



Institut für Pharmakologie und Toxikologie  
der Technischen Universität München



**Elektrophysiologische und molekularbiologische Charakterisierung  
von T-Typ Kalziumkanälen und Natriumkanälen  
in Inselzellen des Pankreas**

**Sheila Vignali**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan  
für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München  
zur Erlangung des akademischen Grades eines

**Doktors der Naturwissenschaften**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Polster

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Heinrich H. D. Meyer

2. Univ.-Prof. Dr. Franz Hofmann

Die Dissertation wurde am 18.08.2006 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum für Ernährung,  
Landnutzung und Umwelt am 09.10.2006 angenommen.

## INHALTSVERZEICHNIS

<i>Abbildungsverzeichnis</i> . . . . .	5
<i>Tabellenverzeichnis</i> . . . . .	8
<i>Abkürzungsverzeichnis</i> . . . . .	9
<i>Abstract</i> . . . . .	11
<i>1. Einleitung</i> . . . . .	12
1.1 Diabetes mellitus . . . . .	12
1.2 Das Pankreas . . . . .	13
1.3 Insulin-Freisetzung . . . . .	15
1.4 Glukagon-Sekretion . . . . .	17
1.5 Spannungsabhängige Kalziumkanäle . . . . .	18
1.5.1 Aufbau spannungsabhängiger Kalziumkanäle . . . . .	18
1.5.2 T-Typ Kalziumkanäle . . . . .	19
1.6 Spannungsabhängige Natriumkanäle . . . . .	20
1.7 Ziel dieser Arbeit . . . . .	23
<i>2. Material und Methoden</i> . . . . .	24
2.1 Isolierung und Kultivierung der Inselzellen . . . . .	24
2.1.1 Verwendete Chemikalien . . . . .	24
2.1.2 Präparation der Langerhans'schen Inseln . . . . .	24
2.1.3 Kultivierung der Inselzellen . . . . .	26
2.2 Molekularbiologische Methoden . . . . .	26
2.2.1 mRNA-Isolierung mittels Dynabeads . . . . .	26
2.2.2 RNA-Isolierung mittels <i>TRIZOL-Reagenz</i> . . . . .	29

2.2.3	Herstellung von codierender DNA (cDNA) durch Reverse Transkription . . . . .	30
2.2.4	Isolierung genomischer DNA . . . . .	31
2.2.5	DNA–Aufreinigung . . . . .	32
2.2.6	Polymerase–Kettenreaktion (PCR) . . . . .	33
2.2.7	RT–PCR . . . . .	35
2.2.8	Nested PCR . . . . .	37
2.2.9	Primer–Sequenzen . . . . .	38
2.2.10	Gel–Elektrophorese . . . . .	39
2.3	Elektrophysiologische Messungen . . . . .	40
2.3.1	Stammlösungen . . . . .	40
2.3.2	Extrazellulär- und Intrazellulärlösungen . . . . .	40
2.3.3	Toxine . . . . .	41
2.3.4	Die Patch–Clamp–Technik . . . . .	42
2.3.5	Die Messapparatur . . . . .	43
2.3.6	Die Messpipetten . . . . .	44
2.3.7	Versuchsdurchführung . . . . .	44
2.3.8	Messprotokolle . . . . .	45
2.3.9	Datenanalyse . . . . .	46
2.4	Versuchstiere . . . . .	46
2.4.1	Das Cre/loxP–Rekombinationssystem . . . . .	47
2.4.2	A–Zellspezifische $Na_V1.7^{-/-}$ –Maus . . . . .	48
2.4.3	Genotypisierung der Mäuse . . . . .	48
2.4.4	Serumanalysen von Kontroll- und $GlucCre^{+/tg}Na_V1.7^{-/-}$ Mäusen . . . . .	50
3.	<i>Ergebnisse</i> . . . . .	51
3.1	Etablierung einer Methode zur Unterscheidung von A- und B–Zellen .	51
3.2	T–Typ Kalziumkanäle in murinen Inselzellen . . . . .	53
3.2.1	Molekularbiologische Untersuchung . . . . .	54
3.2.2	Elektrophysiologische Untersuchung . . . . .	56
3.3	Natriumkanäle in murinen Inselzellen . . . . .	59
3.3.1	Zwei TTX–sensitive Natriumkanäle in den murinen Inselzellen	59

3.3.2	Strom–Spannungsbeziehung spannungsabhängiger Natriumkanäle . . . . .	61
3.3.3	Inaktivierung spannungsabhängiger Natriumkanäle (steady–state Inaktivierung) . . . . .	62
3.3.4	TTX–Wirkung an Natriumströmen aus Inselzellen der Maus .	63
3.3.5	Untersuchung mit spezifischen Primer für alle TTX–sensitiven Natriumkanäle . . . . .	65
3.4	Untersuchung der A–zellspezifischen $Na_V1.7^{-/-}$ –Maus . . . . .	67
3.4.1	Molekularbiologische Untersuchungen . . . . .	67
3.4.2	Elektrophysiologische Untersuchungen . . . . .	70
3.4.3	Gewicht– und Blutzuckermessung an der $Na_V1.7^{-/-}$ –Maus . .	71
3.4.4	Insulin–Toleranztest . . . . .	73
4.	<i>Diskussion</i> . . . . .	75
4.1	Unterscheidung von A– und B–Zellen . . . . .	75
4.2	T–Typ Kalziumkanäle werden nicht in den Inselzellen der Maus exprimiert . . . . .	76
4.3	Zwei Typen von TTX–sensitiven Natriumströme in den Inselzellen der Maus . . . . .	77
4.4	Untersuchung der A–zellspezifischen $Na_V1.7^{-/-}$ –Maus . . . . .	78
5.	<i>Zusammenfassung</i> . . . . .	80
	<i>Literaturverzeichnis</i> . . . . .	81
	<i>Eigene Publikationen</i> . . . . .	90
	<i>Danksagung</i> . . . . .	93
	<i>Erklärung</i> . . . . .	94

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

1.1	Schematische Darstellung des Pankreas. (nach 45) . . . . .	13
1.2	Schematische Darstellung einer murinen Langerhans'schen Insel. (nach 71) . . . . .	14
1.3	Modell der Insulinfreisetzung in einer B-Zelle. (nach 63). . . . .	15
1.4	Die Insulin-Sekretion erfolgt biphasisch. (nach 63) . . . . .	16
1.5	Genetische Vielfalt der $\alpha_1$ -UE (nach 19) . . . . .	19
1.6	$\alpha_1$ -Untereinheit des T-Typ Kalziumkanals mit den Domänen I-IV und den Segmenten 1-6 (nach 40) . . . . .	19
1.7	Schematische Darstellung der $\alpha$ -Untereinheit eines Natrium-Kanals (nach 74). . . . .	21
1.8	Genetische Vielfalt der spannungsabhängigen Natriumkanäle. (nach 24). . . . .	22
2.1	Schematische Darstellung des Pankreas. (Quelle: 3) . . . . .	25
2.2	Längsschnitt durch einen Mikroelektrodenhalter (Quelle: 31) . . . . .	42
2.3	Schematische Darstellung der Messkonfiguration (nach 12) . . . . .	45
2.4	Schematische Darstellung der Messprotokolle. . . . .	46
2.5	Cre/loxP-vermittelte Excision und Integration von DNA (nach 44) . . . . .	47
2.6	Kreuzungsschema für die A-Zellspezifische $Na_V1.7^{-/-}$ -Maus . . . . .	48
3.1	Kapazitäten der A- (weiße Balken) und B-Zellen (graue Balken) . . . . .	52
3.2	Genotypisierung von Inselzellen. . . . .	52
3.3	Messung der Isradipin-Hemmung des $I_{Ba}$ von Inselzellen der $\beta Ca_V1.2^{-/-}$ -Maus . . . . .	53
3.4	PCR-Reaktion mit T-Typ-spezifischen Primern an a) Gehirn-, b) Herz-, c) Muskel-, d) Nieren- und e) Insel-cDNA . . . . .	54
3.5	Amplifikate für $Ca_V3.1$ , 3.2 und 3.3 können nur in einzelnen Inseln (links) aber nicht in einzelnen Zellen (rechts) nachgewiesen werden. . . . .	55

---

3.6	Schematische Darstellung des Verfahrens zum Testen der Sensitivität der T-Typ Kalziumkanal-Primer . . . . .	55
3.7	PCR-Ergebnis der 1:1000 000 Verdünnung. . . . .	56
3.8	Stromkurven zu den Potentialen von -40 mV bis +50 mV mit zugehörigen Messprotokoll. . . . .	57
3.9	Strom-Spannungs-Messung an Harnröhren-Zellen des Menschen. (nach 16). . . . .	57
3.10	Murine B-Zellen nach einer T-Typ Kalziumkanal Strom-Spannungsbeziehung. . . . .	58
3.11	Repräsentative Strommessungen einer A-Zelle von Haltepotentialen von -80 mV (links) und -40 mV (mitte) bei Potentialen von -80 bis +10 mV. Rechts sind die Differenz-Ströme dargestellt. . . . .	59
3.12	Spannungsabhängige Natriumströme von zwei Inselzellen. . . . .	60
3.13	Identifizierung von A- und B-Zellen die den frühinaktivierenden (blau) und den spätinaktivierenden (türkis) Natriumstrom exprimieren mit glukagon- und insulinspezifischen Primern . . . . .	60
3.14	Inselzellen exprimieren unterschiedliche Natriumströme . . . . .	61
3.15	Strom-Spannungsbeziehung des früh- und spätinaktivierenden Natriumstrom. . . . .	62
3.16	Steady-State Inaktivierungskurven für Natrium-Kanäle. . . . .	63
3.17	TTX-Block des früh- und spätinaktivierenden Natriumstrom. $IC_{50}$ -Wert für den frühinaktivierenden Natriumstrom war $2,71 \pm 0,3$ nM TTX (n = 10) und für den spätinaktivierenden $1,3 \pm 0,4$ nM TTX (n = 7). . . . .	64
3.18	PCR Analyse an Gehir- und Skelett-Muskel-cDNA mit spezifischen Primer für alle TTX-sensitiven Natriumkanäle . . . . .	65
3.19	PCR Analyse an Insel-cDNA mit spezifischen Primer für alle TTX-sensitiven Natriumkanäle. . . . .	66
3.20	Single-cell one-step RT-PCR Analyse an einzelnen Inseln. . . . .	66
3.21	Ergebnis der Single-cell one-step RT-PCR an einzelne Zellen mit spezifischen Primer für den $Na_V1.3$ - (n = 5) und $Na_V1.7$ -Kanal (n = 5) . . . . .	66
3.22	Single-cell RT-PCR mit $Na_V1.7$ -spezifischen Primer. . . . .	67

---

3.23	Schematische Darstellung der möglichen Allele in einer $Na_V1.7$ transgenen Maus. . . . .	68
3.24	Genotypisierung genomischer Insel-DNA aus KO- und Kontroll-Mäusen. . . . .	69
3.25	Genotypisierung genomischer Herz-DNA aus KO- und Kontroll-Mäusen. . . . .	69
3.26	Repräsentative Stromkurven einer A-Zelle (SV090507) aus einer $Na_V1.7^{-/-}$ -Maus. . . . .	70
3.27	Repräsentative Stromkurven einer B-Zelle (SV170501) aus einer $Na_V1.7^{-/-}$ -Maus. . . . .	70
3.28	Statistik aller gemessenen KO-Zellen (blau) im Vergleich mit WT-Zellen (türkis). . . . .	71
3.29	Statistische Auswertung des Körpergewichts von 5 KO- (schwarz) und 5-Kontroll-Mäusen (rot). . . . .	72
3.30	Statistische Auswertung des Blutzucker-Wertes von 5 KO- (schwarz) und 5-Kontroll-Mäusen (rot). . . . .	72
3.31	Statistische Auswertung des Insulintoleranztests von 5 KO- (schwarz) und 5 Kontroll-Mäusen (rot). . . . .	73

## TABELLENVERZEICHNIS

2.1	Zusammensetzung des HANKS-Puffers . . . . .	24
2.2	Chemikalien für die Zellkultur . . . . .	24
2.3	Binde-Puffer . . . . .	27
2.4	Wasch-Puffer . . . . .	28
2.5	GTC-Lösung . . . . .	28
2.6	PCR-Programm für eine Standard-PCR-Reaktion mit „touch-down“	35
2.7	Inhalt des Kits, nach der Anleitung von Qiagen: One-step RT-PCR Kit. Alle Angaben beziehen sich auf das Kit 210212 für 100 Reaktionen	36
2.8	Single-cell RT-PCR-Programm . . . . .	37
2.9	Primer-Sequenzen für Insulin/ Glukagon (Ins, Gluc); $Ca_V$ - und $Na_V$ - Kanäle; degenerierte Primer für T-Typ Kalziumkanäle (T05, T06) . .	38
2.10	Zusammensetzung einer 10× TBE-Lösung . . . . .	39
2.11	Zusammensetzung des Farbmarkers . . . . .	40
2.12	Konzentrationen der Stammlösungen . . . . .	40
2.13	Zusammensetzung und Endkonzentration der Extrazellulärlösungen $E_I$ und $E_{II}$ . . . . .	41
2.14	Zusammensetzung und Endkonzentration der Intrazellulärlösung ( $I$ ) .	41
2.15	Konzentrationen der Toxin-Stocklösungen . . . . .	42
2.16	PCR-Ansatz . . . . .	49
2.17	Primersequenzen zur Genotypisierung der gezüchteten Mäuse. . . . .	49
2.18	Maus-kurz Programm zur Genotypisierung der Mauslinien . . . . .	50
3.1	Optimale Annealingtemperaturen der $Na_V$ -Primerpaare . . . . .	65

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintri-phosphat
bp	Basenpaar
$C_{av}$	spannungsabhängige Kalziumkanäle
cDNA	codierende DNA
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHP	Dihydropyridin
DNA	Desoxyribonucleine-Acid
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylene Glycol-bis(2-aminoethyl ether)-N,N,N,N-Tetraacetic Acid
FCS	Fetal Calf Serum
GTC	Guanidin-Thiocyanat
HBSS	Hanks's-Balanced Salt Solution
HVA	High-Voltage-Activated
$K_{ATP}$	ATP-sensitiver Kaliumkanal
Kir	Inward-Rectifier Kaliumkanal
KO	Knockout
LVA	Low-Voltage-Activated
MIP-GFP	Mouse-Insulin-Promotor-Green-Fluorescent-Protein
mRNA	messenger RNA
$N_{av}$	spannungsabhängige Natriumkanäle
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerase Chain Reaction
RNA	Ribonucleine-Acid
RT	Reverse Transkriptase
SUR	Sulfonyl-Urea-Rezeptor

---

TBE .....	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEA-Cl .....	Tetraethylammonium Chlorid
TTX .....	Tetrodotoxin
$V_h$ .....	Haltepotential

## Abstract

Single A- and B-cells of the pancreas were differentiated for the first time by a Single-Cell RT-PCR with insulin and glucagon specific primers. Furthermore by electrophysiological and molecular methods, no T-type calcium channels could be found in murine islet cells. However, two TTX-sensitive sodium channels were measured: an early inactivating and a residual one. In contrary to the current literature, the early inactivating sodium channel could be detected in A- and B-cells, whereas the residual sodium channel could be measured in the B-cells only. By molecular methods the  $Na_V1.7$  was found in both cell types and was identified by an A-cell specific  $Na_V1.7$ -KO mouse as the molecular basis of the early inactivating sodium channel.

## Zusammenfassung

Mittels einer Single-Cell RT-PCR mit insulin- und glukagonspezifischen Primern, konnten erstmals A- und B-Zellen des Pankreas eindeutig voneinander unterschieden werden. Des Weiteren konnten, mit elektrophysiologischen und molekularbiologischen Methoden, keine T-Typ Kalziumkanäle in den murinen Inselzellen gefunden werden. Zwei TTX-sensitive Natriumkanäle wurden stattdessen gemessen, ein Früh- und ein Spätinaktivierender. Im Gegensatz zur Literatur wurde der frühinaktivierende Natriumkanal in A- und B-Zellen detektiert, während der Spätinaktivierende nur in den B-Zellen gemessen werden konnte. Mit molekularbiologischen Methoden konnte der  $Na_V1.7$  in beiden Zellen und durch eine A-zellspezifische  $Na_V1.7$ -KO-Maus als molekulare Grundlage des frühinaktivierenden Natriumkanals identifiziert werden.

## 1. EINLEITUNG

Glukose ist ein Haupt-Energielieferant aller Organe. Die Blutzucker-Konzentration eines gesunden Menschen liegt bei ca. 5 mM und wird über das Gleichgewicht von Glukoseauf- und Abnahme aus dem Blut und ins Blut reguliert. Für diese Regulierung werden die beiden Hormone Insulin und Glukagon benötigt. Ein Defekt in der Hormon-Sekretion führt zu gefährlichen metabolischen Störungen bis hin zu Diabetes mellitus (28). Änderungen im menschlichen Verhalten und Lebensstil haben außerdem über das letzte Jahrhundert einen drastischen Anstieg von Diabetes mellitus weltweit ergeben. Vor allem der Typ-2-Diabetes wird vermehrt beschrieben (77). Die möglichen Ursachen werden in der genetischen Vererbung, in Umwelt- und Verhaltensfaktoren, wie sesshafter Lebensstil, übermäßiger Nahrungskonsum und Fettleibigkeit, gesehen.

### 1.1 *Diabetes mellitus*

Diabetes mellitus beschreibt den Zustand bei dem eine chronische Erhöhung der Blutzuckerkonzentration vorliegt, weshalb es auch als Zuckerkrankheit bezeichnet wird. Es handelt sich hierbei um eine Stoffwechselkrankheit, die auf einen absoluten oder relativen Insulinmangel zurückzuführen ist, bzw. Insulin wird gar nicht oder nur in unzureichenden Mengen vom Pankreas produziert. Man unterscheidet hauptsächlich 2 Formen des Diabetes mellitus, Typ-1 und Typ-2 (71).

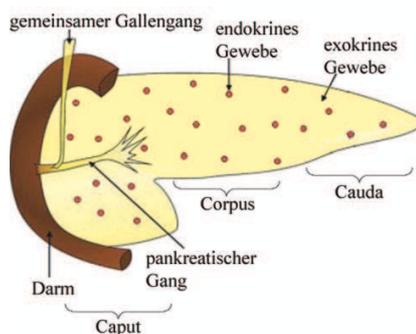
Typ-1: wird als insulin-abhängiger Diabetes bezeichnet. Diese Krankheitsform wird durch eine autoimmune Zerstörung der insulin-freisetzenden B-Zellen der Langerhans Inseln des Pankreas verursacht. Diese Form tritt bereits in der Kindheit und/oder frühen Erwachsenenalter auf. In Europa wird bei 20%, der an Diabetes erkrankten Personen, dieser Typ diagnostiziert.

Typ-2: wird als nicht-insulin-abhängiger Diabetes bezeichnet. Es beginnt im mittleren oder im späten Alter, weshalb es auch Altersdiabetes genannt wird. Dies ist der

am meisten verbreitete Typ. Ca. 80 % aller an Diabetes erkrankten Europäer leiden an dieser Form. Es wird durch eine relativ verringerte Insulinsekretion, die auf eine Insulinresistenz beruht, verursacht. In der Folge lässt die Insulinproduktion komplett nach. Der Typ-2-Diabetes wird zudem im Zusammenhang mit Fettleibigkeit und Metabolischen Syndrom gebracht (71). Alle Arten des Diabetes mellitus führen zu einer Hyperglykämie, die auf Dauer und unbehandelt alle Gefäße des Körpers schädigen kann. Die am häufigsten auftretenden Spätfolgen sind Erkrankungen der großen und kleinen arteriellen Blutgefäße (Makro- bzw. Mikroangiopathie), Schädigung der Netzhaut (diabetische Retinopathie) und der Nieren (diabetische Nephropathie) (53).

## 1.2 Das Pankreas

Das wichtigste Organ für die Blutzucker-Regulierung im Körper ist das Pankreas oder auch Bauchspeicheldrüse genannt. Es handelt sich hierbei um ein quer im Oberbauch liegendes Drüsenorgan, welches für die Produktion von Verdauungsenzymen und Hormonen verantwortlich ist. Beim Menschen ist das Pankreas ca. 14–18 cm lang, 65–75 g schwer und als keilförmiges Organ im Retroperitonealraum angelagert.



*Fig. 1.1:* Schematische Darstellung des Pankreas. Der endokrine Anteil des Pankreas macht 1 % des gesamten Pankreas aus und ist in kleinen Zellklustern, sogenannte Langerhans Inseln, organisiert. (aus: 45)

Es wird in die drei Regionen, Kopf (Caput), Körper (Corpus) und Schwanz (Cauda) unterteilt (Abb. 1.1). Das Pankreas spielt eine wichtige Rolle für den Stoffwechsel und besitzt exo- und endokrine Funktionen. Der endokrine Drüsenanteil ist für die

Sekretion der beiden Hormone Insulin und Glukagon verantwortlich. Diese werden in den Zellen der Langerhans Inseln, als Antwort auf die jeweilige Blutzuckerkonzentration, produziert. Die Langerhans'schen Inseln sind über das gesamte, hauptsächlich aber über den Körper und den Schwanz des Pankreas, verteilt. Insgesamt befinden sich circa 1 Million Inseln in einem gesunden menschlichen Pankreas (71). Eine Insel besteht aus 500 bis 2000 Zellen. Es werden vier funktionell verschiedene Arten von Zellen in den Inseln unterschieden, die unterschiedliche zellspezifische Hormone bilden (Abb. 1.2):

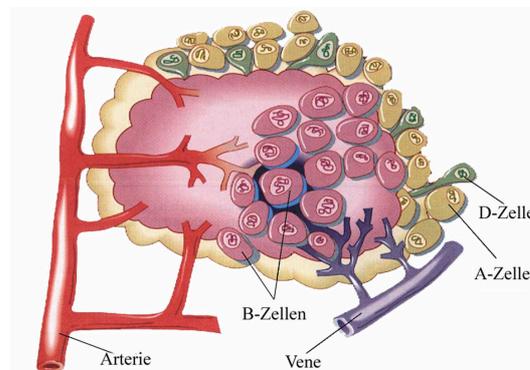


Fig. 1.2: Schematische Darstellung einer murinen Langerhans'schen Insel. In der Peripherie einer Insel sind die A- und D-Zellen lokalisiert, während den größten Anteil die B-Zellen im Herzen einer Insel ausmachen. (aus: 71)

- A-Zellen: ca. 15 % aller Zellen in einer Insel sind A-Zellen. Sie bilden das Hormon Glukagon, welches als Gegenspieler des Insulins fungiert und bei niedrigem Blutzucker den Glykogenabbau sowie die Glukoseneubildung (Glukoneogenese) fördert.
- B-Zellen: den größten Anteil einer Insel bilden die B-Zellen (ca. 80 %). Sie bilden und sezernieren das blutglukosespiegelsenkende Insulin.
- D-Zellen: nur 2–5 % einer Insel machen die D-Zellen aus. Sie bilden Somatostatin, was eine wichtige parakrine Rolle bei der Hemmung der Ausschüttung von Glukagon und Insulin aus A- und B-Zellen besitzt.
- PP-Zellen (Pankreatisches Polypeptid): Sie bilden ein Polypeptid, dessen physiologische Funktion bislang noch nicht bekannt ist (68).

Zahlreiche andere Hormone, insbesondere die Stresshormone Adrenalin und Kortisol, haben ebenfalls Einfluss auf den Blutzuckerspiegel (29).

### 1.3 Insulin-Freisetzung

Insulin wird als Antwort auf einen hohen Blutzuckerspiegel von den B-Zellen des Pankreas sezerniert. Die Insulinsekretion ist schematisch in der Abbildung 1.3 dargestellt.

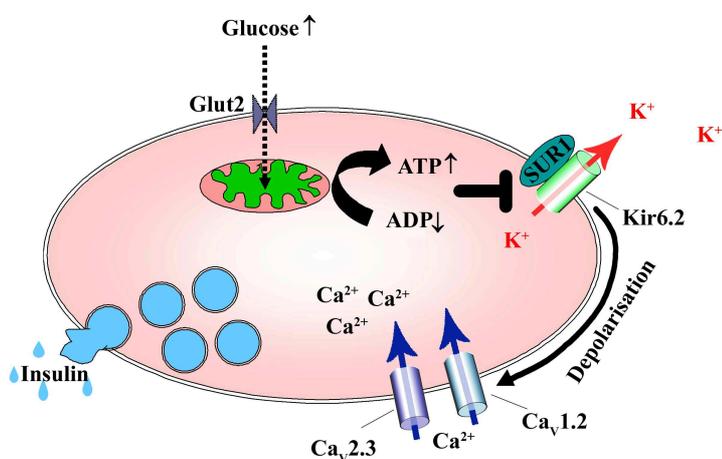


Fig. 1.3: Modell der Insulinfreisetzung in einer B-Zelle. Der  $K_{ATP}$ -Kanal besteht aus einem Kir6.2 Kaliumkanal und einem Sulfonylharnstoff-Rezeptor (SUR1). GLUT2: Glukosetransporter-2;  $\text{Ca}_v2.3$ ,  $\text{Ca}_v1.2$ : spannungsabhängige Kalziumkanäle. Erläuterung siehe Text (nach 63).

Glukose wird über den Glukosetransporter  $\text{GLUT2}$  in die B-Zelle aufgenommen. Dort wird sie von der Glukokinase phosphoryliert—in den Mitochondrien zu ATP verstoffwechselt. Somit führt der Glukose-Metabolismus zu einer Erhöhung des ATP / ADP-Verhältnisses in der B-Zelle. Ein Anstieg des ATP / ADP-Verhältnisses hemmt die  $K_{ATP}$ -Kanäle (20; 62). Der  $K_{ATP}$ -Kanal besteht aus einem Komplex aus einer Sulfonylharnstoffrezeptor-Untereinheit (SUR1) und dem Kaliumkanal Kir6.2. Durch die Hemmung des Kanals depolarisiert die Zellmembran und spannungsabhängige L-Typ Kalziumkanäle ( $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal) öffnen sich, so dass Kalzium in die Zelle einströmt (5). Die Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) führt zur Auslösung von Aktionspotentialen und zur Fusionierung von

insulinhaltenden Granula mit der Zellmembran, wodurch diese über Exozytose ausgeschüttet werden (6; 61; 22). Die Repolarisation der Membran wird direkt durch  $Ca^{2+}$  aktivierte  $K^+$ -Kanäle (SK-Kanäle) und indirekt über  $K_{ATP}$ -Kanäle verursacht. Aufgrund einer erhöhten  $Ca^{2+}$ -ATPase-Aktivität sinkt das ATP / ADP-Verhältnis, wodurch  $K_{ATP}$ -Kanäle aktiviert werden (35; 75; 35; 47). Neben Glukose stimulieren Sulfonylharnstoffe, wie beispielsweise Glibenclamid und Tolbutamid die Insulinausschüttung durch direkte Hemmung der  $K_{ATP}$ -Kanäle über eine Interaktion mit der SUR1-Untereinheit des  $K_{ATP}$ -Kanals (53). Die Insulinsekretion verläuft biphasisch (siehe Abb. 1.4).

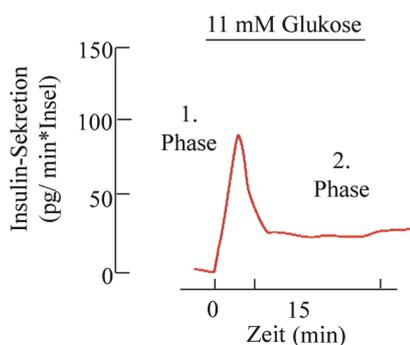


Fig. 1.4: Die Insulin-Sekretion erfolgt biphasisch. Die Glucose-Konzentration wurde auf 11 mM erhöht. (nach 63)

In der ersten Phase wird eine schnelle und effiziente Ausschüttung von Insulin über spannungsabhängige Kalziumkanäle des L-Typs getriggert (47). Etwa 50 Insulingranula von ca. 10 000 werden pro B-Zelle während dieser Phase ausgeschüttet (8). Die restlichen Vesikel werden in der langsamen transienten 2. Phase ausgeschüttet, die von Nicht-L-Typ Kalziumkanälen gesteuert wird. Durch ein geeignetes Knockout-Mausmodell konnte gezeigt werden, dass der L-Typ Kalziumkanal  $Ca_v1.2$  für die 1. Phase verantwortlich ist (66). Die 2. Phase wird durch den Nicht-L-Typ Kalziumkanal  $Ca_v2.3$  geregelt (34).

## 1.4 Glukagon-Sekretion

Glukagon ist der Gegenspieler von Insulin und wird von den A-Zellen des Pankreas bei niedrigem Blutzuckerspiegel segregiert. Die Sekretion wird durch Nährstoffe, zirkulierende Hormone und Neurotransmitter reguliert (55). Die Glukagonsekretion erfolgt ebenfalls  $Ca^{2+}$ -abhängig und ist wesentlich schneller als die Insulinsekretion (7). Welche Ionenkanäle involviert sind und in welcher Form sie wirken ist immer noch unklar. In den A-Zellen der Maus konnten bereits T-Type Kalzium-, Natrium- und spannungsgesteuerte Kaliumkanäle nachgewiesen werden (27). Es wurde spekuliert, dass nur wenige  $K_{ATP}$ -Kanäle in A-Zellen exprimiert werden. Durch die resultierende partielle Depolarisation der Zellen bei niedriger Plasmaglukose werden spannungsabhängige Natriumkanäle aktiviert, die die nachfolgende elektrische Aktivität mit Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  und Hormonfreisetzung auslösen (27; 15; 49). Weitere Depolarisation inaktiviert die an der Glukagonsekretion beteiligten Natrium- und Kaliumkanäle und hemmt so die weitere Glukagonfreisetzung. Dieses Konzept steht in Widerspruch zu Ergebnissen an  $K_{ATP}$ -defizienten Mäusen, bei denen die Hemmung der Glukagonsekretion durch erhöhte Glukosekonzentrationen unverändert war (48). Andere beschreiben eine Beteiligung von T-Typ Kalziumkanälen, die bei niedrigen Plasmaglukosewerten aktiviert werden und das Membranpotential bis zur Aktivierung von HVA (high voltage activated) Kalziumkanälen depolarisieren (27; 35).

## 1.5 Spannungsabhängige Kalziumkanäle

Spannungsabhängige Kalziumkanäle dienen der Signaltransduktion, spielen für die Regulation der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration eine wesentliche Rolle und tragen somit zur Signalverarbeitung in zahlreichen Zellen bei. Zu den  $Ca^{2+}$ -abhängigen Prozessen zählen unter anderem die Kontraktion des Herzens und der glatten Muskulatur, die elektromechanische Kopplung im Skelettmuskel und die Synthese und Sekretion von Neurotransmittern und Hormonen (33). Die Öffnung der Kalziumkanäle wird durch das Membranpotential gesteuert. Sie werden durch Hormone, Proteinkinasen, Phosphatasen, Toxine und Medikamente moduliert. Aufgrund elektrophysiologischer Messungen lassen sich L-, N-, P-, Q-, R- und T-Typ Kalziumkanäle unterscheiden (39).

### 1.5.1 Aufbau spannungsabhängiger Kalziumkanäle

Spannungsgesteuerte Kalziumkanäle sind heterooligomere Komplexe, die aus bis zu vier Untereinheiten bestehen. Die wichtigste und größte ist die porenbildende und ionenleitende  $\alpha_1$ -Untereinheit, welche den Spannungssensor, den Selektivitätsfilter und die Bindungsstellen für die Kanalblocker beinhaltet. Darüber hinaus gibt es eine Reihe von Hilfsuntereinheiten, die  $\beta$ ,  $\alpha_2$ - $\delta$  und  $\gamma$ -Untereinheiten, welche unter anderem die Kinetik des Kalzium-Stroms beeinflussen (33). Die  $\alpha_1$ -Untereinheit wird aus vier homologen Domänen (I–IV) gebildet, die sich wiederum aus je sechs transmembranen Segmenten zusammensetzen.

Es wurden bis jetzt zehn verschiedene  $\alpha_1$ -Untereinheiten kloniert. Der gebräuchlichen Nomenklatur entsprechend werden diese Kanäle als  $Ca_V1.1$ – $Ca_V3.3$  bezeichnet. Der Index „v“ steht für „voltage-activated“ (engl. spannungsaktiviert), die erste Ziffer kennzeichnet die Genfamilie und die zweite Ziffer steht für ein bekanntes Gen. Die  $Ca_V$ -Kanäle können gemäß ihrer pharmakologischen und elektrophysiologischen Eigenschaften in sogenannte hochspannungsaktivierte (high-voltage-activated, HVA) und niederspannungsaktivierte (low-voltage-activated, LVA) oder T-Typ (transient) ( $Ca_V3$ ) Kalziumkanäle unterteilt werden (33). HVA-Kanäle lassen sich weiterhin in *L-Typ* (long-lasting) ( $Ca_V1$ ) sowie *Non-L-Typ-Kalziumkanäle* ( $Ca_V2$ ) unterteilen (Abb. 1.5).

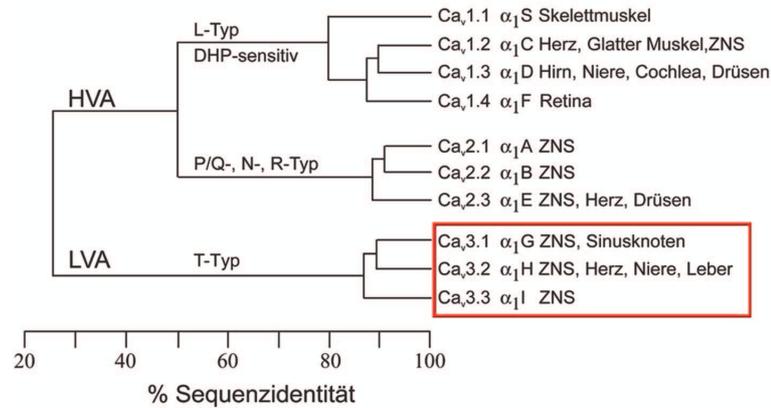


Fig. 1.5: Genetische Vielfalt der  $\alpha_1$ -Untereinheit (nach 19) Die in dieser Arbeit analysierten Kalziumkanäle sind durch einen roten Rahmen gekennzeichnet.

### 1.5.2 T-Typ Kalziumkanäle

T-Typ Kalziumkanäle werden durch das zum Auslösen von makroskopischen Einwärtsströmen benötigte Schwellen-Membranpotential von  $-60$  mV charakterisiert. Sie öffnen und inaktivieren sehr schnell (T für transient), deaktivieren aber um das 10 bis 100 fache langsamer als HVA-Kalziumkanäle. Sie haben eine geringe Leitfähigkeit (T auch für tiny) (40).

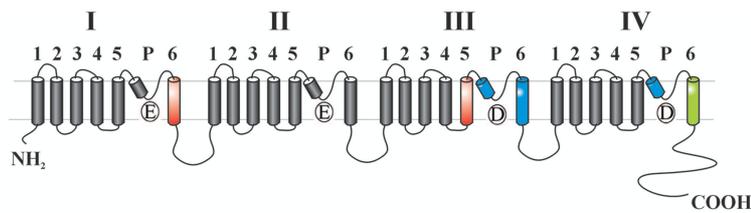


Fig. 1.6:  $\alpha_1$ -Untereinheit des T-Typ Kalziumkanals mit den Domänen I-IV und den Segmenten 1-6, P: Poren und Selektivitätsfilter; E: Glutamat; D: Aspartat (nach 40)

Man kennt drei Subtypen  $Ca_v3.1$ - $Ca_v3.3$  ( $\alpha_1G$ , H und I). In der Abbildung 1.6 ist schematisch die  $\alpha_1$ -Untereinheit der T-Typ Kalziumkanäle dargestellt. Sie wurden im Herzen, Gehirn, Nebenniere und Rückenmark gefunden. Durch Northern-Analyse konnten  $Ca_v3.1$  hauptsächlich im Gehirn und in geringen Mengen im Herzen,  $Ca_v3.2$  hauptsächlich im Herzen, Niere und Leber und  $Ca_v3.3$  im Gehirn,

nachgewiesen werden (21). Ihre Funktion ist vielseitig diskutiert. Es wird vermutet, dass sie eine Rolle bei der Muskelerregbarkeit, neuronaler Oszillation und Sekretion haben, sowie als Schrittmacher fungieren können (72). Im Herzen wird vermutet, dass sie das Aktionspotential im Sinusknoten erzeugen, eine Depolarisation der Zellmembran hervorrufen und die Erregungsfortleitung im Atrioventrikularknoten weiterleiten können. In einer Studie wurde bereits gezeigt, dass der Kalziumeinstrom durch T-Typ Kalziumkanäle im embryonalen Herzen eine wichtige Aufgabe für die  $Ca^{2+}$ -Ausschüttung übernimmt (37). Die Funktion der T-Typ Kalziumkanäle in den Inselzellen der Maus ist noch unklar. Es wurde vermutet, dass sie als Schlüsselaktivatoren die Zellmembran so depolarisieren, dass HVA Kalziumkanäle aktiviert werden können (27). Die Expression von T-Typ Kalziumkanälen in pankreatischen Inselzellen ist speziesabhängig, so werden sie bei Nagetieren nur selten bis gar nicht exprimiert, während sie beim Menschen eindeutig detektiert werden konnten (54; 73).

## 1.6 Spannungsabhängige Natriumkanäle

Spannungsabhängige Natriumkanäle sind für die Auslösung und Fortpflanzung von Aktionspotentialen in Nerven, Muskeln und neuroendokrine Zellen verantwortlich. In geringen Mengen werden sie in den nicht-erregbaren Zellen exprimiert, ihre physiologische Funktion ist allerdings in diesen Zellen noch unklar (18). Der Natriumkanal in einer Säugetierzelle besteht aus der  $\alpha$ -Untereinheit, welche für das funktionelle Kanalprotein kodiert (ca. 260 kDa) und einer oder mehreren  $\beta$ -Hilfsuntereinheiten (52) (Abb. 1.7).

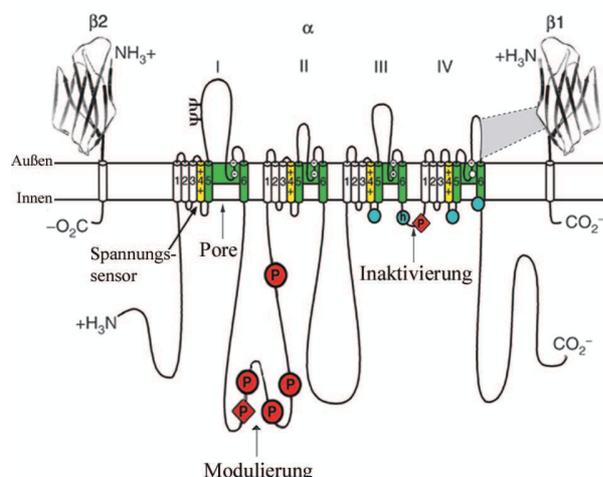


Fig. 1.7: Schematische Darstellung der  $\alpha$ - und  $\beta$  ( $\beta_1$  und  $\beta_2$ )-Untereinheiten des Natriumkanals am Beispiel des  $Na_V1.2$ . Die extrazellulären Domänen der  $\beta$ -Untereinheiten sind als immunoglobulin-ähnliche Faltungen, die mit den Schleifen der  $\alpha$ -Untereinheit interagieren, dargestellt. Die römischen Zahlen bedeuten die vier homologen Domänen I-IV, die Segmente 5 und 6 und die dazwischenliegende Schleife (grün) bilden die Pore aus. S4 Helices (gelb) bilden den Spannungssensor (+) und die Bindungsstelle für TTX (Tetrodotoxin). Die blauen Kreise in den intrazellulären Schleifen der Domänen III und IV zeigen die Inaktivierungsstelle (IFM Motiv: Isoleuzin, Phenylalanin, Methionin) und Rezeptor (h); P = Phosphorylierungsstellen (rote Kreise = Protein Kinase A, PKA-Bindestellen; rote Rauten = Protein Kinase C, PKC-Bindestellen);  $\psi$  = eventuelle N-gelinkte Glykosylierungsstelle. Kreise auf den Schleifen = Ionen-Selektivitätsfilter (Aminosäuren) (nach 74).

Zur Zeit sind zehn verschiedene Gene ( $Na_V1.1$ - $Na_V1.9$ ,  $Na_x$ ) von spannungsaktivierten Natriumkanälen bekannt, davon sechs TTX-sensitive (24) (Abb.1.8).

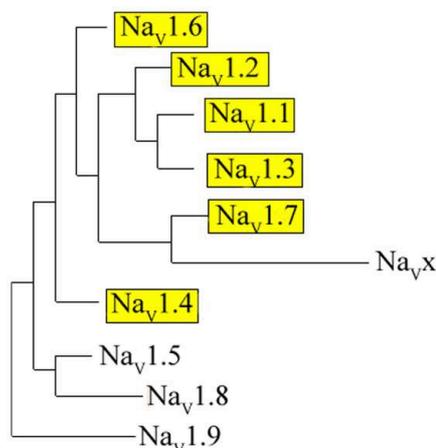


Fig. 1.8: Genetische Vielfalt der spannungsabhängigen Natriumkanäle. Die TTX-sensitiven Natriumkanäle sind gelb unterlegt (nach 24).

$Na_V1.1$ ,  $Na_V1.2$ ,  $Na_V1.3$  und  $Na_V1.7$  sind zusammen auf Chromosom 2 des Menschen und der Maus lokalisiert und zeigen eine Vielzahl gemeinsamer Eigenschaften. Sie werden im Zentralen Nerven System (ZNS) gefunden und durch nanomolare TTX-Konzentrationen geblockt.  $Na_V1.1$ ,  $Na_V1.2$  und  $Na_V1.3$  werden hauptsächlich im ZNS exprimiert, während  $Na_V1.7$  im Peripheren Nerven System (PNS) im Zusammenhang mit der Schmerzwahrnehmung beobachtet wurde (50).  $Na_V1.4$  und  $Na_V1.6$  werden ebenfalls durch nanomolare TTX-Konzentrationen geblockt (18).  $Na_V1.6$  wird am meisten von allen Kanälen im ZNS exprimiert, während  $Na_V1.4$  hauptsächlich im Skelettmuskel gefunden wurde (23).

Die mRNA des Natriumkanals  $Na_Vx$  konnte in Maus, Mensch und Ratte identifiziert werden, aber dessen Funktion und Expression ist noch unklar.

Bisher wurden zwei verschiedene TTX-sensitive Natriumströme in den Inselzellen gefunden. Ein frühinaktivierender Natriumstrom, der nur bei einem hyperpolarisierten Haltepotential von  $V_h = -120$  mV aktiv ist und ein Natriumstrom, der auch bei einem physiologischen Haltepotential von  $V_h = -80$  mV noch aktiviert war (27; 9). Wie wichtig sie jedoch für die Sekretion der beiden Hormone Insulin und Glukagon sind, ist bis jetzt noch nicht geklärt worden (56). Außerdem ist die molekularbiologische Grundlage dieser Ströme noch unbekannt.

## 1.7 Ziel dieser Arbeit

Bisher konnten verschiedene Ionenkanäle in den Inselzellen des Pankreas charakterisiert werden (27). Es war aber nicht immer eindeutig, ob es sich bei den analysierten Zellen um A- oder B-Zellen handelt. Das Ziel dieser Arbeit war in erster Linie die Etablierung einer funktionierenden und zuverlässigen Nachweismethode, mit der man eindeutig A- und B-Zellen voneinander unterscheiden kann und somit die Ergebnisse einem Zelltyp zuordnen kann.

Der Mechanismus der Insulinsekretion aus den B-Zellen des Pankreas ist gut untersucht. Bei hohem Blutzuckerspiegel wird vermehrt Insulin aus den B-Zellen segregiert. Es ist auch bekannt, dass die Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$ , sowie die spannungsabhängigen Kalziumkanäle  $Ca_V1.2$  (1. Phase (66)) und  $Ca_V2.3$  (2. Phase (34)) maßgeblich an der Insulinfreisetzung beteiligt sind. Glukagon ist der funktionelle Antagonist von Insulin und wird bei niedrigem Blutzuckerspiegel vermehrt aus den A-Zellen des Pankreas ausgeschüttet (55). Auch hier ist die  $[Ca^{2+}]_i$  entscheidend für die Freisetzung des Hormons (7). Es wird vermutet, dass Natrium- oder T-Typ Kalziumkanäle an dem Mechanismus der Glukagonfreisetzung beteiligt sind. Daher wurden T-Typ Kalziumkanäle und Natriumkanäle in Kontroll- und Knockout-Inselzellen der Maus mit elektrophysiologischen, pharmakologischen und molekularbiologischen Methoden untersucht. Mit einer A-Zellspezifischen  $Na_V1.7^{-/-}$ -Knockout-Maus sollte die molekulare Grundlage der Natriumströme in A- und B-Zellen geklärt werden.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Isolierung und Kultivierung der Inselzellen

#### 2.1.1 Verwendete Chemikalien

In den folgenden Tabellen 2.1 und 2.2 sind die in dieser Arbeit verwendeten Substanzen für die Isolierung und Kultivierung der Inselzellen aufgeführt.

Substanz	Referenz	Volumen
<i>HBSS</i>	Sigma-Aldrich Chemie, München, D	9,7 g
<i>NaHCO<sub>3</sub></i>	Roth, Karlsruhe, D	0,35 g
<i>H<sub>2</sub>O</i>	-	1 l

Tab. 2.1: Zusammensetzung des HANKS-Puffers

Substanz	Referenz
Kollagenase aus <i>C. histolyticum</i> (1 U/mg)	Serva Elektrophoresis, Heidelberg, D
RPMI Medium 1640 mit L-Glut	Gibco BRL, Karlsruhe, D
Fetal Calf Serum (FCS)	Biochrom AG, Berlin, D
Penicillin / Streptomycin	Biochrom AG, Berlin, D

Tab. 2.2: Chemikalien für die Zellkultur

#### 2.1.2 Präparation der Langerhans'schen Inseln

Vor der Präparation wurden 4,7 ml HANKS-Puffer mit 100  $\mu$ l Kollagenaselösung (0,32 mg in 1 ml entionisierten *H<sub>2</sub>O* gelöst, Endkonzentration 8 U/ $\mu$ l) versetzt und auf Eis gestellt. Die Maus wurde durch zervikale Dislokation getötet und auf einer Styroporplattform mit Injektionsnadeln befestigt. Anschließend wurde die Bauchdecke bis zum Brustkorb aufgeschnitten und der Gallengang durch Beiseiteschieben

des Magen–Darmtrakts freigelegt. Mit chirurgischen Klemmen, sogenannten *bull-dog*–Klemmen, wurde die Mündung des Gallengangs in den Darm abgeklemmt (siehe Abbildung 2.1). So konnten mit Hilfe einer Insulinspritze ca. 2 ml Kollagenaselösung über den Gallengang in das Pankreas injiziert werden.

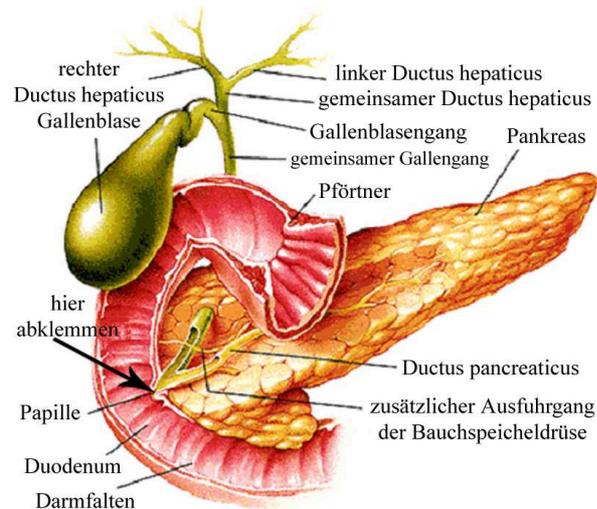


Fig. 2.1: Schematische Darstellung des Pankreas. Der Pfeil deutet auf die Abklemmstelle hin. (Quelle: 3)

Anschließend wurde das Pankreas in ein 15 ml Falkonröhrchen überführt und 15 Minuten bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Wasserbad inkubiert. Das Gewebe wird durch Kollagenfasern zusammengehalten, die durch die Kollagenase abgebaut werden, so dass die Langerhans–Inseln isoliert werden können. Eine Schädigung der Inseln durch die Kollagenase wurde durch kurze Inkubationszeit und anschließender Neutralisierung mit  $10\text{ ml } 1 \times \text{HBSS}$  (Hank’s balanced salt solution)–Puffer verhindert. Dieser Puffer sorgt dafür, dass der natürliche pH–Wert und das osmotische Gleichgewicht, sowie die Versorgung der Zellen mit Wasser und essentiellen, anorganischen Ionen während der Isolierung gewährleistet wird und ermöglicht somit ein Überleben dieser. Durch kräftiges Schütteln, wurde das verdaute Pankreasgewebe vollständig zersetzt und einzelne Inseln freigesetzt. Anschließend wurde der Inhalt des Falkonröhrchens auf zwei weitere zu je 5 ml aufgeteilt und wieder mit  $1 \times \text{HBSS}$ –Puffer auf 10 ml aufgefüllt. Diese Röhrchen stellte man kurze Zeit auf Eis, bis sich alles am Boden abgesetzt hatte. Mit einer 10 ml Stripette wurde der Überstand abgenommen

und verworfen. Das Insel-Pellet wurde nochmals mit  $1 \times$  *HBSS*-Puffer gewaschen und anschließend wurden die einzelnen Inseln sukzessiv in einer 3 ml Petrischale unter stereoskopischer Kontrolle mit einer  $200 \mu\text{l}$  Pipette gepickt und in eine mit  $1 \times$  *HBSS*-Puffer gefüllten Petrischale überführt. Die folgenden Schritte erfolgten unter der Sterilbank, um diverse Verunreinigungen durch Bakterien und Pilze zu vermeiden.

### 2.1.3 *Kultivierung der Inselzellen*

In eine 24-Loch-Platte wurden Plastik-Deckplättchen (NUNC, Brand Products, Rochester, USA) gelegt und mit  $500 \mu\text{l}$  RPMI 1640-Medium überschichtet. Das Medium wurde zuvor mit 10 % FCS (Fetal Calf Serum) (dies benötigen die Zellen für ein besseres und schnelleres Wachstum) und 1 % einer Antibiotika-Lösung, bestehend aus gleichen Anteilen von Penicillin und Streptomycin, (zur Vermeidung von Kontamination) versetzt. Jeweils 15–20 Inseln wurden pro Loch in die Platte pipettiert und über Nacht bei  $37^\circ\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  Atmosphäre inkubiert. Um einzelne Zellen aus den Inseln zu gewinnen, wurden diese mit einer  $1000 \mu\text{l}$  Pipette mehrmals auf und ab pipettiert. Durch die vier wichtigen Bestandteile (Aminosäuren, Kohlenhydrate, anorganische Salze und Vitamine) des RPMI-1640 Mediums, wurden die Zellen während der Kultivierung mit den nötigen Nährstoffen, um den Stoffwechsel aufrecht zu erhalten, versorgt und konnten somit bis zu 3 Tage im Brutschrank aufbewahrt werden.

## 2.2 *Molekularbiologische Methoden*

### 2.2.1 *mRNA-Isolierung mittels Dynabeads*

Bei der Isolierung von RNA gewinnt man neben der für die Weiterverwendung essentiellen messenger RNA (mRNA) auch ribosomale RNA (rRNA) und Transfer-RNA (tRNA). Zum Nachweis von in den Zellen vorkommenden Proteinen wird ausschließlich mRNA benötigt, deren prozentualer Anteil gerade nur 5 % der gesamten RNA ausmacht. Um ausreichend mRNA aus geringen Gewebemengen zu gewinnen, wurde das *Dynabeads mRNA Purification Kit* (DynaL Biotech, Hamburg, Deutschland) verwendet. Mit dieser Methode wird ausschließlich mRNA gewonnen. Durch selektive Bindung der polyA-Sequenz an OligodT beschichtete, magnetische

Partikel (engl. beads), kann die mRNA in einem Magnetfeld durch entsprechende Puffer aufgereinigt werden. Diese kann dann schließlich durch  $H_2O_{DEPC}$  (mit 0,1 % Diethylpyrocarbonat behandeltes  $H_2O$ ) und Hitze wieder von den Dynabeads eluiert und isoliert werden (36). Da Inselzellen nur einen geringen Anteil an Gewebe haben und somit wenig mRNA liefern, wurde diese Methode zur Isolierung dieser angewandt. Folgende Chemikalien wurden zur Herstellung der Puffer benötigt.

- *Tris – HCl* ..... Merck, Darmstadt, Deutschland
- Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) ..... Roth, Karlsruhe, Deutschland
- *LiCl* ..... Merck, Darmstadt, Deutschland
- Guanidin-Thio-Cyanat (*GTC*) ..... Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Dithiotreitol (*DTT*) ..... Roth, Karlsruhe, Deutschland
- N-Lauryl-Sarcosinat ..... Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
- Eisessig ..... Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Na-Acetat (NaAc) ..... Roth, Karlsruhe, Deutschland
- $\beta$ -Mercaptoethanol ..... Merck, Darmstadt, Deutschland

Es wurden folgende Puffer hergestellt:

- 1× Binde-Puffer (50ml)

Substanz	<i>Tris – HCl</i>	<i>EDTA</i>	<i>LiCl</i>
Volumen	5 ml	2 ml	0,848 g
Konzentration	1 M	0,5 M	-

Tab. 2.3: Binde-Puffer

- 1× Wasch-Puffer (50ml)

Substanz	<i>Tris - HCl</i>	<i>EDTA</i>	<i>LiCl</i>
Volumen	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l	0,318 g
Konzentrtaion	1 M	0,5 M	-

Tab. 2.4: Wasch-Puffer

- 4M GTC-Lösung (50ml)

Substanz	<i>NaAc</i>	<i>GTC</i>	<i>DTT</i>	N-Lauryl-Sarcosinat
Volumen	330 $\mu$ l	23,65 g	5 $\mu$ l	0,25 g
Konzentration	3 M	4 M	1 M	-

Tab. 2.5: GTC-Lösung

Zur Herstellung der Lösungen wurde  $H_2O_{DEPC}$  verwendet.

#### Durchführung:

Inselzellen wurden in flüssigem Stickstoff ( $N_2$ ) schockgefroren und danach mit einer 900  $\mu$ l GTC- $\beta$ -Mercaptoethanol-Lösung überschichtet (1 ml 4 M GTC; 6,5  $\mu$ l  $\beta$ -Mercaptoethanol), homogenisiert und mit einer 2 ml Spritze zusätzlich geschert. Anschließend wurden 800  $\mu$ l Binde-Puffer dazupipettiert, gevortext, bei 14 000 rpm für 5 Minuten bei 4 °C zentrifugiert und auf die Dynabeads pipettiert. Nachdem sich alles gut gelöst hatte, wurde das Eppendorfgefäß 5 Minuten im Über-Kopf-Schüttler inkubiert und anschließend 2 min in das Magnetfeld gestellt. Die magnetischen Dynabeads blieben am Rand des Gefäßes kleben, wodurch der Überstand ohne Probleme entnommen werden konnte. Anschließend wurden die Dynabeads 3× mit Wasch-Puffer gewaschen und in 10  $\mu$ l  $H_2O_{DEPC}$  5 min bei 65 °C inkubiert. Dies ist erforderlich, um die RNA von den Dynabeads zu lösen. Danach wurde der Überstand wieder entnommen und die Dynabeads für eine weitere Isolierung aufgereinigt. Anschließend erfolgte nach erfolgreicher Isolierung eine photometrische Konzentrationsbestimmung der RNA mit einem UV-Spektrometer. Hierfür wurde die Extinktion der verdünnten RNA-Lösung bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 260$  nm und 280 nm

bestimmt. Der Quotient aus  $OD_{260} / OD_{280}$  erlaubt in Abhängigkeit vom pH-Wert der Verdünnungslösung eine Aussage über den Reinheitsgrad der RNA bzw. DNA. Hochreine RNA bzw. DNA hat bei einem pH-Wert von 7,5 einen  $OD_{260} / OD_{280}$ -Quotienten von 1,8 bis 2,1. Die in dieser Arbeit bestimmten Quotienten der RNA- und DNA-Lösungen betragen zwischen 1,9 und 2,0. Eine  $OD_{260}$ -Einheit entspricht einer Konzentration von  $40 \mu\text{g RNA} / \text{ml}$  bzw.  $50 \mu\text{g DNA} / \text{ml}$ . Die Berechnung der RNA-Konzentration erfolgte mit folgender Formel:

$$c = OD_{260} \cdot 40 \cdot Verd. [\mu\text{g/ml}] \quad (2.1)$$

$c$ -Konzentration;  $OD$ -optische Dichte;  $40 \hat{=}$  RNA-Konstante

### 2.2.2 RNA-Isolierung mittels TRIZOL-Reagenz

Um ausreichend mRNA aus großen Gewebe-Mengen zu gewinnen wurde Gesamt-RNA mittels *TRIZOL-Reagenz* isoliert. Das Trizol (Gibco BRL, Karlsruhe, D) dient hierbei zum Schutz der empfindlichen RNA vor endogenen und exogenen RNasen. Die Ausbeute an Gesamt-RNA beträgt pro 1 mg Gewebe 0,5 bis  $1 \mu\text{g}$ . Diese Methode wurde im Rahmen dieser Arbeit zur Isolierung von Gesamt-RNA aus dem Gehirn, Herz und der Beinmuskulatur der Maus verwendet.

#### Durchführung:

Das Gewebe wurde in flüssigem  $N_2$  schockgefroren, zermörsert und in Trizol ( $750 \mu\text{l}$  pro 100 mg Gewebe) homogenisiert. Pro  $750 \mu\text{l}$  Trizol-Reagenz wurden  $200 \mu\text{l}$  Chloroform dazugegeben und gut vermischt. Nach 7 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Gemisch 15 Minuten bei  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert (14000 rpm). Es entstanden 2 Phasen: die wässrige Phase (obere) und eine Chloroform-Phase (untere). In der wässrigen Phase ist die RNA enthalten. Dieser Vorgang dient dazu, die RNA von im Gewebe enthaltener DNA zu trennen.

Die wässrige Phase wurde vorsichtig entnommen, mit  $500 \mu\text{l}$  Isopropanol versetzt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde wieder bei  $4^\circ\text{C}$  und 14000 rpm 10 Minuten zentrifugiert. Mit diesem Schritt wurde die RNA aus der wässrigen Phase gefällt. Die flüssige Phase wurde daraufhin entfernt, das Pellet mit 1 ml Ethanol überschichtet und 5 min bei  $4^\circ\text{C}$  und 9500 rpm zentrifugiert. Danach

wurde die RNA nach Entnahme des Ethanols bei  $37^{\circ}\text{C}$  luftgetrocknet und anschließend in einem Volumen von  $20\text{--}40\ \mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_{DEPC}$  bei  $55^{\circ}\text{C}$  10 Minuten lang gelöst. Um eine frühzeitige Zersetzung der RNA durch RNasen zu vermeiden wurde  $\text{H}_2\text{O}_{DEPC}$  verwendet. Anschließend wurde die RNA-Konzentration mit der gleichen Methode wie zuvor photometrisch bestimmt. Je nachdem welche Konzentration man erhielt, wurden zwischen  $2$  und  $5\ \mu\text{l}$  RNA für die cDNA-Synthese eingesetzt.

### 2.2.3 Herstellung von codierender DNA (cDNA) durch Reverse Transkription

Um die gewonnene mRNA auf die Expression bestimmter Gene zu untersuchen, wurde sie in cDNA umgeschrieben, die gegenüber RNasen unempfindlich und somit leichter zu handhaben ist. Die cDNA-Synthese erfolgte mit Hilfe und nach Vorschrift des kommerziellen cDNA-Synthese-Kits *SuperScript II* (Gibco, BRL, Karlsruhe, Deutschland), durch die man mit Hilfe der Reversen Transkriptase (RT) und einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase die vorliegende RNA in cDNA umschreiben kann. Die Transkription durch die RT beginnt am freien 3'-Hydroxyl-Ende eines Primers, der über Wasserstoffbrückenbindungen der komplementären Basen an die Matrizen-RNA gebunden ist.

#### Durchführung:

Zuerst wurde die mRNA bei  $72^{\circ}\text{C}$  denaturiert, um möglicherweise gebildete Schleifen innerhalb der RNA zu zerstören. Erst so können sich die Primer an den Strang binden.  $1\ \mu\text{l}$  Oligo dT-Primer wurde zu  $5\ \mu\text{l}$  mRNA-Lösung pipettiert, 10 Minuten bei  $70^{\circ}\text{C}$  und 2 Minuten auf Eis inkubiert. Diese Primer binden an das PolyA-Ende der mRNA. Im Gegensatz zu normalen Standard-Primern, die nur an eine bestimmte Sequenz innerhalb des Strangs binden und somit nur definierte Bereiche amplifizieren können, sind die Oligo-dT-Primer in der Lage den kompletten RNA-Strang zu synthetisieren. Im nächsten Schritt wurden  $4\ \mu\text{l}$  First Strandbuffer (ein für das Enzym Superscript II geeigneter Puffer),  $2\ \mu\text{l}$   $0,1\ \text{M}$  DTT (Reduktionsmittel, zur Spaltung von Disulfidbrücken zwischen Cystein-Resten) und  $1\ \mu\text{l}$  dNTP's dazupipettiert und 2 Minuten bei  $42^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Danach wurde das Enzym Superscript II, das die mRNA in einzelsträngige cDNA umwandelt, hinzugefügt. 60 Minuten lang bei  $42^{\circ}\text{C}$  wurde dann der DNA-Strang komplementär zum vorliegenden mRNA-

Matrizenstrang polymerisiert. Danach wurde 5 Minuten bei  $90^{\circ}\text{C}$  denaturiert und mit  $1\ \mu\text{l}$  RNase H der RNA-Strang verdaut. Anschließend folgte eine Inkubationsphase von 20 Minuten bei  $37^{\circ}\text{C}$ . Die hier entstandene cDNA wurde bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt und diente als Matrize für weitere PCRs mit sequenzspezifischen Primern.

#### 2.2.4 Isolierung genomischer DNA

Um die genomische DNA aus verschiedenen Geweben zu gewinnen wurde folgendes Kit und zusätzliche Substanzen verwendet.

- *QIAampDNA Mini Kit*<sub>51304</sub> ..... Qiagen GmbH, Hilden
- $10 \times$  PCR-Puffer ..... Promega GmbH, Mannheim
- Proteinase K ..... Qiagen GmbH, Hilden
- Chloroform ..... Merck, Darmstadt
- Ethanol ..... Roth, Karlsruhe

In dem QIAamp DNA Mini Kit sind die Puffer AL, ATL, AW1, AW2 und AE, sowie die Proteinase K, Eppendorfgefäße und Auftrennsäulchen enthalten. Die Isolierung genomischer DNA dient hauptsächlich für PCR- und Southernblot-Reaktionen. Das QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) erweist sich hierbei als sehr hilfreich. Mit Hilfe eines Säulchen-Systems wird die DNA in 20 Minuten aus Gewebe oder kultivierten Zellen isoliert und aufgereinigt. Die DNA ist anschließend sauber von Proteinen, Nucleasen und anderen Kontaminationen oder Inhibitoren (58). Die genomische DNA wurde im Rahmen dieser Arbeit aus den generierten Knockout (KO)-Mäusen isoliert, zum Nachweis des Genotyps. Alle Schritte erfolgten nach der Anleitung von Qiagen.

#### Durchführung:

Von jeweils drei KO- und Kontrollmäusen wurden die Langerhans Inseln isoliert und mit  $180\ \mu\text{l}$  ATL-Puffer und  $20\ \mu\text{l}$  Proteinase K versetzt und über Nacht bei

56 °C unter ständigem Schütteln verdaut. Zur Überprüfung, ob die Deletion gewebespezifisch ist, wurde von beiden Mauslinien die genomische DNA auch aus einer geringen Menge Herz-Gewebe mit der gleichen Methode isoliert.

Danach wurden die Proben kurz zentrifugiert, um alle Tropfen vom Rand des Eppendorfgefäß zu entfernen, mit 100 µl AL-Puffer versetzt, nochmals kurz abzentrifugiert und anschließend 10 min bei 70 °C inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl 96 % Ethanol und kurzem Durchschütteln, wurden die Proben restlos auf die Säulchen überführt. Diese wurden bei 8000 rpm 1 min lang zentrifugiert, bevor sie anschließend mit jeweils 500 µl AW1- und AW2-Puffer gewaschen wurden. Der Waschvorgang erfolgte bei beiden Puffern gleich. Nach Zugabe des AW1-Puffer wurden die Säulchen bei 8000 rpm 1 min und nach Zugabe von AW2-Puffer 3 min lang bei 14000 rpm zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen. An dieser Stelle sollte die DNA weitgehend aufgereinigt sein. Um diese von den Säulchen zu trennen, wurden 200 µl AE-Puffer hinzugefügt und bei Raumtemperatur 5 min inkubiert. Diese Zeit wird benötigt, damit die DNA vom Säulenmaterial gelöst werden kann. Anschließend wurden diese wieder bei 8000 rpm 1 min lang abzentrifugiert. Um auszuschließen, dass Rest-DNA auf der Säule hängengeblieben ist, wurde dieser Schritt ein zweites mal durchgeführt. Anschließend wurde das Eluat, in dem die DNA enthalten sein sollte, photometrisch analysiert und dadurch die DNA-Konzentration nach gleicher Methode, wie für die RNA bestimmt.

Folgende Formel wurde für die Umrechnung verwendet:

$$c = OD_{260} \cdot 50 \cdot Verd. [\mu g/ml] \quad (2.2)$$

c-Konzentration; OD-optische Dichte; 50 ≙ DNA-Konstante

### 2.2.5 DNA-Aufreinigung

Um gewonnene DNA möglichst rein und frei von Protein- und Salzresten zu bekommen, wurde diese mittels einer Salz-Fällung aufgereinigt. Folgende Substanzen wurden hierfür verwendet.

- Roti-Phenol/C/I ≙ Phenol/Chloroform ..... Roth, Karlsruhe
- 5 M NaCl ..... Merck, Darmstadt

- Ethanol ..... Roth, Karlsruhe

Die DNA-Lösung wurde zuerst auf 400  $\mu\text{l}$  verdünnt, mit weiteren 400  $\mu\text{l}$  Phenol / Chloroform-Lösung überschichtet und gut gevortext. Anschließend wurde das Gemisch in der Tischzentrifuge kurz abzentrifugiert. Es entstanden 3 Phasen: die obere Phase enthält die DNA, die mittlere und untere bestehen aus Phenol und Chloroform. Die obere Phase wurde entnommen und weiterverarbeitet. Anschließend wurden 40  $\mu\text{l}$  5 M *NaCl* dazu pipettiert und die 2,5fache Menge 100 % Ethanol hinzugefügt. Alles wurde wieder gut gevortext und 15 Minuten lang in den  $-80^\circ\text{C}$  gestellt. In diesem Schritt fällt die DNA aufgrund der hohen Salzkonzentration aus. Anschließend wurde die Probe 15 Minuten bei  $4^\circ\text{C}$  mit maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand wurde entnommen und die nahezu unsichtbare DNA mit 500  $\mu\text{l}$  70 % Ethanol gewaschen, gevortext und 5 Minuten bei  $4^\circ\text{C}$  wieder mit maximaler Geschwindigkeit abzentrifugiert. Danach wurde die DNA luftgetrocknet und in 20–50  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  aufgenommen.

### 2.2.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) ist eine enzymatische Methode zur *in vitro*-Amplifikation von definierten DNA-Segmenten aus einem Gemisch von Nukleinsäuren (64). Sie ist ein zyklisch verlaufender Prozess und beruht auf der Kettenverlängerung zweier gegenläufiger Oligonukleotid-Primer durch eine hitzestabile DNA-Polymerase. Durch die mehrfache Wiederholung eines Reaktionszyklus (Denaturierung, Primeranlagerung, Polymerisation) wird eine exponentielle Vervielfältigung des zwischen den beiden Primern liegenden DNA-Abschnittes erreicht. Die Anwendungsmöglichkeiten dieser Methode sind vielfältig. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die PCR zur Genotypisierung der gezüchteten Mäuse und zur Amplifikation von genomischer DNA und cDNA aus Inseln verwendet. Für die Standard-PCR-Reaktion mit cDNA bzw. DNA wurden die unten aufgeführten Reagenzien verwendet.

- Primer ..... MWG Biotech, Ebersberg
- Taq-Polymerase ..... Promega GmbH, Mannheim
- dNTP's ..... Quantum Appligene, Heidelberg

- 10× PCR-Puffer ..... Promega GmbH, Mannheim

In ein 0,5 ml Eppendorfgefäß (Eppendorf, Hamburg) wurden für einen 25  $\mu$ l Reaktionsansatz folgende Komponenten pipettiert:

- 14,75  $\mu$ l  $H_2O$
- 2,5  $\mu$ l 10× PCR-Puffer
- 4  $\mu$ l dNTPs (125 pmol/ $\mu$ l)
- 1,25  $\mu$ l Primer forward (10 pmol/ $\mu$ l)
- 1,25  $\mu$ l Primer reverse (10 pmol/ $\mu$ l)
- 0,25  $\mu$ l Taq-Polymerase
- 1  $\mu$ l cDNA

Das Reaktionsgemisch wurde in einen Thermocycler der Firma Biometra (UNO-Thermoblock, Göttingen) gestellt und das in Tabelle 2.6 dargelegte PCR-Programm durchgeführt. Es handelt sich hierbei um ein „touch-down“-PCR-Programm. Das Prinzip einer solchen PCR beruht darauf, dass man bei einer sehr hohen Primeranlagerungs-Temperatur beginnt und sich schrittweise (in 2°- oder 1°-Schritten) der idealen Primeranlagerungs-Temperatur des Primers nähert. Dadurch kann man eine spezifischere Bindung des Primers an die DNA-Matrize erreichen und somit falsche Amplifikate ausschließen. Als Negativkontrolle wurde  $H_2O$  anstelle der cDNA in den Ansatz pipettiert.

Schritt	Bezeichnung	Temperatur	Zeit	Zyklen
1	Taq-Polymerase Aktivierung	95 °C	5 min	-
2	Denaturierung	94 °C	30 s	-
3	Primeranlagerung	64 – 57 °C	30 s	-
4	Polymerisation	72 °C	50 s	2
5	Denaturierung	94 °C	30 s	-
6	Primeranlagerung	62 – 55 °C	30 s	-
7	Polymerisation	72 °C	50 s	2
8	Denaturierung	94 °C	30 s	-
9	Primeranlagerung	60 – 53 °C	30 s	-
10	Polymerisation	72 °C	50 s	2
11	Denaturierung	94 °C	30 s	-
12	Primeranlagerung	58 – 51 °C	30 s	-
13	Polymerisation	72 °C	50 s	30 – 40
14	Polymerisation	72 °C	5 min	-
15	Abkühlphase	20 °C	Pause	-

Tab. 2.6: PCR-Programm für eine Standard-PCR-Reaktion mit „touch-down“

### 2.2.7 RT-PCR

Neben der Synthese von cDNA aus mRNA kann die RT-PCR auch dazu genutzt werden, nur ein bestimmtes Gen im Genom einer Zelle nachzuweisen. Dafür benötigt man einen sequenzspezifischen Primer, der an eine bestimmte mRNA-Matrize bindet. Diese Methode wird vor allem beim Nachweis von winzigen Mengen dieses Gens in einer einzelnen Zelle angewendet. Bei der so genannten *Single-Cell-RT-PCR* wird die Zelle mittels einer Saugvorrichtung nach der elektrophysiologischen Messung eingesaugt und mit  $1 \times$  PCR-Puffer auf  $20 \mu\text{l}$  aufgefüllt und in flüssiges  $N_2$  schockgefroren. Beim Wiederauftauen lysiert die Zelle, so dass die mRNA frei in der Zellsuspension vorliegt. Um die Expression eines bestimmten Gens in dieser Zellsuspension nachzuweisen, wird das Qiagen-One-Step RT-PCR Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) verwendet. Bei  $50^\circ\text{C}$  werden im ersten Schritt dieser PCR zwei Enzyme aktiv, die Omniscript Reverse Transkriptase und die Sensiscript Reverse Transkriptase. Dadurch können RNA-Mengen von 1 pg bis  $2 \mu\text{g}$  nachgewiesen werden. Anschließend wird die HotStartTaq DNA Polymerase bei  $95^\circ\text{C}$  aktiviert. Dieser HotStart gewährleistet, dass im ersten PCR-Zyklus nur hoch spezifische und reproduzierbare PCR-Produkte entstehen. Um ein frühzeitiges Zersetzen der Zellen-

mRNA durch RNasen zu verhindern, wurde ein RNase Inhibitor (Promoga GmbH, Mannheim, Deutschland) hinzugefügt. Folgende Komponenten waren im Kit enthalten:

Substanz	Volumen
Enzym Mix	200 $\mu$ l
Puffer	1,0 ml
Q-Solution	2,0 ml
dNTP Mix	200 $\mu$ l
RNase-freies $H_2O$	$2 \times 1,9$ ml

Tab. 2.7: Inhalt des Kits, nach der Anleitung von Qiagen: One-step RT-PCR Kit. Alle Angaben beziehen sich auf das Kit 210212 für 100 Reaktionen

In dieser Arbeit wurde die *Single-Cell RT-PCR* zum Nachweis von Insulin (Ins) und Glukagon (Gluc) in den A- und B-Zellen, sowie zum Amplifizieren der Zellen mit „degenerierten“ Primern für T-Typ Kalziumkanälen (T05/ T06) und zur Identifizierung der Natriumkanäle auf Zellebene, genutzt. Der Reaktionsansatz wurde wie folgt durchgeführt. In ein 0,5 ml Eppendorfgefäß wurden für einen 50  $\mu$ l Reaktionsansatz folgende Komponenten pipettiert:

- 12  $\mu$ l  $H_2O$
- 6  $\mu$ l 5 $\times$  PCR-Puffer
- 2  $\mu$ l dNTP's (400  $\mu$ M pro dNTP)
- 3  $\mu$ l Primer forward (10 pmol/  $\mu$ l)
- 3  $\mu$ l Primer reverse (10 pmol/  $\mu$ l)
- 2  $\mu$ l RNase Inhibitor (1/6 verdünnt)
- 2  $\mu$ l Enzymmix
- 20  $\mu$ l Zellsuspension (1  $\mu$ l Zelle, 19  $\mu$ l 1 $\times$  PCR-Puffer)

Die Substanzen wurden in einem Thermocycler gestellt, der bereits auf 50°C vorgeheizt war. In Tabelle 2.8 ist das Single-Cell RT-PCR-Programm dargelegt. Für die Negativkontrolle wurde anstelle der cDNA  $H_2O$  in den Ansatz pipettiert.

Schritt	Bezeichnung	Temperatur	Zeit	Zyklen
1	Reverse Transkription	50 °C	30 min	-
2	Taq-Polymerase Aktivierung	95 °C	15 min	-
3	Denaturierung	94 °C	30 s	-
4	Primeranlagerung	64 – 57 °C	30 s	-
5	Polymerisation	72 °C	1 min	2
6	Denaturierung	94 °C	30 s	-
7	Primeranlagerung	62 – 55 °C	30 s	-
8	Polymerisation	72 °C	1 min	2
9	Denaturierung	94 °C	30 s	-
10	Primeranlagerung	60 – 53 °C	30 s	-
11	Polymerisation	72 °C	1 min	2
12	Denaturierung	94 °C	30 s	-
13	Primeranlagerung	58 – 51 °C	30 s	-
14	Polymerisation	72 °C	1 min	30 – 40
15	Polymerisation	72 °C	10 min	-
16	Abkühlphase	20 °C	Pause	-

Tab. 2.8: Single-cell RT-PCR-Programm

### 2.2.8 Nested PCR

Die nested-PCR ist eine Methode um die Spezifität der PCR weiter zu erhöhen. In einem ersten Schritt wird die DNA- oder RNA-Matrize mit unspezifischen Primern über eine geringe Zyklen-Zahl amplifiziert und anschließend wird das resultierende Amplifikat weiter mit spezifischen Primer synthetisiert. Diese Primer liegen innerhalb der amplifizierten DNA, so dass nur ein definierter und spezifischer DNA-Abschnitt des ersten Amplifikats entstehen kann. Der zweite Schritt erfolgt meistens über 30–40 Zyklen. Diese Methode kann die Effizienz, aber auch die Empfindlichkeit einer PCR erhöhen, so dass sehr sorgfältig und kontaminationsfrei gearbeitet werden muss. Der Vorteil dieser Methode ist, dass damit auch geringste Mengen einer Ausgangs-DNA nachgewiesen werden können.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine nested PCR angewendet, um die T-Typ Kalziumkanäle auf Insel- und Zellebene detektieren zu können. Zuerst wurde eine RT-

PCR mit „degenerierten“ Primern (T05/ T06) durchgeführt, d.h. es wurde ein Primerpaar verwendet, der jeden T-Typ Kalziumkanal erkennt und amplifizieren kann. Danach folgte die nested PCR mit spezifischen Primern für die einzelnen T-Typ Kalziumkanäle. Bei beiden PCRs wurde ein „touch-down“-Programm (siehe Tab. 2.6) verwendet.

### 2.2.9 Primer-Sequenzen

Name	Sequanz	Größe
<i>Ins</i> (5')	CAGCAAGCAGGTCATTGTTT	
<i>Ins</i> (3')	CAGTAGTTCTCCAGCTGGTAGA	344 bp
<i>Gluc</i> (5')	GACTTCCCAGAAGAAGTCGCCAT	
<i>Gluc</i> (3')	CTACGGTTACCAGGTGGTCATGT	493 bp
<i>TO5</i> (5')	GT(AG)GA(AG)GG(CT)TTCCAGGC(AGT)GAGG	396 bp-
<i>TO6</i> (3')	GCTGTTCC(AG)GCTGGAGCG(AGC)C	450 bp
<i>Ca<sub>V</sub>3.1</i> (5')	CACCAAGTCTGAGTCAGCGC	
<i>Ca<sub>V</sub>3.1</i> (3')	TGATTTTCATCTCATGATGGGC	271 bp
<i>Ca<sub>V</sub>3.2</i> (5')	AGAGGAAGATTTCGATAAGCT	
<i>Ca<sub>V</sub>3.2</i> (3')	GGCTGCTTCCTGCTCTGTT	305 bp
<i>Ca<sub>V</sub>3.3</i> (5')	AAGCTCC(AC)(AG)GA(AG)GGCCTGGA	
<i>Ca<sub>V</sub>3.3</i> (3')	GTAGTAGGAGCTCCGGGAGCT	258 bp
<i>Na<sub>V</sub>1.1</i> (5')	CCAAGTTGAGTTCAAAGAGC	
<i>Na<sub>V</sub>1.1</i> (3')	TACTGTTGCGTCGCTCTCC	401 bp
<i>Na<sub>V</sub>1.2</i> (5')	GAAAGGCTTCCAGTTTTCCCT	
<i>Na<sub>V</sub>1.2</i> (3')	TTCATGGGTAGAGTGGGTATC	321 bp
<i>Na<sub>V</sub>1.3</i> (5')	GTGCTAAGGAGTGGAGGAA	
<i>Na<sub>V</sub>1.3</i> (3')	AGTCTCTCCTGCTCTCGC	345 bp
<i>Na<sub>V</sub>1.4</i> (5')	AATGAGGCTACCCTGGCC	
<i>Na<sub>V</sub>1.4</i> (3')	AGCACTTTGTGTGCACACTTG	308 bp
<i>Na<sub>V</sub>1.6</i> (5')	AGGCTCTCCGAGGAGCTCA	
<i>Na<sub>V</sub>1.6</i> (3')	GTGCTGTTGCGTTTCACGCT	511 bp
<i>Na<sub>V</sub>1.7</i> (5')	TCTTCAGAAACCTCCAGGCT	
<i>Na<sub>V</sub>1.7</i> (3')	GGGGTCTATGGGGTACGAA	398 bp

Tab. 2.9: Primer-Sequenzen für Insulin/ Glukagon (*Ins*, *Gluc*); *Ca<sub>V</sub>*- und *Na<sub>V</sub>*-Kanäle; degenerierte Primer für T-Typ Kalziumkanäle (T05, T06)

Als Grundlage zur Erstellung der Primer wurden mRNA-Sequenzen genutzt, die in der EMBL-Datenbank (EMBL, Heidelberg) veröffentlicht sind. Bei der Auswahl der Primer-Sequenzen muss unter anderem darauf geachtet werden, dass diese etwa gleiche Bindungstemperaturen haben, exonübergreifend sind und nur ein Amplifikationsprodukt generieren. Alle verwendeten Primer-Sequenzen sind in der Tabelle 2.9 dargelegt. Diese wurden zunächst an cDNA verschiedener Gewebe getestet, bevor damit eine RT-PCR an einzelnen Inseln und Zellen durchgeführt wurde. Die zu erwartende Amplifikat-Größe ist hinter jedem Primer-Paar in [bp] (Basenpaar) angegeben.

### 2.2.10 Gel-Elektrophorese

Zur Analyse von linearer DNA (PCR-Produkt) können horizontale Agarosegele (2%) genutzt werden. Zur Herstellung eines solchen Gels werden 8 g Agarose (BMA, Rockland) in 400  $\mu$ l 1 $\times$  TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA-Puffer, Tris: Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan) durch Kochen gelöst und mit 20  $\mu$ l Ethidiumbromid, was sich in die helikale DNA-Struktur einlagert und mittels UV-Licht visualisiert werden kann, versetzt. Danach wird das flüssige Gel in die Elektrophoreseapparatur gegossen, nach Polymerisierung in die Elektrophoresekammer gelegt und mit 1 $\times$  TBE als Laufpuffer soweit gefüllt, bis das Gel vollständig mit 1 $\times$  TBE bedeckt ist. Jeweils 10  $\mu$ l der DNA-Probe wurden mit 2  $\mu$ l Farbmarker versetzt und einzeln in jede Tasche des Gels pipettiert. Anschließend wurde die DNA bei einer Spannung von 210 mV aufgetrennt. Als Größenstandard wird eine 1 KB DNA-Leiter (Invitrogen, Karlsruhe) mitgeführt. Die Zusammensetzung von TBE und des Farbmarkers sind in den Tabellen 2.10 und 2.11 aufgelistet.

Substanz	Tris	Borat	EDTA	H <sub>2</sub> O
Volumen	540 g	275 g	200 ml	5 l
Konzentration	-	-	0,5 M	-

Tab. 2.10: Zusammensetzung einer 10 $\times$  TBE-Lösung

Zur Herstellung eines 6 $\times$  Farbmarker werden folgende Chemikalien benötigt:

- Ficoll 400 ..... MWG Biotech, Ebersberg

- BPB (Bromphenolblau) ..... Roth, Karlsruhe
- XL (Xylencyanol) ..... Roth, Karlsruhe

Substanz	<i>Ficoll</i> 400	<i>EDTA</i>	$10 \times TBE$	BPB	XL
Volumen	5,4 g	7,2 ml	18,0 ml	405 $\mu$ l	450 $\mu$ l
Konzentration	-	0,5 M	-	55 mg/ml	50 mg/ml

Tab. 2.11: Zusammensetzung des Farbmärkers

## 2.3 Elektrophysiologische Messungen

### 2.3.1 Stammlösungen

Folgende Chemikalien wurden zur Herstellung der Stammlösungen in entsprechenden Volumina entionisiertem  $H_2O$  bei Raumtemperatur gelöst, so dass die in der Tabelle 2.12 angegebenen Konzentrationen erhalten wurden. Die Lösungen wurden erst autoklaviert und anschließend bei  $4^\circ C$  im Kühlschrank aufbewahrt.

Substanz	Konzentration	Firma
<i>NaCl</i>	1 M	Merck, Darmstadt
<i>KCl</i>	1 M	Merck, Darmstadt
<i>CaCl</i> <sub>2</sub> $\times$ 6 <i>H</i> <sub>2</sub> <i>O</i>	0,1 M	Merck, Darmstadt
<i>BaCl</i> <sub>2</sub> $\times$ 6 <i>H</i> <sub>2</sub> <i>O</i>	0,1 M	Merck, Darmstadt
<i>MgCl</i> <sub>2</sub> <i>H</i> <sub>2</sub> <i>O</i>	0,1 M	Merck, Darmstadt
<i>EDTA</i> pH 8,0	0,5 M	Roth, Karlsruhe

Tab. 2.12: Konzentrationen der Stammlösungen

### 2.3.2 Extrazellulär- und Intrazellulärlösungen

Die für die Patch-Clamp-Experimente verwendeten Lösungen sind in den Tabellen 2.13 und 2.14 aufgelistet. Die Zusammensetzung der Extrazellulär-Lösungen wurde der Publikation von Barg entnommen (10). Der pH-Wert wurde durch Zugabe von NaOH auf 7,4 eingestellt. Die Extrazellulärlösungen wurden wöchentlich frisch

angesetzt und im Kühlschrank bei  $4^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Zusammensetzung der Intrazellulär-Lösung wurde wie in einer weiteren Publikation von Barg gewählt (9). Der pH-Wert wurde durch Zugabe von  $\text{CsOH}$  auf 7,15 eingestellt. Anschließend wurde sie auf 4 ml aliquotiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

Substanz	$E_I$	$E_{II}$	Firma
$\text{NaCl}$	118 mM	118 mM	Merck, Darmstadt
$\text{KCl}$	5,6 mM	5,6 mM	Merck, Darmstadt
$\text{CaCl}_2$	2,6 mM	-	Merck, Darmstadt
$\text{BaCl}_2$	-	2,6 mM	Merck, Darmstadt
$\text{MgCl}_2$	1,2 mM	1,2 mM	Merck, Darmstadt
Glucose	-	-	Roth, Karlsruhe
$\text{HEPES}$	5,0 mM	5,0 mM	Roth, Karlsruhe
$\text{TEA} - \text{Cl}$	20 mM	20 mM	Sigma-Aldrich Chemie

Tab. 2.13: Zusammensetzung und Endkonzentration der Extrazellulärlösungen  $E_I$  und  $E_{II}$

Substanz	$I$	Firma
$\text{CsCl}$	125 mM	Merck, Darmstadt
$\text{MgCl}_2$	1 mM	Merck, Darmstadt
$\text{EGTA}$	10 mM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
$\text{Mg}_2\text{ATP}$	3 mM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
$\text{HEPES}$	10 mM	Roth, Karlsruhe

Tab. 2.14: Zusammensetzung und Endkonzentration der Intrazellulärlösung ( $I$ )

### 2.3.3 Toxine

Zur Blockierung, Bestimmung und Charakterisierung der Ionenkanäle wurden folgende Toxine eingesetzt. Es wurde zunächst eine Stammlösung hergestellt und anschließend bis zur gewünschten Konzentration verdünnt. TTX wurde in entionisiertem  $\text{H}_2\text{O}$  und Isradipin in 99 % Ethanol gelöst, bevor sie in den Extrazellulärlösungen  $E_I$  und  $E_{II}$  verdünnt wurden.

Das Toxin TTX wurde mit einer Endkonzentration von 0,3 nM; 1 nM; 3 nM; 10 nM; 30 nM und 100 nM je nach Versuchsanordnung, verdünnt. TTX wurde sowohl zum Blockieren als auch zur Charakterisierung der TTX-sensitiven Natriumkanäle

Substanz	Konzentration	Firma
TTX	10 mM	Biotrend Chemikalien GmbH, Köln
Isradipin	10 mM	Novartis GmbH, Nürnberg

Tab. 2.15: Konzentrationen der Toxin-Stocklösungen

verwendet. Isradipin wurde mit einer Endkonzentration von 100 nM verdünnt und zur Blockierung der DHP-sensitiven Kalziumkanäle bzw. zur Unterscheidung der Zelltypen verwendet.

### 2.3.4 Die Patch-Clamp-Technik

Die Patch-Clamp-Technik wurde 1976 von Erwin Neher und Bert Sakmann entwickelt, wofür sie 1991 den Nobelpreis erhielten (31). Die Erforschung der Ionenströme und anderer elektrischer Phänomene an Zellmembranen wurde durch diese Technik revolutioniert. Das Prinzip dieser Technik beruht darauf, dass eine dünn ausgezogene und mit Elektrolyt-Lösung gefüllte Glaskapillare, die sogenannte Patch-Clamp-Pipette (siehe Abb. 2.2) vorsichtig auf eine intakte Zelle gedrückt wird.

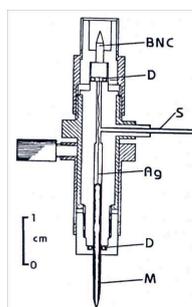


Fig. 2.2: Längsschnitt durch einen Mikroelektrodenhalter (Quelle: 31) M: Glasmikroelektrode; D: Dichtungsring; Ag: Ag/AgCl-Draht; BNC: BNC-Steckverbindung; S: Verbindung zum PVC-Schlauch

Unterhalb der Pipette, innerhalb des Durchmessers der Spitze, entsteht der Patch oder Membranfleck (engl. patch). Anschließend wird durch leichten Unterdruck, der am hinteren Ende der Pipette angelegt wird, eine starke Verbindung zwischen Membran und Pipette erzeugt. Zwischen dem Inneren der Pipette und der Außenlösung entsteht dadurch ein elektrischer Widerstand in der Größenordnung von mehreren

GigaOhm, der sogenannte *Gigaseal* (engl. to seal=versiegeln). Mit der Herstellung des Gigaseals ist die sogenannte Cell-Attached-Konfiguration der Patch-Clamp-Technik erreicht. Durch den hohen Widerstand des Gigaseals muss ein Strom, der durch einen innerhalb des Patches liegenden Ionenkanal fließt, auch durch die Pipette fließen. In die Pipettenlösung taucht eine Elektrode, die an einen empfindlichen Verstärker angeschlossen ist. Dadurch ist es möglich, die Aktivität eines einzelnen Ionenkanals in der Membran des Patches zu messen. Sowohl die Zellmembran, deren Bestandteil der Patch ist, als auch das Innere der Zelle bleiben in dieser Konfiguration intakt (2).

Durch weiteres Anlegen von Unterdruck am Ende der Pipette oder kurze Pulse elektrischer Spannung an der Elektrode in der Pipette kann der Patch geöffnet werden, während der Gigaseal intakt bleibt. Zwischen dem Inneren der Pipette und dem Inneren der Zelle besteht nun eine Kontinuität, während beide gegen die Außenlösung durch den hohen Widerstand des Gigaseals isoliert sind. Diese Konfiguration der Patch-Clamp-Technik wird als Whole-Cell-Konfiguration bezeichnet. In dieser Konfiguration wird von der gesamten Zellmembran abgeleitet.

### 2.3.5 Die Messapparatur

Für diese Messungen wurde eine Messapparatur, bestehend aus Verstärker, PC, Mikroskop (Zeiss, Oberkochen), Videoanlage und mechanischem Mikromanipulator (Leitz, Wetzlar), an dem der Vorverstärker (HEKA Electronics, Lambrecht) mit dem Messpipettenhalter montiert ist, verwendet. Die gesamte Messapparatur war zur Abschirmung mechanischer Schwingungen und Erschütterungen der Umgebung auf einem schwingungsgedämpften Tisch montiert und gegen das Hintergrundrauschen durch einen Faradayschen Käfig abgeschirmt. Auf dem Objektisch des Mikroskops brachte man als Messkammer eine Petrischale an. Über ein selbstgebautes Perfusionsystem konnte über einen Lösungswechsler, der direkt vor die Zelle positioniert wurde, die Badlösung sehr schnell ausgewechselt werden und pharmakologisch wirksame Substanzen appliziert werden. Eine herkömmliche Aquariumpumpe saugte die überständige Lösung ab. Als Elektroden wurden Ag/AgCl-Elektroden verwendet, die Referenzelektrode befand sich in der mit Extrazellulärlösung durchspülten Messkammer, die Messelektrode in der mit Intrazellulärlösung gefüllten Messpipette. Die Signale wurden mit einem EPC-9 Verstärker (HEKA Electronics, Lambrecht)

und der Software Pulse (Version 8.54) verstärkt, aufgenommen, digitalisiert und auf der Festplatte des Computers gespeichert.

### 2.3.6 Die Messpipetten

Die Messpipetten wurden mit Hilfe eines horizontalen Pipettenziehgeräts (DMZ Universal, Zeitz-Instrumente, Augsburg) aus dünnwandigen Borosilikatglaskapillaren mit Filament (Außen-/Innendurchmesser: 1,5 mm/1,17 mm) (BioMedical Instruments, Zöllnitz) gezogen. Im ersten Ziehschritt wurde bei höherer Hitze das Glas vorgezogen, nach Rezentrieren des Glases in die Heizspirale wurde das Glas dann bei niedriger Hitze auseinandergezogen. Anschließend polierte man die Pipetten in der Mikroschmiede (Mikroforge) (Narishige, London) glatt, um größere Abdichtwiderstände zu erhalten. Schließlich hatten die mit Intrazellulärlösung gefüllten Messpipetten Widerstände im Bereich von 3 bis 5  $M\Omega$ .

### 2.3.7 Versuchsdurchführung

Alle Messungen erfolgten unter Raumtemperatur und mit den Extrazellulärlösungen  $E_I$  und  $E_{II}$ . Die Lösung  $E_I$  wurde für alle Natriumkanal- und  $E_{II}$  für alle Kalziumkanal-Messungen verwendet. Der Unterschied zwischen den beiden ist, dass in der zweiten Lösung  $BaCl$  als Ladungsträger fungiert, was eine Inaktivierung der Kalziumkanäle durch  $Ca^{2+}$ -Ionen verhindert, besser durch die Kalziumkanäle fließt und somit einen deutlicheren Kalziumstrom ergeben. TEA-Cl, sowie das in der Intrazellulärlösung enthaltene  $CsCl$ , wurden zum Blockieren von Kalium-Strömen eingesetzt. Die Patch-Elektrode wurde zur Hälfte mit Intrazellulärlösung gefüllt und in die Badlösung eingetaucht. In der Badlösung befanden sich die Zellen auf einem Plastik-Deckplättchen.

Nach Eintauchen der Patchpipette in die Extrazellulärlösung, wurden über den Verstärker Testpulse mit einer Amplitude von 5 mV und einer Dauer von 5 ms auf die Pipette gegeben. Das Elektrodenpotential wurde auf 0 mV gesetzt. Als Antwort auf die Testpulse berechnete der Computer den Strom mittels der Formel  $\Delta I = \Delta U / R$ . Dieser Wert entspricht dem Widerstand der Pipette. Für die Messung näherte man sich langsam an die Zelle, gab einen leichten Sog bei Berührung der Zellen, wodurch eine hochohmige Verbindung entstand (der *Gigaohm*seal). Die schnelle kapazitive Komponente wurde kompensiert. Durch erneutes Saugen kam es zum Durchriss der

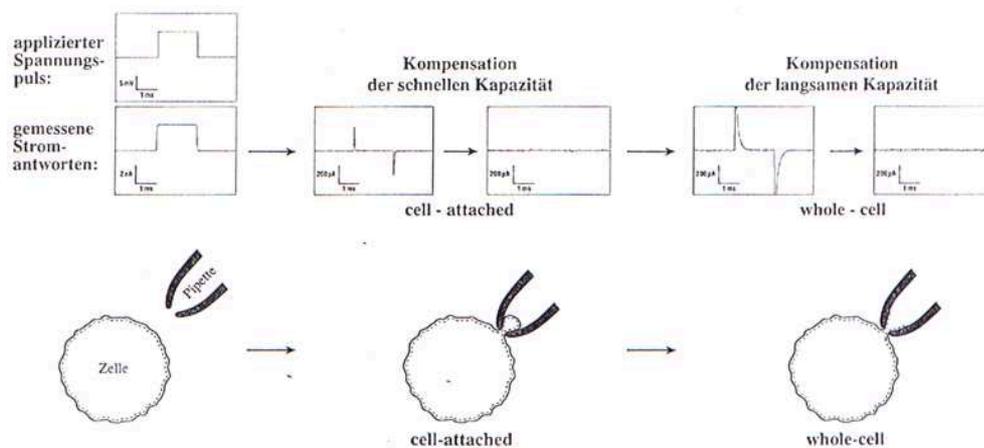


Fig. 2.3: Schematische Darstellung der Messkonfiguration (nach 12)

Zellmembran und die Zelle befand sich in der whole-cell Konfiguration. Die langsame kapazitive Komponente wurde nun kompensiert. Mit diesem Vorgang kann die Größe einer Zelle in pF angezeigt werden, da diese in Relation zu den vom Computer gemessenen kompensierten langsamen kapazitiven Komponenten steht. Anschließend wurden die Messungen mit den unten angeführten Messprotokollen durchgeführt. Es werden nur Zellen ohne Leckstrom verwendet, das heißt, mit intaktem Gigaohmseal.

### 2.3.8 Messprotokolle

Für die Messung der Strom-Spannungsbeziehung wurde von einem Haltepotential von  $-80\text{ mV}$  oder  $-120\text{ mV}$  ausgegangen und mit einer Frequenz von  $0,2\text{ Hz}$  in  $10\text{ mV}$ -Schritten für  $100\text{ ms}$  auf Potentiale von  $-80\text{ mV}$  bis  $+50\text{ mV}$  depolarisiert (siehe Abb. 2.4, A und B). Um die spannungsabhängige Inaktivierung (*steady-state*-Inaktivierung) von Natriumströmen zu messen, wurden  $500\text{ ms}$  lange Vorpulse appliziert und die Membran anschließend für  $50\text{ ms}$  auf  $V_{Test}$ , (Stromantwort der Zelle war hier maximal) geklemmt. Die Frequenz war  $0,5\text{ Hz}$ . Die Vorpuls-Potentiale lagen zwischen  $-150\text{ mV}$  bzw.  $-100\text{ mV}$  bis  $5\text{ mV}$  mit einem Spannungsintervall von  $5\text{ mV}$  (Abb. 2.4, C und D). Für die Bestimmung der TTX-Dosiswirkungskurve der Natriumströme und zum Testen, ob die Zelle eine Sensitivität gegenüber Isradipin zeigte, wurde ein Pulsprotokoll verwendet, bei dem von einem Haltepotential von  $-80\text{ mV}$  oder  $-120\text{ mV}$  ausgegangen mit einer Frequenz von  $0,2\text{ Hz}$  für  $200\text{ ms}$  die Zelle

zu dem Potential depolarisiert wird, bei dem sie in der Strom–Spannungsbeziehung die maximale Stromantwort hatte (Abb. 2.4 E).

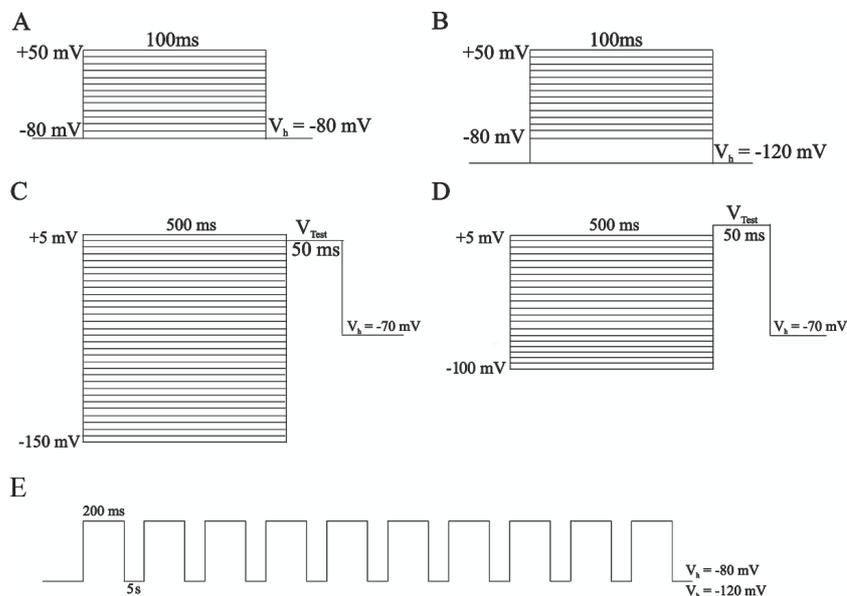


Fig. 2.4: Schematische Darstellung der Messprotokolle. (A, B) Strom–Spannungsbeziehung, (Protokoll 1). (C, D) Steady–state Inaktivierung, (Protokoll 2). (E) Pulsprotokoll, (Protokoll 3)

### 2.3.9 Datenanalyse

Die elektrophysiologischen Daten wurden mit dem Programm Origin 6.1 (Microcal, USA) graphisch dargestellt und ausgewertet. Die Versuchsergebnisse sind als Mittelwert und Standardfehler des Mittelwertes (*standard error of the mean*, SEM) angegeben. Wenn möglich, wurde der zweiseitig gepaarte t–Test nach Student mit  $p < 0,05$  zur Prüfung der Signifikanz angewandt. Signifikante Änderungen sind in den Abbildungen mit einem Symbol gekennzeichnet und im Text erwähnt.

## 2.4 Versuchstiere

Alle Versuchstiere stammten aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Technischen Universität München. Für die elektrophysiologischen und molekularbiologischen Untersuchungen wurden KO– und Kontroll–Mäuse beiderlei Geschlechts

und unterschiedlichen Alters verwendet. Es handelt sich hierbei um Knockout Mäuse mit einer Inselzellspezifischen Deletion des DHP-sensitiven Kalzium-Kanals  $Ca_V1.2$  oder des TTX-sensitiven Natrium-Kanals  $Na_V1.7$ .

#### 2.4.1 Das Cre/loxP-Rekombinationssystem

Um eine räumliche und zeitlich kontrollierte Inaktivierung eines Zielgens zu erhalten, wird das Cre/loxP-Rekombinationssystem eingesetzt. Dies ist ein Werkzeug zum gewebespezifischen Knock-out von Genen. Das Cre-Gen steht für cyclization-recombination und katalysiert reversibel die Rekombination zwischen zwei loxP-Erkennungssequenzen unabhängig von weiteren Cofaktoren. Die loxP-Sequenz besteht aus einem zentralen Element aus acht Basenpaaren (bp), welches von zwei palindromischen Sequenzen mit 13 Basenpaar Länge flankiert wird (loxP für locus of crossing-over of P1) (1). Das Rekombinationssystem leitet sich von der Cre-Rekombinase des Bakteriophagen P1 ab. Ein chromosomales DNA-Segment, das zwischen zwei gleich gerichteten loxP-Segmenten liegt, also von zwei loxP-Seiten flankiertes („gefloxtes“) DNA-Segment, wird durch die Cre-Rekombinase in Form eines zirkulären Produktes aus dem Chromosom herausgeschnitten und in der Zelle abgebaut (Abb. 2.5).

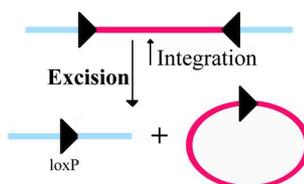


Fig. 2.5: Cre/loxP-vermittelte Excision und Integration von DNA (nach 44)

Übrig bleibt hierbei eine einzelne loxP-Sequenz. Um Mäuse mit einer Cre/loxP-vermittelten gewebespezifischen Gendeletion herzustellen, werden zwei genetisch veränderte Mauslinien benötigt. Die eine Linie trägt den loxP-flankierten Genabschnitt und die andere Linie exprimiert nur in bestimmten Zelltypen die Cre-Rekombinase. In dieser Arbeit wurden zwei Mauslinien verwendet. Die eine Mauslinie exprimiert die Cre-Rekombinase nur unter Kontrolle des Ratten-Insulin-Promotors ( $RipCre^{+/tg}$ ) (57) und die andere nur unter Kontrolle des Ratten-Glukagon-Promotors ( $GlucCre^{+/tg}$ ) (32). Beide Mauslinien wurden sowohl mit einer geflochten

$Ca_V1.2$ - (66), wie auch mit einer geflochtenen  $Na_V1.7$ -Mauslinie <sup>1</sup> (50) gekreuzt. Bei diesen Mäusen wurden die Exons 14 und 15 des  $Ca_V1.2$ - (nach 67) bzw.  $Na_V1.7$ -Gens von loxP-Seiten flankiert (50).

#### 2.4.2 A-Zellspezifische $Na_V1.7^{-/-}$ -Maus

Um eine A-Zellspezifische  $Na_V1.7^{-/-}$ -Maus zu erhalten, wurden geflochte transgene  $Na_V1.7$  Mäuse mit  $GlucCre^{+/tg}$ -Mäusen nach folgendem Schema gekreuzt (Abb. 2.6).

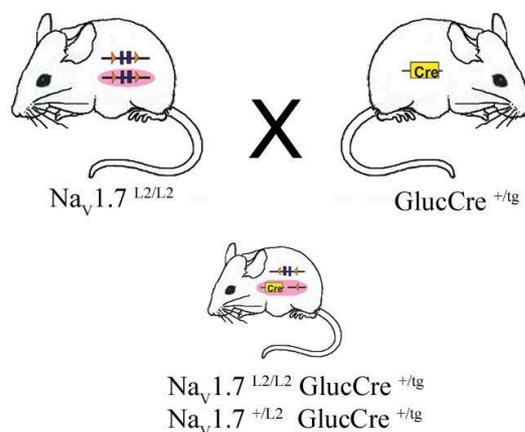


Fig. 2.6: Kreuzungsschema für die A-Zellspezifische  $Na_V1.7^{-/-}$ -Maus

Es wurden  $\alpha Na_V1.7^{-/-}$ -Mäuse und die entsprechenden Kontrollen erhalten.

#### 2.4.3 Genotypisierung der Mäuse

Um abzuklären, ob die gezüchteten Mäuse den richtigen Genotyp haben, wurden von diesen die genomische DNA aus Zehen-Gewebe isoliert und mit spezifischen Primern amplifiziert. Für jede Zehe wurden jeweils  $1 \mu\text{l}$  Proteinase K,  $10 \mu\text{l}$   $10\times$  PCR-Puffer und  $89 \mu\text{l}$   $H_2O$  zusammenpipettiert. Anschließend wurden die Zehen über Nacht bei  $55^\circ\text{C}$  unter ständigem Schütteln inkubiert. Hierdurch wurde das Gewebe zersetzt und verdaut. Danach wurden die Proben bei  $95^\circ\text{C}$  für 15 min gekocht, zentrifugiert und sofort auf Eis gestellt. Zum Nachweis des geflochtenen  $Na_V1.7$ -Gens wurden die

<sup>1</sup> diese Linie wurde über Molecular Nociception Group, Biology Department and Pharmacology Department, University College London, U.K. bezogen.

Primer 16s, 17a und 18a (nach 50) verwendet. Die Primer für die Genotypisierung des geflochtenen *Ca<sub>V</sub>1.2*-Gens waren VI4, VI8 und VI10 (nach 66). Die *GlucCre<sup>+tg</sup>*-Maus wurde durch die Primer ag2, Cre1 und Cre3 (nach 32) und die *RipCre<sup>+tg</sup>*-Maus durch Rip und Cre (nach 57) genotypisiert. Die Primersequenzen sind in der Tabelle 2.17 dargestellt. Für die PCR wurden folgende Ansätze und PCR-Programm verwendet. Nach der PCR-Reaktion wurden die Proben auf ein 2%iges Agarose-Gel aufgetragen und unter UV-Licht betrachtet. Anschließend wurden die Mäuse aussortiert, die vom Genotyp her nicht für die Versuche geeignet waren.

Substanz	RipCre-Maus	GlucCre-, <i>Na<sub>V</sub>1.7</i> -Maus
dNTP's	4 $\mu$ l	4 $\mu$ l
10× PCR-Puffer	2,5 $\mu$ l	2,5 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	14,75 $\mu$ l	13 $\mu$ l
taq-Polymerase	0,25 $\mu$ l	0,25 $\mu$ l
Primer	Rip: 1,25 $\mu$ l	ag2/VI4/16s: 1,25 $\mu$ l
Primer	Cre: 1,25 $\mu$ l	Cre1/VI8/17a: 1,25 $\mu$ l
Primer	-	Cre3/VI10/18a: 1,25 $\mu$ l
DNA	1,5 $\mu$ l	1,5 $\mu$ l

Tab. 2.16: PCR-Ansatz

Primer	Sequenz	Größe
16s	CAGAGATTTCTGCATTAGAATTTGTTC	317 bp
17a	AGTCTTTGTGGCACACGTTACCTC	395 bp
18a	GTTCTCTCTTTGAATGCTGGGCA	461 bp
VI4	TGGCCCCTAAGCAATGA	281 bp
VI8	AGGGGTGTTTCAGAGCAA	415 bp
VI10	CCCAGCCAATAGAATGCCAAT	500 bp
Rip	CTCTGGCCATCTGCTCATCC	
Cre	CGCCGCATAACCAGTGAAAC	550 bp
ag2	CTGCTAACCATGTTTCATGCCT	
Cre1	CCTGTTTTGCACCG	270 bp
Cre3	ATGCTTCTGTCCGTTTGCCG	600 bp

Tab. 2.17: Primersequenzen zur Genotypisierung der gezüchteten Mäuse.

Schritt	Bezeichnung	Temperatur	Zeit	Zyklen
1	Taq-Polymerase Aktivierung	95 °C	5 min	-
2	Denaturierung	94 °C	30 s	-
3	Primeranlagerung	62 °C	30 s	-
4	Polymerisation	72 °C	30 s	10
5	Denaturierung	94 °C	30 s	-
6	Primeranlagerung	58 °C	30 s	-
7	Polymerisation	72 °C	30 s	28
8	Polymerisation	72 °C	5 min	-
9	Abkühlphase	4 °C	Pause	-

Tab. 2.18: Maus-kurz Programm zur Genotypisierung der Mauslinien

#### 2.4.4 Serumanalysen von Kontroll- und $GlucCre^{+/tg} Na_V1.7^{-/-}$ Mäusen

Jeweils 5 männliche A-zellspezifische  $Na_V1.7^{-/-}$ - und ihre dazugehörigen Kontrollgeschwister  $Na_V1.7^{+/-}$ -Mäuse (ebenfalls männlich) wurde auf Gewicht und Blutzucker untersucht. Die Mäuse wurden vor der Messung ca. 4–6 Stunden nüchtern gesetzt, um gleiche Bedingungen zu schaffen. Das Gewicht wurde mit einer Feinwaage (Satorius) bestimmt. Hierfür wurden die Mäuse jeweils einzeln in ein 500 ml Erlenmeyer-Gefäß gesetzt.

Die Messungen erfolgten über 10 Wochen. Der Blutzuckerspiegel wurde mittels eines Blutzucker-Messgeräts (Ascensia Elite, Bayer) gemessen. Die Blutprobe wurde von der Schwanzspitze entnommen. Hierfür wurde sie zunächst mit einer Schere angeschnitten und anschließend durch Massage ein Blutropfen auf den Teststreifen herausgedrückt. Es wurde dann ein Insulin-Toleranz-Test an denselben Mäusen durchgeführt, um zu untersuchen, ob diese KO-Mäuse einen gestörten Insulin-Glukagon-Stoffwechsel haben. Den Mäusen wurde je nach Gewicht eine entsprechende Menge Insulin subkutan injiziert. Das Insulin (Novo Nordisk, Insulin Actrapid HM Penfill) wurde vorher in einer 0,9 % isotonische  $NaCl$ -Lösung (DeltaSelect GmbH, Dreieich) soweit verdünnt, so dass eine Konzentration von 1,2 U/ml entstand. Es wurden Blutzucker-Messungen vor, 30-, 60- und 120 Minuten nach der Injektion durchgeführt. Diese Messung wurde über 4 Wochen durchgeführt.

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1 *Etablierung einer Methode zur Unterscheidung von A- und B-Zellen*

A-Zellen machen nur etwa 15 % einer Insel aus (nach 68) und sind zudem am Rand einer solchen lokalisiert. Während einer Präparation können daher sehr viele verloren gehen. Es wurden daher während des Isolationsvorgangs (nach 10) zwei Waschschrirte ausgelassen und die Zellen direkt in der 24-Loch-Platte in RPMI 1640-Medium ausgeschüttelt. Somit konnte eine größere Ausbeute an Inselzellen erzielt werden.

Als nächstes mussten die Zellen eindeutig identifiziert werden. In der Literatur wurden verschiedene Kriterien aufgezeigt, wie man A- und B-Zellen elektrophysiologisch voneinander unterscheiden kann. A-Zellen besitzen einen TTX-sensitiven Natriumstrom, der auch bei Potentialen um das Ruhemembranpotential persistiert. Sie exprimieren einen A-Typ Kaliumstrom und sie haben eine kleinere Kapazität als B-Zellen (9; 35; 25; 26; 27). Die Überprüfung dieser Kriterien vor jeder Messung ist häufig nicht möglich, da die Zellen nicht immer stabil genug sind. Zur Untersuchung von Natrium- und Kaliumkanälen müssen außerdem Intra- und Extrazellulärlösungen verwendet werden, mit denen weder Membranpotentiale noch Kaliumströme gemessen werden können. Ein häufig verwendetes Kriterium ist daher die Zellgröße. Die Zellen könnten also an Hand ihrer Kapazität unterschieden werden. B-Zellen haben eine mittlere Kapazität von 6 pF, A-Zellen von etwa 3 pF (9). Neuere Untersuchungen zeigten jedoch, dass B-Zellen sehr unterschiedliche Größen haben. Es wurden Kapazitäten von 2 bis 12 pF gemessen (42).

Im Rahmen dieser Arbeit konnten diese Ergebnisse bestätigen werden. Im Mittel hatten B-Zellen Kapazitäten von  $6,4 \pm 0,21$  pF ( $n = 91$ ). A-Zellen waren signifikant ( $p < 0,001$ ) kleiner mit  $5,4 \pm 0,19$  pF ( $n = 34$ ). Die Einzelwerte schwankten aber für beide Genotypen stark (B-Zellen: 2,5 bis 12,8 pF; A-Zellen: 2,1 bis 6,5 pF) (Abb. 3.1), so dass die Zellgröße als Unterscheidungskriterium ungeeignet ist.

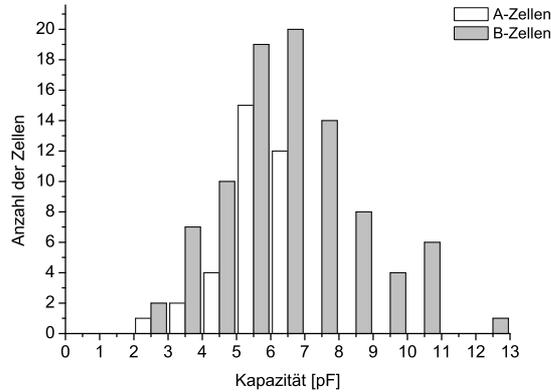


Fig. 3.1: Kapazitäten der A- (weiße Balken) und B-Zellen (graue Balken)

Es musste daher eine Methode entwickelt werden, mit der man schnell und ohne großen Aufwand die Zellen genotypisieren konnte. Es wurden daher einzelne Zellen eingesaugt und mit einer *Single-Cell RT-PCR* mit spezifischen Primer für Glukagon und Insulin genotypisiert. Die Abbildung 3.2 zeigt ein Beispiel einer Genotypisierung.



Fig. 3.2: Genotypisierung von Inselzellen. Single-Cell RT-PCR mit insulin- und glukagonspezifischen Primer. Glukagon-Bande: 493 bp; Insulin-Bande: 344 bp

Die leichten Verunreinigungen der A-Zellen mit Insulin-Banden sind auf das Einsaugen der Zellen zurückzuführen, da unterschiedliche Mengen an Badlösung mit eingesaugt werden. Da B-Zellen den größten Anteil einer Insel ausmachen, besteht die Möglichkeit beim Einsaugen einer Zelle gleichzeitig auch in der Extrazellulärlösung schwimmende Partikel und somit RNA von kurz zuvor geplatzen Zellen in die Pipette mit aufzunehmen.

Um zu beweisen, dass die Genotypisierung erfolgreich funktionierte wurden Zellen aus  $\beta Ca_V1.2^{-/-}$ -Mäusen (66) isoliert. Diese Mäuse haben eine B-zellspezifische Deletion des  $Ca_V1.2$  L-Typ Kalziumkanals. Schulla et al. (2003) zeigte bereits, dass

Isradipin in den KO-B-Zellen keine Wirkung hat. Daher wurde elektrophysiologisch der Effekt von  $1\ \mu\text{M}$  Isradipin auf einzelne Zellen untersucht. Die Zellen wurden in der *Whole-Cell Patch-Clamp*-Konfiguration und mit dem in Kapitel 2 beschriebenen Protokoll 3 (Strommaximum in der Regel bei  $0-10\ \text{mV}$ ), mit  $2,6\ \text{mM}\ \text{Ba}^{2+}$  als Ladungsträger und  $0,1\ \mu\text{M}$  TTX, zum Blockieren der Natriumströme, gemessen.

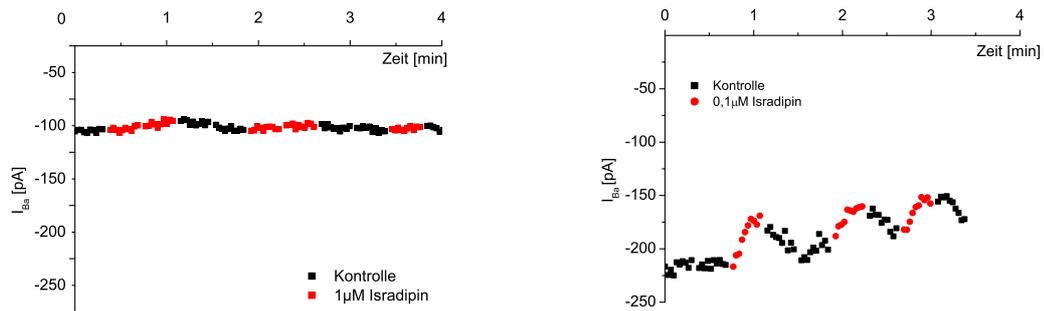


Fig. 3.3: Messung der Isradipin-Hemmung des  $I_{Ba}$  von Inselzellen der  $\beta\text{Ca}_V1.2^{-/-}$ -Maus

Die Abbildung 3.3 zeigt einen repräsentativen Strom-Zeitverlauf einer Zelle ohne (links) und mit Effekt auf Isradipin (rechts). Es wurden alle gemessenen Zellen mit insulin- und glukagonspezifischen Primer genotypisiert. Von 14 Zellen, die eine Isradipin-Hemmung aufwiesen, zeigten alle eine Glukagon-Bande. Alle anderen Zellen, die keine Isradipin-Wirkung zeigten, enthielten ohne Ausnahme eine Insulin-Bande. Daher ist das Vorhandensein einer Glukagon-Bande ausreichend genug, um eine A-Zelle eindeutig als solche zu identifizieren.

### 3.2 T-Typ Kalziumkanäle in murinen Inselzellen

T-Typ Kalziumkanäle wurden bisher in Inselzellen der Ratte und des Menschen (76) beschrieben. Es wurde spekuliert, dass sie hier, die Insulinsekretion verbessern, indem sie eine Schrittmacherfunktion übernehmen (54). Für die Glukagonsekretion sollen T-Typ Kalziumkanäle, aufgrund ihrer Eigenschaften als mögliche Schlüsselaktivatoren in den A-Zelle fungieren. Hierbei sollen sie vor spannungsaktivierten Kalziumkanälen geschaltet sein und für die Depolarisation der Zellmembran, was für das Öffnen der L-Typ Kalziumkanäle erforderlich ist, als Aktivatoren dienen (27). Eine jüngste Untersuchung an MIP-GFP-Mäusen zeigt inzwischen auch die

Existenz von T-Typ Kalziumströme in der Maus und postuliert unterschiedliche A-Zell-Populationen in murinen Inselzellen (41).

### 3.2.1 Molekularbiologische Untersuchung

Es wurden zunächst mittels PCR die Expression der T-Typ Kalziumkanäle in den Inselzellen überprüft. Es wurden spezifische Primer für alle T-Typ Kalziumkanäle designt und an cDNA aus verschiedenen Gewebe getestet. Zuerst wurde eine Standard-PCR mit den degenerierten Primern (T05/T06) für alle T-Typ-Kalziumkanäle durchgeführt und anschließend mit einer nested PCR mit spezifischen Primern für  $Ca_V3.1$ ,  $Ca_V3.2$  und  $Ca_V3.3$  die T-Typ Kalziumkanäle identifiziert. In der Abbildung 3.4 ist das Ergebnis der Gelelektrophorese zu sehen.

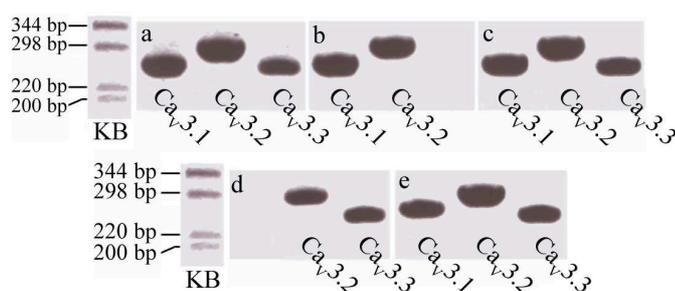


Fig. 3.4: PCR-Reaktion mit T-Typ-spezifischen Primern an a) Gehirn-, b) Herz-, c) Muskel-, d) Nieren- und e) Insel-cDNA

Es wurde die cDNA aus Gehirn, Herz, Muskel, Niere und Inseln amplifiziert. Standard- und nested PCR wurden mit einer Primeranlagerungs-Anfangstemperatur von  $64^{\circ}\text{C}$  begonnen und durch ein „touch-down“ bis auf  $58^{\circ}\text{C}$  heruntergekühlt. Es wurden 30 Zyklen durchgeführt. Amplikons aller T-Typ Kalziumkanäle können in Gehirn-, Muskel- und Insel-cDNA nachgewiesen werden, während die cDNA von Herz ( $Ca_V3.1$  und  $Ca_V3.2$ ) und Niere ( $Ca_V3.2$  und  $Ca_V3.3$ ) jeweils nur zwei exprimieren. Die zu erwartende Bandengrößen sind für  $Ca_V3.1 \rightarrow 271$  bp, für  $Ca_V3.2 \rightarrow 305$  bp und für  $Ca_V3.3 \rightarrow 258$  bp.

Anschließend wurden einzelne Inseln und Zellen mittels der *Single-Cell RT-PCR* wieder zuerst mit degenerierten Primern (T05, T06; gleiches Programm wie für die Genotypisierung von A- und B-Zellen) und anschließend wieder mit der nested

PCR mit spezifischen Primern amplifiziert (gleiches Verfahren wie mit cDNA). In einzelnen Inseln können die Amplifikate der T-Typ Kalziumkanäle noch sehr gut nachgewiesen werden (Abb. 3.5 links), während in einzelnen Zellen, trotz Erhöhung der Zyklenzahl auf 40–50 Zyklen keine T-Typ Kalziumkanäle identifiziert werden können (Abb. 3.5 rechts). Insgesamt wurden 47 Inselzellen auf diese Weise untersucht und es konnten bei keiner dieser Zellen Amplifikate der T-Typ Kalziumkanäle nachgewiesen werden.

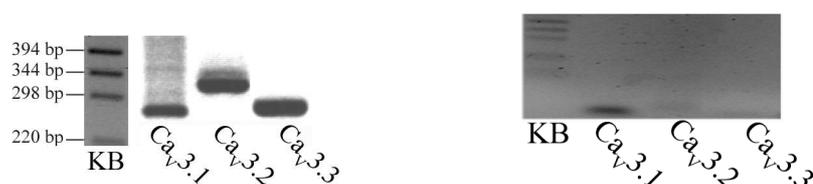


Fig. 3.5: Amplifikate für *Cav3.1*, *3.2* und *3.3* können nur in einzelnen Inseln (links) aber nicht in einzelnen Zellen (rechts) nachgewiesen werden.

Um sicherzustellen, dass die Primer eine ausreichende Sensitivität für die *Single-Cell RT-PCR* haben, wurde folgendes Verfahren durchgeführt (Abb. 3.6):

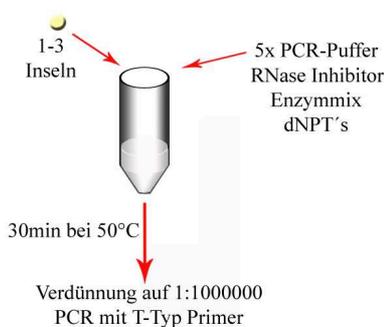


Fig. 3.6: Schematische Darstellung des Verfahrens zum Testen der Sensitivität der T-Typ Kalziumkanal-Primer

1–3 Inseln wurden eingesaugt und mit allen Komponenten der *Single-Cell RT-PCR* bis auf die Primer versetzt und 30 min bei  $50^{\circ}\text{C}$  inkubiert. In dieser Phase erfolgt die Umschreibung der mRNA in cDNA. Anschließend wurde die Lösung auf 1:1000, 1:10 000, 1:100 000 und 1:1 000 000 verdünnt und mit den T-Typ Kalziumkanal-Primern, mit dem oben beschriebenen PCR-Verfahren, amplifiziert.

Sollten die Primer nun nicht sensitiv genug sein, um die geringen mRNA-Mengen in einer Zelle zu detektieren, so sollten sich keine Banden auf dem Gel ergeben. Das Ergebnis zeigt jedoch (Abb. 3.7), dass die Primer die cDNA auch bei einer Verdünnung von 1 : 1 000 000 erkennen und amplifizieren können und für die *Single-Cell RT-PCR* geeignet sind.

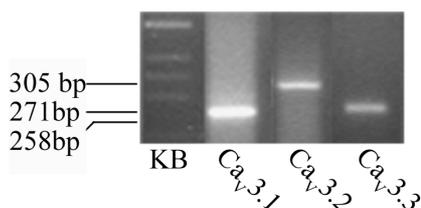


Fig. 3.7: PCR-Ergebnis der 1:1000 000 Verdünnung. Alle 3 T-Typ Kalziumkanäle können noch nachgewiesen werden.

### 3.2.2 Elektrophysiologische Untersuchung

Um die Expression von T-Typ Kalziumkanälen in den Inselzellen der Maus endgültig ausschließen zu können, wurden einzelne Zellen elektrophysiologisch untersucht. Hierfür wurde in der *Whole-Cell Patch-Clamp*-Konfiguration mit dem Protokoll 1 gemessen. Um einen größeren Kalziumstrom zu erzielen wurde  $2,6 \text{ mM Ba}^{2+}$  als Ladungsträger in der Extrazellulärlösung  $E_{II}$  verwendet. Störende Natrium- und Kaliumströme wurden einerseits mit einer Superfusion von  $0,1 \mu\text{M TTX}$ , mit  $20 \text{ mM TEA-Cl}$  in der Extrazellulärlösung und zusätzlich  $125 \text{ mM CsCl}$  anstelle von  $\text{KCl}$  in der Intrazellulärlösung gehemmt. Die Abbildung 3.8 zeigt ein Beispiel für die resultierenden Stromkurven einer solchen Messung. Hier sind nur die Potentiale und Strommessungen von  $-40 \text{ mV}$  bis  $+50 \text{ mV}$  dargestellt.

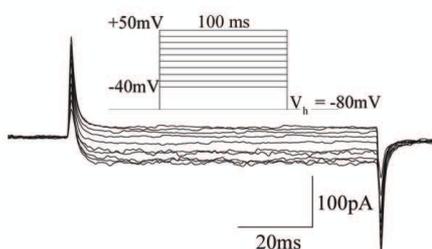


Fig. 3.8: Stromkurven zu den Potentialen von -40 mV bis +50 mV mit zugehörigem Messprotokoll.

Bei neuronalen und anderen T-Typ Kalziumkanal exprimierenden Zellen erweist sich der LVA-Strom in der Strom-Spannungsbeziehung als kleiner „Buckel“ auf dem größeren HVA Strom (13). In den Inselzellen der Maus konnten nur HVA-Kalziumströme gemessen werden. Es wurde daher vermutet, dass die LVA-Ströme durch größere HVA-Ströme verdeckt sein könnten. Daher wurde ein Trick angewendet, um eventuell verdeckte T-Typ Kalziumströme sichtbar zu machen (Abb. 3.9).

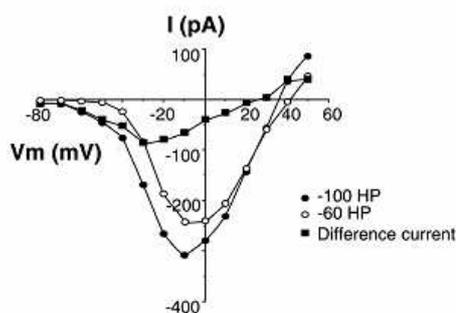
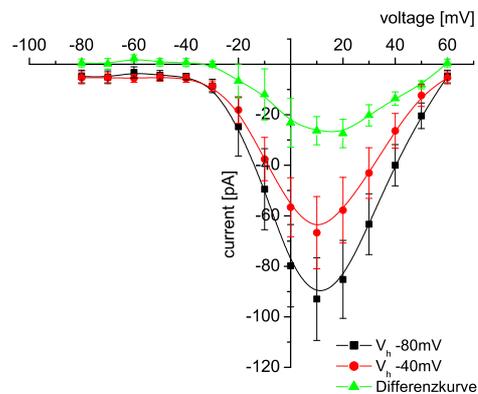


Fig. 3.9: Strom-Spannungs-Messung an Harnröhren-Zellen des Menschen. Der T-Typ Kalziumstrom wird erst sichtbar, wenn man die Kurven zu den verschiedenen Haltepotentialen voneinander subtrahiert (nach 16).

Außerdem inaktivieren T-Typ Kalziumkanäle bei niedrigeren Membranpotentialen als L- und Nicht-L-Typ Kalziumkanäle (13), d.h. bei einem Haltepotential von  $V_h$  -80 mV könnten die T-Typ Kalziumkanäle bereits inaktiv sein. Daher wurden die Versuche bei  $V_h$  -80 mV und  $V_h$  -100 mV durchgeführt. Es wurden zuerst bei negativen Haltepotentialen (schwarz) gemessen und dann bei  $V_h$  -40 mV (rot). Die Differenzkurve ist in grün dargestellt. In murinen Inselzellen wurden keine T-Typ Kalziumströme mit dieser Messung identifiziert (Abb. 3.10).



*Fig. 3.10:* Murine B-Zellen nach einer T-Typ Kalziumkanal Strom-Spannungsbeziehung. Gemessen bei  $V_h$  -80 mV (schwarz) und bei  $V_h$  -40 mV (rot) und die Differenzkurve (grün). Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts (SEM) für  $n = 6$  B-Zellen dargestellt.

Man kann nur einen Unterschied in der Stromamplitude aber nicht in der Spannungsabhängigkeit erkennen. Das gleiche Ergebnis wurde für A-Zellen erhalten. Insgesamt wurden 9 A- und 21 B-Zellen auf diese Weise untersucht. Die Identifizierung der Zellen erfolgte mit der vorher beschriebenen Methode. Beide Zelltypen zeigten die gleichen Ergebnisse. Die Betrachtung einzelner Stromregistrierungen zeigt ebenfalls keine T-Typ Kalziumströme. In Abbildung 3.11 ist eine repräsentative Stromregistrierung einer A-Zelle dargestellt.

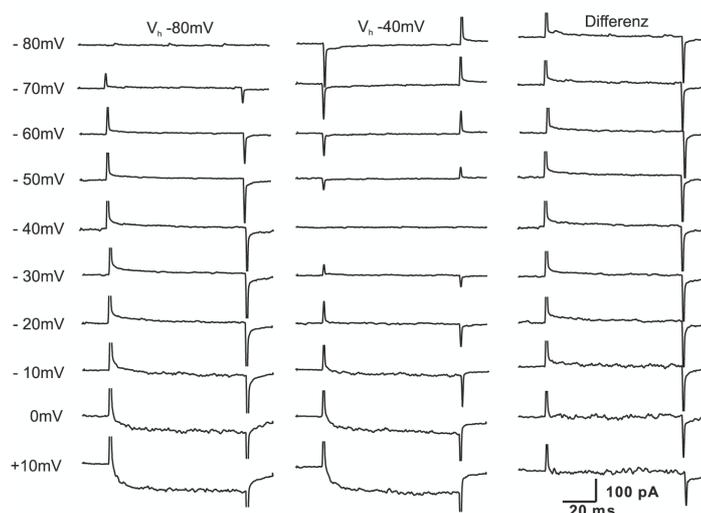


Fig. 3.11: Repräsentative Strommessungen einer A-Zelle von Haltepotentialen von  $V_h$  - 80 mV (links) und  $V_h$  -40 mV (mitte) bei Potentialen von -80 bis +10 mV. Rechts sind die Differenz-Ströme dargestellt.

In keiner Inselzelle der Maus konnten T-Typ Kalziumkanäle molekularbiologisch oder elektrophysiologisch nachgewiesen werden.

### 3.3 Natriumkanäle in murinen Inselzellen

#### 3.3.1 Zwei TTX-sensitive Natriumkanäle in den murinen Inselzellen

In Übereinstimmung mit vorangegangenen Publikationen konnten auch im Rahmen dieser Arbeit zwei verschiedene Natriumströme in den Inselzellen der Maus detektiert werden. Ein früh inaktivierender Natriumstrom, der nur bei einem hyperpolarisierten Haltepotential von  $V_h = -120$  mV aktiv ist und ein Natriumstrom, der bei einem physiologischen Haltepotential von  $V_h = -80$  mV noch aktiviert war. Für die Detektierung der Natriumströme wurde das Protokoll 1 und die Extrazellulärlösung  $E_I$  verwendet. Die Abbildung 3.12 zeigt repräsentative Stromregistrierungen einer Zelle mit früh- (A) und einer Zelle mit spätinaktivierendem (B) Natriumkanal. Beide Ströme konnten durch  $0,1 \mu\text{M}$  TTX vollständig gehemmt werden.

Der frühinaktivierende Natriumstrom wurde bisher nur in den B-Zellen gefunden (42; 11; 43) während der spätinaktivierende den A-Zellen zugeordnet wurde

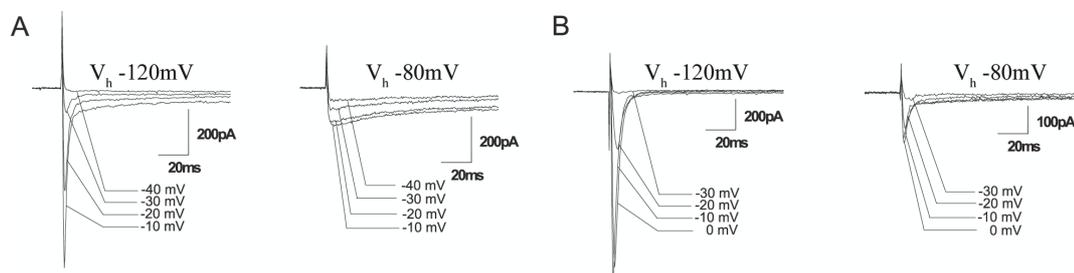


Fig. 3.12: Spannungsabhängige Natriumströme von zwei Inselzellen. A, Natriumstrom einer repräsentativen Zelle mit frühinaktivierendem Natriumkanal (links:  $V_h$  -120 mV, rechts:  $V_h$  -80 mV). B, Natriumstrom einer repräsentativen Zelle mit spätinaktivierendem Natriumkanal (links:  $V_h$  -120 mV, rechts:  $V_h$  -80 mV).

(42; 27). Um diese Befunde nachzuweisen wurden die gemessenen Zellen genotypisiert. Das Ergebnis war höchst überraschend, denn neun von 23 Zellen, die nur den frühinaktivierenden Natriumkanal zeigten wurden eindeutig als A- und die restlichen als B-Zellen identifiziert. Dagegen wurden alle Zellen (insgesamt 24 Zellen), die den spätinaktivierenden oder beide Natriumströme aufwiesen, ohne Ausnahme als B-Zellen genotypisiert (siehe Abb. 3.13).

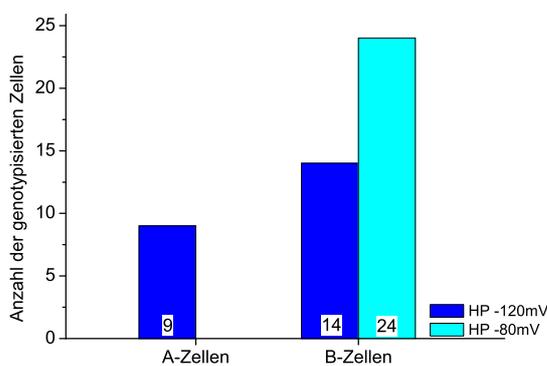


Fig. 3.13: Identifizierung von A- und B-Zellen die den frühinaktivierenden (blau) und den spätinaktivierenden (türkis) Natriumstrom exprimieren mit glukagon- und insulinspezifischen Primern

74% der gemessenen Zellen zeigten nur den frühinaktivierenden Natriumstrom (davon 31% A- und 69% B-Zellen). Die restlichen 26% zeigten den spätinaktivierenden Natriumstrom, davon 1/3 die nur den Natriumstrom, der bei einem Haltepotential von  $V_h$  -80 mV aktiv war, und 2/3 zeigten beide Natriumströme (siehe Abb. 3.14).

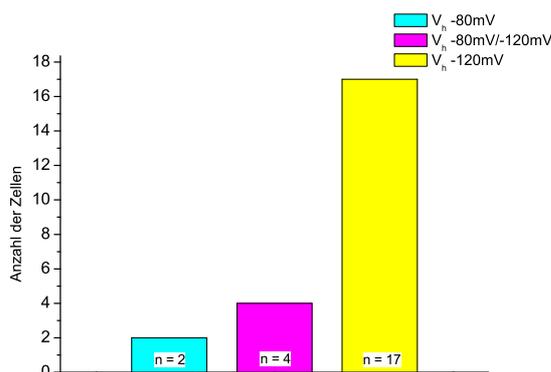


Fig. 3.14: Inselzellen exprimieren unterschiedliche Natriumströme: (türkis) Zellen, die nur bei  $V_h$  -80 mV, (gelb) Zellen, die bei  $V_h$  -120 mV und (rosa) die sowohl bei  $V_h$  -80 mV als auch  $V_h$  -120 mV aktiv waren. n = Anzahl der gemessenen Zellen

### 3.3.2 Strom–Spannungsbeziehung spannungsabhängiger Natriumkanäle

Zur weiteren Charakterisierung wurden Strom–Spannungskurven der Natriumströme gemessen. Die maximalen, einwärtsgerichteten Stromamplituden wurden gemittelt und gegen die Klemmpotentiale aufgetragen. Die Natriumströme, die bei einem Haltepotential von  $V_h = -120$  mV gemessen wurden, aktivierten bei einem Potential von -50 mV. Positivere Potentiale riefen einen ansteigenden, einwärtsgerichteten Strom hervor, der einen Maximalwert bei einem Potential von -10 mV erreichte. Natriumströme, die bei einem Haltepotential von  $V_h = -80$  mV gemessen wurden, zeigten erst ab Potentialen von -40 mV Ströme. Der Maximalwert lag in diesem Fall bei einem Potential von 0 mV. Die maximalen Stromamplituden der früh inaktivierenden Natriumkanäle lagen zwischen 133 und 1000 pA (Mittelwert:  $-622 \pm 131$  pA). Die spät inaktivierenden Natriumkanäle hatten maximale Stromamplituden zwischen

90 und 311 pA (Mittelwert:  $-163 \pm 28$  pA). Beide Ströme konnten mit  $0,1 \mu\text{M}$  TTX vollständig gehemmt werden (Abb. 3.15).

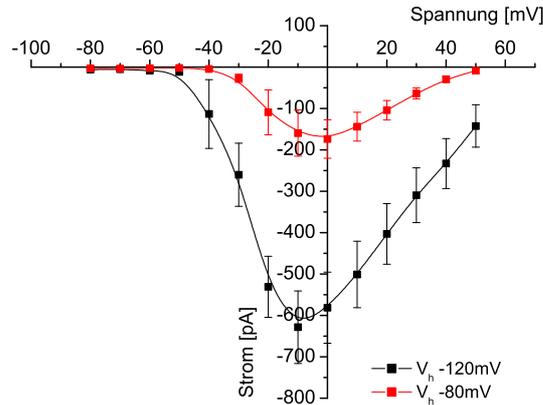


Fig. 3.15: Strom-Spannungsbeziehung des früh- und spätinaktivierenden Natriumstrom.

Die Zellen wurden in 10 mV-Schritten für 100 ms auf Potentiale von -80 mV bis +50 mV depolarisiert. Die Strommaxima für die jeweiligen Potentiale wurden gemittelt und gegen die Spannung aufgetragen ( $n = 11$  für  $V_h = -120$  mV (schwarz),  $n = 8$  für  $V_h = -80$  mV (rot)).

### 3.3.3 Inaktivierung spannungsabhängiger Natriumkanäle (steady-state Inaktivierung)

Natriumkanäle inaktivieren nicht nur zeitlich, sondern auch spannungsabhängig. Diese spannungsabhängige Inaktivierung wurde unter Gleichgewichtsbedingungen (steady-state) bestimmt. Für die Messung der *Steady-State-Inaktivierung* wurde zuerst mit einem Strom-Spannungsprotokoll überprüft, welcher Natriumstrom in der Zelle exprimiert wird. Als Testpuls ( $V_{Test}$ ) wurde für jede Zelle individuell das Potential eingestellt, bei dem sie ihre maximale Stromamplitude hatte. Anschließend wurde auf ein Haltepotential von  $V_h = -70$  mV geklemmt und die Zelle mit Vorpulsen von -150 mV (für den frühinaktivierenden) bzw. -100 mV (für den spätinaktivierenden) in 5 mV-Schritten bis +5 mV depolarisiert. Nachdem alle Zellen genotypisiert waren, wurden die jeweiligen Kurven mit dem Programm Origin berechnet (Abb. 3.16).

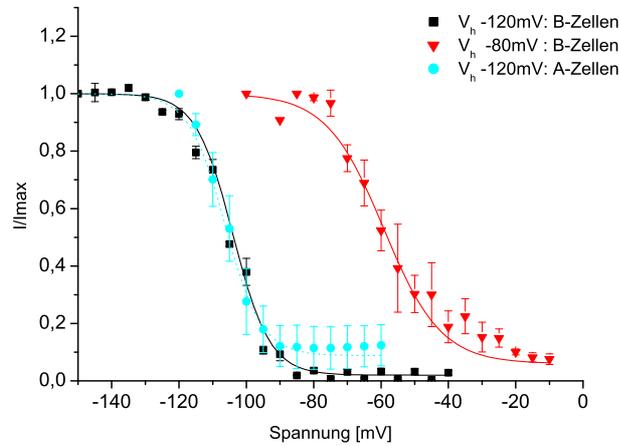


Fig. 3.16: Steady-State Inaktivierungskurven für Natriumkanäle. Gemittelte Inaktivierungskurve für den frühinaktivierende Natriumkanal der B-Zellen ( $n = 13$ , (schwarz),  $V_{0,5} = -104 \pm 1,2$  mV mit  $k = 5,5 \pm 0,3$ ), der A-Zellen ( $n = 4$ ; (türkis);  $V_{0,5} = -106 \pm 1,7$  mV mit  $k = 5,4 \pm 0,9$ ) und für den spätinaktivierenden Natriumkanal der B-Zellen ( $n = 6$ , (rot);  $V_{0,5} = -59 \pm 3,3$  mV mit  $k = 8,5 \pm 1,3$ ) ( $I/I_{max}$ : Verhältnis der gemessenen Stromamplitude zur maximalen Stromamplitude).

Die Stromamplituden wurden zur Maximalamplitude ( $I/I_{max}$ ) in Relation gesetzt und gegen die Vorpulspotentiale aufgetragen. Die Kurve wurde nach der Boltzmann-Gleichung berechnet.

$$\frac{I_0}{I_{max}} = \frac{1}{1 - e^{(V-V_{0,5})/k}} \quad (3.1)$$

$V_{0,5}$ : Potential, bei der die Hälfte aller Natriumkanäle inaktiviert ist;  $k$  Kurvensteigungsfaktor;  $V$ : Vorpulspotential;  $I_{max}$ : maximale Stromamplitude;  $I_0$ : Stromamplitude bei  $V$ .

### 3.3.4 TTX-Wirkung an Natriumströmen aus Inselzellen der Maus

Dosisinhibitions-Kurven geben Aufschluss darüber, welche Konzentrationen eines spezifischen Toxins für eine bestimmte Hemmwirkung notwendig sind. Es ist allgemein gebräuchlich, die Pharmakonwirkung gegen den  $\log[\text{Pharmakon}]$  aufzutragen. In diesen Fällen ist das Ergebnis eine sigmoidal logarithmische Kurve. Ihr Wende-

punkt bezeichnet den  $IC_{50}$ -Wert, das heißt, die Konzentration, bei der das Toxin eine halbmaximale Hemmung auslöst. Einzelne Zellen wurden in der *Whole-Cell Patch-Clamp*-Konfiguration mit dem Protokoll 3 gemessen. Hierfür wurden die Zellen ausgehend von einem Haltepotential von  $V_h$  -80 oder -120 mV auf das Potential, bei dem sie in der Strom-Spannungsbeziehung die maximale Stromantwort hatten, depolarisiert und der Reihe nach mit verschiedenen TTX-Konzentrationen überströmt. Jeder Puls dauerte 200 ms. Es wurden folgende Konzentrationen gewählt: 0 nM, 0,3 nM, 1 nM, 3 nM, 10 nM, 30 nM und 100 nM TTX. Die Werte wurden gemittelt und graphisch dargestellt (Abb. 3.17).

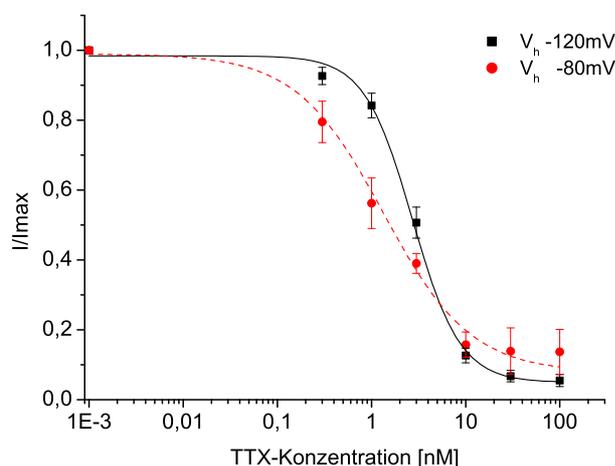


Fig. 3.17: TTX-Block des früh- und spätinaktivierenden Natriumstrom.  $IC_{50}$ -Wert für den frühinaktivierenden Natriumstrom war  $2,7 \pm 0,3$  nM TTX ( $n = 10$ ) und für den spätinaktivierenden  $1,3 \pm 0,4$  nM TTX ( $n = 7$ ). Die Werte für beide Ströme sind nicht signifikant unterschiedlich.

Da der frühinaktivierende Natriumstrom in beiden Zelltypen vorhanden ist und der spätinaktivierende nur in den B-Zellen vorkommt, wurde eine Unterscheidung zwischen A- und B-Zellen vernachlässigt. Es musste nun geklärt werden, um welchen Natriumkanal bzw. um welche Natriumkanäle es sich bei den gemessenen Strömen handelt.

### 3.3.5 Untersuchung mit spezifischen Primer für alle TTX-sensitiven Natriumkanäle

Es wurden zunächst spezifische Primer für die TTX-sensitiven Natriumkanäle ( $Na_V$ -1.1,  $Na_V$ 1.2,  $Na_V$ 1.3,  $Na_V$ 1.4,  $Na_V$ 1.6 und  $Na_V$ 1.7) designt und an Gehirn- und Muskel-cDNA mit einer Standard-PCR getestet. Alle Natriumkanäle bis auf den  $Na_V$ 1.4 konnte in der Gehirn-cDNA nachgewiesen werden.  $Na_V$ 1.2 und  $Na_V$ 1.4 wurden wie erwartet in Skelettmuskel-Gewebe gefunden (18). Die zu erwartende Laufhöhen der einzelnen Amplifikate sind für  $Na_V$ 1.1  $\rightarrow$  401 bp,  $Na_V$ 1.2  $\rightarrow$  321 bp,  $Na_V$ 1.3  $\rightarrow$  345 bp,  $Na_V$ 1.4  $\rightarrow$  308 bp,  $Na_V$ 1.6  $\rightarrow$  511 bp und für  $Na_V$ 1.7  $\rightarrow$  398 bp. Für jedes Primer-Paar wurden folgende optimale Annealing-Temperatur ermittelt und mittels einer „touch-down“ Standard-PCR mit folgenden Anfangstemperaturen verwendet (siehe Material-Methoden; Tab. 3.1). Das Ergebnis ist in der Abbildung 3.18 zu sehen.

Primerpaar	Annealingtemperatur	Anfangstemperatur
$Na_V$ 1.1	56 °C	62 °C
$Na_V$ 1.2	57 °C	63 °C
$Na_V$ 1.3	53 °C	59 °C
$Na_V$ 1.4	55 °C	61 °C
$Na_V$ 1.6	51 °C	57 °C
$Na_V$ 1.7	57 °C	63 °C

Tab. 3.1: Optimale Annealingtemperaturen der  $Na_V$ -Primerpaare

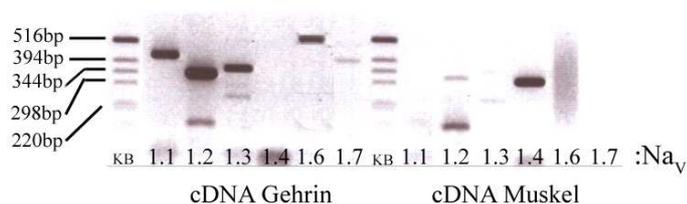


Fig. 3.18: PCR Analyse an Gehirn- und Skelettmuskel-cDNA mit spezifischen Primern für alle TTX-sensitiven Natriumkanäle

Anschließend wurden die Primer mit demselben Programm an Insel-cDNA getestet.

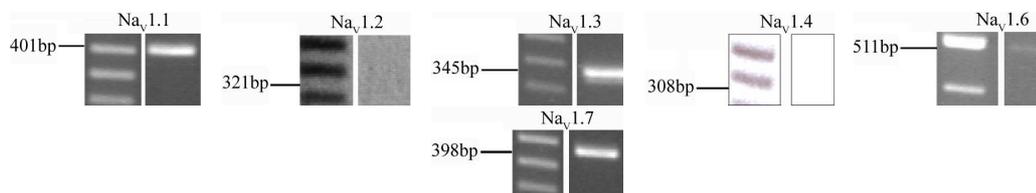


Fig. 3.19: PCR Analyse an Insel-cDNA mit spezifischen Primer für alle TTX-sensitiven Natriumkanäle. Die erste Reihe ist jeweils die KB-DNA-Leiter.

Das Ergebnis der Gelelektrophorese zeigt eine klare Bande für  $Na_V1.1$ ,  $Na_V1.3$  und  $Na_V1.7$ , eine schwache Bande für  $Na_V1.6$  und keine Banden für  $Na_V1.2$  und  $Na_V1.4$ . Eine *Single-Cell RT-PCR* wurde an einzelnen Inseln durchgeführt. Es wurden einzelne Inseln mit spezifischen Primer für  $Na_V1.1$ ,  $Na_V1.3$ ,  $Na_V1.6$  und  $Na_V1.7$  amplifiziert. Es wurden die in der Tabelle 3.1 angegebenen Annealingtemperaturen und das One-Step RT-PCR Programm verwendet. Das Ergebnis ist in der Abbildung 3.20 zu sehen.

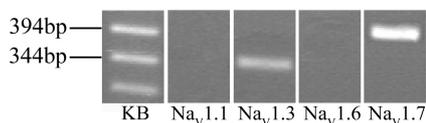


Fig. 3.20: Single-Cell RT-PCR Analyse an einzelnen Inseln. Es wurden nur  $Na_V1.3$  und  $Na_V1.7$  amplifiziert

Mit 30 Zyklen konnte in einzelnen Inseln  $Na_V1.3$  und  $Na_V1.7$  detektiert werden. Auf Einzelzellebene, konnte trotz Erhöhung der Zyklenzahl um 10 Zyklen nur noch schwache Banden für den  $Na_V1.3$  gefunden werden.



Fig. 3.21: Ergebnis der Single-Cell RT-PCR an einzelne Zellen mit spezifischen Primer für den  $Na_V1.3$ - ( $n = 5$ ) und  $Na_V1.7$ -Kanal ( $n = 5$ )

$Na_V1.7$  konnte dagegen in fast jeder Zelle detektiert werden (als Beispiel Abb. 3.21, in 4 von 5 Zellen). Mit Hilfe molekularbiologischer Untersuchungen konnte  $Na_V1.7$  sowohl in Zellen gefunden werden, bei denen elektrophysiologisch beide Natriumströme detektiert wurden, als auch in Zellen, die nur den frühinaktivierenden Strom hatten (Abb. 3.22). Es wird daher vermutet, dass die Natriumkanal  $\alpha$ -Untereinheit des  $Na_V1.7$  die molekularbiologische Grundlage für den frühinaktivierten Natriumstrom darstellt und somit der Haupt-Natriumkanal in den A- und B-Zellen ist.

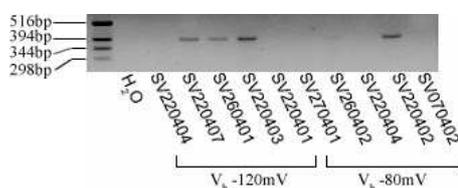


Fig. 3.22: Single-Cell RT-PCR mit  $Na_V1.7$ -spezifischen Primer an (Reihe 2–6) Zellen, die den frühinaktivierenden und (Reihe 7–11) Zellen, die den spätinaktivierenden Natriumstrom exprimierten.

### 3.4 Untersuchung der A-zellspezifischen $Na_V1.7^{-/-}$ -Maus

Um den Anteil des  $Na_V1.7$ -Kanals an der elektrischen Aktivität und Sekretion der Hormone in A-Zellen zu untersuchen, wurde eine A-zellspezifische  $Na_V1.7$ -Knockout Maus generiert. Die beiden Mauslinien  $GlucCre^{+/tg-}$  und die gefloxt transgene  $Na_V1.7$ -Maus wurden miteinander gekreuzt. Die Nachkommen wurden dann anschließend weitergekreuzt, bis die gewünschten  $Na_V1.7^{L2/L2}GlucCre^{+/tg-}$  und deren Kontroll-Maus entstand.

#### 3.4.1 Molekularbiologische Untersuchungen

Es musste zunächst nachgewiesen werden, dass die Deletion gewebespezifisch also nur in den A-Zellen des Pankreas stattgefunden hat. Dazu wurde von jeweils 3 KO- und 3 Kontroll-Mäusen die genomische DNA aus dem Herzen (als Negativkontrolle) und den Inseln gewonnen und mit den in Kapitel 2 beschriebenen Primern

für  $Na_V1.7$  amplifiziert. Es wurde das Standard-PCR Programm (Maus-kurz) verwendet. Die Abbildung 3.23 zeigt, die möglichen Allele in einer  $Na_V1.7$ -transgenen Maus. Hierbei steht Wildtyp (WT) für das Allel, wie es in den Mäusen unter natürlichen Bedingungen vorkommt, L2 für das durch 2 LoxP-Seiten gefloxt Allel und L1 für den KO-Zustand.

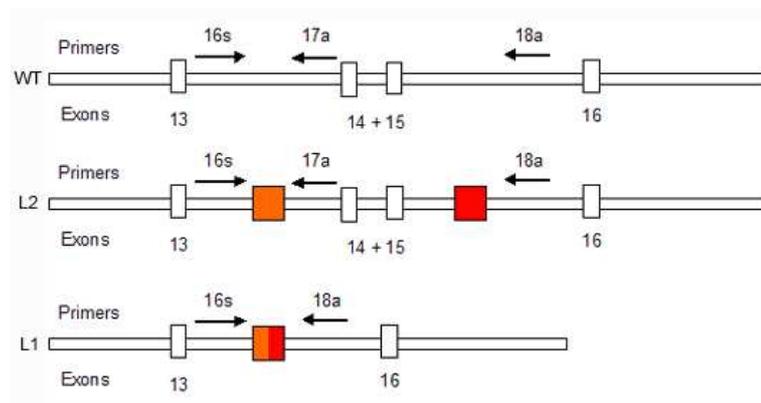


Fig. 3.23: Schematische Darstellung der möglichen Allele in einer  $Na_V1.7$  transgenen Maus. 16s, 17a und 18a = Lage der Primer für die PCR-Reaktion. WT: Wildtyp-Allel, L2: Exon 14 und 15 sind durch 2 LoxP-Seiten flankiert und L1: Exon 14 und 15 wurden durch die Cre-Rekombinase herausgeschnitten, übrig bleibt ein „genloses“ Allel und eine LoxP-Seite

Die Amplifikations-Produkte sind für WT  $\rightarrow$  317 bp (Produkt aus 16s und 17a), für L2  $\rightarrow$  461 bp (Produkt aus 16s und 17a) und L1  $\rightarrow$  395 bp (Produkt aus 16s und 18a). Die Abbildungen 3.24 und 3.25 zeigen das Ergebnis der PCR an Insel- und Herz-DNA aus  $Na_V1.7^{L2/L2}GlucCre^{+/tg-}$  (KO) und  $Na_V1.7^{+/L2}GlucCre^{+/tg-}$  Mäusen (Kontrolle). Die Abbildung 3.24 zeigt das Ergebnis der PCR an Insel-DNA aus KO- und Kontroll-Mäusen. Die KO-Maus-DNA zeigt eine deutliche L2- und eine sehr schwache L1-Bande. Da die Cre-Rekombinase unter dem Glukagon-Promotor steht und somit nur in den A-Zellen, welche den kleineren Anteil einer Insel ausmachen, exprimiert wird, sollte das defekte  $Na_V1.7$ -Allel und somit die L1-Bande nur in den A-Zellen nachweisbar sein. Dies wird durch die schwache L1-Bande bestätigt. Die deutlich stärker L2-Bande wird durch den sehr großen Anteil von B-Zellen, in denen die Cre-Rekombinase nicht exprimiert wird, hervorgerufen. In diesen Zellen liegt das  $Na_V1.7$ -Allel im „gefloxten“ Zustand vor.

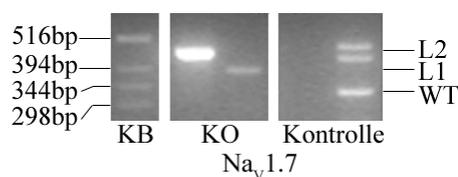


Fig. 3.24: Genotypisierung genomischer Insel-DNA aus KO- und Kontroll-Mäusen. KB: DNA-Leiter; L1: KO-Bande; L2: gefloxtes Allel; WT: Wildtyp-Allel. Erläuterungen siehe Text.

Die Kontroll-Maus-DNA enthält die L2- und WT-Bande. Eine L1-Bande konnte nicht nachgewiesen werden. Es kann aber eine weitere Bande detektiert werden, die das PCR-Produkt der Primer 16s und 18a des Wildtyp-Allels darstellt. Sind beide Allele gefloxt (KO-Zustand), kann diese Bande nicht gefunden werden, da das Amplifikations-Produkt aus 16s und 18a viel zu groß wäre um es auf dem Gel nachzuweisen.

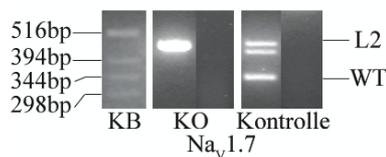


Fig. 3.25: Genotypisierung genomischer Herz-DNA aus KO- und Kontroll-Mäusen. KB: DNA-Leiter; L2: gefloxtes Allel; WT: Wildtyp-Allel. Erläuterungen siehe Text.

Die Herz-DNA zeigt weder in den KO- noch in den Kontroll-Mäusen eine L1-Bande, was die Funktion und Spezifität der Cre-Rekombinase beweist (siehe Abb. 3.25). Auch hier kann die zusätzliche Bande, etwas unterhalb der L2-Laufhöhe detektiert werden, was die Vermutung bestätigt, dass die Primer 16s und 18a ein zusätzliches Amplifikat aus dem Wildtyp-Allel bilden. Beide PCRs wurden nach der Anleitung von (50) durchgeführt. Molekularbiologisch konnte gezeigt werden, dass in den KO-Mäusen das *Nav1.7*-Gen in den A-Zellen deletiert vorliegt.

### 3.4.2 Elektrophysiologische Untersuchungen

Durch elektrophysiologische Messungen wird die Expression des  $Na_V1.7$  Natriumkanals in den A-Zellen der KO-Maus untersucht. Die Messungen erfolgten in der *Whole-Cell Patch-Clamp*-Konfiguration mit der Extrazellulärlösung  $E_I$ . Mittels des Messprotokolls 1 wurden die einzelnen Zellen bei einem Haltepotential von  $V_h$  -120 mV und  $V_h$  -80 mV in 10 mV-Schritten von -80 mV bis +50 mV depolarisiert. Die Abbildungen 3.26 und 3.27 zeigen jeweils repräsentative Beispiele für A-Zellen, die keinen (3.26) und B-Zellen, die sowohl den früh-, als auch den spätinaktivierenden Natriumstrom exprimieren (3.27).

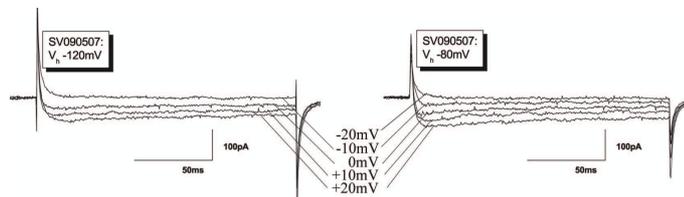


Fig. 3.26: Repräsentative Stromkurven einer A-Zelle (SV090507) aus einer  $Na_V1.7^{-/-}$ -Maus.  $V_h$  -120 mV (links),  $V_h$  -80 mV (rechts)

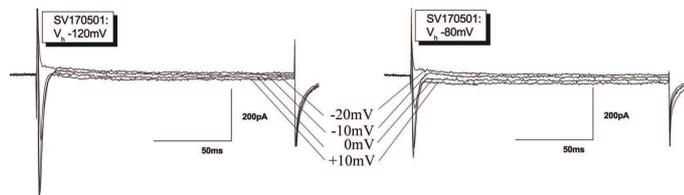


Fig. 3.27: Repräsentative Stromkurven einer B-Zelle (SV170501) aus einer  $Na_V1.7^{-/-}$ -Maus, in der beide Natriumströme exprimiert werden.  $V_h$  -120 mV (links),  $V_h$  -80 mV (rechts)

Insgesamt wurden 37 Zellen aus 13 Präparationen auf diese Weise analysiert und anschließend mit insulin- und glukagonspezifischen Primern genotypisiert. Danach wurden die Ergebnisse der KO-Zellen mit denen aus Kontroll-Mäusen verglichen. Die Zusammenfassung der Messungen und Genotypisierung ist in der Abbildung 3.28 zu sehen.

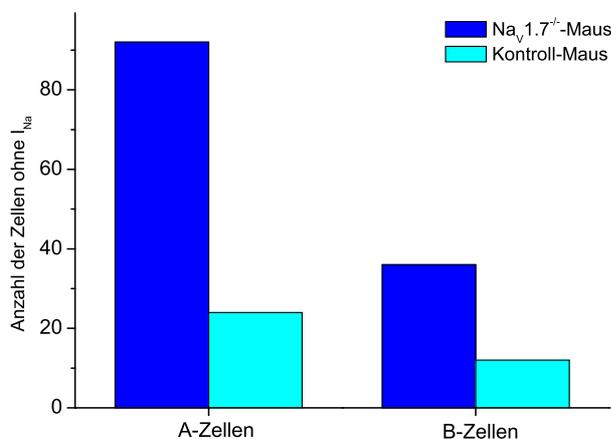


Fig. 3.28: Statistik aller gemessenen KO-Zellen (blau) im Vergleich mit WT-Zellen (türkis).  $I_{Na}$  Natriumstrom

73 % aller gemessenen KO-Zellen konnten als B- und 27 % als A-Zellen identifiziert werden. Von 25 gemessenen B-Zellen hatten 9 keinen und 16 mindestens einen Natriumstrom. Von 12 gemessenen A-Zellen zeigten 11 keinen nur eine einzige hatte einen Natriumstrom. Bei den Kontroll-Mäusen konnten ebenfalls 72 % aller gemessener Zellen als B- und 28 % als A-Zellen genotypisiert werden. Von 85 gemessenen B-Zellen waren nur 10 Zellen ohne und 75 mit Natriumstrom und von 33 gemessenen A-Zellen wurden 8 ohne und 25 mit Natriumstrom gemessen. Somit kann man schlussfolgern, dass der  $Na_v1.7$ -Natriumkanal tatsächlich die molekulare Grundlage für den frühinaktivierenden Natriumstrom in A- und B-Zellen darstellt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Ausschaltung dieses Kanals keine Auswirkung auf die Verteilung von A- und B-Zellen ausmacht. Andererseits scheinen auch die B-Zellen von der Deletion des  $Na_v1.7$  in der A-Zellspezifischen  $Na_v1.7^{-/-}$ -Maus betroffen zu sein, da auch hier deutlich mehr B-Zellen ohne Natriumstrom gemessen wurden.

### 3.4.3 Gewicht- und Blutzuckermessung an der $Na_v1.7^{-/-}$ -Maus

In den nächsten Versuchen sollte geklärt werden, ob die  $Na_v1.7^{-/-}$ -Maus eine Stoffwechselstörung bezüglich der Verwertung von Glukose aufweisen. Dazu wurden bei 5

3-monatigen KO- und 5 Kontroll-Mäuse (Geschwister) über mehrere Wochen hinweg der Blutzuckerspiegel im nüchternen Zustand (4–5 Stunden ohne Futter) kontrolliert. Die Ergebnisse sind den Abbildungen 3.29 und 3.30 zu sehen.

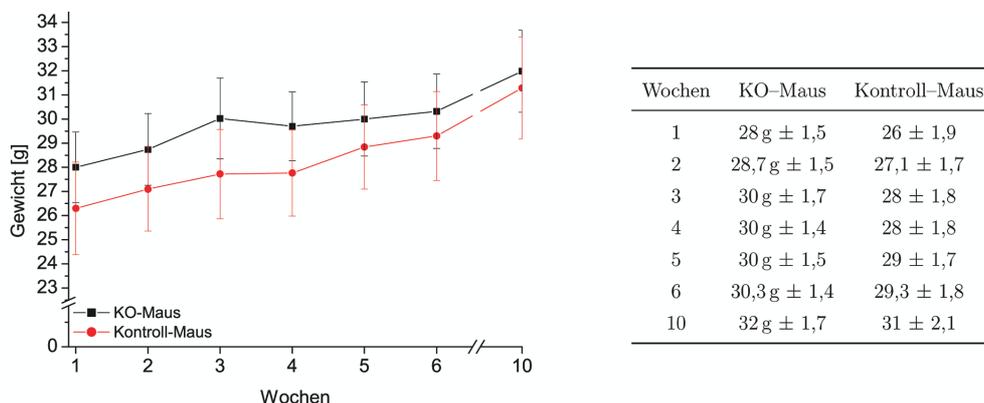


Fig. 3.29: Statistische Auswertung des Körpergewichts von 5 KO- (schwarz) und 5-Kontroll-Mäusen (rot). Graphische Darstellung (links) Werte (rechts).

Die KO-Mäuse waren etwas schwerer als ihre Kontrollgeschwister. Im Mittel wogen die KO-Mäuse zu Beginn der Messungen  $28 \pm 1,46$  g und nach der 10. Messwoche  $32 \pm 1,7$  g. Die Kontroll-Mäuse hingegen wogen im Mittel zu Beginn  $26,3 \pm 1,9$  g und gegen Ende  $31 \pm 2,1$  g. Dennoch unterscheiden sich beide Maus-Linien nicht signifikant voneinander.

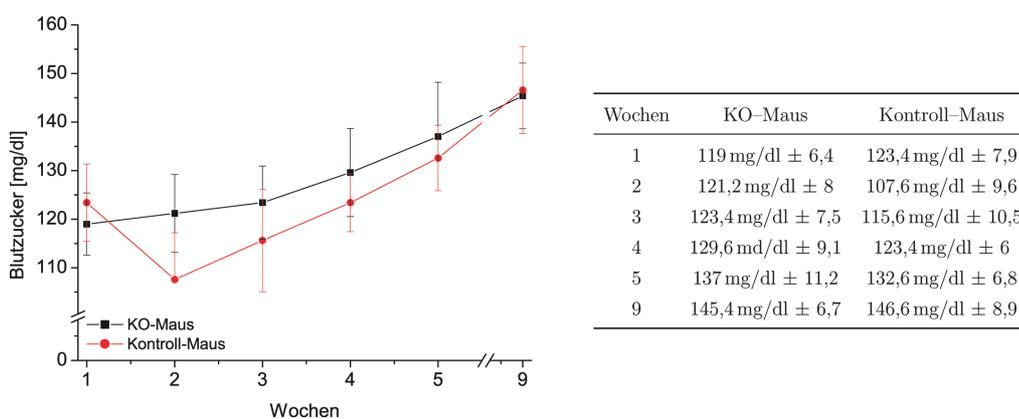


Fig. 3.30: Statistische Auswertung des Blutzucker-Wertes von 5 KO- (schwarz) und 5-Kontroll-Mäusen (rot). Graphische Darstellung (links) Werte (rechts).

Der Blutzuckerspiegel der KO-Mäuse nahmen stetig zu. Zu Beginn lag der Mittelwert bei  $119 \pm 6,4$  mg / dl und stieg während der Messreihen auf  $145,4 \pm 6,7$  mg / dl. Die Kontroll-Mäuse zeigten ähnliche Werte (Beginn:  $123,4 \pm 7,9$  mg / dl; Ende:  $146,6 \pm 8,9$  mg / dl). Die Blutzucker-Werte der KO-Mäuse waren insgesamt ein wenig höher als die der Kontroll-Mäuse, sie unterscheiden sich dennoch nicht signifikant voneinander.

#### 3.4.4 Insulin-Toleranztest

Es wurden die gleichen Mäuse wie in den vorangegangenen Tests verwendet. Die Mäuse wurden vor dem Experiment wieder 4 bis 6 Stunden nüchtern gesetzt. Jeder Maus wurde je nach Gewicht eine bestimmte Insulin-Menge subkutan injiziert, so dass eine Endkonzentration von 1,2 Units / Körpergewicht Maus erreicht wurde. Die Messungen erfolgten vor, 30 min, 60 min und 120 min nach der Injektion. Das Ergebnis ist in der Abbildung 3.31 zu sehen.

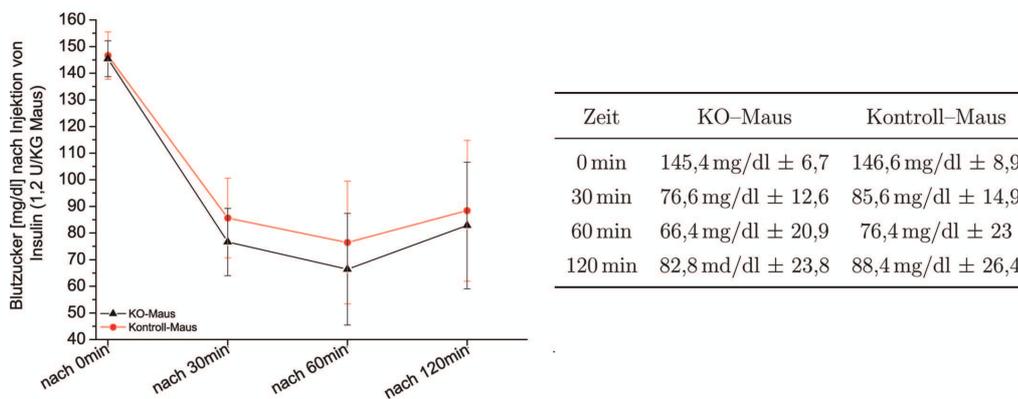


Fig. 3.31: Statistische Auswertung des Insulintoleranztests von 5 KO- (schwarz) und 5 Kontroll-Mäusen (rot). Graphische Darstellung (links), Werte (rechts).

Die KO-Mäuse zeigen gegenüber ihren Kontroll-Geschwistern keine annormale Reaktion auf Insulin. Der Blutzuckerspiegel lag vor der Injektion bei den KO-Mäusen im Mittel  $145,4 \pm 6,7$  mg / dl und bei den Kontroll-Mäusen  $146 \pm 8,9$  mg / dl. Im Laufe der Insulin-Wirkzeit (nach 30 und 60 min) konnte bei beiden Mauslinien eine Senkung des Blutzuckerspiegels registriert werden (siehe Abb. 3.31), der nach 120 min wieder anstieg. Es konnte auch hier keine signifikanten Unterschiede zwischen den KO- und Kontroll-Mäusen gesehen werden. Die Deletion des  $Na_V1.7$ -

Natriumkanals hat daher keinen signifikanten Einfluss auf den Blutzuckerspiegel und das Gewicht bei relativ jungen Mäusen.

## 4. DISKUSSION

### 4.1 Unterscheidung von A- und B-Zellen

Elektrophysiologische und molekularbiologische Untersuchungen haben verschiedene Kalzium- und Natriumkanäle in den Inselzellen und Insulin-sezernierenden Zelllinien identifiziert (65; 47; 73). Bisher gab es keine Methode, um A- von B-Zellen zu unterscheiden. Deswegen konnte man bis jetzt die spannungsabhängigen Ionenkanäle nicht eindeutig einem Zelltyp zuordnen. In der Literatur wurden verschiedene Strategien aufgezeigt, wie man bei elektrophysiologischen Experimenten A- von B-Zellen unterscheiden kann. B-Zellen sind bei hohen, während A-Zellen bei niedrigen Plasmaglukose-Konzentrationen rhythmisch aktiv. Funktionell wurden unterschiedliche Ionenkanäle gefunden (9; 35; 25; 26; 27). B-Zellen besitzen *delayed rectifying* Kaliumkanäle und einen Natriumkanal, der nur bei hyperpolarisierten Haltepotentialen aktiv ist. A-Zellen verfügen über *delayed rectifying* und A-Typ Kaliumkanäle. Sie haben LVA Kalziumkanäle und einen Natriumkanal, der noch bei einem Haltepotential von -70 mV aktiv ist. Die Überprüfung dieser Kriterien vor jeder Messung sind häufig nicht möglich, da die Zellen nicht immer stabil genug sind. Zur Untersuchung von Natrium- und Kaliumkanälen müssen außerdem Intra- und Extrazellulärlösungen verwendet werden, mit denen weder Membranpotentiale noch Kaliumströme gemessen werden können. Auch die Zellgröße kann bei einzeln gemessenen Zellen nicht als Unterscheidungsmerkmal verwendet werden, da B-Zellen sehr stark in ihrer Größe variieren (42). Dies konnte in den hier durchgeführten Messungen bestätigt werden. Wie sich durch die, in dieser Arbeit, durchgeführten Untersuchungen herausstellte, eignen sich auch T-Typ Kalziumkanäle und Natriumkanäle nicht zur Identifizierung der Zelltypen. T-Typ Kalziumkanäle konnten in den Inselzellen der Maus nämlich gar nicht gefunden werden und die Natriumströme zeigten eine umgekehrte Verteilung in A- und B-Zellen als in der Literatur beschrieben.

In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal eine Methode entwickelt, mit der man A- und B-Zellen eindeutig voneinander unterscheiden kann. Mit einer *Single-Cell RT-PCR* mit insulin- und glukagonspezifischen Primern konnten die Zellen erstmals eindeutig genotypisiert werden. Die Kombination aus elektrophysiologischen, pharmakologischen und molekularbiologischen Untersuchungen erlaubt eine Zuordnung der Ionenkanäle zu einem Zelltyp und neue Erkenntnisse über die Expression von Natrium- und T-Typ Kalziumkanäle in den A-Zellen.

#### 4.2 T-Typ Kalziumkanäle werden nicht in den Inselzellen der Maus exprimiert

Die Expression von T-Typ Kalziumkanälen in Pankreasinseln ist speziesabhängig. T-Typen wurden regelmäßig in menschlichen Inseln detektiert, während sie in Inselzellen von Nagern kaum gefunden wurden (73; 54). In Mäusen konnten sie z.B. nur in intakten Inseln mit Hilfe der *Perforated Patch-Clamp-Technik* gemessen werden (9; 27). In Insulinoma-Zelllinien wie INS-1, HIT-T15 oder NIT-1 und Insulinsezernierenden Zellen wurden sie dagegen regelmäßig identifiziert (14; 46; 70). Eine  $Ca_v3.1$  Spleißform wurde sogar aus INS-1 kloniert (76). In der vorliegenden Arbeit konnte eindeutig gezeigt werden, dass einzelne A- und B-Zellen keine T-Typ Kalziumströme oder T-Typ Kalziumkanal-mRNA exprimieren, während in ganzen Inseln die Amplikons dieser Kanäle nachgewiesen werden konnten. In einer jüngsten Untersuchung konnte im Widerspruch dazu an MIP-GFP-Mäusen die Existenz zweier T-Typ-Ströme in einzelne A-Zellen gefunden werden. Der Eine aktiviert bei Haltepotentialen um  $V_h$  -40 mV und der andere bei  $V_h$  -60 mV. Nur ein sehr geringer Anteil an A-Zellen zeigten diesen zweiten T-Typ-Strom und enthielten zudem keine HVA-Ströme. Es wurde daher vermutet, dass es sich um eine A-Zellpopulation handelt, die als Schrittmacher für die anderen A-Zellen bei niedriger Plasmaglukose fungieren könnten (41).

Diese Mauslinie wurde in einer früheren Studie etabliert. Die B-Zellen exprimieren GFP unter dem Insulin-Promotor und können durch grüne Fluoreszenz von den übrigen Zellen unterschieden werden (42). Man kann allerdings in einer gesamten Insel die grünfluoreszierenden Zellen nicht mehr von den nicht-grünfluoreszierenden unterscheiden und zudem ist nicht eindeutig klar, ob es sich bei den nicht-

grünfluoreszierenden Zellen nur um A-Zellen handelt (42). Es könnte sich bei den vermeintlich gemessenen A-Zellen daher auch um D- oder PP-Zellen handeln. In der vorliegenden Arbeit konnten keine T-Typ-Ströme gemessen werden. Der Grund könnte sein, dass während der Zell-Isolationsprozedur T-Typ Kalziumkanäle inaktiviert wurden. Es wurden auch Unterschiede im Metabolismus verschiedener Mauslinien beobachtet (4; 17; 30), was das Fehlen der T-Typ Kalziumkanäle in den hier untersuchten Zellen ebenfalls begründen könnte. Ein weiterer Grund könnte auch sein, dass die Zellen nicht ausreichend genug kultiviert wurden und daher T-Typ Kalziumkanäle erst gar nicht exprimiert werden konnten.

Im kardiovaskulären System findet man nämlich T-Typ Kalziumkanäle vorwiegend während der Entwicklung oder im krankhaften Zustand (59; 60). Es konnte auch gezeigt werden, dass die Expression von LVA Kalziumkanälen in murinen Inselzellen nach Stimulation mit Cytokinen nachgewiesen werden können (70). Unter physiologischen Bedingungen werden diese Kanäle in der Maus offensichtlich nicht exprimiert. Es könnte daher sein, dass sich bei den Inselzellen T-Typ Kalziumkanäle möglicherweise nur bei langfristig kultivierten oder transduzierten Zellen entwickeln. Eine andere Möglichkeit ist, dass T-Typen nur im intakten Inselgewebe funktionell sind, da in einer Insel mehrere Zellen zu einem Cluster vereint sind und durch das Zusammenspiel einzelner Zellen es zur Expression dieser Kalziumkanäle kommen kann.

### 4.3 Zwei Typen von TTX-sensitiven Natriumströme in den Inselzellen der Maus

Bisherige Untersuchungen zeigten, dass Inselzellen zwei Typen von TTX-sensitiven Natriumströmen haben, einen frühinaktivierenden und einen spätinaktivierenden Natriumstrom. In B-Zellen wurde nur der frühinaktivierende Natriumstrom gefunden, während in den A-Zellen ein TTX-sensitiver Natriumkanal beschrieben wurde, der bei einem physiologischen Membranpotential aktiviert ist (25; 9). Dieser Natriumkanal könnte an der Glukagon-Sekretion beteiligt sein (27). In der vorliegenden Arbeit wurden ebenfalls zwei Typen von Natriumströmen in den Inselzellen der Maus gefunden. Die Verteilung auf A- und B-Zellen ist aber im Vergleich zu früheren Studien anders. So konnte der frühinaktivierende Natriumstrom in den A- und

B-Zellen detektiert werden. Die B-Zellen zeigten beide Ströme und konnten in zwei Populationen unterteilt werden. 40 % aller B-Zellen enthielten nur den frühinaktivierenden und die restlichen 60 % beide Natriumströme. Ein Teil der B-Zellen besitzt daher einen Natriumkanal, der bei einem physiologischen Membranpotential aktiv sein könnte (vgl. 69). In A-Zellen konnte nur ein Natriumstrom gemessen werden. Es ist nicht auszuschließen, dass ein Teil der A-Zellen den spätinaktivierten Natriumstrom zeigt. Dieser könnte aufgrund der Isolationsprozedur inaktiviert worden sein. In MIP-GFP-Mäusen konnte gezeigt werden, dass nicht grün-fluoreszierende Zellen (vermutlich A-Zellen) im Inselverband den spätinaktivierenden Natriumstrom exprimieren. In isolierten A-Zellen konnte dieser Natriumstrom jedoch nicht mehr nachgewiesen werden (42).

Durch eine *Single-Cell RT-PCR* mit  $Na_V1.7$ -spezifischen Primern konnte der  $Na_V1.7$  Natriumkanal als molekulare Grundlage des frühinaktivierenden Natriumstroms sowohl in A- wie auch in B-Zellen identifiziert werden.

#### 4.4 Untersuchung der A-zellspezifischen $Na_V1.7^{-/-}$ -Maus

Bereits 1995 wurde der  $Na_V1.7$  aus einer neuroendokrinen Zelllinie des Menschen kloniert (38). Dieser Kanal zeigte die gleichen Eigenschaften wie der frühinaktivierende Natriumkanal in den Inselzellen der Maus. Der einwärtsgerichtete Natriumstrom beginnt bei -40 mV und steigert sich bis zum Maximum bei einem Potential von -10 mV (38). Auch in anderen Studien konnte dieser Strom-Verlauf in den Inselzellen der Maus gemessen werden (9; 27; 43; 42). Eine  $Na_V1.7$ -KO-Maus wurde bisher nur in der Schmerzwahrnehmung untersucht (50). Um so interessanter ist daher die Betrachtung der in der vorliegenden Arbeit generierten A-Zellspezifischen  $Na_V1.7$ -KO-Maus.

Von 12 gemessenen A-Zellen konnten 11 ohne und nur eine einzige mit Natriumstrom gemessen werden. Bei der einen Zelle kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich um einen Mess- oder Genotypisierungsfehler handelt. Eventuell wurde beim Einsaugen versehentlich die falsche bzw. eine weitere Zelle miteingesammelt, so dass bei der *Single-Cell RT-PCR* mit insulin- und glukagonspezifischen Primern Glukagon amplifiziert wurde.

Die Gewichts-, Basalglukosemessungen und der Insulin-Toleranz-Test zeigten keine

signifikanten Unterschiede zwischen den KO- und Kontroll-Mäusen. Beide Mauslinien waren zu Beginn der Messungen ca. drei Monate alt. In der Publikation Netea et al. (2006) wurde eine Mauslinie betrachtet, der das Interleukin-18 deletiert wurde. Diese Mäuse zeigen erst ab einem Alter von 6 Monaten einen signifikanten Unterschied zu den Kontroll-Mäusen. So sind sie im Durchschnitt deutlich dicker, schwerer und haben einen deutlich erhöhten Basalblutzuckerspiegel (51). Die Vermutung wäre, dass bei der  $Na_V1.7^{-/-}$ -Maus auch erst ab einem bestimmten Alter eventuelle Unterschiede zu den Kontroll-Mäusen zu erkennen sind. Dies wurde aber in der vorliegenden Arbeit aus Zeitgründen nicht mehr untersucht. Insgesamt kann man zusammenfassen, dass die A-Zellen der  $Na_V1.7^{-/-}$ -Maus zwar keinen Natriumstrom mehr exprimieren, aber phänotypisch, sowie vom Gewicht und Blutzucker her normal sind. Sie sprechen außerdem auch normal auf 1,2 U / Körpergewicht Insulin an. Eine Langstudien-Messung wäre eventuell von Vorteil, um diverse Stoffwechselstörungen, die erst ab einem bestimmten Alter auftreten, auszuschließen.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Insulin wird bei hohem Blutzucker aus B- und Glukagon bei niedrigem Blutzucker aus A-Zellen des Pankreas freigesetzt. Beide Prozesse werden durch die intrazelluläre  $[Ca^{2+}]$  gesteuert. Es wurde vermutet, dass unterschiedliche Ionenkanäle an der Hormonsekretion beteiligt sind. In A-Zellen sollen Natrium- und T-Typ Kalziumkanäle an der Glukagonsekretion involviert sein. Eine Analyse der Ionenkanäle ist sehr schwer, weil es keine sicheren Unterscheidungsmerkmale für A- und B-Zellen gibt.

In der vorliegenden Arbeit, wurde zum ersten Mal eine Methode entwickelt, mit der man A- und B-Zellen eindeutig unterscheiden und somit die erhaltenen elektrophysiologischen Messungen einem Zelltyp zuordnen kann. Einzelne Zellen wurden mit Hilfe einer *Single-Cell RT-PCR* mit insulin- und glukagonspezifischen Primern genotypisiert. Es konnte gezeigt werden, dass LVA Kalziumkanäle weder in A- noch in B-Zellen exprimiert werden. Stattdessen konnten zwei TTX-sensitive Natriumströme in den Zellen gemessen werden. Der eine inaktiviert schon bei sehr frühen Potentialen und ist nur bei einem Haltepotential von  $V_h$  -120 mV messbar, während der andere bei physiologischen Membranpotentialen von  $V_h$  -80 mV noch persistiert. Eine *Single-Cell RT-PCR* mit glukagon- und insulinspezifischen Primern zeigte, dass entgegen aller Literatur, die A-Zellen nur den frühinaktivierenden und die B-Zellen entweder den frühinaktivierenden oder beide Natriumströme exprimieren. Außerdem konnte diesbezüglich auch gezeigt werden, dass B-Zellen offensichtlich in mehrere Populationen eingeteilt werden können.

Die *Single-Cell RT-PCR* mit  $Na_V1.7$ -spezifischen Primern zeigte eindeutig, dass dieser Natriumkanal in beiden Zelltypen gefunden werden konnte. Die A-Zellspezifische  $Na_V1.7$ -KO-Maus bekräftigte außerdem die Vermutung, dass der  $Na_V1.7$  die molekulare Grundlage für den frühinaktivierenden Natriumstrom in A- und B-Zellen bildet. Ein Unterschied im Gewicht und Blutzucker konnte allerdings bei jungen Mäusen nicht beobachtet werden.

## LITERATURVERZEICHNIS

- [1] *The Cre/loxP recombination system in transgenic mice.*  
<http://mammary.nih.gov/tools/molecular/wagner001/>
- [2] *Patch-Clamp-Technik.* <http://de.wikipedia.org/wiki/Patch-Clamp-Technik>
- [3] *Die Verdauung.* <http://www.buildingyourbody.de/verdauung.php>
- [4] ANDRIKOPOULOS, S ; MASSA, CM ; ASTON-MOURNEY, K ; FUNKAT, A ; FAM, BC ; HULL, RL: Differential effect of inbred mouse strain (C57BL/6, DBA/2, 129T2) on insulin secretory function in response to a high fat diet. In: *J. Endocrinol* 187 (2005), S. 45–53
- [5] ASHCROFT, F.M. ; PROKS, P. ; SMITH, P.A. ; AMMALA, C. ; BOKVIST, K. ; RORSMAN, P.: Stimulus–secretion coupling in pancreatic beta cells. In: *J. Cell. Biochem.* 55 (1994), S. 54–65
- [6] ASHCROFT, F.M. ; RORSMAN, P.: Electrophysiology of the pancreatic  $\beta$ -cell. In: *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 54 (1989), S. 87–143
- [7] BARG, Sebastian: Mechanisms of Exocytosis in Insulin–Secreting B–Cells and Glucagon–Secreting A–Cells. In: *Pharmacology & Toxicology* 92 (2003), Juni, S. 3–13
- [8] BARG, Sebastian ; ELIASSON, Lena ; RENSTRÖM, Erik ; RORSMAN, Patrik: A Subset of 50 Secretory Granules in Close Contact with L–Type  $Ca^{2+}$  Channels Accounts for First–Phase Insulin Secretion in Mouse  $\beta$ –Cells. In: *Diabetes* 51 (2002), Februar, S. 74–82
- [9] BARG, Sebastian ; GLAVANOVSKI, Juris ; GÖPEL, Sven O. ; RORSMAN, Patrik ; ELIASSON, Lena: Tight coupling between electrical activity and exocytosis

- in mouse glucagon-secreting  $\alpha$ -cells. In: *Diabetes* 49 (2000), September, S. 1500–1510
- [10] BARG, Sebastian ; MA, Xiaosong ; ELIASSON, Lena ; GALVANOVSKIS, Juris ; GÖPEL, Sven O. ; OBERMÜLLER, Stefanie ; PLATZER, Josef ; RENSTRÖM, Erik ; TRUS, Michel ; ATLAS, Daphne ; STRIESSNIG, Jörg ; RORSMAN, Patrik: Fast Exocytosis with few  $Ca^{2+}$  channels in insulin-secreting mouse pancreatic B cells. In: *Biophysical Journal* 81 (2001), Dezember, S. 3308–3323
- [11] BARNETT, David W. ; PRESSEL, David M. ; MISLER, Stanley: Voltage-dependent  $Na^+$  and  $Ca^{2+}$  currents in human pancreatic islet  $\beta$ -cells: evidence for roles in the generation of action potentials and insulin secretion. In: *Pflügers Arch-Eur J Physiol* 431 (1995), August, S. 272–282
- [12] BÖDDING, M.: Die Patch-clamp-Technik und angrenzende Messverfahren. In: *Pharm. Ztg.* 141 (1996), S. 11–27
- [13] BEAN, B.P.: Two kinds of calcium channels in canine atrial cells. In: *J Genl Physiol* 86 (1985), Juli, S. 1–30
- [14] BHATTACHARJEE, Arin ; JR., Richard M. W. ; ZHANG, Min ; WANG, Lin ; LI, Ming: T-Type Calcium Channels Facilitate Insulin Secretion by Enhancing General Excitability in the Insulin-Secreting  $\beta$ -Cell Line, INS-1. In: *Endocrinology* 138 (1997), Nr. 9, S. 3735–3740
- [15] BOKVIST, K. ; OLSEN, H. L. ; HOY, M. ; GOTFREDSEN, C. F. ; HOLMES, W. F. ; BUSCHARD, K. ; RORSMAN, P. ; GROMADA, J.: Characterisation of sulphonylurea and ATP-regulated  $K^+$  channels in rat pancreatic A-cells. In: *Pflügers Arch* 438 (1999), September, Nr. 4, S. 428–436
- [16] BRADLEY, J.E. ; ANDERSON, U.A. ; WOOLSEY, S.M. ; THORNBURY, K.D. ; MCHALE, N.G. ; HOLLYWOOD, M.A.: Characterisation of T-type calcium current and its contribution to electrical activity in rabbit urethra. In: *AJP cell* 286 (2004), S. C1078–C1088
- [17] BURGESS, SC ; JEFFREY, FM ; STOREY, C ; MILDE, A ; HAUSLER, N ; MERRITT, ME: Effect of murine strain on metabolic pathways of glucose production

- after brief or prolonged fasting. In: *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289 (2005), S. E53–E61
- [18] CATTERALL, William A. ; GOLDIN, Alan L. ; WAXMAN, Stephen G.: International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and Structure–Function Relationships of Voltage–Gated Sodium Channels. In: *Pharmacological Reviews* 57 (2005), Nr. 4, S. 397–409
- [19] CATTERALL, William A. ; PEREZ-REYES, Edward ; SNUTCH, Terrance P. ; STRIESSNIG, Joerg: International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and Structure–Function Relationships of Voltage–Gated Calcium Channels. In: *Pharmacological Reviews* 57 (2005), Nr. 4, S. 411–425
- [20] COOK, D.L. ; HALES, C.N.: Intracellular ATP directly blocks  $K^+$  channels in pancreatic B–cells. In: *Nature* 311 (1984), S. 271–273
- [21] CRIBBS, L.L. ; LEE, J.-H. ; SATIN, J. ; ZHANG, Y. ; DAUD, A. ; BARCLAY, J. ; WILLIAMSON, M.P. ; FOX, M. ; REES, M. ; PEREZ-REYES, E.: Cloning and characterization of  $\alpha 1H$  from human heart, a member of the T–Type  $Ca^{2+}$  channel gene family. In: *Circ. Res.* 83 (1998), S. 103–109
- [22] DOYLE, Maire E. ; EGAN, Josephine M.: Pharmacological Agents that directly modulate Insulin Secretion. In: *Pharmacological Reviews* 55 (2003), Nr. 1, S. 105–131
- [23] GOLDIN, Alan L.: Evolution of voltage-gated Na(+) channels. In: *J Exp Biol* 205 (2002), März, Nr. 5, S. 575–584
- [24] GOLDIN, Alan L. ; BRACHI, Robert L. ; CALDWELL, John H. ; HOFMANN, Franz ; HOWE, James R. ; HUNTER, John C. ; KALLEN, Roland G. ; MANDEL, Gail ; MEISLER, Miriam H. ; NETTER, Yoheved B. ; NODA, Masahara ; TAMKUN, Michael M. ; WAXMAN, Steven G. ; WOOD, John N. ; CATTERALL, William A.: Nomenclatur of Voltage–Gated Sodium Channels. In: *Neuron* 28 (2000), November, S. 365–368
- [25] GÖPEL, S. ; KANNO, T. ; BARG, S. ; GALVANOVSKIS, J. ; RORSMAN, P.: Voltage–gated and resting membrane currents recorded from B–cells in intact mouse pancreatic islets. In: *J. Physiol* 521 (1999), Dezember, Nr. 3, S. 717–728

- [26] GÖPEL, S.O. ; KANNO, T. ; BARG, S. ; RORSMAN, P.: Patch-clamp characterisation of somatostatin-secreting  $\delta$ -cells in intact mouse pancreatic islets. In: *Journal of Physiology* 528 (2000), Juli, Nr. 3, S. 497–507
- [27] GÖPEL, S.O. ; KANNO, T. ; BARG, S. ; WENG, X.-G. ; GROMADA, J. ; RORSMAN, P.: Regulation of glucagon release in mouse  $\alpha$ -cells by  $K_{ATP}$  channels and inactivation of TTX-sensitive  $Na^+$  channels. In: *Journal of Physiology* 528 (2000), Juli, Nr. 3, S. 509–520
- [28] GÖPEL, Sven: *Electrophysiology of pancreatic  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\delta$ -cell studied in intact mouse islets of Langerhans*. Lund, Department of Physiological Sciences Lund University, Diss., 2001
- [29] GROMADA, Jesper ; BOKVIST, Krister ; DING, Wei-Guang ; BARG, Sebastian ; BUSCHARD, Karsten ; RENSTRÖM, Erik ; RORSMAN, Patrik: Adrenaline stimulates Glucagon Secretion in Pancreatic A-cells by Increasing the  $Ca^{2+}$  Current and the Number of Granules Close to the L-Type  $Ca^{2+}$  Channels. In: *J. Gen. Physiol.* 110 (1997), September, S. 217–228
- [30] GURLEY, SB ; CLARE, SE ; SNOW, KP ; HU, A ; MEYER, TW ; COFFMAN, TM: Impact of genetic background on nephropathy in diabetic mice. In: *Am J Physiol Renal Physiol* 290 (2006), S. F214–F222
- [31] HAMILL, O.P. ; MARTY, A. ; NEHER, E. ; SAKMANN, B. ; SIGWORTH, F.J.: Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. In: *Pflügers Arch.* 391 (1981), S. 85–100
- [32] HERRERA, Pedro L.: Adult insulin- and glucagon-producing cells differentiate from two independent cell lineages. In: *Development* 127 (2000), S. 2317–2322
- [33] HOFMANN, F. ; LACINOVA, L. ; KLUGBAUER, N.: Voltage-Dependent Calcium Channels: From Structure to Function. In: *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 139 (1999), S. 33–87
- [34] JING, Xingjun ; LI, Dai-Qing ; OLOFSSON, Charlotta S. ; SALEHI, Albert ; SURVE, Vikas V. ; CABALLERO, Jose ; IVARSSON, Rosita ; LUNDQUIST, Ingmar ; PEREVERZEV, Alexey ; SCHNEIDER, Toni ; RORSMAN, Patrik ; RENSTRÖM,

- Erik:  $Ca_v2.3$  calcium channels control second-phase insulin release. In: *The Journal of Clinical Investigation* 115 (2005), Januar, Nr. 1, S. 146–154
- [35] KANNO, T. ; RORSMAN, P. ; GÖPEL, S.O.: Glucose-dependent regulation of rhythmic action potential firing in pancreatic beta cells in the rat. In: *Virchows Arch.* 425 (2002), S. 501–507
- [36] KIRCHNER, Andrea: *Expression zellmobilitätsrelevanter Zytokine in der Lunge bei chronischer Silikose der Ratte*. Erfurt, Philipps-Universität Marburg, Diss., Mai 1999
- [37] KITCHENS, S.A. ; BURCH, J. ; CREAZZO, T.L.: T-type  $Ca^{2+}$  current contribute to  $Ca^{2+}$ -induced  $Ca^{2+}$  release in developing myocardium. In: *J. Mol. Cell. Cardiol.* 35 (2003), S. 515–523
- [38] KLUGBAUER, Norbert ; LACINOVA, Lubica ; FLOCKERZI, Veit ; HOFMANN, Franz: Structure and functional expression of a new member of the tetrodotoxin-sensitive voltage-activated sodium channel family from human neuroendocrine cells. In: *The EMBO Journal* 14 (1995), Nr. 6, S. 1084–1090
- [39] KLUGBAUER, Norbert ; SPECHT, Verena ; WELLING, Andrea: Spannungsabhängige Kalziumkanäle: Neue Einblicke mit Hilfe transgener Mausmodelle. In: *BIOspektrum* 6 (2002), S. 1–4
- [40] LACINOVA, Lubica ; HOFMANN, Franz ; PRESS, Academic (Hrsg.): *Voltage-Dependent Calcium Channels*. 4. Heart Physiology and Pathophysiology, 2001
- [41] LEUNG, Yuk M. ; AHMED, Ishtiaq ; SHEU, Laura ; TSUSHIMA, Robert G. ; DIAMANT, Nicholas E. ; GAISANO, Herbert Y.: Two populations of pancreatic islet  $\alpha$ -cells displaying distinct  $Ca^{2+}$  channel properties. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 345 (2006), April, S. 340–344
- [42] LEUNG, Yuk M. ; AHMED, Ishtiaq ; SHEU, Laura ; TSUSHIMA, Robert G. ; DIAMANT, Nicholas E. ; HARA, Manami ; GAISANO, Herbert Y.: Electrophysiological Characterization of Pancreatic Islet Cells in the Mouse Insulin Promotor-Green Fluorescent Protein Mouse. In: *Endocrinology* 146 (2005), Dezember, Nr. 11, S. 4766–4775

- [43] LOU, Xue-Lin ; YU, Xiao ; CHEN, Xiao-Ke ; DUAN, Kai-Lai ; HE, Li-Ming ; QU, An-Lian ; XU, Tao:  $Na^+$  channel inactivation: a comparative study between pancreatic islet  $\beta$ -cells and adrenal chromaffin cells in rat. In: *J Physiol* 548 (2003), Februar, Nr. 1, S. 191–202
- [44] LUKOWSKI, Robert ; WEBER, Silke ; WEINMEISTER, Pascal ; FEIL, Susanne ; FEIL, Robert: Cre/loxP-vermittelte konditionale Mutagenese des cGMP-signalwegs in der Maus. In: *BIOspektrum* 3 (2005), März, S. 287–291
- [45] MACDONALD, Patrick ; RORSMANN, Patrick: Oscillations, Intercellular Coupling, and Insulin Secretion in Pancreatic  $\beta$  Cells. In: *PLoS Biology* 4 (2006), Februar, S. 167–171
- [46] MARCHETTI, C. ; AMICO, C. ; PODESTA, D. ; ROBELLO, M.: Inactivation of voltage-dependent calcium current in an insulinoma cell line. In: *Eur. Biophys J.* 23 (1994), Nr. 1, S. 51–58
- [47] MEARS, David: Regulation of Insulin Secretion in Islets of Langerhans by  $Ca^{2+}$  Channels. In: *J. Membrane Biol.* 200 (2004), Juni, S. 57–66
- [48] MIKI, T. ; LISS, B. ; MINAMI, K. ; SHIUCHI, T. ; SARAYA, A. ; KASHIMA, Y. ; HORIUCHI, M. ; ASHCROFT, F. ; MINOKOSHI, Y. ; ROEPER, J. ; SEINO, S.: ATP-sensitive  $K^+$  channels in the hypothalamus are essential for the maintenance of glucose homeostasis. In: *Nat Neuroscience* 4 (2001), Mai, Nr. 5, S. 507–512
- [49] MUNOZ, Alvaro ; HU, Min ; HUSSAIN, Khalid ; BRYAN, Joseph ; AGUILAR-BRYAN, Lydia ; RAJAN, Arun S.: Regulation of Glucagon Secretion at Low Glucose Concentrations: Evidence for Adenosine Triphosphate-Sensitive Potassium Channel Involvement. In: *Endocrinology* 146 (2005), Dezember, Nr. 12, S. 5514–5521
- [50] NASSAR, Mohammed A. ; STIRLING, L. C. ; FORLANI, Greta ; BAKER, Mark D. ; MATTHEWS, Elizabeth A. ; DICKENSON, Anthony H. ; WOOD, John N.: Nociceptor-specific gene deletion reveals a major role for  $Na_v1.7$  (PN1) in acute and inflammatory pain. In: *PNAS* 101 (2004), Nr. 34, S. 12706–12711

- [51] NETEA, Mihai G. ; JOOSTEN, Leo A. ; LEWIS, Eli ; JENSEN, Dalan R. ; VOSHOL, Peter J. ; KULLBERG, Bart J. ; TACK, Cees J. ; KRIEKEN, Han van ; KIM, Soo-Hyun ; STALENHOEF, Anton F. ; LOO, Fons A. d. ; VERSCHUEREN, Ineke ; PULAWA, Leslie ; AKIRA, Shizuo ; ECKEL, Robert H. ; DINARELLO, Charles A. ; BERG, Wim van d. ; MEER, Jos W. d.: Deficiency of interleukin-18 in mice leads to hyperphagia, obesity and insulin resistance. In: *Nature Medicine* 12 (2006), Juni, Nr. 6, S. 650–657
- [52] OGATA, Nobukuni ; OHISHI, Yoshiaki: Molecular Diversity of Structure and Function of the Voltage-Gated  $Na^+$  Channels. In: *Jpn. J. Pharmacol.* 88 (2002), S. 365–377
- [53] PANTEN, U. ; RUSTENBECK, I.: *Pharmakologie des Glucosestoffwechsels: Antidiabetika, Antihypoglykämika Antihyperglykämische Pharmakotherapie des Diabetes mellitus.* in Aktories, K., Förstermann, U., Hofmann, F., Strake, K., 2005
- [54] PEREZ-REYES, Edward: T-Type Calcium Channels. In: *Physiol Rev* 83 (2003), Januar, S. 130–161
- [55] PIPELEERS, D.G. ; SCHUIT, F.C. ; SCHRAVENDIJK, C.F. V. ; WINKEL, M. V.: Interplay of nutrients and hormones in the regulation of glucagon release. In: *Endocrinology* 117 (1985), September, Nr. 3, S. 817–823
- [56] PLANT, T.D.:  $Na^+$  currents in cultured mouse pancreatic B-cells. In: *Pflügers Arch* 411 (1988), S. 429–435
- [57] POSTIC, Catherine ; SHIOTA, Masakazu ; NISWENDER, Kevin D. ; JETTON, Thomas L. ; CHEN, Yeujin ; MOATES, J. M. ; SHELTON, Kathy D. ; LINDNER, Jill ; CHERRINGTON, Alan D. ; MAGNUSON, Mark A.: Dual roles for glucokinase in glucose homeostasis as determined by liver and pancreatic  $\beta$  cell-specific gene knock-outs using cre recombinase. In: *The journal of biological chemistry* 274 (1999), Januar, Nr. 1, S. 305–315
- [58] QIAGEN, Distributors: *QIAamp DNA Mini Kit and QIAamp DNA Blood Mini Kit Handbook.* Qiagen, Februar 2003

- [59] RICHARD, S. ; LECLERCQ, F. ; LEMAIRE, S. ; PIOT, C. ; NARGEOT, J.:  $Ca^{2+}$  currents in compensated hypertrophy and heart failure. In: *Cardiovasc Res.* 37 (1998), Februar, Nr. 2, S. 300–311
- [60] RODMAN, DM ; REESE, K ; HARRAL, J ; FOUTY, B ; WU, S ; WEST, J ; HOEDT-MILLER, M ; TADA, Y ; LI, KX ; COOL, C ; FAQAN, K ; CRIBBS, L: Low-voltage-activated (T-Type) calcium channels control proliferation of human pulmonary artery myocytes. In: *Circ Res* 96 (2005), April, Nr. 8, S. 864–872
- [61] RORSMAN, P. ; RENSTRÖM, E.: Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells. In: *Diabetologia* 46 (2003), S. 1029–1045
- [62] RORSMAN, P. ; TRUBE, G.: Glucose dependent  $K^{+}$ -channels in pancreatic beta-cells are regulated by intracellular ATP. In: *Pfluegers Arch.* 405 (1985), S. 305–309
- [63] RORSMAN, Patrik ; ELIASSON, Lena ; RENSTRÖM, Erik ; GROMADA, Jesper ; BARG, Sebatsian ; GÖPEL, Sven: The Cell Physiology of Biphasic Insulin Secretion. In: *News Physiol. Sci.* 15 (2000), April, S. 72–77
- [64] SAIKI, R.K. ; GELFAND, D.H. ; STOFFEL, S. ; SCHARF, S.J. ; HIGUCHI, R. ; HORN, G.T. ; MULLIS, K.B. ; ERLICH, H.A.: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. In: *Science* 239 (1988), S. 487–91
- [65] SATIN, L.S.: Localized calcium influx in pancreatic beta-cells: its significance for  $Ca^{2+}$ -dependent insulin secretion from the islets of Langerhans. In: *Endocrine* 13 (2000), S. 251–262
- [66] SCHULLA, Verena ; RENSTRÖM, Erik ; FEIL, Robert ; FEIL, Susanne ; FRANKLIN, Isobel ; GJINOVI, Asllan ; JING, Xing-Jun ; LAUX, Dirk ; LUNDQUIST, Ingmar ; MAGNUSON, Mark A. ; OBERMÜLLER, Stefanie ; OLOFSSON, Charlotta S. ; SALEHI, Albert ; WENDT, Anna ; KLUGBAUER, Norbert ; WOLLHEIM, Claes B. ; RORSMAN, Patrik ; HOFMANN, Franz: Impaired insulin secretion and glucose tolerance in  $\beta$  cell-selective  $Ca_v1.2$   $Ca^{2+}$  channel null mice. In: *The EMBO journal* 22 (2003), Nr. 15, S. 3844–3854

- [67] SEISENBERGER, Claudia ; SPECHT, Verena ; WELLING, Andrea ; PLATZER, Josef ; PFEIFER, Alexander ; KÜHBANDNER, Susanne ; STRIESSNIG, Jörg ; KLUGBAUER, Norbert ; FEIL, Robert ; HOFMANN, Franz: Functional Embryonic Cardiomyocytes after Disruption of the L-type  $\alpha_{1C}$  ( $Ca_v1.2$ ) Calcium Channel Gene in the Mouse. In: *The Journal of Biological Chemistry* 275 (2000), Dezember, Nr. 50, S. 39193–39199
- [68] SILBERNAGL, S. ; DESPOPOULOS, A. ; SILBERNAGL, Despopoulos A. Taschenatlas der P. (Hrsg.): *Hormone, Reproduktion: Kohlenhydratstoffwechsel, Pankreashormone*. 6. Auflage. New York : Thieme Verlag Stuttgart, 2003. – 282–285 S
- [69] VIGNALI, Sheila ; LEISS, Veronika ; KARL, Rosi ; HOFMANN, Franz ; WELLING, Andrea: Characterization of voltage-dependent sodium and calcium channels in mouse pancreatic A- and B-cells. In: *Jphysiol* 572 (2006), Mai, Nr. 3, S. 691–706
- [70] WANG, Lin ; BHATTACHARJEE, Arin ; ZUO, Zhuang ; HU, Fuquan ; HONKANEN, Richard E. ; BERGGREN, Per-Olof ; LI, Ming: A Low Voltage-Activated  $Ca^{2+}$  Current Mediates Cytokine-Induced Pancreatic  $\beta$ -Cell Death. In: *Endocrinology* 140 (1999), Nr. 3, S. 1200–1204
- [71] WILLIAMS, Gareth ; PICKUP, John C. ; SIENCE, Blackwell (Hrsg.): *Handbook of Diabetes*. 2. Auflage. ISBN 0-632-05504-9 : Blackwell science, Februar 2004
- [72] WILLIAMS, Mark E. ; WASHBURN, Mark S. ; HANS, Miachael ; URRUTIA, Arturo ; BRUST, Paul F. ; PRODANOVICH, Patricia ; HARPOLD, Michael M. ; STAUDERMAN, Kenneth A.: Structure and Functional Characterisation of a Novel Human Low-Voltage Activated Calcium Channel. In: *Journal of Neurochemistry* 72 (1999), Nr. 2, S. 791–799
- [73] YANG, S.N. ; BERGGREN, P.O.:  $\beta$ -cell  $Ca_v$  channel regulation in physiology and pathophysiology. In: *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288 (2005), September, S. E16–E28
- [74] YU, Frank H. ; CATTERALL, William A.: Overview of the voltage-gated sodium channel family. In: *Genome Biology* 4 (2003), Nr. 3, S. 207.1–207.7

- 
- [75] ZHANG, M. ; HOUAMED, K. ; KUPERSHMIDT, S ; RODEN, D. ; SATIN, L.S.: Pharmacological properties and functional role of  $K_{slow}$  current in mouse pancreatic beta-cells: SK channels contribute to  $K_{slow}$  tail current and modulate insulin secretion. In: *J. Gen. Physiol.* 126 (2005), S. 353–363
- [76] ZHUANG, Hean ; BHATTACHARJEE, Arin ; HU, Fuquan ; ZHANG, Min ; GOSWAMI, Tapasree ; WANG, Lin ; WU, Songwei ; BERRGREN, Per-Olof ; LI, Ming: Cloning of a T-Type  $Ca^{2+}$  Channel Isoform in Insulin-Secreting Cells. In: *Diabetes* 49 (2000), Januar, S. 59–64
- [77] ZIMMET, Paul ; ALBERTI, K. G. M. M. ; SHAW, Jonathan: Global and societal implications of the diabetes epidemic. In: *Nature* 414 (2001), Dezember, S. 782–787

## VERÖFFENTLICHUNGEN

- Teile dieser Arbeit sind in folgender Originalarbeit veröffentlicht:  
VIGNALI, Sheila; LEISS, Veronika; KARL, Rosi; HOFMANN, Franz; WELLING, Andrea: Characterization of voltage-dependent sodium and calcium channels in mouse pancreatic A- and B-cells., (2006) In: *J. Physiol. (Lond.)*, 572, Mai, Nr. 3, S. 691–706

- Die Ergebnisse dieser Arbeit sind in Teilen auf folgenden Kongressen in Form von Kurzvorträgen und Postern vorgestellt und als Abstracts veröffentlicht worden:

VIGNALI, S.; SCHULLA, V.; KLUGBAUER, N.; HOFMANN, F.; WELLING, A.: Molecular and electrophysiological analysis of Ion channels in Pancreatic Alpha cells., (2004) In: *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacol.* 369, S. R72

WELLING, A.; VIGNALI, S.; SCHULLA, V.; KLUGBAUER, N.; HOFMANN, F.: Analysis of different ionic channels in pancreatic alpha-cells by means of patch-clamp and single-cell RT-PCR., (2004) In: *Pflügers Archive*, 447 Suppl., S. 27

LEISS, V.; VIGNALI, S.; KARL, R.; HOFMANN, F.; WELLING, A.: Identification of different HVA calcium channel subtypes in pancreatic islet cells of the mouse., (2005) In: *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacol.*, 371 Suppl. 1, R 64

VIGNALI, S.; LEISS, V.; KARL, R.; HOFMANN, F.; WELLING, A.: Analysis of sodium and LVA calcium channels in pancreatic islet cells of the mouse., (2005) In: *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacol.*, 371 Suppl. 1, R 64

VIGNALI, S.; LEISS, V.; AUER, V.; HOFMANN, F.; WELLING, A.: Analysis of sodium and calcium channels in murine pancreatic islet cells, 2006 In: *Official journal of the Federation of European Physiological Societies*, 186 Supp. 1, 236

VIGNALI, S.; LEISS, V.; AUER, V.; HOFMANN, F.; WELLING, A.: B- and A-cells of murine pancreatic islets express different sodium and calcium channels., (2006) In: *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacol.*, 372 Supp. 1, 71

## <sup>1</sup>DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Technischen Universität München in der Fakultät für Medizin angefertigt.

An dieser Stelle möchte ich meinen ganz besonderen Dank an Herrn Professor Dr. F. Hofmann aussprechen, der mir diese Arbeit überhaupt ermöglicht hat und das Entstehen dieser durch vielfältige Anregungen, Diskussionen und hilfreicher Unterstützung tatkräftig geleitet hat.

Herrn Professor Dr. H. H.D. Meyer danke ich sehr für seine Bereitschaft mich bei dieser Arbeit betreut zu haben und für seine hilfreichen Tipps wie man eine Doktorarbeit richtig verfasst.

Ganz besonders möchte ich meiner Betreuerin Frau PD Dr. A. Welling für die engagierte Betreuung, für viele gute Ideen und für ihre fachliche Unterstützung danken. Mein Dank gilt außerdem auch Herrn PD Dr. N. Klugbauer, der mich zu Beginn der Arbeit in die Molekularbiologie eingewiesen hat, sowie Frau Dr. V. Specht, die mir freundlicher Weise ihre Knockout-Mäuse und Unterlagen zur Isolierung von Pankreasinseln zur Verfügung gestellt hat, sowie allen meinen Kollegen und Kolleginnen, die mir die Zeit während der Anfertigung dieser Arbeit so angenehm wie möglich gemacht haben.

Ich möchte mich an dieser Stelle auch beim Graduierten Kolleg 333 für ihre finanzielle Unterstützung, sowie interessanten Seminare bedanken.

Außerdem danke ich meiner Familie, die mir mit guten Ratschlägen und Geduld während der Entstehungszeit dieser Arbeit entgegenkamen.

Zuletzt gilt mein ganz besonderer Dank meinem Freund Boris Vakšić, der mir während der gesamten Arbeit immer geduldig und verständnisvoll entgegengetreten ist.

# Erklärung

gemäß § 12 Abs. 8 ADPO

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Promotionsprüfung vorgelegte Arbeit mit dem Titel:

## **Elektrophysiologische und molekularbiologische Charakterisierung von T-Typ Kalziumkanälen und Natriumkanälen in Inselzellen des Pankreas.**

In Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Technischen Universität München unter der Anleitung und Betreuung durch Herrn Prof. Dr. F. Hofmann ohne sonstige Hilfe erstellt und bei der Abfassung nur die gemäß § 6 Abs. 5 angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe die Dissertation in keinem anderen Prüfungsverfahren als Prüfungsleistung vorgelegt. Teile dieser Dissertation wurden in:

VIGNALI, Sheila; LEISS, Veronika; KARL, Rosi; HOFMANN, Franz; WELLING, Andrea: Characterization of voltage-dependent sodium and calcium channels in mouse pancreatic A- and B-cells., (2006) In: *J. Physiol. (Lond.)*, 572, Mai, Nr. 3, S. 691–706

veröffentlicht. Die Promotionsordnung der Technischen Universität München ist mir bekannt.

München, 06.11.2006

Sheila Vignali

## LEBENS LAUF

### *Persönliche Angaben*

Name:	Sheila Vignali
Geburtsdatum:	02.April.1977
Geburtsort:	München
Staatsangehörigkeit:	italienisch
Familienstand:	ledig
Religion:	römisch - katholisch
Anschrift:	Lindwurmstr. 207, 80337 München
Telefon:	0 89 - 120 11 676
email:	sheila.vignali@arcor.de
url:	<a href="http://ww0.de">http://ww0.de</a>

### *Ausbildung*

1983 - 1988	Grundschule in München (Implerschule)
1988 - 1997	Klenze - Gymnasium in München
Juli 1997	Allgemeinen Hochschulreife
1997 - 2002	Studium an der TUM Studiengang: Biologie Diplom
Juli 2002 - Januar 2003	Diplomarbeit am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der TUM Thema: Einfluss von Kalium und Sotalol auf das Schwellenpotential des Natriumkanals und auf Kaliumströme des Herzens
10. Januar 2003	Abschluss in der Regelstudienzeit mit Diplom in Genetik, Mikrobiologie und Pharmakologie / Toxikologie

## *Wissenschaftlicher Werdegang*

Mai 2003 - 2006

Promotion am Institut  
für Pharmakologie und Toxikologie der TUM  
Thema: Elektrophysiologische und  
molekularbiologische Untersuchung von T-Typ  
Kalziumkanälen und Natriumkanälen in Insel-  
zellen des Pankreas

seit Oktober 2006

Wissenschaftliche Angestellte am Lehrstuhl  
für Humanbiologie in Freising-Weihenstephan

## *Auszeichnungen und Preise*

März 2004

Naunyn-Schmiedeberg-Posterpreis in Mainz  
45. Frühjahrstagung der DGPT

von Mai 2004 - Oktober 2006

Stipendiatin des Graduierten Kolleg 333  
der LMU-München

erstellt mit L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X