

## "Late Breaking"-Abstrakts: Grundlagenforschung, Folgeerkrankungen

Vorsitz: H.-P. Hammes, Mannheim; B. Isermann, Heidelberg

P308

**Health technology assessment (HTA) zur Bedeutung von Wachstumsfaktoren in der Behandlung des diabetischen Fußulcus (DFU)**

*Buchberger B.<sup>1</sup>, Follmann M.<sup>2</sup>, Huppertz H.<sup>1</sup>, Wasem J.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Universität Duisburg-Essen, Essen, Germany, <sup>2</sup>Deutsche Krebsgesellschaft e. V., Berlin, Germany

**Einleitung:** Ulcera in Folge von Diabetes mellitus sind aufgrund der zunehmenden Prävalenz der Erkrankung ein schwerwiegendes Problem mit einem großen Anteil an der weltweiten Krankheitslast. Aufgrund langwieriger Therapien mit stationärer, ambulanter und sozialer Betreuung sind diabetische Fußkomplikationen auch teuer. Eine Therapie mit Wachstumsfaktoren könnte eine wirksame innovative Wundbehandlung zusätzlich zu einer Standardwundversorgung darstellen. Ziel dieses HTA im Auftrag des Deutschen Instituts für Medizinische Dokumentation und Information (DIMDI) ist, den Nutzen und die Sicherheit einer Therapie mit Wachstumsfaktoren allein oder in Kombination mit anderen Technologien zur Behandlung eines DFU unter medizinischen, ökonomischen, sozial-ethischen und juristischen Aspekten zu beurteilen.

**Methodik:** In relevanten Datenbanken wird eine systematische Literaturrecherche nach englisch- und deutschsprachigen Publikationen seit 1990 durchgeführt.

Kostenwerte werden an das Preisniveau von 2008 angepasst und in Euro umgerechnet.

Die Überprüfung und Bewertung der methodischen Qualität der Studien erfolgt anhand von anerkannten methodischen Standards der evidenzbasierten Medizin und der Gesundheitsökonomie.

**Ergebnisse:** Eingeschlossen werden 14 randomisierte kontrollierte Studien, neun Kosten-Effektivitäts-Analysen und zwei Metaanalysen.

Die Studiendauern liegen bei zwölf bis 20 Wochen, die Studienpopulationen umfassen zwischen 17 und 382 Patienten, im Durchschnitt 130.

Für eine Behandlung mit Becaplermin, rhEGF und den Hautimplantaten Dermagraft und Apligraf zeigt sich im Vergleich zu einer Standardwundversorgung allein in acht Studien ein Vorteil hinsichtlich einer vollständigen Wundheilung und der Dauer bis zu einer vollständigen Wundheilung mit statistisch signifikanten Unterschieden. Ein Nachweis für den Nutzen einer Behandlung mit bFGF kann nicht erbracht werden. Die Rate unerwünschter Ereignisse beträgt in vier Studien mehr als 30 %, jedoch ohne Unterschiede zwischen den Studiengruppen.

Die methodische Qualität der Studien ist mit deutlichen Mängeln behaftet.

Becaplermin kann als kosteneffektiv betrachtet werden. Zu Dermagraft und Apligraf lässt sich keine eindeutige Aussage machen.

**Diskussion:** Kleine Studienpopulationen und eine mangelhafte methodische Qualität der Studien mit hohem Verzerrungspotential schränken die Aussagekraft der Ergebnisse ein. Die Studiendauern und Follow-up-Phasen sind zur Überprüfung der Nachhaltigkeit der Interventionen und Beobachtung von Rezidiven oder unerwünschten Ereignissen infolge der Behandlung zu kurz.

**Schlussfolgerung:** Es gibt Hinweise auf einen Vorteil einer adjunkten Therapie mit Wachstumsfaktoren für eine vollständige Wundheilung und die Dauer bis zur vollständigen Wundheilung. Weitere methodisch hochwertige Studien mit adäquaten Fallzahlen und ausreichend langen Nachbeobachtungsphasen sind notwendig, in denen zusätzlich auch patientenrelevante Parameter wie z. B. die Lebensqualität untersucht werden sollten.

### P309

#### Kolorektale Neoplasien bei Patienten mit Typ-2 Diabetes mellitus: Ergebnisse einer populationsbasierten Kohortenstudie

*Krämer H.U.<sup>1</sup>, Müller H.<sup>1</sup>, Stegmaier C.<sup>2</sup>, Rothenbacher D.<sup>1</sup>, Brenner H.<sup>1</sup>, Raum E.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ), Klinische Epidemiologie und Altersforschung, Heidelberg, Germany, <sup>2</sup>GBE Saarland - Krebsregister, Saarbrücken, Germany

In den 1990er Jahren etablierte sich die sog. Hyperinsulinämie-Hypothese, aufgrund derer vermutet wurde, dass Typ-2 Diabetes mellitus (T2DM) das Risiko für kolorektale Neoplasien erhöht. Ziel dieser Studie war, den Zusammenhang zwischen T2DM und der Entstehung kolorektaler Neoplasien für eine ältere Population in Deutschland zu untersuchen. Subanalysen sollten zeigen, ob hinsichtlich Lage und Grad der Entartung Unterschiede bestehen.

Die Teilnehmer entstammen der ESTHER-Studie. Einschlusskriterium war die Durchführung einer kolorektalen Endoskopie zwischen Baseline und dem 5-Jahres Follow-up. Ausgeschlossen wurden dagegen diejenigen, die vor der Rekrutierung entweder eine kolorektale Endoskopie hatten oder bei denen bereits eine polypöse Veränderung im Kolorektum gefunden worden waren. Die Berechnung der relativen Prävalenz (prevalence ratio (PR)) erfolgte anhand von adjustierten Log-binomialen Regressionsmodellen.

Insgesamt wurden 1554 Teilnehmer eingeschlossen, darunter 884 Frauen. Das Durchschnittsalter betrug 62 Jahren. Übergewichtig (BMI  $\geq 25$  kg/m<sup>2</sup>) waren 71% der Teilnehmer und 11% hatten zu Baseline einen manifesten T2DM. Zum Follow-up nach 5 Jahren wurde bei 25% eine kolorektale Neoplasie diagnostiziert. Die Basisanalyse ergab nach vollständiger Adjustierung für potentielle Confounder, dass Teilnehmer mit einem T2DM eine 16% höhere Prävalenz (95%-KI: 0,9-1,5) an kolorektalen Neoplasien aufwiesen als diejenigen ohne T2DM. Die Subanalysen zeigten eine potenzielle Assoziation zwischen distaler Lage bzw. tubulo-villöser/ villöser Form der Neoplasien und T2DM. Die Insulintherapie war nicht mit einem zusätzlichen Risiko assoziiert (PR=1,2; 95%-KI: 0,6-2,2). Nach genauerer Betrachtung der Verteilung zeigte sich eine Effektmodifikation durch den Faktor Geschlecht. Eine Stratifizierung der Ergebnisse nach Geschlecht ergab eine höhere Prävalenz kolorektaler Neoplasien für Frauen mit T2DM im Vergleich zu jenen ohne T2DM (PR=1,7; 95%-KI: 1,0-2,6). Bei Männern traten dagegen keine signifikanten Unterschiede auf (PR=1,0; 95%-KI: 0,7-1,4). Obwohl kolorektale Neoplasien bei Männern häufiger sind als bei Frauen, zeigen die Ergebnisse, dass T2DM nur bei Frauen mit kolorektalen Neoplasien assoziiert werden kann. Zusätzliche Untersuchungen mit größeren Kollektiven sind notwendig, um weitere Zusammenhänge zu untersuchen.

### P310

#### Role of glycotoxic metabolites & detoxifying mechanisms in aging & disease

*Fleming T.<sup>1</sup>, Theilen T.M.<sup>1</sup>, Humpert P.M.<sup>1</sup>, Nawroth P.P.<sup>1</sup>, Bierhaus A.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Universitätsklinikum Heidelberg, Innere Medizin I und Klinische Chemie, Heidelberg, Germany

Methylglyoxal (MG) is a reactive metabolite generated from the metabolism of glucose. Increased formation of MG in vivo has been shown to be associated with the onset of tissue damage. MG and other endogenously formed dicarbonyl compounds can react with proteins to form Advanced Glycation Endproducts. Glyoxalase I (GLO1) is part of the glyoxalase system, and is the major cellular defence in the detoxification of MG. Decreased GLO1 activity in situ has been shown to result in an accumulation of MG, increased AGE formation, which can accumulate during physiological aging and at an accelerated rate in diabetes and other chronic degenerative diseases.

**Methods:** To study MG metabolism, a number of assays were developed in-house. To establish the physiological consequences which result from elevated MG levels, the role of MG and glyoxalase I was investigated in (i) physiologic aging, (ii) the development of pain in diabetic neuropathy, and (iii) physiological wound healing.

**Results:** Utilizing these assays, differences in MG metabolism between young (< 8wks) and old (>52 wks) wildtype old mice. It was found that GLO1 activity was decreased in old age by 42%, which was paralleled by an increase in plasma MG by 41%. Furthermore, GLO-II activity was decreased by 76%, paralleled by an 89% decrease in plasma D-lactate. GSH, although decreased slightly with age, was not significant. These results would suggest that with increasing age, the glyoxalase system as a whole is downregulated, leading to an increase in MG. In respect to diabetes, it was found that in STZ-induced diabetes (8 wks) GLO-I activity was also decreased by 46%, compared to age-matched controls, and that plasma MG was significantly increased by 52%. It was also observed that in the diabetic mice, the response times to thermal stimulus, commonly referred to as hyperalgesia, was increased by ca.5secs, suggesting that MG can act as potential novel mediator of metabolic pain in diabetes. In respect to wound healing, it was found that old mice had a significantly slower rate of wound healing compared to young mice (decreased of ca.30%). Experiments using homozygous knockdown mice for RAGE, which show an overall higher level of Glyoxalase I activity and expression compared to wildtype mice, have shown that the rate of wound healing is dependent upon GLO-I and downregulation leads to impairment of wound healing; healthy, young, RAGE-/- mice showed 38% increased rate of wound healing compared to wildtype; whereas GLO-/- mice showed 34% decrease in the rate of wound healing. Recently, these experiments have been completed in old, diabetic, wildtype and RAGE-/-: in which Glyoxalase I becomes downregulated, the rate of wound healing is greatly decreased.

**Conclusion:** These results show that increased MG formation resulting from downregulation of Glyoxalase I plays a fundamental role in the deleterious effects which are associated not only with diabetes but also the aging process.

### P311

#### Typ1-diabetische Ratten zeigen einen Melatonin-Insulin-Antagonismus

*Hofmann K.<sup>1</sup>, Streck S.<sup>1</sup>, Mühlbauer E.<sup>2</sup>, Wedekind D.<sup>3</sup>, Peschke E.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Institut für Anatomie und Zellbiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle/Saale, Germany, <sup>2</sup>Sächsische Akademie der Wissenschaften zu Leipzig, Leipzig, Germany, <sup>3</sup>Institut für Versuchstierkunde, Medizinische Hochschule Hannover, Hannover, Germany

**Hintergrund und Ziele:** Zahlreiche Untersuchungen konnten einen Rezeptor-vermittelten Einfluss des epiphysären Indolamins Melatonin auf die Insulinsekretion der pankreatischen  $\beta$ -Zelle zeigen. Melatonin vermittelt seinen Effekt über membranständige Melatoninrezeptoren (MT1 und MT2). Über die cAMP- und cGMP-Signalkaskade kommt es dabei zu einer Senkung der Insulinsekretion, während die Phospholipase C-IP<sub>3</sub>-Kaskade zu einer Erhöhung der Insulinsekretion führt. Tagesprofile der Melatoninsekretion Typ2-diabetischer Patienten und Typ2-diabetischer Goto-Kakizaki (GK)-Ratten sind gekennzeichnet durch eine deutliche Absenkung des Plasmamelatonins bei gleichzeitig erhöhtem Plasmainsulinspiegel. Dabei zeigten GK-Ratten eine erniedrigte Enzymaktivität der pinealen Arylkylamin-N-acetyltransferase (AA-NAT), während eine erhöhte mRNA-Konzentration der AA-NAT feststellbar war. Ziel dieser Studie war es, einen möglicherweise bestehenden Melatonin-Insulin-Antagonismus anhand geeigneter Typ1-diabetischer Tiermodelle genauer zu charakterisieren.

**Material und Methoden:** Zur Entwicklung eines Typ1-Diabetes mellitus wurden 40 männliche Wistar (WR)-Ratten im Alter von 6 Wochen mit dem Diabetogen Streptozotocin (STZ) behandelt und nach weiteren 6 Wochen im Tagesgang (alle 3 Stunden unter L:D = 12:12) getötet. Daneben konnte ein durch spontane Mutation entstandenes neues Tiermodell für Typ1-Diabetes mellitus, die LEW.1AR1/Ztm-*iddm* (IDDM)-Ratte, mit in die Untersuchungen einbezogen werden. Diese Tiere manifestieren die klassischen Merkmale eines Typ1-Diabetes um den 60. Lebensstag. Sowohl 40 weibliche als auch 40 männliche Tiere sowie deren Kontrolltiere wurden im Tagesgang getötet. Die Insulin- und Melatoninplasmakonzentrationen wurden mit Hilfe eines Radioimmunoassays bestimmt. Pineale Genexpressionsuntersuchungen wurden mittels *real-time* RT-PCR durchgeführt.

**Ergebnisse:** Sowohl STZ- als auch IDDM-Ratten wiesen stark erhöhte Blutglukosewerte auf, die von sehr niedrigen Insulinkonzentrationen im Plasma begleitet waren. Die Melatoninkonzentration im Plasma der diabetischen Tiere war gegenüber den entsprechenden Kontrolltieren signifikant erhöht. Real-time RT-PCR-Untersuchungen zeigten eine erhöhte Expression der pinealen AA-NAT und Hydroxyindol-O-methyltransferase. Die mRNA des Insulinrezeptors und des  $\beta$ 1-Adrenoceptors im Pineal war ebenfalls erhöht.

**Diskussion:** Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass im Gegensatz zu Typ2-diabetischen Patienten und Ratten sowohl Typ1-diabetische STZ- als auch IDDM-Ratten eine signifikant erhöhte Konzentration des Plasmamelatonins zeigen. Ob eine Substituierung diabetischer IDDM-Ratten zu einer Normalisierung der Melatoninkonzentration im Plasma führt, soll Gegenstand nachfolgender Untersuchungen sein. Diese Beobachtung eines bestehenden Insulin-Melatonin-Antagonismus könnte einen wichtigen Beitrag in Bezug auf die Diabetogenese leisten.

### P312

#### Zur Expression und Funktion des humanen MT2-Rezeptors in der pankreatischen $\beta$ -Zelle

*Albrecht E.<sup>1</sup>, Mühlbauer E.<sup>2</sup>, Bazwinsky-Wutschke I.<sup>1</sup>, Peschke E.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Institut für Anatomie und Zellbiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle/Saale, Germany, <sup>2</sup>Sächsische Akademie der Wissenschaften zu Leipzig, Leipzig, Germany

**Fragestellung:** Als Modell dient die Glukose-responsive, Insulin-produzierende Ratten-Insulinoma- $\beta$ -Zelllinie INS1. An dieser wurde bereits der Nachweis erbracht, dass Melatonin die stimulierte Insulinsekretion senkt. Obwohl in der INS1-Zelle der MT2-Rezeptor um ein vielfaches geringer exprimiert ist als der MT1-Rezeptor, konnte zurückliegend in unserer Arbeitsgruppe durch Inkubationsversuche mit Rezeptorantagonisten gezeigt werden, dass offenbar über beide Rezeptoren ein senkender Effekt auf die Insulinsekretion vermittelt wird. Im vorliegenden Versuch sollte nun durch Überexpression des humanen MT2-Rezeptors in der INS1-Zelle gezeigt werden, ob der MT2-Rezeptor wirklich für eine Senkung der Insulinsekretion verantwortlich ist. Wenn ja, soll nachfolgend untersucht werden, ob diese verstärkt durch Hemmung der Adenylatcyclase-cAMP-Signaltransduktionskaskade oder Inhibierung des Guanylatcyclase-cGMP-Weges erfolgt. Außerdem soll geklärt werden, ob über den MT2, wie auch in anderen Geweben beschrieben, ein synchronisierender Effekt auf circadiane Prozesse der  $\beta$ -Zelle ausgeübt werden kann.

**Methodik:** Das Plasmidkonstrukt pTRexDest30 mit der cDNA für den humanen MT2-Rezeptor (hMT2) wurde mit Hilfe von der Transfektionsreagenz Fugene<sup>®</sup> in INS1-Zellen transfiziert. Die Selektion der stabil überexprimierten hMT2-INS1-Klone erfolgte mit dem Antibiotikum G418. Das hMT2-RNA-Expressionsniveau der hMT2-INS1-Klone wurde mittels *real-time* RT-PCR bestimmt. Außerdem wurde die Überexpression mittels Immunocytochemie überprüft. Anschließend wurden Inkubationsexperimente durchgeführt und die Insulinsekretion mittels Radioimmunoassay bestimmt. Desweiteren wurden klonale Linien erzeugt, die nach Blastidcinselektion zusätzlich den Tet-Repressor exprimieren. Diese sollen gezielte Tetrazyklin-regulierte MT2-Rezeptorexpression ermöglichen.

**Ergebnisse:** Bei den hMT2-INS1-Klonen konnte eine deutlich höhere MT2-mRNA-Expression im Vergleich zu INS1-Zellen nachgewiesen werden. Ebenso deutet eine verstärkte Immunreaktivität auf eine größere Anzahl an MT2-Rezeptoren bei den hMT2-INS1-Klonen hin. Die anschließend durchgeführten Inkubationsexperimente zeigten eine stärkere Senkung der durch Glukose oder den unspezifischen Phosphodiesterasehemmer IBMX-stimulierten Insulinsekretion durch Melatonin bei den hMT2-INS1-Klonen als bei den INS1-Zellen. 24stündige Tetrazyklininkubation führte in den Tet-Repressor exprimierenden Klonen zu einer 50 bis 100fachen Erhöhung der MT2 Transkriptmenge. Diese regulierbaren Klone werden zur Zeit funktionell getestet.

**Folgerungen:** Eine Überexpression des MT2-Rezeptors in der INS1-Zelle ist ohne offensichtliche funktionelle Einschränkung der Zelle möglich. Durch Melatonin kann über den MT2-Rezeptor ein senkender Effekt auf die stimulierte Insulinsekretion vermittelt werden. Dieser Befund spricht für die Expression von funktionellen Melatoninrezeptoren in der INS1-Zelle, deren Kopplung an Signalkaskaden zur Zeit ermittelt wird.

### P313

#### Beteiligung von Apurin/Apyrimidin-Endonuclease 1 und mitochondrialer ROS an der Entstehung neuronaler Schädigungen von *C. elegans*

*Schlotterer A.<sup>1</sup>, Kukudov G.<sup>1</sup>, Pfeiffer M.<sup>1</sup>, Bierhaus A.<sup>1</sup>, Nawroth P.<sup>1</sup>, Morcos M.<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup>Universitätsklinikum Heidelberg, Innere Medizin I, Heidelberg, Germany, <sup>2</sup>Zitha Klinik, Luxembourg, Luxembourg

**Fragestellung:** Bei Kultivierung von *C. elegans* unter erhöhter Glukose-Konzentration ist die Akkumulation von Deletionen mitochondrialer DNA (dmtDNA) signifikant verstärkt. Die Entstehung von dmtDNA ist mit der Bildung mitochondrialer reaktiver Sauerstoffspezies (mtROS) assoziiert und wird durch die Präsenz von Apurin/Apyrimidin (AP)-Stellen begünstigt. Die AP-Endonuclease APE1 ist das zentrale Enzym des mitochondrialen DNA-Reparatursystems von AP-Stellen und wird ortholog als *exo-3* in *C. elegans* exprimiert. Ziel dieser Studie war es, den Einfluss von *exo-3* und mtROS auf die gesamtzelluläre ROS-Bildung, das Auftreten morphologischer Veränderungen des Nervensystems, die Beeinträchtigung neuronaler Funktionen und die Lebensspanne zu untersuchen.

**Methodik:** *C. elegans* wurden unter Standard- sowie erhöhten Glukose-Bedingungen kultiviert um Glukose-Konzentrationen von 6 bzw. 14 mmol/l zu erreichen. Die Repression von *exo-3* (R09B3.1) erfolgte durch Bakterien-vermittelte RNAi, die Reduktion der mtROS-Bildung durch Behandlung mit dem mitochondrialen Entkoppler FCCP. Die Expression von *exo-3* mRNA und der Gehalt an mtDNA wurden durch quantitative *real-time* PCR gemessen. ROS-Bildung wurde mittels Hydroethidin-Färbung nachgewiesen und durch computergestützte Bildanalyse konfokaler Laser-Rastermikroskopie (CLSM) quantifiziert. Die strukturelle Integrität der Nervenbahnen und Kommissuren wurde in pan-neuronal YFP-überexprimierenden (NW1229) Tieren durch CLSM untersucht. Zur Bestimmung funktioneller neuronaler Schäden wurden die Bewegungsgeschwindigkeiten des Kopfes und des Körpers mittels computergestützter Videoanalyse (WormTracker 2.0.25) berechnet. Die Lebensspannen wurden durch Berechnung von Kaplan-Meier-Überlebenskurven analysiert und mittels ANOVA / Fisher's PLSD verglichen.

**Ergebnisse:** Durch Steigerung des Glukose-Spiegels und durch Suppression von *exo-3* wurde die Akkumulation von dmtDNA in 12-Tage alten *C. elegans* um 203% ( $P < 0,05$ ) bzw. 248% ( $P < 0,05$ ) gesteigert, die mittlere Lebensspanne von  $18,5 \pm 0,4$  auf  $16,3 \pm 0,6$  ( $P < 0,01$ ) bzw.  $15,4 \pm 0,1$  ( $P < 0,01$ ) Tage und die maximale Lebensspanne von  $25,9 \pm 0,4$  auf  $22,9 \pm 0,2$  ( $P < 0,001$ ) bzw.  $23,2 \pm 0,1$  ( $P < 0,001$ ) Tage verkürzt. Repression von *exo-3* führte auch zum Anstieg der ROS-Bildung auf das 2-fache ( $P < 0,01$ ), strukturellen Veränderungen des Nervensystems sowie Reduktion der Bewegungsgeschwindigkeiten des Kopfes um 43% ( $P < 0,01$ ) und des Körpers um 38% ( $P < 0,05$ ). Reduktion von mtROS durch FCCP in *exo-3*-reprimierten Tieren verringerte die gesamtzelluläre ROS-Bildung, reduzierte neuronale Schäden, steigerte die Beweglichkeit und verlängerte die Lebensspanne.

**Schlussfolgerungen:** Die Expression des APE1-Orthologs *exo-3* und die Bildung von mtROS sind mit der Entstehung struktureller und funktioneller neuronaler Schädigungen sowie der Lebensspanne von *C. elegans* assoziiert. Diese Daten deuten auf eine pathogenetische Rolle des mitochondrialen DNA-Reparatursystems bei *C. elegans* hin.

### P314

#### Die Rolle der Methylglyoxalsynthase bei der Pathogenese der diabetischen Polyneuropathie im Modell *C. elegans*

*Pfeiffer M.<sup>1</sup>, Schlotterer A.<sup>1</sup>, Kukudov G.<sup>1</sup>, Fleming T.<sup>1</sup>, Bierhaus A.<sup>1</sup>, Nawroth P.<sup>1</sup>, Morcos M.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Uniklinik Heidelberg, Medizinische Klinik I und klinische Chemie, Heidelberg, Germany

**Fragestellung:** Methylglyoxal (MG) ist ein bei Diabetes mellitus vermehrt entstehender reaktiver Metabolit, der an der Entstehung diabetischer Spätschäden beteiligt ist. Bislang wurde angenommen, dass er ausschließlich nicht-enzymatisch entsteht. Daneben wurde in Bakterien und Hefen ein durch die Methylglyoxalsynthase (MGS) katalysierter Pathway beschrieben. Unsere Arbeitsgruppe konnte schließlich die Existenz eines MGS-Homologs in *Caenorhabditis elegans* zeigen. Dieses sollte in Funktion und Regulation charakterisiert werden.

**Methodik:** Die MG-Produktion wurde mit spezifischen Antikörpern gegen von MG abgeleitete AGEs (MG-AGEs) nachgewiesen, oxidativer Stress durch die Bestimmung mitochondrialer reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) durch fluorogene Oxidation von Hydroethidin. Mit einem pan-neuronal YFP-exprimierenden *C. elegans* Stamm wurden strukturelle Nervenschäden visualisiert. Für die silencing RNA Experimente wurde die „feeding“ Technik verwendet (RNAi). Die Expression wurde mittels QRT-PCR bestimmt. Lebensspannen wurden durch Kaplan-Meier-Analysen ausgewertet.

**Ergebnisse:** Erhöhte Glukose steigerte die Expression des MGS-Homologs auf das 3-fache ( $p < 0,01$ ). MG-AGEs stiegen um 34% an ( $p < 0,05$ ). Dieser Anstieg konnte durch RNAi gegen MGS signifikant auf 19% reduziert werden ( $p < 0,05$ ). Die Konzentration von ROS erhöht sich in *C. elegans* durch Kultivierung in erhöhter Glukose auf das 2,3-fache. Bei gleichzeitiger MGS-Suppression reduziert sich der Anstieg auf das 1,6-fache ( $p < 0,01$ ). Unter Standard-Bedingungen lassen sich bei *C. elegans* bis zum Alter von 12 Tagen keine neuronalen Schäden nachweisen, während unter erhöhter Glukose strukturelle Schäden von Kommissuren und Nervenbahnen nachweisbar sind. Die Suppression der MGS vermindert Glukose-bedingte neuronale Schäden signifikant. Die Lebensspanne wird unter erhöhten Glukose-Bedingungen signifikant verkürzt ( $p < 0,001$ ). MGS-Suppression wirkt dieser Verkürzung entgegen und verlängert die Lebensspanne ( $p < 0,01$ ).

**Schlussfolgerungen:** Unsere Daten beschreiben erstmals die Funktion eines MGS-Homologs in *C. elegans*. Wir konnten zeigen, dass die MGS-Expression unter erhöhter Glukose eng mit oxidativem Stress, Bildung von MG-derived AGEs und morphologischen Nervenschäden, sowie der Lebensspanne von *C. elegans* assoziiert ist. Der MGS kommt demnach in *C. elegans* eine Bedeutung bei der Entstehung von Nervenschäden durch hohe Glukose zu.

P315

### Das multifunktionale nukleäre Protein *Eny2* reguliert die glukose- und inkretinvermittelte Insulinsekretion

*Lechner A.<sup>1,2</sup>, Dames P.<sup>1</sup>, Weise M.<sup>1</sup>, Parhofer K.G.<sup>1</sup>, Göke B.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Medizinische Klinik 2; Klinikum Großhadern, München, Germany, <sup>2</sup>Medizinische Klinik Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität München, München, Germany

**Fragestellung:** Funktionsstörungen der pankreatischen Betazellen spielen eine wesentliche Rolle in der Pathogenese von Diabetes mellitus Typ 2. Dem Verständnis der molekularen Regulation der Insulinsekretion kommt daher wesentliche Bedeutung zu. In Voruntersuchungen identifizierten wir *Eny2* als ein mögliches, neues regulatorisches Protein in Betazellen. *Eny2* ist das hoch konservierte Säugetierhomolog von *Sus1* der Hefe und *Drosophila e(y)2*. Das Protein wirkt bei der nukleären Gentranskription und beim mRNA-Export aus dem Zellkern mit. In der aktuellen Arbeit untersuchten wir die Funktion des Proteins in *Ins1-E* Insulinomzellen.

**Methodik:** *Eny2* wurde in *Ins1-E* Insulinomzellen (Ratte) transient und stabil überexprimiert, sowie durch siRNA supprimiert. In Zellen mit verschiedenen *Eny2*-Konzentrationen wurde dann die Insulinsekretion nach Stimulation mit Glukose, Tolbutamid, Exendin-4 und KCl gemessen. Darüber hinaus wurde der Insulingehalt bestimmt. Die glukoseabhängige metabolische Aktivität der Zellen wurde in einem MTT-Assay gemessen. Außerdem erfolgten Bestimmungen des cAMP-Gehalts nach Stimulation mit Exendin-4 und Forskolin, sowie des intrazellulären Calciums nach Glukose- und Exendin-4-Stimulation. Für relevante Betazellgene erfolgte eine semiquantitative rtPCR.

**Ergebnisse:** Nach siRNA-vermittelter Suppression von *Eny2* kam es zu einem deutlichen Anstieg der glukoseabhängigen Insulinsekretion in *Ins1-E*-Zellen. Noch deutlicher gesteigert war die inkretinvermittelte Insulinfreisetzung. Die Überexpression von *Eny2* hatte keine Auswirkungen auf die Insulinsekretion. Um die intrazellulären Mechanismen der Effekte einer *Eny2*-Suppression zu verstehen, bestimmten wir zunächst den Insulingehalt der Zellen, der unverändert war. Auch die Expression mehrerer, für die Insulinsekretion zentraler Gene (*Insulin*, *Glut2*, *Glukokinase*, *Phosphofruktokinase*, *PDX1*) war identisch. Es zeigte sich jedoch ein Unterschied in der glukoseabhängigen metabolischen Aktivität der Zellen. Der cAMP-Anstieg nach Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen von Exendin-4 und auch mit Forskolin war unabhängig von einer *Eny2*-Suppression. Für das stimulierte intrazelluläre Calcium fielen jedoch deutlich höhere Konzentrationen nach *Eny2*-knockdown auf.

**Schlussfolgerungen:** Das hoch konservierte, nukleäre Protein *Eny2* ist ein negativer Regulator der glukose- und inkretinvermittelten Insulinsekretion in *Ins1-E* Insulinomzellen. Wesentliche Mechanismen dieses Effekts sind eine gesteigerte glukoseabhängige metabolische Aktivität und eine erhöhte Stimulierbarkeit des intrazellulären Calciums, wahrscheinlich auf der Ebene der calcium-induzierten Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern. Durch die Modulation von *Eny2* ergeben sich interessante Möglichkeiten, um die Funktion insulinproduzierender Zellen im Rahmen wissenschaftlicher Fragestellungen zu beeinflussen und möglicherweise, um neue therapeutische Strategien für den Diabetes mellitus Typ 2 zu entwickeln.

P316

### The insulinotropic effect of fluoroquinolones is counteracted by their inhibitory effect on pancreatic beta cell energy metabolism

*Ghaly H.<sup>1</sup>, Hatlapatka K.<sup>1</sup>, Rustenbeck I.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Institut für Pharmakologie, Toxikologie u. Klinische Pharmazie, Braunschweig, Germany

**Rationale:** Antimicrobial fluoroquinolones both stimulate and inhibit insulin secretion leading to hypo- and hyperglycemias, respectively. The insulinotropic effect is generally explained by their ability to block  $K_{ATP}$  channels in pancreatic beta cells. However, using metabolically intact primary beta cells we have found that fluoroquinolone concentrations which were sufficient to strongly inhibit  $K_{ATP}$  channel activity in open cells were unable to significantly depolarize the beta cell plasma membrane. The rationale to explore the underlying mechanism is that some fluoroquinolones, e.g. moxifloxacin, are clearly less associated with hypoglycemias than others, e.g. gatifloxacin.

**Methods:** Supposing that an interference with mitochondrial energy metabolism was the reason for this discrepancy, we investigated the effects of gatifloxacin, ciprofloxacin and moxifloxacin on the NAD(P)H- and FAD-autofluorescence, the mitochondrial membrane potential (Rhodamine 123-fluorescence) and adenine nucleotide content of isolated pancreatic islets or single beta cells. The autofluorescence values are expressed as changes of the last prestimulatory value which was normalized to 100%.

**Results:** 20 mM glucose induced a NAD(P)H increase of  $35 \pm 9\%$  ( $n=6$ ). This increase was abolished by 100  $\mu$ M moxifloxacin ( $p < 0.01$ ), whereas ciprofloxacin or gatifloxacin (100  $\mu$ M each) did not induce significant changes. The FAD-fluorescence, which is a more specific indicator of the intramitochondrial production of reducing equivalents than NAD(P)H, decreased by  $20 \pm 5\%$  in response to 20 mM glucose ( $n=4$ ). This glucose-induced change was significantly diminished by moxifloxacin (decrease only by  $8 \pm 3\%$ ,  $p < 0.05$ ) but not by ciprofloxacin and gatifloxacin. There was no significant effect of these compounds on the ATP- and ADP-content of glucose-stimulated (20 mM) islets, however, moxifloxacin, but not ciprofloxacin or gatifloxacin significantly reduced the normalized ATP/ADP ratio to 81.5% ( $p = 0.0014$ ,  $n=7$ ). In the presence of 5 mM glucose, all three fluoroquinolones led to a hyperpolarization of the mitochondrial membrane potential, which was most marked with moxifloxacin. On the other hand, the hyperpolarizing effect of a stimulatory glucose concentration (20 mM) was partially antagonized by moxifloxacin ( $p < 0.05$ ,  $n=4$ ), but not ciprofloxacin or gatifloxacin.

**Conclusions:** Apparently, fluoroquinolones interact with the respiratory chain and thereby inhibit the energy metabolism of the pancreatic beta cell. The most marked effect is exerted by moxifloxacin and appears sufficient to counteract the  $K_{ATP}$  channel blocking effect and/or its consequences for the release of insulin. This would explain why this compound is the least associated with hypoglycaemias. Also, these observations illustrate the overriding control which the energy metabolism exerts in the course of stimulus-secretion coupling of the pancreatic beta cell.

P317

### Analysis of submembrane insulin granule number and behavior during the initial phase of secretion - dynamic measurements using TIRF microscopy

*Hatlapatka K.<sup>1</sup>, Matz M.<sup>2</sup>, Baumann K.<sup>2</sup>, Rustenbeck I.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Technische Universität Braunschweig, Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Klinische Pharmazie, Braunschweig, Germany, <sup>2</sup>Technische Universität Braunschweig, Institut für Pharmazeutische Chemie, Braunschweig, Germany

**Background and aims:** The release of a pool of membrane-adjacent secretory granules which are in a primed and docked state and await one final trigger, a depolarization-induced influx of  $\text{Ca}^{2+}$ , is held responsible for the first phase of glucose-induced insulin secretion. Recently, we observed that 15 mM  $\text{K}^+$  led to a 20 mV depolarization and to a lasting increase of the cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ), but only to a modest transient increase in secretion, suggesting that the effect of depolarization on insulin secretion is only incompletely understood.

**Methods:** Insulin secretion was measured by perfusion of mouse islets and MIN6 pseudoislets and ELISA of the fractionated effluate. The  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  of islets and MIN6 cells was measured with the Fura technique. Submembrane granules were visualized by transient transfection of MIN6 cells with an insulin-EGFP fusion protein and imaging by TIRF microscopy at 37°C. The images were evaluated by a purpose-made program written in MatLab to achieve a complete observer-independent quantitation.

**Results:** Islets perfused with 5 mM glucose showed only a transient increase in secretion when  $\text{K}^+$  was raised to 15 mM. A subsequent elevation to 40 mM  $\text{K}^+$  resulted in a prompt overshooting increase in secretion which remained increased as long as 40 mM  $\text{K}^+$  was present. In contrast,  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  was continuously elevated by 15 mM  $\text{K}^+$  and increased further when  $\text{K}^+$  was raised to 40 mM. The same secretion and  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  pattern could be observed with MIN6 pseudoislets. MIN6 cells transfected with insulin-EGFP were therefore used to analyse the behavior of submembrane granules by TIRF microscopy at 5 time points: beginning, prior to high  $\text{K}^+$ , one each during 15 and 40 mM  $\text{K}^+$  and one after washout of high  $\text{K}^+$ . At each time point a sequence of 100 images was acquired within 12 s. Referring to the first sequence as 100%, the numbers of submembrane granules at the next time points were 109%, 76%, 50% and 56%. More than 50% of the granules were long-term resident ( $\geq 12$  s). The percentage of short-term resident granules ( $\leq 1$  s) increased slightly during 15 mM  $\text{K}^+$ , then significantly during 40 mM  $\text{K}^+$  and remained so after washout. This correlated with an increase of the percentage of newly arriving granules from 4% initially to 7% during 15 mM  $\text{K}^+$  and to 15% during 40 mM  $\text{K}^+$  and washout. Very similar percentages applied for departing granules (i.e. return or release). There were no such changes in control experiments. The total and the net distances covered by the submembrane granules were not affected by high  $\text{K}^+$ .

**Conclusion:** 40 mM  $\text{K}^+$  affects arrival, departure and residence time of insulin granules, but not movement parallel to the membrane. 15 mM  $\text{K}^+$  is moderately effective, which concurs with dynamic secretion measurements. There is no indication that long-term resident granules are preferentially departing during stimulation. This puts the idea into question that membrane-adjacent granules make up the initial phase of insulin secretion.