

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Medizin
der Technischen Universität München

**Charakterisierung des Ca_v1.2 L-Typ Kalziumkanals
der RipCre-Maus**

Dirk Laux

2005

Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Technischen Universität München
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. F. Hofmann)

Charakterisierung des Ca_v1.2 L-Typ Kalziumkanals der RipCre-Maus

Dirk Laux

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. F. Hofmann
2. Univ.-Prof. Dr. A. R. Ludwig

Die Dissertation wurde am 22.8.2005 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 16.11.2005 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	III
Abbildungs-/Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungen	VI
1 Einleitung	1
1.1 Kalziumkanäle	2
1.2 Pankreas	5
1.3 L-Typ Kalziumkanäle	6
1.4 Nicht L-Typ Kalziumkanäle	8
1.5 Kalziumkanal-Untereinheiten	9
1.5.1 $\alpha_2\delta$ -Untereinheit	9
1.5.2 β -Untereinheit	10
1.5.3 γ -Untereinheit	11
2 Zielsetzung der Arbeit	12
3 Material und Methoden	15
3.1 Mausstämme	15
3.2 Physiologie	17
3.2.1 HbA _{1c}	17
3.2.2 Glucosespiegel	17
3.2.3 Glucose-Toleranz-Test	18
3.2.4 Insulin	18
3.2.5 Fettdiät	19
3.3 Histologische Untersuchung	20
3.3.1 Einbetten des Pankreas in Paraffin	20
3.3.2 Schneiden der eingebetteten Pankreata	21
3.3.3 Hämatoxylin/Eosin Färbung (HE-Färbung)	21
3.3.4 Insulin-Antikörper	22
3.3.5 Mikroskopie und Photographie	23
3.4 Molekularbiologie	24
3.4.1 Isolierung von genomischer DNS aus dem Mausschwanz	24
3.4.2 Gewinnung von Inselzellen	24
3.4.3 Isolierung von mRNS aus Pankreasinseln	25
3.4.4 Synthese einzelsträngiger cDNS	26
3.4.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	27
3.4.5.1 PCR-Protokoll	27
3.4.5.2 Primer	29
3.4.6 Auftrennung und Isolierung von DNS-Fragmenten	31
3.4.6.1 Agarose-Gelelektrophorese	31
3.4.6.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	32
3.4.6.3 Elektroelution	32
3.4.7 Reinigung von Nukleinsäuren	33
3.4.7.1 Phenol/Chloroform-Extraktion	33
3.4.7.2 Präzipitation	33

3.4.8	Automatische Sequenzierung mittels Kapillarelektrophorese	33
3.4.8.1	Sequenzreaktion	34
3.4.8.2	Reinigung des Sequenzierungsproduktes	35
3.5	Lösungen.....	35
3.6	Statistische Analyse	36
4	Ergebnisse	37
4.1	Molekularbiologie	37
4.1.1	RT-PCR	37
4.1.2	Sequenzanalyse	40
4.2	Immunhistochemie	41
4.2.1	Hämatoxylin-Eosin Färbung (HE-Färbung)	41
4.2.2	Insulin-Antikörper	41
4.3	Physiologie	42
4.3.1	Glucosespiegel	42
4.3.2	HbA _{1C}	44
4.3.3	Insulinspiegel	44
4.3.4	Toleranz-Tests	45
4.3.4.1	Glucose-Toleranz-Test	45
4.3.4.2	Insulinspiegel nach Glucosebelastung	49
4.3.5	Fettdiät	50
5	Diskussion	53
5.1	Zusammensetzung des Ca _v 1.2 im Pankreas.....	53
5.2	Einfluß des Ca _v 1.2 auf den Blutzuckerspiegel.....	54
5.3	Ca _v 1.2 Kalziumkanäle sind nötig für die erste Phase der Insulinsekretion.....	56
5.4	Einfluß von Alter und Ernährung.....	56
5.5	Rolle der Nicht L-Typ Kalziumkanäle.....	57
5.6	Läßt sich die Entstehung von Diabetes mellitus Typ 2 mit der defekten Anordnung von Kalziumkanälen und sekretorischen Insulingranula begründen?.....	58
6	Zusammenfassung	60
7	Literaturverzeichnis	61
	Danksagung	69

Abbildungs-/Tabellenverzeichnis

Abb. 1	Phylogenetischer Stammbaum der Kalziumkanäle
Abb. 2	Modell eines spannungsabhängigen Kalziumkanals
Abb. 3	Schema der Insulinfreisetzung
Abb. 4	Knock-out Strategie
Abb. 5	Schema eines ELISA
Abb. 6	PCR mit α_{1C} Primern
Abb. 7	PCR mit $\beta_2+\beta_3$ Primern
Abb. 8	PCR mit $\alpha_2\delta 1-3$ Primern
Abb. 9	Pankreasschnitte mit HE-Färbung
Abb. 10	Pankreasschnitte mit Insulin-Antikörper
Abb. 11	Basaler Glucosespiegel
Abb. 12	Geschlechtsspezifischer basaler Glucosespiegel
Abb. 13	Basaler Insulinspiegel nach Geschlecht
Abb. 14	Glucosetoleranztest
Abb. 15	Glucosetoleranztest von Jungtieren
Abb. 16	Glucosetoleranztest von alten Tieren
Abb. 17	Insulinspiegel nach Glucosegabe
Abb. 18	HbA _{1C} -Werte unter Fettdiät
Tab. 1	Klassifikation der Kalziumkanäle
Tab. 2	Zusammensetzung der Fettdiät
Tab. 3	PCR-Protokoll
Tab. 4	Primer zur Charakterisierung des Ca _v 1.2
Tab. 5	Primer zur Genotypisierung
Tab. 6	Primer als internen Standard (HPRT)

Abkürzungen

A	Adenin	IgG	Immunglobulin G
Abb.	Abbildung	Kb	Kilobase
ADP	Adenosin-5'-diphosphat	KO	Knock-out
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure	LVA	Low voltage activated
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose	loxP	DNS-Substrat der Cre-Rekombinase (Locus of cross-over of P1)
ATP	Adenosin-5'-triphosphat	μ	Mikro (10^{-6})
bp	Basenpaar	m	Milli (10^{-3}), männlich
BTZ	Benzothiazepin	M	Molar, Marker (bei PCR)
C	Cytosin	mg	Milligramm
Ca²⁺	Kalzium	min	Minute
cAMP	Cyclisches Adenosin-5'-monophosphat	ml	Milliliter
cDNS	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure	mRNS	Messenger-RNS
cGMP	Cyclisches Guanin-5'-monophosphat	ms	Millisekunde
Cre	Cyclization recombination	mV	Millivolt
Da	Dalton	PAA	Phenylalkylamine
dATP	Desoxyadenosintriphosphat	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
dCTP	Desoxycytosintriphosphat	PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
dl	Deziliter	PKA	Proteinkinase A
dTTP	Desoxythymidintriphosphat	pmol	Pikomol
ddNTP	2', 3'-Dodesoxynukleosid-5'-triphosphat	rpm	Umdrehungen pro Minute
DHP	Dihydropyridin	RIA	Radioimmunoessay
DNS	Desoxyribonukleinsäure	RIP	Insulin Promotor der Ratte
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat	RNS	Ribonukleinsäure
EDTA	Natrium-ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat	SDS	Natriumdodecylsulfat
ELISA	Enzymgekoppelter Immunoessay	SEM	Standardfehler des Mittelwertes
ES-Zellen	embryonale Stammzellen	SLMV	Synaptic-like Mikrovessikel
flox	loxP-flankiert	SNAP	Synaptosom assoziiertes Protein
g	Gramm	SNARE	Synaptic core complex
G	Guanin	T	Thymin
GABA	γ -Amino-n-buttersäure	t	Zeit
GK	Glucokinase	Tab.	Tabelle
GLUT 2	Glucosetransporter 2	TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
h	Stunde	U	Unit, Einheit
HbA_{1c}	Glykosylierter Anteil des Hämoglobins	UV	Ultraviolett
HE	Hämatoxyllin/Eosin	VAMP	Vessikel assoziiertes Membranprotein
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase	w	weiblich
HVA	High voltage activated	WT	Wildtyp
i.p.	Intraperitoneal	ZNS	Zentrales Nervensystem

Meinen Eltern

1 Einleitung

Diabetes mellitus Typ 2 stellt mit über 5 Millionen Erkrankten, also 7-8% der Bevölkerung, eine der großen Volkskrankheiten in Deutschland dar. Weltweit sind nach Schätzungen der WHO ca. 150 Millionen Menschen betroffen (Clemens et al., 2003). Bei Diabetes mellitus Typ 2 handelt es sich um eine chronische Stoffwechselerkrankung mit dem Leitsymptom Hyperglykämie. Außerdem ist die Erkrankung gekennzeichnet durch unzureichende Insulinsekretion und Insulinresistenz in der Peripherie. Es handelt sich also nicht nur um eine Erkrankung des Pankreas, sondern zusätzlich sind Protein-, Lipid- und Elektrolytstoffwechsel betroffen.

Zur Diagnose eines Diabetes mellitus Typ 2 werden verschiedene Parameter bestimmt, die auch in der vorliegenden Arbeit von Bedeutung sind:

- Der Glucosespiegel gibt die aktuelle Situation im Körper wieder und ist der wichtigste Parameter, da anhand dieses Wertes beim Diabetiker die Insulindosis bestimmt wird. Da dieser Wert im Tagesverlauf beträchtlichen Schwankungen unterliegt, sind häufige Messungen nötig. Der Glucosespiegel sollte beim Menschen normalerweise in einem Bereich von 80-120 mg/dl liegen. Ein Überschreiten (Hyperglykämie) dieses Wertes gibt Anlass zu einem Diabetes-Screening. Ein Unterschreiten (Hypoglykämie) kann schwere bis zu lebensbedrohliche Folgen nach sich ziehen und muss sofort behandelt werden.
- Der Blutzuckerspiegel ist ein Parameter, der ständigen Schwankungen unterworfen ist, z.B. durch Nahrungsaufnahme, Fasten. Um einen Eindruck von der längerfristigen Einstellung des Glucosespiegels zu erhalten, gibt es daher verschiedene Parameter wie Fructosamin oder HbA_{1C}, die man bestimmen kann.
- Insulin ist der wichtigste Regulator des Glucosespiegels. Es wird von den β -Zellen in den Langerhans' Inseln des Pankreas abhängig vom jeweiligen Glucosespiegel freigesetzt. Dies führt dann zu einer Aufnahme der Glucose in die Zellen und damit zur Senkung des Blutglucosespiegels. Beim Menschen setzt sich der Insulinspiegel aus einer basalen Sekretion und einer nahrungsabhängigen zusätzlichen schnellen Sekretionsphase zusammen. Diese schnelle Sekretionsphase dient der raschen Glucoseaufnahme in die Zellen.

- Der Glucose-Toleranz-Test ist ein Standardverfahren des Diabetescreenings mit dem geprüft wird, wie der Organismus mit einer definierten Menge Glucose zurecht kommt. Es kommt bei einer diabetischen Stoffwechsellage zu einer verzögerten Glucoseaufnahme und damit zu höheren Blutglucosewerten an den Messzeitpunkten. Oft wird auch die sogenannte „Nierenschwelle“ überschritten, so dass es zu einem Ausscheiden der Glucose über den Urin kommt (Glucosurie).

Bis heute ist die Ursache für diese Erkrankung nicht vollständig aufgeklärt. Beim Menschen spielen verschiedene ätiopathogenetische Faktoren eine Rolle. Zu diesen Faktoren zählt neben einer genetischen Prädisposition v.a. körperliche Inaktivität verbunden mit Gewichtszunahme und das metabolische Syndrom. Dieses ist definiert als Stammfettsucht, Insulinresistenz, Hyperinsulinämie, gestörte Glucosetoleranz, Dyslipoproteinämie, Albuminurie und Hypertonie. Desweiteren steigt die Prävalenz mit zunehmendem Alter (Clemens et al., 2004).

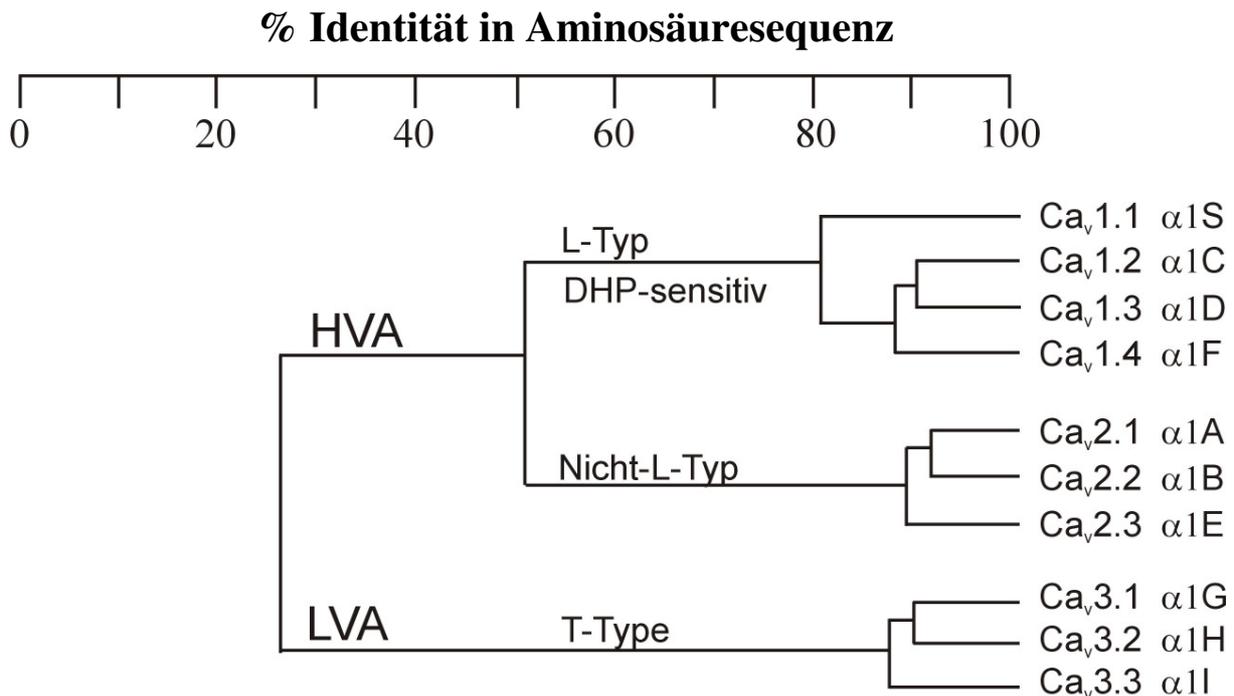
Eine wichtige Hypothese der Grundlagenforschung betont den möglichen Einfluss von Kalziumkanälen bei der Diabetesentstehung. Diese Hypothese soll in der vorliegenden Arbeit anhand eines Mausmodells näher beleuchtet und untermauert werden.

1.1 Kalziumkanäle

Kalziumkanäle spielen eine wichtige Rolle in vielen Organsystemen. Spannungsabhängige Kalziumkanäle sind dabei wesentlich an der Regulation der intrazellulären Konzentration von Ca^{2+} -Ionen beteiligt: sie ermöglichen den Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle abhängig von der Depolarisation und übersetzen so ein elektrisches Signal in ein Zellsignal. Ca^{2+} -abhängige Regulation findet man u.a. bei der Synthese und Sekretion von Neurotransmittern und Hormonen, bei der Kontraktion des Herzens, der glatten und Skelettmuskulatur. Außerdem sind Kalziumkanäle an der Regulation von Enzymaktivitäten, der Genexpression, der Zellproliferation und dem Zelltod beteiligt. Sie gehören der Superfamilie der Transmembran-Ionenkanäle an, zu der auch spannungsabhängige Kalium- und Natriumkanäle gezählt werden. Die Öffnung der Kalziumkanäle wird v.a. durch das Membranpotential reguliert, weiterhin spielen Hormone, Proteinkinasen, Proteinphosphatasen, Toxine und Pharmaka eine wichtige Rolle (Hofmann et al., 1999).

Die α_1 -Untereinheit stellt ein großes hydrophobes Transmembranprotein dar, das aus 4 homologen Domänen gebildet wird, die sich jeweils aus 6 transmembranen Segmenten zusammensetzen. Dieses Protein kann nach Depolarisation seine Konformation ändern und damit die Pore öffnen. Nach kurzer Zeit ändert sich wiederum die Konformation und der Kanal ist inaktiviert. Die α_1 -Untereinheit enthält die Pore, den Selektivitätsfilter der Pore, den Spannungssensor sowie die Stellen zur Interaktion mit den β -Untereinheiten, den $\beta\gamma$ -Untereinheiten der G-Proteine, der $\alpha_2\delta$ -Untereinheit und den Kalziumkanalblockern oder –aktivatoren. Da diese Untereinheit die wichtigste für den Kalziumkanal darstellt, wurde nach ihr die Nomenklatur aufgebaut. Danach lassen sich spannungsabhängige Kalziumkanäle in 2 große Gruppen unterteilen, die sich schon zu einem frühen Zeitpunkt der Evolution getrennt haben (siehe Abbildung 1).

Abb. 1: Phylogenetischer Stammbaum der spannungsabhängigen Kalziumkanäle (Hofmann et al., 1999)



HVA = high voltage aktivierte Ca-Kanäle, LVA = low voltage aktivierte Ca-Kanäle, DHP = Dihydropyridin, L-Typ = long lasting Ca-Kanal, T-Typ = transient aktivierte Ca-Kanäle

Kalziumkanäle lassen sich wie folgt klassifizieren (siehe Tabelle 1):

Auf der einen Seite haben wir die high voltage aktivierten (HVA) Kalziumkanäle mit ihrer weiteren Untergliederung in L-Typ, P/Q-Typ, N-Typ und R-Typ, und auf der anderen Seite die low voltage aktivierten (LVA) Kalziumkanäle auch T-Typ genannt.

Tab. 1: Klassifikation der Kalziumkanäle

		Gewebeverteilung	Blocker
LVA	Ca _v 3.1 (α1G) T-Typ	ZNS, Herz	(Mibefradil, Kurtoxin)
	Ca _v 3.2 (α1H) T-Typ	Niere, Herz, ZNS, Leber	(Mibefradil, Kurtoxin)
	Ca _v 3.3 (α1I) T-Typ	ZNS	(Mibefradil)
HVA	Ca _v 1.1 (α1S) L-Typ	Skelettmuskel	DHP, PAA, BTZ
	Ca _v 1.2 (α1C) L-Typ	Herz, glatter Muskel, ZNS, endokrine Gewebe	DHP, PAA, BTZ
	Ca _v 1.3 (α1D) L-Typ	ZNS, Pankreas, Niere, Ovar, Kochlea	DHP, PAA, BTZ
	Ca _v 1.4 (α1F) L-Typ	Retina	DHP
	Ca _v 2.1 (α1A) P/Q-Typ	ZNS, PNS, Kochlea	ω-Agatoxin IVA
	Ca _v 2.2 (α1B) N-Typ	ZNS	ω-Conotoxin GVIA
	Ca _v 2.3 (α1E) R-Typ	ZNS, Kochlea, Retina, Herz, Pankreas, Spermien, neuroendokrine Gewebe	SNX-482

Beide Gruppen unterscheiden sich durch ihre elektrophysiologischen und pharmakologischen Eigenschaften.

Die Gruppe der LVA-Kanäle oder T-Typ Kalziumkanäle umfasst 3 Mitglieder Ca_v3.1 (α1G), Ca_v3.2 (α1H) und Ca_v3.3 (α1I) (Chuang et al., 1998; Cribbs et al., 1998; Klugbauer et al., 1999b; Perez-Reyes et al., 1998). Die Kanalöffnung beginnt bei einer Depolarisation der Zelle auf –60 bis –40 mV. Das Öffnen der Kanäle erfolgt dabei sehr schnell (wenige Millisekunden), während die Deaktivierung langsam abläuft und die Inaktivierung spannungsabhängig ist. Außerdem haben sie auch eine geringere Leitfähigkeit als HVA-Kanäle (Klugbauer, 1999). Ca_v3.1 und Ca_v3.2 kommen v.a. im ZNS, aber auch in anderen Geweben z.B. im Pankreas, wo Ca_v3.1 den Zellzyklus der β-Zellen beeinflusst, vor (Zhuang et al., 2000). Ca_v3.3 wurde ausschließlich im ZNS (Bulbus olfaktorius, Mittelhirn, Großhirn), Rückenmark, Schilddrüse und Nebenniere gefunden (Talley et al., 1999). Alle T-Typ Kanäle können miteinander koexprimiert sein. Die physiologische Rolle von Ca_v3.1 und Ca_v3.3 scheint die Oszillation im Thalamus zu sein (Chemin et al., 2002). Darüber hinaus sind alle T-Typ Kalziumkanäle an der Schrittmacherfunktion des Sinusknotens beteiligt (Bohn et al., 2000). Ca_v3.2 scheint eher für glattmuskuläre Kontraktion und Proliferation als auch

Aldosteron- und Cortisolsekretion wichtig zu sein (Gomora et al., 2000; Rossier et al., 1998; Sarsero et al., 1998; Schmitt et al., 1995).

HVA-Kanäle dagegen öffnen erst bei einer Depolarisation des Membranpotentials auf > -30 mV. Sie lassen sich im Gegensatz zu den T-Typ Kanälen nur langsam aktivieren, zeigen jedoch eine schnelle, stark Ca^{2+} -abhängige Inaktivierung. Erstaunlicherweise stellt der $\text{Ca}_v1.4$ hierbei eine Ausnahme dar. So bleiben z.B. L-Typ-Kanäle ca. 500 ms geöffnet.

HVA-Kanäle sind heterooligomere Komplexe, die sich aus bis zu vier Untereinheiten zusammensetzen. Mittlerweile sind 10 Gene identifiziert worden, die für die α_1 -Untereinheit, die größte und wichtigste Untereinheit kodieren.

1.2 Pankreas

Das Pankreas ist ein besonderes Organ, da es durch seinen exokrinen und endokrinen Anteil an zwei lebensnotwendigen Sekretionen beteiligt ist. Auf die exokrine Sekretion von Amylase, Cholezystokinin und anderen Verdauungsenzymen soll hier nicht näher eingegangen werden. Die Untersuchung der endokrinen Sekretion von Hormonen, besonders von Insulin, steht im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit. Das Pankreas ist verantwortlich für die Freisetzung von Insulin, Glucagon, Somatostatin und pankreatischem Polypeptid, die alle in den Langerhans' Inseln gespeichert sind. Die Freisetzung von Hormonen aus endokrinen Zellen erfolgt in der Regel relativ langsam (bis zu 500 ms). Die Verzögerung zwischen elektrischer Aktivität und Sekretion nimmt einen viel längeren Zeitraum in Anspruch als es bei der synaptischen Übertragung beobachtet wird (0,5 ms). Trotz dieser zeitlichen Unterschiede weisen die beteiligten Proteine eine bemerkenswerte Übereinstimmung auf (Martin, 1994). Es zeigt sich jedoch ein deutlicher Unterschied in den beteiligten Kalziumkanal-Typen. Nach Stimulation erfolgt die Hormonfreisetzung aus endokrinen Zellen dabei hauptsächlich aus L-Typ Kalziumkanälen (Loechner et al., 1996; Mangel et al., 1996; Scherubl et al., 1993; Villalobos et al., 1997).

Die β -Zellen des Pankreas gehören zu den am besten charakterisierten endokrinen Zellen. Diese Zellen sind verantwortlich für die kontrollierte Insulinfreisetzung als Antwort auf eine erhöhte Plasmaglukosekonzentration. Zunächst wird die Glucose über GLUT2 Transporter in die β -Zelle aufgenommen. Dort erfolgt die sofortige Phosphorylierung. Der oxidative Metabolismus entscheidet als nächstes den weiteren Ablauf. Bei einem Anstieg des ATP/ADP-Verhältnisses erfolgt eine Depolarisation der Zelle durch die Schließung ATP-abhängiger Kaliumkanäle. Diese Depolarisation öffnet spannungsabhängige Kalziumkanäle

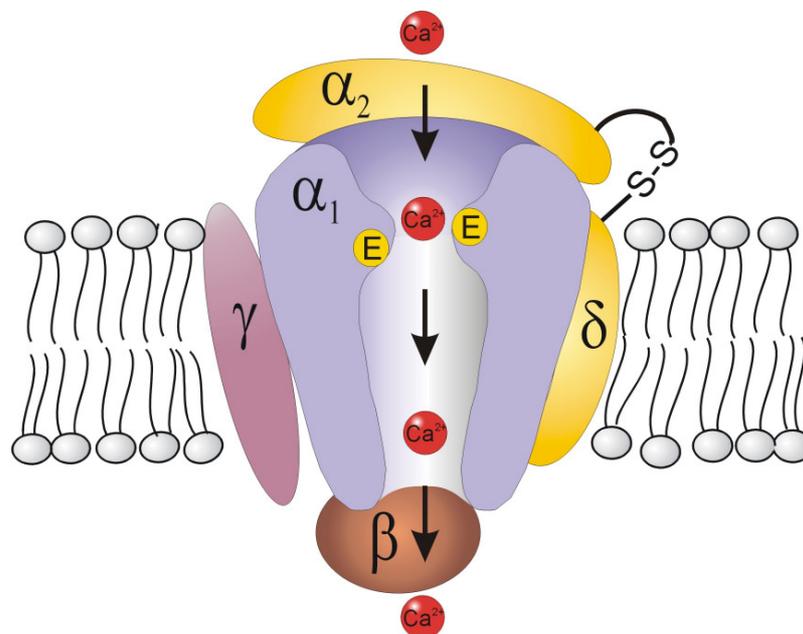
und führt so zu einer Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration. Diese wiederum vermittelt die Fusion der Insulin enthaltenden Vesikel mit der Plasmamembran und damit die Insulinfreisetzung (Doyle and Egan, 2003).

Die bislang vorliegenden Arbeiten zeigten große Unterschiede in der Kanalexpression. So wird beim Mensch die endokrine Sekretion zwar zu 80% durch L-Typ Kalziumkanäle vermittelt, daneben wurden aber auch T-Typ Kanäle nachgewiesen. Bei der Maus wurden bislang nur L-Typ Kalziumkanäle gefunden. Hieraus ergibt sich, dass bislang die Bedeutung von $Ca_v1.2$ unklar ist. In der vorliegenden Arbeit soll aus diesem Grund die Rolle des $Ca_v1.2$ Kalziumkanals bei der Insulinsekretion näher untersucht werden. Zunächst soll jedoch eine kurze Zusammenfassung der Kalziumkanal-Subtypen erfolgen, da einige auch im Pankreas gefunden wurden und ihre Rolle bislang unklar ist.

1.3 L-Typ Kalziumkanäle

L-Typ Kalziumkanäle lassen sich anhand der α_1 -Untereinheit unterteilen in $Ca_v1.1$ (α_1S), $Ca_v1.2$ (α_1C), $Ca_v1.3$ (α_1D), $Ca_v1.4$ (α_1F) (siehe Abbildung 2).

Abb. 2: Aufbau eines high voltage aktivierten Kalziumkanals (Klugbauer et al., 1999)



α_1 = α_1 -Untereinheit, β = β -Untereinheit, α_2 = α_2 -Untereinheit, δ = δ -Untereinheit, γ = γ -Untereinheit, S-S = Disulfidbrücke zur Verankerung der α_2 -Untereinheit an der δ -Untereinheit, E = Glutaminsäureseitenkette = Ionenselektivitätsfilter

Ca_v1.1 ist im Skelettmuskel exprimiert und befindet sich als Tetramer in den Tubuli transversi (Flucher and Franzini-Armstrong, 1996). Hier spielt er zusammen mit dem Ryanodinrezeptor eine Schlüsselrolle bei der elektromechanischen Kopplung, wobei dafür kein Ca²⁺-Einstrom aus dem Extrazellularraum notwendig ist, dafür eine Phosphorylierung durch PKA, was den Ca²⁺-Einstrom aus dem sarkoplasmatischen Retikulum vergrößert. Außerdem kommt ihm Bedeutung bei der Aufrechterhaltung der Kalziumhomöostase im Skelettmuskel zu (Rios et al., 1992).

Defekte in diesem System führen zu familiärer hypokaliämischer Paralyse, maligner Hyperthermie oder muskulärer Dysgenese. Antikörper gegen Ca_v1.1 Kalziumkanäle konnten bei der Lambert-Eaton Erkrankung und sporadischer ALS nachgewiesen werden.

Das Ca_v1.2 Gen umfasst ca. 150 bp und ist aus 44 invarianten und mehr als 6 alternativen Exons zusammengesetzt (Soldatov, 1994); es wird hauptsächlich im Herz, glatten Muskel als auch in neuronalen und endokrinen Zellen exprimiert (Catterall, 2000). Es gibt hierbei mehrere Spleißvarianten des Gens. Für die embryonale Entwicklung ist der Ca_v1.2 unbedingt erforderlich (Seisenberger et al., 2000). Im Herz spielt Ca_v1.2 sowohl eine Rolle bei der Aktionspotentialentstehung, als auch bei der Kontraktion des Herzmuskels. Eine weitere wichtige Funktion ist die Aufrechterhaltung des Gefäßtonus durch die glatte Muskulatur. Hierbei wird Ca_v1.2 v.a. durch Proteinkinasen, cGMP, cAMP reguliert (Striessnig, 1999). Die Funktion des Ca_v1.2 im Pankreas ist nicht vollständig geklärt und Teil der vorliegenden Arbeit, da auch andere L-Typ Kalziumkanäle im Pankreas exprimiert sind. Am Anfang ging man davon aus, dass Ca_v1.3 maßgeblich an der Insulinsekretion beteiligt sein soll (Namkung et al., 2001; Perez-Reyes et al., 1990; Yang et al., 1999). Hierzu liegen jedoch widersprüchliche Ergebnisse vor, da ein Ca_v1.3 Knock-out zu Taubheit, Arrhythmie und Bradykardie führte, jedoch keinerlei Veränderungen im Glucosestoffwechsel gefunden wurden (Platzer et al., 2000). Deswegen wurde daraufhin Ca_v1.2 als Hauptkanal für die Insulinsekretion angesehen (Barg et al., 2001; Ligon et al., 1998; Safayhi et al., 1997). Des Weiteren wurden noch R- und P-/Q-Typ Kalziumkanäle im Pankreas beschrieben, so dass zur Zeit von einer gesicherten Datenlage keinesfalls ausgegangen werden darf. Mit der vorliegenden Arbeit soll die Hauptrolle von Ca_v1.2 bei der Insulinsekretion gezeigt werden. Ca_v1.3 ist ein Kalziumkanal, der hauptsächlich im neuroendokrinen Gewebe aktiv ist. Seine Hauptaufgabe scheint die Neurotransmitterfreisetzung vor allem in sensorischen Zellen zu sein, was in der Cochlea bei Verlust zu Taubheit führt (Platzer et al., 2000). Im Herz ist er im Sinusknoten an der Herzfrequenz beteiligt und an der Länge der PR-Strecke im EKG. In Motoneuronen moduliert Ca_v1.3 die Nervenimpulse (Perrier et al., 2002). Eine weitere

Funktion scheint in der Hormonsekretion zu liegen, besonders im Pankreas, wo $Ca_v1.3$ in β -Zellen nachgewiesen wurde und somit an der Insulinsekretion beteiligt sein könnte. Ein Knock-out-Modell führte zu marginalen Störungen im Glucosestoffwechsel (Namkung et al., 2001), wohingegen Platzter et al keine feststellen konnten.

$Ca_v1.4$ ist ein L-Typ Kalziumkanal, der beim Menschen nur im Auge (äußere Körnerschicht) und Ganglionzellen exprimiert wird. Seine Funktion liegt in der Neurotransmitterfreisetzung in den Zellen der Retina (Koschak et al., 2003). Verlust ruft die inkomplette X-chromosomal gebundene Nachtblindheit Typ 2 hervor (Bech-Hansen et al., 1998).

1.4 Nicht L-Typ Kalziumkanäle

N-Typ Kalziumkanäle sind hauptsächlich in neuronalem Gewebe exprimiert (Westenbroek et al., 1992). Sie sind maßgeblich an der Initiierung der Neurotransmitterfreisetzung beteiligt (Chung et al., 2002). Durch ihre Blockade im sympathischen Nervensystem kann die Schmerzwahrnehmung beeinflusst werden, besonders bei persistierenden Schmerzen (Saegusa et al., 2001). An $Ca_v2.2$ Knock-out Mäusen konnte gezeigt werden, dass N-Typ Kalziumkanäle auch eine Rolle bei der Regulation des Blutdrucks und der Herzfrequenz spielen und außerdem die Neurotransmitterfreisetzung in sympathischen Neuronen deutlich herabgesetzt ist (Ino et al., 2001; Mori et al., 2002).

P/Q-Typ Kalziumkanäle stellen gute Modelle für bestimmte neurologische Erkrankungen dar. Mutationen rufen beim Menschen z.B. bestimmte Ataxieformen (episodische Ataxie Typ 2, spinale cerebelläre Ataxie Typ 6) und Migräne (familiäre hemiplegische Migräne) hervor (Ducros et al., 1999; Kraus et al., 2000; Ophoff et al., 1996). Knock-out-Modelle der Maus zeigten eine Kleinhirnatrophie, schwere Muskelkrämpfe und ebenfalls Ataxie. Außerdem starben die Mäuse ca. 3-4 Wochen nach Geburt (Fletcher et al., 2001; Jun et al., 1999). Beim Erleben von persistierenden Schmerzen spielen P/Q-Typ Kalziumkanäle neben N-Typ Kalziumkanälen ebenfalls eine Rolle (Prado, 2001). Zusätzlich wurde der $Ca_v2.1$ auch in Herz, Pankreas und Hypophyse nachgewiesen. Die Rolle im Pankreas ist bislang aber ungeklärt.

R-Typ Kalziumkanäle spielen eine protektive Rolle bei neuronaler Ischämie, können die Schmerzwahrnehmung auf spinaler und supraspinaler Ebene beeinflussen und spielen bei der räumlichen Orientierung eine Rolle. Ihre Funktionsweise beruht dabei auf dem Kalziumeinstrom in die Dendriten (Saegusa et al., 2002). Außerdem sind sie im Herz und der Niere exprimiert (Mitchell et al., 2002; Vajna et al., 1998) und teilweise mit verantwortlich

für die Spermienbewegung (Sakata et al., 2002). Mit $Ca_v2.3$ wurde neben T-Typ und P/Q-Typ schon der dritte nicht L-Typ Kalziumkanal im Pankreas nachgewiesen. Er scheint für die Einstellung des Glucosespiegels ebenso eine Rolle zu spielen wie für die Adrenalinausschüttung in der Nebenniere (Albillos et al., 2000; Pereverzev et al., 2002a). Seine genaue Funktion wird aber kontrovers diskutiert und soll im weiteren Verlauf der Arbeit ebenfalls beleuchtet werden.

Daneben gibt es noch die sogenannten Hilfsuntereinheiten β , $\alpha_2\delta$ und γ .

1.5 Kalziumkanal-Untereinheiten

1.5.1 $\alpha_2\delta$ -Untereinheit

Die $\alpha_2\delta$ -1 Untereinheit im Skelettmuskel ist ein stark glykosyliertes Membranprotein, das durch Proteolyse posttranslational in ein α_2 -Protein und ein δ -Protein gespalten wird. Beide Proteine sind über Disulfidbrücken miteinander verbunden (De Jongh et al., 1991). Das transmembrane δ -Protein verankert das extrazellulär gelegene α_2 -Protein mit dem Kalziumkanalkomplex (Wiser et al., 1996).

Die $\alpha_2\delta$ -1 Untereinheit wird bei der Maus und dem Menschen ubiquitär exprimiert. Hierbei ergaben sich durch verschiedene Spleißvarianten bislang 5 verschiedene Isoformen, die wiederum gewebespezifisch exprimiert werden (Angelotti and Hofmann, 1996).

Die $\alpha_2\delta$ -2-Untereinheit wurde bei der Maus in ZNS (Purkinje-Zellen), Herz, Skelettmuskel, Niere, Leber, Pankreas entdeckt, während sie beim Menschen auch in der Lunge, insbesondere bei einigen Lungentumoren, und im Hoden gefunden wurde (Gao et al., 2000; Klugbauer et al., 1999). Eine Mutation des Gens (Ducky-Mutation) stellt ein Modell für Absence-Epilepsien dar (Brodbeck et al., 2002). Koexpression mit verschiedenen Kalziumkanälen zeigte eine Zunahme der Stromdichte, Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung und Inaktivierung in Richtung Hyperpolarisierung.

Die $\alpha_2\delta$ -3 Untereinheit wurde bei der Maus nur im ZNS entdeckt, während sie beim Menschen auch im Herz, Skelettmuskel und Niere vorkommt (Gong et al., 2001; Klugbauer et al., 1999).

Zuletzt wurde die $\alpha_2\delta$ -4 Untereinheit mit 4 Spleißvarianten in Nebenniere, Colon, Leber und Hypophyse entdeckt (Qin et al., 2002)

Die Koexpression der $\alpha_2\delta$ -1 Untereinheit mit α_1 und β Untereinheiten verschiebt die Spannungsabhängigkeit zu negativeren Potentialen, was zu einer schnelleren Kanalaktivierung und -inaktivierung führt und die Stromamplitude vergrößert (Klugbauer et al., 1999; Singer et al., 1991).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Effekte der $\alpha_2\delta$ -Untereinheit weniger stark sind, als die der β -Untereinheiten. Außerdem hängen die Effekte stark davon ab, mit welcher α_1 -Untereinheit sie koexprimiert sind.

Auffällig ist außerdem eine große Variabilität zwischen verschiedenen Spezies in der Expression v.a. von $\alpha_2\delta$ -2 und -3 (Gong et al., 2001).

1.5.2 β -Untereinheit

Die β -Untereinheiten sind intrazellulär lokalisierte Proteine mit bis zu 70 kDa, von denen 4 Gene identifiziert wurden, die alle alternativ gespleißt werden können (Castellano et al., 1993; Hullin et al., 1992; Perez-Reyes et al., 1992; Ruth et al., 1989). Eine wichtige Funktion der β -Untereinheit ist neben der Kanalmodulation die Hilfe beim Einbau der α_1 -Untereinheit in die Zellmembran.

Die β_1 -Untereinheit wurde im Skelettmuskel und die Spleißformen in Herz, ZNS und Milz identifiziert (Powers et al., 1992). Eine Mutation ruft beim Menschen die periodische hypokaliämische Paralyse hervor (Yamakage and Namiki, 2002). Bei der Maus ruft die selbe Mutation eine muskuläre Dysgenese hervor (Powell et al., 1996). Außerdem koppelt die β_1 -Untereinheit $Ca_v1.1$ an die Triaden und spielt eine Rolle bei der elektromechanischen Kopplung. Ein β_1 -Knock out stirbt deshalb bei Geburt (Gregg et al., 1996).

Die β_2 -Untereinheit wird v.a. in Herz, Aorta, Trachea, Lunge und ZNS exprimiert (Biel et al., 1991). Ein Knock-out endet ebenfalls letal, wahrscheinlich aufgrund fehlender elektromechanischer Kopplung im Herzen. Sie scheint außerdem im Auge eine wichtige Rolle bei der Lichtwahrnehmung zu spielen, da transgene Mäuse mit Expression der β_2 -Untereinheit ausschließlich im Herz eine herabgesetzte Lichtsensibilität haben (Ball et al., 2002).

Die β_3 -Untereinheit findet man im glatten Muskel, was im Knock-out unter Salzdiät zu Veränderungen in der Blutdruckregulation führte, und im ZNS (Murakami et al., 2000). Die β_4 -Untereinheit ist die vorherrschende Untereinheit der P/Q-Typ Kalziumkanäle im ZNS.

Eine spontane Mutation führt bei Mäusen zu einem trägen und lustlosen Erscheinungsbild (lethargic) (Brice and Dolphin, 1999; Burgess et al., 1999).

Durch Koexpression mit α_1 -Untereinheiten erhöht sich der Spitzenstrom, beschleunigt sich die Aktivierung und Inaktivierung und verschiebt sich die Strom-Spannungsbeziehungskurve zu negativeren Potentialen (Singer et al., 1991; Wei et al., 1991; Welling et al., 1993).

Weitere funktionelle Effekte betreffen die Bindung von Liganden und die intramolekularen Konformationsänderungen. Jeder Kalziumkanal scheint dabei seine bevorzugte β -Untereinheit zu haben; P/Q-Typ wurde besonders häufig mit β_4 -Untereinheiten gefunden, während N-Typ mit β_3 -Untereinheiten gefunden wurden.

1.5.3 γ -Untereinheit

Die γ -Untereinheiten sind die am wenigsten beforschten Untereinheiten. Zuerst hatte man die γ_1 -Untereinheit, ein integrales Membranprotein, im Skelettmuskel entdeckt (Bosse et al., 1990; Jay et al., 1990). Sie bildet dort einen Komplex mit der α_{1S} , der β_1 und $\alpha_2\delta$ -1 Untereinheit. Die γ_1 -Untereinheit verschiebt die spannungsabhängige Inaktivierung des Kalziumkanals zu negativeren Membranpotentialen.

Die γ_2 -Untereinheit wird im ZNS exprimiert. Bei Stargazer-Mäusen, einer spontanen Mutation im γ_2 -Gen, wird sie verantwortlich gemacht für die Absence-Epilepsien und die Ataxien durch Regulation der Bindung des AMPA-Rezeptors an die postsynaptische Membran. Sie hat abhängig von der $\alpha_2\delta$ -Untereinheit einen inhibierenden Einfluß auf den Kalziumkanal (Verlangsamung der Inaktivierung von $Ca_v3.3$, Abnahme der Stromamplitude von $Ca_v2.1$ und $Ca_v2.2$) (Letts et al., 1998).

Die $\gamma_{3/4}$ -Untereinheiten wurden ebenfalls im ZNS gefunden, aber auch in vielen anderen Geweben. Die Kanalcharakteristika wurden durch diese Untereinheiten jedoch kaum verändert (Klugbauer, 1999).

Die γ_5 -Untereinheit wird im Skelettmuskel, der Leber, der Niere, der Lunge und im Herz exprimiert.

Die γ_6 -Untereinheit ähnelt stark der γ_1 -Untereinheit und hat eine hohe Expression im Herz. Eine neue γ_7 -Untereinheit mit 5 statt 4 Exons wurde zuletzt im ZNS entdeckt (Chu et al., 2001).

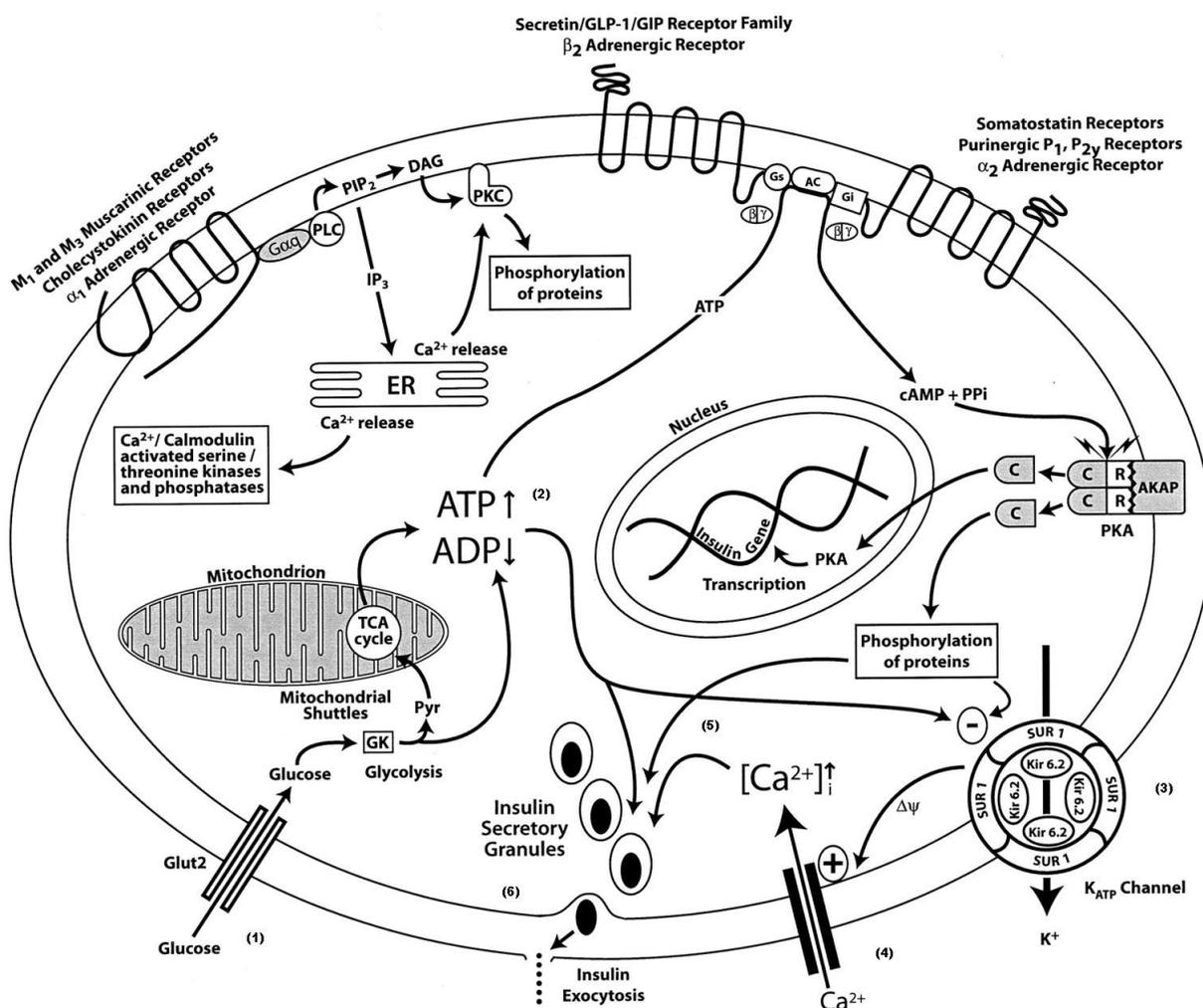
2 Zielsetzung der Arbeit

Glucose ist einer der wichtigsten Energielieferanten des Körpers. Um diese Energie für den Körper nutzbar zu machen, ist er v.a. auf das Pankreas, genauer auf die Langerhans' Inseln, angewiesen.

Insulin muss in einer exakten Menge, zur richtigen Zeit und in einem bestimmten Muster vom Pankreas sezerniert werden, um den Metabolismus im Gleichgewicht zu halten. Das Pankreas ist zudem Sensor für den Energiegehalt der Nahrung. Die Glucosehomöostase wird hierbei aufrechterhalten durch das Gleichgewicht von Insulinsekretion und Insulinwirkung.

Die Insulinsekretion als entscheidender Schritt zur Einstellung des Blutzuckerspiegels, stellt dabei nur den letzten Schritt in einem komplexen Regulationsmechanismus dar (siehe Abbildung 4).

Abb. 4: Insulinfreisetzung in den β -Zellen des Pankreas (Doyle and Egan, 2003)



Schema mit den Hauptereignissen während der Glucose-induzierten Insulinsekretion:

Zunächst wird die Glucose über GLUT2 Transporter in die Langerhans' Zelle aufgenommen (1). Dort erfolgt die sofortige Phosphorylierung. Der oxidative Metabolismus entscheidet als nächstes den weiteren Ablauf. Bei

einem Anstieg des ATP/ADP-Verhältnisses (2) erfolgt eine Depolarisation durch die Schließung ATP-abhängiger Kaliumkanäle (3). Diese Depolarisation öffnet spannungsabhängige Kalziumkanäle (4) und führt so zu einer Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration (5). Diese wiederum vermittelt die Fusion der Insulin enthaltenden Vesikel mit der Plasmamembran und damit die Insulinfreisetzung (6) (Doyle and Egan, 2003).

Aus Abbildung 4 lässt sich entnehmen, dass Kalziumkanäle mehrfach am komplexen Mechanismus der Insulinfreisetzung der β -Zelle beteiligt sind.

Die Funktion der bisher im Pankreas gefundenen Kalziumkanäle stellt sich aktuell sehr undurchsichtig dar und soll durch diese Arbeit verbessert werden. Die Blockierung von R-Typ Kalziumkanälen führte z.B. zu einer Reduktion der glucoseinduzierten Insulinfreisetzung. Manche Komponenten der Ca^{2+} -abhängigen Insulinfreisetzung lassen sich weder durch L-Typ Kalziumkanalblocker noch durch N-Typ Kalziumkanalblocker blockieren, was für einen weiteren Kalziumkanal spricht. Auf diese Weise wurde der $Ca_v2.1$ identifiziert. Andererseits lässt sich die Glucose induzierte Insulinsekretion fast vollständig durch L-Typ Kalziumkanalblocker wie Nifedipin unterdrücken. Untersuchungen an Diabetespatienten zeigten Polymorphismen im $Ca_v1.3$ Gen mit Trinukleotidwiederholungen, was auf eine Beteiligung an Diabetes hindeutet (Yamada et al., 2001). Wie schon weiter oben erwähnt (s. 1.3 L-Typ Kalziumkanäle) liegen widersprüchliche Arbeiten über die Rolle der Kalziumkanäle im Pankreas vor. Diese Arbeit soll einen Beitrag dazu leisten den wichtigsten Kanal für die Insulinsekretion zu finden.

In der vorliegenden Arbeit werden die Auswirkungen des $Ca_v1.2$ Knock-out auf die Insulinsekretion untersucht. Da klassische Knock-out Mäuse in utero vor Tag 14,5 sterben, wurde der $Ca_v1.2$ nur in den β -Zellen des Pankreas ausgeschaltet. Diese Spezifität wurde erreicht durch die Anwendung des Cre/loxP Rekombinationssystem unter der Kontrolle des rat insulin 2 promotors (RiP).

Hierbei stellte sich die Frage, welche Konsequenzen dieser Eingriff auf die physiologischen Parameter wie Glucosehomöostase und Insulinfreisetzung hat und ob sich ein Diabetes-ähnlicher Zustand durch eine bestimmte Ernährung beschleunigen/hervorrufen lässt. Schon länger bekannt ist, dass die Insulinsekretion in 2 Phasen abläuft. Es handelt sich hierbei um eine schnelle, 5-10 Minuten dauernde, erste Phase und eine länger anhaltende zweite Phase (Curry et al., 1968). Welche Kanäle jedoch für die jeweilige Phase zuständig sind, ist bislang unbekannt. Es wurde vermutet, dass die zeitversetzte Vesikelfreisetzung für diese 2 Phasen verantwortlich ist (Barg et al., 2002; Bratanova-Tochkova et al., 2002). Die schnelle Phase soll außerdem durch Vesikel in unmittelbarer Nähe zu den L-Typ Kalziumkanälen zustande

kommen, während die zweite langsame Komponente durch die Freisetzung aus einem Reservepool erfolgen soll (Barg et al., 2001; Wiser et al., 1999).

Weiterhin sollte untersucht werden, ob dieser Knock-out ein Modell für die Entstehung von Diabetes mellitus Typ 2 sein könnte.

Als weitere Fragestellung ergab sich, wie der Kalziumkanal in den β -Zellen des Pankreas aufgebaut ist und welche Untereinheiten hauptsächlich exprimiert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Mausstämme

Bei den verwendeten Mäusen handelt es sich um die Stämme SV 129 (agouti) und C57BL/6 von Charles River (Niederlassung Sulzfeld). Alle Tiere wurden nach den geltenden Richtlinien in einem Tierstall gehalten*.

Das eingesetzte Mausmodell wurde von Dr. Verena Schulla entwickelt und dankenswerter Weise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt (Specht, 2000). Hierbei werden Kontrolltiere ($Ca_v1.2^{Pan +/-}$, $RipCre^{+/tg}$) mit Knock-out Tieren ($Ca_v1.2^{Pan -/-}$, $RipCre^{+/tg}$) verglichen. Das in der Molekularbiologie etablierte Methodenprinzip des Knock-out beinhaltet, dass Teile des Genoms herausgeschnitten werden und es dadurch zu einer fehlerhaften DNS kommt. Dies bewirkt, dass notwendige Proteine - in diesem Fall der Kalziumkanal - nicht mehr funktionsfähig sind.

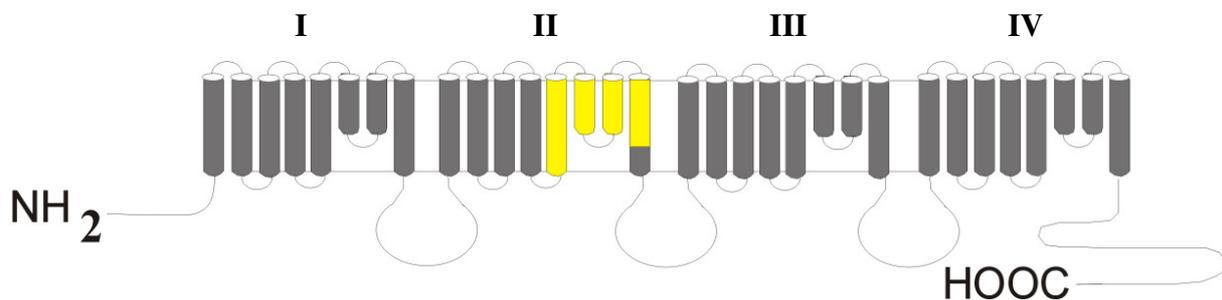
Der $Ca_v1.2$ Kalziumkanal wird bei den verwendeten Mäusen durch 2 verschiedene Allele, L1 und L2, codiert. Mittels eines Vektors wurden diese L1 und L2 Allele in ES-Zellen verändert. L1 umfaßt die Exons 14 und 15 des α_{1C} -Gens des Kalziumkanals. Diese Exons kodieren Teile der zweiten Domäne der α_{1C} -Untereinheit, die wesentlich an der Porenbildung beteiligt sind. Durch das Herausschneiden von Exon 14 und 15 im L1-Allel kommt es zu einem unkorrekten Spleißvorgang zwischen Exon 13 und einem Intron nach Exon 16, was zu einem vorzeitigen Stopcodon in Exon 16 und einem Frameshift führt. Das L2 Allel wurde nur dadurch verändert, dass loxP-Seiten eingeführt wurden. Es stellt somit ein funktionierendes Gen dar. Es handelt sich somit um eine konditionale Geninaktivierung, die mittels des Cre/loxP Rekombinationssystems aus dem Bakteriophagen P1 durchgeführt wurde (Seisenberger et al., 2000).

Um den $Ca_v1.2$ spezifisch in den β -Zellen des Pankreas auszuschalten, wurden $Ca_v1.2^{+/L1}$ Mäuse, die ein intaktes und das L1 Allel hatten, mit Mäusen ($RipCre^{+/tg}$) verpaart, bei denen die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des rat insulin 2 Promotors (RIP) steht (Postic and Magnuson, 1999). Die entstandenen $Ca_v1.2^{+/L1}$, $RipCre^{+/tg}$ Mäuse wurden dann mit $Ca_v1.2^{L2/L2}$ Mäusen verpaart, wodurch $Ca_v1.2^{L1/L2}$, $RipCre^{+/tg}$ ($\beta Ca_v1.2^{Pan -/-}$ Mäuse) und Kontrolltiere ($Ca_v1.2^{Pan +/-}$, $RipCre^{+/tg}$) entstanden (siehe Abbildung 4).

Es werden also Tiere mit 2 Knock-out Allelen mit Tieren, die das Wildtypallel tragen verglichen. Beide Genotypen sind lebensfähig und zeigen keine größeren Auffälligkeiten im Phänotyp.

Abb. 4: Knock-out Strategie (Specht, 2000)

a) Proteinstruktur der α_{1C} -Untereinheit

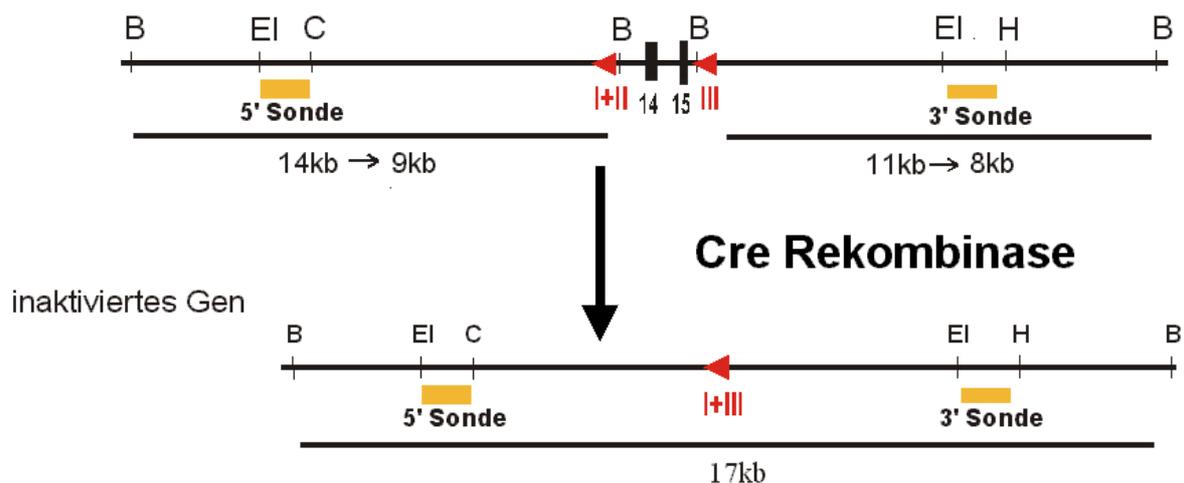


Schematische Darstellung der α_1 -Untereinheit:

I–IV: homologe Domänen, gelb: Exon 14 und 15 im Transmembransegment IIS5 und Pore von Repeat II

b) Knock-out Strategie

geflochte Exons 14 und 15



Rote Pfeile mit römischer Nummerierung: loxP-Sequenzen

Orange Rechtecke: Gensonden zum Mutationsnachweis

Schwarze Kästen: Exons,

B = BamHI, C = ClaI, EI = EcoRI, H = HindIII (Angriffspunkte von Verdauungsenzymen)

3.2 Physiologie

3.2.1 HbA_{1C}

In dieser Arbeit wurde der glykosylierte Anteil des Hämoglobins (HbA_{1C}) als Langzeitparameter, wie er auch für die Diabeteseinstellung beim Menschen bestimmt wird, ausgewählt.

Hierbei wurde der Maus unter Isofluran-Narkose mit einer Kapillare 5 µl Blut aus dem Schwanz entnommen. Zur weiteren Analyse wurde das Testsystem NycoCard der Firma Axis-Shield verwendet. Dieses Testsystem bestimmt den HbA_{1C} durch eine borhaltige Affinitätschromatographie. Durch die Bindung von Glucose an Hämoglobin ändert dieses seine Konformation und präsentiert eine cis-Diol-Gruppe. An diese bindet die Borsäureverbindung spezifisch, wobei sie zur besseren Erkennung blau ist. Das so markierte Hämoglobin wird jetzt auf eine Filtermembran gegeben und bleibt an deren Oberfläche gebunden. Mit dem Ablesegerät NycoCard-Reader wird jetzt die rote und blaue Farbe bestimmt, was mit der Konzentration von glykosyliertem und totalem Hämoglobin korrespondiert. Das Gerät errechnet daraus dann den % HbA_{1C}. Der Vorteil dieser Methode besteht in der Schnelligkeit, da man das Resultat nach ca. 1 Minute erhält.

3.2.2 Glucosespiegel

Analog zur HbA_{1C}-Bestimmung wurde der Blutglucosespiegel aus dem Schwanz der Mäuse bestimmt. Die Messungen wurden über 2 Wochen mit jeweils 4 Messungen pro Woche durchgeführt. Da bei Mäusen eine große Schwankung der Werte erwartet wurde, wurden die Mäuse vor der Messung 6 Stunden nüchtern gesetzt. Dieser Wert wurde als „basaler“ Glucosewert bestimmt. Als Testgerät wurde das Glucometer Elite 2000 der Firma Bayer benutzt. Hierbei wurden ca. 2 µl Blut selbständig durch das Gerät aufgenommen und innerhalb 30 Sekunden analysiert. Dabei wird die Glucose nach der Glucoseoxidase-Methode bestimmt. Die Glucose wird unter Sauerstoffverbrauch von der Glucoseoxidase, einem Enzym des Pilzes *Aspergillus niger*, zu Gluconolacton und Wasserstoffperoxid oxidiert. Die bei dieser Reaktion frei werdenden Elektronen werden mittels Amperometrie vom Testgerät gemessen und sind proportional zur Glucosekonzentration in der Probe.

3.2.3 Glucose-Toleranz-Test

Zur Bestimmung der Glucosetoleranz wurden die Mäuse über Nacht nüchtern gesetzt. Am nächsten Morgen wurde zunächst der Nullwert („Nüchternwert“) für Glucose bestimmt. Anschließend wurden 2 g/kg Körpergewicht Glucose intraperitoneal (i.p.) injiziert. Die weiteren Glucosemesspunkte waren nach 15, 30, 60 und 120 Minuten. Alle Glucosewerte wurden mit dem Glucometer Elite 2000 von Bayer bestimmt (siehe 3.2.2 Glucosespiegel).

3.2.4 Insulin

Der Insulinspiegel wurde zum einen als „basaler“ Insulinspiegel nach 6 Stunden fasten und zum anderen nach Glucosebelastung bestimmt.

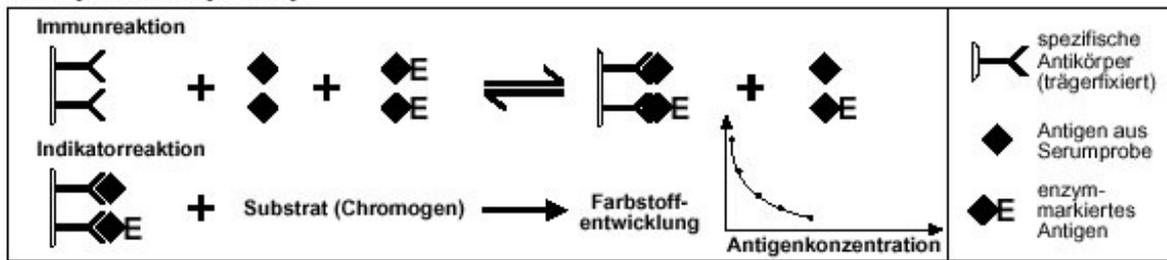
Basaler Insulinspiegel: Der Maus wurden nach 6 Stunden fasten 50-100µl Blut aus dem Schwanz entnommen und anschließend bei 6000 rpm für 2 Minuten zentrifugiert. Das so gewonnene Plasma wurde mit einem Insulin RIA der Firma Linco Research Inc. untersucht. Hierbei handelt es sich um einen kompetitiven Assay (siehe Abbildung 5a), da eine radioaktiv markierte Sonde und die Insulinprobe um eine limitierte Antikörpermenge konkurrieren. Die Menge an gebundener Sonde nimmt ab, je größer die Insulinkonzentration der Probe ist. Dies kann nach Trennung der gebundenen von der freien Sonde gemessen werden und nach Vergleich mit einer Standardkurve die genaue Insulinkonzentration der Probe ermittelt werden.

Insulinspiegel nach Glucosebelastung: Die Mäuse wurden über Nacht nüchtern gesetzt und am nächsten Morgen 3 Minuten nach Glucoseinjektion i.p. durch Genickbruch getötet. Anschließend wurde durch Herzpunktion Blut entnommen. Dieses wurde bei 6000 rpm für 2 Minuten zentrifugiert und das so gewonnene Plasma mit einem Insulin ELISA der Firma Mercodia untersucht. Hierbei handelt es sich um einen ELISA nach dem „Sandwichprinzip“ (siehe Abbildung 5b), da hierbei 2 monoklonale Antikörper gegen verschiedene Antigene des Insulins zum Einsatz kommen und das Antigen so von beiden Seiten (Sandwich) gebunden werden kann. Zu den festgebundenen spezifischen Antikörpern wird die Probe mit der zu bestimmenden Insulinkonzentration gegeben und inkubiert. Nach Entfernung des Überschusses werden nun enzymmarkierte spezifische Antikörper zugegeben. Das gemessene Signal der Nachweisreaktion der enzymmarkierten Antikörper ist direkt proportional zur Insulinkonzentration der Probe.

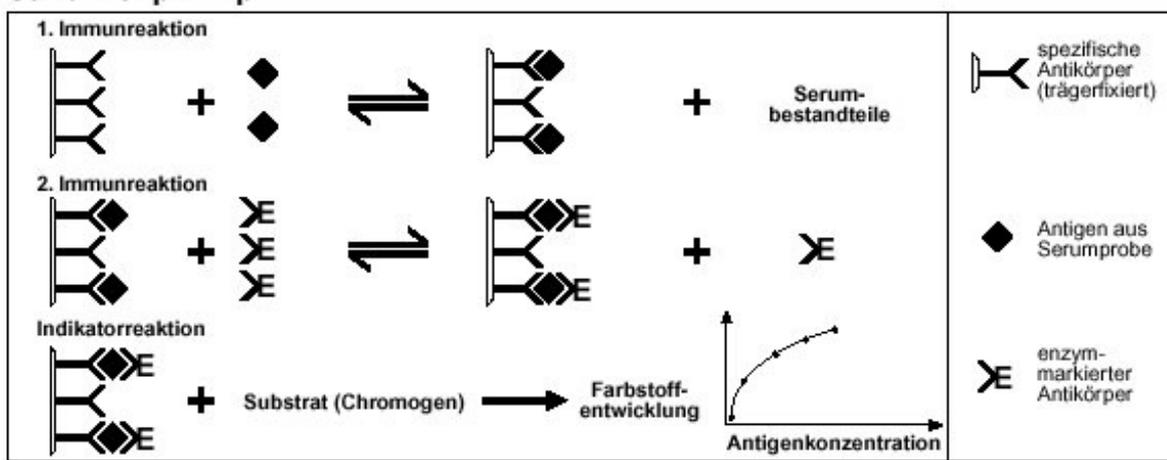
Abb. 5: Prinzipien eines ELISA

Enzymimmunoassays nach dem ELISA-Prinzip

a) Kompetitionsprinzip



b) Sandwichprinzip



3.2.5 Fettdiät

Zur Untersuchung, ob eine fettreiche Kost die Diabetesentstehung beschleunigen kann, wurden die Mäuse für 2 Monate auf fett- und kohlenhydratreiche Kost (Pellets der Firma Altromin) umgestellt.

Die Zusammensetzung der Diät ist in Tabelle 2 wiedergegeben.

Tab. 2: Zusammensetzung der fett- und kohlenhydratreichen Diät

Protein	17 %
Fett	12 %
Wasser	10 %
Energiegehalt	3500 kcal/kg oder 14,6 MJ/kg
Calcium	0,95 %
Magnesium	0,07 %
Kalium	0,7 %
Phosphat	0,75 %
Natrium	0,24 %
Mangan	100 mg/kg
Kupfer	5 mg/kg
Eisen	180 mg/kg
Zink	30 mg/kg
Jod	0,4 mg/kg
Aminosäuren: Lysin, Methionin, Cystin, Phenylalanin, Tyrosin, Arginin, Histidin, Tryptophan, Threonin, Isoleucin, Leucin, Valin	Vitamine A, E, B1, B2, B6, B12, D3, K3, Nikotinsäure, Pantothensäure, Folsäure, Biotin, Cholin, Vitamin C

Als Parameter dienten die wöchentliche Gewichtsveränderung während der ersten 8 Wochen, die Veränderung des Glucosespiegels nach 6 Stunden fasten (gemessen alle 2 Wochen) und die Veränderung des HbA_{1C} nach 2 Monaten.

3.3 Histologische Untersuchung

3.3.1 Einbetten des Pankreas in Paraffin

Um morphologische Untersuchungen am Pankreas von Knock-out- und Kontrolltieren vornehmen zu können, wurden diese mittels Genickbruch getötet und anschließend das Pankreas entnommen.

Das Gewebe wurde dann nach folgendem Schema in Paraffin eingebettet:

1. Fixierung des Pankreas für 24 h in einem kleinen Plastikkäfig in PBS mit 4% Paraformaldehyd (Sigma) bei 4° C
2. Dehydrierung durch eine aufsteigende Ethanolreihe:
 - 50% Ethanol, 1 h bei Raumtemperatur
 - 70% Ethanol, 1 h bei Raumtemperatur
 - 95% Ethanol, 1 h bei Raumtemperatur
 - 100% Ethanol, 1 h bei Raumtemperatur
3. 50% (v/v) Ethanol/Toluol, 1 h bei Raumtemperatur
4. 100% Toluol, 1 h bei Raumtemperatur
5. Einbetten in Paraplast (Sigma) bei 60° C.
 - Paraplast I, 1 h
 - Paraplast II, 1 h
 - Paraplast III, 1h

Das Pankreas wurde anschließend in ein dafür vorgesehenes Metallgefäß gelegt und mit flüssigem Paraplast übergossen. Die Aushärtung erfolgte bei Raumtemperatur innerhalb von 30 Minuten. Das nun eingebettete Gewebe konnte bei 4° C unbegrenzte Zeit gelagert werden.

3.3.2 Schneiden der eingebetteten Pankreata

Der Paraffinblock wurde mit einem Schneidegerät der Firma Microm (HM 335E) bei Raumtemperatur in 10 oder 12 µm dicke Scheiben geschnitten. Diese wurden dann auf Silanbeschichtete Objektträger (3-Aminopropyltriethoxy-Silan; ICN) übertragen und durch backen bei 42° C über Nacht fixiert.

3.3.3 Hämatoxylin/Eosin Färbung (HE-Färbung)

Zur Darstellung und Untersuchung der Morphologie wurden die Schnitte mit Hämatoxylin/Eosin (HE) gefärbt. Die Kerne färben sich dabei blau-violett und das Zytoplasma rosa.

Ablauf:

- Objektträger 3x 10 Minuten in Toluol legen und dazwischen lufttrocknen
- Maximal für 10 Sekunden in Hämatoxylin tauchen

- 2x 2 Minuten in H₂O waschen
- Kurzer Dip in 0,1% Ammoniaklösung
- 5 Minuten H₂O
- 3-10 Sekunden in Eosinlösung
- 8x in 95% Ethanol
- 8x in 100% Ethanol
- 2 Minuten in 100% Ethanol
- 2 Minuten in Xylol
- mit DePeX-Harz (Serva) bestreichen
- Deckglas aufziehen

Hämatoxylin-Lösung nach Harris (Sigma):

Hämatoxylin	7,5 g/l
-------------	---------

Eosin-Lösung:

Eosin Y (Sigma)	6,0 g
Phloxine B (Sigma)	1,5 g
70% Ethanol	ad 250 ml

3.3.4 Insulin-Antikörper

Um den Insulingehalt zwischen Knock-out- und Kontrolltieren vergleichen zu können, wurden die Pankreasschnitte mit einem Insulin-Antikörper angefärbt.

Zunächst wurde das restliche Paraffin durch Lagerung für 2x 5 Minuten in Toluol entfernt.

Danach erfolgte die Rehydrierung durch eine absteigende Isopropanol Reihe (100%, 90%, 80%, 70%) und anschließende Lagerung in warmem Wasser für 5 Minuten. Jetzt wurden die Objektträger horizontal in eine Kammer gelegt und mit 10x PBS bedeckt.

Die eigentliche Färbung wurde mit dem Vectastain ABC System (Vector Laboratories) durchgeführt. Dieses System besteht aus Avidin, einem Glykoprotein mit extrem hoher Affinität zu Biotin, und einer biotinylierten Peroxidase aus Meerrettich. Die Mischung dieser beiden Komponenten ergibt einen sehr stabilen Komplex.

Die Gewebeschnitte wurden zunächst mit einem spezifischen ersten Antikörper inkubiert (Insulin), danach erfolgte die Inkubation mit einem zweiten Antikörper, der gegen IgG der Spezies des ersten Antikörper gerichtet ist und zusätzlich biotinyliert ist (Goat Anti Rabbit

Vectastain). Als nächstes wurde der Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex zugegeben. Die Peroxidaseaktivität wurde schließlich durch das Substrat Diaminobenzidin (DAB, Sigma) detektiert, was man anhand eines braunen Präzipitates auf den Schnitten erkennen konnte. Danach wurden die Objektträger in Wasser gelegt, um den Anfärbeprozess zu stoppen. Zuletzt wurden die Objektträger mit DePeX Harz bestrichen und anschließend mit einem Deckglas versehen. Nun standen die Schnitte für das Mikroskopieren zur Verfügung.

Protokoll für Immunhistochemie

Wichtig ist, dass die Gewebeschnitte niemals austrocknen, weshalb sie während des gesamten Färbeprozesses immer mit PBS bedeckt wurden. Als erstes wurde die endogene Peroxidase durch Inkubation für 20 Minuten mit einer Lösung von PBS, 30% H₂O₂ und 1% Methanol geblockt. Danach wurden die Schnitte wieder mit PBS bedeckt. Jetzt wurden die freien Proteinbindungsstellen mit 5% NGS (Normal Goat Serum, Vectastain) in PBS für 30 Minuten geblockt und anschließend der erste Antikörper (Insulin) in 5% NGS aufgetragen und über Nacht bei 4° C inkubiert. Am nächsten Tag wurde 3x für 15 Minuten mit PBS gewaschen und danach der zweite Antikörper (biotinylierte Goat anti rabbit IgG) in 5% NGS für 1-2 Stunden bei Raumtemperatur aufgetragen. Anschließend wurde wieder 3x mit PBS gewaschen und danach der AB-Komplex in PBS (Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex) aufgetragen und 2 Stunden inkubiert. Danach wurde 2x mit PBS gewaschen und 2 Minuten Tris-Puffer (50 mM, pH 7,6) zugegeben. Um eine Färbung hervorzurufen wurde eine Lösung aus Trispuffer, DAB (Diaminobenzidin) und 30% H₂O₂ zugegeben und so lange inkubiert bis eine deutliche Färbung sichtbar war. Dieser Färbeprozess wurde durch Waschen mit PBS gestoppt.

3.3.5 Mikroskopie und Photographie

Die Gewebeschnitte wurden im Hellfeld bei einer Vergrößerung von 100-400x mit einem Zeiss Axioskop untersucht. Die Photodokumentation erfolgte mit einer Contax 167 MT-Analogkamera oder Nikon D1X Digitalkamera. Als Farbfilm wurde der Kodak EPY 64T Film verwendet. Die Nachbearbeitung erfolgte mit Adobe Photoshop 5.5.

3.4 Molekularbiologie

3.4.1 Isolierung von genomischer DNS aus dem Mausschwanz

Die isolierte DNS wurde benötigt zur Genotypisierung der Mausnachkommen. Ein kleiner Teil des Mausschwanzes wurde über Nacht (ÜN) bei 55 °C in 750 µl Lysepuffer (100 mM Tris pH 8,5, 5 mM EDTA, 0,2 % SDS, 200 mM NaCl, 1 mg Proteinase K) nach Entnahme unter Narkose enzymatisch „verdaut“. Am nächsten Tag wurde die Lösung 5 min bei 12000 rpm zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die Lösung wurde nacheinander extrahiert mit 1 Vol. Phenol, 1 Vol. Phenol/Chloroform und 1 Vol. Chloroform. Zwischen den einzelnen Schritten wurde die Lösung jeweils 5 min zentrifugiert (12000 rpm) und die obere, wässrige Phase abgehoben. Anschließend wurde die DNS mit 1 Vol. Isopropanol gefällt, mit 70 % Ethanol gewaschen und zuletzt bei 37 °C getrocknet. Die DNS wurde in circa 200 µl H₂O gelöst.

3.4.2 Gewinnung von Inselzellen

Zunächst wurde die Maus durch Genickbruch getötet, anschließend wurde das Abdomen durch einen medianen Längsschnitt eröffnet. Als nächstes wurde der Ductus choledochus an der Mündung ins Duodenum mit 2 kleinen Klemmen abgeklemmt. Ebenso wurde der Gallengang am Ausgang aus der Leber mit 5/0 monofilem Nahtmaterial Ethilon II der Firma Ethicon ligiert. Jetzt wurden 2 ml Kollagenase in den Ductus choledochus injiziert, und so das Pankreas mit Kollagenase „aufgeblasen“. Nun konnte das Pankreas entnommen werden und 17 Minuten bei 37°C in einem Falcon erhitzt werden. Anschließend wurde das Falcon mit 10 ml HBSS aufgefüllt und gut geschüttelt. Nach 2 Minuten konnte der Überstand entnommen werden. Der Vorgang wurde 3 x wiederholt. Jetzt konnten die Inseln aus der Restlösung unter dem Mikroskop mit einer Pipette entnommen werden und in eine Petrischale mit HBSS überführt werden. Zuletzt wurden die Inseln einmal in HBSS gewaschen und anschließend in eine Petrischale mit 12-15 ml RPMI 1640 Medium (Gibco™) überführt. Zur Regenerierung wurden die Inseln über Nacht in einen Brutschrank mit 37°C und 5% CO₂ gestellt.

3.4.3 Isolierung von mRNA aus Pankreasinseln

Nahezu alle eukaryotischen mRNA werden nach der Transkription am 3'-Ende mit Poly(A)-Schwänzen versehen. Diese Poly(A)-Schwänze können durch Bindung der Basenpaare an Polythymidilsäure zur affinitätschromatographischen Reinigung von mRNA aus einem RNS Gemisch oder direkt aus dem Gewebe verwendet werden. In dieser Arbeit wurde das Dynabeads Biomagnetic Separation System der Firma Dynal Biotech (Oslo, Norway) verwendet. Dabei sind die Oligo(dT)-Ketten kovalent an die Oberfläche magnetischer Polystyrolkugeln (Dynabeads Oligo (dT)₂₅) gebunden.

Bei der Arbeit mit RNS muß stets darauf geachtet werden, daß keine Kontamination der RNS-haltigen Lösung durch Ribonukleasen erfolgt. Außerdem sollte die Aktivität der anwesenden RNasen so weit wie möglich vermindert werden. Da RNasen jedoch sehr stabile Proteine sind, die selbst durch Abkochen nicht inaktiviert werden, ist eine Inaktivierung nur durch reduzierende Agentien wie β -Mercaptoethanol oder Guanidiniumisothiocyanat möglich. Alle hitzestabilen Verbrauchsmaterialien wurden deshalb zur RNase-Dekontaminierung für mindestens 5 h bei 250°C gebacken und der Arbeitsplatz war zuvor mit Ethanol abgesprüht worden. Zunächst wurden die Inseln unter dem Mikroskop von der Petrischale mit RPMI-Medium (Gibco™) in ein bei 250°C für 4 Stunden behandeltes RNase freies Reaktionsgefäß überführt. Dieses wurde 1 Minute mit 14500 rpm zentrifugiert anschließend der Überstand verworfen und mit HBSS aufgefüllt. Das Pellett wurde losgeklopft und nun nochmals 1 Minute mit 14500 rpm zentrifugiert. Nach Entnahme des Überstandes wurden 900 μ l 4 M GTC-Puffer hinzugegeben und das ganze dann 2x 20 Sekunden mit einem Teflon-Potter homogenisiert. Um eine noch bessere Homogenisierung zu erreichen wurde das gesamte Gemisch noch 3x mit einer Einwegspritze (G24) aufgesaugt und anschließend wieder ausgeblasen. Dem nun aufgeschlossenen Gewebe wurden jetzt 800 μ l Binding Buffer zugegeben und alles 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde dann zu 50 μ l gewaschenen und equilibrierten Dynabeads gegeben. Überstand und Dynabeads kamen dann für 5 Minuten in einen Überkopfschüttler, wobei die Bindung der Poly(A)-RNS an die Dynabeads erfolgte. Zuletzt wurde das ganze in den Magnet gestellt und, nachdem der Überstand entfernt worden war, 3x mit 300 μ l Washing-Puffer gewaschen. Als letztes wurden noch 10 μ l H₂O_{DEPC} hinzugegeben. Zum Ablösen von den Dynabeads wurde das ganze für 2 Minuten auf 65°C erhitzt und anschließend in den Magnet gestellt. Der Überstand konnte jetzt in ein gebackenes frisches Reaktionsgefäß überführt werden und wurde entweder bei -80°C aufbewahrt oder direkt zur Synthese von cDNA verwendet.

Verwendete Lösungen:

4 M Guanidiniumisothiocyanat (GTC)-Lösung:

H ₂ O _{DEPC}	27,5 ml
3 M Natriumacetat, pH 5,4	330 µl
Guanidiniumisothiocyanat (Roth)	23,65g
1 M DTT	5 µl
Lauroylsarcosinat (Roth)	0,25 g
H ₂ O _{DEPC}	ad 50 ml

1x Binding-Puffer:

1 M Tris/HCl, pH 8,0	5 ml
Lithiumchlorid (Roth)	0,848 g
0,5 M EDTA	2 ml
H ₂ O _{DEPC}	ad 50 ml

1x Washing-Puffer:

1 M Tris/HCl, pH 8,0	500 µl
Lithiumchlorid (Roth)	0,318 g
0,5 M EDTA	100 µl
H ₂ O _{DEPC}	ad 50 ml

3.4.4 Synthese einzelsträngiger cDNS

Da zur weiteren Untersuchung einzelsträngige komplementäre DNS (cDNS) nötig war, musste die gewonnene mRNS zunächst in cDNS umgewandelt werden. Dazu wurde eine RNS-abhängige DNS Polymerase (Superscript II Reverse Transcriptase, Invitrogen) verwendet. Dieses Enzym braucht als Startpunkt für seine Synthesefunktion einen Primer. Hierfür wurde der Random Hexamer Primer verwendet (2 µl), der sich an zufällig komplementäre RNS anlagert, und anschließend für 10 Minuten auf 70°C erhitzt. Für die Synthesereaktion wurden 10 µl RNS-Lösung eingesetzt. Nach der Primeranlagerung konnte die RNS-abhängige DNS-Polymerase in Anwesenheit von 5x First Strand Buffer (Invitrogen) (4 µl), 10mM dNTP (Life Technologies) (1 µl) und 0,1 M DTT (Invitrogen) (2 µl) den ersten cDNS-Strang bilden. Nach einer Stunde Synthesereaktion wurde die Reverse Transkriptase

inaktiviert und die verbliebene RNS des RNS/DNS Hybrids durch Zugabe von 1 µl RNase H (Invitrogen) verdaut. Die so gewonnene cDNS wurde als Template zur PCR eingesetzt.

3.4.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) ist ein in vitro Verfahren zur selektiven Amplifikation von Nukleinsäuresequenzen aus einem Gemisch von Nukleinsäuremolekülen (Mullis & Faloona, 1987; Saiki et al., 1985). Hierzu sind 2 Oligonukleotid-Primer erforderlich, die spezifisch an den kodierenden bzw. nicht-kodierenden Strang einer wenigstens teilweise bekannten DNS-Sequenz binden. Die DNS wird zunächst durch Erhitzen auf 94°C denaturiert, anschließend können die Primer, die in großem Überschuß vorliegen, an die entsprechenden Zielsequenzen binden (Annealing bei 45-60°C). Ausgehend von diesem kurzen Bereich wird der fehlende komplementäre Einzelstrang in 5' → 3' Richtung synthetisiert (Elongation bei 72°C). Durch erneutes Denaturieren bei 94°C wird die neu synthetisierte DNS wieder aufgebrochen und die Primer können erneut an ihre Zielsequenzen binden. Bei jedem Zyklus kommt es so im Idealfall zu einer Verdoppelung der DNS.

In dieser Arbeit wurde die PCR zum Nachweis bestimmter Transkripte des Kalziumkanals im Pankreas eingesetzt.

3.4.5.1 PCR-Protokoll:

Die PCR wurde in einem Thermo Cycler von Biometra (UNO oder UNO II) durchgeführt.

Als thermostabile Polymerase wurde die Taq DNS-Polymerase der Firma Promega verwendet. Als Ausgangs-DNS wurden 10 ng oligo(dT)-primed cDNS eingesetzt.

Zunächst wurde der Reaktionsansatz zusammen pipettiert.

Als Standardreaktionsansatz diente:

- 10 ng cDNA
- 8 µl dNTPs (1,25 pmol/µl) (Roth)
- 5 µl 10x PCR-Puffer (Roche)
- 2,5 µl Primer 1
- 2,5 µl Primer 2
- 0,5 µl Taq-Polymerase (Roche) (5 U/µl)
- 29,5 µl H₂O

10x PCR-Puffer (Roche):

Tris/HCl, pH 8,3	100 mM
KCl	500 mM
MgCl ₂	15 mM

dNTPs (Roth) :

dATP (100 mM)	10 µl
dTTP (100 mM)	10 µl
dGTP (100 mM)	10 µl
dCTP (100 mM)	10 µl
H ₂ O	ad 800 µl

Das Standardprogramm ist in Tabelle 3 wiedergegeben:

Tab. 3: Temperatur und Dauer einer Standard-Polymerasekettenreaktion

Phase	Initiale Denaturierung	Zyklus Nr. 1-40	Verlängerung (Extension)
Denaturierung	94°C für 90 Sekunden	94°C für 30 Sekunden	
Primer-Anlagerung (Annealing)		50-65°C für 60 Sekunden	
Polymerisation (Elongation)		72°C für 30 Sekunden	72°C für 5 Minuten

„Touch Down“:

Bei einem sogenannten Touch down Programm verändert sich in den ersten Zyklen die Annealingtemperatur. Mit dieser Methode können spezifische PCR-Produkte angereichert werden und das Auftreten unspezifischer Produkte durch die zunächst höhere Temperatur verhindert werden. In diesem Fall verringerte sich diese um jeweils 2°C pro Zyklus. Nach 6 Zyklen wurde eine Temperatur von 56°C erreicht und anschließend wurden 36 Zyklen mit gleichbleibender Temperatur gestartet.

„Hot Start“:

Dieses Programm wurde für die PCR von genomischer DNS verwendet. Der Reaktionsansatz wurde bei 94°C für 5 Minuten denaturiert. Bis zur Zugabe des Enzymmixes wurde der Ansatz auf 80°C gehalten („hot start“). Nach Zugabe des Enzymmixes begannen die Zyklen mit Denaturierung, Primeranlagerung und Polymerisation, wie in Tab. 1 beschrieben. Die erhaltenen PCR-Produkte hatten eine Größe zwischen 150 und 1500 bp.

Enzymmix:

Taq-Polymerase (5 U/μl)	0,5 μl
10 x PCR-Puffer (Roche)	0,5 μl
dNTPs (je 1,25 mM, Roth)	4,0 μl

Reaktionsansatz :

Primer 1 (10 pmol/μl)	2,5 μl
Primer 2 (10 pmol/μl)	2,5 μl
dNTPs (1,25 mM, Roth)	4,0 μl
10x PCR-Puffer (Roche)	4,5 μl
DNS	10-250 ng
H ₂ O	ad 45 μl

3.4.5.2 Primer:

Alle Primer wurden von der Firma MWG-Biotech bezogen.

In Tabelle 4 sind die Primerpaare zur Amplifizierung der Untereinheiten des Ca_v1.2 im Pankreas angegeben.

Tab. 4: Primerpaare zur Amplifizierung der Untereinheiten des Ca_v1.2 im Pankreas

amplifizierte Untereinheit	Sequenz (5' → 3')	amplifizierte Größe (bp)
α ₂ δ-1	Forward: 5' GTG GAC CTG GTG CGT ATG AA 3' Reverse: 5' CAT ATG CTG AGC GAT GTC CT 3'	365

$\alpha_2\delta$ -2	Forward: 5' CAG CTG TGG AGC TCA GTC TA 3' Reverse: 5' GTA CAG TGC CAG CAT CAG GT 3'	275
$\alpha_2\delta$ -3	Forward: 5' ACC TCC ATC CAG CTC CTG GA 3' Reverse: 5' CTC CTT GTT GGC TCT ACA CAT 3'	309
β 2	Forward: 5' ACC CTC TGC TTA GCC GGA CT 3' Reverse: 5' CCT CCT TGT CAC AGT AGC GAT 3'	457
β 3	Forward: 5' TGC CAT CCC TGG ACT TCA GAA 3' Reverse: 5' CAG TTC CGG TCA TTG TGG TCA T 3'	267
α 1c	E 13: 5' ACA GCC AAT AAA GCC CTC CT 3' Lef 1: 5' GGC TTC TCC ATC ACC TCC TGT T 3'	L1: 341 L2: 670

Tabelle 5 gibt die Primer zur Genotypisierung der verwendeten Mauslinie wieder.

Tab. 5: Primer zur Genotypisierung der verwendeten Mauslinie

Primer	Sequenz (5' → 3')	amplifizierte Größe (bp)
VI4	5' TGG CCC CTA AGC AAT GA 3'	WT: 415
VI8	5' AGG GGT GTT CAG AGC AA 3'	L1: 281
VI10	5' CCC CAG CCA ATA GAA TGC CAA 3'	L2: 500

Tabelle 6 listet die Primer zur Amplifizierung des HPRT-Gens auf.

Tab. 6: Primer zur Amplifizierung des HPRT-Gens

Amplifiziertes Gen	Sequenz (5' → 3')	amplifizierte Größe (bp)
HPRT	QG 197: 5' GTA ATG ATC AGT CAA CGG GGG AC 3' QG 198: 5' CCA GCA AGC TTG CAA CCT TAA CCA 3'	177

3.4.6 Auftrennung und Isolierung von DNS-Fragmenten

Nukleinsäuren besitzen Zucker-Phosphat-Reste und sind deshalb negativ geladen. Diese negative Ladung ermöglicht eine Auftrennung nach Masse im elektrischen Feld. Der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid, der in das Gel eingegossen werden kann, interkaliert mit den DNS-Fragmenten. Dies führt dazu, dass die DNS-Fragmente unter UV-Licht sichtbar werden. Zum Größenvergleich wurde ein DNS-Standard (1 bp Ladder, Gibco-BRL) mit auf das Gel aufgetragen.

Verwendete Materialien:

10x TBE:

Tris (USB)	0,9 M
Borsäure (Merck)	0,9 M
EDTA pH 8,0 (ICN)	20 mM

Elektrophoresepuffer (Laufpuffer):

1x TBE (1 Teil 10x TBE + 9 Teile H₂O)

Auftragspuffer (6x dye):

Ficoll Typ 400 (Sigma)	18%
EDTA pH 8,0	1,2 mM
TBE	6%
Bromphenolblau (IBI)	0,15%
Xylencyanol FF (Sigma)	0,15%

Ethidiumbromidstammlösung:

10 mg/ml (Sigma) wässrig

3.4.6.1 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNS-Fragmenten wurde die horizontale Gelelektrophorese in Agarosegelen (Sambrook et al., 1989) verwendet. 0,7 % Agarose (Seakem LE, Biozym) wurden in 1x TBE im Mikrowellenherd geschmolzen. Anschließend wurde Ethidiumbromid hinzugegeben (Endkonzentration 800 ng/ml) und das ganze in eine horizontale Kammer

gegossen. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Spannung von 100 V in einer Biorad-Elektrophoresekammer mit 1x TBE als Laufpuffer für 1 Stunde.

3.4.6.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde verwendet im Rahmen der DNS-Sequenzierung zur Kontrolle der Primersequenzen. Für die Auftrennung von DNS-Fragmenten mit einer Größe von 50-1000 bp eignet sich hierzu eine vertikale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE). Es wurden 5%ige Polyacrylamidgele in 1x TBE als Laufpuffer verwendet (Sambrook et al., 1989). Die Trennstrecke betrug 15 cm und die Dicke 0,75 mm.

Zusammensetzung von 30 ml Polyacrylamid:

- 3,75 ml Rotiphoresegel (Acrylamid/N, N'-Bisacrylamid = 29:1, 40% der Firma Roth)
- 3 ml 10x TBE
- H₂O ad 30 ml
- 35 µl TEMED (N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin der Firma Sigma)
- 80 µl 20% APS (Ammoniumpersulfat der Firma Sigma)

Die DNS-Proben wurden vor dem Auftragen mit 1/6 Volumen des Auftragspuffers versetzt. Zum Einlaufen wurde eine Spannung von 110 V angelegt, zur Auftrennung dann 270 V für 1 Stunde. Nach der Elektrophorese wurden die Gele 5 Minuten in Ethidiumbromidlösung (0,5 µg/ml) gefärbt und anschließend unter UV-Licht ausgewertet.

3.4.6.3 Elektroelution

Zur Isolierung eines DNS-Fragmentes einer bestimmten Größe wurde eine modifizierte Elektroelution nach Davis angewandt (Davis et al., 1986). Zunächst wurde nach einer PCR mit 50 µl Ansatz und anschließender elektrophoretischer Auftrennung (s. 2.4.5.1./2.4.5.2.) die jeweiligen Banden unter UV-Licht ausgeschnitten. Die Gelstücke wurden in jeweils einen Dialyseschlauch der Firma Sigma mit 300 µl TBE gegeben und ohne Luftblasen verschlossen. Der Dialyseschlauch wurde in TBE-Puffer in eine horizontale Elutionskammer für 1-2 Stunden bei 145 mA gelegt, und damit die DNS aus dem Gel eluiert. Zur Kühlung wurde die

Kammer mit Eis umgeben. Anschließend wurde der Inhalt in ein Reaktionsgefäß überführt und die DNS durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion isoliert (siehe 3.4.7.1.).

3.4.7 Reinigung von Nukleinsäuren

3.4.7.1 Phenol/Chloroform-Extraktion

Mit der Phenol/Chloroform-Extraktion können Proteine aus einer wässrigen Nukleinsäurelösung entfernt werden. Hierzu wurde die Nukleinsäurelösung mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Mischung (25:24:1, Roth) versetzt. Anschließend wurde das Gemisch kräftig geschüttelt und 5 Minuten mit 12000 x g bei 4° C zentrifugiert. Die nukleinsäurehaltige wässrige Oberphase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit Chloroformextraktion von den noch übriggebliebenen Phenolspuren befreit. Im Anschluss wurden die Nukleinsäuren mit Ethanol präzipitiert.

3.4.7.2 Präzipitation

Die Nukleinsäuren wurden zur Aufkonzentrierung und Reinigung mit Ethanol gefällt. Nach der Eluierung der DNS aus dem PAGE wurde 1/10 Volumen 5 M NaCl und das 2,5 fache Volumen eiskalter Ethanol 99,9% zugegeben. Das ganze wurde für 15 Minuten auf -80°C gekühlt und anschließend für 15 Minuten bei 12000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und der ganze Ansatz mit 700 µl Ethanol 70% gewaschen. Anschließend wurde nochmals für 5 Minuten bei 12000 x g zentrifugiert und der Überstand wiederum abgegossen. Das entstandene Pellet wurde in einer Speed-vac getrocknet und anschließend 10 µl H₂O zugegeben und eine Kontroll-PCR durchgeführt.

3.4.8 Automatische Sequenzierung mittels Kapillarelektrophorese

Die Sequenzanalyse der DNS erfolgte nach einer modifizierten Methode von Sanger (Sanger et al., 1992). Mit Hilfe eines spezifischen Primers synthetisiert eine DNS-Polymerase in vitro einen komplementären Strang des gewünschten Fragmentes. Dem Reaktionsansatz werden neben der zu sequenzierenden DNS, dem Primer und der DNS-Polymerase noch Desoxynukleotidtriphosphate (dNTP) und fluoreszenzmarkierte 2', 3' Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTP) zugesetzt. Nach Einbau eines ddNTPs kommt es zu Kettenabbrüchen, da

die fehlende OH-Gruppe in der 3'-Position eine Verlängerung der DNS verhindert. Die richtige Auswahl des Verhältnisses dNTP zu ddNTP bewirkt eine Mischung aus allen möglichen unterschiedlich langen DNS-Fragmenten. Diese DNS-Fragmente wurden durch den Einbau der mit Fluoreszenzfarbstoffen versehenen Didesoxynukleosidtriphosphate markiert und anschließend durch die Kapillare des ABI Prism™ Sequenz-Analyzer der Größe nach aufgetrennt. Jede Base (Guanin, Cytosin, Adenin und Thymin) des Reaktionsmix (Big dye ready reaction mix) wurde mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff markiert (ddGTP: 540 nm, ddATP: 570 nm, ddTTP: 600 nm, ddCTP: 630 nm) und konnte dann durch den Laser detektiert werden.

Aus den Daten des Lasers errechnete ein Macintosh-Computer (Power Macintosh G3) die DNS-Sequenz.

3.4.8.1 Sequenzreaktion

Die eingesetzte DNS-Menge, die aus der PCR gewonnen worden war, variierte zwischen 30-90 ng.

Reaktionsansatz für Terminator Cycle Sequencing:

Terminator Ready Reaction Mix (Perkin Elmer)	4 µl
Primer [0,8 pmol/µl]	4 µl
DNS	x µl
H ₂ O	ad 20 µl

Der fertige Terminator Ready Reaction Mix (ABI Prism Dye Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, PE, Applied Biosystems) enthält die DNS-Polymerase, dNTPs und die fluoreszenzmarkierten ddNTPs. Dieser Mix wurde aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt.

Der Ansatz wurde gemixt und in einem Thermoblock der Firma Biometra (UNO Thermoblock) mit folgendem Programm amplifiziert:

- Denaturierung bei 95 °C für 2 Minuten
- 25 Zyklen mit
 - Denaturierung für 30 Sekunden bei 95 °C
 - Annealing für 40 Sekunden bei 50 °C
 - Elongation für 4 Minuten bei 60 °C

Die Temperaturen wurden dabei langsam (1 °C pro Sekunden) eingestellt. Durch Zugabe nur eines Primers entstand nur eine lineare Vermehrung der DNS und keine exponentielle wie bei der PCR.

3.4.8.2 Reinigung des Sequenzierungsproduktes

Das Reaktionsprodukt des Cycle Sequencings wurde über eine Gelfiltrationssäule (CentriSep Column, Perkin Elmer) von überschüssigen, fluoreszierenden Nukleotiden gereinigt. Die Säulen wurden mit 800 µl H₂O versetzt und für 3 h bei Raumtemperatur inkubiert, um diese zu quellen. Nach dem Quellvorgang ließ man das Wasser aus der Säule für circa 5 min abtropfen. Es folgte ein Zentrifugationsschritt (525 x g, 1,5 min), um das überschüssige Wasser vollständig zu entfernen. Anschließend wurde das Produkt der Sequenzreaktion auf die Säule pipettiert, die Säule in ein Auffanggefäß gestellt und erneut für 1,5 min bei 525 x g zentrifugiert. Nach dem Zentrifugationsschritt befand sich die gereinigte DNS in dem Reaktionsgefäß und wurde für 20-30 min in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Das Pellet wurde in 20 µl Template Suppression Reagent (Perkin Elmer) resuspendiert, für 3 min bei 95 °C denaturiert und entweder sofort in den Sequencer ABI Prism™ 310 gestellt oder bei -20 °C aufbewahrt.

Der Sequencer zog die Probenlösung automatisch in eine mit Polymer (Perkin Elmer) gefüllte Kapillare, in der die DNS-Fragmente durch die angelegte Spannung von 12,2 kV von - nach + auf den Laserdetektor zuwandern. Aus der Abfolge der von dem Laserdetektor bestimmten Farbsignale errechnet der Computer die Nukleotidsequenz.

3.5 Lösungen

Im folgenden sind die Lösungen angegeben, die für die molekularbiologischen Untersuchungen benötigt werden.

H₂O_{DEPC}:

Diethylpyrocarbonat (DEPC)	1g
H ₂ O	ad 1000 ml

Über Nacht rühren lassen, danach durch Autoklavieren Reste von DEPC entfernen

10x PBS:

NaCl	80g
KCl	2 g
Na ₂ HPO ₄	6,2 g
KH ₂ PO ₄	2 g
H ₂ O	ad 1000 ml
pH 7,4	

HBSS:

1 Dose Pulver	
NaCO ₃	0,35 g
H ₂ O bidest	1 l

Kollagenase:

Kollagenase	32 mg
HBSS	1 ml

3.6 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung der Daten wurde mit dem Computerprogramm Origin 6.0 durchgeführt. Alle Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben. Zum Vergleich der Knock-out Gruppe mit der Kontrollgruppe wurde das Signifikanzniveau mit dem gepaarten doppelten t-Test (Student's t-Test) bestimmt. Als Signifikanzniveaus wurden $p < 0,05$ (signifikant) bzw. $p < 0,01$ festgesetzt. Als hochsignifikant wurde ein Signifikanzniveau von $p < 0,001$ festgelegt.

4 Ergebnisse

Die nachfolgend dargestellten Befunde umfassen sowohl die physiologischen Parameter als auch molekularbiologische Untersuchungen. Zunächst wurde der Genotyp der Maus analysiert. Des weiteren interessierte die Zusammensetzung des $Ca_v1.2$ und seine Untereinheiten. Darüber hinaus wurden die Auswirkungen des Knock-out auf die Physiologie des Glucosestoffwechsels untersucht.

4.1 Molekularbiologie

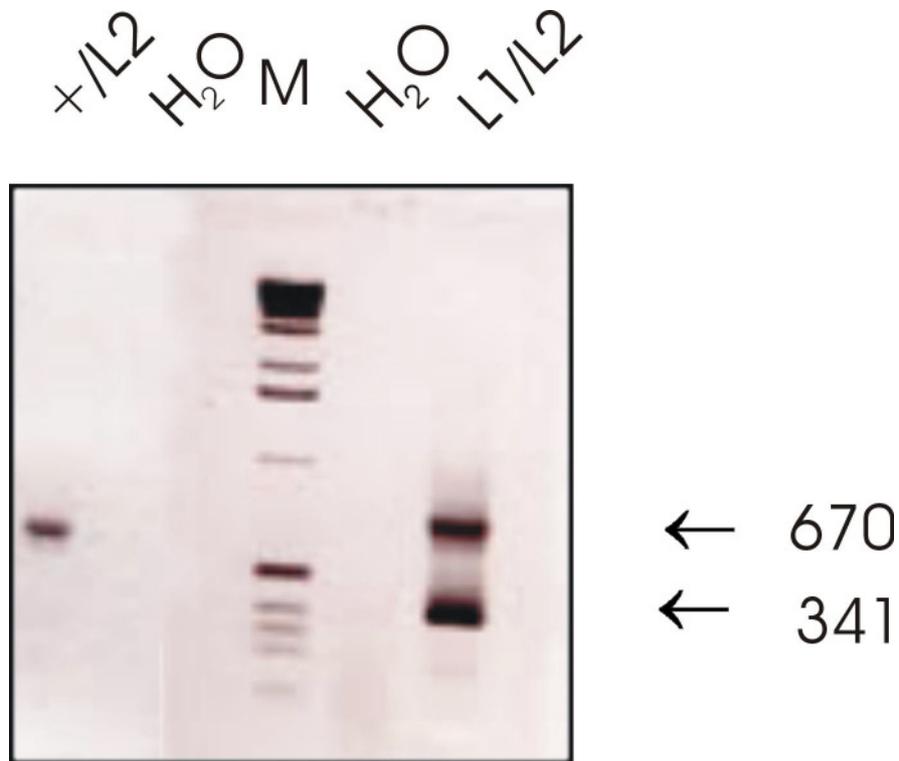
4.1.1 Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

Nach der Inselisolierung aus dem Pankreas wurde zunächst mittels Dynabead-Kit eine cDNS erstellt. Anschließend wurden Primer für die α_{1C} , β_2 , β_3 , $\alpha_2\delta-1$, $\alpha_2\delta-2$ und $\alpha_2\delta-3$ Untereinheit anhand der bekannten Nukleotidsequenz ausgewählt.

Die PCR mit den α_{1C} -Primern bestätigte durch das Auftreten der L1 und L2 Bande bei den $Ca_v1.2^{Pan-/-}$ Mäusen die erfolgreiche Knock-out Strategie, während bei den $Ca_v1.2^{Pan+/-}$ Kontrolltieren nur die L2 Bande sichtbar war (siehe Abbildung 6). Das Ergebnis ließ sich mit mehreren Mäusen reproduzieren.

Abbildung 6 zeigt exemplarisch eine PCR mit α_{1C} -Primern.

Abb. 6: PCR mit α_{1C} -Primern

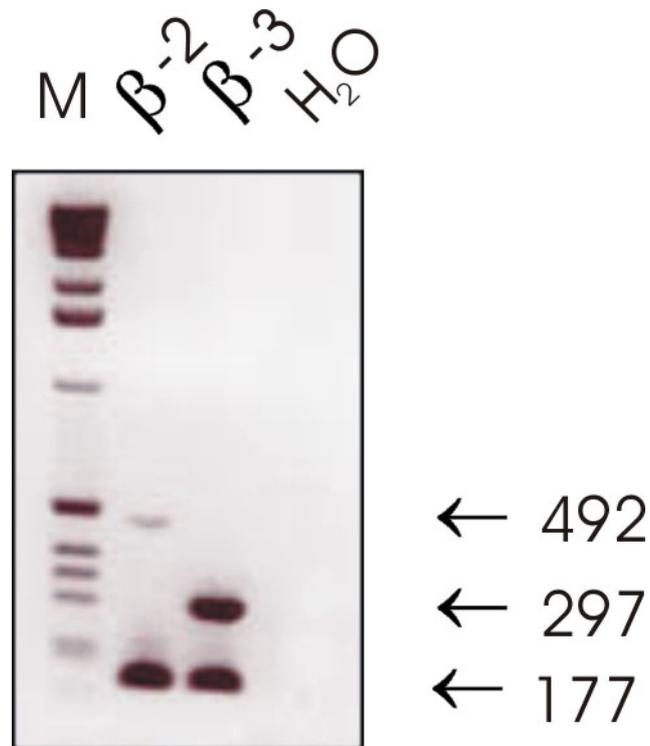


Die Bande bei 670 bp entspricht dem Amplifikat des L2-Gens, während die Bande bei 341 bp dem L1-Gen entspricht. M = Marker im Reaktionsansatz

Die Analyse mit β_2 und β_3 Primern ergab, dass in $Ca_v1.2^{Pan-/-}$ Mäusen hauptsächlich die β_3 -Untereinheit exprimiert ist, während die β_2 -Untereinheit nur geringgradig exprimiert war. Dies konnte anhand mehrerer Mäuse und durch Vergleich mit einem internen Standard, der HPRT, bestätigt werden (siehe Abbildung 7).

Abbildung 7 zeigt exemplarisch eine PCR mit β_2 und β_3 Primern, die zusammen mit HPRT durchgeführt wurde.

Abb. 7: PCR mit β_2 und β_3 Primern



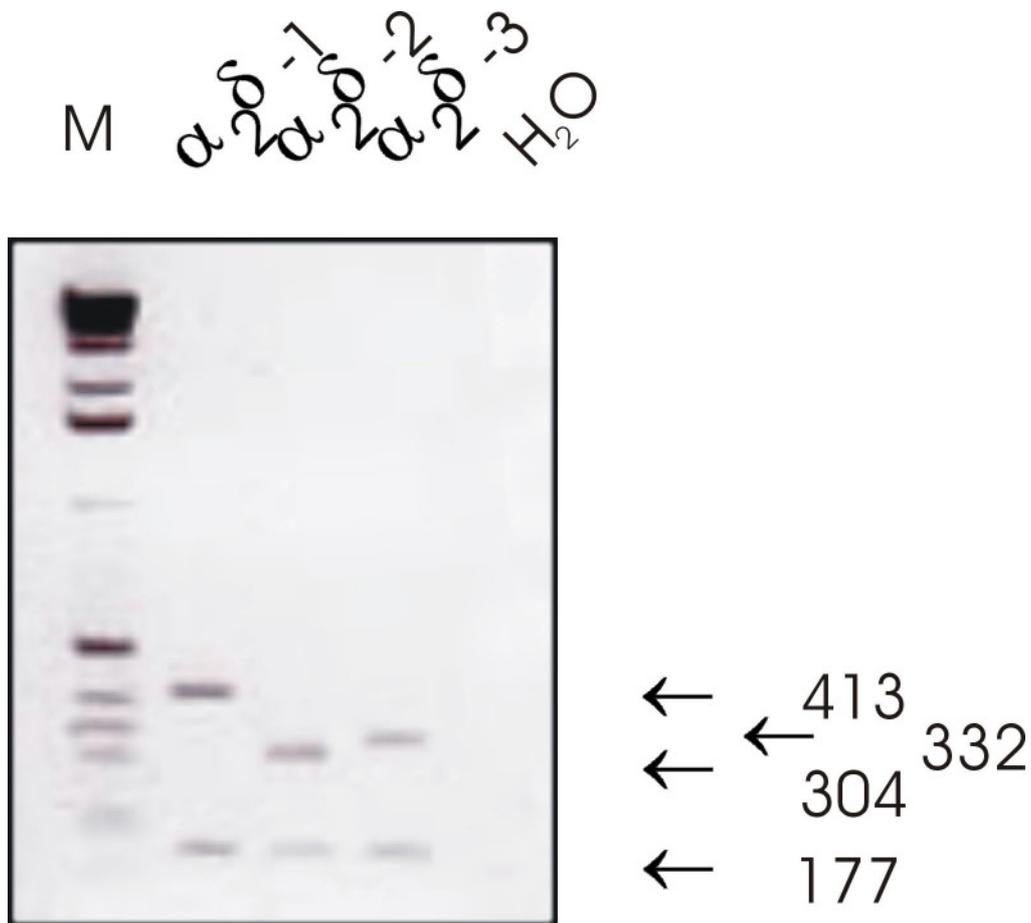
Die Bande bei 177 bp stellt das Amplifikat der HPRT dar, die Bande bei 297 bp entspricht dem β_3 -Gen und die Bande bei 492 bp dem β_2 -Gen. M= Marker im Reaktionsansatz

Die Untersuchung mit den $\alpha_2\delta$ -Primern ergab folgendes Bild:

Im Pankreas sind alle untersuchten $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten vertreten. Die $\alpha_2\delta$ -1 Untereinheit scheint die am stärksten exprimierte Untereinheit zu sein. Die anderen Untereinheiten waren ungefähr gleich stark exprimiert. Der Vergleich mit dem internen Standard HPRT konnte das Ergebnis wiederum bestätigen (siehe Abbildung 8).

Abbildung 8 zeigt exemplarisch eine PCR mit allen $\alpha_2\delta$ -Primern und HPRT.

Abb. 8: PCR mit $\alpha_2\delta$ -Primern



Die Bande bei 177 bp entspricht der HPRT. Die Bande bei 304 bp stellt das $\alpha_2\delta$ -2-Gen, die Bande bei 332 bp das $\alpha_2\delta$ -3-Gen und die Bande bei 413 bp das $\alpha_2\delta$ -1-Gen dar. M = Marker im Reaktionsansatz.

4.1.2 Sequenzanalyse

Um die PCR-Ergebnisse zu überprüfen, wurden die erhaltenen Banden aus dem Gel ausgeschnitten und mittels Kapillarelektrophorese sequenziert.

Die Sequenzierung der β_2 -Bande entsprach den bp 1530 bis 1987 der bekannten Maus DNS-Sequenz aus der Datenbank und konnte somit als β_2 -Untereinheit verifiziert werden.

Die β_3 -Bande wurde von bp 1208 bis 1475 sequenziert und konnte ebenfalls als β_3 -Untereinheit bestätigt werden.

Die $\alpha_2\delta$ -1-Bande wurde von bp 2569 bis 2934 sequenziert und ergab die richtige Gensequenz laut Datenbank.

Die $\alpha_2\delta$ -2-Bande wurde von bp 2962 bis 3237 sequenziert und entsprach ebenfalls der bekannten DNS-Sequenz.

Die $\alpha_2\delta$ -3-Bande wurde von bp 2525 bis 2834 sequenziert und bestätigte ebenfalls die richtige Gensequenz.

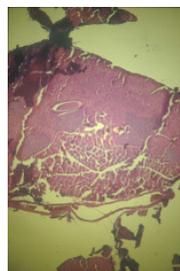
Somit hatten alle ausgewählten Primer die richtigen DNS-Abschnitte amplifiziert.

4.2 Immunhistochemie

4.2.1 Hämatoxylin-Eosin Färbung

Mit der Hämatoxylin-Eosin Färbung sollte die Morphologie des Pankreas untersucht werden. Besonderes Interesse lag hierbei auf einer eventuellen Änderung der Inselzahl und einer veränderten Inselgröße. Es zeigte sich hierbei jedoch kein Unterschied zwischen $Ca_v1.2^{Pan-/-}$ Mäusen und $Ca_v1.2^{Pan+/-}$ Mäusen hinsichtlich Inselanzahl und Inselgröße (siehe Abbildung 9).

Abb. 9: HE-Färbung von Pankreasschnitten



a) $Ca_v1.2^{Pan-/-}$ (KO)



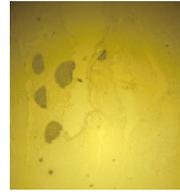
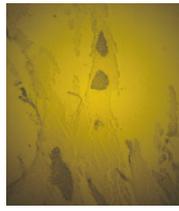
b) $Ca_v1.2^{Pan+/-}$ (WT)

Gewebeschnitte: 10 μ m

4.2.2 Insulin-Antikörper

Durch Auftragen eines Insulin-Antikörpers wurden die Pankreasschnitte auf den Insulingehalt untersucht. Hierbei zeigte sich, dass sowohl die $Ca_v1.2^{Pan-/-}$ Mäuse, als auch die $Ca_v1.2^{Pan+/-}$ Mäuse insulinhaltige Vesikel besitzen. Es konnte hierbei kein Unterschied hinsichtlich Dichte oder Menge an Insulin zwischen den beiden Mausgruppen festgestellt werden (siehe Abbildung 10).

Abb. 10: Immunhistochemie mit Insulinantikörper



a) $Ca_v1.2^{Pan-/-}$ (KO) b) $Ca_v1.2^{Pan+/-}$ (WT)

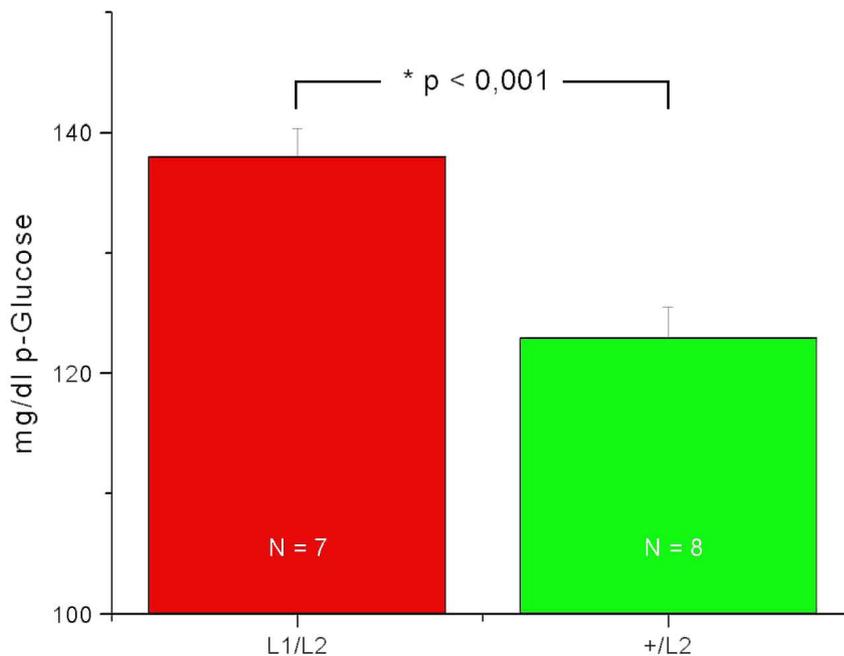
Insulinantikörperverdünnung: 1:100, Gewebeschnitte: 10 μ m

4.3 Physiologie

4.3.1 Glucosespiegel

Die $Ca_v1.2^{Pan-/-}$ Mäuse (N = 7) wiesen im Mittel einen Glucosespiegel von 138 mg/dl \pm 2,4 auf, während die $Ca_v1.2^{Pan+/-}$ Mäuse (N = 8) 123 mg/dl \pm 2,5 aufwiesen (siehe Abbildung 11).

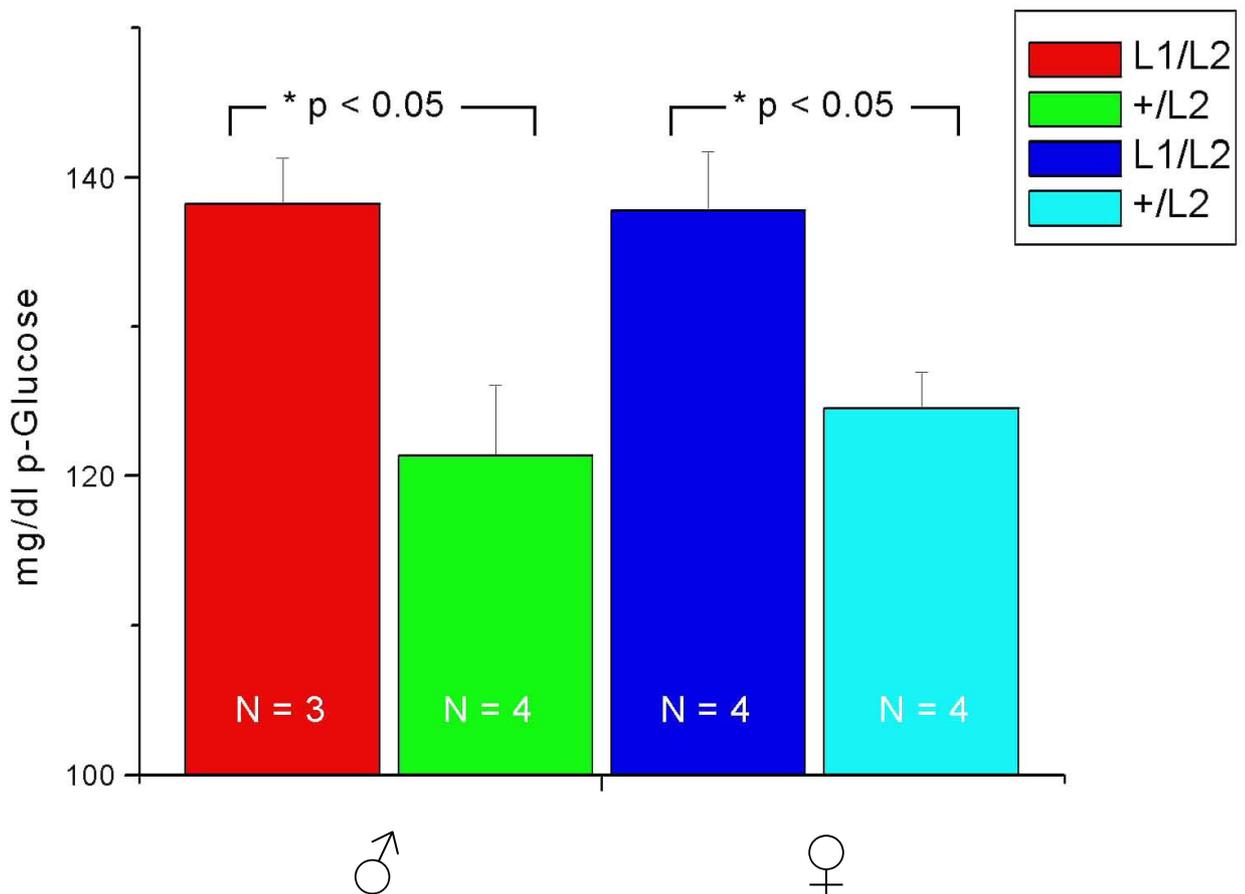
Abb. 11: basaler Glucosespiegel



Basaler Glucosespiegel nach einer Nahrungskarenz von 4 Stunden und anschließender Blutabnahme. Signifikanter Unterschied zwischen Knock-out $Ca_v1.2^{Pan-/-}$ (rot) und Wildtyp $Ca_v1.2^{Pan+/-}$ (grün) Mäusen.

Aufgeschlüsselt nach Geschlecht ergibt sich für $Ca_v1.2^{Pan-/-}$ Männchen (N = 3) ein Glucosespiegel von $138 \text{ mg/dl} \pm 3$ und für die $Ca_v1.2^{Pan+/-}$ Männchen (N = 4) ein Spiegel von $121 \text{ mg/dl} \pm 4,7$. Bei den $Ca_v1.2^{Pan-/-}$ Weibchen (N = 4) ergab sich ebenfalls ein Glucosespiegel von $138 \text{ mg/dl} \pm 3,9$ und bei den $Ca_v1.2^{Pan+/-}$ Weibchen (N = 4) $125 \text{ mg/dl} \pm 2,4$. Alle Werte ergeben einen signifikanten Unterschied zwischen $Ca_v1.2^{Pan-/-}$ und $Ca_v1.2^{Pan+/-}$ (siehe Abbildung 12).

Abb. 12: geschlechtsspezifischer basaler Glucosespiegel



Geschlechtsspezifische Auswertung der basalen Glucosespiegel nach einer Nahrungskarenz von 4 Stunden und anschließender Blutabnahme. Knock-out $Ca_v1.2^{Pan-/-}$ Mäuse (rot = Männchen, blau = Weibchen) weisen signifikant höhere Glucosewerte auf als Wildtyp $Ca_v1.2^{Pan+/-}$ Mäuse (grün = Männchen, hellblau = Weibchen)

Die Differenzierung nach Alter ergab für $Ca_v1.2^{Pan-/-}$ (< 3 Monate) einen Glucosespiegel von $141 \text{ mg/dl} \pm 1,4$ (N = 2), während $Ca_v1.2^{Pan+/-}$ (N = 3) einen Glucosespiegel von $121 \text{ mg/dl} \pm 6,5$ aufwies. Die statistische Auswertung konnte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Jungtieren feststellen. Bei alten $Ca_v1.2^{Pan-/-}$ Tieren (> 3 Monate) (N = 5) ergab sich ein signifikanter Unterschied im Glucosespiegel von $137 \text{ mg/dl} \pm 3,2$ im Vergleich zu $124 \text{ mg/dl} \pm 1,9$ bei alten $Ca_v1.2^{Pan+/-}$ Tieren (N = 5).

4.3.2 HbA_{1C}

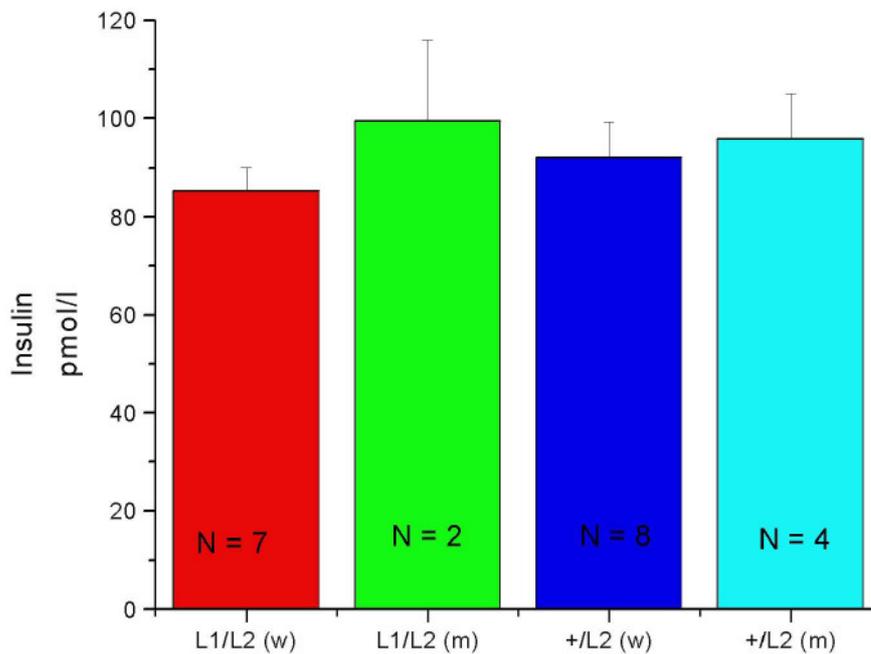
Die HbA_{1C}-Messungen zeigten bei $Ca_v1.2^{Pan-/-}$ Mäusen (N = 8) etwas häufiger einen Wert über 3,0 %, jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen $Ca_v1.2^{Pan-/-}$ und $Ca_v1.2^{Pan+/-}$ (N = 7). Die meisten Mäuse wiesen einen HbA_{1C} von unter 3,0 % auf (Daten nicht gezeigt).

4.3.3 Insulinspiegel

Bei den $Ca_v1.2^{Pan-/-}$ Mäusen (N = 9) konnte ein basaler Insulinspiegel von $88,5 \text{ pmol/l} \pm 5$ gemessen werden. Die $Ca_v1.2^{Pan+/-}$ Mäuse (N = 12) hatten einen basalen Insulinspiegel von $93,5 \pm 5,4$. Im Gegensatz zu den Glucosewerten waren die basalen Insulinspiegel nicht signifikant unterschiedlich (Daten nicht gezeigt).

Die geschlechtsspezifischen Auswertung ergab ebenfalls keine signifikanten Unterschiede. Die $Ca_v1.2^{Pan-/-}$ Weibchen (N = 7) wiesen einen basalen Insulinspiegel von $85,3 \text{ pmol/l} \pm 4,7$ auf. Die $Ca_v1.2^{Pan+/-}$ Weibchen (N = 8) hatten einen basalen Insulinspiegel von $92,2 \text{ pmol/l} \pm 7$. Die $Ca_v1.2^{Pan-/-}$ Männchen (N = 2) wiesen einen basalen Insulinspiegel von $99,5 \text{ pmol/l} \pm 16,5$ auf, während die $Ca_v1.2^{Pan+/-}$ Männchen (N = 4) einen basalen Insulinspiegel von $95,9 \text{ pmol/l} \pm 9$ hatten (siehe Abbildung 13).

Abb. 13: basaler Insulinspiegel nach Geschlecht



Geschlechtsspezifische Auswertung des basalen Insulinspiegels nach 4 Stunden Nahrungskarenz und anschließender Blutabnahme. Knock-out $Ca_v1.2^{Pan-/-}$ Tiere (rot = Weibchen, grün = Männchen) weisen keine signifikanten Unterschiede gegenüber den Wildtyp $Ca_v1.2^{Pan+/-}$ Tieren (blau = Weibchen, hellblau = Männchen) auf.

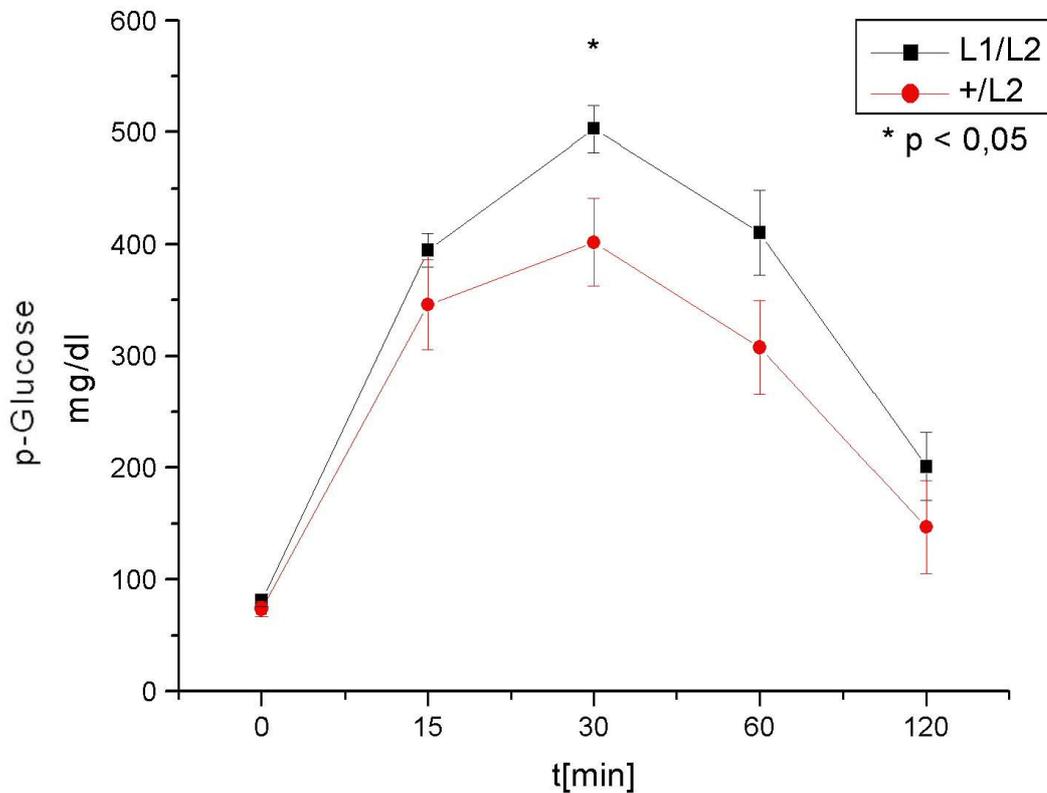
4.3.4 Toleranz-Tests

4.3.4.1 Glucose-Toleranz-Tests

$Ca_v1.2^{Pan-/-}$ Mäuse (N = 11) hatten vor der Applikation einen Glucosespiegel von $81,1 \text{ mg/dl} \pm 5,6$, während die $Ca_v1.2^{Pan+/-}$ Mäuse einen Glucosespiegel von $73,8 \text{ mg/dl} \pm 6,6$ aufwiesen. Nach der Applikation von 2g/kg Körpergewicht Glucose stieg der Glucosespiegel bei $Ca_v1.2^{Pan-/-}$ Mäusen über $394,7 \text{ mg/dl} \pm 14,9$ bei 15 Minuten auf ein Maximum von $503 \text{ mg/dl} \pm 21$ nach 30 Minuten. Danach fiel der Glucosespiegel über $410,4 \text{ mg/dl} \pm 38,2$ bei 60 Minuten auf $200,9 \text{ mg/dl} \pm 30,5$ nach 120 Minuten. Bei den $Ca_v1.2^{Pan+/-}$ Mäusen erfolgte ein Anstieg über $346 \text{ mg/dl} \pm 40,4$ bei 15 Minuten auf ein Maximum von $401,8 \text{ mg/dl} \pm 39,1$ nach 30 Minuten. Dieses Maximum war signifikant kleiner als das der $Ca_v1.2^{Pan-/-}$ Mäuse.

Danach fiel der Glucosespiegel über 307,7 mg/dl bei 60 Minuten auf 146,8 mg/dl nach 120 Minuten (siehe Abbildung 14).

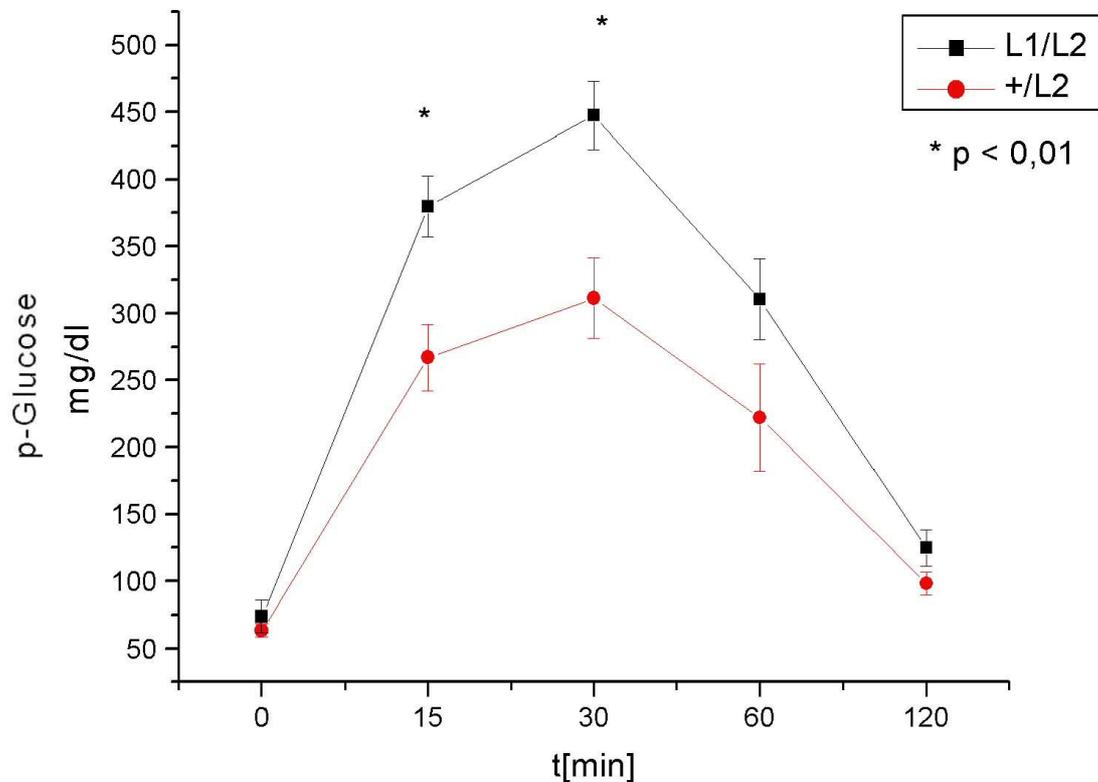
Abb. 14: i.p. Glucosetoleranztest



Die Mäuse wurden über Nacht nüchtern gesetzt; am nächsten Morgen erfolgte die intraperitoneale Applikation von 2g/kg Körpergewicht Glucose. Signifikanter Unterschied zwischen Knock-out $Ca_v1.2^{Pan-/-}$ (schwarz) und Wildtyp $Ca_v1.2^{Pan+/-}$ (rot) Mäusen.

Die altersspezifische Auswertung ergab für junge $Ca_v1.2^{Pan-/-}$ Mäuse (Alter ca. 16 Wochen; N = 6) einen Ausgangswert von 73,8 mg/dl \pm 12, während junge $Ca_v1.2^{Pan+/-}$ Mäuse (N = 7) einen Ausgangswert von 63,6 mg/dl \pm 5 aufwiesen. Der Anstieg erfolgte bei den jungen $Ca_v1.2^{Pan-/-}$ Mäusen nach Glucosegabe über 379,8 mg/dl \pm 22,7 bei 15 Minuten auf ein Maximum von 447,5 mg/dl \pm 25,5 nach 30 Minuten. Danach gingen die Werte auf 310,5 mg/dl \pm 30,2 bei 60 Minuten auf 124,7 mg/dl \pm 13,5 nach 120 Minuten zurück. Bei den jungen $Ca_v1.2^{Pan+/-}$ Mäusen gab es einen signifikant geringeren Anstieg sowohl beim 15 Minuten Wert mit 267 mg/dl \pm 24,8, als auch beim 30 Minuten Wert mit 311,3 mg/dl \pm 30. Die letzten beiden Werte waren mit 222 mg/dl \pm 40,2 und 98,1 mg/dl \pm 8,2 nicht mehr signifikant (siehe Abbildung 15).

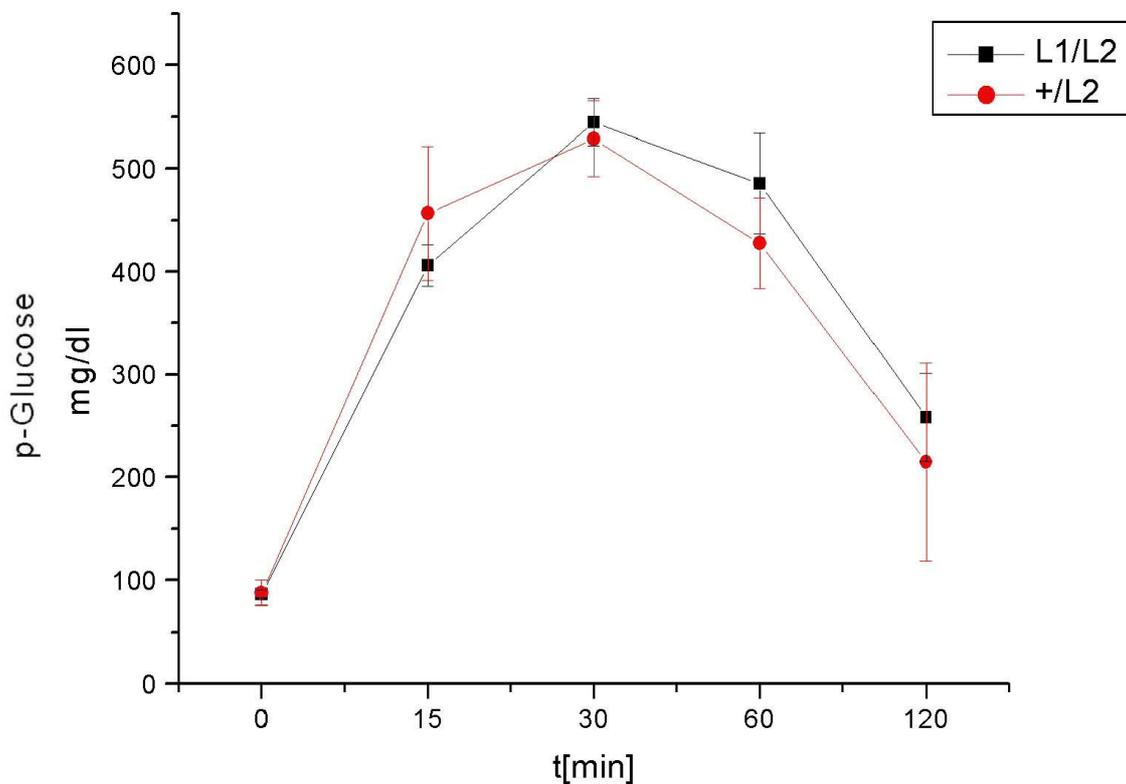
Abb. 15: i.p. Glucosetoleranztest Jungtiere



Die Mäuse (Alter ca. 16 Wochen) wurden über Nacht nüchtern gesetzt und am nächsten Morgen erfolgte die intraperitoneale Applikation von 2 g/kg Körpergewicht Glucose. Schon nach 15 Minuten signifikanter Unterschied zwischen Knock-out $Ca_v1.2^{Pan-/-}$ (schwarz) und Wildtyp $Ca_v1.2^{Pan+/-}$ (rot) Mäusen.

Ein anderes Bild zeigte sich bei den alten $Ca_v1.2^{Pan-/-}$ Mäusen (Alter ca. 36 Wochen; N = 8). Diese hatten einen Ausgangswert von $86,5 \text{ mg/dl} \pm 3,6$, während die $Ca_v1.2^{Pan+/-}$ Mäuse (N = 5) einen Ausgangswert von $88 \text{ mg/dl} \pm 12,2$ hatten. Der Anstieg erfolgte bei den $Ca_v1.2^{Pan-/-}$ Mäusen über $405,9 \text{ mg/dl} \pm 20,2$ nach 15 Minuten auf ein Maximum von $544,6 \text{ mg/dl} \pm 22,4$ bei 30 Minuten. Danach erfolgte der Abfall über $485,4 \text{ mg/dl} \pm 48,8$ bei 60 Minuten auf $258,1 \text{ mg/dl} \pm 42,9$ nach 120 Minuten. Bei den $Ca_v1.2^{Pan+/-}$ Mäusen erfolgte der Anstieg über $456,6 \text{ mg/dl} \pm 65$ bei 15 Minuten auf $528,4 \text{ mg/dl} \pm 36,6$ nach 30 Minuten. Danach erfolgte der Abfall über $427,6 \text{ mg/dl} \pm 44$ bei 60 Minuten auf $215 \text{ mg/dl} \pm 96,4$ nach 120 Minuten (siehe Abbildung 16).

Abb. 16: i.p. Glucosetoleranztest bei alten Mäusen



Die Mäuse (Alter ca.36 Wochen) wurden über Nacht nüchtern gesetzt und am nächsten Morgen erfolgte die intraperitoneale Applikation von 2 g/kg Körpergewicht Glucose. Keine signifikanten Unterschiede zwischen Knock-out $Ca_v1.2^{Pan-/-}$ (schwarz) und Wildtyp $Ca_v1.2^{Pan+/-}$ (rot) Mäusen.

Die geschlechtsspezifische Auswertung ergab analoge Ergebnisse:

Die jungen weiblichen $Ca_v1.2^{Pan-/-}$ Mäuse (Alter ca. 18 Wochen; N = 4) hatten einen Ausgangswert von $56,8 \text{ mg/dl} \pm 6,5$, während die jungen weiblichen $Ca_v1.2^{Pan+/-}$ Mäuse (N = 4) einen Ausgangswert von $55,3 \text{ mg/dl} \pm 4,6$ hatten. Der Anstieg erfolgte bei den $Ca_v1.2^{Pan-/-}$ Mäusen über $387 \text{ mg/dl} \pm 21,3$ auf ein Maximum von $451,8 \pm 29,3$ nach 30 Minuten. Dieses Maximum war signifikant größer als das der $Ca_v1.2^{Pan+/-}$ Mäuse. Danach erfolgte der Abfall über $327,3 \text{ mg/dl} \pm 41,4$ auf $134 \text{ mg/dl} \pm 19,3$ nach 120 Minuten. Die $Ca_v1.2^{Pan+/-}$ Mäuse wiesen einen Anstieg über $288,3 \text{ mg/dl} \pm 36,9$ auf ein Maximum von $316,5 \text{ mg/dl} \pm 44,3$ nach 30 Minuten auf. Danach erfolgte der Abfall über $205,5 \text{ mg/dl} \pm 31,2$ auf $88,75 \text{ mg/dl} \pm 9$ nach 120 Minuten.

Die alten weiblichen $Ca_v1.2^{Pan-/-}$ Mäuse (Alter ca. 35 Wochen; N = 3) hatten einen Ausgangswert von $84,3 \text{ mg/dl} \pm 3,3$, während die alten weiblichen $Ca_v1.2^{Pan+/-}$ Mäuse (N = 3)

einen Ausgangswert von $83,8 \pm 14,7$ hatten. Die Werte stiegen bei den $Ca_v1.2^{Pan-/-}$ Mäusen über $403,9 \text{ mg/dl} \pm 23,2$ auf ein Maximum von $548,1 \text{ mg/dl} \pm 25,5$. Danach fielen sie über $504,4 \text{ mg/dl} \pm 51,9$ auf $273,3 \text{ mg/dl} \pm 46,3$. Der Anstieg der $Ca_v1.2^{Pan+/-}$ Mäuse erfolgte über $469,8 \text{ mg/dl} \pm 82,2$ auf $543,8 \text{ mg/dl} \pm 42,9$. Danach fielen sie über $443,8 \text{ mg/dl} \pm 52,8$ auf $235,8 \text{ mg/dl} \pm 121,5$.

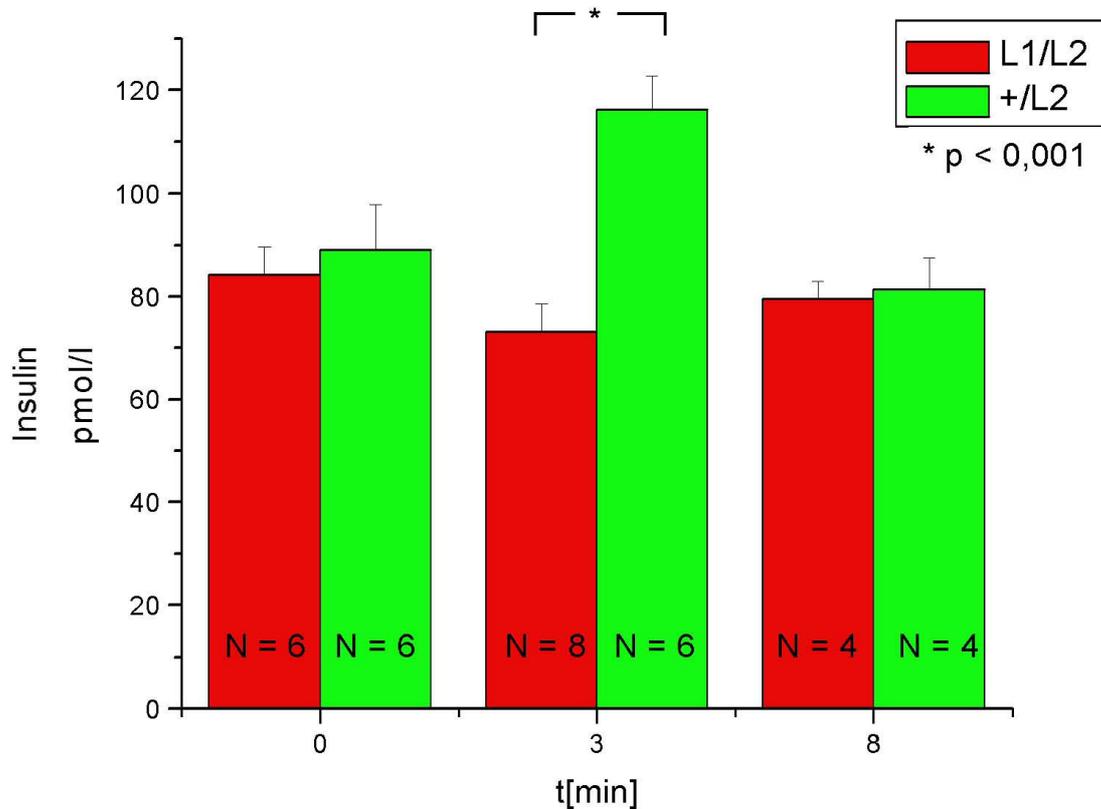
Bei den Männchen ergab sich für die $Ca_v1.2^{Pan-/-}$ Mäuse ($N = 3$) ein Ausgangswert von $106 \text{ mg/dl} \pm 7,8$, während die $Ca_v1.2^{Pan+/-}$ Mäuse ($N = 4$) einen Ausgangswert von $82,3 \text{ mg/dl} \pm 8,3$ hatten. Bei den $Ca_v1.2^{Pan-/-}$ Mäusen erfolgte der Anstieg über $383,7 \text{ mg/dl} \pm 43,5$ auf $466 \text{ mg/dl} \pm 47,2$. Danach fiel der Glucosespiegel über $302 \text{ mg/dl} \pm 34,4$ auf $121,3 \text{ mg/dl} \pm 15,3$. Bei den $Ca_v1.2^{Pan+/-}$ Mäusen gab es einen Anstieg über $280 \text{ mg/dl} \pm 46,4$ auf $345 \text{ mg/dl} \pm 53,2$. Anschließend fiel der Glucosespiegel wieder über $273,8 \text{ mg/dl} \pm 73,1$ auf $116 \text{ mg/dl} \pm 10,8$ (Daten nicht gezeigt).

4.3.4.2 Insulinspiegel nach Glucosebelastung

Aufgrund der Ergebnisse der vorherigen Glucose Versuche wurden diese Versuche nur mit Weibchen durchgeführt, da bislang keine geschlechtsspezifischen Unterschiede aufgetreten waren.

Hierbei zeigte sich, dass $Ca_v1.2^{Pan-/-}$ Mäuse ($N = 6$) vor der Glucosezufuhr einen Insulinspiegel von $84,2 \text{ pmol/l} \pm 5,5$ hatten, während die $Ca_v1.2^{Pan+/-}$ Mäuse ($N = 6$) einen Insulinspiegel von $89,1 \text{ pmol/l} \pm 8,8$ hatten. 3 Minuten nach Glucoseapplikation hatten die $Ca_v1.2^{Pan-/-}$ Mäuse ($N = 8$) mit $73,1 \text{ pmol/l} \pm 5,5$ einen signifikant niedrigeren Insulinspiegel als die $Ca_v1.2^{Pan+/-}$ Mäuse ($N = 6$) mit $116,2 \text{ pmol/l} \pm 6,5$. 8 Minuten nach Glucoseapplikation wiesen die $Ca_v1.2^{Pan-/-}$ Mäuse ($N = 4$) einen Insulinspiegel von $79,5 \text{ pmol/l} \pm 3,4$ und die $Ca_v1.2^{Pan+/-}$ Mäuse ($N = 4$) einen von $81,4 \text{ pmol/l} \pm 6$ auf (siehe Abbildung 17).

Abb. 17: Insulinspiegel nach Glucosebelastung



Erste Phase der Insulinsekretion nach Glucosebelastung. Die Mäuse wurden über Nacht nüchtern gesetzt und am nächsten Morgen erfolgte die intraperitoneale Applikation von 2 g/kg Glucose. Signifikanter Unterschied zwischen Knock-out $Ca_v1.2^{Pan-/-}$ (rot) und Wildtyp $Ca_v1.2^{Pan+/-}$ (grün) Mäusen bei der Reaktion auf diese Glucosebelastung.

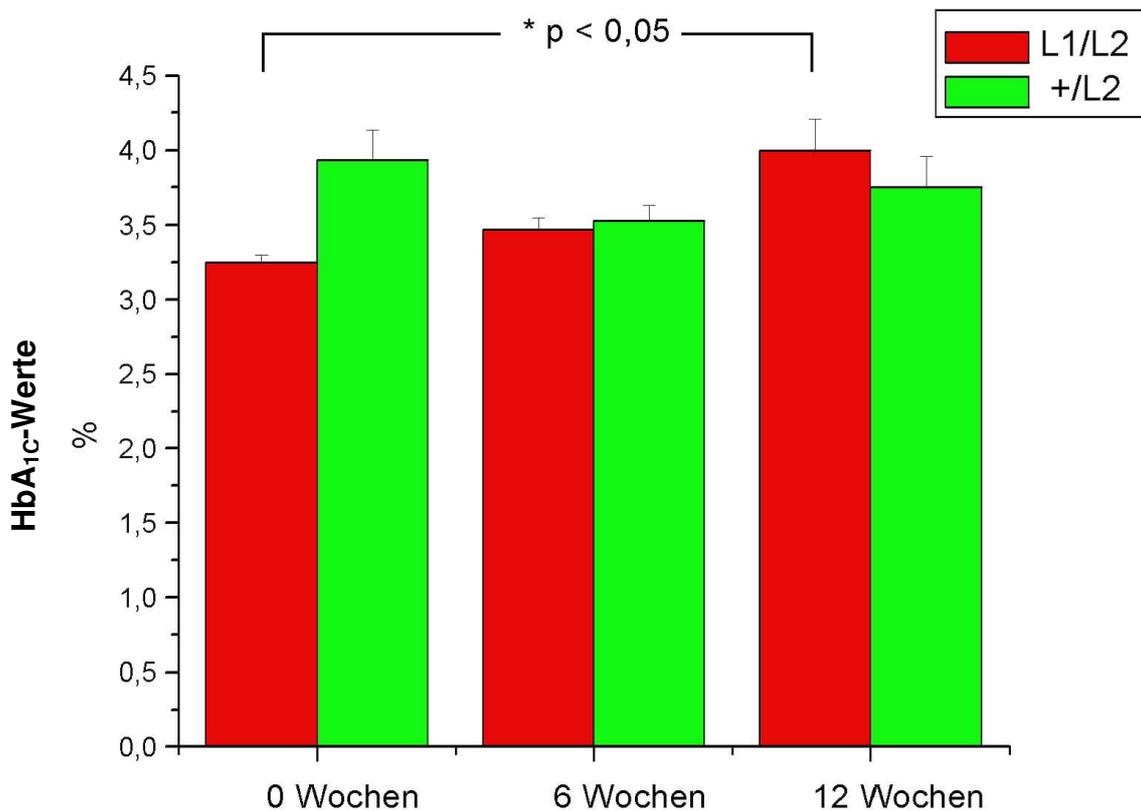
4.3.5 Fettdiät

Da die Glucose Versuche einen altersabhängigen Befund zeigten, wurden für diesen Versuch nur Mäuse verwendet, die älter als 12 Monate waren. Bei diesen Mäusen wurde versucht durch eine fettreiche Nahrung Veränderungen im Glucosestoffwechsel zu provozieren. Vor Beginn der Diät wurden der HbA_{1C} , der Glucosespiegel und das Ausgangsgewicht bestimmt.

Die $Ca_v1.2^{Pan-/-}$ Mäuse (N = 12) unter Fettdiät hatten dabei ein Ausgangsgewicht von $41,2 \text{ g} \pm 1,3$, einen Glucosespiegel von $116,6 \text{ mg/dl}$, und einen HbA_{1C} von $3,3 \% \pm 0,05$. Nach 4 Wochen wiesen die $Ca_v1.2^{Pan-/-}$ Mäuse unter Fettdiät ein Gewicht von $45,9 \text{ g} \pm 2,6$ und einen Glucosespiegel von $108,2 \text{ mg/dl} \pm 6,4$ auf. Wiederum 4 Wochen später hatte sich das Gewicht

bei $46,4 \text{ g} \pm 2,6$ und der Glucosespiegel bei $107,5 \text{ mg/dl} \pm 4,5$ eingependelt. Die Gewichtszunahme innerhalb von 8 Wochen war statistisch signifikant. Der $\text{HbA}_{1\text{C}}$ wurde nach 6 Wochen mit $3,5 \% \pm 0,08$ gemessen. Eine erneute Glucosemessung 3 Monate nach Versuchsbeginn ergab einen Wert von $103,4 \text{ mg/dl} \pm 8,6$. Eine ebenfalls durchgeführte $\text{HbA}_{1\text{C}}$ -Messung ergab einen Wert von $4 \% \pm 0,2$, was einen signifikanten Unterschied zum Ausgangswert darstellte (siehe Abbildung 18).

Abb. 18: $\text{HbA}_{1\text{C}}$ -Werte unter Fettdiät



Die Messung erfolgte immer zum gleichen Zeitpunkt am frühen Nachmittag. Signifikanter Anstieg des $\text{HbA}_{1\text{C}}$ -Wertes bei den $\text{Ca}_v1.2^{\text{Pan-/-}}$ Mäusen (rot).

Die $\text{Ca}_v1.2^{\text{Pan+/-}}$ Mäuse (N = 12) unter Fettdiät hatten ein Ausgangsgewicht von $38,2 \text{ g} \pm 1,9$, einen Glucosespiegel von $105,6 \text{ mg/dl}$, und einen $\text{HbA}_{1\text{C}}$ von $3,9 \% \pm 0,2$. 4 Wochen später hatte das Gewicht auf $41,5 \text{ g} \pm 2,3$ zugenommen, während der Glucosespiegel auf $94,8 \text{ mg/dl} \pm 2,9$ gesunken war. Noch mal 4 Wochen später hatte sich das Gewicht bei $40,1 \text{ g} \pm 2,4$ und der Glucosespiegel bei $93,5 \text{ mg/dl} \pm 6,4$ eingependelt. Der $\text{HbA}_{1\text{C}}$ -Wert war nach 6 Wochen auf $3,5 \% \pm 0,1$ gesunken. Eine Messung des Glucosespiegels weitere 4 Wochen später ergab

einen Wert von $95,9 \text{ mg/dl} \pm 9,4$. Eine gleichzeitig durchgeführte $\text{HbA}_{1\text{C}}$ -Messung ergab einen Wert von $3,8 \% \pm 0,2$.

Die $\text{Ca}_v1.2^{\text{Pan-/-}}$ Mäuse ($N = 12$) unter Normalkost hatten ein Ausgangsgewicht von $41 \text{ g} \pm 2,4$ und einen Glucosespiegel von $113,8 \text{ mg/dl}$. 4 Wochen später wogen die $\text{Ca}_v1.2^{\text{Pan-/-}}$ Mäuse unter Normalkost $41,8 \text{ g} \pm 2,6$ und wiesen einen Glucosespiegel von $102,4 \text{ mg/dl} \pm 4,9$ auf. Noch mal 4 Wochen später wogen sie $41,4 \text{ g} \pm 2,9$ und hatten einen Glucosespiegel von $100,4 \text{ mg/dl} \pm 6,7$. Eine nach 6 Wochen erhobene $\text{HbA}_{1\text{C}}$ -Messung erbrachte einen Wert von $3,5 \% \pm 0,03$. Eine weitere Messung nach 4 Wochen ergab einen Glucosespiegel von $97,8 \text{ mg/dl} \pm 3,7$. Eine ebenfalls durchgeführte $\text{HbA}_{1\text{C}}$ -Messung wies einen Wert von $3,4 \% \pm 0,02$ auf.

Die $\text{Ca}_v1.2^{\text{Pan+/-}}$ Mäuse ($N = 6$) unter Normalkost hatten ein Ausgangsgewicht von $39,1 \text{ g} \pm 3,7$ und einen Glucosespiegel von $103,5 \text{ mg/dl}$. Nach 4 Wochen wogen die $\text{Ca}_v1.2^{\text{Pan+/-}}$ Mäuse unter Normalkost $40,8 \text{ g} \pm 3,8$ und hatten einen Glucosespiegel von $93,2 \text{ mg/dl} \pm 10,9$.

Wiederum 4 Wochen später war das Gewicht mit $40,2 \text{ g} \pm 3,1$ nahezu unverändert, während der Glucosespiegel $106,2 \text{ mg/dl} \pm 6,6$ aufwies. Eine $\text{HbA}_{1\text{C}}$ -Messung nach 6 Wochen ergab einen Wert von $3,5 \% \pm 0,2$. Eine Messung des Glucosespiegels 3 Monate nach Versuchsbeginn ergab einen Wert von $99,8 \text{ mg/dl} \pm 7,7$. Eine ebenfalls durchgeführte $\text{HbA}_{1\text{C}}$ -Messung zeigte mit $3,5 \% \pm 0,1$ einen identischen Wert wie 4 Wochen zuvor.

Aufgrund einer recht hohen Streuung konnte kein signifikanter Unterschied in der Gewichtsentwicklung – trotz deutlicher Gewichtszunahme unter Fettdiät – und beim Glucosespiegel zwischen Fettdiät und Normalkost festgestellt werden. Lediglich der Langzeitparameter $\text{HbA}_{1\text{C}}$ wies einen signifikanten Unterschied zwischen Fettdiät und Normalkost aus.

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen des fehlenden L-Typ Kalziumkanal Gens $Ca_v1.2$ v.a. in vivo im Pankreas untersucht. Der Einsatz von verschiedenen Techniken machte es dabei möglich, die Folgen eines einzelnen Zelldefektes auf das komplexe System der Insulinsekretion und Glucosehomöostase zu untersuchen. Das hierbei verwendete Mausmodell basiert auf dem Vergleich von Kontrolltieren ($Ca_v1.2^{Pan+/-} / RIP-Cre^{+/tg}$ ausschließlich in β -Zellen) mit einer Knock-out Gruppe ($Ca_v1.2^{Pan-/-} / RIP-Cre^{+/tg}$ ebenfalls ausschließlich in β -Zellen). Daraus lässt sich ableiten, dass die Tiere vollständig identisch sind bis auf ein funktionierendes $Ca_v1.2$ Allel in der Kontrollgruppe. Es werden also Tiere mit 2 Knock-out Allelen mit solchen mit 1 Wildtyp Allel verglichen. Dies erlaubt die Untersuchung der spezifischen Funktion von $Ca_v1.2$.

Hierbei konnte gezeigt werden, dass der konditionale Knock-out des $Ca_v1.2$ Gens durch den Einfluß des RIP selektiv im Pankreas erfolgte.

Die Untersuchung der L-Typ Ca-Stromdichte in Kardiomyozyten von Embryonen konnte keinen signifikanten Unterschied zwischen (+/+) und (+/-) Zellen zeigen (Seisenberger et al., 2000). Auch der glattmuskelspezifische Knock-out des $Ca_v1.2$ konnte keine signifikanten Unterschiede in der Stromdichte zwischen (+/+) und (+/-) zeigen (Moosmang et al., 2003). Dies lässt den Schluss zu, dass ein Gen-Dosis-Effekt, also die Messung von signifikanten Unterschieden aufgrund der Veränderung des Genoms, bei den erhobenen Daten keine Rolle spielt.

5.1 Zusammensetzung des $Ca_v1.2$ im Pankreas

Auf mRNA-Ebene wurde die Zusammensetzung des $Ca_v1.2$ im Pankreas untersucht. Hierbei interessierte vor allem, welche Untereinheiten hauptsächlich exprimiert werden. Bei den β -Untereinheiten zeigte sich, dass die β_3 -Untereinheit die Hauptrolle spielt (siehe Abb. 15). Dies steht in leichtem Widerspruch zu den an Ratten gezeigten Daten. In den dortigen Experimenten wurde die β_2 -Untereinheit als Hauptuntereinheit gefunden, während die β_3 -Untereinheit 60-200 fach geringere Werte aufwies (Iwashima et al., 2001). Diese Diskrepanz lässt sich eventuell durch die andere Spezies erklären. Erst recht, nachdem der Versuch mit den identischen Primern bei der Maus die Kanäle nachzuweisen, ohne Erfolg blieb. Die Wichtigkeit der β_3 -Untereinheit konnte auch anhand eines Knock-out Modells gezeigt

werden. Hierbei hatten die Knock-out Tiere eine effizientere Glucosehomöostase und eine gesteigerte Insulinsekretion nach Glucosestimulation aufgrund einer gesteigerten Oszillationsfrequenz in den β -Zellen (Berggren et al., 2004).

Zur Verteilung der $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten lagen bislang keine Daten vor. Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass alle 3 Formen im Pankreas vorkommen. Die größte Expression zeigte dabei $\alpha_2\delta$ -1, während $\alpha_2\delta$ -2 und $\alpha_2\delta$ -3 eher schwach exprimiert sind (siehe Abb. 8). Anhand dieser Daten können in Zukunft weitere Knock-out Modelle aufgestellt werden, um z.B. den genaueren Einfluß der Untereinheiten auf die Kanalkinetik zu untersuchen.

5.2 Einfluß des $Ca_v1.2$ auf den Blutzuckerspiegel

Die vorliegende Arbeit vermutet, dass der Ca^{2+} -Einstrom durch $Ca_v1.2$ essentiell für die Kontrolle des systemischen Blutzuckers ist, und darüber hinaus für die erste Phase der Insulinsekretion. Außerdem wird die Möglichkeit diskutiert, inwiefern Defekte im Sekretionsmechanismus und/oder Ca^{2+} -Einstrom zu einer gestörten Insulinsekretion, wie man sie beim Diabetes mellitus Typ 2 finden kann, beitragen können.

Die vorliegenden Daten verfestigen die zentrale Rolle des $Ca_v1.2$ L-Typ Kalziumkanals bei der Insulinsekretion zur Regulation des Blutzuckerspiegels. Die $Ca_v1.2^{Pan-/-}$ Mäuse hatten mit $138 \text{ mg/dl} \pm 2,4$ einen signifikant höheren Glucosespiegel als die $Ca_v1.2^{Pan+/-}$ Mäuse mit $123 \text{ mg/dl} \pm 2,5$ (siehe Abb. 6). Dies steht in Übereinstimmung mit den Daten von Schulla et al. (Schulla et al., 2003). Diese hatten gezeigt, dass $Ca_v1.2^{Pan-/-}$ Mäuse einen erhöhten Glucosespiegel haben. Andere Studien hatten gezeigt, dass in Maus Inselzellen $Ca_v1.3$ von Bedeutung sein könnte, da hier ebenfalls Glucoseverwertungsstörungen aufgefallen waren (Namkung et al., 2001; Yang et al., 1999). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass der komplette DHP-sensitive Ca^{2+} -Strom nach der Ausschaltung des $Ca_v1.2$ Genes verloren geht. Dies ist wiederum in Übereinstimmung mit früheren immunhistochemischen und elektrophysiologischen Daten, die schon vermuteten, dass $Ca_v1.2$ der einzige L-Typ Kalziumkanal ist, der in Maus β -Zellen exprimiert ist (Barg et al., 2001).

Dennoch steht außer Frage, dass zusätzlich zu den L-Typ Kalziumkanälen in β -Zellen R- und P/Q-Typ Kalziumkanäle existieren. Die Hemmung des L-Typ Ca^{2+} -Stroms reduziert jedoch die Glucose-induzierte Insulinsekretion in vitro um 80% und verhindert sie in vivo fast total. Und dies obwohl der L-Typ Strom nur ca. 50% des totalen Ca^{2+} -Stromes ausmacht. So

scheint es, dass der Ca^{2+} -Einstrom die biologische Effektivität des Ions festlegt und dass der Einstrom durch L-Typ Kalziumkanäle stärker mit der Insulinsekretion verbunden ist, als der über R- und P/Q-Typ vermittelte. Die erhobenen Glucosewerte unterstützen diese Theorie. Die Rolle des $\text{Ca}_v1.2$ vor allem für die Insulinsekretion wurde außerdem durch die Glucosetoleranztests gestützt. Hier zeigte sich, dass die $\text{Ca}_v1.2^{\text{Pan-/-}}$ Mäuse in der ersten Hälfte des Tests signifikant schlechter mit der Glucosebelastung umgehen können. 30 Minuten nach Glucoseapplikation ergab sich ein signifikanter Unterschied mit $503 \text{ mg/dl} \pm 21$ vs. $401,8 \text{ mg/dl} \pm 39,1$ (siehe Abb. 14). Dies lässt darauf schließen, dass die Insulinsekretion nicht in der erforderlichen Schnelligkeit bereitgestellt werden kann. Aufgrund der Tatsache, dass die Glucosewerte nach 2 Stunden wieder ähnliche Spiegel aufweisen, lässt sich folgern, dass die Insulinsekretion durch den Knock-out keinesfalls vollständig aufgehoben wurde, sondern lediglich die schnelle erste Phase beeinträchtigt wird. Interessant war an diesem Experiment darüber hinaus, dass eine gewisse Altersabhängigkeit festgestellt werden konnte. Besonders bei den Jungtieren fiel die gestörte Glukosetoleranz mit signifikantem Unterschied schon 15 Minuten nach Glukosegabe auf (siehe Abb. 15: $379,8 \text{ mg/dl} \pm 22,7$ vs. $267 \text{ mg/dl} \pm 24,8$), während sich bei alten Tieren die Glukosetoleranz auf höherem Niveau anglich (siehe Abb. 16: Maximalwerte nach 30 Minuten ca. 500 mg/dl bei alten Mäusen vs. 450 mg/dl bei jungen $\text{Ca}_v1.2^{\text{Pan-/-}}$ und 300 mg/dl bei jungen $\text{Ca}_v1.2^{\text{Pan+/-}}$) und zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen auftrat. Dies scheint, wie beim Diabetes mellitus Typ 2, für eine mit dem Alter zunehmende Unfähigkeit zu sprechen, mit Glucosebelastungen umgehen zu können.

Die $\text{HbA}_{1\text{C}}$ -Messungen konnten keinen Unterschied zwischen $\text{Ca}_v1.2^{\text{Pan-/-}}$ und $\text{Ca}_v1.2^{\text{Pan+/-}}$ feststellen, trotz eines signifikanten Unterschiedes bei den Glucosewerten. Dies könnte zum einen mit dem Alter der Tiere zusammenhängen, da sie zum Messzeitpunkt noch Jungtiere waren. Zum zweiten scheint bei den $\text{Ca}_v1.2^{\text{Pan-/-}}$ Mäusen die Hyperglykämie noch nicht ausreichend hoch zu sein, um eine signifikante Erhöhung des $\text{HbA}_{1\text{C}}$ hervorzurufen.

Einen ähnlichen Befund erbrachte die Messung des basalen Insulinspiegels. Auch hier konnte keine signifikante Erhöhung des basalen Insulinspiegels bei $\text{Ca}_v1.2^{\text{Pan-/-}}$ Mäusen nachgewiesen werden (siehe Abb. 13: $88,8 \text{ pmol/l} \pm 5$ vs. $93,5 \text{ pmol/l} \pm 5,4$). Der Grund hierfür könnte ebenfalls in der zu geringen Hyperglykämie begründet sein.

5.3 Ca_v1.2 Kalziumkanäle sind nötig für die erste Phase der Insulinsekretion

Schon die Daten aus den Glucosetoleranztests legten nahe, dass der Ca_v1.2 Kalziumkanal besonders für die erste schnelle Phase der Insulinsekretion notwendig ist. Eine genauere Betrachtung dieser ersten Phase erfolgte dann durch Analyse der ersten Minuten nach Glucosebelastung. Hierbei konnte gezeigt werden, dass diese erste Phase der Insulinsekretion in den Ca_v1.2^{Pan^{-/-}} Mäusen signifikant reduziert wurde. 3 Minuten nach Glukosebelastung zeigten die Ca_v1.2^{Pan^{-/-}} Mäuse mit 73,1 pmol/l ± 5,5 einen signifikant geringeren Insulinspiegel als die Ca_v1.2^{Pan^{+/-}} Mäuse mit 116,2 pmol/l ± 6,5 (siehe Abb. 12). Diese Ergebnisse bestätigen die Arbeiten von Schulla et al. , die ebenfalls ein Verschwinden der ersten Phase der Insulinsekretion nach Glucosebelastung gefunden hatten (Schulla et al., 2003). Dies ist ebenfalls in Übereinstimmung mit der schon gezeigten Tatsache, dass Ca_v1.2 Kalziumkanäle eine funktionelle Einheit mit Insulingranula in β-Zellen bilden. Dabei verbindet eine Schleife zwischen der 2. und 3. homologen Domäne den Kalziumkanal mit dem Exocytoseapparat (Wiser et al., 1999). Aus dieser Tatsache lässt sich vermuten, dass der Ca_v1.2 Knock-out den Kalziumkanal-Granula-Komplex zerstört, was zu einem selektiven Verlust der schnellen Sekretion führt. Dies könnte auch erklären, warum die histologischen Schnitte keinen Unterschied zwischen Knock-out und Wildtyp zeigen, da das Insulin zwar in den Granula vorliegt, jedoch nicht schnell freigesetzt werden kann. Jing et al. bestätigten diese Theorie indirekt, da die Insulinsekretion beim Ca_v2.3 Knock-out unter Isradipingabe, einem L-Typ Kalziumkanalblocker, um 77% zurück ging, während sie unter dem R-Kanalblocker nur um 17% zurück ging. Außerdem beeinflusste dieser Knock-out v.a. die zweite Phase der Insulinsekretion im Gegensatz zum Ca_v1.2 (Jing et al., 2005).

5.4 Einfluß von Alter und Ernährung

In den Glucosetoleranztests fiel ein deutlicher Unterschied zwischen Jungtieren und Mäusen, die älter als 12 Monate alt waren, auf. Diese altersabhängige Entwicklung weist Parallelen zur Manifestation des Diabetes mellitus Typ 2 auf. Bekannt ist, dass sich ein Diabetes früher manifestieren kann, je nach dem wie man sich ernährt. Um diese Kausalität zu überprüfen wurden die Mäuse, die älter als 12 Monate waren, einer Fettdiät unterzogen. Hierbei zeigte sich eine signifikante Gewichtszunahme bei Ca_v1.2^{Pan^{-/-}} Mäusen unter Fettdiät (von 41,2 g ±

1,3 auf $46,4 \text{ g} \pm 2,6$). Die anderen Gruppen entwickelten sich eher konstant ohne signifikante Unterschiede zwischen Fett- und Normalkost.

Der Verlauf des Glucosespiegels unter Fettdiät zeigte einen Rückgang, wobei die Werte der $\text{Ca}_v1.2^{\text{Pan-/-}}$ Mäuse jedoch nach wie vor über den Werten der $\text{Ca}_v1.2^{\text{Pan-/-}}$ Mäuse lagen.

Aufgrund einer hohen Messwertschwankung ließen sich jedoch keine signifikanten Unterschiede feststellen. Auch unter Normalkost näherten sich die Glucosewerte an, wiesen aber erstaunlicherweise einen niedrigeren Wert als bei den basalen Glucosemessungen auf. Ein etwas anderes Bild zeigte sich beim $\text{HbA}_{1\text{C}}$. Hier nahm der $\text{HbA}_{1\text{C}}$ bei den $\text{Ca}_v1.2^{\text{Pan-/-}}$ Mäusen unter Fettdiät innerhalb von 3 Monaten signifikant von $3,3\% \pm 0,05$ auf $4,0\% \pm 0,2$ zu (siehe Abb.18), während er bei den $\text{Ca}_v1.2^{\text{Pan+/-}}$ Mäusen mit $3,8\%$ relativ konstant blieb. Dieses Ergebnis bestätigt den Einfluss von endogenen Faktoren wie Alter und exogenen Faktoren wie Ernährung auf den Glucosespiegel. Auch wenn die absoluten Glucosewerte bei den gemessenen Tieren niedriger waren als bei den Versuchen ohne Fettdiät, konnte die Werteverteilung bestätigt werden. Diese Tatsache lässt sich vielleicht dadurch erklären, dass es sich nicht um dieselben Tiere handelt wie bei den Versuchen ohne Fettdiät.

Es lässt sich jedoch eine Angleichung der Glucosewerte beobachten wie schon in den Experimenten ohne Fettdiät gezeigt.

Diese Daten zeigen, dass sich durch einzelne Faktoren noch kein Diabetes mellitus Typ 2 auslösen ließ. Dennoch weisen die vorliegenden Experimente darauf hin, dass Mutationen im $\text{Ca}_v1.2$ starken Einfluss auf den Glucosehaushalt haben können.

5.5 Rolle der Nicht L-Typ Kalziumkanäle

Die Rolle der Nicht L-Typ Kalziumkanäle in β -Zellen bleibt weiterhin geheimnisvoll. Eine Möglichkeit wäre, dass die Nicht L-Typ Kalziumkanäle andere Funktionen in β -Zellen erfüllen als die Initiierung der Exocytose. Als Beispiel sei das Wiederauffüllen der gerade entleerten Granula durch Mobilisierung von Reservegranula genannt. Dies wäre im Einklang mit dem Fund, dass der R-Typ Kalziumkanal Blocker SNX482 seinen stärksten Effekt im späten Teil der Exocytose entfaltet (Schulla et al., 2003). Neueste Ergebnisse zeigen, dass R-Typ Kalziumkanäle ($\text{Ca}_v2.3$) für die zweite Phase der Insulinsekretion verantwortlich sein könnten (Jing et al., 2005). Außerdem könnte der Ca^{2+} -Einstrom durch Nicht L-Typ Kalziumkanäle die Exocytose von GABA-enthaltenden synaptic-like microvesicles (SLMV) regulieren, die ebenfalls in β -Zellen entdeckt wurden (Reetz et al., 1991). Oder aber Nicht L-

Typ Kalziumkanäle könnten bei der Glucose-induzierten Generierung von elektrischer Aktivität eine Rolle spielen ebenso wie bei der Genexpression (Pereverzev et al., 2002b; Wang et al., 2003).

5.6 Lässt sich die Entstehung von Diabetes mellitus Typ 2 mit der defekten Anordnung von Kalziumkanälen und sekretorischen Insulingranula begründen?

Man ist versucht eine gewisse Parallele zum humanen Diabetes mellitus Typ 2 aus den gefundenen Daten abzuleiten. So zeigen frühe Fälle von Diabetes mellitus Typ 2 eine milde Hyperglykämie, gestörte Glucosetoleranz und einen Verlust der ersten Phase der Insulinsekretion (UKPDS, 1995). Dennoch kann man natürlich nicht sagen, dass allein diese $Ca_v1.2$ Mutation Diabetes mellitus auslöst. Polymorphismen jedoch, die zu subtilen Veränderungen im Öffnungsverhalten oder der Fähigkeit zur Interaktion mit dem Exocytoseapparat führen, können zu einer gestörten Insulinsekretion führen (Nagamatsu et al., 1999; Wiser et al., 1999; Zhang et al., 2002). Dies kann verdeutlicht werden durch die Tatsache, dass die SNARE Proteine SNAP-25 und Syntaxin 1A den L-Typ Kalziumkanal hemmen, wenn sie einzeln exprimiert werden, ihn jedoch stimulieren wenn sie zusammen exprimiert sind (Ji et al., 2002; Wiser et al., 1999). Dabei ist außerdem von Interesse, dass die Expression von SNARE Proteinen im GK Modell der Ratte für Diabetes mellitus Typ 2 herabgesetzt ist (Nagamatsu et al., 1999; Zhang et al., 2002). Des weiteren hat man herausgefunden, dass mehrere Proteine, die für die Verankerung der Insulingranula am Kalziumkanal wichtig sind, auf einem Chromosom codiert sind, das im Verdacht steht bei der Diabetesentstehung eine Rolle zu spielen. Dies beinhaltet die Proteine Synaptotagmin 5 und 7 aus den Insulingranula (Hager et al., 1998; Norman et al., 1998; Pratley et al., 1998), die mögliche Ca^{2+} -Sensoren der β -Zell-Exocytose sein könnten (Ji et al., 2002), außerdem das Fusionsprotein VAMP-2/Synaptobrevin-2 (Lindgren et al., 2002; Parker et al., 2001; Regazzi et al., 1995) und das Plasmamembran assoziierte Fusionsprotein SNAP-25 (Imperatore et al., 1998; Ji et al., 2002). So konnte kürzlich gezeigt werden, dass ein Polymorphismus im Nukleotid für Syntaxin 1A mit Diabetes mellitus Typ 2 assoziiert ist (Tsunoda et al., 2001). Aufgrund all dieser Tatsachen können Kalziumkanäle und Proteine, die an der Exocytose beteiligt sind, als interessante Kandidaten für Diabetes mellitus Typ 2 angesehen werden und sollten in genetischen Studien untersucht werden. Dennoch muss gesagt werden, dass die funktionellen Konsequenzen von solchen Polymorphismen klein sein müssen, da wir ja alle

nicht mit Diabetes mellitus Typ 2 geboren werden. Dies legt nahe, dass die aus dem Polymorphismus herrührenden Veränderungen in der Proteinstruktur nur relevant werden in Kombination mit anderen β -Zellabnormalitäten, wie z.B. altersabhängige Reduktion des Glucosmetabolismus (aufgrund der Akkumulation von mitochondrialen Mutationen (Maechler et al., 2002)), resultierend in einer gestörten elektrischen Aktivität der Zelle und damit auch des Ca^{2+} -Einstrom. Dies steht im Einklang mit der derzeit herrschenden Meinung, dass Diabetes mellitus Typ 2 das Resultat von genetischen Faktoren, Alter und Umweltfaktoren darstellt (McCarthy and Froguel, 2002). Dies scheint der Versuch mit der Fettdiät ebenfalls zu bestätigen, da die Mäuse zwar deutlich an Gewicht zunahmen, sich der Glucosespiegel jedoch nicht änderte.

Gene, die für Proteine der Exocytose codieren (SNARE Proteine, aber auch Kalziumkanäle), sollten als Kandidaten in zukünftigen Studien zur Genetik von Diabetes mellitus Typ 2 gelten.

Abschließend muss konstatiert werden, dass der Diabetes mellitus Typ 2 weiterhin in vielen Bereichen noch immer eine unverstandene Krankheit darstellt, trotz vieler ermutigender Ergebnisse.

6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden tierexperimentell die Auswirkungen der konditionalen Inaktivierung des α_{1C} -Gens im Pankreas mit Hilfe des Cre/loxP Rekombinationssystems untersucht. Die selektive Inaktivierung in den β -Zellen des Pankreas erfolgte durch Verpaarung mit RIP-Cre Mäusen.

Die molekularbiologische Untersuchung ergab, dass der α_{1C} -Kalziumkanal in den β -Zellen des Pankreas vor allem aus der β_3 und $\alpha_2\delta-1$ Untereinheit besteht. Die β_2 , $\alpha_2\delta-2$ und $\alpha_2\delta-3$ Untereinheiten sind zwar ebenfalls vorhanden, jedoch geringer exprimiert.

Die physiologische Charakterisierung dieser Mauslinie ergab folgende Befunde:

Die $Ca_v1.2^{Pan-/-}$ (Knock-out, KO) Mäuse wiesen einen signifikant höheren basalen Glucosespiegel auf, verglichen mit den $Ca_v1.2^{Pan+/+}$ (Wildtyp, WT) Mäusen. Die Untersuchung des basalen Insulinspiegels ergab jedoch keinen signifikanten Unterschied, was auch für den HbA_{1C}-Wert gezeigt werden konnte.

Die Durchführung von Glucose-Toleranz-Tests konnte verifizieren, dass tatsächlich eine gestörte Glucoseverwertung vorliegt. Die KO-Mäuse hatten nach 1 Stunde signifikant höhere Glucosewerte als die WT-Mäuse. Eine altersspezifische Auswertung ergab ein noch eindeutigeres Bild, da jetzt schon nach 30 Minuten ein signifikanter Unterschied zwischen den Mäusen festgestellt wurde.

Die in vivo Untersuchung der Insulinfreisetzung zeigte, dass die schnelle erste Phase der Insulinsekretion selektiv bei den KO-Mäusen fehlte. So war der Insulinspiegel 3 Minuten nach Glucoseapplikation bei den KO-Mäusen signifikant geringer als bei den WT-Mäusen. Nach 5 Minuten wiesen beide Gruppen wieder ungefähr die gleichen Werte auf.

Eine Fettdiät sollte nachweisen, ob sich durch Ernährung diese Glucoseverwertungsstörung provozieren oder verschlimmern lässt. Es konnte gezeigt werden, dass der HbA_{1C}-Wert bei den Mäusen unter Fettdiät innerhalb von 3 Monaten signifikant zunahm. Die Glucosewerte wiesen die gleiche Tendenzen auf wie bei den Versuchen ohne Fettdiät, waren aber nicht signifikant.

Basierend auf dieser Mauslinie können in Zukunft weitere Untersuchungen erfolgen, um die Diabetesentstehung, aber auch andere Funktionen und Charakteristika des Kalziumkanals zu erforschen.

7 Literaturverzeichnis

- Albillos, A., Neher, E., and Moser, T. (2000). R-Type Ca²⁺ channels are coupled to the rapid component of secretion in mouse adrenal slice chromaffin cells. *J Neurosci* 20, 8323-8330.
- Angelotti, T., and Hofmann, F. (1996). Tissue-specific expression of splice variants of the mouse voltage-gated calcium channel alpha2/delta subunit. *FEBS Lett* 397, 331-337.
- Ball, S. L., Powers, P. A., Shin, H. S., Morgans, C. W., Peachey, N. S., and Gregg, R. G. (2002). Role of the beta(2) subunit of voltage-dependent calcium channels in the retinal outer plexiform layer. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43, 1595-1603.
- Barg, S., Eliasson, L., Renstrom, E., and Rorsman, P. (2002). A subset of 50 secretory granules in close contact with L-type Ca²⁺ channels accounts for first-phase insulin secretion in mouse beta-cells. *Diabetes* 51 Suppl 1, S74-82.
- Barg, S., Ma, X., Eliasson, L., Galvanovskis, J., Gopel, S. O., Obermuller, S., Platzer, J., Renstrom, E., Trus, M., Atlas, D., Striessnig, J., and Rorsman, P. (2001). Fast exocytosis with few Ca(2+) channels in insulin-secreting mouse pancreatic B cells. *Biophys J* 81, 3308-3323.
- Bech-Hansen, N. T., Naylor, M. J., Maybaum, T. A., Pearce, W. G., Koop, B., Fishman, G. A., Mets, M., Musarella, M. A., and Boycott, K. M. (1998). Loss-of-function mutations in a calcium-channel alpha1-subunit gene in Xp11.23 cause incomplete X-linked congenital stationary night blindness. *Nat Genet* 19, 264-267.
- Berggren, P. O., Yang, S. N., Murakami, M., Efanov, A. M., Uhles, S., Kohler, M., Moede, T., Fernstrom, A., Appelskog, I. B., Aspinwall, C. A., Zaitsev, S. V., Larsson, O., de Vargas, L. M., Fecher-Trost, C., Weissgerber, P., Ludwig, A., Leibiger, B., Juntti-Berggren, L., Barker, C. J., Gromada, J., Freichel, M., Leibiger, I. B., and Flockerzi, V. (2004). Removal of Ca²⁺ channel beta3 subunit enhances Ca²⁺ oscillation frequency and insulin exocytosis. *Cell* 119, 273-284.
- Biel, M., Hullin, R., Freundner, S., Singer, D., Dascal, N., Flockerzi, V., and Hofmann, F. (1991). Tissue-specific expression of high-voltage-activated dihydropyridine-sensitive L-type calcium channels. *Eur J Biochem* 200, 81-88.
- Bohn, G., Moosmang, S., Conrad, H., Ludwig, A., Hofmann, F., and Klugbauer, N. (2000). Expression of T- and L-type calcium channel mRNA in murine sinoatrial node. *FEBS Lett* 481, 73-76.
- Bosse, E., Regulla, S., Biel, M., Ruth, P., Meyer, H. E., Flockerzi, V., and Hofmann, F. (1990). The cDNA and deduced amino acid sequence of the gamma subunit of the L-type calcium channel from rabbit skeletal muscle. *FEBS Lett* 267, 153-156.
- Bratanova-Tochkova, T. K., Cheng, H., Daniel, S., Gunawardana, S., Liu, Y. J., Mulvaney-Musa, J., Schermerhorn, T., Straub, S. G., Yajima, H., and Sharp, G. W. (2002). Triggering and augmentation mechanisms, granule pools, and biphasic insulin secretion. *Diabetes* 51 Suppl 1, S83-90.
- Brice, N. L., and Dolphin, A. C. (1999). Differential plasma membrane targeting of voltage-dependent calcium channel subunits expressed in a polarized epithelial cell line. *J Physiol* 515 (Pt 3), 685-694.
- Brodbeck, J., Davies, A., Courtney, J. M., Meir, A., Balaguero, N., Canti, C., Moss, F. J., Page, K. M., Pratt, W. S., Hunt, S. P., Barclay, J., Rees, M., and Dolphin, A. C. (2002). The ducky mutation in *Cacna2d2* results in altered Purkinje cell morphology and is associated with the expression of a truncated alpha 2 delta-2 protein with abnormal function. *J Biol Chem* 277, 7684-7693.
- Burgess, D. L., Biddlecome, G. H., McDonough, S. I., Diaz, M. E., Zilinski, C. A., Bean, B. P., Campbell, K. P., and Noebels, J. L. (1999). beta subunit reshuffling modifies N- and P/Q-type Ca²⁺ channel subunit compositions in lethargic mouse brain. *Mol Cell Neurosci* 13, 293-311.

Castellano, A., Wei, X., Birnbaumer, L., and Perez-Reyes, E. (1993). Cloning and expression of a neuronal calcium channel beta subunit. *J Biol Chem* 268, 12359-12366.

Catterall, W. A. (2000). Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16, 521-555.

Chemin, J., Monteil, A., Perez-Reyes, E., Bourinet, E., Nargeot, J., and Lory, P. (2002). Specific contribution of human T-type calcium channel isoforms (alpha(1G), alpha(1H) and alpha(1I)) to neuronal excitability. *J Physiol* 540, 3-14.

Chu, P. J., Robertson, H. M., and Best, P. M. (2001). Calcium channel gamma subunits provide insights into the evolution of this gene family. *Gene* 280, 37-48.

Chuang, R. S., Jaffe, H., Cribbs, L., Perez-Reyes, E., and Swartz, K. J. (1998). Inhibition of T-type voltage-gated calcium channels by a new scorpion toxin. *Nat Neurosci* 1, 668-674.

Chung, S. H., Lee, K. Y., Kim, K. H., Kim, C. T., Lee, N. S., Sawada, K., Haga, H., Lee, B. C., Fukui, Y., Rhee, M. H., and Jeong, Y. G. (2002). Immunohistochemistry of voltage-gated calcium channel alpha1B subunit in mouse cerebellum. *J Vet Sci* 3, 175-178.

Clemens, A., Riemann, J. F., and Siegel, E. G. (2003). [Optimized diabetes therapy in type 2 diabetics]. *Med Klin (Munich)* 98, 484-492.

Clemens, A., Siegel, E., and Gallwitz, B. (2004). Global risk management in type 2 diabetes: blood glucose, blood pressure, and lipids--update on the background of the current guidelines. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 112, 493-503.

Cribbs, L. L., Lee, J. H., Yang, J., Satin, J., Zhang, Y., Daud, A., Barclay, J., Williamson, M. P., Fox, M., Rees, M., and Perez-Reyes, E. (1998). Cloning and characterization of alpha1H from human heart, a member of the T-type Ca²⁺ channel gene family. *Circ Res* 83, 103-109.

Curry, D. L., Bennett, L. L., and Grodsky, G. M. (1968). Dynamics of insulin secretion by the perfused rat pancreas. *Endocrinology* 83, 572-584.

De Jongh, K. S., Warner, C., Colvin, A. A., and Catterall, W. A. (1991). Characterization of the two size forms of the alpha 1 subunit of skeletal muscle L-type calcium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 10778-10782.

Doyle, M. E., and Egan, J. M. (2003). Pharmacological agents that directly modulate insulin secretion. In *Pharmacol Rev*, pp. 105-131.

Ducros, A., Denier, C., Joutel, A., Vahedi, K., Michel, A., Darcel, F., Madigand, M., Guerouaou, D., Tison, F., Julien, J., Hirsch, E., Chedru, F., Bisgard, C., Lucotte, G., Despres, P., Billard, C., Barthez, M. A., Ponsot, G., Bousser, M. G., and Tournier-Lasserre, E. (1999). Recurrence of the T666M calcium channel CACNA1A gene mutation in familial hemiplegic migraine with progressive cerebellar ataxia. *Am J Hum Genet* 64, 89-98.

Fletcher, C. F., Tottene, A., Lennon, V. A., Wilson, S. M., Dubel, S. J., Paylor, R., Hosford, D. A., Tessarollo, L., McEnery, M. W., Pietrobon, D., Copeland, N. G., and Jenkins, N. A. (2001). Dystonia and cerebellar atrophy in Cacna1a null mice lacking P/Q calcium channel activity. *Faseb J* 15, 1288-1290.

Flucher, B. E., and Franzini-Armstrong, C. (1996). Formation of junctions involved in excitation-contraction coupling in skeletal and cardiac muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 8101-8106.

Gao, B., Sekido, Y., Maximov, A., Saad, M., Forgacs, E., Latif, F., Wei, M. H., Lerman, M., Lee, J. H., Perez-Reyes, E., Bezprozvanny, I., and Minna, J. D. (2000). Functional properties of a new voltage-dependent calcium channel alpha(2)delta auxiliary subunit gene (CACNA2D2). *J Biol Chem* 275, 12237-12242.

Gomora, J. C., Xu, L., Enyeart, J. A., and Enyeart, J. J. (2000). Effect of mibefradil on voltage-dependent gating and kinetics of T-type Ca(2+) channels in cortisol-secreting cells. *J Pharmacol Exp Ther* 292, 96-103.

Gong, H. C., Hang, J., Kohler, W., Li, L., and Su, T. Z. (2001). Tissue-specific expression and gabapentin-binding properties of calcium channel alpha2delta subunit subtypes. *J Membr Biol* 184, 35-43.

Gregg, R. G., Messing, A., Strube, C., Beurg, M., Moss, R., Behan, M., Sukhareva, M., Haynes, S., Powell, J. A., Coronado, R., and Powers, P. A. (1996). Absence of the beta subunit (cchb1) of the skeletal muscle dihydropyridine receptor alters expression of the alpha 1 subunit and eliminates excitation-contraction coupling. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 13961-13966.

Hager, J., Dina, C., Francke, S., Dubois, S., Houari, M., Vatin, V., Vaillant, E., Lorentz, N., Basdevant, A., Clement, K., Guy-Grand, B., and Froguel, P. (1998). A genome-wide scan for human obesity genes reveals a major susceptibility locus on chromosome 10. *Nat Genet* *20*, 304-308.

Hofmann, F., Lacinova, L., and Klugbauer, N. (1999). Voltage-dependent calcium channels: from structure to function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* *139*, 33-87.

Hullin, R., Singer-Lahat, D., Freichel, M., Biel, M., Dascal, N., Hofmann, F., and Flockerzi, V. (1992). Calcium channel beta subunit heterogeneity: functional expression of cloned cDNA from heart, aorta and brain. *Embo J* *11*, 885-890.

Imperatore, G., Hanson, R. L., Pettitt, D. J., Kobes, S., Bennett, P. H., and Knowler, W. C. (1998). Sib-pair linkage analysis for susceptibility genes for microvascular complications among Pima Indians with type 2 diabetes. Pima Diabetes Genes Group. *Diabetes* *47*, 821-830.

Ino, M., Yoshinaga, T., Wakamori, M., Miyamoto, N., Takahashi, E., Sonoda, J., Kagaya, T., Oki, T., Nagasu, T., Nishizawa, Y., Tanaka, I., Imoto, K., Aizawa, S., Koch, S., Schwartz, A., Niidome, T., Sawada, K., and Mori, Y. (2001). Functional disorders of the sympathetic nervous system in mice lacking the alpha 1B subunit (Cav 2.2) of N-type calcium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 5323-5328.

Iwashima, Y., Abiko, A., Ushikubi, F., Hata, A., Kaku, K., Sano, H., and Eto, M. (2001). Downregulation of the voltage-dependent calcium channel (VDCC) beta-subunit mRNAs in pancreatic islets of type 2 diabetic rats. *Biochem Biophys Res Commun* *280*, 923-932.

Jay, S. D., Ellis, S. B., McCue, A. F., Williams, M. E., Vedvick, T. S., Harpold, M. M., and Campbell, K. P. (1990). Primary structure of the gamma subunit of the DHP-sensitive calcium channel from skeletal muscle. *Science* *248*, 490-492.

Ji, J., Yang, S. N., Huang, X., Li, X., Sheu, L., Diamant, N., Berggren, P. O., and Gaisano, H. Y. (2002). Modulation of L-type Ca(2+) channels by distinct domains within SNAP-25. *Diabetes* *51*, 1425-1436.

Jing, X., Li, D. Q., Olofsson, C. S., Salehi, A., Surve, V. V., Caballero, J., Ivarsson, R., Lundquist, I., Pereverzev, A., Schneider, T., Rorsman, P., and Renstrom, E. (2005). CaV2.3 calcium channels control second-phase insulin release. *J Clin Invest* *115*, 146-154.

Jun, K., Piedras-Renteria, E. S., Smith, S. M., Wheeler, D. B., Lee, S. B., Lee, T. G., Chin, H., Adams, M. E., Scheller, R. H., Tsien, R. W., and Shin, H. S. (1999). Ablation of P/Q-type Ca(2+) channel currents, altered synaptic transmission, and progressive ataxia in mice lacking the alpha(1A)-subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 15245-15250.

Klugbauer, N. (1999). Molekulare Grundlagen der Wirkung von Kalziumkanalblockern. *Med Welt* *50*, 506-511.

Klugbauer, N., Lacinova, L., Marais, E., Hobom, M., and Hofmann, F. (1999). Molecular diversity of the calcium channel alpha2delta subunit. *J Neurosci* *19*, 684-691.

Klugbauer, N., Marais, E., Lacinova, L., and Hofmann, F. (1999b). A T-type calcium channel from mouse brain. *Pflugers Arch* *437*, 710-715.

Koschak, A., Reimer, D., Walter, D., Hoda, J. C., Heinzle, T., Grabner, M., and Striessnig, J. (2003). Cav1.4alpha1 subunits can form slowly inactivating dihydropyridine-sensitive L-type Ca2+ channels lacking Ca2+-dependent inactivation. *J Neurosci* *23*, 6041-6049.

Kraus, R. L., Sinnegger, M. J., Koschak, A., Glossmann, H., Stenirri, S., Carrera, P., and Striessnig, J. (2000). Three new familial hemiplegic migraine mutants affect P/Q-type Ca(2+) channel kinetics. *J Biol Chem* *275*, 9239-9243.

Letts, V. A., Felix, R., Biddlecome, G. H., Arikath, J., Mahaffey, C. L., Valenzuela, A., Bartlett, F. S., 2nd, Mori, Y., Campbell, K. P., and Frankel, W. N. (1998). The mouse stargazer gene encodes a neuronal Ca²⁺-channel gamma subunit. *Nat Genet* *19*, 340-347.

Ligon, B., Boyd, A. E., 3rd, and Dunlap, K. (1998). Class A calcium channel variants in pancreatic islets and their role in insulin secretion. *J Biol Chem* *273*, 13905-13911.

Lindgren, C. M., Widen, E., Tuomi, T., Li, H., Almgren, P., Kanninen, T., Melander, O., Weng, J., Lehto, M., and Groop, L. C. (2002). Contribution of known and unknown susceptibility genes to early-onset diabetes in scandinavia: evidence for heterogeneity. *Diabetes* *51*, 1609-1617.

Loechner, K. J., Kream, R. M., and Dunlap, K. (1996). Calcium currents in a pituitary cell line (AtT-20): differential roles in stimulus-secretion coupling. *Endocrinology* *137*, 1429-1437.

Maechler, P., Gjinovci, A., and Wollheim, C. B. (2002). Implication of glutamate in the kinetics of insulin secretion in rat and mouse perfused pancreas. *Diabetes* *51 Suppl 1*, S99-102.

Mangel, A. W., Scott, L., and Liddle, R. A. (1996). Depolarization-stimulated cholecystokinin secretion is mediated by L-type calcium channels in STC-1 cells. *Am J Physiol* *270*, G287-290.

Martin, T. F. (1994). The molecular machinery for fast and slow neurosecretion. *Curr Opin Neurobiol* *4*, 626-632.

McCarthy, M. I., and Froguel, P. (2002). Genetic approaches to the molecular understanding of type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* *283*, E217-225.

Mitchell, J. W., Larsen, J. K., and Best, P. M. (2002). Identification of the calcium channel alpha 1E (Ca(v)2.3) isoform expressed in atrial myocytes. *Biochim Biophys Acta* *1577*, 17-26.

Moosmang, S., Schulla, V., Welling, A., Feil, R., Feil, S., Wegener, J. W., Hofmann, F., and Klugbauer, N. (2003). Dominant role of smooth muscle L-type calcium channel Cav1.2 for blood pressure regulation. *Embo J* *22*, 6027-6034.

Mori, Y., Nishida, M., Shimizu, S., Ishii, M., Yoshinaga, T., Ino, M., Sawada, K., and Niidome, T. (2002). Ca(2+) channel alpha(1B) subunit (Ca(V) 2.2) knockout mouse reveals a predominant role of N-type channels in the sympathetic regulation of the circulatory system. *Trends Cardiovasc Med* *12*, 270-275.

Murakami, M., Yamamura, H., Murakami, A., Okamura, T., Nunoki, K., Mitui-Saito, M., Muraki, K., Hano, T., Imaizumi, Y., Flockerzi, T., and Yanagisawa, T. (2000). Conserved smooth muscle contractility and blood pressure increase in response to high-salt diet in mice lacking the beta3 subunit of the voltage-dependent calcium channel. *J Cardiovasc Pharmacol* *36 Suppl 2*, S69-73.

Nagamatsu, S., Nakamichi, Y., Yamamura, C., Matsushima, S., Watanabe, T., Ozawa, S., Furukawa, H., and Ishida, H. (1999). Decreased expression of t-SNARE, syntaxin 1, and SNAP-25 in pancreatic beta-cells is involved in impaired insulin secretion from diabetic GK rat islets: restoration of decreased t-SNARE proteins improves impaired insulin secretion. *Diabetes* *48*, 2367-2373.

Namkung, Y., Skrypnik, N., Jeong, M. J., Lee, T., Lee, M. S., Kim, H. L., Chin, H., Suh, P. G., Kim, S. S., and Shin, H. S. (2001). Requirement for the L-type Ca(2+) channel alpha(1D) subunit in postnatal pancreatic beta cell generation. *J Clin Invest* *108*, 1015-1022.

Norman, R. A., Tataranni, P. A., Pratley, R., Thompson, D. B., Hanson, R. L., Prochazka, M., Baier, L., Ehm, M. G., Sakul, H., Foroud, T., Garvey, W. T., Burns, D., Knowler, W. C., Bennett, P. H., Bogardus, C., and Ravussin, E. (1998). Autosomal genomic scan for loci linked to obesity and energy metabolism in Pima Indians. *Am J Hum Genet* *62*, 659-668.

Ophoff, R. A., Terwindt, G. M., Vergouwe, M. N., van Eijk, R., Oefner, P. J., Hoffman, S. M., Lamerdin, J. E., Mohrenweiser, H. W., Bulman, D. E., Ferrari, M., Haan, J., Lindhout, D.,

van Ommen, G. J., Hofker, M. H., Ferrari, M. D., and Frants, R. R. (1996). Familial hemiplegic migraine and episodic ataxia type-2 are caused by mutations in the Ca²⁺ channel gene CACNL1A4. *Cell* 87, 543-552.

Parker, A., Meyer, J., Lewitzky, S., Rennich, J. S., Chan, G., Thomas, J. D., Orho-Melander, M., Lehtovirta, M., Forsblom, C., Hyrkko, A., Carlsson, M., Lindgren, C., and Groop, L. C. (2001). A gene conferring susceptibility to type 2 diabetes in conjunction with obesity is located on chromosome 18p11. *Diabetes* 50, 675-680.

Pereverzev, A., Mikhna, M., Vajna, R., Gissel, C., Henry, M., Weiergraber, M., Hescheler, J., Smyth, N., and Schneider, T. (2002a). Disturbances in glucose-tolerance, insulin-release, and stress-induced hyperglycemia upon disruption of the Ca(v)2.3 (alpha 1E) subunit of voltage-gated Ca(2+) channels. *Mol Endocrinol* 16, 884-895.

Pereverzev, A., Vajna, R., Pfitzer, G., Hescheler, J., Klockner, U., and Schneider, T. (2002b). Reduction of insulin secretion in the insulinoma cell line INS-1 by overexpression of a Ca(v)2.3 (alpha 1E) calcium channel antisense cassette. *Eur J Endocrinol* 146, 881-889.

Perez-Reyes, E., Castellano, A., Kim, H. S., Bertrand, P., Baggstrom, E., Lacerda, A. E., Wei, X. Y., and Birnbaumer, L. (1992). Cloning and expression of a cardiac/brain beta subunit of the L-type calcium channel. *J Biol Chem* 267, 1792-1797.

Perez-Reyes, E., Cribbs, L. L., Daud, A., Lacerda, A. E., Barclay, J., Williamson, M. P., Fox, M., Rees, M., and Lee, J. H. (1998). Molecular characterization of a neuronal low-voltage-activated T-type calcium channel. *Nature* 391, 896-900.

Perez-Reyes, E., Wei, X. Y., Castellano, A., and Birnbaumer, L. (1990). Molecular diversity of L-type calcium channels. Evidence for alternative splicing of the transcripts of three non-allelic genes. *J Biol Chem* 265, 20430-20436.

Perrier, J. F., Alaburda, A., and Hounsgaard, J. (2002). Spinal plasticity mediated by postsynaptic L-type Ca²⁺ channels. *Brain Res Brain Res Rev* 40, 223-229.

Platzer, J., Engel, J., Schrott-Fischer, A., Stephan, K., Bova, S., Chen, H., Zheng, H., and Striessnig, J. (2000). Congenital deafness and sinoatrial node dysfunction in mice lacking class D L-type Ca²⁺ channels. *Cell* 102, 89-97.

Postic, C., and Magnuson, M. A. (1999). [Role of glucokinase (GK) in the maintenance of glucose homeostasis. Specific disruption of the gene by the Cre-loxP technique]. *Journ Annu Diabetol Hotel Dieu*, 115-124.

Powell, J. A., Petherbridge, L., and Flucher, B. E. (1996). Formation of triads without the dihydropyridine receptor alpha subunits in cell lines from dysgenic skeletal muscle. *J Cell Biol* 134, 375-387.

Powers, P. A., Liu, S., Hogan, K., and Gregg, R. G. (1992). Skeletal muscle and brain isoforms of a beta-subunit of human voltage-dependent calcium channels are encoded by a single gene. *J Biol Chem* 267, 22967-22972.

Prado, W. A. (2001). Involvement of calcium in pain and antinociception. *Braz J Med Biol Res* 34, 449-461.

Pratley, R. E., Thompson, D. B., Prochazka, M., Baier, L., Mott, D., Ravussin, E., Sakul, H., Ehm, M. G., Burns, D. K., Foroud, T., Garvey, W. T., Hanson, R. L., Knowler, W. C., Bennett, P. H., and Bogardus, C. (1998). An autosomal genomic scan for loci linked to prediabetic phenotypes in Pima Indians. *J Clin Invest* 101, 1757-1764.

Qin, N., Yagel, S., Momplaisir, M. L., Codd, E. E., and D'Andrea, M. R. (2002). Molecular cloning and characterization of the human voltage-gated calcium channel alpha(2)delta-4 subunit. *Mol Pharmacol* 62, 485-496.

Reetz, A., Solimena, M., Matteoli, M., Folli, F., Takei, K., and De Camilli, P. (1991). GABA and pancreatic beta-cells: colocalization of glutamic acid decarboxylase (GAD) and GABA with synaptic-like microvesicles suggests their role in GABA storage and secretion. *Embo J* 10, 1275-1284.

Regazzi, R., Wollheim, C. B., Lang, J., Theler, J. M., Rossetto, O., Montecucco, C., Sadoul, K., Weller, U., Palmer, M., and Thorens, B. (1995). VAMP-2 and cellubrevin are expressed in pancreatic beta-cells and are essential for Ca(2+)-but not for GTP gamma S-induced insulin secretion. *Embo J* *14*, 2723-2730.

Rios, E., Pizarro, G., and Stefani, E. (1992). Charge movement and the nature of signal transduction in skeletal muscle excitation-contraction coupling. *Annu Rev Physiol* *54*, 109-133.

Rossier, M. F., Ertel, E. A., Vallotton, M. B., and Capponi, A. M. (1998). Inhibitory action of mibefradil on calcium signaling and aldosterone synthesis in bovine adrenal glomerulosa cells. *J Pharmacol Exp Ther* *287*, 824-831.

Ruth, P., Rohrkasten, A., Biel, M., Bosse, E., Regulla, S., Meyer, H. E., Flockerzi, V., and Hofmann, F. (1989). Primary structure of the beta subunit of the DHP-sensitive calcium channel from skeletal muscle. *Science* *245*, 1115-1118.

Saegusa, H., Kurihara, T., Zong, S., Kazuno, A., Matsuda, Y., Nonaka, T., Han, W., Toriyama, H., and Tanabe, T. (2001). Suppression of inflammatory and neuropathic pain symptoms in mice lacking the N-type Ca²⁺ channel. *Embo J* *20*, 2349-2356.

Saegusa, H., Matsuda, Y., and Tanabe, T. (2002). Effects of ablation of N- and R-type Ca(2+) channels on pain transmission. *Neurosci Res* *43*, 1-7.

Safayhi, H., Haase, H., Kramer, U., Bihlmayer, A., Roenfeldt, M., Ammon, H. P., Froschmayr, M., Cassidy, T. N., Morano, I., Ahlijanian, M. K., and Striessnig, J. (1997). L-type calcium channels in insulin-secreting cells: biochemical characterization and phosphorylation in RINm5F cells. *Mol Endocrinol* *11*, 619-629.

Sakata, Y., Saegusa, H., Zong, S., Osanai, M., Murakoshi, T., Shimizu, Y., Noda, T., Aso, T., and Tanabe, T. (2002). Ca(v)2.3 (alpha1E) Ca²⁺ channel participates in the control of sperm function. *FEBS Lett* *516*, 229-233.

Sambrook, J., Fritsch, E., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual* (New York, Cold Spring Harbor).

Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biotechnology* *24*, 104-108.

Sarsero, D., Fujiwara, T., Molenaar, P., and Angus, J. A. (1998). Human vascular to cardiac tissue selectivity of L- and T-type calcium channel antagonists. *Br J Pharmacol* *125*, 109-119.

Scherubl, H., Kleppisch, T., Zink, A., Raue, F., Krautwurst, D., and Hescheler, J. (1993). Major role of dihydropyridine-sensitive Ca²⁺ channels in Ca(2+)-induced calcitonin secretion. *Am J Physiol* *264*, E354-360.

Schmitt, R., Clozel, J. P., Iberg, N., and Buhler, F. R. (1995). Mibefradil prevents neointima formation after vascular injury in rats. Possible role of the blockade of the T-type voltage-operated calcium channel. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* *15*, 1161-1165.

Schulla, V., Renstrom, E., Feil, R., Feil, S., Franklin, I., Gjinovci, A., Jing, X. J., Laux, D., Lundquist, I., Magnuson, M. A., Obermuller, S., Olofsson, C. S., Salehi, A., Wendt, A., Klugbauer, N., Wollheim, C. B., Rorsman, P., and Hofmann, F. (2003). Impaired insulin secretion and glucose tolerance in beta cell-selective Ca(v)1.2 Ca²⁺ channel null mice. *Embo J* *22*, 3844-3854.

Seisenberger, C., Specht, V., Welling, A., Platzer, J., Pfeifer, A., Kuhbandner, S., Striessnig, J., Klugbauer, N., Feil, R., and Hofmann, F. (2000). Functional embryonic cardiomyocytes after disruption of the L-type alpha1C (Cav1.2) calcium channel gene in the mouse. *J Biol Chem* *275*, 39193-39199.

Singer, D., Biel, M., Lotan, I., Flockerzi, V., Hofmann, F., and Dascal, N. (1991). The roles of the subunits in the function of the calcium channel. *Science* *253*, 1553-1557.

Soldatov, N. M. (1994). Genomic structure of human L-type Ca²⁺ channel. *Genomics* *22*, 77-87.

- Specht, V. (2000). Genetische Modifikation des $\alpha 1C$ L-Typ Kalziumkanals der Maus mit Hilfe des Cre/loxP Rekombinationssystems (München), pp. 60-75.
- Striessnig, J. (1999). Pharmacology, structure and function of cardiac L-type Ca^{2+} channels. *Cell Physiol Biochem* 9, 242-269.
- Talley, E. M., Cribbs, L. L., Lee, J. H., Daud, A., Perez-Reyes, E., and Bayliss, D. A. (1999). Differential distribution of three members of a gene family encoding low voltage-activated (T-type) calcium channels. *J Neurosci* 19, 1895-1911.
- Tsunoda, K., Sanke, T., Nakagawa, T., Furuta, H., and Nanjo, K. (2001). Single nucleotide polymorphism (D68D, T to C) in the syntaxin 1A gene correlates to age at onset and insulin requirement in Type II diabetic patients. *Diabetologia* 44, 2092-2097.
- UKPDS (1995). Overview of 6 years therapy of type II diabetes: a progressive disease (UKPDS16). *Diabetes* 44, 1249-1258.
- Vajna, R., Schramm, M., Pereverzev, A., Arnhold, S., Grabsch, H., Klockner, U., Perez-Reyes, E., Hescheler, J., and Schneider, T. (1998). New isoform of the neuronal Ca^{2+} channel $\alpha 1E$ subunit in islets of Langerhans and kidney--distribution of voltage-gated Ca^{2+} channel $\alpha 1$ subunits in cell lines and tissues. *Eur J Biochem* 257, 274-285.
- Villalobos, C., Nunez, L., and Garcia-Sancho, J. (1997). Mechanisms for stimulation of rat anterior pituitary cells by arginine and other amino acids. *J Physiol* 502 (Pt 2), 421-431.
- Wang, W., Xu, J., and Kirsch, T. (2003). Annexin-mediated Ca^{2+} influx regulates growth plate chondrocyte maturation and apoptosis. *J Biol Chem* 278, 3762-3769.
- Wei, X. Y., Perez-Reyes, E., Lacerda, A. E., Schuster, G., Brown, A. M., and Birnbaumer, L. (1991). Heterologous regulation of the cardiac Ca^{2+} channel $\alpha 1$ subunit by skeletal muscle beta and gamma subunits. Implications for the structure of cardiac L-type Ca^{2+} channels. *J Biol Chem* 266, 21943-21947.
- Welling, A., Kwan, Y. W., Bosse, E., Flockerzi, V., Hofmann, F., and Kass, R. S. (1993). Subunit-dependent modulation of recombinant L-type calcium channels. Molecular basis for dihydropyridine tissue selectivity. *Circ Res* 73, 974-980.
- Westenbroek, R. E., Hell, J. W., Warner, C., Dubel, S. J., Snutch, T. P., and Catterall, W. A. (1992). Biochemical properties and subcellular distribution of an N-type calcium channel $\alpha 1$ subunit. *Neuron* 9, 1099-1115.
- Wiser, O., Trus, M., Hernandez, A., Renstrom, E., Barg, S., Rorsman, P., and Atlas, D. (1999). The voltage sensitive Lc-type Ca^{2+} channel is functionally coupled to the exocytotic machinery. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 248-253.
- Wiser, O., Trus, M., Tobi, D., Halevi, S., Giladi, E., and Atlas, D. (1996). The $\alpha 2/\delta$ subunit of voltage sensitive Ca^{2+} channels is a single transmembrane extracellular protein which is involved in regulated secretion. *FEBS Lett* 379, 15-20.
- Yamada, Y., Kuroe, A., Li, Q., Someya, Y., Kubota, A., Ihara, Y., Tsuura, Y., and Seino, Y. (2001). Genomic variation in pancreatic ion channel genes in Japanese type 2 diabetic patients. *Diabetes Metab Res Rev* 17, 213-216.
- Yamakage, M., and Namiki, A. (2002). Calcium channels--basic aspects of their structure, function and gene encoding; anesthetic action on the channels--a review. *Can J Anaesth* 49, 151-164.
- Yang, S. N., Larsson, O., Branstrom, R., Bertorello, A. M., Leibiger, B., Leibiger, I. B., Moede, T., Kohler, M., Meister, B., and Berggren, P. O. (1999). Syntaxin 1 interacts with the L(D) subtype of voltage-gated Ca^{2+} channels in pancreatic beta cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 10164-10169.
- Zhang, W., Khan, A., Ostenson, C. G., Berggren, P. O., Efendic, S., and Meister, B. (2002). Down-regulated expression of exocytotic proteins in pancreatic islets of diabetic GK rats. *Biochem Biophys Res Commun* 291, 1038-1044.

Zhuang, H., Bhattacharjee, A., Hu, F., Zhang, M., Goswami, T., Wang, L., Wu, S., Berggren, P. O., and Li, M. (2000). Cloning of a T-type Ca²⁺ channel isoform in insulin-secreting cells. *Diabetes* 49, 59-64.

Danksagung

Zunächst möchte ich an dieser Stelle allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herr PD Dr. Norbert Klugbauer hat mit seiner fachlichen Unterstützung und einem immer offenen Ohr entscheidend zum Entstehen der Arbeit beigetragen. Danke für die Geduld und hervorragende Betreuung.

Herrn Prof. Dr. Franz Hofmann danke ich für die freundliche Aufnahme an seinem Institut und sein Interesse am Fortgang der Arbeit.

Herrn Dr. Sven Moosmang möchte ich für die Hilfe bei den physiologischen Untersuchungen danken.

Frau Dr. Verena Schulla danke ich für die Unterstützung bei den molekularbiologischen Experimenten sowie für die Mauszucht.

Frau Susanne Paporisto und Frau Astrid Vens gilt mein Dank für die Unterstützung im Laborbetrieb.

Allen Mitarbeitern und Kollegen des „zweiten Stocks“ (Man, Nicole, Stefan, und anderen) danke ich für das angenehme Arbeitsklima, die uneingeschränkte Hilfsbereitschaft, viele wissenschaftliche und nicht so wissenschaftliche Diskussionen und auch für gesellige Aktivitäten außerhalb des Laboralltags.

Frau Günther, Herrn Sahiner und Herrn Pavel danke ich für die Betreuung der Mäuse im Tierstall.

Ein Dankeschön geht auch an alle restlichen Mitarbeiter des Institutes für ihre Hilfsbereitschaft und gute Zusammenarbeit.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, v.a. meinem Vater für alle Tipps und viele Kleinigkeiten, die entscheidend für das Gelingen waren.