeong IK, Koh KH, Rhie DJ, Yoon SH, Hahn SJ, Kim MS, Jo YH. Exendin-4 induction of cyclin d1 expression in ins-1 beta-cells: involvement of camp-responsive element. *Journal of Endocrinology*, 188(3):623–633, 2006.
- [41] Kubota N, Terauchi Y, Tobe K, Yano W, Suzuki R, Ueki K, Takamoto I, Satoh H, Maki T, Kubota T, Moroi M, Okada-Iwababu M, Ezaki O, Nagai R, Ueta Y, Kadowaki T, Noda T. Insulin receptor substrate 2 plays a crucial role in beta cells and the hypothalamus. *Journal of Clinical Investigation*, 114(7):917–927, 2004.

- [42] Kwon G, Pappan KL, Marshall CA, Schaffer JE, McDaniel ML. camp dose-dependently prevents palmitate-induced apoptosis by both protein kinase a- and camp-guanine nucleotide exchange factor-dependent pathways in beta-cells. *Journal of Biological Chemistry*, 279(10):8938–8945, 2004.
- [43] Lillioja S, Mott DM, Spraul M, Ferraro R, Foley JE, Ravussin E, Knowler WC, Bennett PH, Bogardus C. Insulin resistance and insulin secretory dysfunction as precursors of non-insulin-dependent diabetes mellitus. prospective studies of pima indians. *New England Journal of Medicine*, 329(27):1988–1992, 1993.
- [44] Ling L, Zhu T, Lobie PE. Src-crk-c3g-dependent activation of rap1 switches growth hormone-stimulated p44/42 map kinase and jnk/sapk activities. *Journal of Biological Chemistry*, 278(29):27301–27311, 2003.
- [45] List JF, Habener JF. Glucagon-like peptide 1 agonists and the development and growth of pancreatic beta-cells. *American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism*, 286(6):E875–881, 2004.
- [46] Lohmueller KE, Pearce CL, Pike M, Lander ES, Hirschhorn JN. Meta-analysis of genetic association studies supports a contribution of common variants to susceptibility to common disease. *Nature Genetics*, 33(2):177–182, 2003.
- [47] Memisoglu A, Hu FB, Hankinson SE, Liu S, Meigs JB, Altshuler DM, Hunter DJ, Manson JE. Prospective study of the association between the proline to alanine codon 12 polymorphism in the ppargamma gene and type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 26(10):2915–2917, 2003.
- [48] Nauck MA, Heimesaat MM, Orskov C, Holst JJ, Ebert R, Creutzfeldt W. 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. *Journal of Clinical Investigation*, 91(1):301–307, 1993.
- [49] Niessen M. On the role of irs2 in the regulation of functional beta-cell mass. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 112(2):65–73, 2006.

- [50] Okada S, Matsuda M, Anafi M, Pawson T, Pessin JE. Insulin regulates the dynamic balance between ras and rap1 signaling by coordinating the assembly states of the grb2-sos and crk-c3g complexes. *EMBO Journal*, 17(9):2554–2565, 1998.
- [51] Parhofer K, Landgraf R, Göke B. Diabetes mellitus. *Innere Medizin, Hrsg. Berdel WE, Böhm M, Classen M, Diehl V, Kochsiek K, Schmiegel W*, pages 1531–1561, 2005.
- [52] Parikh H, Groop L. Candidate genes for type 2 diabetes. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 5(2):151–176, 2004.
- [53] Park S, Dong X, Fisher TL, Dunn S, Omer AK, Weir G, White MF. Exendin-4 uses irs2 signaling to mediate pancreatic beta cell growth and function. *Journal of Biological Chemistry*, 281(2):1159–1168, 2006.
- [54] Park SY, Avraham H, Avraham S. Characterization of the tyrosine kinases raftk/pyk2 and fak in nerve growth factor-induced neuronal differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 275(26):19768–19777, 2000.
- [55] Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH. Mitogen-activated protein (map) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocrine Reviews*, 22(2):153–183, 2001.
- [56] Perfetti R, Merkel P. Glucagon-like peptide-1: a major regulator of pancreatic beta-cell function. *European Journal of Endocrinology*, 143(6):717–725, 2000.
- [57] Pierce M, Keen H, Bradley C. Risk of diabetes in offspring of parents with non-insulin-dependent diabetes. *Diabetic Medicine*, 12(1):6–13, 1995.
- [58] Poirout V, Robertson RP. Minireview: Secondary beta-cell failure in type 2 diabetes - a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity. *Endocrinology*, 143(2):339–342, 2002.

- [59] Porzio O, Federici M, Hribal ML, Lauro D, Accili D, Lauro R, Borboni P, Sesti G. The gly972arg amino acid polymorphism in irs-1 impairs insulin secretion in pancreatic beta cells. *Journal of Clinical Investigation*, 104(3):357–364, 1999.
- [60] Posern G, Rapp UR, Feller SM. The crk signaling pathway contributes to the bombesin-induced activation of the small gtpase rap1 in swiss 3t3 cells. *Oncogene*, 19(54):6361–6368, 2000.
- [61] Rajala MW, Scherer PE. Minireview: The adipocyte—at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. *Endocrinology*, 144(9):3765–3773, 2003.
- [62] Ravichandran KS. Signaling via shc family adapter proteins. *Oncogene*, 20(44):6322–6330, 2001.
- [63] Rebhun JF, Castro AF, Quilliam LA. Identification of guanine nucleotide exchange factors (gefs) for the rap1 gtpase. regulation of mr-gef by m-ras-gtp interaction. *Journal of Biological Chemistry*, 275(45):34901–34908, 2000.
- [64] Rinninger F, Standl E. Diabetes mellitus. *Therapie innerer Krankheiten, Hrsg. Paumgartner G*, pages 731–769, 2005.
- [65] Robertson RP, Harmon J, Tran PO, Poitout V. Beta-cell glucose toxicity, lipotoxicity, and chronic oxidative stress in type 2 diabetes. *Diabetes*, 53(Supplement 1):S119–124, 2004.
- [66] Robertson RP, Harmon J, Tran PO, Tanaka Y, Takahashi H. Glucose toxicity in beta-cells: type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection. *Diabetes*, 52(3):581–587, 2003.
- [67] Schaeffer HJ, Weber MJ. Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Molecular and Cellular Biology*, 19(4):2435–2444, 1999.
- [68] Senn JJ, Klover PJ, Nowak IA, Zimmers TA, Koniaris LG, Furlanetto RW, Mooney RA. Suppressor of cytokine signaling-3 (socs-3), a potential mediator of

- interleukin-6-dependent insulin resistance in hepatocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 278(16):13740–13746, 2003.
- [69] Shaywitz AJ, Greenberg ME. Creb: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annual Reviews Biochemistry*, 68:821–861, 1999.
- [70] Stork PJ, Dillon TJ. Multiple roles of rap1 in hematopoietic cells: complementary versus antagonistic functions. *Blood*, 106(9):2952–2961, 2005.
- [71] Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haeften TW. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet*, 365(9467):1333–1346, 2005.
- [72] Thorens B. Expression cloning of the pancreatic beta cell receptor for the glucagon-like peptide 1. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 89(18):8641–8645, 1992.
- [73] Trümper J, Ross D, Jahr H, Brendel MD, Göke R, Hörsch D. The rap-b-raf signalling pathway is activated by glucose and glucagon-like peptide-1 in human islet cells. *Diabetologia*, 48(8):1534–1540, 2005.
- [74] Turner R. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (ukpds 33). uk prospective diabetes study (ukpds) group. *Lancet*, 352(9131):837–853, 1998.
- [75] Vilsboll T, Holst JJ. Incretins, insulin secretion and type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia*, 47(3):357–366, 2004.
- [76] Wang Q, Li L, Xu E, Wong V, Rhodes C, Brubaker PL. Glucagon-like peptide-1 regulates proliferation and apoptosis via activation of protein kinase b in pancreatic ins-1 beta cells. *Diabetologia*, 47(3):478–487, 2004.
- [77] Wang Z, Dillon TJ, Pokala V, Mishra S, Labudda K, Hunter B, Stork PJ. Rap1-mediated activation of extracellular signal-regulated kinases by cyclic amp is

- dependent on the mode of rap1 activation. *Molecular and Cellular Biology*, 26(6):2130–2145, 2006.
- [78] Widmann C, Burki E, Dolci W, Thorens B. Signal transduction by the cloned glucagon-like peptide-1 receptor: comparison with signaling by the endogenous receptors of beta cell lines. *Molecular Pharmacology*, 45(5):1029–1035, 1994.
- [79] Wilkinson MG, Millar JB. Control of the eukaryotic cell cycle by map kinase signaling pathways. *FASEB Journal*, 14(14):2147–2157, 2000.
- [80] Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, Froguel P, Foufelle F, Ferre P, Carling D, Kimura S, Nagai R, Kahn BB, Kadowaki T. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating amp-activated protein kinase. *Nature Medicine*, 8(11):1288–1295, 2002.
- [81] Yki-Jarvinen H. Glucose toxicity. *Endocrine Reviews*, 13(3):415–431, 1992.
- [82] Yu J, Zhang Y, McIlroy J, Rordorf-Nikolic T, Orr GA, Backer JM. Regulation of the p85/p110 phosphatidylinositol 3'-kinase: stabilization and inhibition of the p110alpha catalytic subunit by the p85 regulatory subunit. *Molecular and Cellular Biology*, 18(3):1379–1387, 1998.
- [83] Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*, 414(6865):782–787, 2001.

Anhang A

Schaubildlegende

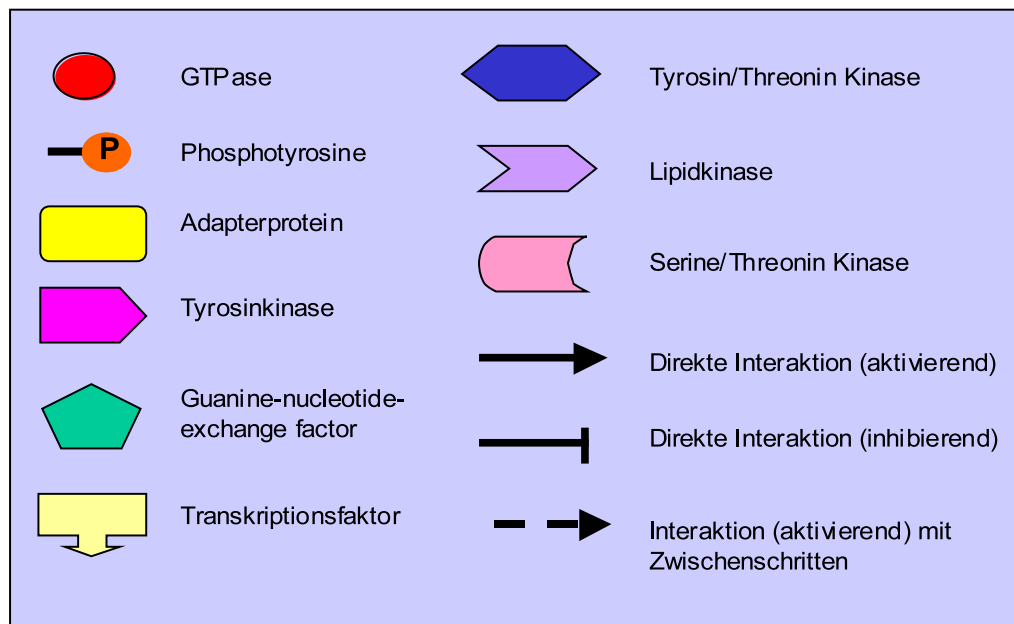


Abbildung A.1: Auflistung der in den Schaubildern eingesetzten Symbole.

Anhang B

Abkürzungen und Einheiten

B.1 Abkürzungen

APS	Ammoniumpersulfat
B-Raf	V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
BSA	Bovines Serum Albumin
C3G	Crk-SH3-guanine-nucleotide-releasing-factor
C3G CBR	C3G Crk binding region
CalDAG-GEF	Calcium and Diacylglycerol regulated guanine-nucleotide-exchange-factor
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate
CHO/IR	Chinese hamster ovary cells/insulin receptor
CREB	Cyclic-AMP-response-element-binding-protein
Crk II	CT10 regulator of kinase II
DPP IV	Dipeptidyl Peptidase IV
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsure
EGF	Epidermal growth factor
Elk-1	ELK1, member of ETS oncogene family
Epac	Exchange protein directly activated by cAMP
ERK1/2	Extracellular signal-regulated kinase 1 and 2

FAK	Focal adhesion kinase
FCS	Fetales Klber Serum
GAP	GTPase-activating-protein
GDP	Guanine-nucleotide diphosphate
GEF	Guanine-nucleotide-exchange-factor
GIP	Glucose-dependent insulintropic polypeptide
GLP-1	Glucagon-like peptide-1
Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2
GTP	Guanine-nucleotide triphosphate
IGF-1	Insulin-like growth factor-1
IL-6	Interleukin 6
IRS1	Insulin receptor substrate 1
IRS2	Insulin receptor substrate 2
JNK	C-Jun N-terminal kinase
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinasen
MTOR	Mammalian target of rapamycin
NF κ B	Nuclear factor kappa B
NGF	Nerve growth factor
PDGF	Platelet-derived growth factor
PDK-1	Phosphoinositol-dependent kinase-1
PDX-1	Pancreas duodenum homeobox-1
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PKA	Protein Kinase A
PKB	Protein Kinase B
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPAR γ	Proliferator-activated receptor gamma
PTB	Phospho-tyrosine binding domaine
Pyk2	Proline rich/ Ca 2+-activated tyrosine kinase
Raf-1	V-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1
Rap1	Ras-proximate-1

Ras	Rat sarcoma
SAPK	Stress-activated protein kinase
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SH2	Src homology region 2
SH3	Src homology region 3
Shc	Src-homolgy/collagen
SOCS	Suppressors of cytokine signaling
Sos	Son-of-sevenless
Src	Sarcome verursachendes Onkoprotein
TBS-T	Tris-Buffered Saline Tween-20
TNFalpha	Tumornekrosefaktor alpha
UKPDS	UK Prospective Diabetes Study

B.2 Einheiten

cm	Zentimeter
g	Gramm
°C	Grad Celsius
h	Stunden
kDa	Kilodalton
l	Liter
M	Mol
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimol
mV	Millivolt
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomol
pH	pH-Wert
V	Volt

Zusammenfassung

Ein wichtiger Faktor in der Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 2 ist die Dysfunktion der pankreatischen beta-Zellen, die zum einen durch eine funktionelle Störung und zum anderen durch einen Verlust von Betazellmasse gekennzeichnet ist. Das Inkretinhormon „glucagon-like peptide-1“ [GLP-1] besitzt neben seinen blutzuckersenkenden Eigenschaften auch die Fähigkeit, durch wachstumsfaktorähnliche Wirkung die pankreatische beta-Zellmasse zu expandieren. Dieser Effekt wird durch die Dosis- und Glukose-abhängige Stimulation der drei wichtigsten mitogenen Signaltransduktionsmodule cAMP/PKA, PI3K/PKB und ERK1/2 MAPK über die Aktivierung des G-Protein gekoppelten GLP-1 Rezeptors vermittelt. Eine Besonderheit endokriner Zellen ist, dass der ERK1/2 MAPK-Komplex vor allem über die GTPase Rap1 und nicht durch den Prototyp der kleinen GTPasen Ras aktiviert wird.

Diese Promotionsarbeit untersucht die Regulationsmodalitäten der GTPase Rap1, die Verknüpfung der einzelnen Signaltransduktionsmodule und neue Elemente in der GLP-1-regulierten Signaltransduktion in pankreatischen beta-Zellen. Hierzu wurden INS 1E Zellen als beta-Zellmodell mit Glukose und GLP-1 stimuliert und nach Durchführung von Immunpräzipitationen die Bindungspartner von Rap1 ermittelt.

Es konnte gezeigt werden, dass der konstitutiv aktive RapGEF C3G Rap1 in Abhängigkeit vom Phosphorylierungszustand des Adapterproteins Crk II aktiviert. Crk II wird unter Glukose und GLP-1 Stimulation vermindert phosphoryliert und ermöglicht vermutlich durch eine Konformationsänderung die C3G-vermittelte Überführung von Rap1 in den GTP-gebundenen Zustand („on“). So findet sich eine signifikant abgeschwächte Aktivierung des Transkriptionsfaktors Elk-1 in C3G CBR transfizierten INS 1E Zellen, in denen die reguläre Proteinbindung zwischen C3G und Crk II gestört ist.

Weitere Untersuchungen ergaben, dass die Signaltransduktionsmodule ERK1/2 MAPK und PI3K/PKB über Rap1 und IRS2 in einem Komplex verbunden sind und dass der PI3K/PKB Signaltransduktionsweg unter GLP-1 Stimulation verstärkt ak-

tiviert wird. Dieser Effekt wird vermutlich durch die dargestellte gesteigerte Interaktion von Rap1 mit IRS2 gefördert.

Als neue Elemente in GLP-1 regulierter Signaltransduktion konnte Pyk2, eine rezeptorunabhängige Tyrosinkinase, und Shc, ein weiteres Adapterprotein, identifiziert werden. Unsere Untersuchungen deuten darauf hin, dass Pyk2 über das Adapterprotein IRS2 Einfluss auf die PI3K/PKB Signaltransduktionskaskade nimmt. Den Stellenwert, den Pyk2 bzw. Shc in dem ERK1/2 MAPK-Komplex einnehmen, bleibt beim derzeitigen Kenntnisstand unklar, allerdings sind hier neue Ausgangspunkte für weitere Untersuchungen von GLP-1 abhängiger mitogener Signaltransduktion geschaffen worden.

Die Erkenntnisse über die Bedeutung von Rap1 und den Einfluß von Adapterproteinen auf diese GTPase in den GLP-1 abhängigen mitogenen Signaltransduktionskaskaden, ermöglicht die Entwicklung neuer Strategien zur *in vitro* / *in vivo* Expansion von beta-Zellen als Therapieoption des Diabetes mellitus.

Summary

One of the key factors in the pathogenesis of type II diabetes mellitus is the dysfunction of the pancreatic beta cell. This dysfunction is characterized by a disturbed response to glucose and the loss of functional beta cell mass. The incretin hormone glucagon-like peptide-1 [GLP-1] not only lowers blood glucose levels by a direct effect on insulin sensitive tissues, but also functions as a growth factor for beta cells. GLP-1 leads to a dose- and glucose-dependent activation of the cAMP/PKA, PI3K/PKB and ERK1/2 MAPK. These three central mitogenic signaltransduction pathways are activated upon binding of GLP-1 to its G-protein coupled receptor. In contrast to other tissues in endocrine cells the signal transduction is not initiated by the prototype of small GTPases Ras but instead by Rap1.

The aim of this thesis was to examine the regulation and bindings partners of the GTPase Rap1 in beta cells stimulated with glucose and GLP-1. In addition identifying proteins which mediate the crosstalk between certain signal transduction cascades associated with Rap1 was a second field of exploration. The rat beta cell line INS 1E was employed as a model and the differential regulation of binding partners of Rap1 were identified by co-immunoprecipitation after stimulation with glucose and GLP-1.

The constitutive active RapGEF C3G was found to activate Rap1 depending on the phosphorylation of the adaptorprotein Crk II. As Crk II phosphorylation decreases upon stimulation with glucose and GLP-1 the ensuring conformational change leads to the activation of Rap1 by C3G. If the interaction of C3G and Crk II is blocked by introducing a dominant negative C3G CBR the activation of the downstream transcription factor Elk-1 is significantly reduced.

The interaction of Rap1 with IRS2 was shown to link the ERK1/2 MAPK pathway with the PI3K/PKB pathway. This led to an activation of the PI3K/PKB pathway after stimulation of the cells with glucose and GLP-1. The receptor independent tyrosine kinase Pyk2 could be indentified as a new element in the GLP-1 initiated signaltransduction cascade. Pyk2 interacts not only with Rap1, but also

with IRS2 and thereby maybe influencing the two central mitogenic signal transduction pathways ERK1/2 MAPK and PI3K/PKB. The function of another newly identified binding partner of Rap1 - the adaptor protein Shc - is yet unclear. Based on these findings further studies into the role of Pyk2 and Shc in the signal transduction of GLP-1 are warranted.

The results of this thesis reveal new insights into the regulation and interactions of the small GTPase Rap1 in beta cells after GLP-1 stimulation. Understanding this process into full detail will lead to new strategies for the *in vitro* / *in vivo* expansion of beta cells for new therapeutic options in the treatment of diabetes mellitus.

Publikationsliste

Artikel

Trümper J, **Ross D**, Jahr H, Brendel MD, Göke R, Hörsch D. The Rap-B-Raf signalling pathway is activated by glucose and glucagon-like peptide-1 in human islet cells. *Diabetologia*, 48(8):1534-1540, 2005. *J.T. and D.R. contributed equally*

Kongressbeiträge

Ross DP, Sauer S, Schrader J, Hörsch D. Glucagon-like peptide-1 activates MAPK by an interaction of GTPase Rap1 with Crk II and C3G in INS 1E insulinoma cells. *Diabetologia*, 48(Supplement 1): A161-162, 2005.

*Posterpräsentation auf der 42. Jahrestagung der EASD von **Ross D***

Hörsch D, **Ross D**, Trümper J, Sauer S. Die Aktivität des kleinen G-Proteins Rap1 in beta-Zellen als glukoseabhängiger Aktivator des mitogenen Signaltransduktionsweges wird durch die Interaktion mit dem Austauschfaktor C3G und dem Adaptorprotein Crk II reguliert. *Diabetes und Stoffwechsel*, 13(1): 55, 2004.

*Posterpreis auf der 39. Jahrestagung der DDG an **Ross D***

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren

In Marburg: Arnold, Aumüller, Bacher, Back, Barth, Basler, Bauer, Baum, Beato, Becker, Behr, Berendes, Berger, Berndt, Bernhardt, Bertalanffy, Besedovsky, Beyer, Bien, Blankenburg, Braasch, Cetin, Czubayko, Daume, Daut, Dittrich, Dodel, Dombrowski, Donner-Banzhoff, Egbring, Ehrhardt, Eilers, Elsässer, Engel, Engenhardt-Cabillic, Eschenbach, Fehmann, Flores de Jacoby, Friederich, Fruhstorfer, Fuhrmann, Garten, Gemsa, Geus, Göke, Görg, Gotzen, Graul, Gressner, Grimm, Griss, Gröne, Grundner, Grzeschik, Gudermann, Habermehl, Hamer, Happle, Hardewig, Hasilik, Hebebrand, Heeg, Heidenreich, Hellinger, Hemmer, Hennis, Hering, Herpertz-Dahlmann, Herzum, Heß, Heufelder, Hildebrandt, Hilgermann, Hörsch, Hofbauer, Hofmann, Hoffmann, Huffmann, Ihm, Jacob, Janke, Joseph, Jungclas, Kälble, Kann, Kern, Kleine, Klenk, Klötzer, Klose, Knauff, Knoll, Köhler, Koolman, Krause, Kretschmer, Krieg, Kroh, Kroll, Kuhn, Kuni, Lammel, Lang, Lange, Lauer, Lehmann, Lennartz, Lill, Lippert, Löffler, Lohoff, Lorenz, Lotzmann, Ludwig, Lürmann, Lütcke, Maisch, Mann, Martin, Mannheim, Massarrat, Mennel, Moll, Möller, Moosdorf, Müller, Mutters, Netter, Neubauer, Neurath, Niemeyer, Niessing, Oepen, Oertel, Peter, Petry, Pfeiffer, Pohlen, Portig, Radsak, Rehder, Remschmidt, Renz, Richter, Riedmiller, Riße, Rodeck, Rosemann, Rosenow, Rothmund, Rupec, Schachtschabel, Schäfer, Schepelmann, Schiff, Schlegel, Schleyer, Schmid, Schmidt, Schmitz-Moormann, Schnabel, Schneider, Schueffel, Schulz, Schwarz, Seifart, Seitz, Seyberth, Slenczka, Sommer, Stachniss, Steiniger, Stiletto, Stempel, Sturm, Sure, Suske, Vedder, Vogelmeier, Voigt, Wagner, Weber, Weihe, Werner, Wesemann, Westermann, Wiegandt, Wilke, Wirth, Wolf, Wulf, Ziegler, Zielke.

In Wien: Freissmuth, Rotter.

Danksagung

Herzlich bedanken möchte ich mich an dieser Stelle bei allen, die zum Gelingen meiner Promotionsarbeit beigetragen haben.

An erster Stelle ist hier mein Doktorvater PD Dr. Dieter Hörsch zu nennen. Seine Begeisterung für die Wissenschaft hat dem „Laboralltag“ immer wieder Spannung verliehen und er war jederzeit Ansprechpartner für kleinere und größere Probleme. Die Teilnahme an Kongressen und Seminaren, die er mir ermöglichte, erlaubten einen sehr interessanten Einblick in die internationalen Kreise der Inselzellularforschung.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeitern und Mit-Doktoranden des Forschungsbereichs-3 bedanken, vor allem bei Jutta und Antje, die mir die Basistechniken des Labors zeigten und Eleni, Harald, Ute, Katharina und Sascha, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben. Stets herrschte eine herzliche Atmosphäre im Forschungsbereich-3 und es hat riesig viel Spaß gemacht, mit allen dort zusammenzuarbeiten - vielen Dank!

Ein herzlicher Dank gilt meinem Mann Jörg, der Freude über gelungene und Ärger über missglückte Versuche geteilt und mit seiner optimistisch-beharrlichen Art und vielfältiger Hilfe zur Vollendung der Promotionsarbeit beigetragen hat.

Weiterhin gilt ein herzlicher Dank meinen Eltern, die meinen beruflichen Werdegang in vielen Hinsichten ermöglicht haben und stets aufmunternde Worte für die schwierigen Zeiten fanden.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Freunden danken, bei denen ich immer ein „offenes Ohr“ für die Höhen und Tiefen der Promotionsarbeit fand und die die Zeit des Studiums in Marburg unvergesslich gemacht haben.