

Aus der Medizinischen Fakultät der
Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald
Institut für Pathophysiologie
Abteilung für Versuchstierkunde
(Leiterin: Prof. Dr. Dr. Ingrid Klötting)

Thema: Einfluss von Calcium und Cytokinen auf die Funktion und Proteinexpression Langerhans'scher Inseln: BB/OK-Ratten vs. kongener Derivate

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des akademischen

Grades

Doktor der Medizin
(Dr. med.)

der

Medizinischen Fakultät

der

Ernst-Moritz-Arndt-Universität

Greifswald

2004

vorgelegt von:

Sebastian Reil

geb. am 17.4.1977

in Werl/NRW

Dekan:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

3. Gutachter:

Raum:

Datum der Disputation:

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Typ 1 Diabetes	5
1.2	Modelltiere in der experimentellen Diabetesforschung	7
1.3	Molekulare Mechanismen der Langerhans`schen Inseln als mögliche Co-Faktoren einer Manifestation des Typ 1 Diabetes	10
2	Ziele der Arbeit	14
3	Material und Methoden	15
3.1	Tiermaterial und Haltung	17
3.2	Präparation und Kultur Langerhans`scher Inseln	17
3.3	Funktionelle Untersuchungen der Langerhans`schen Inseln	20
3.3.1	Insulinsekretion der Langerhans`schen Inseln	20
3.3.2	Insulingehalt der Langerhans`schen Inseln	21
3.3.3	Insulin-ELISA	21
3.4	Expression von HSP70 und Calbindin	22
3.4.1	Quantitative Proteinbestimmung	22
3.4.2	Herstellung von Proteinextrakten	22
3.4.3	SDS-Elektrophorese	23
3.4.4	Westernblot	24
3.4.5	Antikörper-Reaktion	25
3.5	Statistische Berechnung	27
4	Ergebnisse	28
4.1	Insulinsekretion der Langerhans`schen Inseln	28
4.1.1	Insulinsekretion Langerhans`scher Inseln des BB/OK-Stammes	28

4.1.2	Insulinsekretion Langerhans`scher Inseln der BB.6S-Linie	29
4.1.3	Insulinsekretion Langerhans`scher Inseln der BB.LL-Linie	31
4.1.4	Zusammenfassung der Sekretionsergebnisse Langerhans`scher Inseln des Parentalstammes BB/OK vs. BB.6S- und BB.LL-Linie	32
4.2	Insulingehalt der Langerhans`schen Inseln	35
4.2.1	Insulingehalt Langerhans`scher Inseln des Parentalstammes BB/OK	35
4.2.2	Insulingehalt Langerhans`scher Inseln der BB.6S-Linie	36
4.2.3	Insulingehalt Langerhans`scher Inseln der BB.LL-Linie	36
4.2.4	Insulingehalte der kongenen Ratten-Linien als Gesamtsumme	37
4.3	Gesamtprotein-Expression nach Cytokinexposition	38
4.4	HSP70-Expression unter cytokinexponierten Bedingungen	39
4.5	Calbindin-Expression unter cytokinexponierten Bedingungen.	42
5	Diskussion	46
6	Thesen zur Dissertation	57
7	Literaturverzeichnis	61
8	Anhang	74
	Abkürzungsverzeichnis	
	Reagenzien	
	Geräte	
	Zusammensetzung der verwendeten Lösungen	
	Eidesstattliche Erklärung	
	Lebenslauf	
	Danksagung	

1 Einleitung

1.1 Typ 1 Diabetes

Der Diabetes mellitus (lat. = honigsüßer Harnfluß) ist eine weltweit verbreitete chronische Stoffwechselerkrankung, die auf einer Störung des Glucosestoffwechsels aufgrund eines relativen oder absoluten Insulinmangels beruht.

Der primär insulinabhängige Diabetes mellitus (insulin dependent diabetes mellitus – IDDM), der auch als Typ 1 Diabetes bezeichnet wird, wird durch einen Mangel an Insulin hervorgerufen, welcher aufgrund einer irreversiblen und selektiven Zerstörung¹ der insulinproduzierenden Langerhans'schen Inseln des Pankreas entsteht^{2, 3}. Man unterscheidet zwischen einem Frühsymptom des Diabetes mellitus mit Stoffwechselentgleisungen bis hin zum diabetischen Koma und Spätkomplikationen, gekennzeichnet durch eine Vielzahl von heterogenen Krankheitsbildern wie z.B. Hyperglycämie oder der Tendenz zur mikro- und makrovaskulären Spätkomplikationen⁴. Diese auch als diabetische Sekundärkrankheiten bezeichneten Störungen sind teilweise durch die chronische Hyperinsulinämie (Typ 2 Diabetes), teilweise durch die chronische Hyperglycämie bedingt und entstehen fast alle aufgrund mikroskopischer und makroskopischer Gefäßschädigungen, die das klinische Bild im fortgeschrittenen Stadium bestimmen.

Während die mikroangiopathischen Veränderungen die Niere (diabetische Glomerulosklerose), die Retina (Diabetische Retinopathie) und das periphere Nervensystem (diabetische Neuropathie) betreffen, wirken sich die makroangiopathischen Veränderungen besonders auf das Herz (Koronare Herzkrankheit (KHK)) und die Extremitäten (Claudicatio intermittens) aus.

Der Anteil der Patienten mit Typ 1 Diabetes bei allen Diabetespatienten in Deutschland wird gegenwärtig auf mindestens 5-7% geschätzt und ist bei Frauen und Männern gleich stark ausgeprägt. Die Erkrankung manifestiert sich im allgemeinen vor dem 35. Lebensjahr mit höchster Inzidenz während der Pubertät. Weltweit ist eine Zunahme der Prävalenz für Diabetes mellitus zu beobachten. Während im Jahre 2000 die Zahl der erkrankten Diabetiker noch bei ca. 150 Millionen lag, rechnet man bis zum Jahre 2025 mit einer Verdopplung der Erkrankten auf 300 Millionen Diabetiker⁵. Nicht zu vernachlässigen sind bei diesen Untersuchungen, welche Einflüsse weltweite geographische und bevölkerungsspezifische Differenzen haben können⁶. So ist die Inzidenz des Diabetes mellitus im asiatischen Raum am niedrigsten, während sie in den skandinavischen Ländern am höchsten ist. Für diese globalen Differenzen nimmt man heute ursächlich genetische Differenzen sowie verschiedene Umweltfaktoren an⁷.

Für Deutschland wird die Zahl der Diabetiker auf etwa 3,6 Millionen geschätzt, von denen 580 000 insulinpflichtig sind. Trotz der Möglichkeit der Substitution von Insulin und einer straffen Stoffwechselführung ist die Mortalität beim Typ 1 Diabetes erhöht. In der gesamten Diabetesmanifestation wird eine Reduzierung der Lebenserwartung von 6-7 Jahren im Vergleich zur Standardbevölkerung angegeben⁸, wobei eine deutliche Altersabhängigkeit besteht. Angiopathien sind mit über 75% die häufigste Todesursache für die an Diabetes erkrankten Patienten. Angesichts dieser Entwicklung und nicht zuletzt der eingeschränkten Lebensqualität insbesondere im Kindes- und Jugendalter, besteht in besonderer Weise die Notwendigkeit zur Erforschung der Ätiopathogenese auf molekularer Ebene sowie bezüglich der genetischen Ursachen. Aufgrund auffallender Comorbiditäten wie Fettstoffwechselstörungen und Hypertonie besteht weiterhin der dringende Verdacht, dass eine gemeinsame genetische Störung vorliegt. Bestätigt werden diese Vermutungen dadurch, dass bei Erkrankung eines Elternteiles an Typ 1 Diabetes das Risiko für die Kinder bei Erkrankung des Vaters um ca. 5%, bei Erkrankung der Mutter um 2,5 % erhöht ist⁸. Sind beide Eltern betroffen, besteht bei den Kindern sogar ein Risiko bezüglich einer Erkrankung bis 42%^{9, 10}. Insbesondere Gene des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC), der beim Menschen als HLA Komplex (Human Leukocyte Antigen) bezeichnet wird, nehmen hier eine Schlüsselstellung ein^{11, 12}. Bestimmte Gene des HLA-Komplexes HLA-DR3 und/oder -DR4 erklären zu ca. 40 % das Risiko, an einem Typ 1 Diabetes zu erkranken^{13, 14}. Insgesamt besitzen ca. 90 % der Typ 1 Diabetiker diese diabetogenen HLA-Allele. SIBLEY et. al. 1985 und SIOVER and EISENBARTH 1997 zeigten bei ihren Untersuchungen, dass auch nach Transplantation von Pankreassegmenten in eineiige Zwillinge ohne Immuntherapie eine Insulitis mit charakteristischer lymphozytärer Infiltration und anschließender Manifestation eines Diabetes mellitus auftritt. Bei eineiigen Zwillingen beträgt das gemeinsame Erkrankungsrisiko ca. 35% und hängt zusätzlich vom Ausmaß der HLA-Identität ab¹⁵. HLA-identische Geschwister haben ein statistisches Risiko von ca. 18%, HLA-haplotypidentische Geschwister eines von ca. 6%, dagegen haben HLA-verschiedene Geschwister ein kaum erhöhtes Risiko an Typ 1 Diabetes zu erkranken¹⁶. Aus der oben ausgeführten statistischen Untersuchung, dass eineiige Zwillinge nicht 100% konkordant für Typ 1 Diabetes sind, lässt sich die Schlussfolgerung ableiten, dass auch Umweltfaktoren auf die Entstehung des Typ 1 Diabetes Einfluss nehmen können.

Obwohl die ursächlichen Mechanismen nicht vollständig geklärt sind, weiß man heute doch, dass autoimmunologische Prozesse¹⁷ eine entscheidende Bedeutung bei der Pathogenese des Typ 1 Diabetes mellitus spielen^{18, 19}. Als wesentliches Merkmal dieses Autoimmunphänomens wird eine lymphozytäre Infiltration der Langerhans'schen Inseln im Rahmen einer Insu-

litis beschrieben²⁰. Der Typ 1 Diabetes entwickelt sich nach sukzessiver Zerstörung der β -Zellen des Pankreas und manifestiert sich, wenn etwa 90% der endokrinen Inseln die Insulinsekretion eingestellt haben. Neben der Invasion von lymphozytären Zellen²¹ in die Langerhans'schen Inseln zeigt sich zudem das frühzeitige Auftreten von zirkulierenden Autoantikörpern gegen cytoplasmatische Inselzellantigene (ICA), gegen Inselzelloberflächenantigenen (ICSA), Glutamatdecarboxylase (GAD) und gegen Insulin, die schon lange vor Ausbruch der Erkrankung nachzuweisen sind¹⁷.

Bekräftigt wird die Annahme, dass es sich beim Typ 1 Diabetes um eine Autoimmunerkrankung handelt, außerdem dadurch, dass immunsuppressive Medikamente wie beispielsweise Cyclosporin A²² oder monoklonale Antikörper²³ den Krankheitsverlauf verzögern können²⁴,²⁵. Auch die Verwendung von Antiinterferon kann den Progress dieser Autoimmunerkrankung verzögern oder aufhalten²⁶.

Wie und wodurch es zur Aktivierung der autoimmunologischen Mechanismen kommt, ist noch nicht vollständig geklärt, aber es werden als Ursache in der Literatur auch eine parainfektöse Genese wie z.B. virale Infektionen (Coxsacki-Virusinfektionen) beschrieben²⁷.

1.2 Modelltiere in der experimentellen Diabetesforschung

Entscheidende Fortschritte bei der Erforschung der Ätiopathogenese des Typ 1 Diabetes wurden erst seit dem Einsatz von Modelltieren erzielt, wobei es sich bei den Versuchstieren hauptsächlich um die B(io)B(reeding)-Ratte (BB-Ratte) und die N(on)-O(bese)-D(iabetic)-Maus (NOD-Maus) handelt²⁸. Beide Modelltiere entwickeln mit hoher Inzidenz ein dem Typ 1 Diabetes des Menschen ähnliches Krankheitsbild mit den typischen Kennzeichen dieser Erkrankung wie Insulinitis, Insulinopenie, Hyperglycämie, Ketoseneigung, Polyurie und Polydipsie^{29, 30}. Sowohl histologisch als auch immunhistochemisch zeigen sich Veränderungen wie z.B. eine autoimmune Destruktion der Langerhans'schen Zellen, eine lymphozytäre Infiltration des Gewebes sowie das Auftreten spezifischer Insulin- und β -Zellantikörper, die dem menschlichen Krankheitsbild in hohem Maße entsprechen^{31, 32}. Eine weitere Übereinstimmung zum menschlichen Typ 1 Diabetes ergibt sich durch das MHC Klasse II System, das mit der Diabetes-Erkrankung verknüpft ist³³.

Die BB-Ratten gehen auf mehrere spontandiabetische Ratten zurück, die bereits 1974 in einem Wistarrattenaufzuchtstamm der BioBreeding Laboratories in Ottawa (Kanada) entdeckt wurden. Alle Nachkommen dieser Ratten wurden hinsichtlich einer Diabetesmanifestation

selektiert, zunächst jedoch nicht durch Inzucht weitervermehrt. Da Tiere dieser Anfangspopulationen später in verschiedene Laboratorien weltweit zu Versuchszwecken weiter gegeben wurden, gibt es heute, ca. 3 Jahrzehnte später, mehrere genetisch und phänotypisch differente Sublinien^{34, 35, 36}. Das Vollbild der Erkrankung tritt bei diesen BB-Ratten zumeist zwischen dem 60. und 120. Lebenstag auf, wobei jedoch auch noch spätere Manifestationen beschrieben wurden. Das Auftreten der Hyperglykämie entwickelt sich abrupt und geht mit Hypoinsulinismus einher. Ohne unmittelbare Insulinsubstitution versterben die diabetischen Ratten innerhalb von wenigen Tagen. Die Werte der Glucose im Blut dieser BB-Ratten variieren zwischen 14 und 40 mmol/l^{37, 38}. Von der Diabetesmanifestation sind beide Geschlechter gleichermaßen betroffen und hinsichtlich der Manifestationszeit bestehen keine Unterschiede.

Im Gegensatz zum menschlichen Diabetes entwickeln die BB-Ratten weder Bluthochdruck noch eine Nephropathie als zusätzliche Komplikationen. Analog zum Menschen sind bei diesen Modelltieren bestimmte MHC-Allele für die Entwicklung eines Typ 1 Diabetes essentiell und werden entsprechend als *Iddm1* bezeichnet³¹. Kreuzungen von Diabetes-suszeptiblen BB/OK-Ratten und Diabetes-resistenten Rattenstämme zeigten aber, dass nicht nur MHC-Gene (*Iddm1*) und Gene für die Ausprägung der Lymphopenie (*Iddm2*), sondern auch weitere, sogenannte Nicht-MHC Gene (*Iddm3* und *Iddm4*) für die Entwicklung des Typ 1 Diabetes verantwortlich sind, zumal nur etwa 50% der *Iddm1* und *Iddm2* homozygot gekreuzten Hybriden einen Diabetes entwickeln. Dabei wurde *Iddm3* auf Chromosom 18 und *Iddm4* auf Chromosom 6 kartiert.

Um die Auswirkungen der Nicht-MHC-Gene für die Entwicklung eines Diabetes zu prüfen, wurden verschiedene kongene BB.SHR-Linien etabliert, indem ein Segment von Chromosom 6 (*Iddm4*; BB.6S) bzw. von Chromosom 18 (*Iddm3*; BB.18S) durch wiederholte Rückkreuzung auf die BB/OK-Ratte übertragen wurde. Die phänotypische Ausprägung der daraus resultierenden BB.6S-Ratten bzw. BB.18S-Ratten zeigte im Vergleich zum Parentalstamm (BB/OK) im Verlauf von 30 Wochen eine drastische Reduzierung der Diabetesmanifestation (14% vs. 34% vs. 86%). Die Ergebnisse deuteten darauf hin, dass auf diesen Chromosomensegmenten Diabetes protektive Gene der SHR lokalisiert sind und dadurch die Wirkung der Gene, die zu einer Diabetesentwicklung der BB/OK-Ratte führten, unterdrückt werden^{39, 40, 41, 42, 43, 44}.

Die kongene BB.SHR (Chr.4), auch als BB.LL bekannt, die ein Segment des Chromosoms 4 der nicht lymphopenischen SHR trägt, zeigte in den Untersuchungen keine Diabetesmanifestation, während die BB.6S deutlich seltener eine Diabetesmanifestation zeigte als die diabe-

tessuszeptible BB/OK-Ratte⁴⁵. Weitere Unterschiede zwischen der BB/OK-, BB.6S- und der BB.LL-Ratte betrafen das Körpergewicht, die Serumtriglyceride, Cholesterin, Gesamtprotein, Harnstoff, Calcium, Phosphat und den 24 h Urin.

Eine wesentliche Abweichung im Vergleich zum menschlichen Typ 1 Diabetes stellte die ausgeprägte Lymphopenie der BB-Ratten dar. Diese Lymphopenie (*Iddm2*) wird autosomal-rezessiv vererbt⁴⁶ und segregierte unabhängig vom *Iddm1*. Das Gen konnte auf Chromosom 4 kartiert werden. In verschiedenen Studien wurde nachgewiesen, dass die Funktion des T-Lymphozytensystems der SHR unterdrückt war. Unter der Annahme, dass der Diabetes des Menschen sowie der BB-Ratte eine T-Zell vermittelte Autoimmunerkrankung war, lag die Vermutung nahe, dass die „SHR-Immundefizienz“ die Autoimmunerkrankung in den BB/OK-Ratten „neutralisierte“ und somit sowohl BB.6S- als auch BB.18S-Ratten vor einer Diabetesentwicklung schützte. Die Ratten der BB.6S-Linie wiesen in diesem Zusammenhang z.B. ca. 50% weniger aktivierte T-Zellen verglichen mit denen des Parentalstammes BB/OK auf.

1.3 Molekulare Mechanismen der Langerhans'schen Inseln als mögliche Co-Faktoren einer Manifestation des Typ 1 Diabetes

Obwohl umfangreiche Kenntnisse über die molekularen Immunmechanismen und genetische Prädispositionen bei der Entstehung des Typ 1 Diabetes bestehen, ist weiterhin unvollständig geklärt, welche Faktoren auf molekularer Ebene langfristig die Destruktion der β -Zellen initiieren und welche Faktoren schließlich die Insulinfreisetzung der β -Zellen beeinflussen.

Der Mechanismus der Glucose-stimulierten Insulinsekretion ist weitgehend geklärt⁴⁷. In Vivo wird die Sekretion von Insulin im Wesentlichen durch die Glucosekonzentration im Blut gesteuert⁴⁸. Dabei ist die vermehrte Entstehung von ATP durch die Oxidation der Glucose entscheidend, die durch Carrier-vermittelten Transport in die β -Zellen gelangt⁴⁹. Daraufhin wird ein ATP-abhängiger Kaliumkanal gehemmt, die Membran wird depolarisiert, wodurch spannungsabhängige Calcium-Kanäle geöffnet werden und extrazelluläres Calcium einströmen kann, um den Exozytose-Prozess einzuleiten⁵⁰. Ergänzend zum Einstrom des extrazellulären Calciums, erfolgt die Freisetzung von Calciumionen aus intrazellulären Speichern⁵¹. Ausgehend von der Aktivierung der Phospholipase C durch G-Proteine erfolgt eine Spaltung des Phosphatidylinositol (PIP₂) zu Inositoltriphosphat (IP₃) und Diacylglycerin (DAG). Das aktivierte IP₃ wirkt in der Zelle über eine Freisetzung von Calcium aus den Ca²⁺ Speichern. Das erhöhte Calcium wirkt dann als tertiärer Botenstoff, der die Freisetzung von Insulin aus den Langerhans'schen Inseln des Pankreas vermittelt. Auch das zweite Spaltprodukt des PIP₂, das DAG, hat die Funktion eines weiteren Botenstoffs. DAG stimuliert eine Proteinkinase C, die ihrerseits andere Proteine für die Bildung von Insulin phosphoryliert. Entscheidend ist, dass die Aktivierung der Proteinkinase C calciumabhängig ist: Eine erhöhte Calciumkonzentration (Ca²⁺) verstärkt die Kinaseaktivierung und somit die Bildung des Insulins. Daher unterstützen sich DAG und das durch IP₃ freigesetzte Ca²⁺ in ihrer Wirkung.

Aus diesen Beobachtungen wird die Bedeutung des Calciums für die Insulinsekretion ersichtlich. Calcium nimmt daher in unterschiedlicher Weise einerseits als Teilfaktor dieser komplexen Reaktionskaskade, andererseits auch über die Regulation von Ionenkanälen ganz entscheidend an der Regulation der Insulinsekretion teil. Weniger als 1% der Gesamtcalciumkonzentration befinden sich in der Extrazellulärflüssigkeit, mehr als 99% im Knochen. Trotz der extrem ungleichen Verteilung ist es die Plasmakonzentration des Calciums, die in einem engen Schwankungsbereich präzise reguliert wird. Die physiologische Konzentration des Plasmacalciums liegt im Mittel bei 2,5 mmol/l. Die biologische Wirksamkeit im Sinne der Zellregulation wird nur durch die freie, ionisierte Form des Calciums, das Ca²⁺-Ion, gewähr-

leistet. Die Homöostase des Calciums ist nicht nur im Plasma, sondern erst recht intrazellulär zwingend erforderlich, wo laufend die freie zytosolische Calciumkonzentration in ihre Konstanz bedroht ist. Diese Zellen verfügen über Transportproteine, mit denen Calcium aus dem Zytosol in die Speicher bzw. in den Extrazellulärraum zurückgeführt wird. Auch für die Kommunikation zwischen Zellverbänden über Gap Junctions spielen die Calciumionen eine entscheidende Rolle. Die Kanäle sind weit geöffnet bei normaler Calciumkonzentration und schließen sich bei erhöhter zytosolischer Calciumkonzentration, so dass diese Zellen entkoppelt werden und die Funktion des Zellverbandes im allgemeinen nicht stören.

Eine weitere wichtige Funktion in der Pathogenese des Typ 1 Diabetes spielen sogenannte Hitze-Schock-Proteine (HSP). Wie in diversen Versuchen gezeigt werden konnte, erhöhen die Hitze-Schock-Proteine die Resistenz gegenüber oxidativen Substanzen in den Langerhans'schen Inseln^{52, 53}. Hitze-Schock-Proteine bilden eine wichtige, ubiquitär vorkommende Familie zytosolischer Stressproteine, bei der die Anzahl dieser Vertreter in verschiedenen Spezies stark variiert. Ihre Expression wird nicht nur nach Temperaturerhöhung, wie ihr Name bereits andeutet, sondern auch durch diverse andere Stressfaktoren, wie oxidatives Milieu, Zytotoxine, Tumor-Nekrose-Faktoren und bestimmte Krebsmedikamente drastisch erhöht, so dass sie bis zu 1% des zellulären Gesamtproteingehaltes ausmachen können⁵⁴. Die Überexpression der HSP wird auch im Verlauf einiger neurodegenerativer Krankheiten sowie bei der Tumorgenese beobachtet. Interessanterweise zeigt ein Augenlinsenprotein, das α -Kristallin, sowohl eine Sequenz- als auch eine funktionelle Homologie zur Familie der HSP, wobei die Bedeutung dieses Proteins in diesem Zusammenhang noch nicht geklärt ist. Die monomeren Molekulargewichte der Proteine variieren zwischen 12 und 90 kDa. Sie bilden dabei hocholigomere Komplexe mit bis zu 50 Untereinheiten. Für einige HSP konnte nachgewiesen werden, dass sie durch Hitzeschock und andere Stressfaktoren phosphoryliert werden, wobei sich die Oligomeren rearrangieren. Diese Phosphorylierungsreaktion scheint auch bei Signaltransduktionsprozessen von extrazellulären Faktoren bezüglich des Cytoskeletts wichtig zu sein. Eine Provokation der Expression von Hitze-Schock-Proteinen kann durch Einwirkung von Cytokinen auf Langerhans'schen Inseln erreicht werden^{55, 56}.

Von besonderer Bedeutung im Zusammenhang mit dem Typ 1 Diabetes ist das spezifische HSP70 aus der großen Gruppe von Hitze-Schock-Proteinen. Durch verschiedene Studien konnte bereits gezeigt werden, dass gerade dieses Hitze-Schock-Protein die Langerhans'sche Inseln vor einer schädigenden Einwirkung durch IL1- β schützen kann⁵⁷.

Nicht nur Hitze-Schock-Proteine, sondern auch andere molekulare Mechanismen können eine Diabetesmanifestation verhindern oder reduzieren. Eine weitere wichtige Funktion in der Pathogenese des Diabetes könnte das Protein Calbindin–D28k spielen. Es handelt sich um ein intrazelluläres Protein, das sowohl im Cytosol als auch im Zellkern vorhanden ist und keine anatomische Anbindung an Membranen hat, wie CHRISTAKOS, GABRIELIDES et al. 1989, BINDELS et al. 1991 in ihren Versuchen nachweisen konnten. Es wurde erstmals 1966 von Wassermann und Taylor beschrieben, indem sie zeigten, dass Vitamin D3 die Bildung von Calcium-bindenden-Proteinen (CaBP) in der Darmmukosa induziert. Dieses Protein wurde zunächst CaBP bezeichnet, später aber, in Anlehnung an die spezifischen Calcium-bindenden Eigenschaften, die Vitamin D Abhängigkeit⁵⁸ und das spezifische Molekulargewicht von 28 kDa in Calbindin-D28K umbenannt⁵⁹ Calbindin kommt in einer Vielzahl von Geweben vor, wie z.B. in der Niere⁶⁰, im Knochen⁶¹ oder im Darm, aber auch in solchen Geweben, die primär nicht an der Regulation des Serum-Calciums beteiligt sind, wie Gehirn und Pankreas. Wenn auch die endgültige Funktion des Calbindins nicht geklärt ist, so spielt es zumindest als „Carrier protein“ eine entscheidende Rolle, wie bei CHRISTAKOS, GABRIELIDES et al. 1989 beschrieben⁶². Es reguliert den transzellulären Calcium Transport und dient als Puffer für cytotoxische Calciumkonzentrationen. Es werden gegenwärtig drei mögliche Regulationswege des Calbindins diskutiert. Zum einen kann über Vitamin D (1,25(OH)2D), zum anderen auch über die extrazelluläre Calciumkonzentration eine Expression hervorgerufen werden. Ein Mangel an Phosphat zeigte ebenfalls einen unerklärlichen Anstieg des renalen Calbindins⁶³.

Man geht davon aus, dass die extrazelluläre Calciumkonzentration die Expression von Calbindin D28K auch in Langerhans'schen Inseln hervorrufen kann. Diabetiker zeigen eine besonders niedrige Konzentration des renalen Calbindins D28K.

Da Calbindin D28K in verschiedenen Zell-Linien durch bis dahin unbekannte Mechanismen eine Apoptose verhindern konnte, zeigte sich, dass Calbindin auch vor einer Cytokin-induzierten Apoptose der β -Zellen schützen kann, indem die freie Radikalformation verhindert wird⁶⁴. RABINOVITCH, SUAREZ-PINZON et al. konnten zeigen, dass Calbindin indirekt u.a. an der Regulierung der β -Zell-Zerstörung beteiligt ist und die Autoimmunmechanismen des Typ 1 Diabetes aufhalten konnte. Sie beobachteten außerdem in ihren Versuchen, dass eine durch Expressions-Faktoren induzierte Überexpression an Calbindin die Anzahl der apoptotischen β -Zellen in Gegenwart von IL1- β signifikant reduzieren konnte. Den größten Schutz vor IL1- β zeigte derjenige β -Zell Klon, der die höchste Konzentration an Calbindin exprimierte. Eine Überexpression von Calbindin wurde auch bei neuronalen Zellen sowie im

Rahmen der Alzheimer-Erkrankung beobachtet und führt auch da zum Schutz vor einer Apoptose⁶⁵. Um den Mechanismus des antiapoptotischen Effektes von Calbindin zu klären, ergab sich die Notwendigkeit zu prüfen, inwieweit Calbindin die freie Radikalbildung verhindern konnte. Der stimulierende Effekt von Cytokinen auf die Bildung von Stickstoffoxiden, Hydroperoxiden und Peroxinitraten als intrazelluläre Radikalstrukturen war in stark Calbindin exprimierenden β -Zellen signifikant reduziert.

Andere Studien zeigten, dass die β -Zellen des Pankreas spezifische Rezeptoren für 1,25 Dihydroxyvitamin D3 [1,25-(OH)₂D₃] besaßen und dass dieses Vitamin die Insulinsekretion in Vitamin D abhängigen Ratten stimulierte. Dabei konnte auch ein Zusammenhang zwischen der Calcium- sowie der Vitamin D₃-Konzentration in Bezug zur Insulinsekretion erfasst werden. Ratten, die einen hohen Level an Vitamin D₃, gleichzeitig aber eine niedrige Calciumkonzentration hatten, zeigten unbeeinflusst von der Vitamin D₃-Konzentration eine unveränderte Insulinsekretion⁶⁶. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ wird für eine normale Glucose stimulierte Insulinsekretion der Langerhans'schen Inseln benötigt. Biochemische und immunhistochemische Untersuchungen zeigten, dass diese Rezeptoren gleichmäßig an der Oberfläche des Pankreas verteilt sind⁶⁷.

2 Ziele der Arbeit

Im Rahmen der Untersuchungen dieser Arbeit wurden spontandiabetische BB/OK-Ratten verwendet und zwei ihrer kongenen Derivate, die BB.LL- und BB.6S-Ratten. Hinsichtlich der genetischen Grundlagen und einer möglichen Lokalisation der für die Ausprägung des Diabetes erforderlichen Gene wurden in der Vergangenheit zahlreiche Untersuchungen durchgeführt. Das Ziel dieser experimentellen Studie bestand darin zu prüfen, inwieweit unter Berücksichtigung des genetischen Hintergrundes molekulare Mechanismen eine Prädisposition für die Entstehung eines Diabetes darstellen könnten. Zunächst wurde der Einfluss des freien Calciums in Abhängigkeit unterschiedlicher Glucosekonzentrationen auf die Insulinsekretion und den Insulingehalt der Langerhans'schen Inseln durch Variation dieser beiden Parameter im Medium untersucht. Der Effekt des ionisierten Calciums in Bezug auf die Funktionalität und die Aktivität der β -Zelle konnte durch die Insulinbestimmung dargestellt werden.

Da gerade der Typ 1 Diabetes das Ergebnis einer selektiven autoimmunologischen Zerstörung der β -Zellen darstellt, und bereits mehrere Jahre vor der klinischen Manifestation des Typ 1 Diabetes Antikörper gegen Inselstrukturen nachgewiesen werden konnten, wurde im weiteren Verlauf dieser Studie durch die Verwendung von Cytokinen im Inkubationsmedium eine in Vivo vergleichbare Stressreaktion für die Langerhans'schen Inseln geschaffen. Aufgrund der genetischen Variation und der voneinander variierenden Diabetes-Inzidenz der einzelnen Ratten-Linien lag die Vermutung nahe, dass verschiedene, genetisch bedingte, molekulare Mechanismen die spontane autoimmunologische β -Zellzerstörung regulierten. Diese könnten möglicherweise schon während der prädiabetischen Phase wirksam sein und sich in Form protektiver Mechanismen und/oder in Form von Reparationsvorgängen darstellen. Im Folgenden wurde daher die Funktion zweier intrazellulärer Proteine (HSP70, Calbindin D28K) im Hinblick auf einen möglichen Zusammenhang mit der unterschiedlichen Diabetesmanifestation der drei verwendeten Linien untersucht. In verschiedenen Studien konnte bisher gezeigt werden, dass sowohl sogenannte Hitze-Schock-Proteine (engl.: heat shock proteins), sowie das Calcium-bindende Protein Calbindin D28K in der Pathogenese des Typ 1 Diabetes eine wichtige Bedeutung haben. Um relative Aussagen über die Menge der exprimierten Proteine machen zu können, war eine genaue Bestimmung der Gesamtprotein-Expression unter den gegebenen Bedingungen erforderlich. Die Auswertung dieser Studie erfolgte unter dem Gesichtspunkt der unterschiedlichen Diabetesmanifestationen der drei verwendeten BB-Ratten-Linien und demzufolge unter Berücksichtigung der genetischen Variation.

3 Material und Methoden

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit beziehen sich auf In vitro-Untersuchungen an isolierten Langerhans'schen Inseln von drei Ratten-Linien (BB/OK, BB.LL, BB.6S) in einem Alter zwischen 8 und 12 Tagen. Die Untersuchungen zu dieser Arbeit gliedern sich in folgende Schwerpunkte:

Zunächst wurden die Langerhans'schen Inseln im Hinblick auf die Insulinsekretion und den Insulingehalt untersucht. Diese beiden Parameter wurden nach jeweiliger Isolierung und Inkubation einer bestimmten Anzahl von Langerhans'schen Inseln in Medien unterschiedlicher Calcium- und Glucosekonzentration erfasst. Ziel dieser Untersuchungen war es, Aussagen darüber zu treffen, inwieweit die extrazelluläre Calciumkonzentration die Glucose stimulierte Insulinbildung und Sekretion der Langerhans'schen Inseln beeinflusst.

Im folgenden Abschnitt der tierexperimentellen Untersuchung wurde der Einfluss bestimmter Cytokine auf die Langerhans'schen Inseln dargestellt, welcher anhand der Expression bestimmter Proteine (Calbindin, HSP70) deutlich wurde. Für diese Untersuchung wurden jeweils 500 Inseln isoliert und nach Vorkultivierung und Cytokinbehandlung über 24 Stunden weiter untersucht. Diese so gewonnenen Extrakte wurden mittels der Elektrophorese, eines Immunblots und einer Antigen-Antikörper-Reaktion hinsichtlich der oben genannten Parameter wie Proteingehalt, Calbindin und HSP70 untersucht.

Die detaillierte Versuchübersicht der Cytokin-abhängigen Versuchsreihe wird in Abb. 2 veranschaulicht. Als jeweilige Kontrolle aller Teilexperimente dienten Langerhans'sche Inseln, die ohne Cytokineinwirkung im Grundmedium kultiviert wurden.

Der allgemeine Versuchsablauf dieser gesamten experimentellen Studie ist nachfolgend graphisch dargestellt (s. **Abb. 3-1**) und wird im folgenden detailliert beschrieben

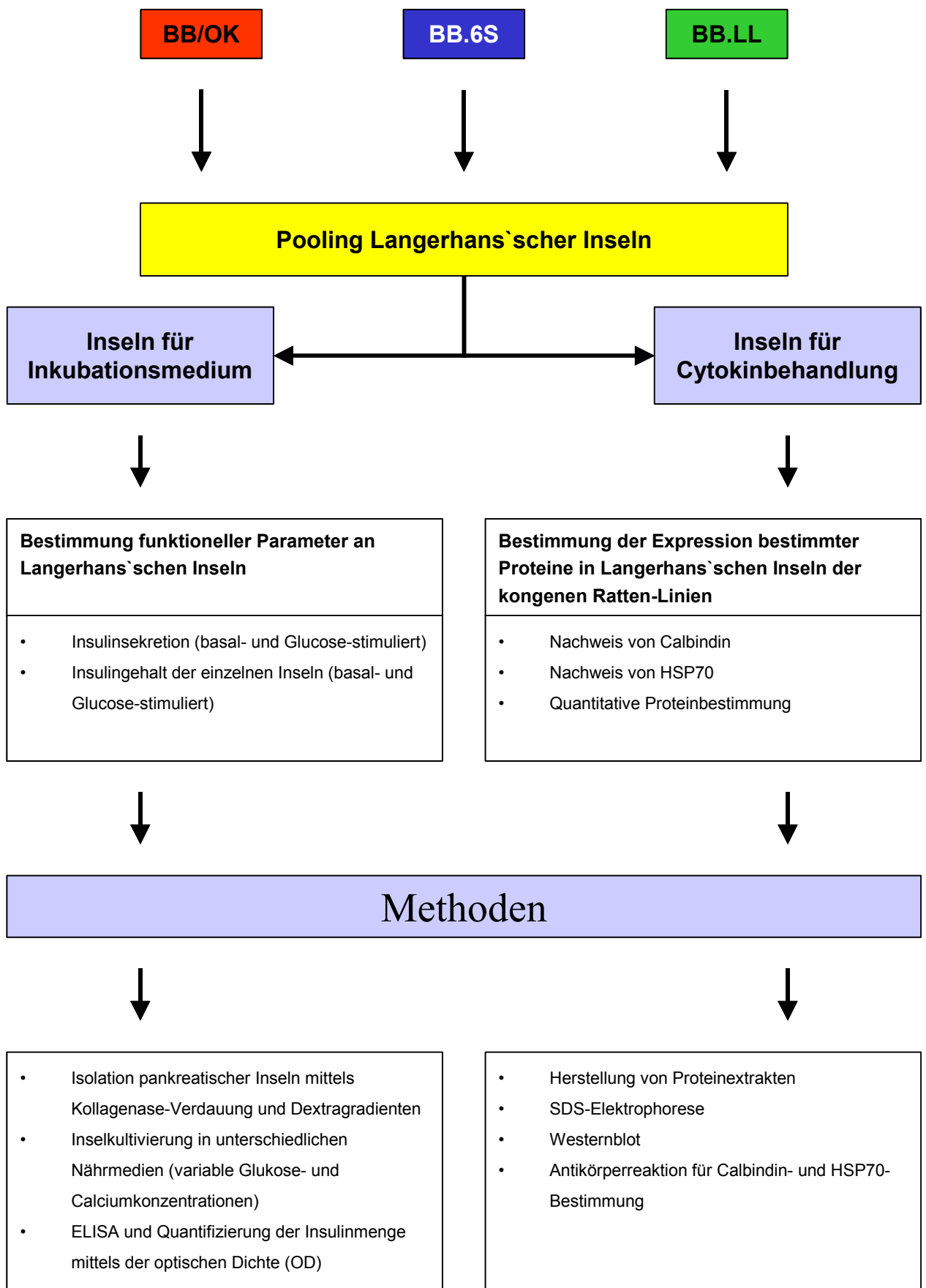


Abb. 3-1: Allgemeiner Versuchsablauf

3.1 Tiermaterial und Haltung

Alle verwendeten Tiere wurden in der Abteilung für Versuchstierkunde der Medizinischen Fakultät der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald gezüchtet und für die Untersuchungen bereitgestellt. Die tierexperimentellen Untersuchungen erfolgten nach strikter Einhaltung der gültigen Tierschutzbestimmungen und nach Kenntnisnahme der zuständigen Tierschutzbehörden des Landes Mecklenburg-Vorpommern. Das durchschnittliche Alter der Tiere betrug 8-12 Tage. Folgende Rattenstämme wurden für die In vitro-Untersuchungen verwendet:

- Ratten der BB/OK-Linie: Ratten von nicht diabetischen Muttertieren
- Ratten der BB.6S-Linie
- Ratten der BB.LL-Linie

Die Tiere wurden unter strikten SPF (spezifiziert-pathogen-frei) –Bedingungen gezüchtet und mit Pelletfutter (Ssniff R-Zucht, Spezialdiäten GmbH, Soest) sowie Wasser mit einem pH-Wert von 2,5-3 ad libitum ernährt. Die Versuchstiere wurden tageszeitlichen Rhythmen von 12 Stunden Licht (5 bis 17 Uhr) und 12 Stunden Dunkelheit ausgesetzt. Die Raumtemperatur lag bei 22 +/- 2 °C, die relative Luftfeuchtigkeit bei 55 +/- 10%.

3.2 Präparation und Kultur Langerhans'scher Inseln

Nach Dekapitation der 8 bis 12 Tage alten Ratten wurde das entnommene Pankreasgewebe von Fettgewebe und Lymphknoten befreit und in Hanks'scher Salzlösung (HBSS) kultiviert. Die sich anschließende fraktionierte enzymatische Verdauung des exokrinen Pankreasgewebes erfolgte nach einer modifizierten Methode von HEHMKE und KOHNERT⁶⁸. Nach dieser Methode wurde das Pankreasgewebe in kollagenasehaltiger Hank'scher Lösung (3 mg Kollagenase/5 ml HBSS) bei 37°C inkubiert. Die Verdauung infolge enzymatischer Zersetzung musste rechtzeitig beendet werden, um die Funktion der Langerhans'schen Inseln nicht nachteilig zu beeinflussen. Die Kollagenasewirkung wurde durch Zugabe von Hank'scher Lösung gestoppt. Die Anreicherung der Langerhans'schen Inseln erfolgte durch Dichtegradientenzentrifugation mit Dextran wie bei HEHMKE, KOHNERT, et al. beschrieben. Dazu wurden, ausgehend von einer Dextranstammlösung, drei unterschiedlich verdünnte Dextran-

lösungen (DL1, DL2, DL3, Zusammensetzung s. Anhang) hergestellt. Das Sediment wurde in 10 ml der Dextranstammlösung suspendiert und vorsichtig mit DL1, DL2 und DL3 überschichtet. Durch Zentrifugation reicherten sich die Langerhans'schen Inseln in der Übergangsphase zwischen DL2 und DL3 an. Nach Überführung der Inseln aus dieser Phase in Hank'sche Lösung mit 10% hitzeinaktiviertem neonatalem Kälberserum (NKS) wurden die Langerhans'schen Inseln unter dem Mikroskop isoliert. Mit dieser Technik ließen sich etwa 150-200 Langerhans'sche Inseln pro Pankreas dieser Altersgruppe isolieren. Ein Teil der isolierten Inseln wurde im ersten experimentellen Schritt dieser Arbeit für die Bestimmung von Insulinsekretion und Insulingehalt verwendet.

Für die sich anschließenden Versuche wurden die Langerhans'schen Inseln aus der Hank'schen Lösung in eine RPMI 1640 Lösung (s. Anhang) überführt. Gruppen von jeweils 500 Inseln wurden zunächst für 3 Tage unter sterilen Bedingungen in 3 ml dieses Gewebekulturmediums (RPMI 1640 + 10% FKS + 11,1 mmol/l Glucose) bei 37 °C und 5% CO₂ im Inkubator vorkultiviert.

Nach der Inkubation wurden die Inseln in zwei Gruppen von jeweils ca. 450 Inseln in 2 ml Inkubationsmedien überführt und mit IL1- β (10 U/ml; Biosource, Camarillo, CA) und IL1- β + IFN γ + TNF α (10+500+500 U/ml; Biosource, Camarillo, CA) behandelt. Nicht cytokinbehandelte, unter ansonsten identischen Bedingungen, gewonnene und kultivierte Langerhans'sche Inseln dienten als Kontrollgruppe. Nach einer 24-stündigen Behandlungsperiode erfolgte die funktionelle Untersuchung der Langerhans'schen Inseln. Der zeitliche Ablauf der Kultivierung sowie die Bestimmung der funktionellen Parameter der isolierten Inseln ist in **Abb. 3-2** graphisch dargestellt.

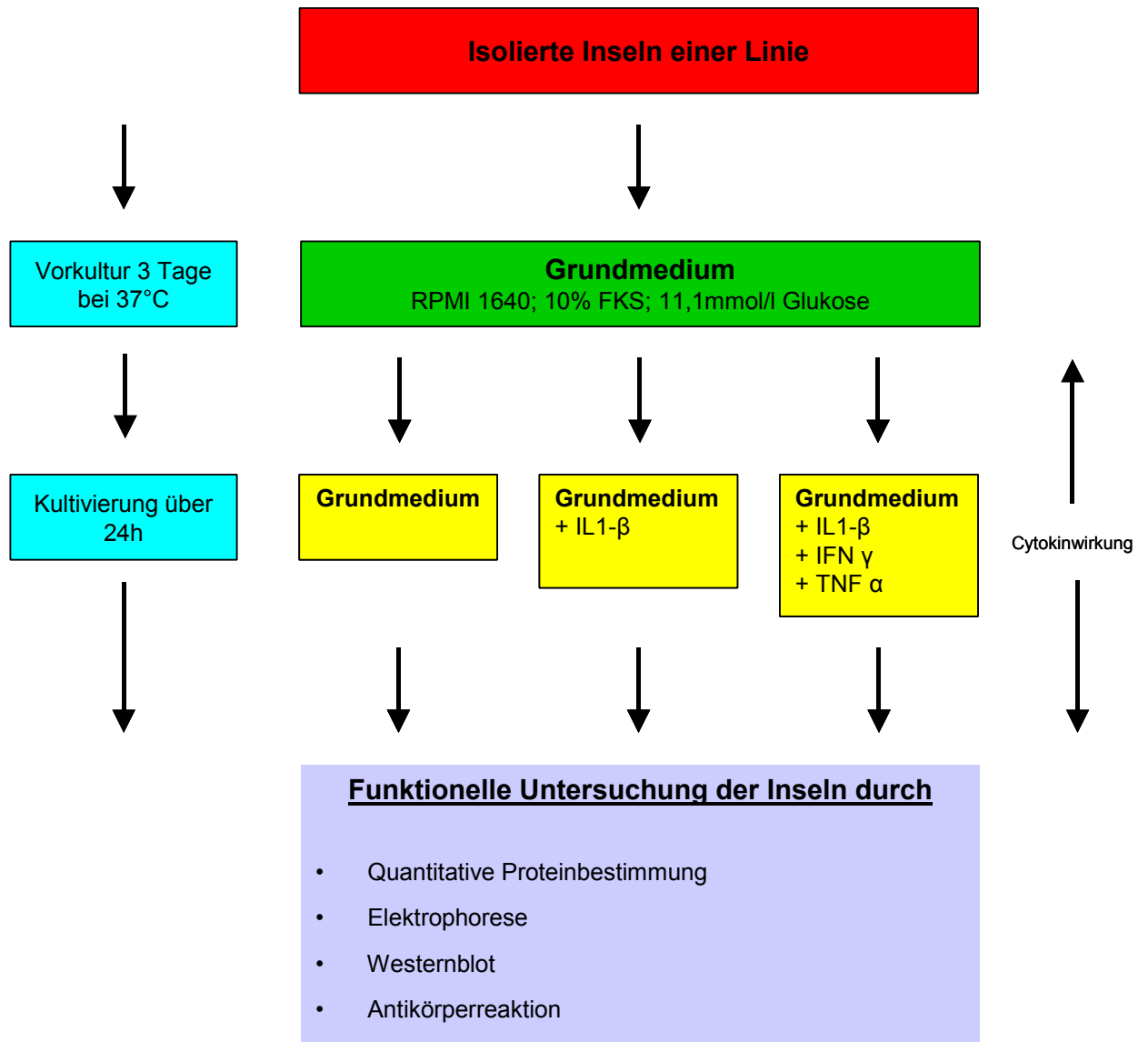


Abb. 3-2: Detaillierte Versuchsübersicht über die Cytokinbehandlung der Langerhans'schen Inseln

BB/OK: n = 9;

BB.6S: n = 9;

BB.LL: n = 8

3.3 Funktionelle Untersuchungen der Langerhans'schen Inseln

3.3.1 Insulinsekretion der Langerhans'schen Inseln

Die funktionelle Integrität der Langerhans'schen Inseln wurde mittels der Stimulierbarkeit zur Insulinsekretion durch Glukosezugabe überprüft (modifizierte Methode nach HAHN).

Die Bestimmung der Insulinsekretion erfolgte nach Inkubation der Langerhans'schen Inseln in Carbogen-gesättigter Atmosphäre, um dadurch ein pH-Optimum von 7,4 zu erreichen. Dazu wurden jeweils 5 Langerhans'sche Inseln in 200 µl GEY & GEY Medium (s. Anhang) inkubiert. Die Messung wurde in drei Versuchsreihen (s. **Tab. 3-1**) mit variierender Calciumkonzentrationen (0 mmol/ml Ca; 2,5 mmol/ml Ca und 3,5 mmol/ml Ca) und jeweils steigender Glucosekonzentration (0 mmol/ml Glucose; 2 mmol/ml Glucose und 20 mmol/ml Glucose) vorgenommen. Ausgangsmedium dieser Inkubationslösungen ist eine Calcium-freie GEY & GEY Stammlösung, die durch Zugabe von Glucose und Calcium entsprechend modifiziert wurde (s. Anhang). Die Inkubation der Inseln erfolgte über 2h bei 37°C in einem Schüttelwasserbad. Die Überstände mit dem während der Glukosestimulation sezernierten Insulin wurden anschließend in Eppendorf-Röhrchen überführt und zentrifugiert.

Glucose / Calcium	0 mmol/ml Calcium	2,5 mmol/ml Calcium	3,5 mmol/ml Calcium
0 mmol/ml Glucose	5 Inseln	5 Inseln	5 Inseln
2 mmol/ml Glucose	"	"	"
20 mmol/ml Glucose	"	"	"

Tab. 3-1: Versuchsreihe mit variierender Calcium- und Glucosekonzentration

Die Inkubation in 2,5 mmol/ml Calcium in Gegenwart von 2 mmol/ml Glucose (basale Insulinsekretion) diente als Kontrollgruppe dieser Versuchsreihe. Aliquote des Inkubationsmediums wurden mit RIRI-Puffer verdünnt und bis zur Messung bei -20°C eingefroren. Die quantitative Bestimmung des sezernierten Insulins erfolgte mittels ELISA.

3.3.2 Insulingehalt der Langerhans'schen Inseln

Die Bestimmung des Insulingehaltes erfolgte im Anschluss an die Insulinsekretion. Für diese Ermittlung wurden die Gruppen von je 5 Langerhans'schen Inseln nach ihrer 2 h Inkubationszeit in 400 µl Hank'sche Lösung (s. Anhang) überführt. Durch Ultraschallbehandlung wurden die β-Zellen homogenisiert (20 sec, 50 W). Aliquote des Homogenisates werden mit RIRI-Puffer verdünnt (1:100) und dienen der Messung des Insulingehaltes mittels Insulin-ELISA.

3.3.3 Insulin-ELISA

Die Bestimmung des Insulins wurde enzymimmunologisch mit einem direkten Sandwich-ELISA (Mercodia Rat Insulin ELISA, Uppsala, Schweden) durchgeführt⁶⁹. Diese Methode ermöglichte eine quantitative Ermittlung des Insulins und wurde sowohl zur Bestimmung der Insulinsekretion als auch des Insulingehaltes angewendet.

Die Standards sowie die Sekretions- und Gehaltsmedien wurden zu je 25 µl pipettiert. Anschließend wurden 50 µl einer Konjugatlösung (0,6 ml Konjugat-Stammlösung + 6 ml Konjugat-Puffer) zu jeder Probe bzw. Standard hinzugegeben. Unter ständiger Bewegung auf einem Schüttler wurden die Proben bei Raumtemperatur gleichmäßig durchmischt. Während dieser Zeit konnten die Antikörper an antigenen Strukturen der Insulinmoleküle binden, nicht gebundene Antikörper wurden anschließend durch 6 Waschschriffe mit 350 ml Waschlösung entfernt. Die entstandenen Antigen-Antikörper-Verbindungen konnten mit dem Chromogen 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (200 µl) sichtbar gemacht werden. Dabei wurde das zunächst farblose Chromogen als Substrat durch die an den Antigen-Antikörper-Komplex gebundene Peroxidase in ein farbiges Endprodukt umgesetzt. Nach der 15 minütigen Inkubation wurde die Reaktion durch eine Stopplösung (1 M H₂SO₄) unterbrochen. Die quantitative Insulinbestimmung erfolgte über die spektrophotometrische Bestimmung der angefärbten Enzym-Substrat-Verbindungen am Photometer bei 450 nm. Als Referenzwert diente die aus den Ratten-Insulin-Standards gewonnene Standardkurve.

Bei der Berechnung der Höhe der Insulinsekretion sowie des Insulingehaltes wurden die Verdünnungsfaktoren sowie die Anzahl der Insulin produzierenden Inseln berücksichtigt.

3.4 Expression von HSP70 und Calbindin

3.4.1 Quantitative Proteinbestimmung

Die differenzierte Beurteilung der elektrophoretisch aufgetrennten Banden setzte eine quantitative Bestimmung des Gesamtproteingehaltes in den Extrakten voraus. Von den zuvor dokumentierten Volumina der Extrakte wurden jeweils 1 μ l abgenommen und für die Proteinbestimmung aufgearbeitet. Jedes Volumen wurde mit 300 μ l Aqua dest. verdünnt und anschließend auf drei Wells der Mikroplatte aufgeteilt um Dreifachbestimmungen vorzunehmen. Die Standards wurden in Form einer Verdünnungsreihe in die entsprechenden Wells der Mikroplatten pipettiert. Daraufhin wurde eine zuvor vorbereitete Lösung (s. Anhang) mit jeweils 100 μ l in die Wells pipettiert. Die Bestimmung der Proteinmenge erfolgte über die Höhe der Extinktion mittels der Densitometrie bei einer vorgegebenen Wellenlänge von 570 nm. Aus den Extinktionswerten konnte mit Hilfe einer Eichreihe die Proteinmenge in μ g/Insel berechnet werden.

3.4.2 Herstellung von Proteinextrakten

Die Langerhans'schen Inseln wurden nach der Cytokinbehandlung dem Kulturmedium entnommen und in einem Eppendorfbecher auf Eis gestellt. Nach dem Auswaschen des Kulturmediums mit PBS-Puffer erfolgte eine Zentrifugation bei 2500 U/min (4 °C). Der Überstand wurde mit einer Spritze abgenommen und das Sediment mit einer vorgegebenen Menge an Lysepuffer versetzt. Die Suspension wurde nun 30 min auf Eis gestellt und anschließend bei –70 °C eingefroren.

Für die Vorbereitung der Elektrophorese wurden die Lysate schließlich wieder aufgetaut (30 Minuten auf Eis) und bei 5000 U/min zentrifugiert.

3.4.3 SDS-Elektrophorese

Die SDS-Elektrophorese dient der Trennung und Analyse von Proteingemischen in einem Spannungsfeld; dabei durchwandern die Proteine eine inerte Matrix eines stark vernetzten Polyacrylamid-Gels. Da die Polypeptide aufgrund der unterschiedlichen Aminosäurezusammensetzung jeweils differente Nettoladungen besitzen, werden sowohl das Probenmaterial als auch das Gel mit einem geladenen Detergenz versetzt (SDS). Zusätzlich werden alle Sulfidbindungsbrücken durch eine reduzierende Substanz (DTT) gespalten. Durch diese Maßnahmen erfolgt die Separation allein aufgrund der Größe der einzelnen Peptidketten.

Die Elektrophorese erfolgte nach einer weit verbreiteten Methode nach LAEMMLI⁷⁰. Für die Elektroelution wurden Trenngele mit einer Acrylamidkonzentration von 10% verwendet, um eine gute Separation der Proteine im oberen Molekularmassenbereich zu erzielen. Nach Zugabe von Ammoniumpersulfat als Starter bzw. Katalysator für die Vernetzung begann die Aushärtung der Gele. Die 6 cm x 8 cm x 0,5 cm großen Gele wurden wie bei LAEMMLI beschrieben hergestellt. Der Elektrodenpuffer enthielt Tris, Glycin, SDS sowie Aqua dest.

Aufgrund des relativ hohen Acrylamidanteils ist die Strukturvernetzung innerhalb des Trenngels höher, so dass auch kleine Moleküle nach ihrer Auftrennung noch im Gel vorhanden sind. Es wurde somit eine gute Separation der Proteine über die gesamte Spannbreite der zu erwartenden Molekulargewichte erreicht. Die 1 cm breiten Sammelgele setzten sich wie die Trenngele aus Acrylamid, Bisacrylamid, Tris-HCl (pH 6,8), TEMED, Ammoniumpersulfat sowie Aqua dest. zusammen.

Vor dem Auftragen der Lysate wurden diese unter Protokollierung des Volumens abpipettiert und mit dem jeweils gleichen Volumen an Probenpuffer versetzt, während die Marker zur Darstellung des zu erwartenden Molekulargewichtes unverdünnt verwendet wurden. Sowohl Marker wie auch Proben (Lysate) wurden auf das Gel aufgetragen und bei 60 mA über 60-90 min im elektrischen Feld getrennt. Unter Berücksichtigung der zurückgelegten Laufstrecke wurde der Vorgang schließlich beendet. Die Gele wurden in gekühltem Blotpuffer bei 4 °C equilibriert, um das SDS wieder aus dem Gel zu entfernen.

3.4.4 Westernblot

Der Immunblot oder Westernblot ist ein Verfahren, mit der Proteine mittels eines elektrischen Feldes von einem Elektrophoresegel auf eine proteinbindende Membran übertragen werden. Sofern Antikörper gegen die geblohteten Antigene vorhanden sind, lassen sie sich zur spezifischen Markierung verwenden und in einem farbreaktiven Schritt sichtbar machen.

Für die Durchführung wurden Filterpapier und Nitrocellulose-Membranen in der Größe der zu blottenden Gelfläche zugeschnitten und schließlich nach Einweichen in Blotpuffer bei 4°C in einer vorgegebenen Reihenfolge übereinandergeschichtet und im feuchten Zustand in die Blotkammer gelegt. Die genaue Anordnung wird nachfolgend ersichtlich:

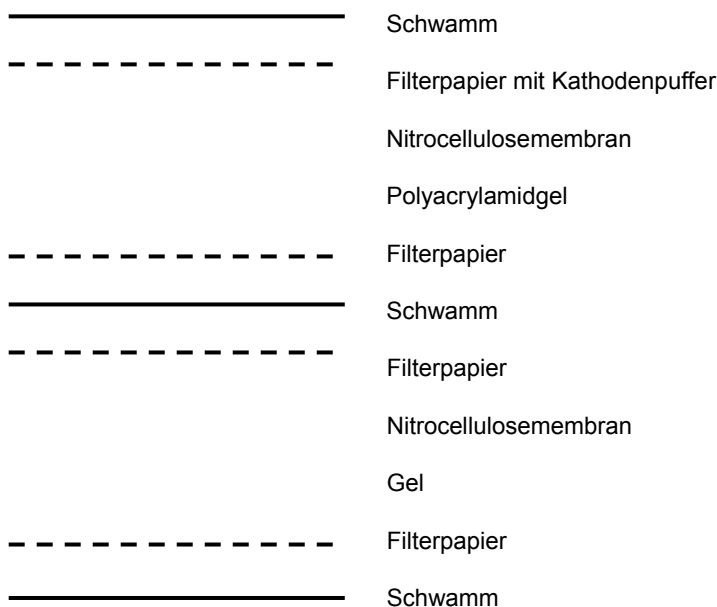


Abb.3-3: Aufbau der Blotkammer

Wie bei TOWBIN et al.⁷¹ beschrieben erfolgte der Transfer der Proteine vom Gel auf die Nitrocellulosemembran bei konstanter Voltzahl (150 mV) und einer Temperatur von 4 °C. Mit einer Ponceaulösung (3%) konnte der Transfer der Proteine auf die Nitrocellulosemembran kontrolliert werden. Nach dem Auswaschen der Ponceaulösung folgt eine einstündige Inkubation der Nitrocellulosemembran bei Zimmertemperatur (20 °C) in Blockpuffer. Durch diesen Vorgang wurden alle nicht durch die transferierten Proteine belegten Bindungskapazitäten der Membran abgesättigt, so dass keine unspezifischen Bindungen bei weiteren Reaktionsschritten entstehen konnten. Nach zweimaligen Waschen mit PBS Tween (s. Anhang) wurde die

Nitrocellulosemembran zwischen Filterpapier getrocknet und bis zur Antikörper-Reaktion bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

3.4.5 Antikörper-Reaktion

Voraussetzung für diesen Arbeitsschritt war eine erfolgreiche Übertragung der Proteine vom Gel auf die Nitrocellulosemembran im Westernblot.

In diesem Zusammenhang wurde bei Raumtemperatur der Blot mit dem ersten spezifischen Antikörper (AK1) inkubiert. Nach mehrmaligen Waschen der Membran in PBS-Tween wurde der Blot mit dem zweiten an Peroxidase gekoppelten Antikörper (AK2) bei Raumtemperatur inkubiert.

Während der erste Antikörper (AK1) an den antigenen Oberflächenstrukturen des HSP70 (STRESS GEN; Anti-HSP70; *mouse monoclonal*) und des Calbindins (SANTA CRUZ; Anti-Calbindin; *goat monoclonal*) gebunden hat, konnte die Bindung des zweiten Antikörpers (AK2) an spezifischen antigenen Strukturen des ersten Antikörpers durch eine Farbreaktion mittels alkalischer Phosphatase sichtbar gemacht werden.

Der erste Antikörper (AK1), der gegen antigene Strukturen des HSP70 gerichtet war, wurde 1:1000 mit PBS-Tween verdünnt und zwei Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler mit der Blot-Membran, auf der sich die Proteine befinden, inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Blot-Membran mit PBS-Tween wurde diese mit dem zweiten Antikörper (s. Anhang) in einer Verdünnung von 1:5000 versetzt (vgl. **Tab. 3-2**). Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei Raumtemperatur wurde der Antikörper erneut mit PBS-Tween ausgewaschen, und der gebundene Antikörper kann mit alkalischer Phosphatase (s. Anhang) innerhalb von wenigen Minuten nachgewiesen werden. Nach deutlich erkennbarer Braunfärbung der Proteinbanden wurde die Farbreaktion durch mehrmaliges Waschen in PBS-Tween und Aqua dest. beendet, abschließend die Blot-Membran zwischen Filterpapier getrocknet.

Der Nachweis des Calbindins erforderte eine 24 h Inkubation des Blots in Gegenwart des ersten Antikörpers. Die weiteren Schritte in der Durchführung entsprachen denen des HSP70-Nachweises. Die detaillierte Durchführung der Antikörperreaktion wird in der folgenden Darstellung (s. **Abb. 3-4**) deutlich.

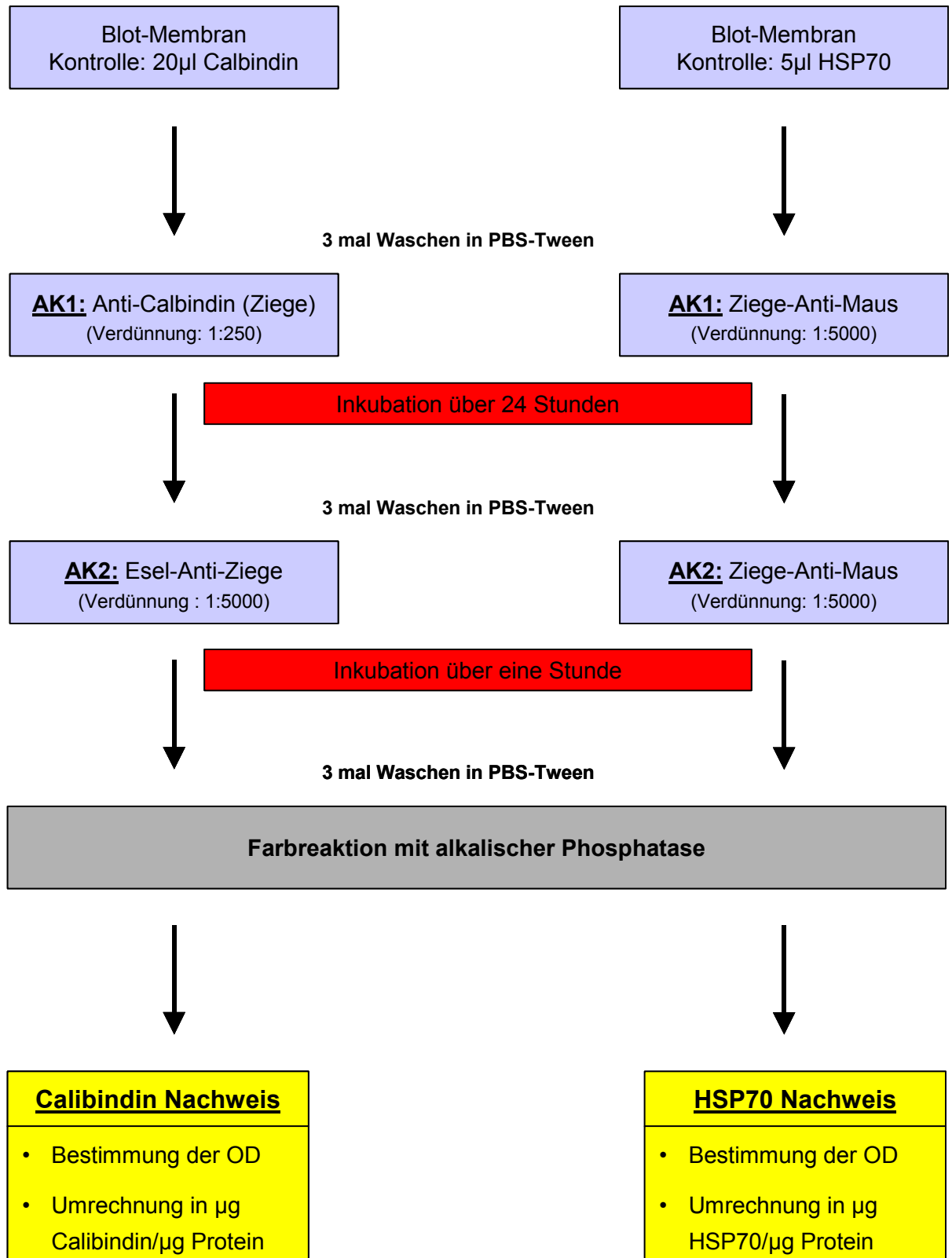


Abb. 3-4: Antikörperreaktion für die HSP70- und Calbindin Bestimmung

Antikörper-Bezeichnung	Herkunft	Inkubation	Verdünnung	Ak-Kontrolle
Anti-HSP70 (AK1)	Maus	2 h	1:5000	HSP70
Ziege-Anti-Maus-AP (AK2)	Ziege	1 h	1:5000	
Anti-Calbindin (AK1)	Ziege	24 h	1:250	Calbindin
Esel-Anti-Ziege-AP (AK2)	Esel	1 h	1:5000	

Tab. 3-2: Auflistung der verwendeten Antikörper nach Funktion und Herkunft

3.5 Statistische Berechnung

Für alle Versuche standen die zuvor isolierten Langerhans'schen Inseln zur Verfügung, die aus verschiedenen Einzelverdauungen der entsprechenden Ratten-Linie gepoolt wurden. Zur Bestimmung der funktionellen Parameter (Insulinsekretion und Insulingehalt) erfolgten für jede Ratten-Linie 6-8 Einzelerperimente mit unabhängiger Inselisolation. Die n-Zahl aller Versuche entsprach der Anzahl der Einzelverdauungen der einzelnen Ratten-Linien. Die Messergebnisse wiederum basierten auf statistischer Mittelung der Einzelmessergebnisse.

In jedem Einzelerperiment der Insulinsekretions- und Insulingehaltsbestimmungen wurden zwei parallele Ermittlungen eines Parameters pro Kulturbestimmung durchgeführt.

Für die Bestimmung des Proteingehaltes aus den Extrakten erfolgte eine dreifache Bestimmung der Messwerte mit Ermittlung der jeweiligen Mittelwerte.

Die Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm mittlerer Fehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt.

Die Prüfung auf statistische Signifikanz der Mittelwerte innerhalb der Einzelerperimente sowie zwischen den Linien erfolgte mit Hilfe des t-Test mit dem Statistikprogramm Sigma Plot. Für $p < 0,05$ wurden die Ergebnisse als statistisch signifikant angegeben.

4 Ergebnisse

4.1 Insulinsekretion der Langerhans`schen Inseln

Die Sekretion von Insulin ist eine spezifische Leistung der β -Zellen und ist auch *in vitro* bei isolierten Langerhans`schen Inseln nachweisbar. Dabei steht als Bestätigung für die funktionelle Unversehrtheit des Gewebes – trotz Isolationsprozedur und Entfernung der exokrinen Gewebestrukturen im Gesamtgefüge des Pankreas – die Reaktion der Inseln zur Verfügung. Die β -Zellen reagieren auf eine erhöhte Glucosekonzentration des umgebenen Mediums mit gesteigerter Insulinsekretion.

4.1.1 Insulinsekretion Langerhans`scher Inseln des BB/OK-Stammes

Am Beispiel der von den BB/OK-Ratten isolierten Langerhans`schen Inseln ist zu erkennen, dass kultivierte Inseln von 8–12 Tage alten BB-Ratten für eine derartige hoch spezialisierte und komplexe Stoffwechselreaktion intakt und reif genug sind.

Wie in der **Abb. 4-1** deutlich wird, zeigt sich unabhängig von der Calciumkonzentration bei einer Glucosekonzentrationen zwischen 0 und 2 mmol/ml kein Unterschied bezüglich der Freisetzung von Insulin aus den Langerhans`schen Inseln. Die infolge fehlender Glucose nicht stimulierte Abgabe von Insulin (0 mmol/ml Glucose) entspricht nahezu der basalen Sekretion bei 2 mmol/ml Glucose. Im statistischen Mittel liegen die Werte der Insulin-Sekretion bei allen drei Calciumkonzentrationen etwa bei 0,034 pmol Insulin/Insel. Die stufenweise erhöhte Calciumkonzentration (von 0 mmol/ml über 2,5 mmol/ml bis zu 3,5 mmol/ml Calcium) im Medium hat bei 0 bzw. 2 mmol/ml Glucose keinen Einfluss auf die Freisetzung von Insulin aus den β -Zellen. Erst bei einer maximalen Glucosestimulation (20 mmol/ml) wird die Sekretionsleistung bei allen drei Calciumkonzentrationen signifikant erhöht gegenüber den beiden vorherigen Messreihen. Im Vergleich der Sekretionswerte unter maximaler Glucosekonzentration (20 mmol/ml Glucose) wird deutlich, dass sich die Sekretionsleistung der Langerhans`schen Inseln bei Erhöhung der Calciumkonzentration von 0 auf 2,5 mmol/ml mehr als verdoppelt, bei weiterer Zunahme der Calciumkonzentration auf 3,5 mmol/ml die Sekretion jedoch wieder abfällt.

Daraus lässt sich ableiten, dass bei physiologischer Calciumkonzentration (2,5 mmol/ml Calcium) sich die höchste Sekretionsleistung der Langerhans'schen Inseln ergibt, was nahezu einer Zunahme um den Faktor 5 gegenüber der nicht Glucose-stimulierten Abgabe von Insulin entspricht. Die Sekretionsleistung der Langerhans'schen Inseln fällt also bei weiterer Steigerung der Calciumkonzentration über das physiologische Optimum wieder ab, d.h. eine Calciumkonzentration von 2,5 mmol/ml ermöglicht eine maximale Insulinsekretion bei den vorgegebenen Versuchsbedingungen.

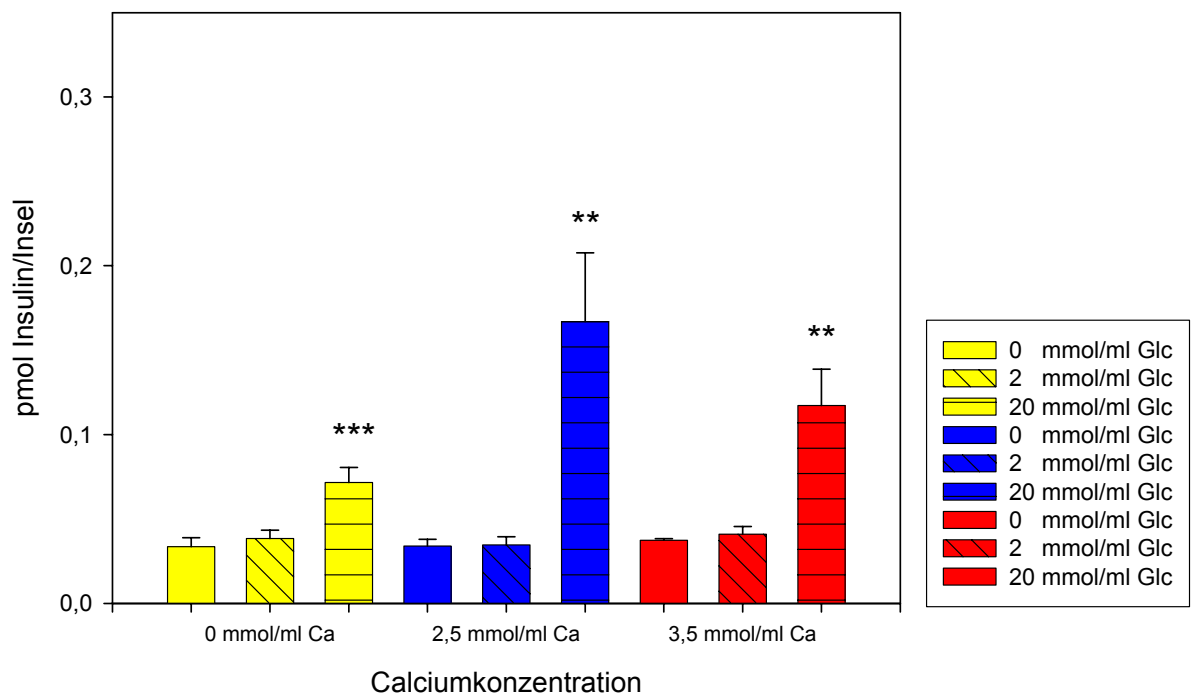


Abb. 4-1: Einfluss der Calcium- und Glucosekonzentration auf die Insulinsekretion Langerhans'scher Inseln. des Parentalstamm BB/OK; Tieralter: 10-12 d; Mittelwert \pm SEM; n = 6; * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$ gegenüber der Insulinsekretion bei 0 mmol/ml Glucose im gleichen Calciumniveau (0; 2,5; 3,5 mmol/ml Calcium).

4.1.2 Insulinsekretion Langerhans'scher Inseln der BB.6S-Linie

Im folgenden wird die Sekretionsleistung der Langerhans'schen Inseln von Ratten der BB.6S-Linie in Abhängigkeit von der gleichen Glucose- und Calciumkonzentrationen, wie in 4.1.1 beschrieben, herausgestellt. Vergleicht man bei allen drei vorgegebenen Calciumkonzentrationen bei 0 und 2 mmol/ml Glucose die Abgabe von Insulin, so entsprechen die Werte nahezu einander. Bei hoher Glucosekonzentration (20 mmol/ml) ist die Steigerungsrate bei physiologischer Calciumkonzentration von 2,5 mmol/ml jedoch ausgeprägter als bei dem zuvor be-

schriebenen Parentalstamm BB/OK. Auffallend ist, dass auch bei 3,5 mmol/ml Calcium im Medium noch eine leichte Steigerung der Insulinsekretion zu verzeichnen ist (vgl. **Abb. 4-2**).

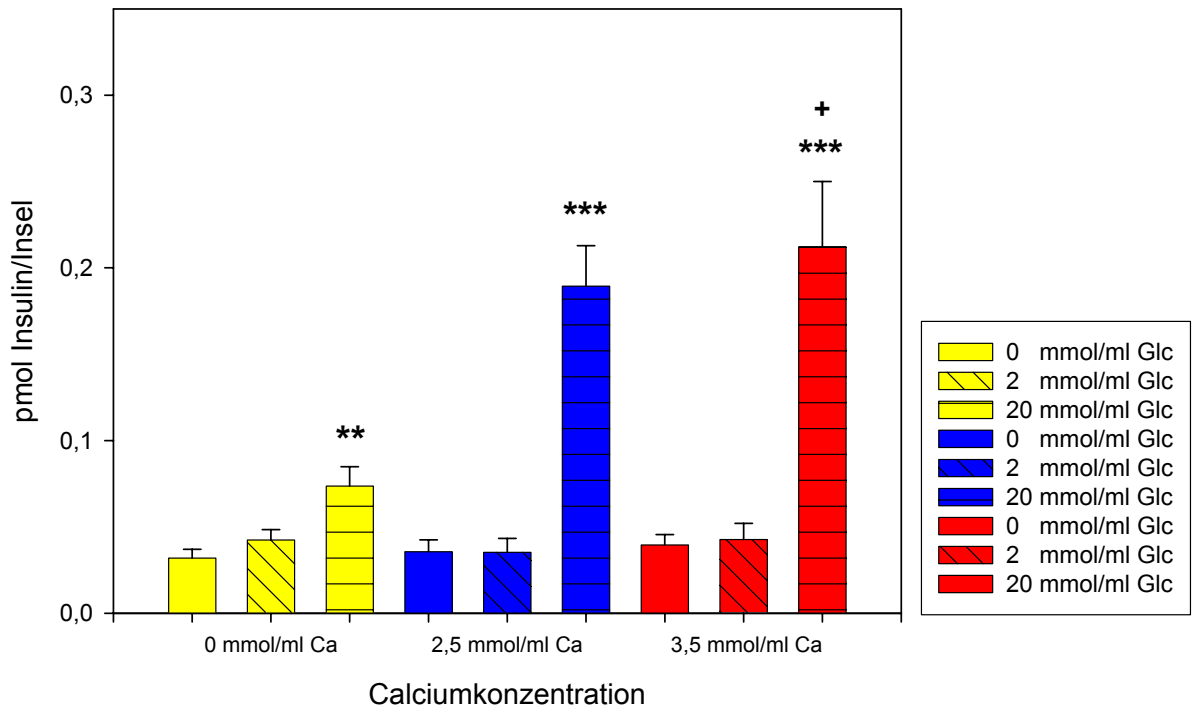


Abb. 4-2: Einfluss der Calcium- und Glucosekonzentration auf die Insulinsekretion Langerhans'scher Inseln der BB.6S- Linie; Tieralter: 10-12 d; Mittelwert \pm SEM; n = 7; * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$ gegenüber der Insulinsekretion bei 0 mmol/ml Glucose im gleichen Calciumniveau (0; 2,5; 3,5 mmol/ml Calcium), + = $p < 0,05$, ++ = $p < 0,01$, +++ = $p < 0,001$ gegenüber dem Parentalstamm BB/OK bei gleicher Glucose- und Calciumkonzentration.

Ein Vergleich des Parentalstammes BB/OK mit der BB.6S-Linie zeigt, dass hinsichtlich der Insulinfreisetzung sowohl bei 0 als auch bei 2 mmol/ml Glucose keine signifikanten Unterschiede bestehen. Auch die drei unterschiedlichen Calciumkonzentrationen (0; 2,5 und 3,5 mmol/ml Calcium) nehmen keinen Einfluss darauf. Auffallende Abweichungen der Insulinsekretion werden erst bei einer Erhöhung der Glucosekonzentration auf 20 mmol/ml deutlich. Die Erhöhung der Glucosekonzentration von 0 auf 20 mmol/ml Glucose führt bei 0 mmol/ml Calcium zu einer Steigerung der Insulinsekretion um den Faktor 2,3. Vergleichsweise ergibt sich bei ansonsten gleichen Bedingungen, aber unter physiologischer Calciumkonzentration (2,5 mmol/ml), ein Anstieg der Insulinsekretion um den Faktor 5,4. Eine vergleichbare Zunahme der Insulinsekretion beobachtet man bei einer Calciumkonzentration von 3,5 mmol/ml im Umgebungsmedium. Die maximale Sekretionsrate liegt dabei allerdings nur geringfügig

über der Sekretionsleistung bei physiologischer Calciumkonzentration (2,5 mmol/ml Calcium).

4.1.3 Insulinsekretion Langerhans'scher Inseln der BB.LL-Linie

Im folgenden werden die Ergebnisse der BB.LL-Linie dargestellt. Es zeigen sich auch hier keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Höhe der Insulinfreisetzung bei 0 und 2 mmol/ml Glucose. Dieses gilt für alle drei untersuchten Calciumkonzentrationen. Kennzeichnend bei dieser dritten Untersuchungsreihe ist der Einfluss der Calciumkonzentration auf die Höhe der Insulinsekretion bei 20 mmol/ml Glucose. Dabei kann die Insulinfreisetzung pro Langerhans'scher Insel annähernd um den Faktor 4 gesteigert werden.

Die Sekretionsleistung der Langerhans'schen Inseln von Ratten der BB.LL-Linie wird durch eine maximale Glucosestimulation von 20 mmol/ml signifikant gegenüber der spontanen Abgabe bei 0 mmol/ml Glucose erhöht. Wie die graphische Darstellung (s. **Abb. 4-3**) ersichtlich macht, erfolgt bei 0 mmol/ml Calcium nahezu eine Verdopplung der maximal stimulierten Insulinsekretion (20 mmol/ml), während bei 2,5 mmol/ml Calcium die Sekretionsrate um den Faktor 5 gegenüber der spontanen Abgabe bei 0 mmol/ml Glucose erhöht werden konnte. Jenseits der physiologischen Calciumkonzentration (3,5 mmol/ml Calcium) steigt die Sekretionsleistung in vitro um den Faktor 7,4.

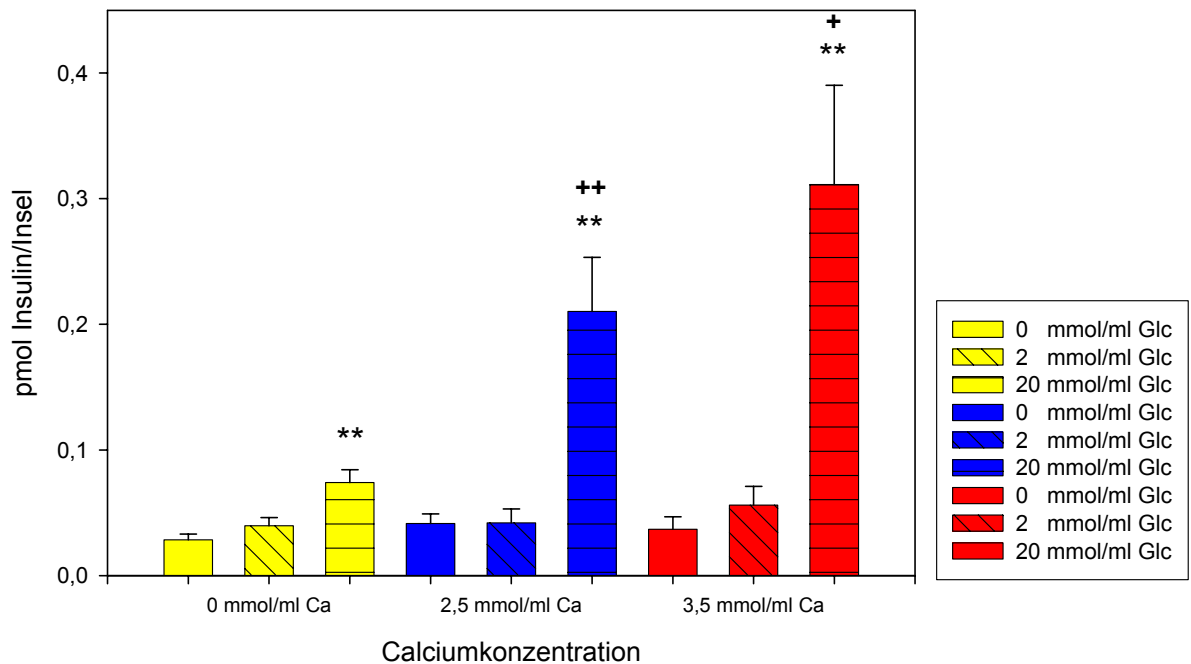


Abb. 4-3: Einfluss der Calcium- und Glucosekonzentration auf die Insulinsekretion Langerhans'scher Inseln der BB.LL-Linie; Tieralter: 10-12 d; Mittelwert \pm SEM; n =7; * = p< 0,05, ** = p< 0,01, *** = p< 0,001 gegenüber der Insulinsekretion bei 0 mmol/ml Glucose im gleichen Calciumniveau (0; 2,5; 3,5 mmol/ml Calcium), + = p< 0,05, ++ = p< 0,01, +++ = p<0,001 gegenüber dem Parentalstamm BB/OK bei gleicher Glucose- und Calciumkonzentration.

4.1.4 Zusammenfassung der Sekretionsergebnisse Langerhans'scher Inseln des Parentalstammes BB/OK vs. BB.6S- und BB.LL-Linie

Vergleicht man die Reaktionen der Langerhans'schen Inseln von Ratten der BB.LL-Linie mit denen der BB.6S-Linie in Bezug auf unterschiedliche Calcium- und Glucosekonzentrationen (s. **Abb. 4-4**), so wird eine signifikante Abweichung der Sekretionsleistung zwischen beiden Ratten-Linien nur bei einer 3,5-prozentigen Calciumkonzentration im Inkubationsmedium deutlich.

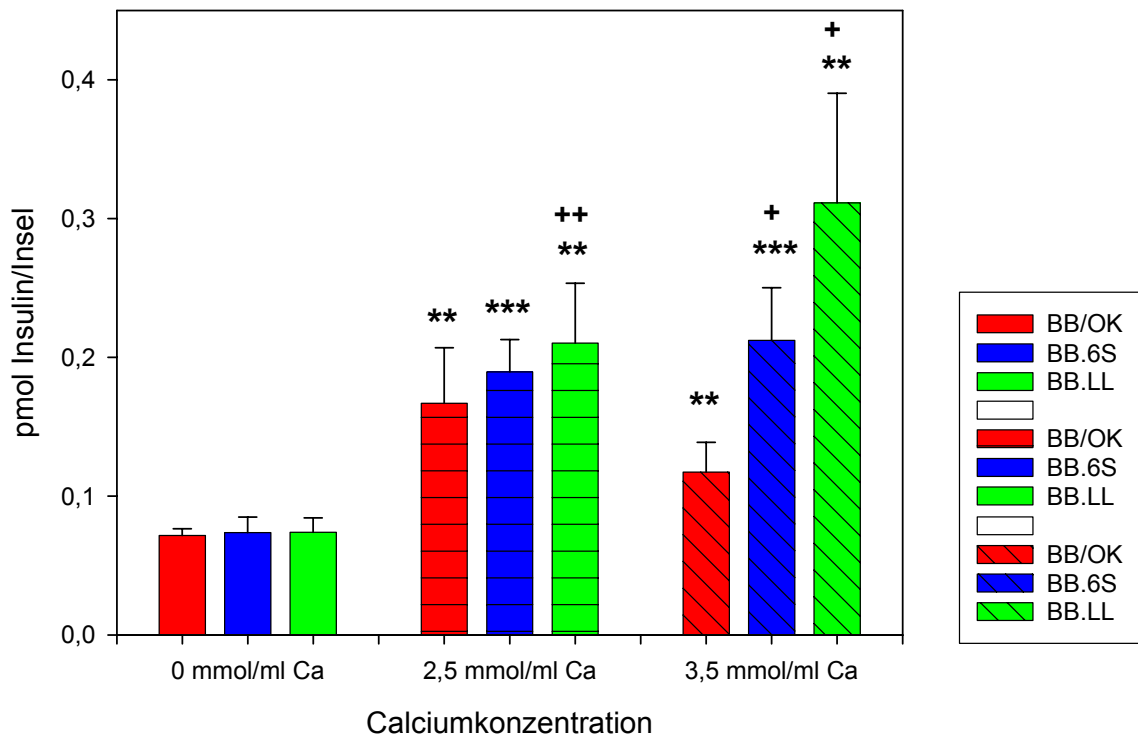


Abb. 4-4: Vergleichende Darstellung der Sekretionsleistung der Linien BB/OK, vs. BB.6S und BB.LL bei 20 mmol/ml Glucose. Einfluss der Calciumkonzentration auf die Insulinsekretion Langerhans'scher Inseln bei maximaler Glucosestimulation mit 20 mmol/ml Glucose; Tieralter: 10-12 d; Mittelwert \pm SEM; * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$ gegenüber der Insulinsekretion bei 0 mmol/ml Glucose im gleichen Calciumniveau (0; 2,5; 3,5 mmol/ml Calcium), + = $p < 0,05$, ++ = $p < 0,01$, +++ = $p < 0,001$ gegenüber dem Parentalstamm BB/OK bei gleicher Glucose- und Calciumkonzentration.

Deutlicher werden die unterschiedlichen Reaktionen der β -Zellen auf die vorgegebenen Calcium- und Glucosekonzentrationen im direkten Vergleich des Parentalstammes BB/OK mit der BB.LL-Linie. Während in Gegenwart von 0 mmol/ml Calcium die Reaktionen der Langerhans'schen Inseln nur wenig differieren (0,003 pmol Insulin/Insel), wird bei einer Konzentration von 2,5 mmol/ml Calcium eine stärker abweichende Reizantwort ersichtlich. Eine voneinander noch weiter abweichende Differenz zeigt sich bei 3,5 mmol/ml Calcium. Diese beruht auf einer gegenläufigen Entwicklung der Werte, da die höhere Calciumkonzentration zu einer weiteren Steigerung der Sekretion der Langerhans'schen Inseln bei Ratten der BB.LL-Linie führt, dagegen zu einer Reduzierung der Sekretion der Langerhans'schen Inseln des BB/OK-Stammes.

Fasst man die bisherigen Ergebnisse der Sekretionsversuche noch einmal zusammen, so wird deutlich, dass bei einer physiologischen Calciumkonzentration (2,5 mmol/ml Calcium) in

Gegenwart eines maximalen Glucosereizes (20 mmol/ml Glucose) bei allen drei Stämmen eine signifikante Zunahme der Insulinsekretion erfolgt, während bei 0 und 2 mmol/ml Glucose innerhalb der kongenen Linien sich keine nennenswerten Unterschiede herausstellen lassen. Gleiches gilt bei Abwesenheit von Calcium, allerdings mit dem Unterschied, dass hier die maximale Glucose-stimulierte Insulinsekretion (20 mmol/ml Glucose) niedriger ausfällt als unter physiologischen Calcium-Bedingungen.

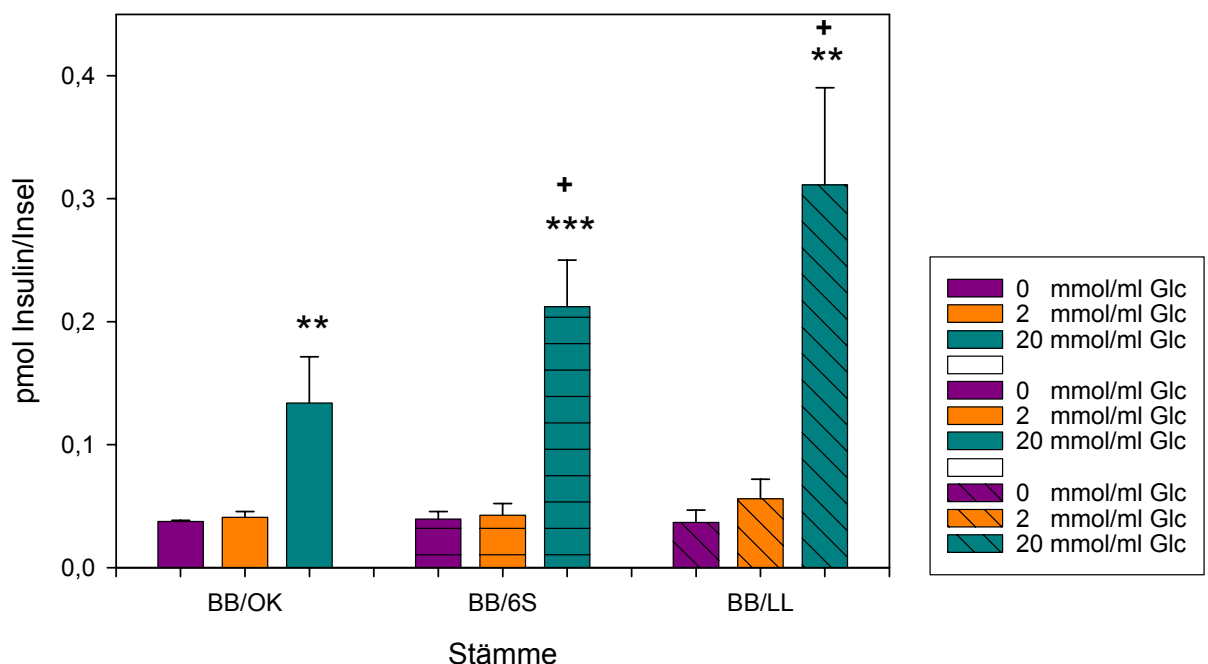


Abb. 4-5: Einfluss der Glucosekonzentration auf die Insulinsekretion Langerhans'scher Inseln bei einer Calciumkonzentration von 3,5 mmol/ml. Linien: BBOK (n = 6), BB.6S (n = 7), BB.LL (n = 7); Tieralter: 10-12 d; Mittelwert \pm SEM; * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$ gegenüber der Insulinsekretion bei 0 mmol/ml Glucose, + = $p < 0,05$, ++ = $p < 0,01$, +++ = $p < 0,001$ gegenüber dem Parentalstamm BB/OK bei gleicher Glucose- und Calciumkonzentration.

Anders sehen dagegen die Ergebnisse bei einer Calciumkonzentration von 3,5 mmol/ml aus. Während die Inseln der BB.6S- und der BB.LL-Ratten geringfügig mehr Insulin freisetzen als unter physiologischen Calciumbedingungen (2,5mmol/ml), gilt dieses nicht für die β -Zellen der BB/OK-Ratten. Im Gegensatz zu den vorher angeführten Rattenlinien fällt bei den Langerhans'schen Inseln dieses Rattenstammes bei weiterer Erhöhung der Calciumkonzentration auf 3,5 mmol/ml die Sekretionsleistung wieder ab. Diese signifikante Änderung der Sekreti-

onswerte bei einer gegebenen Calciumkonzentration von 3,5 mmol/ml in Abhängigkeit eines maximalen Glucosereizes (20 mmol/ml Glucose) wird nochmals in **Abb. 4-5** verdeutlicht.

4.2 Insulingehalt der Langerhans`schen Inseln

Im Anschluss an die Insulinsekretion wurde der Insulingehalt der Langerhans`schen Inseln bestimmt. Dabei ließen sich bei allen drei Ratten-Linien in Abhängigkeit von der Glucose- und Calciumkonzentration im Medium zwischen 20- und 60-fach höhere Werte an Insulin innerhalb der jeweiligen Inseln im Vergleich zum Sekretionsprodukt nachweisen. Auffallend ist, dass Schwankungen der ermittelten Werte als Reaktion auf die variierende Calcium- und Glucosekonzentration deutlich geringer ausgeprägt sind als bei der Sekretionsbestimmung. Aufgrund der nicht signifikanten Versuchsergebnisse lässt sich bezüglich des Insulingehaltes nur ein tendenzieller Zusammenhang darstellen. Trotz einer Untergliederung der Ergebnisse sollten diese in ihrer Gesamtheit betrachtet werden.

4.2.1 Insulingehalt Langerhans`scher Inseln des Parentalstammes BB/OK

Die isolierten Inseln des BB/OK-Stammes zeigen bei maximaler Glucosestimulation (20 mmol/ml) nach Erhöhung der Calciumkonzentration von 2,5 auf 3,5 mmol/ml einen Abfall des Insulingehaltes (s. **Tab. 4-1**). Diese Tendenz zeigte sich auch bei den zuvor durchgeführten Sekretionsversuchen dieser Langerhans`schen Inseln. Weniger stark ausgeprägt ist dieser tendenzielle Abfall des Insulingehaltes bei 2 mmol/ml Glucose und in Gegenwart von 2,5 mmol/ml Calcium.

Glucose / Calcium	0 mmol/ml Calcium	2,5 mmol/ml Calcium	3,5 mmol/ml Calcium
0 mmol/ml Glucose	2,06 +/- 0,14	1,80 +/- 0,31	2,62 +/- 0,54
2 mmol/ml Glucose	2,60 +/- 0,33	2,98 +/- 0,28	2,67 +/- 0,41
20 mmol/ml Glucose	2,75 +/- 0,22	3,32 +/- 0,36	2,13 +/- 0,32

Tab. 4-1: Einfluss der Calcium- und Glucosekonzentration auf den Insulingehalt Langerhans`scher Inseln des Parentalstammes BB/OK; Tieralter: 10-12 d; Mittelwert \pm SEM; n = 6; keine Signifikanz der Insulingehalte innerhalb eines Calciumniveaus sowie zwischen den Calciumniveaus. Angaben in pmol Insulin/Insel

4.2.2 Insulingehalt Langerhans'scher Inseln der BB.6S-Linie

Wie aus der Entwicklung der Werte aus (s. **Tab. 4-2**) erkenntlich wird, reagieren die Langerhans'schen Inseln der BB.6S-Linie auf die stufenweise Erhöhung des Calciums unter maximal Glucose-stimulierten Bedingungen (20 mmol/ml) nicht im Sinne einer kontinuierlichen Steigerung des Insulingehaltes, sondern es erfolgt vielmehr ein leichter Abfall des Insulingehaltes von 2,83 auf 2,48 pmol Insulin/Insel.

Auffallend ist weiterhin, dass hier bei maximaler Glukosestimulation (20 mmol/ml Glucose) die Insulingehalte mit Zunahme der Calciumkonzentration kontinuierlich abfallen, während bei den zuvor durchgeführten Sekretionsversuchen eine weitere Steigerung der Sekretion zu beobachten ist.

Wider der Erwartung ist der generell hohe Insulingehalt der Langerhans'schen Inseln bei 0 mmol/ml Calcium und maximal Glucose-stimulierten Bedingungen. Während die Insulingehalte bei 0 und 2 mmol/ml Glucose bei Erhöhung der Calciumkonzentration keine großen Veränderungen zeigen, reduziert sich bei maximaler Glucosekonzentration (20 mmol/ml) der Wert tendenziell jeweils in Stufen von 3,36 über 2,83 auf 2,48 pmol Insulin/Insel.

Glucose/Calcium	0 mmol/ml Calcium	2,5 mmol/ml Calcium	3,5 mmol/ml Calcium
0 mmol/ml Glucose	2,43 +/- 0,41	2,59 +/- 0,23	2,64 +/- 0,46
2 mmol/ml Glucose	2,61 +/- 0,52	2,70 +/- 0,25	2,65 +/- 0,45
20 mmol/ml Glucose	3,36 +/- 0,52	2,83 +/- 0,45	2,48 +/- 0,51

Tab. 4-2: Einfluss der Calcium- und Glucosekonzentration auf den Insulingehalt Langerhans'scher Inseln der BB.6S-Linie: Tialter: 10-12 d; Mittelwert \pm SEM; n = 7; keine Signifikanz der Insulingehalte innerhalb eines Calciumniveaus sowie zwischen den Calciumniveaus. Angaben in pmol Insulin/Insel

4.2.3 Insulingehalt Langerhans'scher Inseln der BB.LL-Linie

Der Insulingehalt der Langerhans'schen Inseln der BB.LL-Linie spiegelt nur z.T. die Ergebnisse der zuvor dargestellten Sekretionsversuche wieder. Während unter physiologischen Calciumbedingungen und in Gegenwart von 2 mmol/ml Glucose nur ca. 0,042 pmol Insulin/Insel dieser BB.LL-Linie sezerniert wurde, liegt dagegen der Insulingehalt innerhalb der β -Zellen unter ansonsten gleichen Bedingungen bei 2,64 pmol Insulin/Insel (s. **Tab. 4-3**). Dieser entspricht im Vergleich zur Insulinsekretion einem etwa 60-fach höheren Insulingehalt. Mit Zu-

nahme der Glucosekonzentration innerhalb der jeweiligen Calciumniveaus (0; 2,5; 3,5 mmol/ml Calcium) nimmt der Insulingehalt innerhalb der Langerhans'schen Inseln jeweils geringfügig zu. Ähnlich wie bei der Insulinsekretion werden bei 3,5 mmol/ml Calcium unter maximal-Glucose-stimulierten Bedingungen (20 mmol/ml Glucose) die höchsten Werte gemessen.

Glucose/Calcium	0 mmol/ml Calcium	2,5 mmol/ml Calcium	3,5 mmol/ml Calcium
0 mmol/ml Glucose	2,39 +/- 0,70	2,46 +/- 0,50	2,79 +/- 0,79
2 mmol/ml Glucose	3,02 +/- 0,53	2,64 +/- 0,42	3,08 +/- 0,90
20 mmol/ml Glucose	3,49 +/- 0,80	2,90 +/- 0,72	3,87 +/- 1,39

Tab. 4-3: Einfluss der Calcium- und Glucosekonzentration auf den Insulingehalt Langerhans'scher Inseln der BB.LL-Linie; Tieralter: 10-12 d; Mittelwert \pm SEM; n = 7; keine Signifikanz der Insulingehalte innerhalb eines Calciumniveaus sowie zwischen den Calciumniveaus. Angaben in pmol Insulin/Insel.

4.2.4 Insulingehalte der kongenen Ratten-Linien als Gesamtsumme

Da die einzelnen Untersuchungen bezüglich des Insulingehaltes keine signifikanten Unterschiede ergeben, wurde für den weiteren Vergleich dieser Parameter eine Gesamtsumme ermittelt. Diese Gesamtsumme ergibt sich durch Addition der einzelnen Gehalte bei jeweils variierender Calcium- und Glucosekonzentration. Wie **Tab. 4-4** zu entnehmen, haben die Langerhans'schen Inseln von Ratten der BB.LL-Linie mit 29,68 pmol Insulin/Insel die vergleichsweise höchste Gesamtsumme, während die β -Zellen des Parentalstammes BB/OK mit 24,32 den niedrigsten Insulingehalt aufweisen. Die Langerhans'schen Inseln der BB.6S-Linie enthalten hingegen einen Gesamtinsulingehalt, der dem Betrage nach zwischen denen der beiden anderen Ratten-Linien liegt. Diese Ergebnisse stimmen zum Teil mit den Einzelauswertungen des Insulingehaltes der jeweiligen Ratten-Linie überein.

Calciumkonz.	0 mmol/ml Calcium			2,5 mmol/ml Calcium			3,5 mmol/ml Calcium		
Glucosekonz.	0 mmol/ml Glucose	2 mmol/ml Glucose	20 mmol/ml Glucose	0 mmol/ml Glucose	2 mmol/ml Glucose	20 mmol/ml Glucose	0 mmol/ml Glucose	2 mmol/ml Glucose	20 mmol/ml Glucose
BB/OK	2,06	2,67	2,75	1,81	2,91	3,31	2,62	2,67	2,13
BB.6S	2,43	2,60	3,36	2,60	2,72	2,83	2,64	2,65	2,48
BB.LL	3,02	3,49	2,47	2,64	2,98	2,79	2,79	3,08	3,87

Tab. 4-4: Übersicht der Insulingehalte in Abhängigkeit der Calcium- und Glucosekonzentration bei den verwendeten Rattenstämmen. Angabe in pmol Insulin/Insel.

4.3 Gesamtprotein-Expression nach Cytokinexposition

Unter Kontrollbedingungen werden bei allen drei Ratten-Linien die Proteine in ähnlich hohen Werten exprimiert (s. **Tab. 4-5**). Signifikante Unterschiede lassen sich bezüglich der untersuchten Ratten-Linien nicht nachweisen. Erst bei Zugabe von Interleukin 1- β (IL1- β) zeigt sich eine reduzierte und stärker abweichende Gesamtprotein-Expression zwischen den untersuchten Linien und in Relation zu den Kontrollbedingungen. Tendenziell ist die Expression der Proteine bei den Ratten der BB.LL-Linie am höchsten, während die Langerhans'schen Inseln der BB/OK- und BB.6S-Ratten ungefähr ähnliche Proteinmengen exprimieren. Die Synthese der Gesamtproteine (s. **Abb. 4-6**) fällt bei allen drei Linien in Gegenwart der Cytokinkombination (IL1- β , TNF α und INF γ) ab. Die höchsten Werte der Gesamtprotein-Expression unter Cytokineinfluss ergeben sich für die β -Zellen der BB.LL-Linie.

Stamm	Kontrolle	Interleukin (IL1- β)	IL1- β + INF γ + TNF α
BB/OK	45,51 +/- 2,50	36,28 +/- 2,90	26,78 +/- 1,50
BB.6S	48,42 +/- 6,00	36,01 +/- 2,10	28,21 +/- 2,60
BB.LL	47,15 +/- 4,19	39,93 +/- 3,02	35,06 +/- 4,67

Tab. 4-5: Einfluss der Cytokine auf die Gesamtprotein-Menge Langerhans'scher Inseln. Linie: BB/OK, (n = 9); BB.6S, (n = 9); BB.LL, (n = 10); Tieralter: 10-12 d; Mittelwert \pm SEM; keine Signifikanz der Gesamtprotein-Expression innerhalb einer Linie sowie zwischen den Linien. Angaben in μ g Protein.

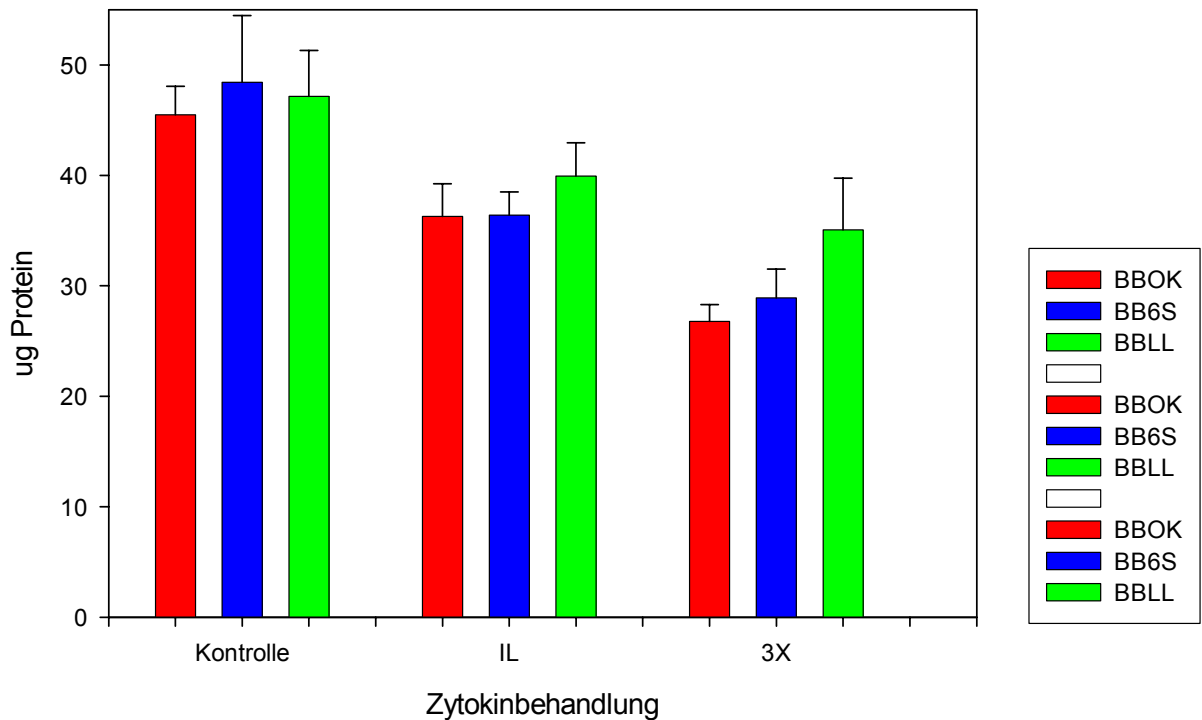


Abb. 4-6: Graphische Darstellung der Gesamtprotein-Expression Langerhans'scher Inseln. Einfluss der Cytokine auf die Gesamtprotein-Expression Langerhans'scher Inseln. Stamm: BB/OK, (n = 9); BB.6S, (n = 9); BB.LL, (n = 10); Tieralter: 10-12 d; Mittelwert \pm SEM; keine Signifikanz der Gesamtprotein-Expression innerhalb einer Linie sowie zwischen den Linien. Kontrolle = keine Cytokineinwirkung ; IL = Interleukin 1- β ; 3X = Interleukin 1- β (IL1- β) + Interferon γ (INF γ) + Tumornekrose-Faktor α (TNF α); Angaben in μ g Protein/Insel.

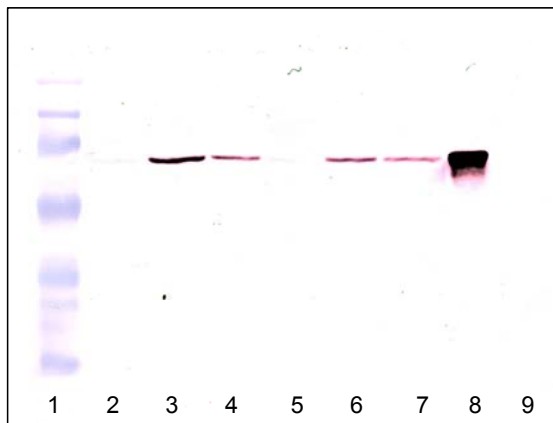
4.4 HSP70-Expression unter cytokinexponierten Bedingungen

Die folgenden Versuche veranschaulichen die Reaktion Langerhans'scher Inseln des Parentalstammes BB/OK sowie ihrer kongenen Linien bei Einwirkung von Cytokinen. In Proteinextrakten von isolierten Langerhans'schen Inseln der drei Linien konnte das spezifische Protein HSP70 über eine Antikörperreaktion quantitativ nachgewiesen werden.

Der Nachweis von HSP70 erfolgt nach einer 24h Inkubationsprozedur mit Cytokineinwirkung und ist in vitro durchführbar. Die Kontrollgruppe eines jeden Stammes (keine Cytokinexposition) zeigt keine Expression des induzierbaren Hitzeschockproteins HSP70 (s. **Tab. 4-8**). Bei allen drei kongenen Linien wird in Gegenwart von Cytokinen im Vergleich zur Kontrollgruppe eine deutliche Expression beobachtet. Die Expression des HSP70 ist nicht nur signifikant gegenüber der Kontrollgruppe gesteigert, sondern zeigt auch signifikante Unterschiede zwischen den Ratten-Linien auf.

Die isolierten Langerhans'schen Inseln des Parentalstammes BB/OK-Stammes exprimieren den geringsten Anteil an HSP70. Demgegenüber ist die Expression des HSP70 bei den nicht Diabetes-suszeptiblen Ratten der BB.LL-Linie um mehr als das Doppelte im Vergleich zum Parentalstamm BB/OK gesteigert. Die Langerhans'schen Inseln von Ratten der BB.6S-Linie exprimieren ähnlich den β -Zellen der BB.LL-Linie einen signifikant hohen Anteil an HSP70.

Bei Kombination der Cytokine (IL1-1 β + IFN γ + TNF α) fällt der Anteil des HSP70 im Vergleich zur alleinigen Einwirkung von IL-1 β deutlich ab. Der exprimierte Anteil des HSP70 liegt jedoch bei allen drei Ratten-Linien weiterhin deutlich über der Expression unter Kontrollbedingungen. Auch unter diesen Bedingungen exprimieren die Inseln von Ratten der BB.LL-Linie den größten Anteil an HSP70, während die Langerhans'schen Inseln des Parentalstammes BB/OK den geringsten Anteil exprimieren. Der Immunblot (s. **Abb. 4-7 und Abb. 4-8**) sowie die graphische Darstellung (s. **Abb. 4-9**) zeigen die Auswirkung der Cytokine in Bezug auf die HSP70-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe.



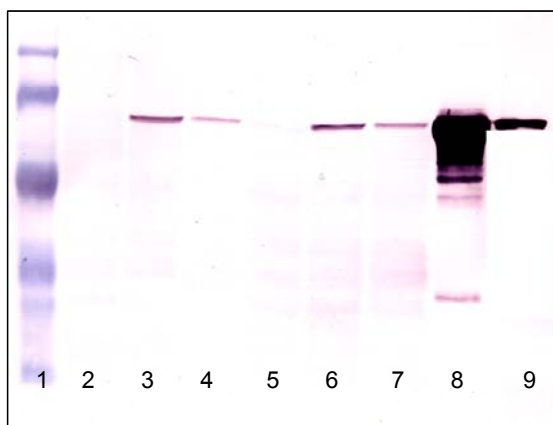
KDa

70

Bande	BB-Linie	Bedingung im Medium
1	Marker Protein	-
2	BB.6S	Ohne Cytokine
3	BB.6S	IL1-β
4	BB.6S	IL1-β + INF γ + TNF α
5	BB/OK	Ohne Cytokine
6	BB/OK	IL1-β
7	BB/OK	IL1-β + INF γ + TNF α
8	HSP70	Pos. Kontrolle
9	-	-

Tabelle 4-6: Legende zu Abb. 4-7

Abb. 4-7: Immunblot mit Darstellung der peroxidase-markierten HSP70-Expression.



KDa

70

Bande	BB-Linie	Bedingung im Medium
1	Marker Protein	-
2	BB.LL	Ohne Cytokine
3	BB.LL	IL1-β
4	BB.LL	IL1-β + INF γ + TNF α
5	BB.6S	Ohne Cytokine
6	BB.6S	IL1-β
7	BB.6S	IL1-β + INF γ + TNF α
8	HSP70	Pos. Kontrolle
9	BOA	-

Tabelle 4-7: Legende zu Abb. 4-8

Abb. 4-8: Immunblot mit Darstellung der peroxidase-markierten HSP70-Expression.

Linie	Kontrolle	Interleukin (IL1-β)	IL1-β + INF γ + TNF α
BB/OK	0,002 +/- 0,002	0,223 +/- 0,009 ***	0,124 +/- 0,039 *
BB.6S	0,002 +/- 0,001	0,476 +/- 0,100 ** +	0,291 +/- 0,100 *
BB.LL	0,007 +/- 0,007	0,555 +/- 0,100 ** +	0,352 +/- 0,118 *

Tab. 4-8: HSP70-Expression Langerhans'schen Inseln der drei untersuchten Ratten-Linien. Mittelwert ± SEM; Angabe in µg HSP70/µg Protein. Linien: BB/OK (n = 5), BB.6S (n = 5), BB.LL (n = 5); * = p < 0,05, ** = p < 0,01, *** = p < 0,001 gegenüber der HSP70 Expression unter Kontrollbedingungen innerhalb der jeweiligen Linie; + = p < 0,05, ++ = p < 0,01, +++ = p < 0,001 gegenüber dem Parentalstamm BB/OK bei gleichen Bedingungen. Angaben in µg HSP70/µg Protein.

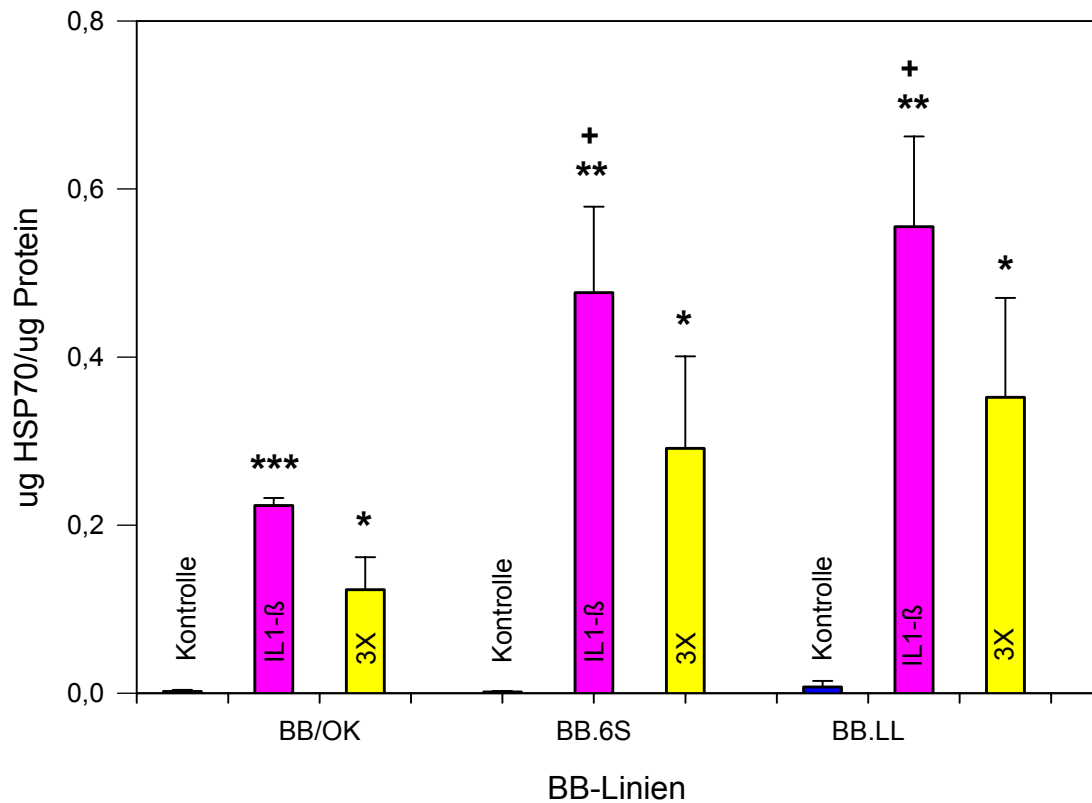


Abb. 4-9: HSP70-Expression Langerhans'scher Inseln gemessen nach peroxidasemarkierter Antikörperfarbreaktion unter Kontrollbedingungen sowie bei Cytokinexposition; Kontrolle = keine Cytokineinwirkung; IL1-β = Interleukin1-β; 3X = Interleukin 1-β (IL1-β) + Interferon γ (INF γ) + Tumornekrose-Faktor α (TNF α); Linien: BB/OK (n = 5), BB.6S (n = 5), BB.LL (n = 5); Tieralter: 10-12 d; Mittelwert \pm SEM; * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$ gegenüber der HSP70-Expression unter Kontrollbedingungen innerhalb der jeweiligen Linie; + = $p < 0,05$, ++ = $p < 0,01$, +++ = $p < 0,001$ gegenüber dem Parentalstamm BB/OK bei gleichen Bedingungen. Angaben in μg HSP70/ μg Protein.

4.5 Calbindin-Expression unter cytokinexponierten Bedingungen.

Calbindin kann ebenso wie HSP70 als Expressionsprodukt der Langerhans'schen Inseln betrachtet werden. Anhand dieser Expression soll eine weitere Differenzierung der Linien in Bezug auf die unterschiedliche Diabetesmanifestation vorgenommen werden. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in **Tab. 4-11** aufgeführt.

Die graphische Darstellung (s. **Abb. 4-12**) zeigt anschaulich bei allen drei Ratten-Linien eine Expression des Calbindins, d.h. auch dann, wenn keine Cytokine auf die Langerhans'schen Inseln einwirken (s. Kontrollbedingungen). Unter diesen nicht-cytokinexponierten Bedingungen werden deutliche Unterschiede bezüglich des exprimierten Calbindinanteils zwischen den BB-Linien erkennbar. Die Langerhans'schen Inseln des Parentalstammes BB/OK exprimieren

insgesamt die geringsten Menge an Calbindin. Bei Inkubation dieser Inseln in einer Interleukinumgebung wird eine Reduzierung der Calbindin-Expression im Vergleich zur Kontrolle deutlich. Anders als bei den Langerhans'schen Inseln des BB/OK-Stammes führt die Inkubation der BB.6S- und BB.LL-Inseln in einer IL1- β Umgebung dagegen zu einem Anstieg des exprimierten Calbindins. Das exprimierte Calbindin der Langerhans'schen Inseln der BB.LL-Linie fällt insgesamt geringer aus als das der BB.6S-Linie, wobei sich diesbezüglich jedoch keine signifikanten Unterschiede herausstellen lassen. Bei der gleichzeitigen Kombination von drei Cytokinen (IL1- β + IFN γ + TNF α) zeigen alle drei Linien eine deutliche Reduzierung ihrer Calbindin-Expression im Vergleich zur Calbindin-Expression in einer reinen IL1- β Umgebung. Während die Langerhans'schen Inseln der BB.6S- und BB.LL-Linie in Gegenwart der Cytokinkombination (IL1- β + IFN γ + TNF α) eine vergleichbare Calbindin-Expression erreichen, zeigt sich bei den Inseln des BB/OK-Stammes in Bezug zur Expression unter Kontrollbedingungen sogar eine reduzierte Antwort der Calbindin-Expression.

Zusammenfassend lässt sich konstatieren, dass die Langerhans'schen Inseln der BB.6S-Linie im Hinblick auf die Calbindin-Expression eine deutlich auffälligere Reaktion auf Cytokine zeigen als die Inseln von Ratten der BB.LL-Linie. Die mit Abstand geringste Reaktion zeigen die Langerhans'schen Inseln des Parentalstammes BB/OK.

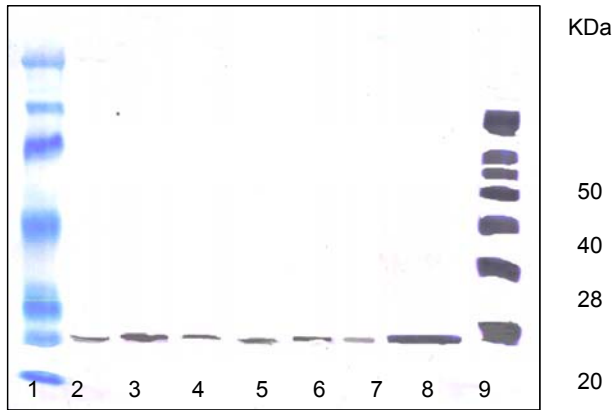


Abb. 4-10: Immunblot mit Darstellung der peroxidase-markierten Calbindin-Expression.

Bande	BB-Linie	Bedingung im Medium
1	Marker Protein	-
2	BB.6S	Ohne Cytokine
3	BB.6S	IL1-β
4	BB.6S	IL1-β + INF γ + TNF α
5	BB/OK	Ohne Cytokine
6	BB/OK	IL1-β
7	BB/OK	IL1-β + INF γ + TNF α
8	Calbindin	Pos. Kontrolle
9	BOA	-

Tabelle 4-9: Legende zu Abb. 4-7

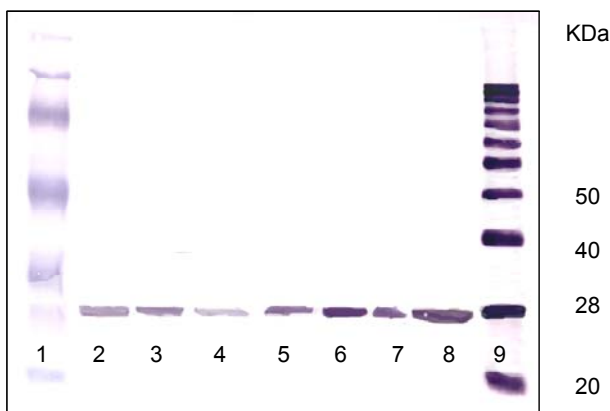


Abb. 4-11: Immunblot mit Darstellung der peroxidase-markierten Calbindin-Expression.

Bande	BB-Linie	Bedingung im Medium
1	Marker Protein	-
2	BB/OK	Ohne Cytokine
3	BB/OK	IL1-β
4	BB/OK	IL1-β + INF γ + TNF α
5	BB.LL	Ohne Cytokine
6	BB.LL	IL1-β
7	BB.LL	IL1-β + INF γ + TNF α
8	Calbindin	Pos. Kontrolle
9	BOA	-

Tabelle 4-10: Legende zu Abb. 4-8

Linie	Kontrolle	Interleukin (IL1-β)	IL1-β + INF γ + TNF α
BB/OK	0,041 +/- 0,005	0,165 +/- 0,056	0,003 +/- 0,005
BB.6S	0,360 +/- 0,118	0,613 +/- 0,068 **	0,400 +/- 0,280 ***
BB.LL	0,330 +/- 0,029 ***	0,48 +/- 0,034 **	0,320 +/- 0,100 **

Tab. 4-11: Calbindin Expression Langerhans'scher Inseln der drei verwendeten Ratten-Stämme. Mittelwert ± SEM ; Angaben in µg Calbindin/µg Protein. Linien: BB/OK (n = 4), BB.6S (n = 4), BB.LL (n = 5); Kontrolle = ohne Cytokineinwirkung; IL1-β = Interleukin1-β; 3X = Interleukin1-β (IL1-β) + Interferon γ (INF γ) + Tumornekrose-Faktor α (TNF α); Tieralter: 10-12 d; Mittelwert ± SEM; * = p < 0,05, ** = p < 0,01, *** = p < 0,001 gegenüber der Calbindin-Expression des Parentalstammes BB/OK bei jeweils gleichen Kulturbedingungen. Angaben in µg Calbindin/µg Protein.

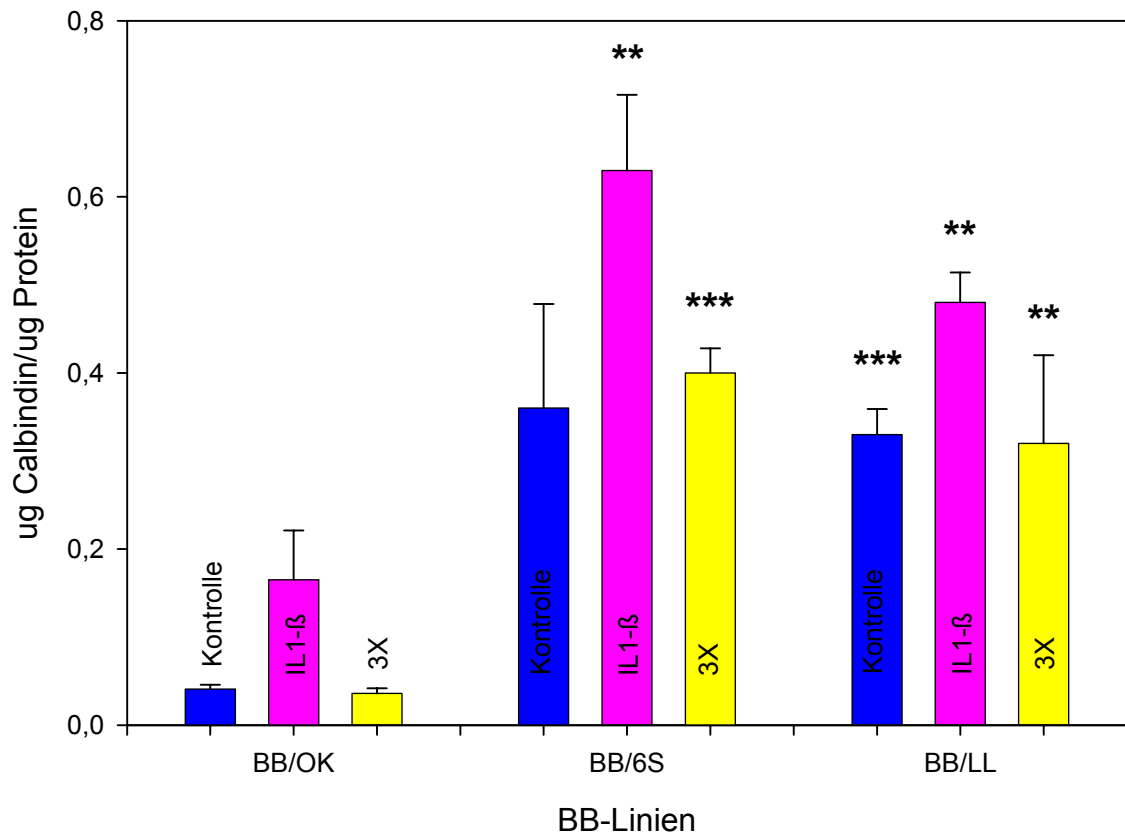


Abb. 4-12: Calbindin-Expression Langerhans'scher Inseln gemessen nach Peroxidase markierter Antikörperfarb-reaktion unter Kontrollbedingungen sowie bei Cytokinexposition. Kontrolle = ohne Cytokineinwirkung; IL1-β = Interleukin1-β; 3X = Interleukin1-β (IL1-β) + Interferon γ (INF γ) + Tumornekrose Faktor α (TNF α); Linien: BB/OK (n = 4), BB.6S (n = 4), BB.LL (n = 5); Tialter: 10-12 d; Mittelwert ± SEM; * = p < 0,05, ** = p < 0,01, *** = p < 0,001 gegenüber der Calbindin-Expression des BB/OK-Stammes bei jeweils gleichen Kulturbedingungen. Angaben in µg Calbindin/µg Protein.

5 Diskussion

In der vorliegenden Studie wurden zunächst vergleichend die Auswirkungen unterschiedlicher Glucose- und Calciumkonzentrationen auf die Sekretion Langerhans'scher Inseln bei drei verschiedenen BB-Ratten-Linien untersucht. Synthese und Sekretion von Insulin, sowie die Anpassungen beider Stoffwechselfvorgänge an den Insulinbedarf des Organismus sind hochspezialisierte Leistungen, zu denen nur die β -Zellen des Pankreas befähigt sind. Die Bestimmung dieser beiden Parameter sind daher als sensible Indikatoren für den speziellen β -Zellfunktionszustand ansehen.

Die Langerhans'schen Inseln der untersuchten Ratten-Linie zeigten bereits in einer Altersstufe von 8-12 Tagen eine ausgeprägte Ansprechbarkeit bezüglich der Insulinsekretion auf einen Glucosereiz. Diese ist ein Indikator für die Vitalität und den Reifegrad des isolierten endokrinen Pankreasgewebes und daher eine entscheidende Voraussetzung für die Eignung des isolierten Gewebes für die in der Studie durchgeführten In vitro-Untersuchungen.

Die für die Untersuchungen verwendeten Langerhans'schen Inseln des Parentalstammes BB/OK sowie ihrer kongenen Linien BB.6S und BB.LL sezernieren bei 0 mmol/ml Calcium und Glucose pro Zeiteinheit vergleichbare Mengen an Insulin. Da auch bei Erhöhung der Glucosekonzentrationen auf 2 mmol/ml unter ansonsten unveränderten Bedingungen bei allen drei Linien sehr übereinstimmende Werte der spontanen Insulinfreisetzung beobachtet wurden, könnte annehmen, dass bei dieser Glucosekonzentration die Funktionsfähigkeit der Insulinbildungs- und Freisetzungsmechanismen unbeeinflusst ist. Dieser Zustand entspricht in vivo einer Hypoglycämie. Er führt also nicht zur Herausbildung von signifikanten Unterschieden zwischen den Ratten-Linien. Zusätzlich zeigte auch eine stufenweise geänderte Calciumkonzentration des Umgebungsmediums jeweils bei 0 und 2 mmol/ml Glucose keinen Einfluss auf die Funktion der β -Zellen des endokrinen Gewebes. Daraus wird ersichtlich, dass sowohl ohne Calcium als auch ohne Glucose im Medium eine spontane Insulinfreisetzung der Langerhans'schen Inseln möglich ist, d.h. der Mechanismus der „Insulinsekretion“ erfolgt auch ohne Glucosereiz.

Erst bei deutlicher Erhöhung der Glucosekonzentration des umgebenen Mediums auf 20 mmol/ml, was in vivo einem hyperglycämischen Zustand entspricht, stellte man erwartungsgemäß fest, dass die Insulinsekretion der Ratten-Linien einerseits z.T. signifikant anstieg, andererseits aber auch Funktionseinschränkungen erkennbar wurden. Auffällig ist die im Vergleich zu den Langerhans'schen Inseln der BB.6S- und der BB.LL-Linie deutlich verminderte

Reaktion auf die Glucosestimulierbarkeit der BB/OK-Inseln. Bei nahezu gleichen Werten der Insulinsekretion bei 0 und 2 mmol/ml Glucose sezernierten die Inseln der Diabetes-suszeptiblen BB/OK-Ratten bei Stimulation durch eine maximale Glucosekonzentration (20 mmol/ml) erheblich weniger als die Diabetes-resistenten BB.LL-Ratten. Noch ausgeprägter wird dieser Aspekt unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Calciumkonzentrationen, so dass dem Calcium eine nicht unerhebliche Bedeutung bei der gesamten Interpretation der Sekretionsversuche zugewiesen werden kann⁷².

Ohne Calcium ist die Sekretionsmenge der Langerhans'schen Inseln bei allen drei Linien auch bei stark Glucose-stimulierten Bedingungen vergleichbar. Es lassen sich in dem Zusammenhang also keine deutlichen Unterschiede zwischen den Linien herausstellen. Bei einer Calciumkonzentration von 2,5 mmol/ml, die einer zellphysiologischen Calciumkonzentration entspricht, zeigten die Diabetes-suszeptiblen Inseln der BB/OK-Ratten die geringste Insulinfreisetzung in das Umgebungsmedium, während die Inseln der BB.6S- und BB.LL-Ratten dagegen höhere Werte erreichten.

Erst bei weiterer Erhöhung der Umgebungskonzentration des Calciums auf 3,5 mmol/ml wurde eine verminderte Glucosestimulierbarkeit des BB/OK-Stammes deutlich. Daraus lässt sich ableiten, dass eine erhöhte Calciumkonzentration die Insulinbildungs- und Sekretionsmechanismen der β -Zellen sowohl bei der BB.6S- als auch bei der BB.LL-Linie zu optimieren scheint, nicht aber die des Parentalstammes BB/OK. Letztere wurden eher in ihrer Funktion gehemmt, was dadurch deutlich wurde, dass die Sekretionsmenge des Insulins im Verlauf dieser Versuchsreihe rückläufig war.

Fasst man diese Ergebnisse zusammen, so wird deutlich, dass bei den Langerhans'schen Inseln der BB.LL- und BB.6S-Linie eine Steigerung ihrer Funktion in Gegenwart einer erhöhten Calciumkonzentration möglich ist, während die der BB/OK-Linie unter gleichen Bedingungen eine Reduzierung ihrer Funktion erfahren. Es bleibt somit noch zu klären, ob die erhöhte Calciumkonzentration bei den BB.LL- und BB.6S-Ratten die Insulinsekretionsmechanismen optimiert oder inwieweit physiologische Mechanismen bestehen, die eine Calciumtoxizität verhindern können.

Die Abhängigkeit der Insulinsekretion von der Glucosekonzentration des Umgebungsmediums wurde bereits in diversen Studien an in vitro isolierten Langerhans'schen Inseln von Ratten gezeigt. Wie bereits durch Versuche bestätigt, ist die Stimulation der Insulinsekretion als Antwort auf einen Glucosereiz direkt abhängig von der Gegenwart des extrazellulären Calciums⁷³. Glucose beeinflusst die Insulinfreisetzung durch Inaktivierung ATP-abhängiger Kali-

umkanäle. Infolge der daraus resultierenden Depolarisation der Zellmembran wird ein spannungsgesteuerter Calciumkanal (L-Typ) geöffnet⁷⁴ und dadurch konsekutiv die cytoplasmatische Calciumkonzentration erhöht. Diese veränderte Calciumkonzentration ist eine entscheidende Voraussetzung für die weitere Freisetzung von Insulin aus den Langerhans'schen Inseln. Über verschiedene zelluläre Steuerungsmechanismen wird die Calciumkonzentration in einem engen Bereich reguliert. Veränderungen von der normalerweise vorliegenden physiologischen Calciumkonzentration können in der Regel durch verschiedene Kaskaden, wie z.B. durch die Calcium-Calmodulin- oder durch die Calbindin-Kaskade kompensiert werden. Unter der Annahme, dass Calcium für die Steuerungsmechanismen der Insulingranula-Freisetzung eine bedeutende Rolle einnimmt, kann dann die Steigerung der Insulinsekretion der Langerhans'schen Inseln der BB.LL- und des BB.6S-Linie bei Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentration erklärt werden. Über die extrazelluläre Calciumkonzentration kann Einfluss auf das intracytoplasmatische Milieu genommen werden, so dass in Abhängigkeit von der im Umgebungsmedium vorliegenden Calciumkonzentration die intrazelluläre Calciumkonzentration variieren kann⁷⁵. Andere Studien dahingegen zeigen, dass eine sukzessive Steigerung der cytoplasmatischen Calciumkonzentration zur Apoptose der betroffenen Inselzellen des Pankreas führt. Hohe Konzentrationen (5 mmol/ml) an Calciumionen können über den Mechanismus der DNA-Fragmentation zum Zelltod führen, wie JUNTITI-BERGGREN; LARSSON et al. bereits in ihren Untersuchungen zeigen konnten. Durch Blockademechanismen spannungsabhängiger Calciumkanäle gelang es, eine Reduzierung des intrazellulären Calciums zu erreichen, damit der Zerstörung der Langerhans'schen Inseln entgegenzuwirken und somit den prozentualen Anteil der apoptotischen Inseln gering zu halten⁷⁶. Die im Vergleich zu den anderen kongenen Linien (BB.LL; BB.6S) deutlich reduzierte Insulinfreisetzung der Langerhans'schen Inseln des Diabetes-suszeptiblen BB/OK-Stammes könnte durch den Einfluss der erhöhten Calciumkonzentration, die mit 3,5 mmol/ml jenseits der physiologischen Calciumkonzentration liegt, und durch den daraus bedingten zuvor bereits beschriebenen Mechanismus der β -Zell-Zerstörung erklärt werden. Somit könnten die Inseln des Parentalstammes BB/OK eine hohe Empfindlichkeit gegenüber überhöhtem intrazellulärem Calcium aufweisen und offensichtlich die hohen Calciumkonzentrationen nicht kompensieren. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass die Vorgänge der Apoptose in den Langerhans'schen Inseln des BB/OK-Stammes begünstigt ablaufen können, und somit die Zellerstörung nachweisbar verstärkt wird. Es bleibt weiterhin noch zu klären, inwieweit eine hohe Calciumkonzentration (3,5 mmol/ml) bei den Inselzellen der BB.LL- und BB.6S-Linie trotz einer möglichen toxischen Wirkung dieser hohen Calciumkonzentration zu einer Steigerung der Insulin-

sekretion führen kann. Die β -Zellen der BB.6S- und BB.LL-Linie verfügen möglicherweise über Mechanismen, die einer intrazellulären Dekompensation entgegenwirken⁷⁷.

Eine Beeinflussung der cytoplasmatischen Calciumkonzentration kann nicht nur über die extrazelluläre Variation der Calciumwerte, wie im ersten Teil dieser Arbeit durchgeführt, sondern auch indirekt über den Einfluss verschiedener Mediatoren hervorgerufen werden. Eine stoffwechselphysiologisch entscheidende Bedeutung haben diejenigen Stoffe oder Mediatoren, die Stickstoffmonoxid (NO-Donatoren) intrazellulär ansteigen lassen. Auch Cytokine können durch eine massive Bildung und Freisetzung von Stickstoffmonoxid über bislang nicht vollständig geklärte Mechanismen in den intrazellulären Calciumhaushalt eingreifen, indem sie zu einer nachweisbaren Erhöhung der Calciumkonzentration führen und konsekutiv den Vorgang der beschriebenen Apoptose in Gang setzen, wie bei NAKATO, UTO, et al. Beschrieben⁷⁸. Die konsequente Überproduktion von Stickstoffmonoxid bei Langerhans'schen Inseln als Antwort auf die Einwirkung von Cytokinen wurde bereits als wesentliche Ursache einer Hemmung der Insulinfreisetzung beschrieben und ist einer der Gründe, die zur β -Zell-Zerstörung beim Typ 1 Diabetes führt⁷⁹. Durch die Verwendung und den gezielten Einsatz von Calcium-Chelatoren und Calcium-Kanal-Blockern kann die induzierte Erhöhung der Calciumkonzentration verhindert und damit der Vorgang der Apoptose aufgehalten werden.

Der Insulingehalt der Langerhans'schen Inseln zeigte als Reaktion auf eine sich ändernde Glucose- und Calciumkonzentration des Umgebungsmediums tendenziell vergleichbare Veränderungen wie die Insulinsekretion. Dabei spiegelte der Insulingehalt quantitativ die Menge des innerhalb der Langerhans'schen Inseln gebildeten Insulins wieder. Der intrazellulär vorhandene Insulinanteil war um ein Vielfaches höher als diejenige Insulinmenge, die bei der Sekretion nach Ablauf von 2 Stunden freigesetzt wurde. Dies erklärt, weshalb innerhalb kurzer Zeit eine Steigerung der Insulinsekretion möglich war, ohne dass eine vollständige Neubildung des Insulins über die Proteinbiosynthese zuvor notwendig war. Zwischen den in dieser Studie untersuchten BB-Ratten-Linien lassen sich jedoch keine signifikanten Unterschiede herausstellen. Vielmehr lässt sich eine Tendenz ableiten, die eine deutliche Korrelationen zu den Ergebnissen der Sekretionsversuche aufweist. Die Menge des in Form von Granula gebildeten und gespeicherten intrazellulären Insulins nimmt bei Erhöhung der Glucosekonzentration bis auf 20 mmol/ml bei Konzentrationen zwischen 0 und 2,5 mmol/ml Calcium zu.

Auch der bei den Sekretionsversuchen beschriebene Einfluss der Calciumkonzentration auf die Reaktion der β -Zellen lässt sich auf die Gehaltsmessungen übertragen. Wie bereits in der

Diskussion der Sekretionsversuche erwähnt, zeigten auch die β -Zellen der BB.LL-Linie bei 3,5 mmol/ml Calcium eine tendenzielle Steigerung des Insulingehaltes, während im Vergleich dazu die Sekretionsleistung bei den β -Zellen der BB.6S-Linie schon abfallende Werte der Insulinspeicherung aufwiesen. Daraus kann man schließen, dass nicht nur die Insulinsekretion, sondern auch die Insulinbildung durch hohe Calciumkonzentrationen nachteilig beeinflusst werden. Für die Sekretion der BB.6S-Inseln stand dennoch ausreichend Insulin zur Verfügung, so dass keine bemerkenswerte Reduzierung der Insulinsekretion erfolgte. Die freie Calciumionenkonzentration kann daher sowohl auf den Insulingehalt (intrazellulärer Insulingehalt) als auch auf die Insulinsekretion einen nachteiligen Einfluss nehmen. Am deutlichsten wurde der Calciumeinfluss unter maximaler Glucosestimulation bei den Langerhans'schen Inseln des BB/OK-Stammes erkennbar. In Korrelation zur Sekretion nahm bei 3,5 mmol/ml Calcium des Umgebungsmediums der Insulingehalt deutlich ab und erreichte Werte, die dem nicht Glucose-stimulierten Insulingehalt bei 0 mmol/ml Calcium entsprachen. Die Reduzierung des Insulingehaltes war allerdings deutlicher ausgeprägt als bei den β -Zellen der BB.6S-Linie, d.h. die Langerhans'schen Inseln des Parentalstammes BB/OK reagierten deutlich empfindlicher auf hohe Calciumkonzentrationen.

Bei Calciummangel (0 mmol/ml) sowie bei physiologischer Calciumkonzentration zeigte sich bei allen drei untersuchten Ratten-Linien, dass die stufenweise erhöhte Glucosekonzentration tendenziell eine Steigerung des Insulingehaltes bewirkte, was auch hier die Glucose induzierte Insulinbildung bestätigt.

Im Folgenden sollen Auswirkungen der verwendeten Cytokine in Bezug auf die Expression von Stressproteinen und Calbindin bei kongenen BB-Ratten diskutiert werden. Die Rolle der Cytokine (IL1- β und TNF α) und des endogen gebildeten Interferon γ (INF γ) ist für die Entwicklung eines Typ 1 Diabetes bei BB-Ratten bereits seit längerem bekannt^{80, 81}. Aufgrund dieser Kenntnisse zeigten Untersuchungen von NICOLETTI, ZACCONE et al. 1997⁸², dass eine Anti-Interferon γ (Antirat-INF γ) Therapie einen protektiven Effekt auf die Entstehung eines Typ 1 Diabetes hat und sich im Falle einer Erkrankung der Langerhans'schen Inseln eine deutlich mildere Form einer Insulinitis ausbildet. Diese Ergebnisse unterstreichen nochmals die zentrale Bedeutung der Cytokine in der Pathogenese des Typ 1 Diabetes.

Weiterhin von Bedeutung in der Pathogenese des Typ 1 Diabetes ist die große Gruppe der Hitze-Schock-Proteine, speziell des HSP70. Sie haben ein ubiquitäres Vorkommen und scheinen im Krankheitsverlauf den Zerstörungsprozess von Zellen aufhalten zu können. In den tierexperimentellen Untersuchungen dieser Arbeit konnten signifikante Unterschiede hinsicht-

lich der HSP70-Expression zwischen den drei verwendeten Tierstämmen nachgewiesen werden. Wie bereits frühere Untersuchungen zeigten, führt die Expression des HSP70 zu einer nachweislich erhöhten Resistenz gegenüber der Einwirkung von cytotoxischen Substanzen und Mediatoren, wie z.B. Stickstoffmonoxid, Superoxid-Dismutase (SOD), Oxygenasen oder Cytokinen⁸³. Von diesen genannten cytotoxischen Stoffen sind insbesondere Stickstoffmonoxid (NO) und verschiedene reaktive Sauerstoffverbindungen entscheidend an der β -Zell-Zerstörung beteiligt⁸⁴. Verschiedene In vitro-Studien deuten darauf hin, dass Langerhans'sche Inseln im Gegensatz zu anderen Zellen besonders empfindlich gegenüber diesen toxischen Effekten sind, da sie über ein gering ausgeprägtes Potential an Radikalabfangmechanismen verfügen. Auffallend ist auch, dass menschliche Inselzellen vielfach resistenter gegenüber Cytokinen sind als die von Nagetieren. Das Auftreten von Hitze-Schock-Proteinen kann durch eine Vielzahl von Verbindungen und Stoffen, wie beispielsweise Ethanol, Arsen, Schwermetalle, Cytokine sowie durch Infektionen in hohem Maße hervorgerufen werden. In dieser Arbeit fanden Cytokine als Provokationsfaktoren für die Expression von Hitze-Schock-Proteinen Verwendung. Aus der großen Familie der Hitze-Schock-Proteine besitzt überwiegend das HSP70 eine maßgeblich zellprotektive Wirkung und scheint sowohl eine Rolle bei der DNA-Reparatur als auch bei der Protektion der β -Zellen zu spielen.

Interleukine, die bereits in der Frühphase der Typ 1 Diabetesmanifestation nachweisbar sind, induzieren als Stressfaktoren der Langerhans'schen Inseln in kurzer Zeit nachweislich die Expression von HSP70⁸⁵. Von diesen Überlegungen ausgehend werden in der vorliegenden Studie durch die Verwendung von Cytokinen diese angesprochenen Verhältnisse unter In vitro-Bedingungen simuliert. Der Einsatz von Interleukin 1- β (IL1- β) induzierte in den Inselzellen eine abnehmende Insulinsynthese und Insulinsekretion, eine Abnahme der Glucose-Oxidation und der Proteinbiosynthese sowie eine ausgeprägte Zunahme einer induzierbaren NO-Synthetase. Untersuchungen von WACHLIN et al. zeigten, dass BB/OK-Inseln nach Behandlung mit IL-1 β über 24 h eine drastische Inhibition der Glucose-stimulierten Insulinsekretion aufwiesen und dass dieser Effekt auch noch nach 6 Tagen in einer Erholungskultur ohne IL1- β um mehr als 50% im Vergleich zu den Kontrollinseln reduziert blieb. Die spezifischen Wirkungen von IL1- β auf die Inselzellen sind rezeptorvermittelt, wie Untersuchungen von HAMMONDS, DEYERLE et al. 1992 nachweisen konnten. Als intrazellulärer Mediator nimmt Stickstoffmonoxid, wie bereits erwähnt, eine Schlüsselposition ein. Dieses kurzlebige Radikal wird bei der Oxidation von L-Arginin zu L-Citrullin in Gegenwart einer konstitutiven NO-Synthetase (cNOS) gebildet. Wie Endothelzellen und Makrophagen besitzen auch die Inselzellen des Pankreas eine induzierbare NO-Synthetase (iNOS). Durch IL1- β wird in den

β -Zellen nachweislich die induzierbare Form der NO-Synthetase exprimiert und dadurch große Mengen des Radikals NO gebildet⁸⁶. Interessanterweise wird jedoch dieses Enzym in den α -Zellen des Pankreas nicht durch IL1- β induziert. Die NO-Radikale führen in hohem Maße zu einer Veränderung der intracytoplasmatischen Calciumkonzentration und infolge dessen zu einer Apoptose der Langerhans'schen Inseln⁸⁷. Ein Ziel der Untersuchungen dieser Arbeit besteht darin, zu klären, inwiefern die Expression von HSP70 Einfluss auf die Diabetesmanifestation bei kongenen Ratten-Linien hat. BELLMANN, K et al.⁸⁸ konnten in ihren Untersuchungen zeigen, dass Hitze-Schock-Proteine bei den phänotypisch Diabetes-resistenten BB-Ratten eine protektive Wirkung haben, während Ratten mit Ausprägung einer Insulinitis keine maßgebliche Hitze-Schock-Protein-Expression aufwiesen.

Durch Einwirkung von Cytokinen konnte bei allen drei BB-Linien eine signifikante Steigerung der HSP70-Expression gegenüber der Kontrolle beobachtet werden. Unter der Annahme einer generellen Reduzierung der Proteinbiosynthese der Langerhans'schen Inseln führt die Kombination von Cytokinen (IL1- β + INF γ + TNF α) zu einem Abfall der absoluten Menge des HSP70. Übereinstimmend mit Angaben in der Literatur ist eine HSP70-Expression auch ohne Cytokineinwirkung nachzuweisen.

Bemerkenswert ist die deutlich höhere Expression von HSP70 der Langerhans'schen Inseln der BB.LL-Linie im Vergleich mit denen des Parentalstammes BB/OK. Diese Ergebnisse stimmen auch mit der geringeren Empfindlichkeit der Langerhans'schen Inseln der BB.LL-Linie in Bezug auf eine hohe Calciumkonzentration überein. Demnach sind die β -Zellen der BB.LL-Linie in besonderer Weise befähigt, unter Einwirkung von Interleukinen HSP70 zu exprimieren und damit eine protektive Wirkung aufzubauen. Die durch Interleukine vermittelte NO-Synthesesteigerung oder auch eine hohe Calciumkonzentration könnte durch eine hohe Expression von HSP70 blockiert werden, so dass sich eine erhöhte Resistenz der BB.LL-Linie gegenüber Interleukinen vermuten lässt.

Im Hinblick auf die Diabetesmanifestation haben Untersuchungen gezeigt, dass die BB-Ratten der BB.6S-Linie mit ca. 14% eine niedrigere Inzidenz haben einen Typ 1 Diabetes auszubilden als die der BB/OK-Linie. Trotz vielfältiger Ursachen auf genetischer oder molekularer Ebene spielt auch hier die HSP70-Expression eine sicherlich nicht unerhebliche Rolle. Wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, liegt der Anteil der HSP70-Expression deutlich über dem Anteil des BB/OK-Stammes und geringfügig unter dem der BB.LL-Linie. Der prozentuale Anteil der HSP70-Expression zeigt deutliche Korrelationen zur Häufigkeit der Diabetesmanifestation der kongenen Linien. Dies lässt den Rückschluss zu, dass die Inseln der BB.6S-

und der BB.LL-Linie durch die Höhe der HSP70-Expression einen zusätzlichen protektiven Schutzmechanismus gegenüber der Einwirkung von Cytokinen erfahren. Die Kombination von Cytokinen (IL1- β + INF γ + TNF α) führt auch bei den β -Zellen der BB.6S-Linie zu einer Suppression der gesamten Proteinbiosynthese und somit zu einer Reduzierung der HSP70-Expression, wie die Auswertung der Gesamtproteine zeigt. Die β -Zellen von Ratten der BB.6S-Linie besitzen durch die vermehrte Expression von HSP70 einen intrazellulären Mechanismus, der ihnen eine erhöhte Resistenz gegenüber einer Cytokineinwirkung vermittelt und der möglicherweise für die niedrige Inzidenz des Typ 1 Diabetes verantwortlich ist. Die höhere Expression von HSP70 bei den Langerhans'schen Inseln der BB.LL-Linie könnte im Vergleich zur Expression der BB.6S-Linie neben anderen Faktoren könnte das Ausbleiben einer Diabetesmanifestation erklären.

Wie in der Literatur beschrieben kann nicht nur HSP70, sondern auch Calbindin D28 auf eine cytokininduzierte Apoptose der Langerhans'schen Inseln Einfluss nehmen, so dass auch dieses Protein für eine Diabetesmanifestation von Bedeutung sein könnte. Die Ergebnisse der Calbindin-Expression der BB.6S- und BB.LL-Linie deuten ebenfalls unter Berücksichtigung der intrazellulären Funktion auf eine erhöhte Resistenz gegenüber der Einwirkung von Cytokinen hin. Es lassen sich signifikante Unterschiede in Bezug zum Parentalstamm BB/OK herausstellen. Ähnlich wie bereits bei der Expression von HSP70 beobachtet, heben sich die Ergebnisse des Parentalstammes BB/OK auch bei der Calbindin-Expression deutlich von denen der anderen beiden BB-Linien ab. Man beobachtete bei den β -Zellen des BB/OK-Stammes sowohl unter Kontrollbedingungen als auch unter Cytokineinwirkung die geringste Calbindin-Expression, während die Langerhans'schen Inseln der BB.6S- und BB.LL-Linie eine weitaus höhere Calbindin-Expression zeigten. Wider Erwarten exprimierten die Langerhans'schen Inseln der BB.6S-Linie mehr Calbindin als die der BB.LL-Linie, wobei sich hinsichtlich der Calbindin-Expression keine Signifikanz erkennen lässt. Bekanntermaßen reguliert das Calciumbindende-Protein Calbindin in den β -Zellen des Pankreas sowohl die Calciumfreisetzung wie auch die Insulinsekretion. Verschiedene Studien konnten außerdem zeigen, dass eine Überexpression des Calbindins sowohl bei kultivierten neuronalen oder osteoblastischen Zellen aber auch bei β -Zellen des Pankreas eine Apoptose verhindern konnte⁸⁹.

Ungewöhnlich hohe und nicht-physiologische Calciumkonzentrationen sowie die Bildung oxigener Radikale, die durch die Gegenwart von Cytokinen hervorgerufen werden, können durch Überexpression von Calbindin supprimiert werden. Es handelt sich dabei um einen komplexen Regulationsvorgang, da eine hohe extrazelluläre Calciumkonzentration ebenfalls

die Expression von Calbindin D28K hervorruft. Eine weitere Regulierung des intrazellulären Calbindins erfolgt über eine rezeptorvermittelte Wirkung von Vitamin D, dessen Rezeptoren sich überall an der Oberfläche der Langerhans'schen Inseln befinden^{90, 91}. Da Vitamin D3 (1,25-Dihydroxyvitamin D3 [1,25(OH)₂D3]) entsprechend neuerer Studien nicht nur eine Auswirkung auf die Calbindin-Expression, sondern auch auf die Glucose-stimulierte Insulinfreisetzung hat⁹², kann man von einem komplexen Zusammenspiel zwischen Vitamin D3 und Calbindin D28K in Bezug auf die Diabetesmanifestation ausgehen. Ebenso nimmt Vitamin D3 Einfluss auf die Calciumkonzentration, so dass auch über dieses eine Regulierung der Insulinsekretion erfolgen kann.

Da Calbindin die β -Zellen vor einer cytokininduzierten Apoptose schützen kann, indem die freie Radikalformation verhindert wird, bestätigt dies ebenfalls die Bedeutung des Calbindin D28K als Regulator einer β -Zellzerstörung. Sowohl Calbindin als auch das Hitze-Schock-Protein HSP70 besitzen ähnliche oder zum Teil synergistische Wirkung im Hinblick auf eine protektive Wirkung gegenüber Cytokinen.

Die Ergebnisse der Calbindin-Bestimmungen dieser Studie lassen bei den verwendeten Rattenstämmen folgende Rückschlüsse zu. Die niedrigen Werte der Calbindin-Expression des Parentalstammes BB/OK korrelierten mit einer hohen Diabetesmanifestation (ca. 86%), während die Calbindin-Expression der Langerhans'schen Inseln der BB.6S-Linie mit einer niedrigen Diabetes-Inzidenz einherging. Dagegen wurde eine Erkrankung an Typ 1 Diabetes bei den Ratten der BB.LL-Linie nicht beobachtet. Unter Berücksichtigung der Diabetes-Inzidenz der untersuchten Stämme und der jeweiligen Calbindin-Expression könnte das Auftreten von Typ 1 Diabetes mellitus an BB-Ratten erklärt werden. Die vergleichsweise höhere Calbindin-Expression bei den Langerhans'schen Inseln der BB.6S- und BB.LL-Ratten wiesen diesbezüglich auf eine relative Resistenz gegenüber der Einwirkung von Cytokinen und den dadurch induzierten Effekten hin. Den Angaben der Literatur entsprechend liegt die Diabetes-Inzidenz dieser Ratten-Linien bei 0% (BB.LL) bzw. 14% (BB.6S). Demzufolge könnte die Calbindin-Expression der Langerhans'schen Inseln auf molekularer Ebene im Rahmen der Diabetesmanifestation eine Rolle spielen. Die Verwendung einer Kombination aus Cytokinen (IL1- β + INF γ + TNF α) führte nachweislich zu einer Reduzierung der Calbindin-Expression. Diese Beobachtung kann ähnlich dem zuvor beschriebenen Mechanismus der HSP70-Expression als Suppression der Proteinbiosynthese insgesamt interpretiert werden, wodurch auch der absolute Anteil der Calbindin-Expression vermindert wird.

Zusammenfassend lassen die ermittelten Ergebnisse folgende Schlüsse zu. Aus den Ergebnissen der Glucoseseekretion in Abhängigkeit von der Calciumempfindlichkeit, der HSP70- und Calbindin-Expression ist zu folgern, dass die Diabetes-resistenten Langerhans'schen Inseln der BB.LL-Linie in Bezug auf eine Diabetesmanifestation Mechanismen besitzen, die eine deutlich erhöhte Resistenz gegenüber cytotoxischen Substanzen aufweisen. Die Grundlagen zur Erklärung dieser molekularen Mechanismen sind durch den Transfer von Chromosomen im Rahmen der Inzucht- und Kreuzungsstudien angelegt worden. Die Diabetes-suszeptiblen Ratten des Parentalstammes BB/OK zeigten dagegen sowohl in den Calciumabhängigen Versuchen der Insulinsekretion sehr reduzierte Toleranzbereiche, als auch bezüglich der HSP70- und Calbindin-Expression eine hohe Empfindlichkeit auf die Cytokinkombination (IL1- β + INF γ + TNF α). Die β -Zellen der BB.6S-Linie wiesen zum Teil Toleranzbereiche und Empfindlichkeitsbereiche auf, die sich zwischen denen der BB.LL-Linie und des Parentalstammes BB/OK widerspiegelten. Die Cytokinempfindlichkeit bei allen drei BB-Linien entspricht bei In vitro-Verhältnissen der Empfindlichkeit unter In vivo-Verhältnissen nach Ablauf einer bestimmten Manifestationszeit. Damit könnte ein Zusammenhang zwischen der unterschiedlichen Cytokinempfindlichkeit und einer Diabetesmanifestation gegeben sein. Auch die Calciumabhängige Insulinsekretion des Parentalstammes BB/OK und seiner kongenen Linien unterstreicht noch einmal diesen Zusammenhang.

Die in dieser Arbeit untersuchte Fragestellung bezüglich möglicher ursächlicher Faktoren für die Ausprägung eines Typ 1 Diabetes ist sehr komplex und stellt nur einen Teilfaktor eines multifaktoriellen Geschehens in der Pathogenese des Typ 1 Diabetes mellitus dar. Die Insulinsekretion erfolgt über einen hoch komplizierten Mechanismus, an dem noch weitere Proteine oder Stoffwechsellaskaden beteiligt sind, die in dieser Dissertation zum Teil beschrieben wurden. Demnach bleiben an dieser Stelle einige Fragen offen, die durch ergänzende experimentelle Untersuchungen in Zukunft geklärt werden könnten. Interessant wäre in diesem Zusammenhang die Fragestellung, ob bei den genetisch unterschiedlichen Ratten-Linien in Bezug auf die Calcium-Calmodulin-Kaskade oder bezüglich einer intrazellulären NO-Synthetase Unterschiede zu beobachten wären. Letztere würde die massive Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) und anderen reaktiven Sauerstoffverbindungen bei Einwirkung von Cytokinen erklären. Da diese NO-Verbindungen u.a. an der Apoptose der Langerhans'schen Inseln beteiligt sind, wären auch hier Unterschiede bei den verwendeten Ratten-Linien zu erwarten. Von entscheidender Bedeutung in der Diskussion des Typ 1 Diabetes ist weiterhin die experimentelle Untersuchung der Calbindin- und HSP70-Expression der jeweiligen Ratten-Linien in einer Altersstufe um den Zeitpunkt der klinischen Diabetesmanifestation. In dem Zusammen-

hang wäre zu untersuchen, ob die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse weiterhin bestehen oder ob die Unterschiede möglicherweise noch ausgeprägter auftreten.

6 Thesen zur Dissertation

1. Der primär insulinabhängige Typ 1 Diabetes mellitus ist durch Hyperglykämie infolge eines absoluten Insulinmangels charakterisiert, der durch die selektive autoimmune Zerstörung der Insulin-produzierenden β -Zellen der Langerhans'schen Inseln des Pankreas verursacht wird.
2. Humorale Faktoren und mononukleäre Zellen (Makrophagen, T-Zellen, NK-Zellen), die bereits im Vorfeld der Diabetesmanifestation das endokrine Pankreas infiltrieren (Insulitis), haben offenbar eine Schlüsselfunktion im Destruktionsprozess der Langerhans'schen Inseln.
3. Cytokine wirken nicht nur als Mediatoren des Entzündungsprozesses, sondern sie sind rezeptorvermittelt direkt an der Induktion funktioneller und struktureller Schäden in den β -Zellen beteiligt. Entscheidend ist dabei die Induktion einer NO-Synthetase zur Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) sowie anderer radikaler Sauerstoffverbindungen.
4. Wie und wodurch es zur Aktivierung der autoimmunologischen Mechanismen kommt, ist noch nicht vollständig geklärt. Entscheidende Fortschritte bei der Erforschung der Ätiopathogenese des Typ 1 Diabetes wurden jedoch durch den Einsatz von Modelltieren erzielt.
5. Eines dieser spontandiabetischen Modelltiere ist die B(io)B(reeding)-Ratte. Diese Ratte entwickelt spontan einen Insulin-abhängigen Typ 1 Diabetes, wobei im Mittel etwa 85% der Tiere zwischen dem 80. und 120. Lebenstag erkranken. Analog zum Menschen sind die Klasse-II-Gene des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) essentiell für die Diabetesentwicklung und erklären zu etwa 40-50% das Risiko, an einem Typ 1 Diabetes zu erkranken. Der übrige Anteil zur Ausprägung der Erkrankung wird durch diabetogene Nicht-MHC-Gene determiniert, die auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert wurde.
6. Zwecks Prüfung der Auswirkungen und Relevanz von Nicht-MHC-Genen wurden verschiedene kongene BB-Ratten der Sublinie BB/O(ttawa)K(arlsburg) etabliert. Als Voraussetzungen für diese Untersuchungen wurden chromosomale Regionen mit diabetogenen Nicht-MHC-Genen durch die von Diabetes-resistenten Stämmen mittels Kreuzung und sich anschließender Verdrängungskreuzung ausgetauscht. Dabei konnte gezeigt werden, dass Tiere, denen das Nicht-MHC-Gen für Lymphopenie auf Chro-

mosom 4 fehlt (BB.LL), keinen Diabetes entwickeln und dass Tiere, denen ein Stück von Chromosom 6 ausgetauscht wurde (BB.6S), nur noch geringfügig an Diabetes (ca. 14%) erkranken.

7. Im Rahmen der Untersuchungen dieser Arbeit wurden spontandiabetische BB/OK-Ratten und zwei ihrer kongenen Derivate, die BB.LL- und BB.6S-Ratten, verwendet. Zunächst wurde der Einfluss des freien Calciums in Abhängigkeit von unterschiedlichen Glucosekonzentrationen auf die Insulinsekretion und den Insulingehalt der isolierten Langerhans'schen Inseln von 8-12 Tage alten Tieren durch Variation dieser beiden Parameter im Medium (Glucose: 0, 2, 20 mmol/ml; Calcium: 0, 2,5, 3,5 mmol/ml) untersucht. Darüber hinaus wurde die Funktion zweier intrazellulärer Proteine (Hitze-Schock Protein 70 (HSP70) und Calbindin D28K) im Hinblick auf einen möglichen Zusammenhang mit der unterschiedlichen Diabetesmanifestation der drei verwendeten Linien untersucht, indem durch die Verwendung von Cytokinen im Inkubationsmedium eine in vivo vergleichbare Stressreaktion für die Langerhans'schen Inseln geschaffen wurde.
8. Die spontane Abgabe von Insulin bei einer Glucosekonzentration von 2 mmol/ml zeigte vergleichbare Werte zwischen den Rattenlinien. Das Calciumniveau des Umgebungsmediums hatte demnach keinen Einfluss auf die Funktionalität der Insulinsekretion. Erst bei einer Glucosekonzentration von 20 mmol/ml im Umgebungsmedium waren eine signifikante Steigerung der basalen Insulinsekretion und Unterschiede bezüglich der untersuchten Rattenlinien nachweisbar.
9. Die Änderung der Calciumkonzentration beeinflusste den Mechanismus der Insulinsekretion. Eine Konzentration von 2,5 mmol/ml bewirkte bei allen drei untersuchten Rattenlinien eine Zunahme der Insulinsekretion unter maximaler Glucosestimulation (20 mmol/ml). Unter diesen Bedingungen sezernierten die Langerhans'schen Inseln der BB.LL-Linie den höchsten, die Inseln des Diabetes-susceptiblen Parentalstammes BB/OK den geringsten Anteil an Insulin. Eine Mittelstellung nahm die BB.6S-Linie ein.
10. Eine hohe Calciumkonzentration (3,5 mmol/ml) führte zu einer Reduktion der Insulinsekretion der Langerhans'schen Inseln des Parentalstammes BB/OK. Der offensichtlich toxische Einfluss des hohen Calciumwertes konnte dabei nicht ausreichend kompensiert werden. Eine weitere Steigerung der Insulinsekretion der BB.LL-Linie unter

den gleichen Bedingungen deutete auf molekulare Resistenzmechanismen dieser Linie hin.

11. Die Gesamtsumme der Insulingehalte der einzelnen Linien zeigte analog zu den Sekretionsversuchen eine hohe Empfindlichkeit der Langerhans'schen Inseln des Parentalstammes BB/OK gegenüber hohen Calciumkonzentrationen. Die weiterhin hohe Insulinbildung der Diabetes-resistenten BB.LL-Linie zeigte, dass diese eine derart hohe Calciumkonzentrationen über molekulare Mechanismen kompensieren kann.
12. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand darin zu prüfen, ob sich die Expression von Calbindin D28K oder HSP70 als Schutzmechanismus mit und ohne (Kontrollsituation) Einwirkung von Cytokinen bei den BB/OK-Ratten-Linien von denen der kongenen BB.LL- und BB.6S-Linien unterscheidet.
13. Durch Einwirkung von Cytokinen konnte bei allen drei Linien eine signifikante Steigerung der HSP70-Expression gegenüber der unbehandelten Kontrolle beobachtet werden. Unter der Annahme einer generellen Reduzierung der Proteinbiosynthese der Langerhans'schen Inseln führte die Kombination von Cytokinen (IL1- β + INF γ + TNF α) zu einem Abfall der absoluten Menge des HSP70.
14. Die weitaus höhere Calbindin- und HSP70-Expression der kongenen Rattenlinien (BB.LL, BB.6S) deutete in Anbetracht ihrer intrazellulären Funktionen auf eine verminderte Empfindlichkeit der Diabetes-resistenten BB.LL-Ratten gegenüber den Diabetes-susceptiblen BB/OK-Ratten bei Einwirkung von Cytokinen hin.
15. Die β -Zellen des Parentalstammes BB/OK zeigten sowohl unter Kontrollbedingungen als auch unter Cytokineinwirkung die geringste Calbindin-Expression, während die Langerhans'schen Inseln der BB.6S- und BB.LL-Linie eine weitaus höhere Calbindin-Expression hatten. Interessanterweise exprimierten die Langerhans'schen Inseln der BB.6S-Linie mehr Calbindin als die der BB.LL-Linie.
16. Da Calbindin die β -Zellen vor einer cytokinininduzierten Apoptose schützt, indem die freie Radikalformation verhindert wird, könnte die höhere Expression von Calbindin in den Langerhans'schen Inseln der BB.LL- und BB.6S-Linie als protektiv angesehen werden.
17. Da sowohl Calbindin als auch HSP70 ähnliche und zum Teil synergistische Wirkungen im Hinblick auf eine protektive Wirkung gegenüber Cytokinen besitzen, könnten

beide Proteine somit bei der Manifestation eines Typ 1 Diabetes auf molekularer Ebene involviert sein.

7 Literaturverzeichnis

1. Atkinson, M.A. and Maclaren, N.K. (1994): The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *N.Engl.J.Med.*, 331:1428-1436
2. Davidson, A. and Diamond, B. (2001): Autoimmune diseases.
3. Riley, W.J., Atkinson, M.A., and Maclaren, N.K. (1988): Insulin autoantibodies in pre-diabetes. *Adv.Exp.Med.Biol.*, 246:45-51.
4. Acosta, J., Hettinga, J., Fluckiger, R., Krumrei, N., Goldfine, A., Angarita, L., and Halperin, J. (2000): Molecular basis for a link between complement and the vascular complications of diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97:5450-5455
5. King, H., Aubert, R.E., and Herman, W.H. (1998): Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care*, 21:1414-1431.
6. Odugbesan, O., Fletcher, J.A., Sanders, A., Bradwell, A.R., Botazzo, G.F., and Barnett, A.H. (1988): Autoantibodies in Indian-Asians with insulin-dependent diabetes in the UK. *Postgrad.Med.J.*, 64:357-360.
7. Tillil, H. and Kobberling, J. (1989): [Genetic determinants of diabetes mellitus]. *Internist (Berl)*, 30:536-546
8. Helmut Schatz, Diabetologie kompakt, Grundlagen und Praxis 2001, *Blackwell Wissenschafts-Verlag Berlin*, ISBN 3-89412-488-1

9. Rjasanowski, I., Klöting, I. and W. Kerner Frequency of diabetes transmission from two type 1 diabetic parents to their children, *Diabetes Care* 26, 2003, 2219-2220 (Letter)
10. Köbberling J, Tillil H. Empirical risk figures for first degree relation of non-insulin dependent diabetics. The genetics of diabetes mellitus. *Academic press*, 1990; 201-211
11. Wucherpfennig, K.W, Eisenbarth, G.S. Type 1 diabetes. *Nat Immunol* 2001; 2: 767-8
12. Boitard, C, Caillat-Zucman, S, Timsit, J. Insulin-dependent diabetes and human leucocyteantigens. *Diabetes Metab* 1997; 23 Suppl 2:22-8.:22-8
13. Platz, P, Jakobsen, B.K, Morling N, Ryder L.P Svejgaard A, Thomsen M, Christy M Kromann H, Benn J, Nerup J, Green A, Hauge M: HLA-D and -DR antigens in genetic analysis of insulin dependent diabetes mellitus. *Diabetologica* 1981; 21: 108-115
14. Dubois-Laforgue D, Timsit, J, Djilali-Saiah I, Boitard, C, Caillat-Zucman S. Insulin-dependent diabetes mellitus in non-DR3/non-DR4 subjects. *Hum Immunol* 1997; 57: 104-9
15. Barnett, A. and Bain, S. (1994): Genetics of diabetes mellitus. *Br.J.Hosp.Med.*, 51:387-389
16. Barnett, A.H, Eff. C, Leslie, R.D, Pyke, D.A. (1981): Diabetes in identical twins. A study of 200 pairs. *Diabetologia*. 1981 Feb;20(2):87-93

17. Nerup, J. and Lernmark, A. (1981): Autoimmunity in insulin-dependent diabetes mellitus. *Am.J.Med.*, 70:135-141.
18. Brogren, C.H., Baekkeskov, S., Dyrberg, T., Lernmark, A., Marner, B., Nerup, J., and Papadopoulos, G.K. (1983): Role of islet cell antibodies in the pathogenesis of type I diabetes. *Curr.Probl.Clin.Biochem.*, 12:65-85.:65-85.
19. Mandrup-Poulsen, T., Bendtzen, K., Nerup, J., Egeberg, J., and Nielsen, J.H. (1986): Mechanisms of pancreatic islet cell destruction. Dose-dependent cytotoxic effect of soluble blood mononuclear cell mediators on isolated islets of Langerhans. *Allergy*, 41:250-259
20. Marner, B., Lernmark, A., Ludvigsson, J., MacKay, P., Matsuba, I., Nerup, J., and Rabinovitch, A. (1985): Islet cell antibodies in insulin-dependent (type 1) diabetic children treated with plasmapheresis. *Diabetes Res.*, 2:231-236
21. Francfort, J.W., Najj, A., Silvers, W.K., and Barker, C.F. (1987): Elevated levels of a lymphocyte subset accurately predict the diabetic state in the BB rat. *Pancreas*, 2:141-145
22. Stiller C.R, Duprè J, Gent M, Jenner M.R, Keown P.A, Laupacis A, Martell R, Rodger N.W: Effects of cyclosporin immunosuppression in insulin-dependent diabetes mellitus of recent onset. *Science* 1984; 223: 1362-1367
23. Mauricio, D., Andersen, H.U., Larsen, C. M., Karlsen, A.E., Mandrup-Poulsen, T., Nerup, J. (1997). Dexamethasone prevents interleukin-1beta-mediated inhibition of rat islet insulin secretion without decreasing nitric oxide production. *Cytokine* 9, 563-569.

24. Like, A.A., Biron, C.A., Weringer, E.J., Byman, K., Sroczynski, E., and Guberski, D.L. (1986) Prevention of diabetes in BioBreeding/Worcester rats with monoclonal antibodies that recognize T-lymphocytes or natural killer cells. *J.Exp.Med.*, 164:1145-1159.
25. Corbett, J.A., Wang, J.L., Misko, T.P., Zhao, W., Hickey, W.F., and McDaniel, M.L. (1993): Nitric oxide mediates IL-1 beta-induced islet dysfunction and destruction: prevention by dexamethasone. *Autoimmunity*, 15:145-153.
26. Nicoletti, F. et al. Prevention of spontaneous autoimmune diabetes in diabetes-prone BB rats by prophylactic treatment with antirat interferon-gamma antibody. *Endocrinology* 1997; 138: 281-8.
27. Banatvala, J.E., Bryant, J., Scherthaner, G., Borckenstein, M., Schober, E., Brown, D., De Silva, L.M., Menser, M.A., and Silink, M. (1985): Coxsackie B, mumps, rubella, and cytomegalovirus specific IgM responses in patients with juvenile-onset insulin-dependent diabetes mellitus in Britain, Austria, and Australia. *Lancet*, 1:1409-1412.
28. Ramanathan, S. and Poussier, P. (2001): BB rat lyp mutation and Type 1 diabetes. *Immunol.Rev.*, 184:161-71.:161-171.
29. Klötting, I., van den Brandt, J., and Kovacs, P. (1998). Quantitative trait loci for blood glucose confirm diabetes predisposing and protective genes, Iddm4 and Iddm5r, in the spontaneously diabetic BB/OK rat. *Int. J. Mol. Med.* 2, 597-601.
30. Kloeting, I. and Vogt, L. (1990): Coat colour phenotype, leucopenia, and insulin-dependent diabetes mellitus in BB rats. *Transplant.Proc.*, 22:2574-2575

31. Klöting, Van den Brandt, Kuttler: Alleles of SHR rats protect spontaneously diabetic BB/OK rats from diabetes: Lessons from congenic BB.SHR rat strains
32. Lucke, S., Klöting, I., Pusch, A., Heinrich, H.W. and H.J. Hahn Endocrine pancreas histology of congenic BB-Rat strains with reduced diabetes incidence after genetic manipulation on chromosomes 4, 6 and X. *Autoimmunity* 36, 2003, 143-149
33. Stark, O., Klöting, I., Reiher, K., and Kohnert, K.D. (1982): The major histocompatibility complex and insulin-dependent diabetes in BB rats. *Acta Biol.Med.Ger*, 41:1129-1133
34. Klöting, I., Stark, O., and Fischer, U. (1988). Incidence of diabetes in F2 and first backcross hybrids of BB rats of different origin. *In Lessons from animal diabetes II* (Shafir, E., and Renold, A.E., Eds.), pp85-87, J Libbey, London, Paris.
35. Klöting, I., and Kovacs, P. (1998). Phenotypic differences between diabetes-prone BB rat sublines cosegregate with loci on chromosomes X and 10. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 45, 865-870.
36. Klöting, I., Voigt, B. and L. Vogt Molecular analysis of diabetes-prone BB rat sublines and derivatives of their common ancestor as a tool to search for candidate loci causing different phenotypes in BB rats. *Diabetes Res.* 29, 1995, 65-71
37. Klöting, I., and Vogt, L. (1991). BB/O(ttawa)K(arlsburg) rats: Features of a subline of diabetes-prone BB rats. *Diabetes Res.* 18, 79-87.
38. Tannenbaum, G.S, Colle, E, Gurd, W, Wanamaker, L., Dynamic time-course studies of the spontaneously diabetic BB Wistar rat. I. Longitudinal profiles of plasma growth hormone, insulin, and glucose. *Endocrinology.* 1981 Dec;109(6):1872-9.

39. Klöting, I., and Vogt, L. (1990). Coat colour phenotype, leucopenia and insulin-dependent diabetes mellitus in BB rats. *Diabetes Res.* 15, 37-39.
40. Klöting, I., Vogt, L., and Serikawa, T. (1995). Locus on chromosome 18 cosegregates with diabetes in the BB/OK subline. *Diabet. Metab.* 21, 338-344.
41. Klöting, I., Schmidt, S., and Kovacs, P. (1998). Mapping of novel diabetes predisposing and protecting genes in the spontaneously diabetic BB/OK rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 245, 483-486.
42. Klöting, I., van den Brandt, J., and Kovacs, P. (1998). Quantitative trait loci for blood glucose confirm diabetes predisposing and protective genes, *Iddm4* and *Iddm5r*, in the spontaneously diabetic BB/OK rat. *Int. J. Mol. Med.* 2, 597-601.
43. Klöting, I., and Kovacs, P. (1998). Genes of the immune system cosegregate with the age at onset of diabetes in the BB/OK rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 242, 461-463.
44. Klöting, I., van den Brandt, J., Klöting, N. and B. Radović. Alleles of Diabetes-resistant BN rats contribute to insulin-dependent type 1 diabetes mellitus. *J. Autoimmunity* 20, 2003, 119-123
45. Klöting, I., Kovacs, P., and Kuttler, B. (1997). Phenotypic consequences after restoration of lymphopenia in the diabetes-prone BB/OK rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 239, 106-110.
46. Guberski, D.L, Butler, L., Kastern, W, Like, AA.: Genetic studies in inbred BB/Wor rats. Analysis of progeny produced by crossing lymphopenic diabetes-prone rats with nonlymphopenic diabetic rats. *Diabetes.* 1989 Jul;38(7):887-93.

47. Henquin, J.C. Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. *Diabetes*. 2000 Nov; 49(11):1751-60.
48. Hellman, B. and Andersson, T. (1978): Calcium and pancreatic beta-cell function. 4. Evidence that glucose and phosphate stimulate calcium-45 incorporation into different intracellular pools. *Biochim.Biophys.Acta* 541:483-491
49. Hellman, B., Gylfe, E., Berggren, P. O., Andersson, T., Abrahamsson, H., Rorsman, P., & Betsholtz, C. (1980). Ca²⁺ transport in pancreatic beta-cells during glucose stimulation of insulin secretion. *Ups.J.Med.Sci* 85,321-329
50. Herchuelz, A., Thonnart, N., Sener, A., and Malaisse, W.J. (1980): Regulation of calcium fluxes in pancreatic islets: the role of membrane depolarization. *Endocrinology*, 107:491-497.
51. Gylfe, E., Andersson, T., Rorsman, P., Abrahamsson, H., Arkhammar, P., Hellman, P., Hellman, B., Oie, H. K., & Gazdar, A. F. (1983). Depolarization-independent net uptake of calcium into clonal insulin-releasing cells exposed to glucose. *Bio-sci.Rep.* 3, 927-937.
52. Bellmann, K., Hui,L., Radons, J., Burkart, V., and Kolb, H. (1997): Low stress response enhances vulnerability of islet cells in diabetes-prone BB rats. *Diabetes*, 46:232-236.
53. Bellmann, K., Jaattela, M., Wissing, D., Burkart, V., and Kolb, H. (1996): Heat shock protein hsp70 overexpression confers resistance against nitric oxide. *FEBS Lett.*, 391:185-188.

54. Strandell E, Buschard K, Saldeen J, Welsh N. Interleukin-1 beta induces the expression of hsp70, heme oxygenase and Mn-SOD in FACS-purified rat islet beta-cells, but not in alpha-cells. *Immunol Lett* 1995; 48: 145-8.
55. Bellmann, K et al. Heat shock induces resistance in rat pancreatic islet cells against nitric oxide, oxygen radicals and streptozotocin toxicity in vitro. *J Clin Invest* 1995; 95: 2840-5.
56. Bellmann, K., Jaattela, M., Wissing, D., Burkart, V, Kolb, H. Heat shock protein hsp70 overexpression confers resistance against nitric oxide. *FEBS Lett* 1996; 391: 185-8.
57. Wachlin, G., Heine, L., Kloeting, I., Dunger, A., Hahn, H. J., & Schmidt, S. (2002). Stress response of pancreatic islets from diabetes prone BB rats of different age. *Autoimmunity* 35, 389-395.
58. Hall, A. K. & Norman, A. W. (1990). Regulation of calbindin-D28K gene expression by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in chick kidney. *J.Bone Miner.Res.* 5, 325-330.
59. Hamilton, K., Tein, M., Glazier, J., Mawer, E. B., Berry, J. L., Balment, R. J., Boyd, R. D., Garland, H. O., & Sibley, C. P. (2000). Altered calbindin mRNA expression and calcium regulating hormones in rat diabetic pregnancy. *J.Endocrinol.* 164 , 67-76.
60. Sooy, K., Kohut, J., & Christakos, S. (2000). The role of calbindin and 1,25 dihydroxy vitamin D3 in the kidney. *Curr.Opin.Nephrol.Hypertens.* 9, 341-347
61. Bellido, T., Huening, M., Raval-Pandya, M., Manolagas, S. C., & Christakos, S. (2000). Calbindin-D28k is expressed in osteoblastic cells and suppresses their apoptosis by inhibiting caspase-3 activity. *J.Biol.Chem.* 275, 26328-26332

62. Christakos, S., Barletta F, Huening, M., Dhawan P, Liu, Y., Porta, A., Peng X. Vitamin D target proteins: function and regulation: *J Cell Biochem.* 2003 Feb 1;88(2):238-44.
63. Hemmingsen, C. Regulation of renal calbindin-D28K. *Pharmacol Toxicol* 2000; 87 Suppl 3:5-30.: 5-30
64. Rabinovitch, A., Suarez-Pinzon, W. L., Sooy, K., Strynadka, K., & Christakos, S. (2001). Expression of calbindin-D(28k) in a pancreatic islet beta-cell line protects against cytokine-induced apoptosis and necrosis. *Endocrinology* 142, 3649-3655
65. Guo, Q., Christakos, S., Robinson, N., & Mattson, M. P. (1998). Calbindin D28k blocks the proapoptotic actions of mutant presenilin 1: reduced oxidative stress and preserved mitochondrial function. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95, 3227-3232
66. Lee, S., Clark, S. A., Gill, R. K., & Christakos, S. (1994). 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and pancreatic beta-cell function: vitamin D receptors, gene expression, and insulin secretion. *Endocrinology* 134, 1602-1610.
67. Johnson, J. A., Grande, J. P., Roche, P. C., & Kumar, R. (1994). Immunohistochemical localization of the 1,25(OH)₂D₃ receptor and calbindin D28k in human and rat pancreas. *Am.J.Physiol* 267, E356-E360.
68. Hehmke, B., Kohnert, K.D., and Odselius, R. (1986): The use of a new dextran gradient medium for rapid isolation of functionally intact neonatal rat pancreatic islets.*Diabetes Res.*, 3:13-16.
69. Besch, W., Woltanski, K. P., Keilacker, H., Diaz-Alonso, J. M., Schulz, B., Amendt, P., Kohnert, K. D., & Ziegler, M. (1987). Measurement of insulin in human sera using a new RIA kit. 1. Insulin determination in the absence of insulin antibodies--conventional assay and micromodification.*Exp. Clin. Endocrinol.* 90,264-270.

70. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
71. Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1992). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology* 24, 145-149.
72. Herchuelz, A., Thonnart, N., Sener, A., & Malaisse, W. J. (1980). Regulation of calcium fluxes in pancreatic islets: the role of membrane depolarization. *Endocrinology* 107, 491-497.
73. Arkhammar, P., Nilsson, T., & Berggren, P. O. (1989). Glucose-induced changes in cytoplasmic free Ca^{2+} concentration and the significance for the regulation of insulin release. Measurements with fura-2 in suspensions and single aggregates of mouse pancreatic beta-cells. *Cell Calcium* 10, 17-27.
74. Zhuang, H., Bhattacharjee, A., Hu, F., Zhang, M., Goswami, T., Wang, L., Wu, S., Berggren, P. O., Arkhammar, P., Islam, M. S., Juntti-Berggren, L., Khan, A., Kindmark, H., Kohler, M., Larsson, K., Larsson, O., Nilsson, T. (1993). Regulation of cytoplasmic free Ca^{2+} in insulin-secreting cells. *Adv.Exp.Med.Biol.* 334, 25-45.
75. Nilsson, T., Arkhammar, P., & Berggren, P. O. (1987). Extracellular Ca^{2+} induces a rapid increase in cytoplasmic free Ca^{2+} in pancreatic beta-cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 149, 152-158.
76. Wang, L., Bhattacharjee, A., Zuo, Z., Hu, F., Honkanen, R. E., Berggren, P. O., & Li, M. (1999). A low voltage-activated Ca^{2+} current mediates cytokine-induced pancreatic beta-cell death. *Endocrinology* 140, 1200-1204.

77. Berggren, P. O., Arkhammar, P., Islam, M. S., Juntti-Berggren, L., Khan, A., Kindmark, H., Kohler, M., Larsson, K., Larsson, O., Nilsson, T., & . (1993). Regulation of cytoplasmic free Ca²⁺ in insulin-secreting cells. *Adv.Exp.Med.Biol.* 334, 25-45.
78. Nakata, M., Uto, N., Maruyama, I., & Yada, T. (1999). Nitric oxide induces apoptosis via Ca²⁺-dependent processes in the pancreatic beta-cell line MIN6. *Cell Struct.Funct.* 24, 451-455.
79. Suarez-Pinzon, W. L., Strynadka, K., Schulz, R., & Rabinovitch, A. (1994). Mechanisms of cytokine-induced destruction of rat insulinoma cells: the role of nitric oxide. *Endocrinology* 134, 1006-1010.
80. McDaniel, M. L., Kwon, G., Hill, J. R., Marshall, C. A., & Corbett, J. A. (1996). Cytokines and nitric oxide in islet inflammation and diabetes. *Proc.Soc.Exp. Biol.Med.* 211.
81. McDaniel, M. L., Corbett, J. A., Kwon, G., & Hill, J. R. (1997). A role for nitric oxide and other inflammatory mediators in cytokine-induced pancreatic beta-cell dysfunction and destruction. *Adv.Exp.Med.Biol.* 426:313-9., 313-319.
82. Nicoletti, F et al. Prevention of spontaneous autoimmune diabetes in diabetes-prone BB rats by prophylactic treatment with antirat interferon-gamma antibody. *Endocrinology* 1997; 138: 281-8.
83. Heitmeier, M. R., Scarim, A. L., & Corbett, J. A. (1997). Interferon-gamma increases the sensitivity of islets of Langerhans for inducible nitric-oxide synthase expression induced by interleukin 1. *J.Biol.Chem.* 272, 13697-13704

84. Kaneto,H et al. Apoptotic cell death triggered by nitric oxide in pancreatic beta-cells. *Diabetes* 1995; 44: 733-8.
85. Mandrup-Poulsen,T.R. [Molecular mechanisms of beta-cell destruction in type 1 diabetes]. *Ugeskr Laeger* 2001; 163: 4176-9. Berggren, P. O., & Li, M. (2000). Cloning of a T-type Ca²⁺ channel isoform in insulin-secreting cells. *Diabetes* 49, 59-64
86. Comens, P.G.,Wolf, B.A., Unanue, E.R., Lacy, P.E., & McDaniel, M. L (1987). Interleukin 1 is potent modulator of insulin secretion from isolated rat islets of Langerhans. *Diabetes* 36, 963-970
87. Welsh, N, Eizirik, D.L, Sandler, S. Nitric oxide and pancreatic beta-cell destruction in insulin dependent diabetes mellitus: don't take NO for an answer. *Autoimmunity* 1994; 18: 285-90
88. Bellmann, K, Hui, L, Radons, J, Burkart,V, Kolb, H. Low stress response enhances vulnerability of islet cells in diabetes-prone BB rats. *Diabetes* 1997; 46: 232-6.
89. Bellido, T, Huening, M, Raval-Pandya, M, Manolagas, S.C, Christakos, S. Calbindin-D28k is expressed in osteoblastic cells and suppresses their apoptosis by inhibiting caspase-3 activity. *J Biol Chem* 2000; 275: 26328-32.
90. Johnson, J. A., Grande, J. P., Roche, P. C., & Kumar, R. (1994). Immunohistochemical localization of the 1,25(OH)₂D₃ receptor and calbindin D28k in human and rat pancreas. *Am.J.Physiol* 267, E356-E360
91. Lee, S., Clark, S. A., Gill, R. K., & Christakos, S. (1994). 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ and pancreatic beta-cell function: vitamin D receptors, gene expression, and insulin secretion. *Endocrinology* 134, 1602-1610

92. Bourslon,P.M et al. Relationship between calbindin-D28K levels in the A and B cells of the rat endocrine pancreas and the secretion of insulin and glucagon: influence of vitamin D3 deficiency and 1,25-dihydroxyvitamin D3. *J Endocrinol* 1996; 148: 223-32

8 Anhang

Abkürzungsverzeichnis:

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
APC	Antigenpräsentierende Zelle
AK	Antikörper
BB-Ratte	B(io)B(reeding)-Ratte
BB/OK-Ratte	BB/O(ttawa)K(arlsburg)-Ratte
Ca ⁺⁺	Calcium-Ionen
cNOS	konstitutive Form der NO-Synthetase
CD	Cluster of Differentiation
DL	Dextranlösung
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DSL	Dextranstammlösung
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
FKS	fötales Kälberserum
G & G	GEY und GEY-Puffer
Glc	Glucose
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution (Hank'sche Lösung)
HLA	Humane Leukozytenantigene
HSP70	Hitze-Schock-Protein 70 (engl.: heat shock protein)
IFN- γ	Interferon γ
IAA	Inselautoantikörper
ICA	Inselzellantigene
ICSA	Inselzelloberflächenantigene

IDDM	Insulinabhängiger Diabetes Mellitus
IE	internationale Einheiten
IL1- β	Interleukin 1- β
iNOS	induzierbare Form der NO-Synthetase
IgG	Immunglobulin G
IRI	Immunreaktives Insulin
Ko	Kontrolle
MAK	Monoklonale Antikörper
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MNC	Mononukleäre Zellen
MW	Mittelwert
NIDDM	Nichtinsulinabhängiger Diabetes Mellitus
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NKS	Neonatales Kälberserum
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthetase
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
RIA	Radioimmunassay
RPMI 1640	Standardnährmedium für Zell- und Gewebezucht
SDS	Natrium(sodium)dodezylsulfat
SEM	Mittlerer Fehler des Mittelwertes
TNF- α	Tumornekrose-Faktor α
3 X	3-fach Kombination aus IL1- β + IFN γ + TNF α

Reagenzien:

Alkalisches Phosphatase Substrat	(Sigma, USA)
APS	(GIBCO BRL, Life Technologies)
BOA	(Biomol, Hamburg, Germany)
Brain Extract	(Santa Cruz Biotechnology)
Calciumchlorid	(Merck, Darmstadt, Germany)
Dextran M70	(VEB Jenapharm Serumwerk, Bernberg)
Fötale Kälberserum	(GIBCO BRL, Life Technologies)
Glukose	(GIBCO BRL, Life Technologies)
HANK, calciumfrei	(Sigma, Chemical Company, Canada)
HANK`s Balances Salts	(Sigma Chemical, Steinheim, Germany)
Kaliumchlorid	(Merck, Darmstadt, Germany)
Kaliumhydrogenphosphat	(Merck, Darmstadt, Germany)
Kollagenase	(Kollagenase Pan plus, Serva, Heidelberg, Germany)
Magnesiumchlorid	(Merck, Darmstadt, Germany)
Marker Protein	(Bio-Rad Laboratories, Hercules, Canada)
Methylbenzol (Tulol)	(Merck, Darmstadt, Germany)
Methanol	(Merck, Darmstadt, Germany)
Natriumchlorid	(Serva, Heidelberg, Germany)
Natriumhydrogenkarbonat	(Merck, Darmstadt, Germany)
Natriumhydrogenphosphat	(Merck, Darmstadt, Germany)
Natriumnitrit	(Sigma, Deisenhofen, Germany)
PBS Tween	(AccuGene 10 X, Rockland, USA)
Penicillin G	(Jenapharm, Germany)
RAT-Insulin-ELISA	(Mercodia AB, Uppsala, Sweden)
Rekomb. Humaner TNF α	(Biosource (100 μ g), lyophilized)

Rekomb. Ratten-Interferon (IFN γ)	(Biosource (100 μ g), lyophilized)
Rekomb. Interleukin (IL1- β)	(Biosource, 2 μ g/20 μ l)
Rinderserumalbumin	(Roche, Germany, 100 g Fraktion V)
SDS 10%	(Bio Whittaker, Walkersville, Maryland)
Streptomycin	(FATOL Arzneimittel GmbH, Schiffweiler, Germany)
Top Block	(Bio Chemika, USA)
Zellzuchtmedium RPMI 1640	(GIBCO Invitrogen Corporation, 500 ml, Medium mit L-Glutamin)

Reagenzien für den Nachweis von HSP70:

Kontrolle:	HSP70	Stress Gen (100µg)
Antikörper 1:	Anti-HSP70	Stress Gen (Maus)
Antikörper 2:	AK-Anti-HSP70	Stress Gen (Ziege-Anti-Maus-IgG-AP)

Reagenzien für den Nachweis von Calbindin:

Kontrolle:	Calbindin	Santa Cruz
Antikörper 1:	Anti-Calbindin	Santa Cruz (Ziege)
Antikörper 2:	AK-Anti-Calbindin	Immuno Research (Esel-Anti-Ziege-IgG-AP)

Geräte:

Apparatur für die Elektrophorese	(GIBCO BRL Elektrophoresis Power Supply)
Kühlmikrozentrifuge	(Mikro 22P Hettich Zentrifugen)
Schüttler	(Titertek [®] , Flus laboratories, Irvine, UK)
Schüttelwasserbad	(GFL 1083)
Zentrifuge	(Megafuge 1.0R Heraeus)
Ultraschallhomogenisator	(Janke und Hunkel, Germany)
PC für die Bestimmung der optischen Dichte der Immunblots	

Zusammensetzung der verwendeten Stammlösungen:**Dextran-Dichte-Gradient:**

Dextranstammlösung (DSL):	DSL: 11g Dextran M70 + 39 ml HBSS
Dextranlösungen (DL1...DL3):	DL1: 5,8 ml DSL + 0,5 ml HBSS
	DL2: 5,0 ml DSL + 1,2 ml HBSS
	DL3: 2,8 ml DSL + 3,5 ml HBSS

GEY & GEY-Puffer:

NaCl	6,5 g	≅	111 mmol
KCl	0,37 g	≅	4,96 mmol
NaHCO ₃	2,27 g	≅	27,0 mmol
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,21 g	≅	11,0 mmol
KH ² PO ⁴	0,03 g	≅	0,22 mmol
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,07 g	≅	0,28 mmol
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	0,11 g	≅	0,92 mmol
ad 1000 ml Aqua dest.			

Einstellung auf pH 7,4 durch begasen mit Carbogen für 30 min

CaCl ₂	2 ml	≅	1 mol
RSA	1 g		

Grundmedium (GM): RPMI 1640:

Glucose:	11,1 mmol/ml/l
hitzeinaktiviertes FKS:	10 %
Streptomycin:	100 µg / ml
Penicillin:	100 IE / ml

Isotonische Salzlösung nach Hank (HBSS):

NaCl:	160,0 g	≅	2,74 mol
KCl:	8,0 g	≅	0,11 mol
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	3,7 g	≅	0,03 mol
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	4,0 g	≅	0,02 mol

ad 1000 ml Aqua dest.

RIRI-Puffer: (Probepuffer zur radioimmunologischen Ratteninsulinbestimmung)

NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O	5,52 g	≅	35,38 mmol
HSA	3,0 g		
NaCl	6,0 g	≅	102,67 mmol
Methiolat	0,25 g		

ad 1000 ml Aqua dest., Einstellung auf pH 7,4

PBS-Konzentrat (10-fach konzentriert):

NaCl	81,2 g	≅	1,4 mol
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	14,4 g	≅	81 mmol
KH ₂ PO ₄	2,04 g	≅	15 mmol
KCl	5,78 g	≅	77 mmol

Gebrauchslösung: 100 ml Konzentrat + 900 ml A. bidest.

Lysepuffer

Tris-HCl	121 mg	≅	10 mmol, <i>pH 7,4</i>
EDTA:	3,72 mg	≅	0,1 mmol
NaCl:	876 mg	≅	150 mmol
NP-40:	500 µl	≅	0,5 %
MgCl ₂ :	200 µl	≅	2 mmol
PMSF:	17 mg	≅	1 mmol
DNAse:	50 µg/ml		

ad. 100 ml Tris-Puffer (10 mmol, pH 7,4)

Gele für die SDS-Gelelektrophorese:**1. Trenngel (10%)**

Ac/Bis	6,6 ml
Tris-HCl (1,5 M, pH 8,8)	5,0 ml
SDS (10 %ig)	200 µl
A. bidest.	8,0 ml
APS (10%ig)	200 µl
TEMED	20 µl

2. Sammelgel:

Ac/Bis	1,3 ml
Tris-HCl (0,5 M, pH 6,8)	2,5 ml
SDS (10%ig)	100 µl
A. bidest.	6,0 ml
APS (10%ig)	100 µl
TEMED	10 µl

SDS-Probenpuffer:

DTT (Dithiothreitol)	150 mg	≅	100 mmol
SDS	500 mg	≅	5%
Glycerin	1,0 g	≅	10%

ad. 10 ml Tris-HCl (0,06 mol, pH 6,8)

SDS-Stammlösung:

SDS	10 g
-----	------

ad 100 ml Aqua dest.

Laufpufferstammlösung (10fach), pH 8,6:

Tris	30 g
Glycin	144 g

ad. 1000 ml Aqua dest.

SDS-Laufpuffer:

Laufpuffer-Stammlösung	100 ml
SDS-Stammlösung	10 ml

ad. 1000 ml Aqua dest.

Blotpuffer:

Laufpufferstammlösung	100 ml
Methanol	100 ml

ad. 1000 ml Aqua dest.

Acrylamid/Bisacrylamid:

Acrylamid	30,0 g
Bisacrylamid	0,8 g
ad. 100 ml Aqua dest.	

Tris-HCl-Puffer 1,5 M, pH 8,8 :

Tris	36,34g
HCl	ca. 90 ml 1N
ad. 200 ml Aqua dest.	

Tris-HCl-Puffer 0,5 M, pH 6,8:

Tris	12,1 g
HCl	ca 1ml 1N
ad. 200 ml Aqua dest.	

Ammoniumpersulfatlösung (APS):

APS	100 mg
ad 1 ml Aqua dest.	

Färbelösung:

Coomassie blue	0,5 g
Methanol	250 ml
Essigsäure	50 ml
Aqua dest.	200 ml

Entfärbelösung:

Methanol	300 ml
Essigsäure	80 ml
ad. 1000 ml Aqua dest.	

Trocknerlösung:

Methanol	300 ml
Glycerin	50 ml
ad. 1000 ml Aqua dest.	

Tris-Puffer:

Aqua dest.	726 mg ad. 100 ml
mit 1 N HCl auf pH 6,8 einstellen	

PBS-Tween:

PBS-Konzentrat	100 ml
Tween 20	500 µl
ad. 1000 ml Aqua dest.	

Ponceau-Gebrauchslösung:

Ponceau-Lösung (3%ig)	20 ml
ad. 100 ml A. bidest.	

Block-Puffer:

BSA	1 g
PBS-Tween	100 ml

DAB-Puffer:

Diaminobenzidin (DAB)	5 mg
PBS-Tween	10 ml
H ₂ O ₂ (30%ig)	10 µl

SDS-Elektrophorese:

25-30 mA/pro Gel, konst.

Spannung auf 600 mV erweitern

Laufzeit: abhängig von zurückgelegter Laufstrecke

Protein-Transfer:

150 V konstant

Stromstärke auf 60 mA erweitern

Laufzeit: 1h

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine andere als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Bonn, den 2.2.2004

Sebastian Reil

Lebenslauf

Schulische Ausbildung

1983-1987	Heilig-Geist-Grundschule in Osnabrück
1987-1989	Orientierungsstufe Dom in Osnabrück
1989-1996	Gymnasium Carolinum in Osnabrück
1996	Allgemeine Hochschulreife, Leistungsfächer: Chemie und Biologie

Hochschulstudium

10/1997 - 09/2002	Studium der Humanmedizin an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald
08/1999	Ärztliche Vorprüfung (Physikum), Greifswald
09/2000	1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Greifswald
09/20002	2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Greifswald
10/2002	Praktisches Jahres an dem Universitätsklinikum der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn,
11/2003	3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Wahlfach Gynäkologie
Promotionsarbeit	Institut für Pathophysiologie der Universität Greifswald

Erfahrungen im Berufsfeld

07/1996 - 08/1997	Zivildienst im Zentrallabor, Marienhospital Osnabrück, mit selbstständigem medizinischen und organisatorischen Tätigkeitsfeld
08/1997 - 09/1997	Praktikum in der Endoskopie, Franziskushospital Osnabrück

Famulaturen	Gastroenterologie/Onkologie, Marienhospital Osnabrück Kardiologie, Klinikum Osnabrück Neurologie, Universitätsklinikum Greifswald Kinderheilkunde, Kinderhospital Osnabrück Internistische Praxis, Bad Essen
-------------	--

Studienbegleitende Tätigkeiten

06/1999 - 05/2002	Nachtdienste sowie Spät- und Wochenenddienste auf einer chirurgischen Intensivstation und einer chirurgischen Wachstation der Universitätsklinik Greifswald
04/2001 - 07/2002	Tutor im anatomischen Institut der Universität Greifswald

Engagement und Hobbys:

1990 - 1996	Teilnahme als Schlagzeuger im Sinfonie-Orchester und der Big Band des Gymnasiums Carolinum sowie dem Blas-Orchester des Konservatoriums Osnabrück
04/2000 - 09/2002	Aufbau, Organisation und vorübergehende Leitung der Big Band der Universität Greifswald
1994 - 2003	Schlagzeuger einer privaten Jazz- und Soul-Band Segeln und Tennis

Arbeitsverhältnis

ab 01/2004	Arzt im Praktikum in der internistischen Abteilung des Johanniter Krankenhauses Bonn
------------	--