

**Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Universität Würzburg**

Vorstand: Professor Dr. med. Martin J. Lohse

Molekulare Wirkmechanismen von Sulfonyl- harnstoffen: Direkte Epac-Aktivierung oder Hemmung der Phosphodiesterasen

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Filip Berisha

aus Paderborn

Würzburg, Juni 2017

Referent

Prof. Dr. med. Martin Lohse

Korreferent

Prof. Dr. med. Martin Fassnacht

Dekan

Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung

18.01.2019

Inhalt

1	Einleitung.....	1
1.1	Diabetes mellitus.....	1
1.2	Klassifikation des Diabetes mellitus.....	1
1.3	Komplikationen und Folgeschäden	2
1.4	Insulin	5
1.5	Therapie.....	6
1.6	Sulfonylharnstoffe.....	8
1.7	Phosphodiesterasen.....	14
1.8	Fluoreszenzmikroskopie als optische Methode zur Analyse der Enzymaktivität	15
1.8.1	Fluoreszierende Proteine in der Zellbiologie.....	15
1.8.2	FRET.....	17
1.9	Fragestellung	20
2	Material und Methoden	21
2.1	Chemikalien.....	21
2.2	Oligonukleotide.....	22
2.3	Vektoren.....	22
2.4	Zellkultur	23
2.5	Enzyme.....	23
2.6	Weitere Materialien und Geräte.....	24
2.7	Klonierung	25
2.7.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	25
2.7.2	Aufreinigung von Plasmid-DNA und PCR-Produkten.....	26
2.7.3	Herstellung kompetenter Bakterien.....	28
2.7.4	Transformation von E. coli mit der KCM-Methode	29
2.7.5	Klonierung von Plasmiden.....	30
2.7.6	Mini-Plasmid-Präparation und Restriktionsanalyse.....	31
2.7.7	Midi-Plasmid-Präparation und Konzentrationsbestimmung	32
2.8	Zellkultur	33
2.8.1	Kultivierung eukaryotischer Zellen	33

2.8.2	Transfektion der HEK-293AD-Zellen.....	34
2.8.3	Transfektion der HEK-293AD-Zellen mit Calcium-Phosphat.....	35
2.9	FRET-Messungen.....	36
2.9.1	<i>In vitro</i> -FRET-Messung.....	36
2.9.2	FRET-Mikroskopie an lebenden Zellen	38
2.10	Auswertung der FRET-Daten	40
3	Ergebnisse.....	42
3.1	Klonierung neuer Epac-basierter Sensoren	42
3.1.1	CFP-Epac2-YFP.....	44
3.1.2	Epac2-camps-PDE4A1.....	45
3.1.3	Epac1-camps-PDE3B und Epac2-camps-PDE3B	46
3.2	Messung der Epac-Sensoraktivierung <i>in vitro</i>	47
3.3	Messung der Epac-Sensoraktivierung in lebenden Zellen.....	49
3.4	Weitere auf Epac2-camps basierende Sensoren.....	53
3.5	Messungen der PDE-Inhibition in lebenden Zellen.....	56
3.5.1	Epac1.....	56
3.5.2	Epac2.....	59
4	Diskussion.....	62
5	Zusammenfassung.....	72
6	Literaturverzeichnis	74
7	Abbildungsverzeichnis	88
8	Tabellenverzeichnis	89
9	Abkürzungsverzeichnis	90

Danksagung

Lebenslauf

1 Einleitung

1.1 Diabetes mellitus

Beim Diabetes mellitus (kurz: Diabetes) handelt es sich um eine Gruppe metabolischer Erkrankungen, die als Leitbefund chronisch erhöhte Blutzuckerwerte (Hyperglykämie) gemein haben. Die Ursache dafür liegt entweder in der verminderten Funktion der Bauchspeicheldrüse, die zu wenig Insulin produziert, oder an einer verminderten Wirkung des Insulins an seinen Zielzellen (Gardner und Shoback, 2011). Für die Begriffsbildung des Diabetes mellitus („honigsüßer Durchfluss“) zeichnen sich die beiden zuerst bekannt gewordenen Hauptsymptome verantwortlich: zum einen die übermäßige Urinausscheidung, die schon in der ägyptischen Antike beschrieben wurde, und zum anderen der süßliche Geschmack des Urins, welcher später durch eine Geschmacksprobe festgestellt wurde. Letzterer wird durch die Unfähigkeit der Niere, die großen Mengen an Glukose aus dem Primärharn zurück zu resorbieren, verursacht (Gardner und Shoback, 2011).

1.2 Klassifikation des Diabetes mellitus

Die aktuell geläufige Einteilung des Diabetes mellitus beruht auf pathogenetischen Kriterien, die auf den Leitlinien der Deutschen Diabetes Gesellschaft (DDG) basieren. Der **Typ-1-Diabetes** ist durch eine primäre Unfähigkeit der Betazellen der Bauchspeicheldrüse, hinreichend Insulin zu produzieren, gekennzeichnet. Ursächlich dafür ist eine Zerstörung der genannten Zellen durch eine fehlgeleitete immunologische Reaktion (Typ A), welche beim idiopathischen Typ B nicht eruiert werden kann (Cantor et al., 1995; Imagawa et al., 2000). Der **Typ-2-Diabetes**, welcher in Deutschland die häufigste Form darstellt, ist durch ein Missverhältnis zwischen der Sekretion und einer über einen Zeitraum von mehreren Jahren abnehmenden Wirkung des Insulins an seinen Zielzellen (Insulinresistenz) charakterisiert

(Polonsky et al., 1996). Das Vorliegen beider Merkmale ist dabei für eine Diagnose entscheidend, wohingegen eine ebenfalls häufig vorliegende gestörte Glucagonsekretion kein notwendiges Kriterium darstellt (Melmed et al., 2011). Ursächlich für eine solche Entwicklung ist ein komplexes Zusammenspiel einer genetischen Veranlagung mit der Beteiligung vermutlich zahlreicher Gene, die entscheidend für die Entstehung und den Verlauf der Erkrankung zu sein scheinen (Newman et al., 1987), und einer Reihe von Umweltfaktoren. Allen voran ist das Übergewicht zu nennen, welches als eine der Hauptursachen für diesen Erkrankungstyp betrachtet wird. Weitere Risikofaktoren, die die Entstehung der Krankheit begünstigen, sind eine unausgewogene Ernährung, Mangel an körperlicher Aktivität und ein fortgeschrittenes Lebensalter (Gardner und Shoback, 2011). Andere, erheblich seltenere Typen sind der Gestationsdiabetes, der nach Angaben der DDG in ca. 1-5 % aller Schwangerschaften auftritt, mit Ende der Schwangerschaft wieder remittiert, aber ein lebenslang erhöhtes Risiko für einen Typ-2-Diabetes hinterlässt, das Auftreten erhöhter Blutzuckerwerte im Rahmen anderer Erkrankungen (z.B. Cushing-Syndrom) oder die dominant vererbte *MODY*-Form (*Maturity Onset Diabetes of the Young*). Neuere Studien lassen vermuten, dass eine Einteilung des Diabetes in drei Gruppen als zu vereinfacht anzusehen ist, und suggerieren eine Einteilung in fünf Gruppen: eine immunologische als Typ I bekannte Form, und eine Einteilung des Typ-2-Diabetes in vier weitere Unterkategorien, wodurch eine zugeschnittene und verbesserte Therapie der einzelnen Untergruppen erhofft wird (Ahlqvist et al., 2018).

1.3 Komplikationen und Folgeschäden

Während ein Typ-2-Diabetes oft mehrere Jahre unbemerkt bleiben kann, sind akute Stoffwechselkomplikationen durch eine erhebliche körperliche Beeinträchtigung charakterisiert und erfordern eine rasche medizinische Behandlung. Diese gehen mit außergewöhnlichen Abweichungen der Glukosekonzentration einher (Normwerte: 3,9 bis 5,5 mmol/l bzw. 70 bis 100 mg/dl) (Dietel und Fauci, 2009).

Das diabetische Koma ist eine schwere und lebensgefährliche Stoffwechsellage, die über Stunden bis Tage auftreten kann. Ein hierfür ursächlicher absoluter Insulinmangel führt u.a. zu einer vermehrten Produktion saurer Stoffwechselprodukte (z.B. Ketonkörper) und schließlich zu einer schweren metabolischen Azidose (ketoazidotisches Koma, eher typisch für Typ-1-Diabetes) (Chiasson et al., 2003; Trachtenberg, 2005). Beim Typ-2-Diabetes kann es durch einen relativen Insulinmangel zu einem hyperosmolaren Koma kommen, bei dem noch hinreichend Insulin verfügbar ist, um den zellulären Fettabbau durch die hormonsensitive Lipase zu hemmen. Hierbei führen stark erhöhte Blutzuckerwerte (bis über 1.000 mg/dl bzw. 56 mmol/l) durch ihre osmotische Wirkung zu einer Polyurie (osmotische Diurese). Dehydration führt durch Nierenversagen und Exsikkose zu Elektrolytstörungen, die zu Lethargie bis hin zum Koma führen können (Kitabchi et al., 2009; Stoner, 2005). Die Ursachen für ein hyperosmolares Koma sind vielfältig, am häufigsten sind es zugrunde liegende Infektionen (Chu et al., 2001).

Die Hypoglykämie, eine gegenüber dem Normbereich zu niedrige Glukosekonzentration, tritt hingegen meistens als unerwünschte Nebenwirkung verschiedener Therapeutika auf, die entweder auf eine Überdosierung von Insulin, einer verminderten Kohlenhydratzufuhr oder der Kombination beider zurückzuführen ist (Makam und Nguyen, 2017). Andere Ursachen (z.B. Insulin produzierende Tumore) sind deutlich seltener (Dietel und Fauci, 2009). Bereits ein Absinken der Blutglukosekonzentration unter 70 mg/dl (3,9 mmol/l) kann zu ersten charakteristischen Symptomen führen, die vor allem auf die Aktivierung des sympathischen Nervensystems zurückzuführen sind. Diese umfassen u.a. vermehrte Schweißbildung, Palpitationen und Herzrasen als Folge einer vermehrten Sekretion von Glukagon und Adrenalin und sind als Mechanismen der Gegenregulation zu verstehen. Schwerwiegender sind neurologische Symptome, die durch einen zunehmenden Funktionsverlust der Zellen des zentralen Nervensystems als Folge einer Substratminderversorgung verursacht werden. Anhaltende Hypoglykämien

können zu schweren neurologischen Defiziten bis hin zum Tode führen (Cryer et al., 2009).

Seinen besonderen Krankheitswert erhält der Diabetes mellitus durch die chronischen Folgeschäden, die durch langfristig erhöhte Blutglukosekonzentrationen verursacht werden. Ein wichtiger Mechanismus ist die nichtenzymatische Proteinglykierung (Brownlee, 2001; Tan et al., 2002). Glukose besitzt eine reaktionsfreudige Aldehydgruppe, die konzentrationsabhängig eine nichtenzymatische, zunächst reversible Bindung mit der Aminogruppe verschiedener intra- und extrazellulärer Proteine eingeht. Bei längerer Exposition entstehen durch Umlagerungsreaktionen irreversible Verbindungen, die auch als *Advanced Glycation Endproducts* (AGEs) bezeichnet werden (Bucala und Cerami, 1992). AGEs sind eine heterogene Gruppe von Verbindungen, die durch verschiedene Mechanismen (u.a. Verringerung enzymatischer Aktivität, Schäden an Nukleinsäuren, gestörten Proteinabbau und Aktivierung zytotoxischer Signalwege) direkt Zellfunktionen stören und schädigen können (Fölsch et al., 2000; Thornalley, 1998).

Ein Beispiel für solche Produkte ist die Entstehung von glykiertem Hämoglobin (Hämoglobin A_{1c} bzw. HbA_{1c}). Da Erythrozyten keine Zellkerne besitzen, hat die Glukose durch ihre erhöhte Konzentration während der Lebensdauer eines Erythrozyten die Gelegenheit, solche Glykierungsprodukte zu bilden. Die einfache Kinetik dieser Reaktion macht man sich als diagnostisches Hilfsmittel zu Nutze. Die Bestimmung des glykierten Anteils des Hämoglobins im Blut gibt Aufschluss über die Blutglukosekonzentration mehrerer Wochen und hat sich zu einem wichtigen Instrument in der klinischen Praxis entwickelt (American Diabetes Association, 2007; Goldstein et al., 2004).

Die vermehrte Bildung von AGEs wurde in der Pathogenese vieler diabetischer Langzeitfolgen impliziert. AGEs verursachen erhöhten oxidativen Stress und eine

Aktivierung von Endothelzellen. Sie steigern die Gefäßpermeabilität und induzieren die Migration von Makrophagen und T-Zellen in die Intima. Dies führt zu vielen krankheitsspezifischen Veränderungen (Vistoli et al., 2013). Besonders hervorzuheben ist hierbei die diabetische Mikroangiopathie. Dabei handelt es sich um eine krankhafte Veränderung der kleinen Gefäße, die mit einer Verdickung der Basalmembran einhergeht, welche direkt durch die erhöhte Blutglukosekonzentration verursacht wird. Dadurch kommt es zu Durchblutungsstörungen, die zu verschiedenen Organschädigungen führen können. Diese betreffen beispielsweise die Netzhaut (Retinopathie), die Niere (Glomerulosklerose) oder die peripheren und autonomen Nerven (Neuropathie). Dem steht die unspezifische Makroangiopathie gegenüber, also die Schädigung großer Blutgefäße durch Ablagerungen an den Gefäßwänden wie zum Beispiel der Herzkranzarterien, der Hirnarterien und der Beinarterien. Dadurch kommt es zu einer verminderten Durchblutung der Organe, was zu verschiedenen Krankheiten führen kann (koronare Herzkrankheit, Schlaganfall, periphere arterielle Verschlusskrankheit). Diese Form der Gefäßveränderung, auch Arteriosklerose genannt, ist eine altersbedingte Erkrankung, die im Zusammenhang mit einem Diabetes mellitus verfrüht auftreten kann (Fauci et al., 2008; Klein, 1995; Stratton et al., 2000). So weisen Diabetiker beispielsweise ein erhöhtes Infarktisiko auf, das mit dem von stoffwechselgesunden Patienten, die bereits einen Herzinfarkt erlitten haben, vergleichbar ist (Haffner et al., 1998).

1.4 Insulin

Insulin ist ein lebenswichtiges Peptidhormon, das in den Betazellen der Bauchspeicheldrüse gebildet wird und erstmals 1916 von dem Physiologen Sir Edward Schafer beschrieben wurde (Schafer, 1916). Es spielt eine entscheidende Rolle im Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel, indem es die Aufnahme von Glukose aus dem Blut in Fett- und Muskelzellen fördert und den Aufbau von Fettgewebe be-

wirkt (Sonksen und Sonksen, 2000). Es wird in den Inselzellen der Bauchspeicheldrüse gebildet und je nach Bedarf, der durch einen steigenden Blutzuckerspiegel angezeigt wird, freigesetzt (Rhoades und Bell, 2009). Die physiologische glukoseabhängige Insulinfreisetzung erfolgt durch die oxidative Metabolisierung von Glukose. Bei ansteigender Konzentration gelangt es aufgrund des vermehrten Eintritts von Glukose durch einen insulinunabhängigen Glukosetransporter entlang dem Konzentrationsgradienten in die Inselzellen der Pankreas, wo sie der Glykolyse und dem Zitronensäurezyklus zugeführt wird. Hierdurch kommt es zu einem Anstieg der ATP-Konzentration. Dies führt durch die direkte Hemmung ATP-sensitiver Kaliumkanäle (K⁺ATP-Kanal, SUR1/Kir6.2) zu einer gesenkten Kaliumleitfähigkeit und somit zu einer Depolarisation der Zellmembran und der Aktivierung spannungsabhängiger Ca²⁺-Kanäle. Der massive Einstrom von Kalziumionen bildet den entscheidenden Reiz für die Verschmelzung der insulinhaltigen Vesikel mit der Zellmembran (Gribble et al., 1998; Nichols et al., 1996). Diese ATP-sensitiven Kaliumkanäle bestehen aus vier identischen, porenbildenden Untereinheiten (Kir6.2), die jeweils eine weitere regulatorische Untereinheit besitzen, den Sulfonylharnstoffrezeptor (SUR1) (Proks und Ashcroft, 2009). Neben ATP führt auch die Bindung durch Vertreter der Sulfonylharnstoffe (SH) zu einer Schließung des Kanals und somit zu einer glukoseunabhängigen Insulinsekretion.

1.5 Therapie

Ein wichtiger Schwerpunkt der Behandlung liegt auf Lebensstilinterventionen (sog. *lifestyle interventions*), die u.a. eine Gewichtsreduktion, Ernährungsberatung, Schulungen und die Verminderung anderer kardiovaskulärer Risikofaktoren beinhalten (Ripsin et al., 2009). Bis 2009 forderte die Deutsche Diabetes Gesellschaft (DDG) in ihren Leitlinien, dass eine medikamentöse Therapie erst nach Ausschöpfung dieser Maßnahmen erfolgen soll. Für die Effektivität der Lebensstilinterventionen zur Verhinderung und Beeinflussung eines Typ-2-Diabetes gibt es

eine Vielzahl von Studien. Diese zeigen aber auch, dass Patienten eine medikamentöse Therapie eher akzeptieren als eine Veränderung des Lebensstils (Knowler et al., 2002; Tuomilehto et al., 2001). Außerdem gibt es keine hinreichende Evidenz dafür, dass eine Änderung des Lebensstils allein zu einer Reduktion der Mortalität führt (Schellenberg et al., 2013). Da Diabetes mit erhöhtem Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen einhergeht, können Änderungen des Lebensstils durchaus für eine bessere Blutdruckkontrolle empfohlen werden (Haw et al., 2017; Mottalib et al., 2017).

Spätestens wenn eine Umstellung der Lebensgewohnheiten nicht zu einem zufriedenstellenden Ergebnis führt, wird eine medikamentöse Behandlung eingeleitet. Hauptziel der antidiabetischen Therapie ist dabei die dauerhafte Senkung der Blutglukosekonzentration auf normale Werte, um das Auftreten langfristiger Komplikationen zu vermeiden oder zumindest aufzuschieben. Dafür stehen verschiedene Medikamentenklassen zur Verfügung, die in zwei große Gruppen eingeteilt werden können: der Insulinersatz und die oralen Antidiabetika. Eine Insulinersatztherapie erfolgt durch die Zufuhr von i.d.R. gentechnisch hergestelltem Insulin oder Insulinanaloga, die sich voneinander hauptsächlich in ihrer Kinetik unterscheiden. Daneben gibt es verschiedene Medikamente, die auf unterschiedliche Weise den Blutzuckerspiegel senken (DeFronzo, 1999).

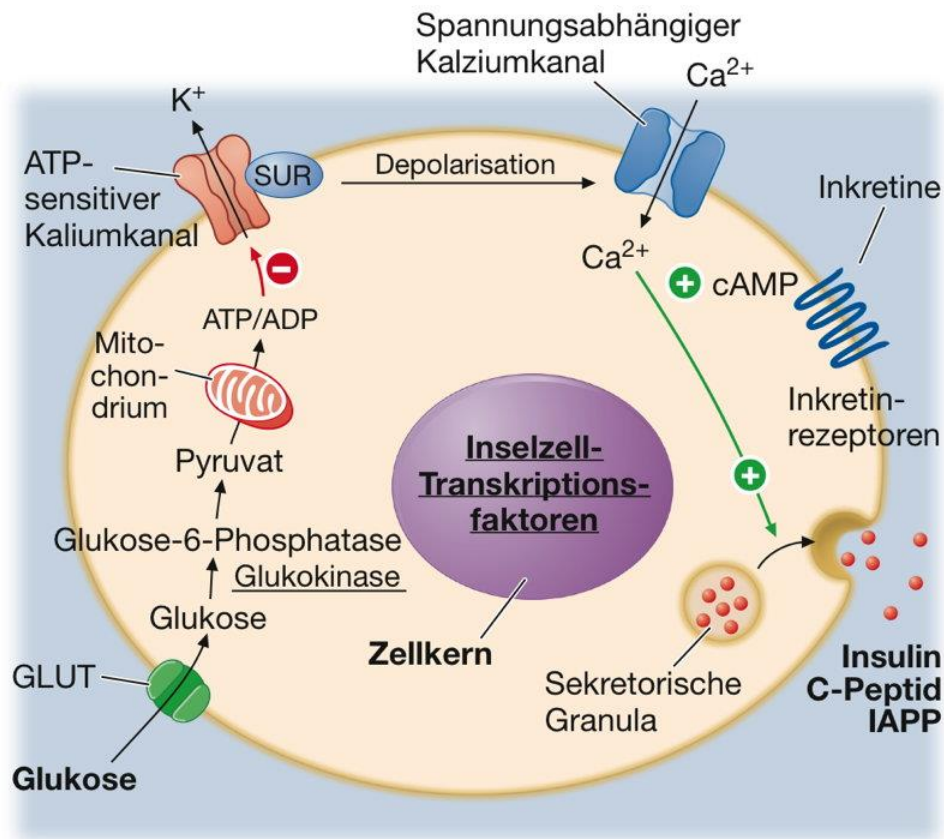
Üblicherweise wird der Therapiebeginn mit Metformin, insbesondere bei Übergewicht, empfohlen. Metformin ist ein Arzneistoff aus der Gruppe der Biguanide und reduziert die Hyperglykämie vorwiegend, indem es die Glukosebildung in der Leber reduziert (Kirpichnikov et al., 2002). Auch wenn der genaue Wirkmechanismus nicht vollständig aufgeklärt werden konnte, werden verschiedene mögliche Mechanismen diskutiert: Hemmung der mitochondrialen Atmungskette (Komplex I), Aktivierung der AMP-aktivierten Proteinkinase (AMPK), verminderte Aktivität der Proteinkinase A (PKA) durch Hemmung der durch Glukagon induzierten Erhöhung des cAMP-Spiegels, Hemmung der mitochondrialen Glycerophosphat-

Dehydrogenase und Beeinflussung verschiedener Darmbakterien (Burcelin, 2014; Madiraju et al., 2014; Rena et al., 2013). Führt die alleinige Einnahme nicht zum gewünschten Effekt oder liegen Kontraindikationen (z.B. chronische Niereninsuffizienz) oder eine Unverträglichkeit gegenüber Metformin vor, wird ein zweites bzw. anderes orales Antidiabetikum hinzugegeben. Diese sind u.a. SH, Thiazolidinedione, DPP-4-Inhibitoren, SGLT-2-Inhibitoren und (Inkretinmimetika) GLP-1-Analoga (Kapoor und Thomas, 2017). SH wie Glibenclamid führen durch die Blockade von Kaliumkanälen in den Inselzellen zu einer vermehrten Freisetzung von Insulin und können dementsprechend zu Hypoglykämien oder einer Gewichtszunahme führen (American Diabetes Association, 2007; Inzucchi et al., 2015). Ziel der antidiabetischen Therapie ist eine dauerhafte Senkung des Blutzuckers. Diese richtet sich üblicherweise nach dem HbA_{1C} mit Zielwerten zwischen 6,0 und 7,0 % (Qaseem et al., 2007), wobei nach neueren Erkenntnissen auch höhere Werte (ca. 7,0 % - 8,0 %) toleriert werden (Qaseem et al., 2018), z.B. bei älteren Patienten oder Kollektiven mit einer geringeren Lebenserwartung, um Komplikationen einer Übertherapie zu vermeiden (Makam und Nguyen, 2017).

1.6 Sulfonylharnstoffe

Nachdem in den vierziger Jahren bei der Erforschung von Sulfonamidantibiotika durch den Chemiker Janbon deren blutzuckersenkende Wirkung festgestellt und mit Carbutamid einige Jahre später das erste orale Antidiabetikum eingeführt wurde, sind Sulfonylharnstoffe (SH) wie Tolbutamid oder Glibenclamid zu einer der wichtigsten Wirkstoffklassen in der oralen Pharmakotherapie des Typ-2-Diabetes geworden (Loubatieres-Mariani, 2007). Sie senken bei unzureichender endogener Insulinsekretion die Glukosekonzentration im Plasma, indem die Insulinsekretion in den Inselzellen der Bauchspeicheldrüse gesteigert wird. Dies geschieht durch eine indirekte Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration in Betazellen, was zu einer Fusion der Insulin enthaltenden Vesikel mit der Zell-

membran und somit zu einer verstärkten Sekretion führt (Holz, 2004). Üblicherweise wird die Insulinsekretion durch die Konzentration von Glukose im Blut reguliert, deren Aufnahme und Metabolisierung zu einer erhöhten ATP-Konzentration führen. Dies führt durch die Hemmung ATP-sensitiver Kaliumkanäle (K^+_{ATP} -Kanal) zu einer gesenkten Kaliumleitfähigkeit und somit zu einer Depolarisation der Zellmembran, die durch die Öffnung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle einen Kalziumeinstrom bewirkt (Lin und Sun, 2010). SH greifen in diesen Signalweg ein, indem sie durch eine direkte Hemmung des K^+_{ATP} -Kanals die Insulinsekretion erhöhen. Dazu binden sie an den spezifischen Rezeptor *SUR* (*sulfonylurea receptor*), einer Untereinheit des ATP-abhängigen, einwärts gleichrichtenden Kaliumkanals an der Zellmembran von pankreatischen Inselzellen (siehe Abbildung 1). Dies führt zu einer Hemmung des hyperpolarisierenden Kaliumausstroms, dies wiederum zur Aktivierung der spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle (Ashcroft und Rorsman, 1989). Da dieser Signalweg durch eine direkte Hemmung des Kaliumkanals verläuft, vermitteln SH ihre Wirkung auch bei normaler Glukosekonzentration und können somit zu gefährlichen Hypoglykämien führen (Hemmingsen et al., 2014). Während ältere SH in einigen Arbeiten mit einem schlechteren Outcome assoziiert wurden, konnte für neuere Vertreter der SH keine Erhöhung des kardiovaskulären Risikos nachgewiesen werden (Rados et al., 2016).



Aus: Harrisons Innere Medizin, 18. Auflage (Copyright: ABW Wissenschaftsverlag GmbH)

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Insulinfreisetzung in einer pankreatischen Betazelle

Der ATP-sensitive Kaliumkanal besitzt eine regulatorische Untereinheit, den Sulfonylharnstoffrezeptor (SUR1), der durch die Bindung von ATP oder SH den Kanal blockiert und über die Senkung der Kaliumleitfähigkeit die Depolarisation der Zelle verursacht. Dies führt durch die Aktivierung spannungsabhängiger Kalziumkanäle zu einem Einstrom von Kalziumionen, die den entscheidenden Reiz für die Verschmelzung der insulinhaltigen Vesikel mit der Zellmembran bilden. Die Blockierung des Kaliumkanals durch SH erfolgt direkt und somit unabhängig von ATP und Glukose (Dietel und Fauci, 2009).

Sowohl in gesunden als auch in erkrankten Zellen wird die Insulinsekretion durch intrazelluläres cAMP verstärkt. Cyclisches Adenosinmonophosphat (Adenosin-3',5'-Monophosphat, cAMP) ist ein ubiquitär vorkommendes, vom ATP abgeleitetes Molekül, das als *second messenger* an der Regulation zahlreicher zellulärer Prozesse wie Stoffwechsel und Genexpression (Lee, 1991), kardialer Kontraktilität (Zagotta et al., 2003), Immunantwort (Torgersen et al., 2002) und auch der Insulinsekretion beteiligt ist (Kashima et al., 2001; Leech et al., 2000; Ozaki et al., 2000). Daneben ist eine Veränderung der cAMP-Verteilung auch an der Entstehung von Krankheiten wie der Herzinsuffizienz beteiligt (Guellich et al., 2014). Die Synthese

geschieht durch die membranständige Adenylylcyclase, die nach Stimulation von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (z.B. durch ein Hormon) aktiviert wird und zelluläres ATP zu cAMP umbaut. Der Abbau erfolgt durch die verschiedenen Phosphodiesterasen (PDE), die den *second messenger* zu AMP abbauen. Die intrazelluläre Wirkung von cAMP wird dabei über die Aktivierung weiterer Proteine vermittelt: die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA), die eine Phosphorylierung anderer zellulärer Proteine wie z.B. Ca²⁺-Kanäle bewirkt, die direkte Beeinflussung cAMP-abhängiger Kanäle z.B. HCN-Kanal (*hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel*) in Kardiomyozyten (Zagotta et al., 2003), die cAMP-sensitiven PDE wie z.B. PDE10 (Jager et al., 2012) und das *Exchange protein directly activated by cAMP* (Epac) (Holz, 2004). Epac ist eine in den vergangenen Jahren neu entdeckte Gruppe von Proteinen, die als Guanin-Nucleotid-Austauschfaktoren für die kleine GTPase Rap1 fungieren. Als direkte Zielproteine für cAMP scheinen sie viele seiner Funktionen wie Exozytose und Integrinexpression zu vermitteln (Bos, 2003; de Rooij et al., 1998; Kawasaki et al., 1998). Rap1 ist ein kleines G-Protein aus der Familie der *ras-related proteins* und spielt eine entscheidende Rolle in vielen Signalwegen. Es wurde zuerst als Protein beschrieben, welches die durch Ras vermittelte, onkogene Wachstumsstimulation von Zellen unterdrücken kann (Kitayama et al., 1989). Es wirkt als molekularer Schalter und hat in seiner inaktiven Form GDP gebunden. Rap1 wird von einer Vielzahl von Rezeptortypen und *second messenger* durch den Austausch von GDP mit GTP aktiviert (de Rooij et al., 1998) und ist auch an der Stimulation der glukoseabhängigen Insulinsekretion der pankreatischen Inselzellen beteiligt. Dieses kleine G-Protein besitzt eine intrinsische GTPase-Aktivität, sodass seine Epac-vermittelte Aktivierung durch die Hydrolyse von GTP beendet wird. Auch wenn die genauen Mechanismen der Einflussnahme von Rap1 auf viele Zellfunktionen unbekannt sind, wirkt es an der Regulation zahlreicher zellulärer Prozesse mit. So ist das Protein auch bei der Aktivierung der Proteinkinase B, der Phospholipase C und durch

seine Lokalisation auf der Membran sekretorischer Granula auch an der Exozytose involviert (Holz, 2004).

Mithilfe Epac-selektiver cAMP-Analoga, die in niedrigen Konzentrationen keine nennenswerten Effekte auf die PKA haben, konnten neue, bis dahin unbekannte oder früher den Proteinkinasen zugeschriebene Effekte des *second messengers* ermittelt werden, die PKA-unabhängig über Epac vermittelt werden (Bos, 2003). Diese Proteine wurden bisher in zwei Varianten beschrieben und sind das Produkt zweier Gene: Epac1, das in nahezu allen Geweben exprimiert wird und eine wichtige Rolle u.a. in kardialer Aktivierung und der Entstehung von Herzinsuffizienz (Metrich et al., 2008; Okumura et al., 2014), Infektionen (Gong et al., 2013; Tao et al., 2014) und der Entstehung von Krebsmetastasen (Almahariq et al., 2015) spielt, und Epac2, welches im Gegensatz dazu eine zweite cAMP-Bindungsstelle aufweist und überwiegend im zentralen Nervensystem, den Nebennieren und der Bauchspeicheldrüse exprimiert wird (de Rooij et al., 2000; Kawasaki et al., 1998; Roscioni et al., 2008). Beide kommen in pankreatischen Inselzellen vor (Qiao et al., 2002) und sind im Falle von Epac2 an der natürlichen Insulinsekretion beteiligt (Gloerich und Bos, 2010), indem es K^+_{ATP} -Kanäle hemmt (Kang et al., 2006; Tsuboi et al., 2003) und Kalziumkanäle (Ryanodinrezeptor) aktiviert (Kang et al., 2001; Kang et al., 2005; Kang et al., 2003). Außerdem nimmt es direkten Einfluss auf das Andocken und die Fusion exozytotischer Vesikel (Ozaki et al., 2000; Shibasaki et al., 2004). Ferner nimmt es auch Einfluss auf den Wirkmechanismus von SH: In diesem Zusammenhang wurde kürzlich beschrieben, dass Epac2 direkt von SH aktiviert wird, was zu einer Aktivierung von Rap1 führt (Zhang et al., 2009). So konnte von den Autoren in Tierversuchen gezeigt werden, dass bei Knockout-Mäusen ohne Epac2-Protein die Gabe sowohl von SH allein als auch der Kombination aus Glukose und SH im Vergleich zum Wildtyp zu einer geringeren Insulinsekretion führte, sodass die Autoren eine Bindung an Epac2 als Voraussetzung für eine SH-induzierte maximale Insulinsekretion ableiteten (Zhang et al., 2009). Ferner

konnte gezeigt werden, dass diese Aktivierung durch direkte Bindung an Epac geschieht und sich als selektiv für Epac2 erweist, im Vergleich zu seiner eng verwandten Isoform Epac1 (Herbst et al., 2011).

Neben den SH gibt es weitere orale Antidiabetika. Rosiglitazon, ein Thiazolidinedion, der durch die Bindung an den PPAR γ -Rezeptor (*peroxisome proliferator-activated receptor γ*) die Wirkung des Insulins in Adipozyten verstärkt (sog. *insulin sensitizer*), konnte in Studien jedoch keinen Vorteil in Bezug auf den Langzeit-Outcome zeigen (Richter et al., 2007). Darüber hinaus werden Thiazolidinedione mit einer erhöhten kardiovaskulären Mortalität in Verbindung gebracht (Chen et al., 2012). So wurde in einer Meta-Analyse für die Einnahme von Rosaglitazon von einer um etwa 40 % erhöhten Herzinfarktrate berichtet (Nissen und Wolski, 2007).

Die Inkretinmimetika und die Inhibitoren der Dipeptidylpeptidase 4 (DPP-4-Inhibitoren) wirken über den Inkretin-Effekt. Dieser führt auf den in den 1960er Jahren erstmals beobachteten Umstand zurück, dass bei gleichen Blutzuckerspiegeln die intravenöse Injektion von Glukose zu einer deutlich geringeren Insulinsekretion als die orale Gabe führt. Als Ursache für diesen Effekt konnte die Existenz gastrointestinaler Hormone (Inkretine) nachgewiesen werden, die die nahrungsabhängige Insulinsekretion maßgeblich beeinflussen (Drucker und Nauck, 2006). Vertreter dieser Hormone sind das Glukoseabhängige insulinotrope Peptid (GIP) und das Glucagon-like Peptid 1 (GLP-1). Diese führen über verschiedene Mechanismen zu ihrer blutzuckersenkenden Wirkung. Das GLP-1 z.B. verstärkt über eine Bindung an G_s-gekoppelte Rezeptoren der Bauchspeicheldrüse die Insulinfreisetzung. Über den Proteinkinase-A-Signalweg werden Kaliumkanäle geschlossen, die resultierende Depolarisation der Zellmembran führt zur Öffnung spannungsabhängiger Kalziumkanäle. Kalzium triggert die Fusion insulin-speichernder Vesikel mit der Zellmembran. Ferner stimuliert GLP-1 die Transkription des Insulin-Gens und die Proliferation der Langerhans-Inseln, senkt die Produktion von

Glucagon in den α -Zellen der Bauchspeicheldrüse und verzögert die Entleerung des Mageninhaltes in den Darm und hemmt die Magensaftsekretion. Während die Inkretin-Mimetika die Wirkung des körpereigenen Hormons GLP-1 simulieren, hemmen die Inhibitoren der Dipeptidylpeptidase-4 dessen Abbau (Drucker und Nauck, 2006; Singh et al., 2013).

Das Sicherheitsprofil der GLP-1R-Agonisten und DPP-4-Inhibitoren wurde in Frage gestellt, da ihre Verwendung mit einer erhöhten Inzidenz von Pankreatitis, Dysplasie der exokrinen Pankreas und Inselzellhyperplasie (alpha-Zellen) in Verbindung gebracht wurde (Butler et al., 2013; Singh et al., 2013). Eine Metanalyse aus 2018 zeigte für DPP-4-Inhibitoren außerdem keine Verbesserung bzgl. der Gesamtmortalität, der kardiovaskulären Mortalität und des Risikos für Herzinfarkte und Schlaganfälle (Zheng et al., 2018).

SGLT-2-Hemmer fördern durch die Hemmung des renalen natriumabhängigen Glukosetransporters Typ 2 (SGLT-2) in den Nierentubuli die Ausscheidung von Glukose über die Niere, dies führt zu einer Senkung des Blutzuckers (Shubrook et al., 2015). Ein wichtiger Vertreter dieser Gruppe ist Empagliflozin, dessen Einnahme bei Patienten mit einem hohen Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse zu einer signifikanten Verbesserung der Prognose (kardiovaskuläres Ereignis und Tod durch beliebige Ursachen) führte (Shubrook et al., 2015).

1.7 Phosphodiesterasen

Eine weitere wichtige Klasse von Enzymen in der Signaltransduktion von cAMP sind die Phosphodiesterasen (PDE) (Beavo et al., 1994). Die Enzymklasse, bestehend aus elf Familien und zahlreichen Isoformen, hydrolysiert zyklische Nukleotide (cAMP und cGMP) und überführt sie in ihr entsprechendes Nukleotid, das 5'-Monophosphat. PDE-Familien 1, 2, 3, 10 und 11 hydrolysieren sowohl cAMP als auch cGMP, während 4, 7 und 8 cAMP präferieren und 5, 6 und 9 spezifisch cGMP spalten (Conti und Beavo, 2007). Die PDE sind dabei von essenzieller Bedeutung

für die den zyklischen Nukleotiden nachfolgenden Zellprozesse, da ihre Aktivität einen großen Einfluss auf die Konzentration von cAMP und cGMP hat, indem sie ihre Wirkung beenden können (Rang et al., 2016).

So sind PDE u.a. maßgeblich an der Regulation der Herzfunktion (Zaccolo und Movsesian, 2007), der Steroidhormonsynthese in den Nebennierenrinden, der erektilen Funktion und der Fototransduktion im menschlichen Auge beteiligt (Francis et al., 2011). Eine spezifische Hemmung der einzelnen PDE führt dabei zu therapeutischen Anwendungen, wie z.B. der selektiven PDE5-Hemmung bei der Therapie der erektilen Dysfunktion, insbesondere bei Patienten mit Diabetes mellitus (Vardi und Nini, 2007).

1.8 Fluoreszenzmikroskopie als optische Methode zur Analyse der Enzymaktivität

1.8.1 Fluoreszierende Proteine in der Zellbiologie

In den letzten Jahrzehnten ist es möglich geworden, biochemische Prozesse in einzelnen, lebenden Zellen sichtbar zu machen. Diese Techniken basieren auf der Verwendung fluoreszierender Proteine oder Farbstoffe, die nach Absorption von Licht einer bestimmten Wellenlänge zu einer spontanen Emission mit einer anderen Wellenlänge und geringeren Energie angeregt werden. Zahlreiche Anwendungsmöglichkeiten gehen auf die Entdeckung des **grün fluoreszierenden Proteins** (GFP) aus der lumineszierenden Qualle *Aequorea victoria* (Shimomura et al., 1963) zurück. Seine Entdeckung und Weiterentwicklung, insbesondere die Möglichkeit, es mit anderen Proteinen zu fusionieren, wurde 2008 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet. GFP besteht in seiner Primärstruktur aus 238 Aminosäuren und weist bei einem Molekulargewicht von 26,9 kDa eine β -Fass-Struktur auf, die im Inneren ein für die Fluoreszenz verantwortliches Chromophor beinhaltet (siehe Abbildung 2). Ein Chromophor (Farbstoff) ist ein Molekül (oder Teil eines Moleküls), das Energie in Form von Strahlung abgibt, deren Wellenlänge sich

im sichtbaren Spektrum befindet. Das in der Qualle natürlich vorkommende GFP zeigt ein Exzitationsmaximum bei einer Wellenlänge von 395 nm und 475 nm und eine Emissionswellenlänge von 509 nm, welche im namensgebenden grünen Spektrum des sichtbaren Lichts liegt.

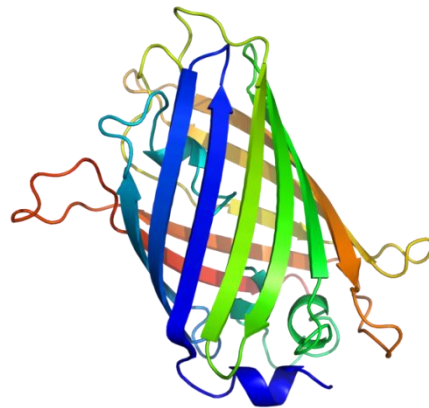


Abbildung 2: Schematische Struktur des GFP nach PDB 1EMA

Das eigentliche Chromophor wird aus sich in der Mitte befindenden Aminosäuren gebildet (Ormo et al., 1996).

Durch äußerst geringe Toxizität und Exprimierbarkeit in nahezu allen eukaryotischen Zellen eignet sich das GFP besonders gut für die Darstellung biologischer Prozesse in lebenden Zellen und kann dabei durch seine Eigenschaft als Protein an zelleigene Enzyme und Signalpeptide fusioniert werden. Durch Anregung des fluoreszierenden Proteins kann so die zeitliche und räumliche Verteilung des mit GFP fusionierten Proteins in lebenden Zellen und Geweben visualisiert werden. Seither ist diese Methode in wenigen Jahren zu einer beliebten Standardmethode in der Zellbiologie geworden. Letztendlich sind durch Modifikation weitere Varianten des GFP hergestellt worden, die entsprechend der Wellenlänge ihrer Emission u.a. als CFP (*cyan*), YFP (*yellow*) oder RFP (*red*) bezeichnet werden (Shaner et al., 2004). Weitere Modifikationen dieser Varianten führten zu stabileren und stärker leuchtenden Proteinen, wie z.B. das *enhanced YFP*.

Die gleichzeitige Verwendung der verschiedenen Varianten erlaubt die Entwicklung von Biosensoren, die eine Darstellung komplexer intrazellulärer Prozesse wie Enzymaktivierungen oder Interaktionen zwischen verschiedenen Proteinen ermöglichen. Die Kombination zweier fluoreszierender GFP-Mutanten ermöglicht die Darstellung ihres intra- bzw. intermolekularen Abstandes und somit der Konformationsänderung ihres Fusionsproteins, basierend auf dem Prinzip des **Förster-Resonanzenergietransfers**.

1.8.2 FRET

Förster-Resonanzenergietransfer (FRET), auch Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer, ist ein nach Theodor Förster benannter physikalischer Mechanismus, der eine Übertragung von Energie zwischen zwei Chromophoren beschreibt. Ein durch elektromagnetische Strahlung angeregtes Chromophor, im Folgenden Donor genannt, gibt dabei einen Teil seiner Energie an ein nahegelegenes anderes Chromophor, im Folgenden Akzeptor genannt, ab. Der Energietransfer findet dabei strahlungsfrei – also ohne die Übertragung von Photonen – über sogenannte Dipol-Dipol-Wechselwirkungen statt. Darunter verstehen sich die zwischen Molekülen wirkenden Kräfte, die ein permanentes elektrisches Dipolmoment besitzen (Förster, 1948). Die Effizienz E des Energietransfers wird in Gleichung (1) dargestellt, wobei r der Abstand beider Farbstoffe zueinander und R_0 der Förster-Radius ist. Letzterer ist jener Abstand zwischen Donor und Akzeptor, bei dem E 50 % beträgt. Dieser liegt je nach verwendeten Farbstoffen in einer Größenordnung zwischen 2 und 6 nm.

$$E = \frac{1}{1 + \left(\frac{r}{R_0}\right)^6} \quad (1)$$

Demnach verhält sich die Effizienz der Energieübertragung reziprok proportional zur sechsten Potenz ihrer Entfernung. So führt z.B. eine Verdopplung des Abstandes zu einer ca. 30-fachen Reduktion der Effizienz, was FRET äußerst sensitiv für eine Distanzänderung zwischen Donor und Akzeptor macht (Förster, 1948; Fujitsuka et al., 2006; Yasuda, 2006).

Bei der Auswahl fluoreszierender Proteine für eine geeignete Anwendung sollten einige Eigenschaften des Donors und Akzeptors beachtet werden. Zunächst sollten sie ein möglichst ungleiches Exzitationsspektrum aufweisen, damit eine unerwünschte Direktanregung des Akzeptors („Falschanregung“) möglichst gering ausfällt. Für die Effizienz der Energieübertragung hingegen ist eine möglichst große Überlappung der Spektren von Donoremission und Akzeptorexzitation notwendig. Ferner werden unterschiedliche Emissionsspektren erwünscht, die eine gleichzeitige Messung der Fluoreszenz beider Farbstoffe unabhängig voneinander erlauben. CFP und YFP haben sich dabei bis heute als die am häufigsten und erfolgreichsten verwendete Kombination von GFP-Varianten bewährt (Jares-Erijman und Jovin, 2006).

Die Anwendung von FRET-Biosensoren mit zwei verschiedenen Farbstoffen folgt dabei zwei unterschiedlichen Modellen. Eine Möglichkeit ist die Bindung der Fluorophore an zwei verschiedene Proteine, wodurch ihre Interaktion miteinander über eine Abstandsänderung durch eine FRET-Messung dargestellt wird. Die in dieser Arbeit verwendeten Sensoren basieren allerdings auf einem anderen Prinzip: der Fusion von CFP und YFP an **ein** Protein, welches mit einem bestimmten in Frage stehenden Molekül interagiert. Die Bindung eines Liganden führt zu einer Konformationsänderung des Proteins und somit zu einer Änderung des Abstandes zwischen Donor und Akzeptor (siehe Abbildung 3). Diese kann durch eine Änderung der FRET-Ratio nachverfolgt werden (Nikolaev und Lohse, 2006). Als ein Beispiel für die Anwendung eines solchen monomolekularen Sensors sei an dieser Stelle die Konstruktion eines cAMP-Sensors genannt. Die cAMP-bindende

Domäne eines Proteins aus der Epac-Familie wird dabei mit CFP und YFP versehen, sodass eine Erhöhung der cAMP-Konzentration durch vermehrte Bindung und die daraus resultierende Konformationsänderung über den Abstand der Farbstoffe visuell dargestellt werden kann (Nikolaev et al., 2004). Durch Transfektion und anschließende Expression oder sogar durch direkte Injektion des aufgereinigten Sensors in große Zellen (Norris et al., 2009) können diese Experimente auch an lebenden Zellen durchgeführt werden.

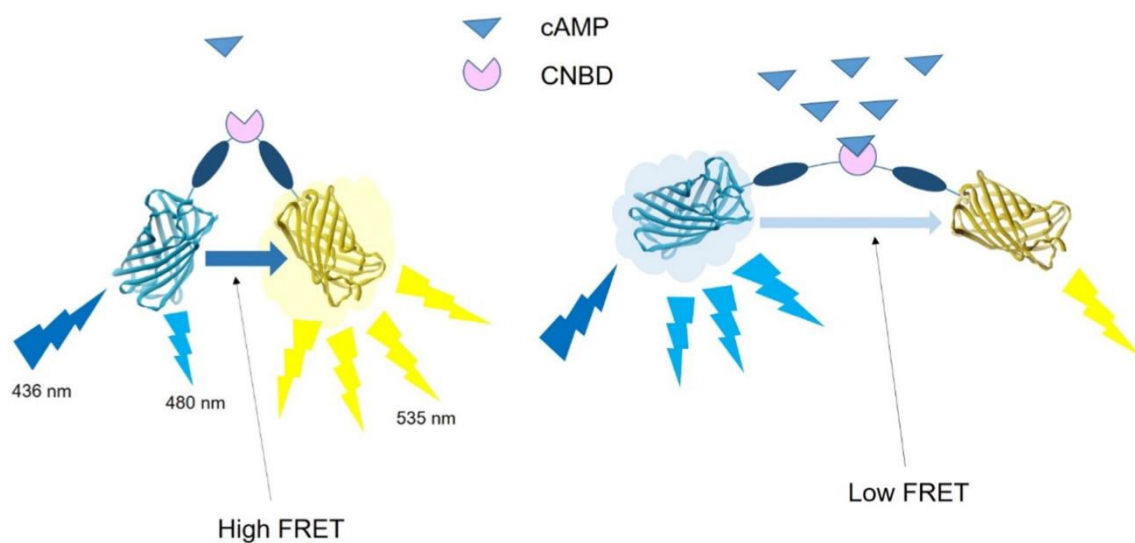


Abbildung 3: Schematische Darstellung eines FRET-Sensors mit zwei Fluorophoren

Abgebildet ist die schematische Darstellung eines Proteins am Beispiel eines cAMP-Sensors mit zwei verschiedenen fluoreszierenden Proteinen (Berisha und Nikolaev, 2017). Kommt es durch Bindung eines Liganden (cAMP) an die Bindedomäne (CNBD) des Sensors zu einer Konformationsänderung, ändert sich der Abstand der fluoreszierenden Proteine zueinander, was in diesem Beispiel zu einem verminderten Energietransfer führt. Dieser macht sich durch eine messbare Änderung der Strahlungsintensitäten der Fluorophore bemerkbar.

1.9 Fragestellung

In dieser Arbeit soll der molekulare Wirkmechanismus von SH untersucht werden. Es wurde kürzlich publiziert, dass Epac direkt durch SH aktiviert wird (Zhang et al., 2009). Allerdings wird diese Veröffentlichung aktuell kontrovers diskutiert. Durch die Verwendung bereits vorhandener und die Konstruktion weiterer FRET-basierter Sensoren, die in lebenden Zellen die Aktivierung von Epac bzw. die Inhibierung von Phosphodiesterasen (PDE) direkt messen können (Herget et al., 2008), soll die Wirkung der SH auf die verschiedenen PDE-Familien ausführlich pharmakologisch charakterisiert und besser verstanden werden. Dabei werden insbesondere folgende Fragestellungen verfolgt:

1. Werden Epac1 und/oder Epac2 durch SH aktiviert?
2. Wird eine solche Aktivierung direkt oder indirekt über die Erhöhung von cAMP durch Hemmung von PDE vermittelt?
3. Unterscheidet sich die SH-vermittelte Hemmung der PDE bei den Familien 3A, 3B und 4A?

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Name	Hersteller
Hefeextrakt	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Trypton	AppliChem GmbH
Agar	Gibco BRL, Darmstadt, Deutschland
Agarose	Peqlab Biotechnology, Erlangen, Deutschland
Ampicillin-Natriumsalz	AppliChem GmbH
CaCl ₂	AppliChem GmbH
cAMP	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
DMSO	Sigma-Aldrich
DNA-Leiter	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M., Deutschland
EDTA	Sigma-Aldrich
Ethanol	Sigma-Aldrich
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich
Forskolin	Sigma-Aldrich
Glukose	AppliChem GmbH
HEPES	AppliChem GmbH
Isopropanol	Sigma-Aldrich
KCl	Sigma-Aldrich
Methanol	Sigma-Aldrich
MgCl ₂	AppliChem GmbH
NaCl	AppliChem GmbH
Pepton aus Casein	AppliChem GmbH
Tris	AppliChem GmbH
Trypton	AppliChem GmbH
Wasserstoffperoxid	AppliChem GmbH

Tabelle 2-1: In dieser Arbeit verwendete Chemikalien

2.2 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) bezogen (Tabelle 2-2). Die Bezeichnung beinhaltet die Angabe des Enzyms, dessen spezifische Schnittstelle durch das Oligonukleotid in die DNA-Sequenz eingefügt wurde, und der Leserichtung bei der Polymerase-Kettenreaktion (*for* für vorwärts und *rev* für rückwärts).

Oligonukleotid	Sequenz 5' → 3' – Richtung	Restriktionsenzyme
mEpac2EcoRVfor	5'-aaa gatatc tc atggctcgtcgca-3'	EcoRV
mEpac2NheIrev	5'-aaa gctagc tggccttcgaggctct	NheI
CFPXhoIinostoprev	5'-aaa ctcgag gaattc gcggccgc cttg-tacagctcgtccatgc-3'	XhoI, EcoRI, NotI
CFPXbaIfor	5'-aaa tctaga gtgagcaagggcgagg-3'	XbaI
CFPNotIrev	5'-aaa gcggccgc cctgtacagctcgtcc-3'	NotI
PDE3BNotIfor	5'-aaa gcggccgc gaggaaaagtgcctgtgatc-3'	NotI
PDE3BXhoIrev	5'-aaa ctcgag tcattcaacattgttcttctct-3'	XhoI

Tabelle 2-2: Verwendete Oligonukleotide für die Klonierung (PCR)

2.3 Vektoren

Vektor	Quelle
CFP-Epac1 Δ DEP-YFP	Kees Jalink, Amsterdam
CFP-Epac2-YFP	diese Arbeit
Epac1-camps	Dr. Viacheslav Nikolaev
Epac1-camps-PDE3A	Sabine Herget
Epac1-camps-PDE3B	diese Arbeit
Epac1-camps-PDE4A1	Sabine Herget
Epac2-camps	Dr. Viacheslav Nikolaev
Epac2-camps-PDE3B	diese Arbeit
Epac2-camps-PDE4A1	diese Arbeit
pcDNA3.0	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
pECFP-N1	Clontech, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
pEYFP-N1	Clontech

Tabelle 2-3: In dieser Arbeit verwendete Vektoren

2.4 Zellkultur

DMEM, 4,5 % Glukose	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
L-Glutamin	PAN-Biotech GmbH
Penicillin/Streptomycin	PAN-Biotech GmbH
Trypsin-EDTA	PAN-Biotech GmbH
FCS (Fötales Kälberserum)	PAN-Biotech GmbH
DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline)	PAN-Biotech GmbH
Effectene Transfection Reagent	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland

Tabelle 2-4: Chemikalien und Medien für die Zellkultur

2.5 Enzyme

Enzym	Hersteller
Pfu-Polymerase	Promega GmbH
T4 DNA Ligase und Puffer	New England Biolabs GmbH
Restriktionsenzyme und Puffer	New England Biolabs GmbH
Taq Polymerase	Invitrogen

Tabelle 2-5: Verwendete Enzyme für die Klonierung

2.6 Weitere Materialien und Geräte

Gerät	Hersteller
Avanti™ J-25 Zentrifuge	Beckmann, Krefeld, Deutschland
Axiovert 200 inverses Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Jena, Deutschland
CCD Kamera CoolSNAP HQ2	Photometrics, Tucson, USA
Deckgläschen (Ø 24 mm)	World Precision Instruments, Sarasota, USA
Dichromatische Spiegel T455LP & T515LP	Chroma Technology, Bellows Falls, USA
Digital pH-Meter	WTW, Weilheim, Deutschland
Dual View imaging system mit DCXR505 dichromatischem Spiegel und Emissionsfilter für CFP (HQ480/30) und YFP (HQ535/40)	Photometrics
EC Plan-Neofluar 63x/1.25 Öl-Immersionsobjektiv	Zeiss
Exzitationsfilter ET436/20x & ET500/20x	Chroma Technology
Feinwaage TE214S	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Fluoreszenzspektrometer LS50B	Perkin Elmer Life Sciences, Massachusetts, USA
JA-14 Rotor	Beckmann
JA-17 Rotor	Beckmann
Magnetrührer IKA Combimag RET	Janke & Kunkel, Staufen, Deutschland
MetaFluor und MetaMorph imaging software	Molecular Devices, Sunnyvale, USA
MS 3 Digital Vortexer	IKA Works, Wilmington, USA
NanoDrop Spektralphotometer	Thermo Scientific, Wilmington, USA
OriginPro software	OriginLab, Northampton, USA
Polychrome IV monochromatische Lichtquelle	TILL Photonics, Gräfelfing, Deutschland
Prism 4.0	GraphPad Software, San Diego, USA
Rotanta 96 R Zentrifuge	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Strahlenteiler DCLP 460	TILL Photonics
Strahlenteiler DCLP 505	TILL Photonics
Tischzentrifuge 5424	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Ultraturrax T10	IKA-Werke, Staufen, Deutschland
Waage	Sartorius
Wasserbad	Haake, Karlsruhe, Deutschland
Zellkulturschalen (Ø 100 mm & 150 mm)	BD Falcon, Franklin Lakes, USA
Digital pH-Meter	WTW

Tabelle 2-6: Weitere Materialien und Geräte

2.7 Klonierung

2.7.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (englisch: *polymerase chain reaction, PCR*) dient der exponentiellen Vermehrung eines DNA-Abschnittes. Dabei legen Oligonukleotide (Primer) den Beginn und das Ende eines Abschnittes, der vervielfältigt werden soll, fest. Dazu wird ein Enzym, die DNA-Polymerase, verwendet, das am Vorwärts- und Rückwärtsprimer beginnend die erwünschte DNA komplementär zum entsprechenden Abschnitt der Vorlage verlängert. Dieser Prozess besteht grundsätzlich aus einer Folge von drei Schritten: Denaturierung, Hybridisierung und Elongation. Diese Schrittfolge wird je nach Gesamtdauer der Reaktion 20- bis 50-mal wiederholt.

Die verwendete Zusammensetzung der PCR-Reaktion (Tabelle 2-7) wird im Mastercycler (Eppendorf AG, Hamburg) durchgeführt. Die einzelnen Schritte dieser Standard-PCR sind in Tabelle 2-8 festgehalten.

Reagenz	Volumen	Stammkonzentration
100-200 ng Matrizen-DNA	variabel	
Primer for	2,5 µl	10 pmol/µl
Primer rev	2,5 µl	10 pmol/µl
dNTP-Mix ¹	2 µl	
Pfu-Polymerase	1 µl	
Polymerase-Pufferlösung (10x)	10 µl	
H ₂ O	auf 100µl	
100 µl Gesamtvolumen		

¹ dNTP-Mix: je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP

Tabelle 2-7: Zusammensetzung einer Standard-PCR-Reaktion

Reaktion	Zeit	Temperatur	Zyklen
Initiale Denaturierung	5 min	94 °C	1
Denaturierung	30 s	94 °C	30
Hybridisierung	30 s	55 °C	30
Elongation	2 min/kb	72 °C	30
Terminale Polymerisation	10 min	72 °C	1
Abkühlung	∞	4°C	1

Tabelle 2-8: Protokoll einer Standard-PCR

2.7.2 Aufreinigung von Plasmid-DNA und PCR-Produkten

Für die Weiterverwendung der nun vervielfältigten DNA muss sie von den anderen Bestandteilen des PCR-Produkts gereinigt werden. Diese Auftrennung geschieht in der Agarose-Gelelektrophorese. Dabei wird das PCR-Produkt in ein Agarose-Gel, welches aus einer Vernetzung von Agarose-Polymeren entsteht, eingebracht; anschließend wird eine Spannung angelegt, wodurch sich die negativ geladenen Nukleinsäure-Moleküle durch das Agarose-Gel in Richtung Pluspol bewegen. Je größer die Agarose-Konzentration ist, desto kleiner sind die Poren in dem Gel, die von der DNA überwunden werden müssen, wobei kleinere Moleküle schneller durch die Poren gelangen. Dadurch gelingt eine Trennung der DNA-Stränge nach ihrer Größe. Für den Nachweis und die Aufarbeitung aller für diese Arbeit aufgeführten DNA-Fragmente wurde eine 1 %ige Agarose-Lösung verwendet. Zur Herstellung dieser wird 1 g Agarose in 100 ml TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA, siehe Tabelle 2-9) in der Mikrowelle achtsam erhitzt, bis die Agarose vollständig gelöst ist. Anschließend wird die Lösung in einen entsprechenden Gelträger gegeben, auf 60 °C abgekühlt und nach Zugabe von 4 µl Ethidiumbromid mit einem Probenkamm versehen, damit Aussparungen im Gel für die Auffüllung mit dem zu reinigenden PCR-Produkt entstehen. Nachdem das Gel auf Raumtemperatur abgekühlt und vollständig erstarrt ist, wird es in die Elektrophoresekammer eingelegt, die mit TAE-Puffer befüllt wird, bis das Gel vollständig bedeckt ist. Das Ethidiumbromid interkaliert in die Basenabfolge der DNA, wodurch sie unter UV-Bestrahlung wegen der Fluoreszenzeigenschaften gut sichtbar gemacht werden kann. Die zu reinigende DNA wird im Verhältnis von 5:1 mit einem Laufpuffer aus Glycerol und einem Farbmaler (Bromphenolblau) versetzt, sodass die Proben nach Entfernung des Probenkamms in das Gel eingebracht werden können. Gleichzeitig wird eine Lösung mit verschiedenen DNA-Fragmenten bekannter Größe in eine separate Tasche eingebracht, eine sogenannte DNA-Leiter, um sie am Ende der Elektrophorese mit denen des PCR-Produkts zu vergleichen und sie

anhand der Größe identifizieren zu können. Die Proben werden bei 90 V für ca. 30 bis 60 min (je nach Länge der DNA) elektrophoriert. Die gesuchte DNA-Bande wird unter UV-Beleuchtung mit Hilfe der DNA-Leiter identifiziert und ausgeschnitten.

Die DNA wird anschließend mittels des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Protokoll des Herstellers extrahiert. Dazu wurde das ausgeschnittene Gelfragment nach Zugabe des dreifachen Gelvolumens QG-Puffer für 10 min bei 50 °C geschmolzen (Beträgt die Länge des DNA-Fragments 500 bis 4000 Basenpaare, kann für eine größere Ausbeute Isopropanolol (einfaches Gelvolumen) hinzugefügt werden.) und in QIAquick-Säulchen übertragen. Dieses wurde für 1 min bei 14.000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und zum Waschen erneut mit 500 µl QG-Puffer und 750 µl PE Puffer zentrifugiert. Anschließend wurde es noch einmal 1 min bei 14.000 rpm trocken zentrifugiert, um residuales Ethanol aus dem PE-Puffer zu entfernen. Zum Abschluss wurden 50 µl Wasser auf die Säule gegeben und nach kurzer Inkubationszeit wurde die DNA durch erneute Zentrifugation (1 min, 14.000 rpm) eluiert.

Puffer	Zusammensetzung
TAE-Puffer	10 mM EDTA 50 mM Natriumacetat 400 mM Tris-HCl, pH 8 H ₂ O
DNA-Ladepuffer (10x)	0,25 % (M/V) Bromphenolblau 50 % Glycerin 100 mM EDTA H ₂ O

Tabelle 2-9: Zusammensetzung des TAE- und DNA-Ladepuffers

2.7.3 Herstellung kompetenter Bakterien

Unter Kompetenz versteht man die Fähigkeit von Bakterien, im Medium vorhandene DNA aufzunehmen, die die Voraussetzung für die Transformation von Bakterien darstellt. Dabei weisen nur einige Bakterienarten eine natürliche Kompetenz auf, was bedeutet, dass sie über gewisse Gene verfügen, die eine Aufnahme und Integration der DNA in das Genom ermöglichen. Das in dieser Arbeit verwendete Bakterium *Escherichia coli* (*E. coli*) zeigt hingegen keine natürliche Kompetenz, weshalb durch eine chemische Behandlung eine künstliche Kompetenz herbeigeführt werden muss.

Zur Vermehrung von Bakterienzellen mit künstlicher Kompetenz werden diese für die spätere Transformation auf einer Agarplatte (LB-Medium ohne Antibiotikum) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am Folgetag wird eine Kolonie gewählt und in 250 ml LB-Medium (ebenfalls ohne Antibiotikum) mit 2 ml einer Vorkultur (*E. coli*) übertragen und bei 37 °C im Rotationsschüttler kultiviert, bis eine optische Dichte von ca. 0,5 (595 nm) erreicht ist. Die Bakterien werden anschließend abzentrifugiert (10 min, 4.500 rpm, 4 °C), in 25 ml TBS Puffer (4 °C) resuspendiert und nach einigen Stunden Inkubation auf Eis in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die nachfolgende Lagerung erfolgt bei -80 °C. Die verwendeten Chemikalien sind in Tabelle 2-10 aufgelistet.

Reagenzien	Zusammensetzung
LB-Medium	1 % (W/V) Trypton 0,5 % (W/V) Hefeextrakt 1 % (W/V) NaCl H ₂ O
LB-Agarplatten	1 % (W/V) Agar in LB-Medium
TSB	10 % (M/V) Polyethylenglycol 3.000 5 % (V/V) DMSO 20 mM MgCl ₂ in LB-Medium, pH 6,5

Tabelle 2-10: Reagenzien für die Arbeit mit kompetenten Zellen

2.7.4 Transformation von E. coli mit der KCM-Methode

Als Transformation wird die Übertragung von DNA in (kompetente) Zellen bezeichnet. Durch diese Methode ergibt sich die Möglichkeit, Plasmid-DNA in Bakterienzellen einzuführen und zu vermehren. In der vorliegenden Arbeit werden dafür kompetente Zellen des E. coli-Stammes DH5 α verwendet. Dazu werden 100 μ l Suspension kompetenter Zellen (1×10^6 bis 1×10^7 Kolonien/ μ g DNA) auf Eis aufgetaut und anschließend mit 80 μ l H₂O und 20 μ l 5x KCM-Puffer (150 mM CaCl₂, 250 mM MgCl₂, 500 mM KCl) vermischt, wobei dem KCM-Puffer die zu transformierende DNA (0,5 μ g Plasmid-DNA oder Ligationsansatz (s.u.)) zuvor zugeführt wird. Die Suspension wird anschließend weitere 20 min auf Eis und 10 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Nach weiterer Zugabe von 1 ml LB-Medium werden die Bakterien 50 min bei 37 °C im Thermomixer (5436, Eppendorf) geschüttelt und auf Agarplatten mit selektivem Medium ausgestrichen. Damit nur die Kolonien wachsen, die den Vektor aufgenommen haben, wird ein Medium mit einem Antibiotikum verwendet, für das die kompetenten Zellen eine Resistenz entwickelt haben, die auf dem Vektor vorhanden ist. Das LB-Medium enthält dabei 1,5 % Agar und 100 μ g/ml Ampicillin oder Kanamycin. Die Zellen werden über Nacht bei 37 °C kultiviert und auf positive Kolonien überprüft, welche anschließend in 200 ml LB-Medium (100 μ g/ml Ampicillin bzw. 40 μ g/ml Kanamycin) nochmals über Nacht im Rotationsschüttler bei 37 °C wachsen.

2.7.5 Klonierung von Plasmiden

Bei der Klonierung wird das zuvor gewonnene DNA-Fragment in einen Vektor (Plasmid) eingebracht, um diesen in Bakterien zu vervielfältigen und in animalischen Zellen exprimieren zu können. Als Standardexpressionsvektor in der vorliegenden Arbeit dient das Plasmid pcDNA3, das sich gut für die Expression in Säugerzellen eignet.

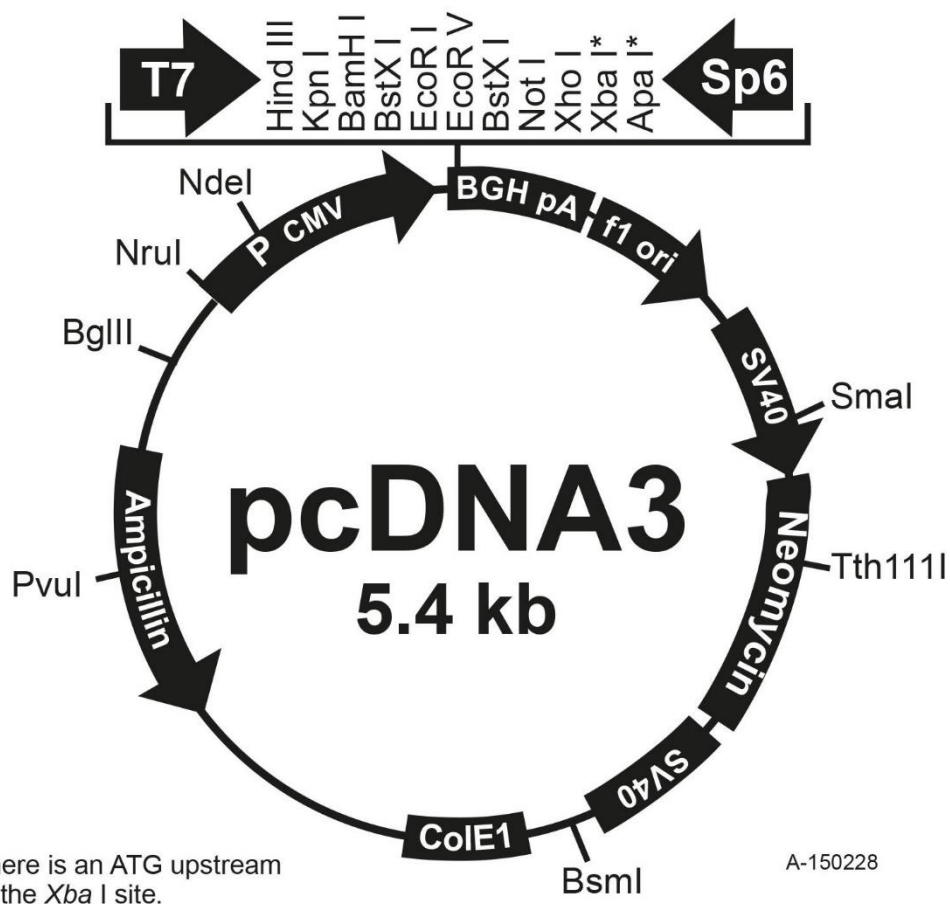


Abbildung 4: Vektorkarte pcDNA3.0

Die Abbildung zeigt eine schematische Darstellung eines typischen eukaryotischen Expressionsvektors (pcDNA3 von Invitrogen, Life Technologies). CMV = Cytomegalievirus-Promoter, T7 und Sp6 = RNA Polymerasepromoter mit multiplen Klonierungsstellen, BGH = vom bovinen Wachstumshormon stammende Polyadenylierungssequenz (Terminierungssequenz für die Transkription), Simian-Virus SV40-Promoter und SV40-Adenylationssignal, Ampicillin (Gen für die Selektion in prokaryoten Zellen) und Neomycin (in eukaryoten Zellen). Bildquelle: Handbuch Invitrogen Life Technologies. 2013. Mit freundlicher Genehmigung der Life Technologies Corporation.

Die PCR-Produkte und Vektoren (Abbildung 4) werden zunächst mit den entsprechenden Enzymen geschnitten. Dabei werden im verwendeten Vektor die gewünschte Stelle zur Insertion des PCR-Fragments ausfindig gemacht und dementsprechend werden die Schnittenzyme gewählt. Die für die PCR verwendeten Oligonukleotide müssen die gleichen Erkennungssequenzen aufweisen wie der Vektor, damit sie jeweils komplementäre Enden für die Ligation aufweisen. Nachdem Vektor und PCR-Fragment unter den enzyspezifischen Reaktionsbedingungen für 1-2 h bzw. über Nacht geschnitten (siehe Tabelle 2-11), erneut im Agarose-Gel aufgetrennt und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit isoliert werden, werden sie in einer Ligation kombiniert. Die Ligation wird mit der T4-DNA-Ligase über Nacht bei 16 °C durchgeführt.

Enzym	Puffer
BamHI	2, 3, 4
EcoRI	1, 2, 3, 4
HindIII	2
KpnI	1
NotI	3
XbaI	2, 4
XhoI	2, 3, 4

Tabelle 2-11: Restriktionsenzyme und ihre optimalen Puffer

Die kompetenten E. coli werden nun nach folgendem Schema mit den Plasmiden aus dem Ligationsprodukt transformiert: 15 µl Ligationsansatz, 65 µl H₂O, 20 µl 5x KCM-Puffer und 100 µl kompetente Zellen. Die nächsten Schritte erfolgen analog zu der oben beschriebenen KCM-Methode.

2.7.6 Mini-Plasmid-Präparation und Restriktionsanalyse

Dieser Schritt dient dazu, den Erfolg der Klonierung zu überprüfen. Sind bei der Inkubation der Agarplatten mit den mit dem Konstrukt transformierten kompetenten Zellen über Nacht Kolonien gewachsen, werden davon 3-5 ausgewählt und

in jeweils 5 ml selektives LB-Medium (enthält Ampicillin oder Kanamycin) überführt und über Nacht bei 37 °C im Rotationsschüttler kultiviert. Zur Aufreinigung der kleinen Mengen an Plasmid-DNA wurden dabei die Chemikalien aus dem Qiagen Plasmid Mini Kit verwendet. Dafür werden den Kulturen jeweils 1,5 ml Suspension entnommen und 2 min bei 5.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet mit 300 µl Resuspensionspuffer (P1: 50 mM Tris, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A, H₂O, pH 8,0) resuspendiert und mit 300 µl Lysepuffer (P2: 200 mM NaOH, 1 % (M/V) SDS, 4 °C) vermengt. Nach Zugabe von weiteren 300 µl Neutralisierungspuffer (P3: 3 M Kaliumacetat, pH 5,0) wird der Ansatz kräftig geschüttelt und 3 min bei 14.000 rpm (4 °C) zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Gefäß überführt und nochmals bei 14.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand mit 750 µl Isopropanol vermengt und erneut zentrifugiert. Die so gefällte DNA wird mit 300 µl Ethanol (70 %) gewaschen und nach wiederholtem Zentrifugieren und Verwerfen des Überstandes bei RT getrocknet. Das getrocknete DNA-Pellet wird anschließend in 50 µl bidestilliertem Wasser gelöst und kann nun der Restriktionsanalyse zugeführt werden. Dafür werden die aufgereinigten Plasmide mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten und in einer Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Im Fall einer positiven Restriktionsanalyse für das Vorhandensein des erwünschten Konstrukts in einer der Bakterienkulturen werden diese in 200 ml LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin bzw. 40 µg/ml Kanamycin) übertragen und erneut über Nacht bei 37 °C im Rotationsschüttler kultiviert.

2.7.7 Midi-Plasmid-Präparation und Konzentrationsbestimmung

Für die Isolierung und Reinigung größerer Mengen Plasmid-DNA wird das Qiagen Plasmid Midi Kit verwendet. Die Präparation erfolgt entsprechend den Herstellerangaben analog zur Mini-Plasmid-Präparation und einer zusätzlichen chromatographischen Aufreinigung durch Anionenaustausch. Diese Präparation hat eine größere Ausbeute von Plasmid-DNA zur Folge und erlaubt durch eine höhere

Reinheit die Transfektion in andere Zellen. Anschließend wird die DNA-Konzentration durch photometrisch bestimmte Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm berechnet. Dabei entspricht die optische Dichte OD_{260} von 1 einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/l}$ doppelsträngiger DNA. Die Absorptionsmessung erfolgt in einer Quarzglasküvette bei einer Weglänge von 1 cm. Weiterhin wird eine Absorptionsmessung bei 280 nm durchgeführt, um die Reinheit der DNA-Probe zu ermitteln. Mit steigender Verunreinigung der Probe durch Proteine aus vorherigen Isolierungsschritten steigt die Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm, sodass in Folge dessen der Absorptionsquotient von 260 nm und 280 nm absinkt. Für die weitere Verwendung der DNA im Rahmen dieser Arbeit wird dafür ein Wert von $\geq 1,8$ angestrebt.

2.8 Zellkultur

2.8.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

In dieser Arbeit werden ausschließlich HEK-293AD-Zellen verwendet. Diese wurden von Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) bezogen und in Zellkulturschalen (\varnothing 100 mm) mit 20 ml Komplettmedium (Tabelle 2-12) bei 37 °C und 7 % CO_2 kultiviert. Zum Passagieren wurde das Medium mit einer Pasteurpipette entfernt und der Zellrasen achtsam mit 10 ml phosphatgepufferter Salzlösung (DPBS) gespült. Anschließend wurden die Zellen nach Zugabe von < 1 ml Trypsin-EDTA-Lösung bei 37 °C für ca. 1 min inkubiert, bis sie sich vom Boden der Zellkulturschale kugelig ablösten. Durch Zugabe von DMEM (10 % FCS) wurde das Trypsin inaktiviert und die Zellen konnten nach Suspension auf eine neue Kulturschale (im Verhältnis 1:4 oder 1:5) ausgesät und mit weiteren 20 ml DMEM aufgefüllt werden.

Für die *in vitro*-Fluoreszenz-Messung (siehe Kapitel 2.9.1) wurden die Zellen auf Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 150 mm und für Lebendzell-FRET-Experimente auf Deckgläschen (\varnothing 24 mm) in einer 6-Well-Platte übertragen.

Kulturmedium	Zusammensetzung
HEK-293AD-Medium	DMEM 4,5 g/l Glukose 10 % FCS 2 mM L-Glutamin 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin

Tabelle 2-12: Zusammensetzung des Kulturmediums für HEK-293AD-Zellen

2.8.2 Transfektion der HEK-293AD-Zellen

Unter Transfektion versteht man das Einbringen von Fremd-DNA in lebende, eukaryotische Zellen. Wird die fremde DNA nicht fest in das Genom integriert, sondern nur zeitweilig als Plasmid in die Zelle eingebracht, spricht man von transien-ter Transfektion, was zur Folge hat, dass die DNA im Verlauf der weiteren Zellteilung immer weiter verdünnt wird. Die Experimente mit transfizierten Zellen wurden in dieser Arbeit stets am Folgetag durchgeführt, weshalb die transiente Transfektion eine hinreichende Methode darstellt, welche mit Effectene (Effectene Transfection Reagent) von Qiagen erfolgte. Hierbei handelt es sich um ein nicht-liposomales Lipidreagenz, das an die positiv geladenen Plasmide bindet und Komplexe bildet, die die Zellwand überwinden können. Die HEK-293AD-Zellen werden am Vortag von einer Zellkulturschale auf in einer 6-Well-Platte liegende Deckgläschen (Ø 24 mm) übertragen, sodass sie zum Zeitpunkt der Transfektion eine Zelldichte von 60 % aufweisen. Für die Transfektion wird die Plasmid-DNA aufeinanderfolgend mit dem EC-Puffer, einem Enhancer und zuletzt mit Effectene (jeweils aus dem Qiagen-Kit) vermengt und inkubiert. Das Pipettierschema ist in Tabelle 2-13 dargestellt. Zwischenzeitlich wird das Medium von der Zellkulturplatte abgesaugt, die Zellen mit DBPS gewaschen und erneut mit 1,5 ml Medium pro Deckgläschen bedeckt. Weitere 3 ml Medium werden mit dem Transfektionsansatz vermengt und tropfenweise auf die Zellen gegeben (0,5 ml + Transfektionsansatz/Well). Anschließend werden die Zellen über Nacht bei 37 °C und 7 % CO₂ inkubiert.

Reagenz	Volumen/ μ l	Inkubation/min
Plasmid-DNA (0,4 μg)		
+ EC-Puffer	~86	-
+ Enhancer	3,2	2-5
+ Effectene	10	5-10
+ Medium	1.600	-

Tabelle 2-13: Pipettierschema für Transfektion mit Effectene auf 6-Well-Platte

2.8.3 Transfektion der HEK-293AD-Zellen mit Calcium-Phosphat

Für *in vitro*-FRET-Messungen werden eine größere Menge Zellen und ein exprimierter Sensor benötigt, weshalb hierfür die Transfektion mit der Methode der Calcium-Phosphat-Präzipitation erfolgt. Dabei bindet die DNA in einer Reaktion mit Calciumchlorid und Natriumphosphat an ausfallendes Calciumphosphat und wird mit den Kristallen durch Endozytose in die Zellen aufgenommen.

Dazu werden am Vortag die Zellen auf eine große Zellkulturschale (\varnothing 150 mm) ausgesät, sodass sie zum Zeitpunkt der Transfektion eine Zelldichte von 60 % aufweisen. Es werden 1 ml Transfektionsansatz (880 μ l H₂O, 100 μ l CaCl₂ (2.5M) und 20 μ l Plasmid-DNA-Lösung (20 μ g)) mit 1 ml 2xBBS-Puffer (Tabelle 2-14) vermischt und nach 10 min Inkubationszeit auf die Zellen übertragen. Anschließend werden diese für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

BBS-Puffer (2x)	50 mM BES 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ 280 mM NaCl
------------------------	---

Tabelle 2-14: Zusammensetzung des BBS-Puffers

2.9 FRET-Messungen

2.9.1 *In vitro*-FRET-Messung

Die *in vitro*-Experimente erfolgten mit Epac1-camps nach einem bereits publizierten Protokoll (Nikolaev et al., 2004). Dafür werden HEK-293AD-Zellen auf zwei Zellkulturschalen (\varnothing 150 mm) am Vortag ausgesät und bei einer Zelldichte von ca. 60 % mithilfe der Calcium-Phosphat-Präzipitation (siehe 2.8.3) mit Epac1-camps-Plasmid transfiziert. Am Folgetag werden die Zellen nach Entfernung des Mediums mehrfach gründlich mit DPBS gespült und anschließend auf Eis gelegt und mit je 600 μ l Lysispuffer (Tabelle 2-15) versehen. Anschließend erfolgt der Aufschluss der Zellen mittels eines Ultra-Turrax-Geräts (IKA-Werke, Staufen), indem die Zellen zwei Mal 20 s lang auf Eis homogenisiert werden. Die dadurch entstehenden Zelllysate werden in einer Avanti J-25 Ultrazentrifuge (TLA120.1 Rotor) 20 min bei 80.000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand (Zellzytosol) wird abpipettiert und für photometrische Messungen verwendet. Weiterhin wird dieser Überstand mit Lysispuffer verdünnt und 600 μ l dieser Lösung werden in eine Küvette des Spektralphotometers gegeben und bei einer Anregung mit einer Wellenlänge von 436 nm und einer Weglänge von 0,5 cm wird das Emissionsspektrum im Bereich von 460 – 550 nm aufgezeichnet. Hierbei werden die Spitzenintensitäten von CFP (ca. 477 nm) und YFP (ca. 525 nm) jeweils vor und nach Zugabe von zunächst Glibenclamid oder Tolbutamid in verschiedenen Konzentrationen und nach anschließender Zugabe von cAMP (200 μ M Endkonzentration) zur Kontrolle aufgezeichnet.

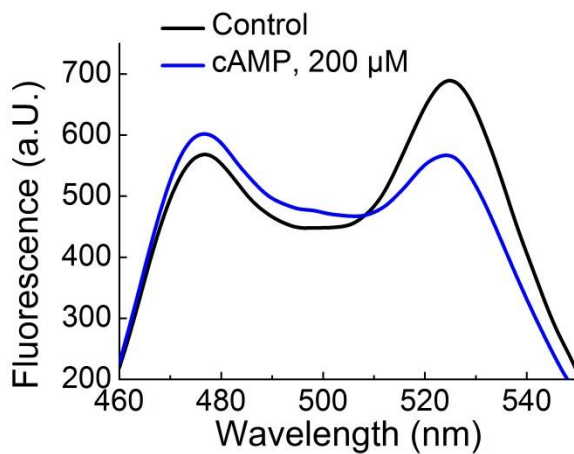


Abbildung 5: Exemplarische Emissionsspektren (n=5) einer spektralphotometrischen Messung mit Epac1-camps

Im Spektralphotometer wurden die Spitzenintensitäten von CFP und YFP im Emissionsbereich der Wellenlängen von 460 – 550 nm nach Anregung bei 436 nm gemessen. Die Zugabe von cAMP (200 µM) führt zu einer Steigerung der CFP- (Maximum bei ca. 477 nm) und einer Abnahme der YFP-Emission (Maximum bei ca. 525 nm), und somit eine Abnahme des YFP-/CFP-Quotienten, was die Aktivierung des Sensors anzeigt. Dies wird durch eine Abstandsänderung von CFP zu YFP durch die Konformationsänderung des Sensors nach Bindung von cAMP verursacht, was zu einer Abnahme der Energieübertragung führt.

Aus den aufgezeichneten Daten kann jeweils der CFP/YFP-Quotient (Q_P) berechnet und die prozentuale Änderung der Emission ($\Delta FRET$) nach folgender Gleichung

$$\Delta FRET = \frac{Q_P - Q_0}{Q_{100} - Q_0} \times 100$$

bestimmt werden, wobei Q_0 den basalen CFP-/YFP-Quotienten ohne Stimulation und Q_{100} den Quotienten mit der maximalen Änderung des FRET-Signals darstellt. Die Daten werden zur Veranschaulichung in einer Kurve (Emissionsintensität gegen Wellenlänge) dargestellt (Abbildung 5).

Lysispuffer	5 mM Tris HCl 2 mM EDTA pH 7,4
--------------------	--------------------------------------

Tabelle 2-15: Zusammensetzung des Lysispuffers

2.9.2 FRET-Mikroskopie an lebenden Zellen

Zur Bestimmung der Interaktion von SH mit Phosphodiesterasen (PDE) in lebenden Zellen werden die Sensoren einen Tag zuvor in HEK-293AD-Zellen auf Deckgläschen transfiziert und anschließend unter den bereits aufgeführten Bedingungen im Brutschrank kultiviert. Nach Entnahme des Deckgläschens aus der Zellkulturschale wird es in eine spezielle Mikroskopierhalterung (Attofluor cell chamber, Invitrogen) eingelegt (siehe Abbildung 6), achtsam zunächst gespült, mit 400 μ l FRET-Puffer (Tabelle 2-16) bedeckt und nach Zugabe von Immersionsöl unter Verwendung eines 63x-Objektivs in das Mikroskop eingespannt. Nach Scharfstellung unter Durchlicht und anschließender Verdunklung des Raums werden die Zellen mithilfe des Exzitationsfilters ET436/20X und Dauerbeleuchtung mit einer Wellenlänge von 436 nm des Polychroms V angeregt und betrachtet, um eine geeignete Zelle zu finden, die den Sensor gleichmäßig exprimiert und keine sichtbaren fluoreszierenden Sensorproteinaggregate aufweist.

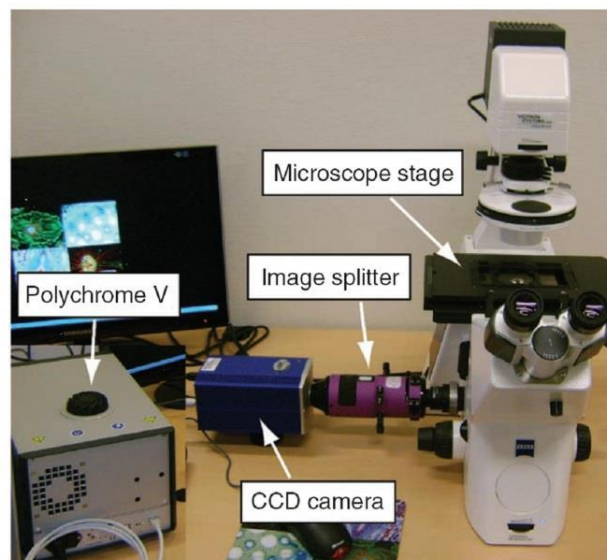


Abbildung 6: Darstellung des Mikroskopiersetups

Abgebildet ist die photographische Darstellung des Mikroskopiersetups (Börner et al., 2011). Für die FRET-Messungen an lebenden Zellen wurden ein inverses Fluoreszenzmikroskop, eine monochromatische Lichtquelle (Polychrome V), ein photometrisches DUAL-Emissions-System und eine CCD-Kamera (*charge coupled device*) verwendet. Diese erlauben die gleichzeitige Messung der Emissionen von CFP und YFP. Für die Aufzeichnung der Daten wurde die Software MetaFluor genutzt.

Nach Auswahl einer geeigneten Zelle und Aufnahme eines ersten Bildes wird in der Mikroskopiersoftware MetaFluor der Bereich der Zelle manuell bestimmt, über den die Emissionen im weiteren Verlauf aufgezeichnet werden sollen. In einem zweiten Schritt wird der Exzitationsfilter ET500/20x ausgewählt und der Messbereich einmal mit monochromatischem Licht der Wellenlänge 500 nm angeregt, damit ein Wert für eine direkte Anregung von YFP vorliegt (YFP_{dir}), der später für die Korrektur der FRET-Daten (Kapitel 0) benötigt wird. Vor Beginn des Experiments wird wieder der erste Exzitationsfilter eingelegt und eine Aufnahme­frequenz von einem Bild pro 5 s und eine Belichtungszeit zwischen 10 und 50 ms festgelegt, welche für die vorliegende Fragestellung ausreicht und das Problem des Fotobleichens minimiert. Anschließend wird mit der Serienaufnahme der Emissionen bei 535 ± 20 nm und 480 ± 15 nm bei einer Exzitation mit 436 ± 10 nm Wellenlänge begonnen, welche durch die Software sowohl einzeln als auch im Verhältnis zueinander aufgezeichnet und in Form eines Graphen in Echtzeit angezeigt werden. Anschließend wird gewartet, bis sich eine stabile Basallinie des YFP/CFP-Quotienten entwickelt, bevor die Zugabe der ersten Substanz erfolgt.

Puffer	Zusammensetzung
FRET-Puffer	144 mM NaCl 5.4 mM KCl 2 mM CaCl ₂ 1 mM MgCl ₂ 10 mM HEPES pH 7.3 mit NaOH

Tabelle 2-16: Zusammensetzung des FRET-Puffers

2.10 Auswertung der FRET-Daten

Die von der Mikroskopiersoftware MetaFluor aufgezeichneten Rohdaten werden nach Beendigung des Experiments in die Programme MetaMorph 5.0 (Visitron Systems) und OriginPro 6.1 übertragen und das CFP-/YFP-Verhältnis gegen die Zeit aufgetragen. Für die Berechnung des tatsächlichen CFP-/YFP-Verhältnisses müssen die Rohdaten noch um den Einfluss des Durchblutens, des Fotobleichens sowie der spektralen Kreuzanregung angepasst werden (Börner et al., 2011). Das Durchbluten beschreibt den Umstand, dass bei der Messung im Akzeptorkanal durch Überlappung der Emissionsspektren bedingt auch eine Detektion des Donorsignals stattfindet, wohingegen die spektrale Kreuzanregung durch eine direkte Anregung von YFP auch bei 436 nm verursacht wird.

Dafür werden in einem anderen Versuch HEK-293AD-Zellen mit Plasmiden transfiziert, sodass entweder nur CFP oder nur YFP allein exprimiert wird, und diese im gleichen Setting für CFP mit 436 nm und YFP zunächst mit 436 nm und anschließend mit 500 nm (YFP) angeregt. Bei den CFP-exprimierenden Zellen werden der CFP- und FRET-Kanal aufgezeichnet, deren Verhältnis (FRET/CFP) den Koeffizienten B erbringt. Nach Anregung der YFP-exprimierenden Zellen können durch die Aufnahme bei 436 nm die FRET-Kanal-Intensität I_{DA} und bei 500 nm die FRET-Kanal-Intensität I_{AA} bestimmt werden, deren Division (I_{DA}/I_{AA}) die Berechnung des Koeffizienten D erlaubt, welcher das Ausmaß der direkten Akzeptoranregung widerspiegelt. Die Korrektur der Messdaten wird wie folgt vorgenommen:

$$FRET_{Korr} = FRET - B \times CFP - D \times YFP_{dir}$$

YFP (dir) stellt dabei die Akzeptorintensität, deren Messung wie bereits beschrieben bei direkter YFP-Anregung mit 500 nm zu Beginn eines jeden Experiments stattfindet, B den Durchblutungskoeffizienten und D den Koeffizienten zur Korrektur zu hoher Werte durch direkte Anregung dar. Die Bestimmung der Koeffizienten B und D wird vor der Durchführung der Experimente durchgeführt.

Zum Schluss kann nun der korrigierte FRET-/CFP-Quotient zur Datenauswertung anhand folgender Formel

$$FRET_{Ratio} = \frac{FRET_{Korr}}{CFP}$$

berechnet werden (Börner et al., 2011).

Die Verfälschung des Signals durch Fotobleichen, dem eine Abnahme in der Intensität des Fluorophors zugrunde liegt, welche durch Exzitation noch beschleunigt wird, wird durch eine geringe Belichtungszeit und -frequenz minimiert und kann dann vernachlässigt werden.

3 Ergebnisse

3.1 Klonierung neuer Epac-basierter Sensoren

Ein wichtiges Ziel dieser Arbeit stellt die Konstruktion geeigneter Sensoren dar, mit deren Hilfe die Inhibierung von (PDE) durch (SH) untersucht werden kann. Dafür wurden neben den bereits vorhandenen mehrere Fusionsproteine entworfen, die einen cAMP-Sensor (Epac1-camps oder Epac2-camps) enthielten, an deren N-terminales Ende eine PDE hinzugefügt wurde. Die Abbildung 7 zeigt eine Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten und für sie entworfenen Sensoren. Die so entstandenen Sensoren konnten wie in Kapitel 2.8.2 beschrieben in HEK-293A-Zellen eingebracht und weiterverwendet werden.

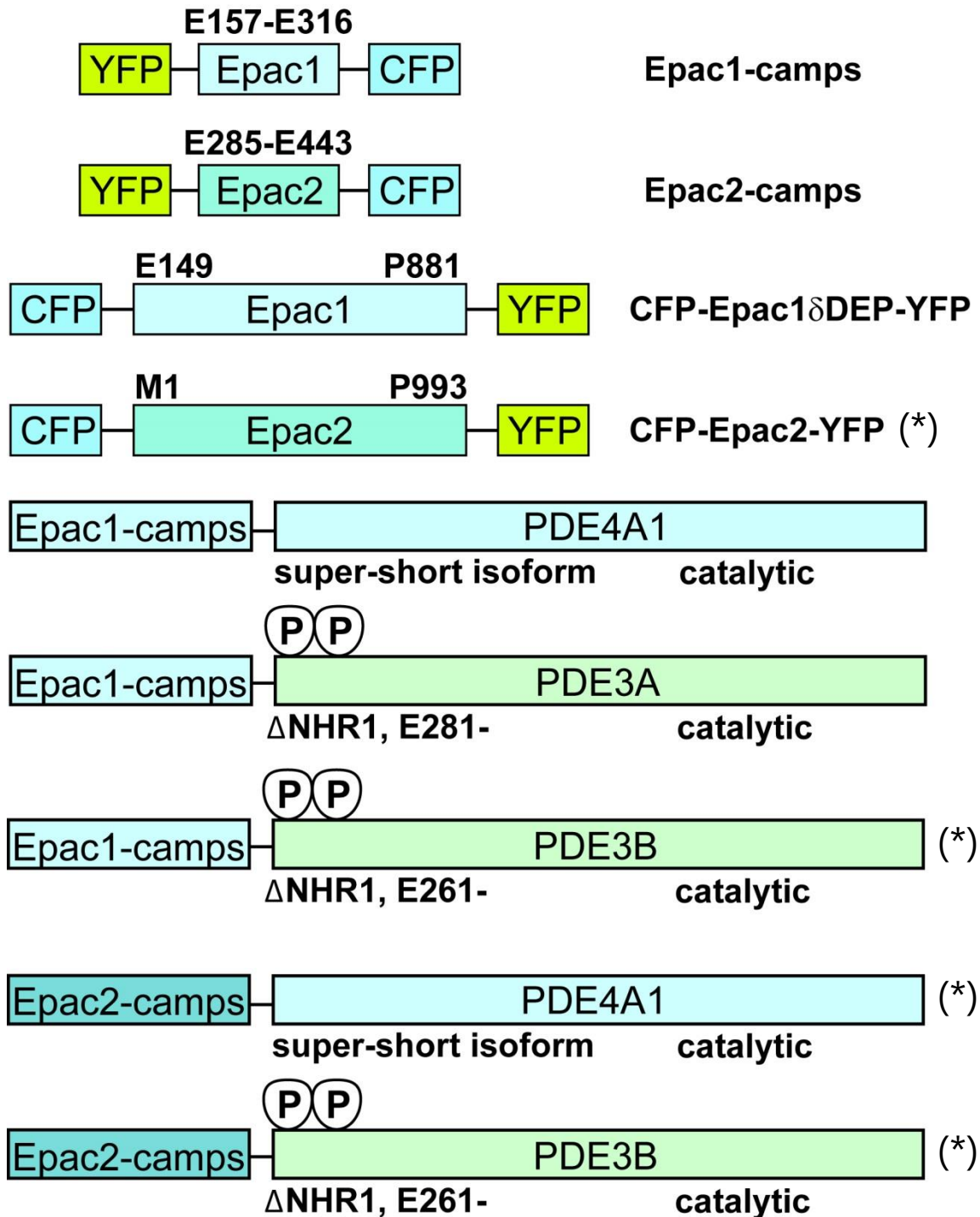


Abbildung 7: In dieser Arbeit verwendete Sensoren

Die vorliegende Abbildung zeigt eine schematische Darstellung der in dieser Arbeit verwendeten Sensoren. Epac1-camps und Epac2-camps (Nikolaev et al., 2004) wurden verwendet, um eine direkte Aktivierung durch SH auszuschließen. CFP-Epac2-YFP wurde in dieser Arbeit unter Verwendung des langen Epac2-Proteins (gesamte Epac2-Sequenz von M1 bis P993) mit seinen beiden cAMP-Bindungsstellen über EcoRV und NheI Schnittstellen kloniert (siehe 3.1.1). Alle mit einem (*) versehenen Sensoren wurden in dieser Arbeit neu konstruiert. Die genauen Informationen zur Klonierungsstrategie sind in den folgenden Kapiteln 3.1.1 bis 3.1.3 dargestellt.

3.1.1 CFP-Epac2-YFP

Um die Wirkungen auf das gesamte Epac2-Protein mit beiden cAMP-Bindungsstellen zu untersuchen, wurde ein weiterer cAMP-Sensor konstruiert. Dazu wurde die gesamte Epac2-Sequenz mit Aminosäuren M1 bis P993 (Acc. Bos und Rehmann, Niederlande) in einer PCR mit den Primern mEpac2EcoRVfor und mEpac2NheIrev amplifiziert und nach Verwendung der Schnittenzyme EcoRV und NheI in den Vektor CFP-Epac1 δ DEP-YFP (Kees Jalink, Amsterdam) eingefügt, was im neuen Sensor **CFP-Epac2-YFP** resultierte (Abbildung 8).

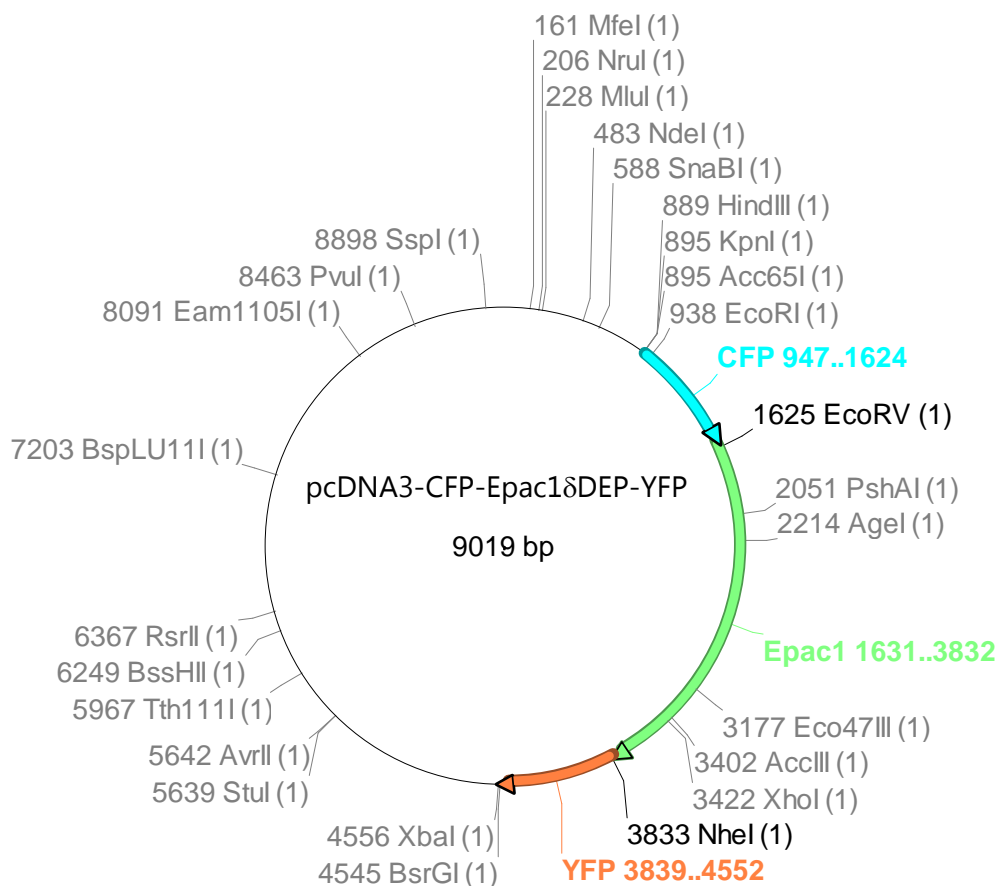


Abbildung 8: pcDNA3-CFP-Epac1 δ DEP-YFP

Der abgebildete Vektor pcDNA3-CFP-Epac1 δ DEP-YFP (schematische Darstellung) wurde mit EcoRV und NheI verdaut. Anschließend wurde die mittels PCR amplifizierte und mit EcoRV- und NheI-Schnittstellen flankierte gesamte Epac2-Protein-Sequenz (M1-P993) ohne Stopcodon eingefügt.

3.1.2 Epac2-camps-PDE4A1

Epac1-camps-PDE4A1 (Acc. Sabine Herget, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Würzburg) wurde mit HindIII und BamHI geschnitten (Abbildung 9) und als Vektor verwendet. Anschließend wurde mittels Tripple-Ligation ein YFP-Epac2-Fragment (mit HindIII+XbaI aus Epac2-camps (Abbildung 10) ausgeschnitten) und CFP ohne Stopcodon (aus Epac1-camps-PDE4A1 mit XbaI + BamHI ausgeschnitten, siehe Abbildung 9) hineinkloniert. Dadurch entstand der Sensor **Epac2-camps-PDE4A1**.

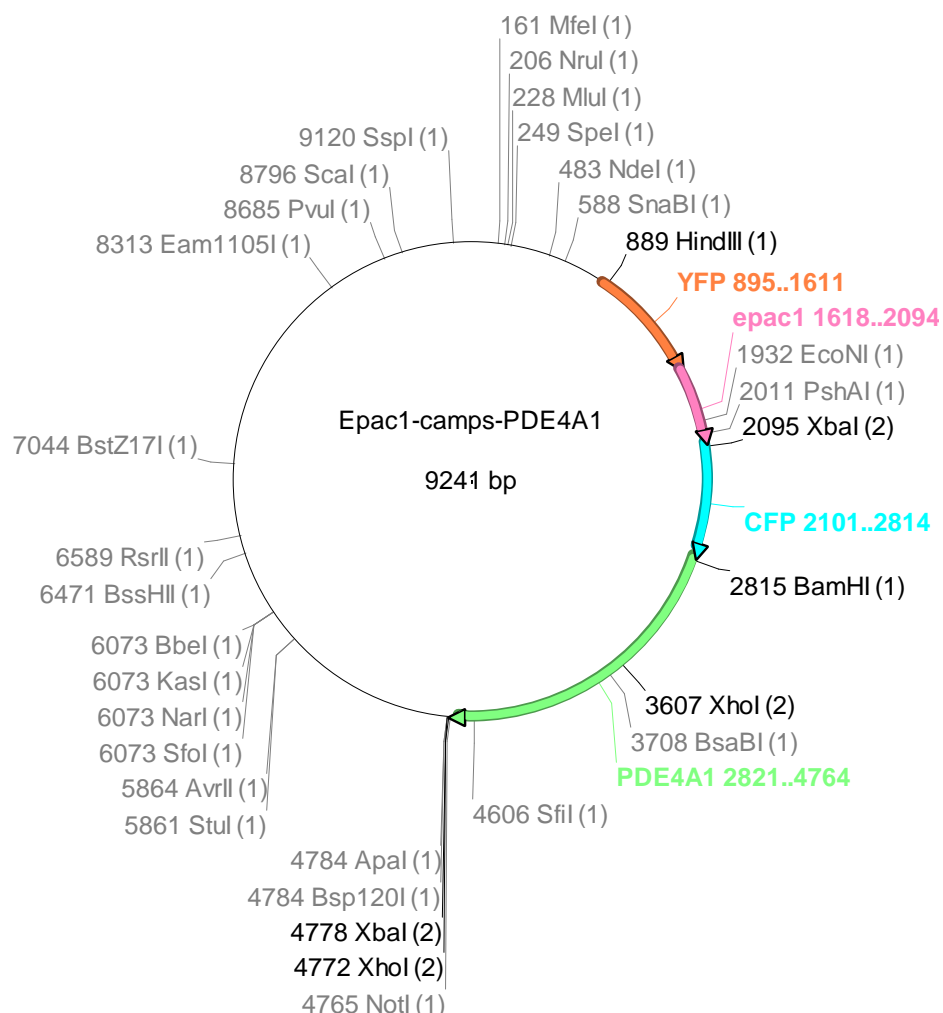


Abbildung 9: Epac1-camps-PDE4A1

Dieser Vektor diente als Vorlage für die Konstruktion von Epac2-camps-PDE4A1. Durch die Verwendung der Restriktionsenzyme HindIII und BamHI wurde die YFP-Epac1-CFP Sequenz entfernt und stattdessen die Epac2-camps-Sequenz ohne Stopcodon hineinkloniert. Diese bestand aus zwei Teilen: 1.) YFP-Epac2-Fragment, welches mit HindIII und XbaI aus dem Epac2-camps-Vektor (Abbildung 10) ausgeschnitten wurde, und 2.) CFP-Sequenz ohne Stopcodon, ausgeschnitten mit XbaI und BamHI aus Epac1-camps-PDE4A1.

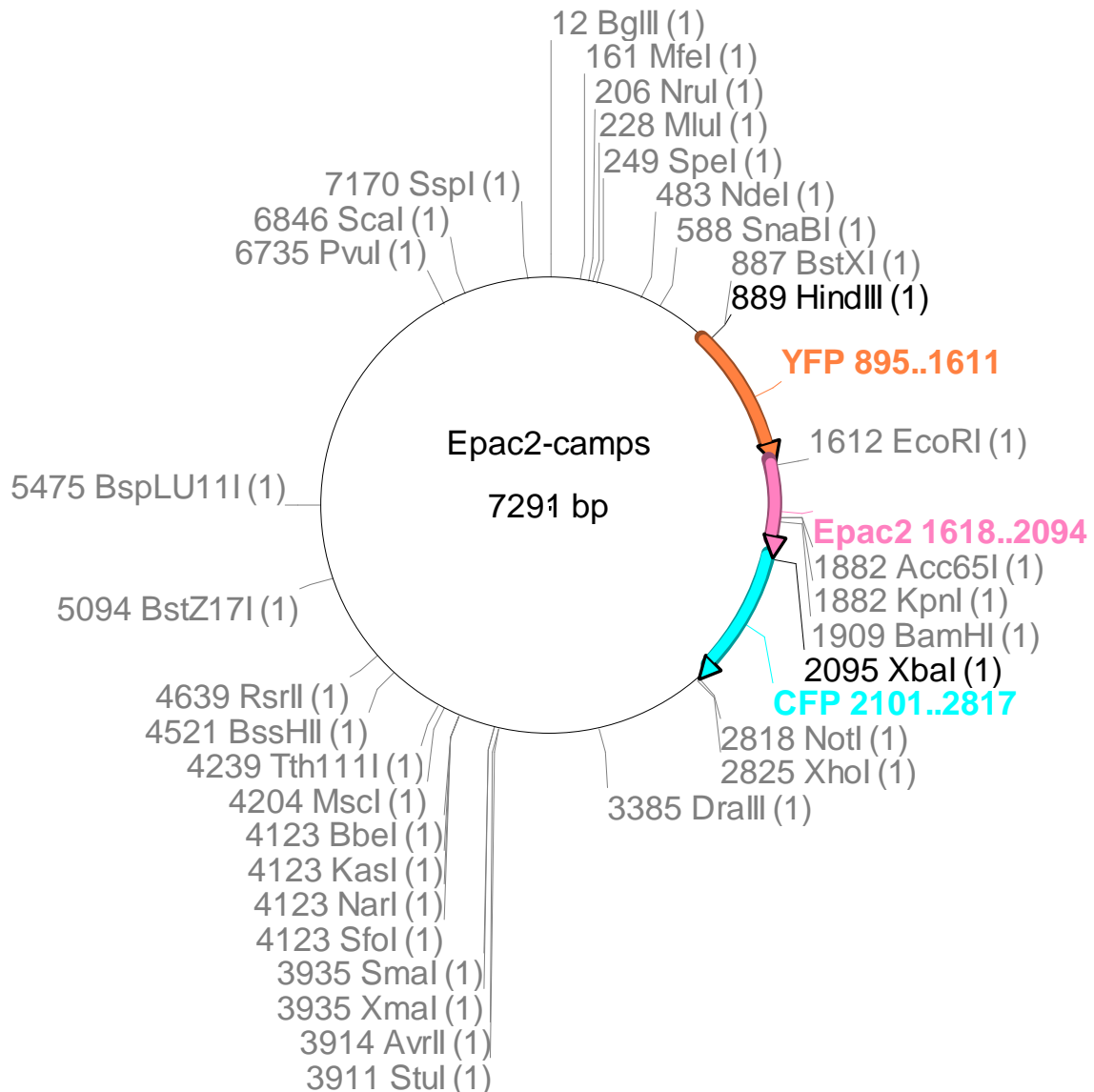


Abbildung 10: Epac2-camps

Aus diesem Vektor wurde die Sequenz YFP-Epac2 mit HindIII und XbaI ausgeschnitten und zusammen mit der CFP Sequenz (ohne Stopcodon, ausgeschnitten aus Epac1-camps-PDE4A1 mit XbaI und BamHI) in den vorhandenen Vektor mit PDE4A1 (Abbildung 9) eingesetzt.

3.1.3 Epac1-camps-PDE3B und Epac2-camps-PDE3B

Als Template für diese Klonierung wurde die PDE3B-Sequenz (Acc. Vincent Manganiello, Bethesda, USA) benutzt. Als Ausgangsvektor wurde zunächst das Plasmid Epac1-camps (Nikolaev et al., 2004) verwendet. Dieses endete mit den Schnittstellen NotI und XhoI, zwischen denen die PDE3B-Sequenz eingefügt werden sollte. Da das Plasmid zwischen CFP und dieser Schnittstelle noch ein Stop-

codon enthielt, musste dieses erst in einem Zwischenschritt entfernt werden. Dafür wurde CFP im vorhandenen Vektor durch CFP ohne Stopcodon zwischen XbaI und XhoI unter Verwendung der Primer CFPXbaIfor und CFPXhoInostopRev ersetzt. Letzterer enthielt u.a. die Sequenz gggccgc, um das entfernte NotI zu ersetzen. Als Template für die Sequenz von CFP diente der Vektor ECFP-N1 (Clontech). In einem zweiten Schritt wurde nun die Sequenz von PDE3B unter Verwendung der Primer PDE3BNotIfor und PDE3BXhoIrev amplifiziert und eingesetzt, um das **Epac1-camps-PDE3B**-Konstrukt zu bekommen. Diese Klonierungsstrategie wurde nochmals für den Epac2-camps-Vektor wiederholt (Abbildung 10) um den **Epac2-camps-PDE3B**-Sensor zu klonieren.

3.2 Messung der Epac-Sensoraktivierung *in vitro*

Es war vor Erstellung dieser Arbeit bereits bekannt, dass SH das Epac1-Protein nicht direkt zu aktivieren vermag. Um zu ermitteln, wie es sich bei Epac2 verhält, wurden die im Folgenden beschriebenen Versuche durchgeführt.

Zunächst wurde aus Sf9-Insektenzellen-Expression gereinigtes Epac2-camps (Nikolaev et al. 2004) untersucht. Nach erfolgter Anregung mit 436 nm und Aufzeichnung der Emissionsspektren wurde zu dem verdünnten Protein Glibenclamid (10 μ M), ein Vertreter der Sulfonylharnstoffe (SH) der zweiten Generation, hinzugegeben und die erneute Messung abgewartet. Im Anschluss wurde die Kontrolle des Sensors mit der Zugabe einer hinreichend großen Konzentration cAMP (200 μ M) durchgeführt. Das Emissionsspektrum (460 - 550 nm) wurde jeweils vor und nach Zugabe der verschiedenen Substanzen aufgezeichnet. Anschließend wurden die gleichen Messungen mit Tolbutamid wiederholt. Die Fluoreszenzintensität wurde gegen die Wellenlänge der gemessenen Emission aufgetragen (Abbildung 11). Die vorliegenden Abbildungen zeigen keine signifikante Aktivierung des Sensors nach Zugabe von Glibenclamid oder Tolbutamid. Da es sich hierbei um einen Versuch *in vitro* mit einem aufgereinigten Sensor aus

Sf9-Insektenzellen handelt und somit der Einfluss weiterer Proteine wie etwa PDE ausgeschlossen ist, kann in diesem Aufbau keine (direkte) Aktivierung des Epac2-camps-Sensorproteins gezeigt werden.

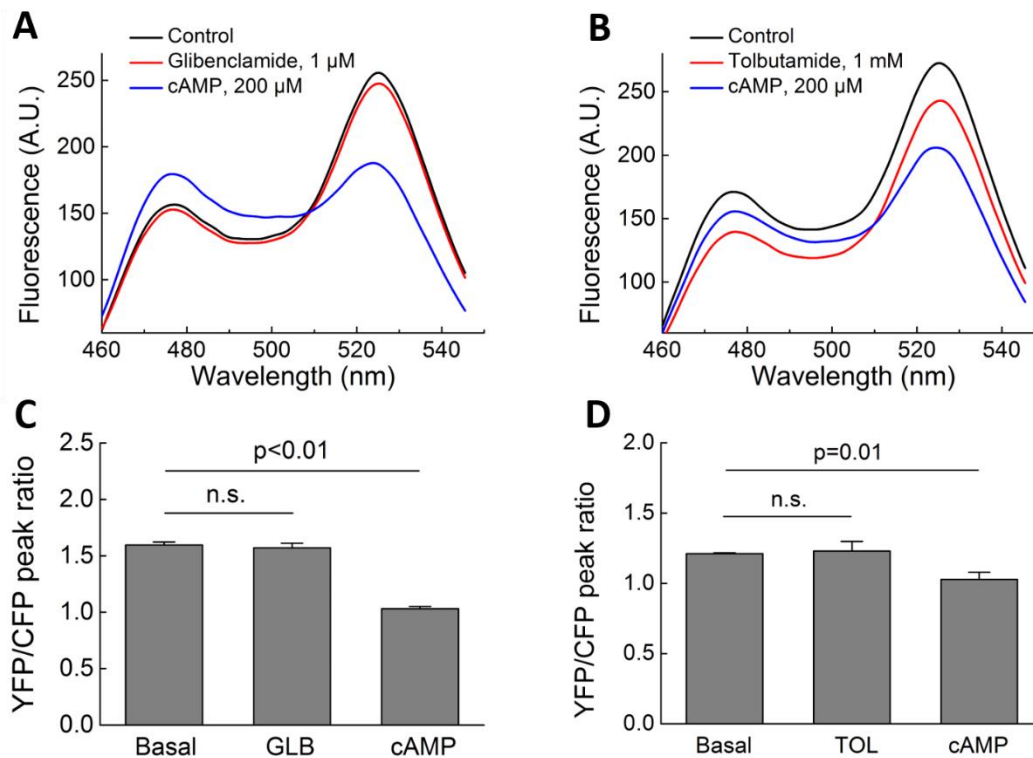


Abbildung 11: Aktivierung von Epac2-camps durch SH *in vitro*

Epac2-camps-Sensor aus Sf9-Insektenzellen wurde vor und nach Zugabe von Glibenclamid (A) oder Tolbutamid (B) photometrisch angeregt. Gezeigt sind beispielhafte Emissionsspektren (n=4). Es zeigt sich eine leichte Abnahme der Intensität für beide Emissionsmaxima, aber keine signifikante (GLB, Diagramm C) bzw. nur eine minimale Änderung der FRET-Ratio (TOL, Diagramm D). Eine gering verminderte Intensität der Fluoreszenz sowohl für CFP als auch YFP deutet darauf hin, dass hier eine gleichmäßige Abnahme der Gesamtfluoreszenz vorliegt. Mittelwerte \pm Standardfehler für YFP-/CFP-FRET-Ratios waren für A: basal $1,60 \pm 0,03$ und nach Glibenclamidgabe $1,57 \pm 0,04$ (kein signifikanter Unterschied, $p = 0,35$) und für B: basal $1,21 \pm 0,01$ und nach Tolbutamidgabe $1,27 \pm 0,07$ (kein signifikanter Unterschied, $p = 0,79$). Die Zugabe von cAMP führt zu einem deutlichen Abfall der FRET-Ratio von YFP/CFP (blaue Kurve) als Positivkontrolle.

Als nächstes wurden HEK-293A-Zellen auf zwei bis drei Zellkulturschalen (\varnothing 100 mm) übertragen und der Sensor Epac1-camps bei einer Zelldichte von ca. 60 % mithilfe der Calcium-Phosphat-Präzipitation (siehe Kapitel 2.8.3) transfiziert. Die photometrische Anregung des Sensors zeigt eine überraschende Reaktion. Die Zugabe von Tolbutamid (1 mM) führte zu einer leichten Abnahme der

FRET-Ratio, was einer Aktivierung des Sensors entspricht. Die Zugabe der Kontrollsubstanz (200 μ M cAMP) führte zu einer deutlich stärkeren Aktivierung (Abbildung 12).

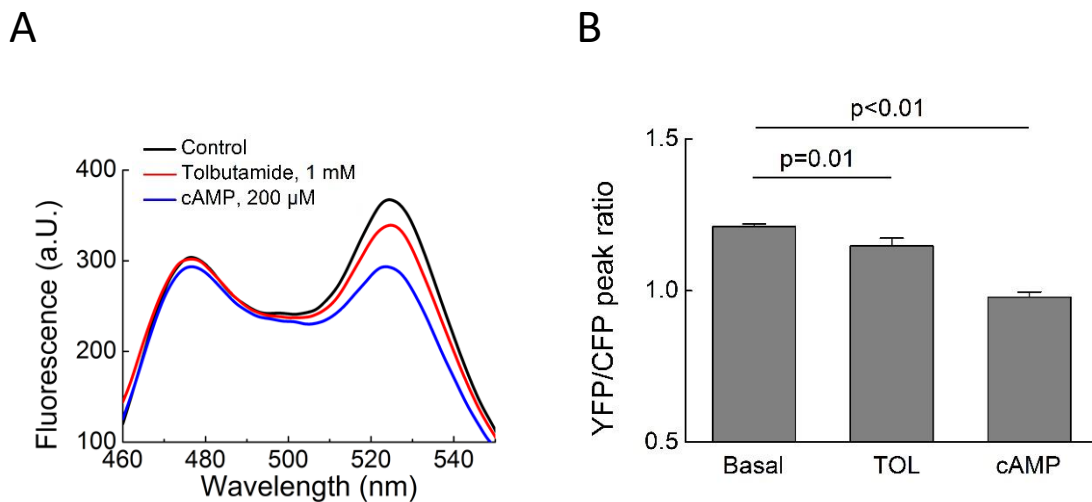


Abbildung 12: Aktivierung von Epac1-camps *in vitro*

Diagramm A zeigt beispielhafte Emissionsspektren (460-550 nm, n = 3) gemessen bei photometrischer Anregung des Epac1-camps-Sensors mit 436 nm vor und nach Zugabe von Tolbutamid (1 mM). Der gelöste Sensor wird durch den SH aktiviert. Die Zugabe von 200 μ M cAMP führt anschließend zu einer noch stärkeren Aktivierung. B: Auswertung der YFP- / CFP-Ratios unter drei experimentellen Bedingungen – basal, nach Tolbutamidgabe (TOL) und nach cAMP-Gabe (Mittelwerte \pm Standardfehler, n = 3).

3.3 Messung der Epac-Sensoraktivierung in lebenden Zellen

Zunächst wurden HEK-293A-Zellen mit verschiedenen Sensoren transfiziert, die lediglich Epac1- oder Epac2-Sequenzen enthielten, und auf Deckgläschen (\varnothing 24 mm) ausgesät. Unter Verwendung des o.g. Mikroskop-Setups wurden die zeitlichen Änderungen in der CFP-/YFP-Ratio aufgezeichnet, während die Zellen mit verschiedenen Substanzen stimuliert wurden. Anschließend wurde eine hinreichend große Konzentration an Tolbutamid (300 μ M) als Vertreter der SH der ersten Generation auf die Zellen gegeben und eine Reaktion abgewartet. Kam es nach 60 s zu keiner Änderung des FRET-Signals, wurde mit der Gabe von Isoproterenol (Iso) nochmals stimuliert. Interessanterweise führte sowohl bei CFP-Epac2-YFP als auch bei Epac1-camps die alleinige Anwendung von Tolbutamid bereits zu einer Aktivierung des Sensors. Bei CFP-(Epac1, δ DEP)-YFP und Epac2-

camp5 kam es erst durch einen Anstieg der cAMP-Konzentration nach β -adrenerger Stimulation mit Iso zu einer Änderung des FRET-Signals. Die Tatsache, dass sowohl ein Sensor mit Epac1 (CFP-Epac δ DEP-YFP) als auch mit Epac2 (Epac2-camp5) nicht durch den SH, sondern erst durch einen cAMP-Anstieg aktiviert wurde, und andererseits zwei Sensoren mit Varianten von Epac1 und Epac2 bereits durch den SH aktiviert wurden, ist widersprüchlich. Es könnte sich hierbei um Artefakte ohne direkte Proteinaktivierung (Epac) handeln. Alternativ könnten die molekularen Mechanismen der Sensoraktivierung durch cAMP (nach Iso-Stimulation) und SH grundsätzlich unterschiedlich sein.

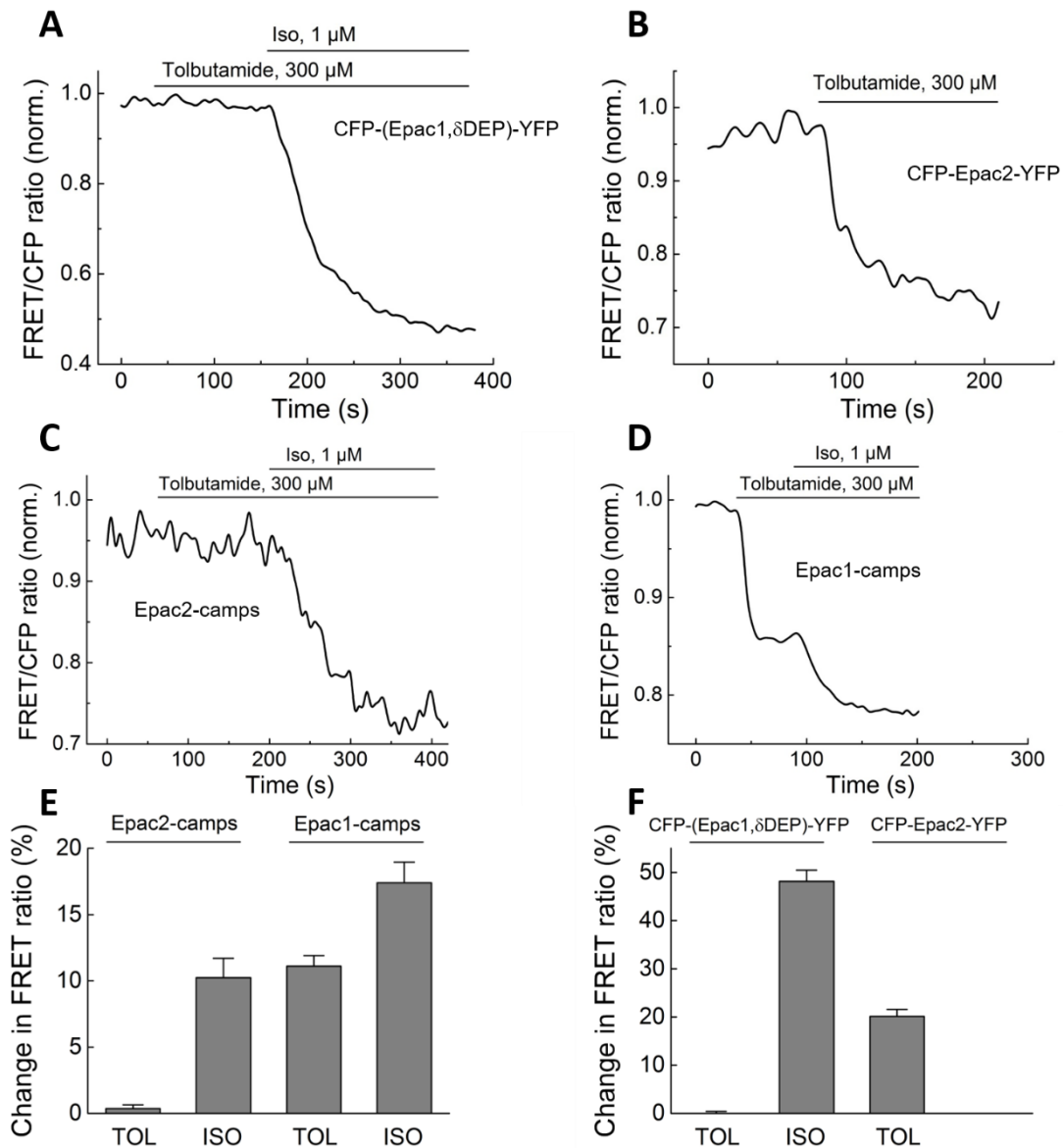


Abbildung 13: Epac-Aktivierung in lebenden Zellen

HEK-293A-Zellen wurden mit cAMP-Sensoren transfiziert und zunächst mit Tolbutamid (TOL) oder einem selektiven PDE-Hemmstoff und anschließend zur Kontrolle mit Iso stimuliert. Der Sensor CFP-(Epac1,δDEP)-YFP wird nicht durch Tolbutamid, sondern erst durch Iso (A) bzw. cAMP-Anstieg aktiviert. In den CFP-Epac2-YFP exprimierenden Zellen führt die Zugabe von Tolbutamid allein bereits zu einer FRET-Änderung, nicht aber in den Epac2-camps exprimierenden Zellen (C), wohingegen Epac1-camps bereits durch Tolbutamid allein aktiviert wird. Die Diagramme A-D zeigen repräsentative Kurven für jeweils 4-6 Experimente mit mehreren (5-10) Zellen. E und F zeigen Mittelwerte \pm Standardfehler, für A (n = 5): TOL $48,2 \pm 2,3$ %, für B (n = 5): TOL $20,1 \pm 1,5$ %, für C (n = 6): TOL $0,4 \pm 0,3$ %, für D (n = 6): TOL $11,1 \pm 1,6$ %.

Selbst eine besonders hohe Konzentration von Tolbutamid (2 mM Endkonzentration) konnte keine messbare Aktivierung des Sensors (Epac2-camps) herbeiführen (Abbildung 14).

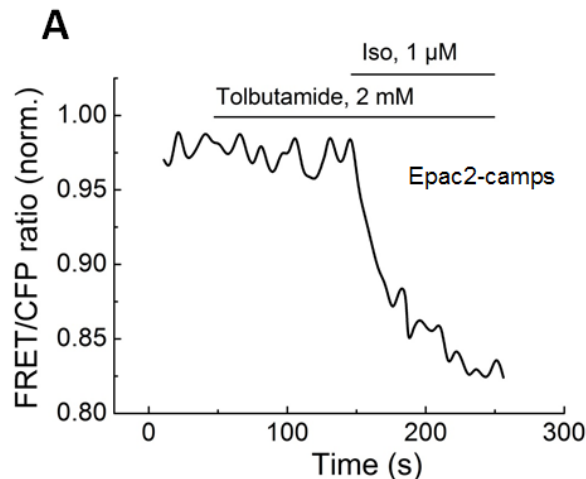


Abbildung 14: Keine Aktivierung von Epac2-camps durch Tolbutamid

Die Abbildung zeigt eine repräsentative Messung ($n = 5$) mit Epac2-camps exprimierenden HEK-293A-Zellen. Selbst bei Zugabe einer sehr hohen Konzentration Tolbutamid (2 mM) ist keine Aktivierung des Sensors zu verzeichnen. Die Zugabe von Iso (1 μM) führt zu einer starken Aktivierung des Sensors.

Auch eine Erhöhung der basalen cAMP-Konzentration durch eine zunächst selektive (Rolipram, 1 μM) und anschließend unselektive (IBMX 100 μM) PDE-Hemmung führte weder bei Epac2-camps noch bei Epac2-camps ohne β-adrenerge Stimulation zu einer messbaren Sensoraktivierung (Abbildung 15).

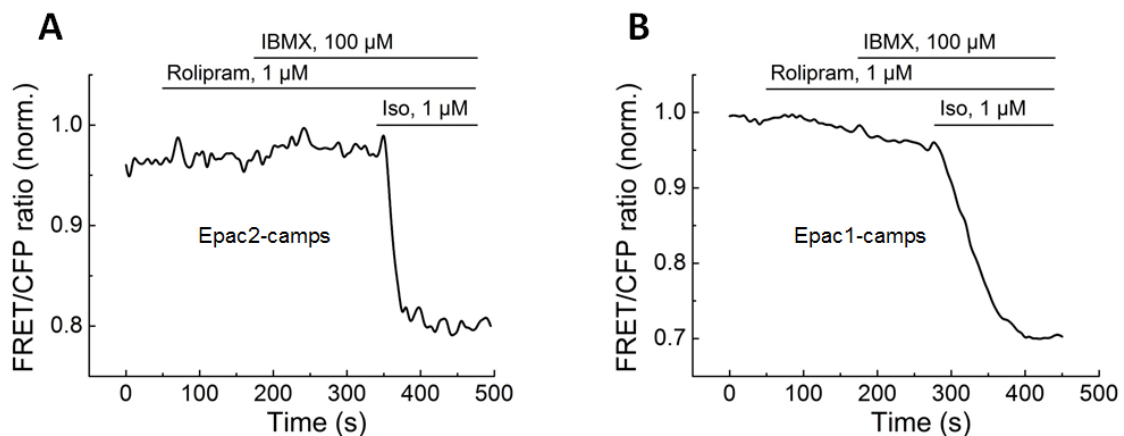


Abbildung 15: Keine Aktivierung von Epac2-camps und Epac1-camps durch PDE-Inhibitoren

Diese Abbildung zeigt die Zugabe von Rolipram (1 μM) und anschließend IBMX (100 μM) auf Epac2-camps (A) und Epac1-camps (B) exprimierende HEK-293A-Zellen. Eine Erhöhung der basalen cAMP-Konzentration durch eine selektive (Rolipram) oder unselektive (IBMX) PDE-Hemmung führte ohne β-adrenerge Stimulation weder bei Epac2-camps (A) noch bei Epac1-camps (B) zu einer Aktivierung des Sensors. Die Zugabe von Iso (1 μM) führt auch hier zu einer starken Aktivierung des Sensors. A und B zeigen jeweils eine repräsentative Kurve für mehrere Experimente (je $n = 5$).

3.4 Weitere auf Epac2-camps basierende Sensoren

Aufgrund teilweise widersprüchlicher Ergebnisse wurden weitere auf Epac1 und Epac2 basierende Sensoren verwendet, um besser zu verstehen, ob und wie Epac durch SH beeinflusst wird (Abbildung 16).

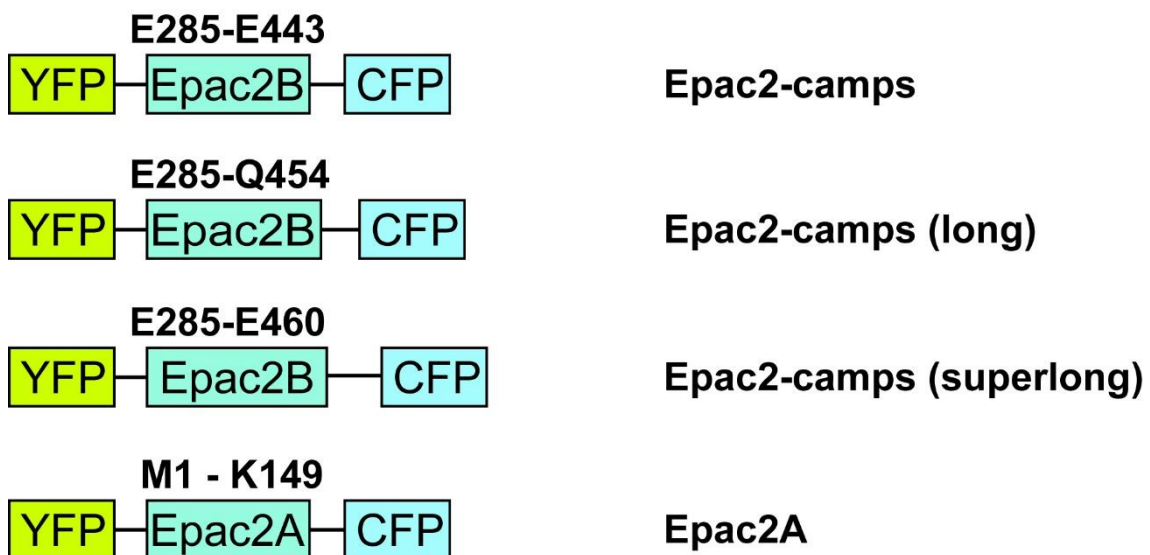


Abbildung 16: Weitere auf Epac2-camps basierende Sensoren

Die vorliegende Abbildung zeigt eine schematische Darstellung weiterer Sensoren, die verschiedene Varianten von Epac2-camps enthalten. Neben Epac2-camps sind hier analog dazu mit gleichem Aufbau und etwas längerem Abschnitt aus dem Epac2-Protein Epac2-camps (long) und Epac2-camps (superlong) bis zur AS Q454 bzw. E460 und Epac2A, einem Sensor, der nur die Bindestelle-A (M1-K149) enthält (Nikolaev et al., 2004), dargestellt. Ein weiterer Sensor (Epac1-campsR279E), bei dem der Austausch einer Aminosäure in Epac1-camps zu einem Verlust der Bindeaffinität von cAMP führte (Börner et al., 2011), ist hier nicht abgebildet. Eine entsprechende Mutante für Epac2-camps lag zum Zeitpunkt der Entstehung dieser Arbeit nicht vor.

Zunächst wurde eine Mutante von Epac1-camps verwendet (Epac1-campsR279E), bei der innerhalb der cAMP-Bindedomäne das Arginin an der Aminosäurestelle 279 durch Glutaminsäure ersetzt wurde, wodurch der Sensor die Bindungsfähigkeit für cAMP verliert (Börner et al., 2011; Mei et al., 2002). Dieser Sensor wurde nach transienter Transfektion in HEK-Zellen erst mit Tolbutamid und anschließend mit Iso stimuliert. Weder die Zugabe des SH noch die Erhöhung der cAMP-Konzentration durch maximale adrenerge Stimulation führten zu einer messbaren Änderung der FRET-Ratio (siehe Abbildung 17).

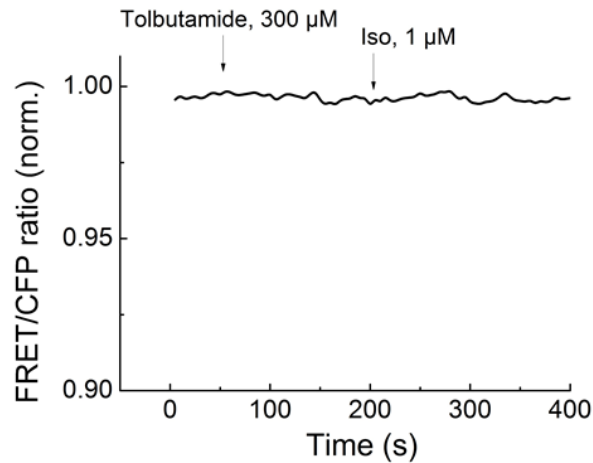


Abbildung 17: Die Epac-Mutante (Epac1-campsR279E) reagiert nicht auf SH oder cAMP

Abbildung 17 zeigt eine repräsentative Messung mit Epac1-campsR279E exprimierenden HEK293A-Zellen. Dabei handelt es sich um eine Variation von Epac1-camps, bei der eine Aminosäure innerhalb der Bindedomäne ausgetauscht wurde (Arginin durch Glutamin). Hierdurch verliert die ehemalige Bindedomäne ihre Affinität für cAMP (Börner et al., 2011). Hierbei führt weder die Zugabe von Tolbutamid noch die Stimulation mit Iso zu einer relevanten Sensoraktivierung. N = 9; Mittelwert \pm Standardfehler = $0,5 \pm 0,4$ % FRET-Ratio-Änderung.

Da der Sensor mit dem gesamten Epac2-Protein auf SH reagiert und Epac2-camps, der lediglich die Bindedomäne B enthält, selbst auf höchste Konzentrationen von Tolbutamid keine messbare Wirkung zeigt, wurden darüber hinaus weitere Sensoren verwendet, die verschiedene Varianten von Epac2 enthalten, um weitere Hinweise für eine direkte Aktivierung zu finden bzw. den Zielort für die Wirkung weiter einzuengen.

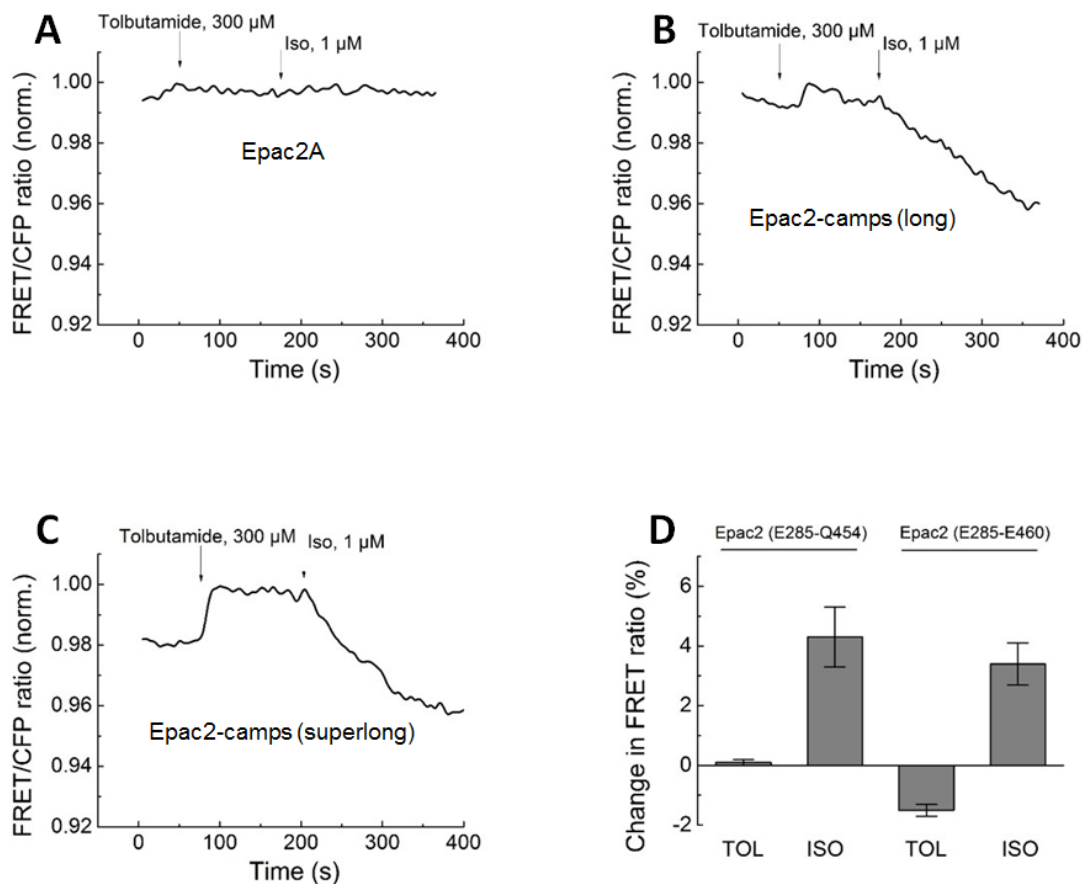


Abbildung 18: Tolbutamid hat unterschiedliche Wirkungen auf die verschiedenen Epac2-Varianten

HEK-293A-Zellen wurden mit verschiedenen Varianten von Sensoren, die auf Epac2-camps basieren, transfiziert und erst mit Tolbutamid und anschließend zur Kontrolle mit Iso stimuliert. Der Sensor Epac2A (A) enthält im Gegensatz zu Epac2-camps die andere (niedrigaffine) cAMP-Bindestelle A aus Epac2 (M1-K149). Dieser reagiert nicht auf Tolbutamid und wegen der geringen Affinität auch nicht auf cAMP-Stimulation in HEK-Zellen (Nikolaev et al., 2004). Epac2-camps (long) zeigt durch Zugabe von Tolbutamid bereits gewisse „Fluktuationen“ (B), aber keine signifikante Änderung der Baseline (D). Epac2-camps (superlong) hingegen zeigt durch eine deutliche und signifikante Zunahme der FRET-Ratio eine klare Aktivierung durch die Zugabe von Tolbutamid (C, D). für A n = 7, Mittelwert \pm Standardfehler = $0,1 \pm 0,1$ % FRET Änderung. Für B n = 3 für C n = 6.

Epac2-camps (long) und Epac2-camps (superlong) sind zwei weitere Varianten von Epac2-camps (E285-Q454), die über die cAMP-Bindedomäne B hinaus noch weitere 11 (long) bzw. 17 (superlong) Aminosäuren aus Epac2 enthalten. Epac2A hingegen enthält im Gegensatz zu Epac2-camps lediglich die Bindedomäne A aus Epac2 mit einer deutlich geringeren Affinität (87 μ M) für cAMP (de Rooij et al., 2000). Diese neuen Sensoren wurden entsprechend den vorigen Experimenten in HEK-Zellen transfiziert und mit Tolbutamid und Iso stimuliert. Zunächst zeigte der Sensor Epac2A keine Wirkung auf Tolbutamid, selbst höhere Konzentrationen von cAMP nach maximaler adrenerger Stimulation (1 μ M Iso) verursachten aufgrund

der niedrigen Affinität (Nikolaev et al., 2004) keine messbare Sensoraktivierung (Abbildung 18).

Überraschende Ergebnisse erbrachten jedoch die Experimente mit den leicht verlängerten Varianten von Epac2-camps. In Epac2-camps (long) kann nach Zugabe von Tolbutamid eine Veränderung der Sensoraktivität im Sinne einer „instabilen“ Kurve der FRET-Ratio beobachtet werden, eine mehrfache Wiederholung des Experiments und eine Bestimmung des Mittelwerts zeigen jedoch keine signifikante Änderung der Baseline. In Epac2-camps (superlong) hingegen führt Tolbutamid zu einer deutlichen signifikanten Aktivierung im Sinne einer Zunahme der FRET-Ratio. Die Zugabe von Iso zeigt mit einer starken Aktivierung in gewohnter Weise die intakte Funktion der Sensoren (Abbildung 18).

3.5 Messungen der PDE-Inhibition in lebenden Zellen

3.5.1 Epac1

Die zuvor entwickelten Sensoren Epac1-camps-PDE4A1 und Epac1-camps-PDE3A (Herget) wurden jeweils in HEK-293A-Zellen exprimiert und auf Deckgläschen (\varnothing 24 mm) ausgesät. Anschließend wurde die Änderung des FRET-Signals nach Zugabe verschiedener Substanzen aufgezeichnet (Abbildung 19). Bei den angegebenen Konzentrationen handelte es sich immer um die jeweilige Endkonzentration, die bis zum Ende des Experiments beibehalten wurde. Zunächst wurden die Zellen mit Iso (1 μ M Endkonzentration) maximal stimuliert, die zu einer direkten, maximalen Aktivierung der β -Adrenozeptoren und damit zu einem starken cAMP-Anstieg in den Zellen führte. Dadurch wurde eine Bindung von cAMP an die Epac-Domäne ermöglicht, was eine Voraussetzung für eine Sensoraktivität darstellte. Nach ca. 100 Sekunden folgte als nächstes die Stimulation des Sensors mit einem SH (Tolbutamid, 300 μ M). Das Experiment wurde durch Zugabe eines selektiven PDE-Hemmstoffs (Rolipram, 1 μ M für PDE4A1, bzw. Cilostamid, 1 μ M

für PDE3A) beendet, um eine maximale PDE-Inhibierung zu erreichen. Die Erhöhung der cAMP-Konzentration durch Stimulation des β -adrenergen Rezeptors führte durch hohe konstitutive PDE-Aktivität am Sensor (die PDE im Sensor hydrolisiert cAMP, bevor es eine messbare Aktivierung des Sensors verursachen kann) zu keiner FRET-Änderung (Herget et al., 2008), wohingegen die Zugabe des SH Tolbutamid eine Abnahme der FRET-Ratio um ca. 10 % zur Folge hatte. Durch Zugabe des spezifischen PDE4-Inhibitors Rolipram wurde schließlich eine maximale Aktivierung mit einer FRET-Änderung von nun insgesamt 50 % erreicht (Abbildung 19A).

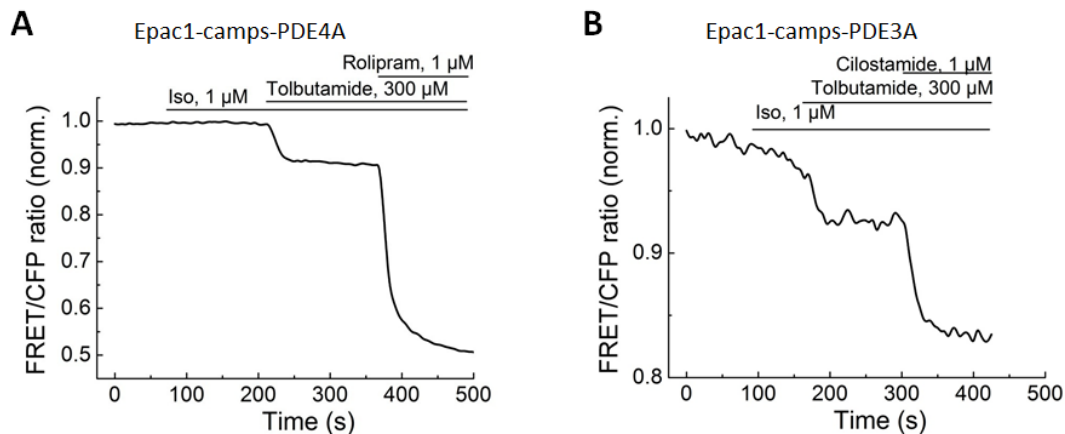


Abbildung 19: Tolbutamid aktiviert Epac1-camps-PDE4A (A) bzw. Epac1-camps-PDE3A (B)

Die Sensoren Epac1-camps-PDE4A (A) und Epac1-camps-PDE3A (B) werden zunächst mit Iso, anschließend mit Tolbutamid und zuletzt mit ihrem jeweiligen selektiven Hemmstoff (Rolipram für PDE4 und Cilostamid für PDE3) stimuliert. Die Erhöhung der cAMP-Konzentration durch Iso allein führt aufgrund der hohen basalen Aktivität der PDE zu keiner Sensoraktivierung. Erst die Zugabe von Tolbutamid führt zu einer Aktivierung, die durch den jeweiligen selektiven PDE-Hemmstoff Rolipram (A) bzw. Cilostamid (B) noch verstärkt wird. A und B zeigen jeweils eine repräsentative Kurve für mehrere Experimente (je $n = 5$). Mittelwerte \pm Standardfehler – siehe Abbildung 17.

Vergleichbare Ergebnisse zeigte auch die Anwendung des Sensors Epac1-camps-PDE3A: eine 10 %ige Abnahme der FRET-Ratio durch Tolbutamid und eine weitere ca. 10 %ige Abnahme durch den PDE3-Inhibitor (Cilostamid). Die Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen der Aktivierung der Epac1 enthaltenden PDE-Sensoren durch Tolbutamid sind in Abbildung 20 dargestellt. Sie zeigen, dass höhere Tolbutamidkonzentrationen (> 1 mM) zu noch stärkeren FRET-Signalen führen, die bei 10 mM die Stärke der Effekte von PDE-Inhibitoren erreichen.

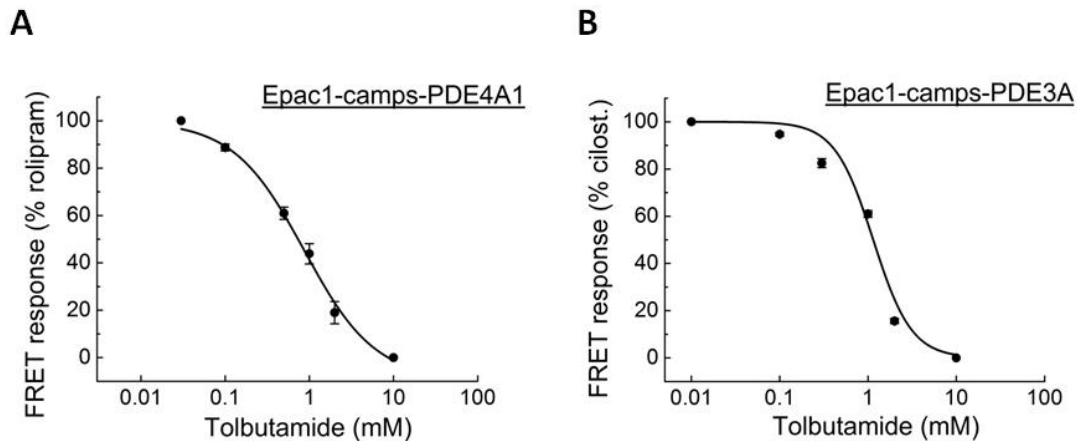


Abbildung 20: Dosisabhängige Wirkung von Tolbutamid auf Epac1-camps-PDE3A/4A

Die Abbildung zeigt die beiden Konzentrations-Wirkungs-Kurven für die FRET-Änderung durch Tolbutamid. Die Zugabe von Tolbutamid führt zu einer dosisabhängigen Sensoraktivierung. Die Wirkung ist dabei in Relation zur maximalen Aktivierung des Sensors durch seinen selektiven Inhibitor, Rolipram (10 μ M) für Epac1-camps-PDE4A1 (A) und Cilostamid (10 μ M) für Epac1-camps-PDE3A, dargestellt. Gezeigt werden Mittelwerte \pm Standardfehler, normiert auf die maximalen PDE-Inhibitoreffekte, n = 5.

Da die pankreatischen β -Zellen hauptsächlich PDE3B und nicht PDE3A exprimieren, wurde ein neuer Sensor (Epac1-camps-PDE3B) entwickelt und getestet, um die Effekte der SH auf die für die Insulinsekretion relevante PDE3B zu untersuchen. Die Verwendung des Epac1-camps-PDE3B-Konstrukts zeigte mit Epac1-camps-PDE3A vergleichbare Ergebnisse (Abbildung 21).

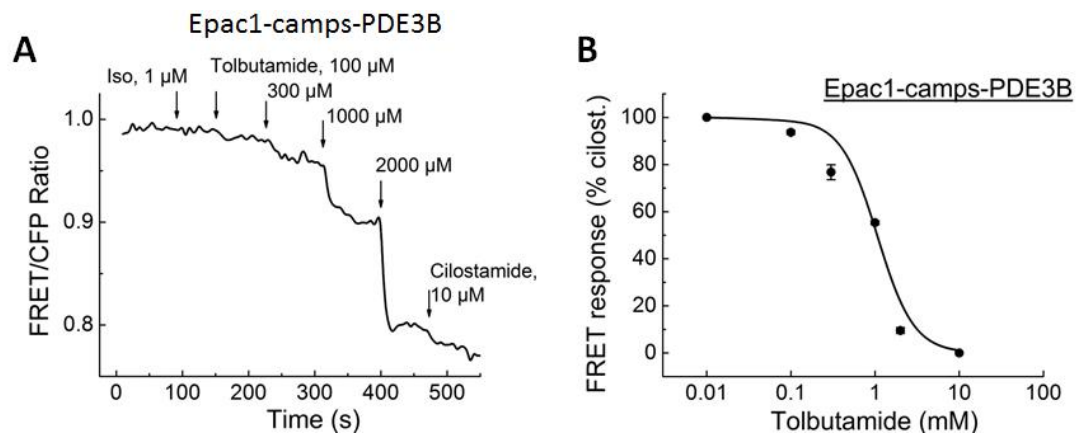


Abbildung 21: Tolbutamid aktiviert Epac1-camps-PDE3B-Sensor

Die Abbildung zeigt Messungen für eine pharmakologische Inhibition von PDE3B durch TOL. Der Sensor wird zunächst mit Iso-proterenol (1 μ M) und anschließend mit einer immer höheren Dosis Tolbutamid stimuliert. Abschließend wird für eine maximale Aktivierung ein selektiver PDE3-Inhibitor, Cilostamid, hinzugefügt. Selbst nach Zugabe von Tolbutamid mit einer Endkonzentration von 2.000 μ M ist eine weitere Aktivierung des Sensors durch Cilostamid möglich (A). Die Konzentrations-Wirkungs-Beziehung zeigt eine vergleichbare Aktivierung durch Cilostamid wie bei den anderen Sensoren, die Epac1 enthalten (B). A zeigt eine repräsentative FRET-Spur für Epac1-camps-PDE3B. B zeigt Mittelwerte \pm Standardfehler, normiert auf die maximalen PDE-Inhibitoreffekte, n = 4.

Da Tolbutamid Epac1-camps direkt aktivieren kann und eine selektive PDE-Hemmung zu einer weiteren Änderung des Signals führte, kann hieraus aufgrund möglicher Mischeffekte nicht sicher eine Inhibierung der PDE gefolgert werden. Daher wurden neue Sensoren entwickelt, in denen Epac1-camps durch Epac2-camps ersetzt wurde, welcher keine direkten FRET-Signale auf Tolbutamid zeigt.

3.5.2 Epac2

Da Epac1-camps (und nicht Epac2-camps) direkt durch SH aktiviert werden kann, wurden auch Epac2-camps basierte Konstrukte entwickelt und untersucht. Die Sensoren Epac2-camps-PDE4A1 und Epac2-camps-PDE3B wurden in HEK-293A-Zellen transfiziert und die Änderung der FRET-Ratio mittels Imaging nach Zugabe von SH und PDE-Inhibitoren aufgezeichnet (vgl. Kapitel 3.5.1). Die Ergebnisse sind in Abbildung 22 grafisch dargestellt.

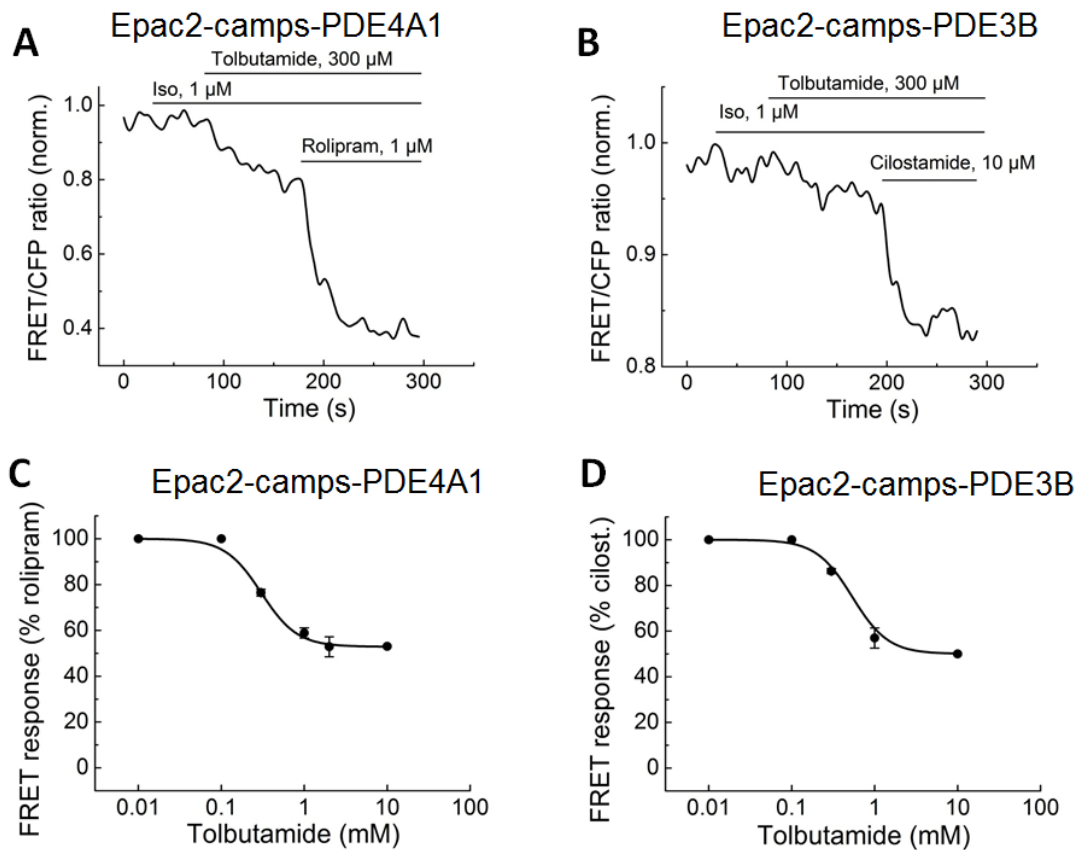


Abbildung 22: Tolbutamid aktiviert Epac2-camps basierte PDE-Sensoren Epac2-camps-PDE4A1 (A, C) und Epac2-camps-PDE3B (B, D)

Abbildung 22 zeigt die FRET-Antwort der Epac2-camps enthaltenden PDE-Sensoren nach Zugabe von Tolbutamid. Die *in vitro*-Messungen mit Epac2-camps in Kapitel 3.2 zeigten, dass das Protein nicht direkt durch Tolbutamid aktiviert wird. Somit weisen FRET-Änderungen bei Verwendung dieser Sensoren auf eine Hemmung der im Sensor enthaltenden PDE. Dies gilt sowohl für Epac2-camps-PDE4A1 (A) als auch für Epac2-camps-PDE3B (B). Die Zugabe ihres spezifischen Inhibitors Rolipram (A) bzw. Cilostamid (B) führt in beiden Fällen zu einer noch stärkeren Hemmung der jeweiligen PDE und somit zu einer weiteren FRET-Änderung. Je höher die Konzentration von Tolbutamid desto stärker ist die Hemmung der PDE4A (C) bzw. PDE3B (D). A und B zeigen repräsentative FRET-Spuren, C und D Mittelwerte \pm Standardfehler (normiert auf die maximalen PDE-Inhibitoreffekte). $n = 6$ für A und C; $n = 4$ für B und D.

Die Zugabe von Tolbutamid führte in beiden Fällen zu einer Änderung der FRET-Ratio und somit einer Aktivierung des Sensors. Da diese Änderung nicht durch eine direkte Aktivierung des Epac2-Proteins verursacht wurde (siehe Kapitel 3.2), erschließt sich daraus, dass die Zugabe von Tolbutamid zu einer Hemmung der PDE 4A und 3B führte. Diese Hemmung war bei einer geringen Konzentration von Tolbutamid (300 μ M) submaximal, was durch den weiteren Anstieg der FRET-Ratio nach Zugabe eines spezifischen PDE-Hemmers in geeignet hoher Konzentration (Rolipram: 1 μ M, Cilostamid: 10 μ M) deutlich wurde. Die Konzentrations-Wirkungs-Kurven in Abbildung 22 (D, C) zeigen die Stärke der PDE-Inhibition bei

verschiedenen Tolbutamidkonzentrationen. Sie unterscheiden sich von den Kurven für Epac1-camps-basierte Sensoren, indem sie selbst bei sehr hohen Tolbutamidkonzentrationen kein maximales FRET-Signal erreichten. Das deutet darauf hin, dass die direkte Aktivierung von Epac1-camps einen zusätzlichen artifiziellen Effekt verursacht, der nicht auf eine PDE-Hemmung zurückzuführen ist. Diese kann hingegen spezifisch mit den Epac2-camps-basierten Sensoren gemessen werden.

4 Diskussion

Sulfonylharnstoffe (SH) üben ihre antidiabetische Wirkung durch eine vermehrte Insulinfreisetzung in pankreatischen Inselzellen aus. Dies geschieht klassischerweise durch die Schließung des K-ATP-Kanals, die über die direkte Bindung einer Untereinheit, dem Sulfonylharnstoffrezeptor (SUR1), vermittelt wird. Hierdurch kommt es über einen Anstieg der intrazellulären Ca-Konzentration zu einer vermehrten Insulinfreisetzung (Ashcroft und Rorsman, 1989; Sturgess et al., 1985). Sowohl in gesunden wie auch in kranken Inselzellen wird die Insulinsekretion durch die Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration über bisher zwei bekannte Effektoren verstärkt, der cAMP-abhängigen Proteinkinase (PKA) und dem Exchange protein directly activated by cAMP (Epac) (Holz, 2004).

Die SUR1-Untereinheit wird bis heute als der bedeutendste Rezeptor für SH angesehen. Jedoch deuteten bereits frühe Arbeiten auf die Existenz mutmaßlicher weiterer SH-Rezeptoren hin. Bereits Anfang der 90er Jahre konnte anhand von Bindungsassays mit radioaktiven SH die Existenz von Bindestellen mit hoher Affinität, die später dem SUR1 zugewiesen wurden, und weiteren mit niedriger Affinität nachgewiesen werden (Nelson et al., 1992). Die Beobachtung, dass SH die Insulinsekretion ohne eine Veränderung des Membranpotentials stimulieren können, führte zu der Annahme, dass weitere SH-bindende Proteine existieren (Eliasson et al., 1996). So konnten Renstrom et al. zeigen, dass auch auf Insulin enthaltenden Granula SH-Rezeptoren zu finden sind, die auch gSUR (granular SUR) genannt werden (Renstrom et al., 2002).

Weiterhin zeigten kürzlich publizierte Daten, dass SH auch Epac2 aktivieren können (Zhang et al., 2009). Die Bindung von cAMP führt zu einer großen Konformationsänderung, die die katalytische Domäne von Epac freilegt (Rehmann et al., 2008; Rehmann et al., 2006). Durch cAMP aktiviert agiert Epac als Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor (GEF) für die kleinen G-Proteine Rap1 und Rap2 (Holz, 2004;

Vetter und Wittinghofer, 2001). In pankreatischen Inselzellen wird überwiegend Epac2 exprimiert (Leech et al., 2000).

Die erste Verbindung, die zwischen Epac2 und der Insulinsekretion hergestellt wurde, beruht auf der Beobachtung einer Interaktion von Epac mit SUR1 und Rim1/Rim2 (Kashima et al., 2001; Ozaki et al., 2000). Rim1 wurde in Verbindung mit dem kleinen G-Protein Rab3 im Zusammenhang mit der Regulation von Vesikelfusion beschrieben (Wang et al., 1997).

In Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass Epac2 eine wesentliche Rolle in der Insulinsekretion spielt. So zeigten Epac2-knockout-Mäuse (Epac2 $-/-$) nach Behandlung mit Glukose und SH oder SH allein eine deutlich reduzierte Insulinsekretion und folglich deutlich erhöhte Glukosekonzentrationen. Dies führte die Autoren zu der Annahme, dass für eine maximale Wirkung von SH die Bindung sowohl an den SUR1 als auch an Epac2 benötigt wird (Zhang et al., 2009).

Während die alleinige Wirkung von Epac2 auf die Insulinsekretion durch die Beobachtung in Frage gestellt werden kann, dass in SUR1 $(-/-)$ -Mäusen SH zu keiner messbaren Insulinsekretion führen (Seghers et al., 2000), ist die cAMP-abhängige Insulinsekretion wesentlich beeinträchtigt (Eliasson et al., 2003).

Zhang et al. konnten feststellen, dass SH direkt an Epac2 binden und es als Rap-GEF aktivieren; diese Erkenntnisse wurden von Herbst et al. (Herbst et al., 2011) bestätigt, von Tsalkova et al. (Tsalkova et al., 2011) jedoch bezweifelt. Zhang et al. verwendeten einen auf Epac2 basierenden FRET-Sensor, der in COS-Zellen exprimiert wurde. Die Zugabe von SH führte zu einer deutlichen Änderung der FRET-Ratio, vergleichbar mit der Zugabe eines cAMP-Analogons. Diese Ergebnisse konnten von Herbst reproduziert werden. Weiter führte die Zugabe von SH zu den Zellen zu einem Anstieg der Rap-GTP-Konzentration. Diese Beobachtungen konnten mit radioaktiv markierten SH, die an COS-Zellen mit überexprimiertem

Epac2 oder SUR1 binden, weiter bekräftigt werden. Diese Beobachtungen konnten von Herbst et al. untermauert werden, die einen aufgereinigten (Ni^{2+} -Affinitätschromatographie) Epac2-basierten FRET-Sensor *in vitro* verwendeten. Die Zugabe von SH führte ebenfalls zu einer FRET-Antwort.

Weiterhin führte die o.g. Zugabe des cAMP-Analogons (8-Br-cAMP) zwar zu einer Aktivierung von Epac2, allerdings konnte keine Konkurrenz zu Glibenclamid bei gleichzeitiger Gabe festgestellt werden, so dass eine unterschiedliche Bindungsstelle postuliert wurde. Diese Bindungsstelle konnte durch eine Mutation in Epac2 (R447), die den beobachteten Effekt nach Zugabe von SH aufhebt, genauer identifiziert werden (Herbst et al., 2011). Diese Schlussfolgerungen wurden durch Tsalkova et al. aufgrund folgender Beobachtungen angezweifelt: Zum einen konnten SH im Gegensatz zu cAMP in einem *in vitro*-Assay mit Epac2 und ein mit einem fluoreszierendem GDP-Analogon versetztes Rap1 keine Aktivierung herbeiführen. Weiterhin konnte anhand ITC (Isotherme Titrationskalorimetrie), bei der die Enthalpieänderung (ΔH) während der Zusammenführung von zwei Molekülen gemessen wird, keine Interaktion von SH und Epac2 gemessen werden (Tsalkova 2011).

Tsalkova et al. bemängeln zurecht, dass sowohl eine FRET-Änderung in COS-Zellen mit Epac2-basiertem Sensor als auch der Anstieg von RapGTP keine indirekte Aktivierung von Epac und Rap ausschließen. Als möglicher Mechanismus wird eine indirekte Aktivierung durch eine cAMP-Erhöhung genannt (Rehmann, 2012; Tsalkova et al., 2011), da SH dafür bekannt sind, die Wirkung von Phosphodiesterasen (PDE) zu beeinträchtigen, obwohl noch unklar ist, wie relevant diese Effekte unter physiologischen Bedingungen sind.

Es konnte bereits 1971 gezeigt werden, dass Tolbutamid verschiedene PDE hemmen (Brooker und Fichman, 1971; Goldfine et al., 1971) und auf diese Weise möglicherweise die Konzentration von cAMP erhöhen kann. Diese Implikationen sind

auch von hoher Relevanz für die physiologische Insulinsekretion, da PDE3B als wichtiges regulatorisches Enzym der Insulinsekretion identifiziert werden konnte (Harndahl et al., 2002). Dies wird dadurch unterstützt, dass in INS-1-Zellen die Zugabe von Tolbutamid und IBMX jeweils allein bereits zu einer dosisabhängigen FRET-Antwort führt (Holz et al., 2015), wobei hier für Tolbutamid nicht zwischen einer Epac-Aktivierung und einer PDE-Hemmung unterschieden werden kann.

In dieser Arbeit wurden verschiedene FRET-basierte Sensoren verwendet, um die spezifischen Einflüsse der SH auf verschiedene Epac-Varianten und die verschiedenen Isoformen der PDE zu untersuchen. Dafür wurden in dieser Arbeit weitere Sensoren (CFP-Epac2-YFP, Epac1-camps-PDE3B, Epac2-camps-PDE3B, Epac2-camps-PDE4A1) konstruiert und bereits vorhandene Sensoren (CFP-Epac1dDEP-YFP, Epac1-camps, Epac1-camps-PDE3A, Epac1-camps-PDE4A1, Epac2-camps-PDE3B, Epac1-campsR279E, Epac2A, Epac2-camps (long) und Epac2-camps (superlong) verwendet.

Um eine direkte Aktivierung von SH auf Epac1 und Epac2 zu untersuchen, wurden zunächst die Sensoren Epac2-camps und Epac1-camps mit gereinigtem Sensorprotein aus Sf9-Zellen bzw. aus Zelllysaten aus transfizierten HEK293T-Zellen photometrisch getestet. Weder Tolbutamid (TOL) noch Glibenclamid (GLB) führen in Epac2-camps zu einer signifikanten Änderung der FRET-Ratio (Abbildung 11), was zunächst die Annahme von Tsalkova et al. unterstützt, dass keine direkte Aktivierung von Epac2 stattfindet. Eine indirekte Aktivierung wie zum Beispiel durch eine indirekte Erhöhung der cAMP-Konzentration durch eine mögliche PDE-Hemmung ist in diesem Versuchsaufbau mit gereinigtem Sensor aus Sf9-Insektenzellen nicht denkbar. Eine weitere mögliche Erklärung könnte allerdings auch eine abweichende Bindestelle für SH in Epac2 erbringen, die sich bezüglich der Lokalisation unterscheidet und in Epac2-camps (E285 – E443) nicht enthalten ist. Ebenfalls wurde postuliert, dass diese Aktivierung spezifisch für Epac2 gegenüber Epac1 ist, da die Zugabe von SH in Zellen mit Epac1-Sensoren keine Änderung der

FRET-Ratio zur Folge hatte. Da die suggerierte Bindestelle für SH im Epac2-Protein auch im Epac1-Protein vorhanden ist, wurden weitere Interaktionen im Epac2-Protein als Ursache für eine Aktivierung als möglich erachtet (Herbst et al., 2011). Im Gegensatz dazu konnten photometrische Versuche mit Epac1-camps (Abbildung 12) zeigen, dass auch hier eine Aktivierung durch Tolbutamid stattfindet, was zunächst suggeriert, dass weitere Mechanismen als die beschriebene Bindung an R447 existieren. Die Größe der FRET-Änderung hingegen ist deutlich geringer ausgeprägt als durch cAMP. Demgegenüber postulierten Takahashi et al. anhand von Docking-Simulationen und FRET-Experimenten, dass die Bindestelle A für die Bindung von SH wichtig ist und SH und cAMP gemeinsam Epac und die Bindung an cNBD-A und cNBD-B aktivieren.

Versuche mit den Epac2-Sensoren in lebenden HEK293T-Zellen zeigten ähnliche Ergebnisse. So führt die Zugabe von SH in Epac2-camps exprimierenden Zellen zu keiner Sensoraktivierung (Abbildung 13). Auch sehr hohe Konzentrationen von Tolbutamid (2 mM) führen dabei zu keiner Änderung der FRET-Ratio (Abbildung 14), was dafürspricht, dass wie in den photometrischen Versuchen bereits gezeigt keine direkte Aktivierung im Bereich der cAMP-Bindestelle und keine indirekte cAMP-abhängige Aktivierung stattfindet.

In Zellen mit dem Sensor CFP-Epac2-YFP, der im Gegensatz zu Epac2-camps das gesamte Epac2-Protein anstatt nur der cAMP-Bindedomäne B enthält, führt Tolbutamid allein bereits zu einer starken Aktivierung des Sensors (Abbildung 13), was die Annahmen von Zhang et al. und Herbst et al. unterstützt, dass eine direkte Aktivierung außerhalb der cAMP-Bindedomäne B verursacht werden könnte. Auch führt der Einsatz von Tolbutamid bei dem Sensor mit dem langen Epac1-Protein (CFP-Epac1dDEP-YFP) zu keiner FRET-Änderung. Erst eine starke Erhöhung der cAMP-Konzentration durch Isoproterenol (Iso) führt zu einer Aktivierung des Sensors (Abbildung 13). Zellen, die Epac1-camps, also den Sensor mit

lediglich einer Bindedomäne exprimieren, zeigen durch SH eine deutliche Sensoraktivierung (Abbildung 13), analog zu den photometrischen Messungen (geringe Aktivierung) *in vitro* mit Epac1-camps.

In zusätzlichen Versuchen mit einer Epac1-Variante, die durch eine R279E-Mutation in der Epac1-Sequenz nicht durch cAMP aktiviert werden kann (Nikolaev et al., 2004) und mit einer weiteren Variante des Epac2-Sensors, der nur die Bindedomäne A aufweist (Epac2A), war jeweils keine Reaktion zu sehen (Abbildung 17). Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass SH bei Epac1-camps in der Nähe der cAMP-Bindungsstelle binden und eine Konformationsänderung hervorrufen, die aber für die physiologische Epac-Aktivierung keine Bedeutung hat, weil der lange Epac1(δ DEP)-Sensor nicht aktiviert wird. Bei dem sich gegensätzlich verhaltenden Sensor mit Epac2 lag zum Zeitpunkt der Entstehung dieser Arbeit keine entsprechende Mutante des Sensors vor. Mit einem solchen Sensor könnte diese Fragestellung weiter geklärt werden. Die Verwendung weiterer Sensoren mit verschiedenen Varianten von Epac2 zeigen einen entscheidenden Hinweis. Dafür wurden mit Epac2-camps (long) und Epac2-camps (superlong) zwei weitere Varianten von Epac2-camps (E285-Q454), die über die cAMP-Bindedomäne B hinaus noch weitere 11 (long) bzw. 17 (superlong) Aminosäuren aus Epac2 enthalten. Während Epac2A, das lediglich die Bindedomäne A aus Epac2 enthält, keine Wirkung auf SH zeigt, zeigte Epac2-camps (long) nach Zugabe von Tolbutamid eine Veränderung der Sensoraktivität im Sinne einer „instabilen“ Kurve der FRET-Ratio und Epac2-camps (superlong) eine deutliche Aktivierung im Sinne einer Zunahme der FRET-Ratio (Abbildung 18), wodurch eine direkte Aktivierung insgesamt sehr wahrscheinlich erscheint und eine Bindestelle für SH, die sich von denen von cAMP unterscheidet, weiter eingengt werden konnte (im näheren Bereich von Q454 bzw. E460, siehe Abbildung 16).

Der durch Tsalkova et al. suggerierte Mechanismus einer indirekten Aktivierung durch eine basale cAMP-Erhöhung war eine weitere Fragestellung dieser Arbeit. Zunächst konnte in Epac2-camps exprimierenden HEK-Zellen keine Aktivierung durch SH hervorgerufen werden, obwohl dieser eine deutlich höhere Sensitivität für ansteigenden cAMP-Konzentrationen aufweist als die anderen Sensoren mit den längeren Epac2-Varianten, bei denen SH stets eine Aktivierung auslösen konnten. Auch der Einsatz von PDE-Inhibitoren (Rolipram und IBMX) führte im Gegensatz zu Tolbutamid sowohl bei Epac1-camps als auch bei Epac2-camps zu keiner Änderung der FRET-Ratio (Abbildung 15). Aufgrund dieser Ergebnisse ist nicht von einer indirekten Aktivierung durch eine cAMP-Erhöhung, die durch die PDE-Hemmung hervorgerufen würde, auszugehen. Da jedoch ohne β -adrenerge Stimulation (Isoprenalin) in HEK293T-Zellen trotz PDE-Inhibition niedrige basale cAMP-Konzentrationen zu erwarten sind und auch die bekannten PDE-Inhibitoren keine relevante Sensoraktivierung zeigten, ist somit die grundsätzliche Fähigkeit der SH, PDE zu beeinflussen, keineswegs geklärt. Es konnte lediglich ausgeschlossen werden, dass dies den einzigen Mechanismus einer Epac-Aktivierung darstellt.

Daher wurden weitere Sensoren konstruiert bzw. verwendet, um die PDE-Aktivität und die Beeinflussung durch SH weiter zu untersuchen. Zunächst verwendeten wir den bereits von Herget et al. etablierten Sensor PDE4A1-Epac1-camps, der durch die Fusion eines cAMP-Sensors und einer aktiven (kurzen) Isoform von PDE4A1 am C-terminalen Ende entstand (Herget et al., 2008) und sich durch rasche Änderung der FRET-Ratio als sensibler Sensor für selektive (Rolipram) und unselektive (IBMX) PDE-Hemmer bewährt hat. Da Cilostamid und Sildefanil nach β -adrenerger Stimulation keine FRET-Änderung hervorrufen konnten, wurde diesem Sensor auch eine hohe Selektivität zugesprochen.

Herget et al. konnten mit PDE4A eine IC_{50} von 21 ± 1 nM für Rolipram und eine mit PDE3A1 eine IC_{50} von 0.37 ± 0.05 μ M für Cilostamid zeigen (Herget et al., 2008). Auch SH zeigen eine effektive PDE-Hemmung. Durch Tolbutamid (300 μ M) war eine rasche Änderung der FRET-Ratio mit einer IC_{50} von $\sim 0,75$ mM (PDE4A) bzw. 1,15 mM (PDE3A) zu erkennen.

Da PDE3B die überwiegende PDE-Isoform in Inselzellen darstellt und der Mechanismus der Insulinsekretion weiter charakterisiert werden soll, wurde ein weiterer Sensor konstruiert, Epac1-camps-PDE3B. Auch hier konnte eine rasche Änderung der FRET-Ratio nach Applikation von Tolbutamid festgestellt werden, die bei einer sehr hohen Konzentration (2 mM) mit der maximalen Wirkung von Cilostamid vergleichbar war (IC_{50} von TOL betrug ca. 1,06 mM, so dass an dieser Stelle bereits von einer eher unselektiven PDE-Hemmung durch SH auszugehen ist.

Da in dieser Arbeit auch Epac1-camps unerwartet auf SH reagiert hat, konnte an dieser Stelle eine reine PDE-Hemmung durch Tolbutamid nicht sicher dargestellt werden, da die bisher verwendeten Sensoren Epac1-camps enthalten und eine Mischaktivierung vorliegen könnte. Zwar kann der Sensor nicht durch einen Anstieg von cAMP und somit eine Aktivierung von Epac1-camps aktiviert werden; das könnte laut Herget et al. z.B. aber auch dadurch erklärt werden, dass cAMP durch eine sehr hohe basale Aktivität von PDE4A1 schneller zu AMP degradiert werden kann, bevor es den Sensor aktiviert. Zumindest dieser Erklärungsansatz lässt sich aber nicht auf Tolbutamid übertragen, welches nicht durch die PDE abgebaut werden kann und über den Versuchszeitraum eine stabile Wirkung haben sollte. Daher wurden weitere Sensoren konstruiert, die auf den Sensor Epac2-camps basieren, der sowohl photometrisch (*in vitro*) als auch in lebenden Zellen nicht durch SH, aber durch cAMP aktiviert werden kann.

Sowohl Epac2-camps-PDE4A1 als auch Epac2-camps-PDE3B zeigten vergleichbar zu den Sensoren von Herget et al. keine Wirkung auf cAMP, aber eine deutliche

Wirkung sowohl nach Zugabe des SH, als auch auf seinen selektiven Hemmstoff (Rolipram bzw. Cilostamid). Hierbei ergaben sich IC_{50} -Werte für Tolbutamid von $\sim 0,3$ mM (PDE4A1) bzw. $0,5$ mM (PDE3B), so dass hier von einer klaren und zumindest für die Isoformen 3 und 4 unselektiven PDE-Hemmung für SH auszugehen ist.

Dadurch ergeben sich einige (klinisch relevante) Implikationen. Zunächst muss davon ausgegangen werden, dass neben der direkten Epac-Aktivierung auch eine direkte Hemmung der PDE einen wichtigen Mechanismus für die Sekretion von Insulin darstellt. Ausgehend von effektiven Tolbutamidspiegeln im Patientenserum von ca. 100 $\mu\text{g/ml}$ (Adir et al., 1982; Crooks und Brown, 1974) bei bereits beginnenden Dosierungen von Tolbutamid und davon ausgehend, dass höhere klinisch zugelassene Dosierungen oder die Anwendung bei Patienten mit einer verminderten Elimination aufgrund eines erhöhten Alters oder einer renalen Insuffizienz zu erwarten sind, sind in der Klinik noch höhere Konzentrationen zu erwarten. Dies entspricht Tolbutamidkonzentrationen von 370 mmol/l und höher. Das sind Werte, bei denen bereits eine deutliche Hemmung festgestellt werden konnte (z.B. betrug der IC_{50} -Wert von Tolbutamid bei Epac2-camps-PDE3B $\sim 0,5\text{mM}$), so dass von einer deutlichen PDE-Hemmung auszugehen ist, die eine relevante Beteiligung an der Insulinsekretion erkennen lässt. Daneben ergeben sich hier weitere, möglicherweise bisher nicht beschriebene Nebenwirkungen. Proteine der Epac-Familie sind in hohem Maße an der Regulation vieler Zellfunktionen beteiligt. In Herzmuskelzellen ist Epac2 maßgeblich an der Entstehung von β_1 -adrenergen Arrhythmien im Zusammenhang mit einem Kalzium-Leck beteiligt (Pereira et al., 2013). Herget et al. geben z.B. für Milrinon, einem häufig verwendeten Inotropikum, einen IC_{50} von $7,0$ μM an; bei therapeutischen Spiegeln von 100 bis 300 ng/mg , was bei einem Molekulargewicht von 211 g/mol einer Plasmakonzentration von $0,5$ - $1,5$ $\mu\text{M/ml}$ entspricht, muss hier bei eingeschränkter Vergleichbarkeit von relevanten Konzentrationen von SH bezogen auf kardiale

Wirkungen ausgegangen werden. Daraus kann angenommen werden, dass bei hohen therapeutischen Konzentrationen von SH kardiale Nebenwirkungen wie etwa Arrhythmien, die heutzutage als eine Ursache für die Erhöhung der nachgewiesenen Mortalität für Milrinon bei therapeutischer Anwendung angesehen wird, auftreten können. (Cohn et al., 1998; Packer et al., 1991; Smith et al., 2011). Zusammenfassend lassen die Ergebnisse dieser Arbeit darauf schließen, dass SH in therapeutischen Konzentrationen, außer durch eine noch weitgehend umstrittene direkte Epac2-Aktivierung, durch direkte PDE3- und PDE4-Hemmung zur intrazellulären cAMP-Konzentrationserhöhung beitragen können. Dies könnte u.U. nicht nur für therapeutische, sondern auch für unerwünschte Wirkungen von SH von Bedeutung sein.

5 Zusammenfassung

Diabetes mellitus ist die häufigste Stoffwechselerkrankung in Deutschland. Sulfonylharnstoffe (SH) stellen die älteste und eine sehr prominente Gruppe in der oralen Therapie des Diabetes mellitus Typ II dar, die eine verstärkte Insulinfreisetzung vorrangig durch die Hemmung eines ATP-sensitiven Kaliumkanals (K⁺ATP-Kanal) erreichen. Daneben konnten weitere Proteine identifiziert werden, die mit SH interagieren und zu deren Effekten beitragen. Während bereits in frühen Arbeiten gezeigt werden konnte, dass SH Vertreter der Phosphodiesterasen (PDE)-Familie in ihrer Funktion behindern können, wurde kürzlich Epac2 (exchange protein directly activated by cAMP 2) als weiteres Zielprotein für SH angeführt. Insbesondere die Fähigkeit von SH, direkt an Epac2 zu binden, wird in der Literatur kontrovers diskutiert und eine indirekte Aktivierung durch eine PDE-Hemmung und einen erhöhten cAMP-Spiegel als Mechanismus vermutet. Zur weiteren Untersuchung wurden in dieser Arbeit FRET-basierte Biosensoren verwendet, um die Wirkung von SH auf Epac und PDEs näher zu untersuchen.

Dabei konnte sowohl in einem photometrischen Ansatz als auch in lebenden Zellen, die einen Epac2-basierten Sensor enthalten, gezeigt werden, dass eine Aktivierung durch SH stattfindet. Da sowohl Epac2-camps, der von allen hier verwendeten Sensoren mit der höchsten Sensitivität für cAMP, als auch CFP-Epac1 δ DEP-YFP nicht auf SH reagieren, ist diese Aktivierung selektiv für die Isoform Epac2 und wird vorrangig nicht durch eine PDE-Hemmung verursacht. Die Verwendung weiterer Sensoren mit verschiedenen Varianten von Epac2 (verlängerte Version von Epac2-camps) zeigen mit zunehmender Länge über die cAMP-Bindedomäne hinaus eine beginnende Reaktion im Sinne einer instabilen FRET-Kurve (Epac2-camps long) bzw. eine deutliche Aktivierung durch den SH (Epac2-camps super-long), wodurch eine direkte Aktivierung bestätigt wird, und suggerieren eine Bindestelle für SH, die sich von denen von cAMP unterscheidet und weiter eingeeignet werden konnte (im näheren Bereich von Q454 bzw. E460).

Obwohl hierdurch eine direkte Aktivierung gezeigt werden konnte, ist die grundsätzliche Fähigkeit der SH, PDE zu beeinflussen, keineswegs geklärt. Daher wurden weitere Sensoren konstruiert bzw. verwendet, die basierend auf Epac1-camps und Epac2-camps verschiedene PDEs enthalten. Dabei konnte durch die Zugabe von SH eine deutliche Aktivierung des jeweiligen Sensors und somit eine PDE-Hemmung nachgewiesen werden. Dies konnte sowohl für PDE4A als auch für die in Inselzellen überwiegend vorkommende PDE3B gezeigt werden.

Dadurch ergeben sich einige (klinisch relevante) Implikationen. Zum einen stellt neben der direkten Epac-Aktivierung auch die direkte Hemmung der PDE einen wichtigen Mechanismus für die Sekretion von Insulin dar. Außerdem sind bei PDE-Hemmung und direkter Epac-Aktivierung außerhalb der Inselzellen auch Nebenwirkungen in anderen Organen zu erwarten wie z.B. die Entstehung lebensgefährlicher Rhythmusstörungen in Herzmuskelzellen.

6 Literaturverzeichnis

- Adir, J., Miller, A.K., und Vestal, R.E. (1982). Effects of total plasma concentration and age on tolbutamide plasma protein binding. *Clin Pharmacol Ther* 31, 488-493.
- Ahlqvist, E., Storm, P., Karajamaki, A., Martinell, M., Dorkhan, M., Carlsson, A., Vikman, P., Prasad, R.B., Aly, D.M., Almgren, P., *et al.* (2018). Novel subgroups of adult-onset diabetes and their association with outcomes: a data-driven cluster analysis of six variables. *Lancet Diabetes Endocrinol* 6, 361-369.
- Almahariq, M., Chao, C., Mei, F.C., Hellmich, M.R., Patrikeev, I., Motamedi, M., und Cheng, X. (2015). Pharmacological inhibition and genetic knockdown of exchange protein directly activated by cAMP 1 reduce pancreatic cancer metastasis in vivo. *Molecular pharmacology* 87, 142-149.
- American Diabetes Association, A. (2007). Standards of Medical Care in Diabetes—2007. *Diabetes Care* 30, S4-S41.
- Ashcroft, F.M., und Rorsman, P. (1989). Electrophysiology of the pancreatic beta-cell. *Progress in biophysics and molecular biology* 54, 87-143.
- Beavo, J.A., Conti, M., und Heaslip, R.J. (1994). Multiple cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Molecular pharmacology* 46, 399-405.
- Berisha, F., und Nikolaev, V.O. (2017). Cyclic nucleotide imaging and cardiovascular disease. *Pharmacol Ther* 175, 107-115.
- Börner, S., Schwede, F., Schlipp, A., Berisha, F., Calebiro, D., Lohse, M.J., und Nikolaev, V.O. (2011). FRET measurements of intracellular cAMP concentrations and cAMP analog permeability in intact cells. *Nature protocols* 6, 427-438.
- Bos, J.L. (2003). Epac: a new cAMP target and new avenues in cAMP research. *Nature reviews Molecular cell biology* 4, 733-738.
- Brooker, G., und Fichman, M. (1971). Chlorpropamide and tolbutamide inhibition of adenosine 3'5' cyclic monophosphate phosphodiesterase. *Biochem Biophys Res Commun* 42, 824-828.

- Brownlee, M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* *414*, 813-820.
- Bucala, R., und Cerami, A. (1992). Advanced glycosylation: chemistry, biology, and implications for diabetes and aging. *Adv Pharmacol* *23*, 1-34.
- Burcelin, R. (2014). The antidiabetic gutsy role of metformin uncovered? *Gut* *63*, 706-707.
- Butler, A.E., Campbell-Thompson, M., Gurlo, T., Dawson, D.W., Atkinson, M., und Butler, P.C. (2013). Marked expansion of exocrine and endocrine pancreas with incretin therapy in humans with increased exocrine pancreas dysplasia and the potential for glucagon-producing neuroendocrine tumors. *Diabetes* *62*, 2595-2604.
- Cantor, A.B., Krischer, J.P., Cuthbertson, D.D., Schatz, D.A., Riley, W.J., Malone, J., Schwartz, S., Quattrin, T., und Maclaren, N.K. (1995). Age and family relationship accentuate the risk of insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) in relatives of patients with IDDM. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* *80*, 3739-3743.
- Chen, X., Yang, L., und Zhai, S.D. (2012). Risk of cardiovascular disease and all-cause mortality among diabetic patients prescribed rosiglitazone or pioglitazone: a meta-analysis of retrospective cohort studies. *Chin Med J (Engl)* *125*, 4301-4306.
- Chiasson, J.L., Aris-Jilwan, N., Belanger, R., Bertrand, S., Beaugard, H., Ekoe, J.M., Fournier, H., und Havrankova, J. (2003). Diagnosis and treatment of diabetic ketoacidosis and the hyperglycemic hyperosmolar state. *CMAJ* *168*, 859-866.
- Chu, C.H., Lee, J.K., Lam, H.C., und Lu, C.C. (2001). Prognostic factors of hyperglycemic hyperosmolar nonketotic state. *Chang Gung Med J* *24*, 345-351.
- Cohn, J.N., Goldstein, S.O., Greenberg, B.H., Lorell, B.H., Bourge, R.C., Jaski, B.E., Gottlieb, S.O., McGrew, F., 3rd, DeMets, D.L., und White, B.G. (1998). A dose-dependent increase in mortality with vesnarinone among patients with severe heart failure. Vesnarinone Trial Investigators. *The New England journal of medicine* *339*, 1810-1816.
- Conti, M., und Beavo, J. (2007). Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling. *Annual review of biochemistry* *76*, 481-511.

- Crooks, M.J., und Brown, K.F. (1974). The binding of sulphonylureas to serum albumin. *J Pharm Pharmacol* 26, 304-311.
- Cryer, P.E., Axelrod, L., Grossman, A.B., Heller, S.R., Montori, V.M., Seaquist, E.R., Service, F.J., und Endocrine, S. (2009). Evaluation and management of adult hypoglycemic disorders: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 94, 709-728.
- de Rooij, J., Rehmann, H., van Triest, M., Cool, R.H., Wittinghofer, A., und Bos, J.L. (2000). Mechanism of regulation of the Epac family of cAMP-dependent RapGEFs. *J Biol Chem* 275, 20829-20836.
- de Rooij, J., Zwartkruis, F.J., Verheijen, M.H., Cool, R.H., Nijman, S.M., Wittinghofer, A., und Bos, J.L. (1998). Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature* 396, 474-477.
- DeFronzo, R.A. (1999). Pharmacologic therapy for type 2 diabetes mellitus. *Annals of internal medicine* 131, 281-303.
- Dietel, M., und Fauci, A.S. (2009). *Harrisons Innere Medizin* (McGraw-Hill).
- Drucker, D.J., und Nauck, M.A. (2006). The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *Lancet* (London, England) 368, 1696-1705.
- Eliasson, L., Ma, X., Renstrom, E., Barg, S., Berggren, P.O., Galvanovskis, J., Gromada, J., Jing, X., Lundquist, I., Salehi, A., *et al.* (2003). SUR1 regulates PKA-independent cAMP-induced granule priming in mouse pancreatic B-cells. *J Gen Physiol* 121, 181-197.
- Eliasson, L., Renstrom, E., Ammala, C., Berggren, P.O., Bertorello, A.M., Bokvist, K., Chibalin, A., Deeney, J.T., Flatt, P.R., Gabel, J., *et al.* (1996). PKC-dependent stimulation of exocytosis by sulphonylureas in pancreatic beta cells. *Science* 271, 813-815.
- Fauci, A.S., Eugene, B., Hauser, S.L., Longo, D.L., J, J., und Joseph, L. (2008). *Harrison's principles of internal medicine* (McGraw-Hill).

- Fölsch, U.R., Kochsiek, K., und Schmidt, R.F. (2000). Pathophysiologie (Berlin: Springer).
- Förster, T. (1948). Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik* 437, 55-75.
- Francis, S.H., Blount, M.A., und Corbin, J.D. (2011). Mammalian cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular mechanisms and physiological functions. *Physiological reviews* 91, 651-690.
- Fujitsuka, M., Cho, D.W., Shiragami, T., Yasuda, M., und Majima, T. (2006). Intramolecular electron transfer from axial ligand to S₂-excited Sb-tetraphenylporphyrin. *The journal of physical chemistry B* 110, 9368-9370.
- Gardner, D., und Shoback, D. (2011). Greenspan's Basic and Clinical Endocrinology, Ninth Edition (Mcgraw-hill).
- Gloerich, M., und Bos, J.L. (2010). Epac: defining a new mechanism for cAMP action. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 50, 355-375.
- Goldfine, I.D., Perlman, R., und Roth, J. (1971). Inhibition of cyclic 3',5'-AMP phosphodiesterase in islet cells and other tissues by tolbutamide. *Nature* 234, 295-297.
- Goldstein, D.E., Little, R.R., Lorenz, R.A., Malone, J.I., Nathan, D.M., Peterson, C.M., und American Diabetes, A. (2004). Tests of glycemia in diabetes. *Diabetes Care* 27 *Suppl 1*, S91-93.
- Gong, B., Shelite, T., Mei, F.C., Ha, T., Hu, Y., Xu, G., Chang, Q., Wakamiya, M., Ksiazek, T.G., Boor, P.J., *et al.* (2013). Exchange protein directly activated by cAMP plays a critical role in bacterial invasion during fatal rickettsioses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 19615-19620.
- Gribble, F.M., Tucker, S.J., Haug, T., und Ashcroft, F.M. (1998). MgATP activates the beta cell KATP channel by interaction with its SUR1 subunit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 7185-7190.
- Guellich, A., Mehel, H., und Fischmeister, R. (2014). Cyclic AMP synthesis and hydrolysis in the normal and failing heart. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 466, 1163-1175.

- Haffner, S.M., Lehto, S., Ronnema, T., Pyorala, K., und Laakso, M. (1998). Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *The New England journal of medicine* 339, 229-234.
- Harndahl, L., Jing, X.J., Ivarsson, R., Degerman, E., Ahren, B., Manganiello, V.C., Renstrom, E., und Holst, L.S. (2002). Important role of phosphodiesterase 3B for the stimulatory action of cAMP on pancreatic beta-cell exocytosis and release of insulin. *J Biol Chem* 277, 37446-37455.
- Haw, J.S., Galaviz, K.I., Straus, A.N., Kowalski, A.J., Magee, M.J., Weber, M.B., Wei, J., Narayan, K.M.V., und Ali, M.K. (2017). Long-term Sustainability of Diabetes Prevention Approaches: A Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Clinical Trials. *JAMA Intern Med* 177, 1808-1817.
- Hemmingsen, B., Schroll, J.B., Wetterslev, J., Gluud, C., Vaag, A., Sonne, D.P., Lundstrom, L.H., und Almdal, T. (2014). Sulfonylurea versus metformin monotherapy in patients with type 2 diabetes: a Cochrane systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials and trial sequential analysis. *CMAJ Open* 2, E162-175.
- Herbst, K.J., Coltharp, C., Amzel, L.M., und Zhang, J. (2011). Direct activation of Epac by sulfonylurea is isoform selective. *Chemistry & biology* 18, 243-251.
- Herget, S., Lohse, M.J., und Nikolaev, V.O. (2008). Real-time monitoring of phosphodiesterase inhibition in intact cells. *Cellular signalling* 20, 1423-1431.
- Holz, G., Leech, C., Roe, M., und Chepurny, O. (2015). High-Throughput FRET Assays for Fast Time-Dependent Detection of Cyclic AMP in Pancreatic β Cells. In *Cyclic Nucleotide Signaling* (CRC Press), pp. 35-60.
- Holz, G.G. (2004). Epac: A new cAMP-binding protein in support of glucagon-like peptide-1 receptor-mediated signal transduction in the pancreatic beta-cell. *Diabetes* 53, 5-13.
- Imagawa, A., Hanafusa, T., Miyagawa, J., und Matsuzawa, Y. (2000). A novel subtype of type 1 diabetes mellitus characterized by a rapid onset and an absence of diabetes-related antibodies. Osaka IDDM Study Group. *The New England journal of medicine* 342, 301-307.

- Inzucchi, S.E., Bergenstal, R.M., Buse, J.B., Diamant, M., Ferrannini, E., Nauck, M., Peters, A.L., Tsapas, A., Wender, R., und Matthews, D.R. (2015). Management of hyperglycaemia in type 2 diabetes, 2015: a patient-centred approach. Update to a position statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetologia* 58, 429-442.
- Jager, R., Russwurm, C., Schwede, F., Genieser, H.G., Koesling, D., und Russwurm, M. (2012). Activation of PDE10 and PDE11 phosphodiesterases. *J Biol Chem* 287, 1210-1219.
- Jares-Erijman, E.A., und Jovin, T.M. (2006). Imaging molecular interactions in living cells by FRET microscopy. *Current opinion in chemical biology* 10, 409-416.
- Kang, G., Chepurny, O.G., und Holz, G.G. (2001). cAMP-regulated guanine nucleotide exchange factor II (Epac2) mediates Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in INS-1 pancreatic beta-cells. *J Physiol* 536, 375-385.
- Kang, G., Chepurny, O.G., Malester, B., Rindler, M.J., Rehmann, H., Bos, J.L., Schwede, F., Coetzee, W.A., und Holz, G.G. (2006). cAMP sensor Epac as a determinant of ATP-sensitive potassium channel activity in human pancreatic beta cells and rat INS-1 cells. *J Physiol* 573, 595-609.
- Kang, G., Chepurny, O.G., Rindler, M.J., Collis, L., Chepurny, Z., Li, W.H., Harbeck, M., Roe, M.W., und Holz, G.G. (2005). A cAMP and Ca²⁺ coincidence detector in support of Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in mouse pancreatic beta cells. *J Physiol* 566, 173-188.
- Kang, G., Joseph, J.W., Chepurny, O.G., Monaco, M., Wheeler, M.B., Bos, J.L., Schwede, F., Genieser, H.G., und Holz, G.G. (2003). Epac-selective cAMP analog 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP as a stimulus for Ca²⁺-induced Ca²⁺ release and exocytosis in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* 278, 8279-8285.
- Kapoor, N., und Thomas, N. (2017). Oral antidiabetic agents: Recently available novel oral antidiabetic agents in India: A clinical review. *Current Medical Issues* 15, 169-176.
- Kashima, Y., Miki, T., Shibasaki, T., Ozaki, N., Miyazaki, M., Yano, H., und Seino, S. (2001). Critical role of cAMP-GEFII--Rim2 complex in incretin-potentiated insulin secretion. *J Biol Chem* 276, 46046-46053.

- Kawasaki, H., Springett, G.M., Mochizuki, N., Toki, S., Nakaya, M., Matsuda, M., Housman, D.E., and Graybiel, A.M. (1998). A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science* 282, 2275-2279.
- Kirpichnikov, D., McFarlane, S.I., and Sowers, J.R. (2002). Metformin: an update. *Annals of internal medicine* 137, 25-33.
- Kitabchi, A.E., Umpierrez, G.E., Miles, J.M., and Fisher, J.N. (2009). Hyperglycemic crises in adult patients with diabetes. *Diabetes Care* 32, 1335-1343.
- Kitayama, H., Sugimoto, Y., Matsuzaki, T., Ikawa, Y., and Noda, M. (1989). A ras-related gene with transformation suppressor activity. *Cell* 56, 77-84.
- Klein, R. (1995). Hyperglycemia and microvascular and macrovascular disease in diabetes. *Diabetes Care* 18, 258-268.
- Knowler, W.C., Barrett-Connor, E., Fowler, S.E., Hamman, R.F., Lachin, J.M., Walker, E.A., Nathan, D.M., and Diabetes Prevention Program Research, G. (2002). Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *The New England journal of medicine* 346, 393-403.
- Lee, K.A. (1991). Transcriptional regulation by cAMP. *Current opinion in cell biology* 3, 953-959.
- Leech, C.A., Holz, G.G., Chepurny, O., and Habener, J.F. (2000). Expression of cAMP-regulated guanine nucleotide exchange factors in pancreatic beta-cells. *Biochem Biophys Res Commun* 278, 44-47.
- Lin, Y., and Sun, Z. (2010). Current views on type 2 diabetes. *The Journal of endocrinology* 204, 1-11.
- Loubatieres-Mariani, M.M. (2007). [The discovery of hypoglycemic sulfonamides]. *Journal de la Societe de biologie* 201, 121-125.
- Madiraju, A.K., Erion, D.M., Rahimi, Y., Zhang, X.M., Braddock, D.T., Albright, R.A., Prigaro, B.J., Wood, J.L., Bhanot, S., MacDonald, M.J., *et al.* (2014). Metformin suppresses gluconeogenesis by inhibiting mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase. *Nature* 510, 542-546.

- Makam, A.N., und Nguyen, O.K. (2017). An Evidence-Based Medicine Approach to Antihyperglycemic Therapy in Diabetes Mellitus to Overcome Overtreatment. *Circulation* 135, 180-195.
- Mei, F.C., Qiao, J., Tsygankova, O.M., Meinkoth, J.L., Quilliam, L.A., und Cheng, X. (2002). Differential signaling of cyclic AMP: opposing effects of exchange protein directly activated by cyclic AMP and cAMP-dependent protein kinase on protein kinase B activation. *J Biol Chem* 277, 11497-11504.
- Melmed, S., Williams, R.H., Polonsky, K.S., Larsen, P.R., und Kronenberg, H.M. (2011). *Williams Textbook of Endocrinology* (Elsevier/Saunders).
- Metrich, M., Lucas, A., Gastineau, M., Samuel, J.L., Heymes, C., Morel, E., und Lezoualc'h, F. (2008). Epac mediates beta-adrenergic receptor-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Circulation research* 102, 959-965.
- Mottalib, A., Kasetty, M., Mar, J.Y., Elseaidy, T., Ashrafzadeh, S., und Hamdy, O. (2017). Weight Management in Patients with Type 1 Diabetes and Obesity. *Curr Diab Rep* 17, 92.
- Nelson, D.A., Aguilar-Bryan, L., und Bryan, J. (1992). Specificity of photolabeling of beta-cell membrane proteins with an 125I-labeled glyburide analog. *J Biol Chem* 267, 14928-14933.
- Newman, B., Selby, J.V., King, M.C., Slemenda, C., Fabsitz, R., und Friedman, G.D. (1987). Concordance for type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in male twins. *Diabetologia* 30, 763-768.
- Nichols, C.G., Shyng, S.L., Nestorowicz, A., Glaser, B., Clement, J.P.t., Gonzalez, G., Aguilar-Bryan, L., Permutt, M.A., und Bryan, J. (1996). Adenosine diphosphate as an intracellular regulator of insulin secretion. *Science* 272, 1785-1787.
- Nikolaev, V.O., Bunemann, M., Hein, L., Hannawacker, A., und Lohse, M.J. (2004). Novel single chain cAMP sensors for receptor-induced signal propagation. *J Biol Chem* 279, 37215-37218.
- Nikolaev, V.O., und Lohse, M.J. (2006). Monitoring of cAMP synthesis and degradation in living cells. *Physiology* 21, 86-92.

- Nissen, S.E., und Wolski, K. (2007). Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes. *The New England journal of medicine* 356, 2457-2471.
- Norris, R.P., Ratzan, W.J., Freudzon, M., Mehlmann, L.M., Krall, J., Movsesian, M.A., Wang, H., Ke, H., Nikolaev, V.O., und Jaffe, L.A. (2009). Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte. *Development* 136, 1869-1878.
- Okumura, S., Fujita, T., Cai, W., Jin, M., Namekata, I., Mototani, Y., Jin, H., Ohnuki, Y., Tsuneoka, Y., Kurotani, R., *et al.* (2014). Epac1-dependent phospholamban phosphorylation mediates the cardiac response to stresses. *J Clin Invest* 124, 2785-2801.
- Ormo, M., Cubitt, A.B., Kallio, K., Gross, L.A., Tsien, R.Y., und Remington, S.J. (1996). Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science* 273, 1392-1395.
- Ozaki, N., Shibasaki, T., Kashima, Y., Miki, T., Takahashi, K., Ueno, H., Sunaga, Y., Yano, H., Matsuura, Y., Iwanaga, T., *et al.* (2000). cAMP-GEFII is a direct target of cAMP in regulated exocytosis. *Nat Cell Biol* 2, 805-811.
- Packer, M., Carver, J.R., Rodeheffer, R.J., Ivanhoe, R.J., DiBianco, R., Zeldis, S.M., Hendrix, G.H., Bommer, W.J., Elkayam, U., Kukin, M.L., *et al.* (1991). Effect of oral milrinone on mortality in severe chronic heart failure. The PROMISE Study Research Group. *The New England journal of medicine* 325, 1468-1475.
- Pereira, L., Cheng, H., Lao, D.H., Na, L., van Oort, R.J., Brown, J.H., Wehrens, X.H., Chen, J., und Bers, D.M. (2013). Epac2 mediates cardiac beta1-adrenergic-dependent sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak and arrhythmia. *Circulation* 127, 913-922.
- Polonsky, K.S., Sturis, J., und Bell, G.I. (1996). Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Non-insulin-dependent diabetes mellitus - a genetically programmed failure of the beta cell to compensate for insulin resistance. *The New England journal of medicine* 334, 777-783.
- Proks, P., und Ashcroft, F.M. (2009). Modeling K(ATP) channel gating and its regulation. *Progress in biophysics and molecular biology* 99, 7-19.

- Qaseem, A., Vijan, S., Snow, V., Cross, J.T., Weiss, K.B., Owens, D.K., und Clinical Efficacy Assessment Subcommittee of the American College of, P. (2007). Glycemic control and type 2 diabetes mellitus: the optimal hemoglobin A1c targets. A guidance statement from the American College of Physicians. *Annals of internal medicine* *147*, 417-422.
- Qaseem, A., Wilt, T.J., Kansagara, D., Horwitch, C., Barry, M.J., Forciea, M.A., und Clinical Guidelines Committee of the American College of, P. (2018). Hemoglobin A1c Targets for Glycemic Control With Pharmacologic Therapy for Nonpregnant Adults With Type 2 Diabetes Mellitus: A Guidance Statement Update From the American College of Physicians. *Annals of internal medicine* *168*, 569-576.
- Qiao, J., Mei, F.C., Popov, V.L., Vergara, L.A., und Cheng, X. (2002). Cell cycle-dependent subcellular localization of exchange factor directly activated by cAMP. *J Biol Chem* *277*, 26581-26586.
- Rados, D.V., Pinto, L.C., Remonti, L.R., Leitao, C.B., und Gross, J.L. (2016). Correction: The Association between Sulfonylurea Use and All-Cause and Cardiovascular Mortality: A Meta-Analysis with Trial Sequential Analysis of Randomized Clinical Trials. *PLoS Med* *13*, e1002091.
- Rang, H.P., Dale, M.M., Flower, R.J., und Henderson, G. (2016). Rang and Dale's pharmacology.
- Rehmann, H. (2012). Epac2: a sulfonylurea receptor? *Biochem Soc Trans* *40*, 6-10.
- Rehmann, H., Arias-Palomo, E., Hadders, M.A., Schwede, F., Llorca, O., und Bos, J.L. (2008). Structure of Epac2 in complex with a cyclic AMP analogue and RAP1B. *Nature* *455*, 124-127.
- Rehmann, H., Das, J., Knipscheer, P., Wittinghofer, A., und Bos, J.L. (2006). Structure of the cyclic-AMP-responsive exchange factor Epac2 in its auto-inhibited state. *Nature* *439*, 625-628.
- Rena, G., Pearson, E.R., und Sakamoto, K. (2013). Molecular mechanism of action of metformin: old or new insights? *Diabetologia* *56*, 1898-1906.
- Renstrom, E., Barg, S., Thevenod, F., und Rorsman, P. (2002). Sulfonylurea-mediated stimulation of insulin exocytosis via an ATP-sensitive K⁺ channel-independent action. *Diabetes* *51 Suppl 1*, S33-36.

- Rhoades, R., und Bell, D.R. (2009). *Medical physiology : principles for clinical medicine*, 3rd edn (Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins).
- Richter, B., Bandeira-Echtler, E., Bergerhoff, K., Clar, C., und Ebrahim, S.H. (2007). Rosiglitazone for type 2 diabetes mellitus. *Cochrane Database Syst Rev*, CD006063.
- Ripsin, C.M., Kang, H., und Urban, R.J. (2009). Management of blood glucose in type 2 diabetes mellitus. *Am Fam Physician* 79, 29-36.
- Roscioni, S.S., Elzinga, C.R., und Schmidt, M. (2008). Epac: effectors and biological functions. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 377, 345-357.
- Schafer, E.S. (1916). *The Endocrine Organs* (London: Longmans, Green, and co.).
- Schellenberg, E.S., Dryden, D.M., Vandermeer, B., Ha, C., und Korownyk, C. (2013). Lifestyle interventions for patients with and at risk for type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Annals of internal medicine* 159, 543-551.
- Seghers, V., Nakazaki, M., DeMayo, F., Aguilar-Bryan, L., und Bryan, J. (2000). Sur1 knockout mice. A model for K(ATP) channel-independent regulation of insulin secretion. *J Biol Chem* 275, 9270-9277.
- Shaner, N.C., Campbell, R.E., Steinbach, P.A., Giepmans, B.N., Palmer, A.E., und Tsien, R.Y. (2004). Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nature biotechnology* 22, 1567-1572.
- Shibasaki, T., Sunaga, Y., Fujimoto, K., Kashima, Y., und Seino, S. (2004). Interaction of ATP sensor, cAMP sensor, Ca²⁺ sensor, and voltage-dependent Ca²⁺ channel in insulin granule exocytosis. *J Biol Chem* 279, 7956-7961.
- Shimomura, O., Johnson, F.H., und Saiga, Y. (1963). Further Data on the Bioluminescent Protein, Aequorin. *Journal of cellular physiology* 62, 1-8.
- Shubrook, J.H., Bokaie, B.B., und Adkins, S.E. (2015). Empagliflozin in the treatment of type 2 diabetes: evidence to date. *Drug Des Devel Ther* 9, 5793-5803.

- Singh, S., Chang, H., Richards, T.M., Weiner, J.P., Clark, J.M., and Segal, J.B. (2013). Glucagonlike peptide 1–based therapies and risk of hospitalization for acute pancreatitis in type 2 diabetes mellitus: A population-based matched case-control study. *JAMA Internal Medicine* 173, 534-539.
- Smith, A.H., Owen, J., Borgman, K.Y., Fish, F.A., and Kannankeril, P.J. (2011). Relation of milrinone after surgery for congenital heart disease to significant postoperative tachyarrhythmias. *Am J Cardiol* 108, 1620-1624.
- Sonksen, P., and Sonksen, J. (2000). Insulin: understanding its action in health and disease. *British journal of anaesthesia* 85, 69-79.
- Stoner, G.D. (2005). Hyperosmolar hyperglycemic state. *Am Fam Physician* 71, 1723-1730.
- Stratton, I.M., Adler, A.I., Neil, H.A., Matthews, D.R., Manley, S.E., Cull, C.A., Hadden, D., Turner, R.C., and Holman, R.R. (2000). Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. *BMJ* 321, 405-412.
- Sturgess, N.C., Ashford, M.L., Cook, D.L., and Hales, C.N. (1985). The sulphonylurea receptor may be an ATP-sensitive potassium channel. *Lancet (London, England)* 2, 474-475.
- Tan, K.C., Chow, W.S., Ai, V.H., Metz, C., Bucala, R., and Lam, K.S. (2002). Advanced glycation end products and endothelial dysfunction in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 25, 1055-1059.
- Tao, X., Mei, F., Agrawal, A., Peters, C.J., Ksiazek, T.G., Cheng, X., and Tseng, C.T. (2014). Blocking of exchange proteins directly activated by cAMP leads to reduced replication of Middle East respiratory syndrome coronavirus. *J Virol* 88, 3902-3910.
- Thornalley, P.J. (1998). Cell activation by glycated proteins. AGE receptors, receptor recognition factors and functional classification of AGEs. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 44, 1013-1023.
- Torgersen, K.M., Vang, T., Abrahamsen, H., Yaqub, S., and Tasken, K. (2002). Molecular mechanisms for protein kinase A-mediated modulation of immune function. *Cellular signalling* 14, 1-9.

- Trachtenbarg, D.E. (2005). Diabetic ketoacidosis. *Am Fam Physician* 71, 1705-1714.
- Tsalkova, T., Gribenko, A.V., und Cheng, X. (2011). Exchange protein directly activated by cyclic AMP isoform 2 is not a direct target of sulfonylurea drugs. *Assay Drug Dev Technol* 9, 88-91.
- Tsuboi, T., da Silva Xavier, G., Holz, G.G., Jouaville, L.S., Thomas, A.P., und Rutter, G.A. (2003). Glucagon-like peptide-1 mobilizes intracellular Ca²⁺ and stimulates mitochondrial ATP synthesis in pancreatic MIN6 beta-cells. *Biochem J* 369, 287-299.
- Tuomilehto, J., Lindstrom, J., Eriksson, J.G., Valle, T.T., Hamalainen, H., Ilanne-Parikka, P., Keinanen-Kiukaanniemi, S., Laakso, M., Louheranta, A., Rastas, M., *et al.* (2001). Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *The New England journal of medicine* 344, 1343-1350.
- Vardi, M., und Nini, A. (2007). Phosphodiesterase inhibitors for erectile dysfunction in patients with diabetes mellitus. *Cochrane Database Syst Rev*, CD002187.
- Vetter, I.R., und Wittinghofer, A. (2001). The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* 294, 1299-1304.
- Vistoli, G., De Maddis, D., Cipak, A., Zarkovic, N., Carini, M., und Aldini, G. (2013). Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation. *Free Radical Research* 47, 3-27.
- Wang, Y., Okamoto, M., Schmitz, F., Hofmann, K., und Sudhof, T.C. (1997). Rim is a putative Rab3 effector in regulating synaptic-vesicle fusion. *Nature* 388, 593-598.
- Yasuda, R. (2006). Imaging spatiotemporal dynamics of neuronal signaling using fluorescence resonance energy transfer and fluorescence lifetime imaging microscopy. *Current opinion in neurobiology* 16, 551-561.
- Zaccolo, M., und Movsesian, M.A. (2007). cAMP and cGMP signaling cross-talk: role of phosphodiesterases and implications for cardiac pathophysiology. *Circulation research* 100, 1569-1578.

- Zagotta, W.N., Olivier, N.B., Black, K.D., Young, E.C., Olson, R., and Gouaux, E. (2003). Structural basis for modulation and agonist specificity of HCN pacemaker channels. *Nature* 425, 200-205.
- Zhang, C.L., Katoh, M., Shibasaki, T., Minami, K., Sunaga, Y., Takahashi, H., Yokoi, N., Iwasaki, M., Miki, T., and Seino, S. (2009). The cAMP sensor Epac2 is a direct target of antidiabetic sulfonylurea drugs. *Science* 325, 607-610.
- Zheng, S.L., Roddick, A.J., Aghar-Jaffar, R., Shun-Shin, M.J., Francis, D., Oliver, N., and Meeran, K. (2018). Association Between Use of Sodium-Glucose Cotransporter 2 Inhibitors, Glucagon-like Peptide 1 Agonists, and Dipeptidyl Peptidase 4 Inhibitors With All-Cause Mortality in Patients With Type 2 Diabetes: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA* 319, 1580-1591.

7 **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Insulinfreisetzung in einer pankreatischen Betazelle	10
Abbildung 2: Schematische Struktur des GFP nach PDB 1EMA	16
Abbildung 3: Schematische Darstellung eines FRET-Sensors mit zwei Fluorophoren	19
Abbildung 4: Vektorkarte pcDNA3.0.....	30
Abbildung 5: Exemplarische Emissionsspektren (n=5) einer spektralphotometrischen Messung mit Epac1-camps.....	37
Abbildung 6: Darstellung des Mikroskopiersetups.....	38
Abbildung 7: In dieser Arbeit verwendete Sensoren.....	43
Abbildung 8: pcDNA3-CFP-Epac1 δ DEP-YFP.....	44
Abbildung 9: Epac1-camps-PDE4A1	45
Abbildung 10: Epac2-camps	46
Abbildung 11: Aktivierung von Epac2-camps durch SH <i>in vitro</i>	48
Abbildung 12: Aktivierung von Epac1-camps <i>in vitro</i>	49
Abbildung 13: Epac-Aktivierung in lebenden Zellen.....	51
Abbildung 14: Keine Aktivierung von Epac2-camps durch Tolbutamid	52
Abbildung 15: Keine Aktivierung von Epac2-camps und Epac1-camps durch PDE-Inhibitoren.....	52
Abbildung 16: Weitere auf Epac2-camps basierende Sensoren	53
Abbildung 17: Die Epac-Mutante (Epac1-campsR279E) reagiert nicht auf SH oder cAMP	54
Abbildung 18: Tolbutamid hat unterschiedliche Wirkungen auf die verschiedenen Epac2-Varianten.....	55
Abbildung 19: Tolbutamid aktiviert Epac1-camps-PDE4A (A) bzw. Epac1-camps-PDE3A (B).....	57

Abbildung 20: Dosisabhängige Wirkung von Tolbutamid auf Epac1-camps-PDE3A/4A.....	58
Abbildung 21: Tolbutamid aktiviert Epac1-camps-PDE3B-Sensor.....	58
Abbildung 22: Tolbutamid aktiviert Epac2-camps basierte PDE-Sensoren Epac2-camps-PDE4A1 (A, C) und Epac2-camps-PDE3B (B, D)	60

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: In dieser Arbeit verwendete Chemikalien	21
Tabelle 2-2: Verwendete Oligonukleotide für die Klonierung (PCR).....	22
Tabelle 2-3: In dieser Arbeit verwendete Vektoren	22
Tabelle 2-4: Chemikalien und Medien für die Zellkultur	23
Tabelle 2-5: Verwendete Enzyme für die Klonierung.....	23
Tabelle 2-6: Weitere Materialien und Geräte.....	24
Tabelle 2-7: Zusammensetzung einer Standard-PCR-Reaktion.....	25
Tabelle 2-8: Protokoll einer Standard-PCR.....	25
Tabelle 2-9: Zusammensetzung des TAE- und DNA-Ladepuffers.....	27
Tabelle 2-10: Reagenzien für die Arbeit mit kompetenten Zellen	28
Tabelle 2-11: Restriktionsenzyme und ihre optimalen Puffer.....	31
Tabelle 2-12: Zusammensetzung des Kulturmediums für HEK-293AD-Zellen.....	34
Tabelle 2-13: Pipettierschema für Transfektion mit Effectene auf 6-Well-Platte.....	35
Tabelle 2-14: Zusammensetzung des BBS-Puffers.....	35
Tabelle 2-15: Zusammensetzung des Lysispuffers.....	37
Tabelle 2-16: Zusammensetzung des FRET-Puffers.....	39

9 Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CFP	Cyan Fluorescent Protein (Cyan fluoreszierendes Protein)
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
DDG	Deutsche Diabetes Gesellschaft
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
E. coli	Escherichia coli
FCS	Fetal Calf Serum (Fötales Kälberserum)
FRET	Fluoreszenz (Förster) Resonanz Energie Transfer
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	Green Fluorescent Protein (Grün fluoreszierendes Protein)
GTP	Guanosintriphosphat
i.d.R.	in der Regel
Iso	Isoprenalin, Isoproterenol
K ⁺ _{ATP} -Kanal	ATP-sensitiver Kaliumkanal
PDE	Phosphodiesterase
PK (PKA)	Proteinkinase (Proteinkinase A)
Rap	Ras related protein
Ras	Rat sarkoma
RFP	Red Fluorescent Protein (Rot fluoreszierendes Protein)
RT	Raumtemperatur
SH	Sulfonylharnstoffe
SUR	Sulfonyl Urea Receptor (Sulfonylharnstoffrezeptor)
u.a.	unter anderem
YFP	Yellow Fluorescent Protein (Gelb fluoreszierendes Protein)
z.B.	zum Beispiel

Danksagung

Den folgenden Personen, ohne deren Hilfe diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre, möchte ich an dieser Stelle meinen besonderen Dank aussprechen.

Zunächst danke ich Herrn Professor Dr. Martin Lohse, dass er diese Arbeit im Institut für Pharmakologie und Toxikologie ermöglichte und für seine Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Besonderer Dank gebührt meinem Forschungsleiter Herrn Professor Dr. Viacheslav Nikolaev für seine warmherzige und exzellente Betreuung. Er hatte die zündende Idee zu diesem Thema und begleitete die Dissertation von der Entstehung bis zur Vollendung mit zahlreichen Ratschlägen und Anregungen, die mir stets wertvolle Wegweiser waren.

Des Weiteren danke ich Herrn Christian Dees und Frau Anette Hannawacker für ihre freundliche und bemerkenswerte technische Unterstützung bei der Entstehung dieser Arbeit.

Ferner danke ich meiner Schwester Angelina Berisha, die der vorliegenden Arbeit mit ihrer außerordentlichen Unterstützung zu Form und Inhalt den letzten Schliff verlieh.

Mein größter Dank gilt jedoch meiner Mutter für ihre unerschütterliche Geduld und Förderung nicht nur für die Dissertation, sondern auch während des gesamten Studiums. Ihr ist diese Arbeit gewidmet.

LEBENS LAUF

Filip Berisha – geb. 31.01.1985 in Paderborn

Akademische Laufbahn

seit 08.2014

Assistenzarzt an der Klinik für Allgemeine und Interventionelle Kardiologie des Universitären Herzzentrums Hamburg, Prof. Dr. Blankenberg

11.2013 – 07.2014

Assistenzarzt (DFG-Gerokstelle) an der Klinik für Kardiologie und Pneumologie, Georg-August-Universität Göttingen, Prof. Dr. Hasenfuß

03.2010 – 11.2013

Promotion am Institut für Pharmakologie und Toxikologie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Lohse mit dem Thema: Molekulare Wirkmechanismen von Sulfonylharnstoffen: Direkte Epac-Aktivierung oder Hemmung der Phosphodiesterasen

Methoden: Fluoreszenzmikroskopie, Zell-Imaging, FRET-Messungen, Zellkultur, Standardtechniken der Molekularbiologie und-biochemie

04.2006 – 11.2012

Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg mit Erteilung der Approbation am 30.11.2012

10.2005 – 03.2006

Studium der Physik an der Universität Paderborn

Auslandsaufenthalte und berufliche Erfahrungen

2013 Gerokstipendium (DFG) – Gerokstelle als Assistenzarzt

2012 PJ – Innere Medizin – Universitätsklinik Rochester, USA

2011 Promotionsstipendium der Universität Würzburg

2011 Drittmittelförderung: Gewinner des Wettbewerbs „Was macht gesund?“ des Bundesministeriums für Bildung und Forschung mit einem Preisgeld von 10.000 € als Drittmittelförderung für das Projekt „Scholar Science Camp“

2009 Chirurgie – Famulatur – General Surgery, Washington Hospital Fremont, USA

Sprachen

- Deutsch, Albanisch Muttersprachen
- Englisch Sehr gut in Wort und Schrift
- Französisch Grundkenntnisse