

Saskia Erbel
Dr. sc. hum.

Pathophysiologie des Betazell-spezifischen ER-Stress beim Diabetes mellitus Typ 2 und die Sicherheit der Insulintherapie

Geboren am 18.01.1981 in Essen
Staatsexamen am 01.12.2005 an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Promotionsfach: Innere Medizin
Doktorvater: Herr Priv.-Doz. Dr. med. Robert A. Ritzel

Der Diabetes mellitus Typ 2 ist eine chronisch progressive Stoffwechselerkrankung, die durch Insulinresistenz, Betazell dysfunction und ein Betazelldefizit gekennzeichnet ist. Eine wichtige Ursache für die Dysfunction und den programmierten Zelltod (Apoptose) der Betazellen ist chronischer Betazellstress, vor allem Stress im endoplasmatischen Retikulum. Auslöser von chronischem Betazellstress sind Insulinresistenz und Hyperglykämie, neuere Untersuchungen sprechen auch für eine Rolle der Adipokine, die bei Adipositas insbesondere von viszeralen Adipozyten sezerniert werden. Bislang kann der chronisch progrediente Verlauf der Erkrankung durch kein therapeutisches Verfahren wirksam aufgehalten werden. Es ist unklar, ob die Insulinsubstitution als wichtigste Therapieform des Diabetes mellitus durch Wachstumsfaktor-ähnliche Eigenschaften des Insulins die Progression von autonomem Zellwachstum fördert. Folgende Fragen sollen daher bearbeitet werden: 1) Ist die isolierte humane Langerhans'sche Insel ein geeignetes Modell, um in Inkubationsexperimenten die Betazellfunktion, Inselmorphologie und den Zellturnover zu analysieren? 2) Welche ER-Stresssignalwege werden in Betazellen und isolierten Langerhans'schen Inseln durch Hyperglykämie und proinflammatorische Zytokine induziert und kann Betazellstress durch etablierte Therapieprinzipien reduziert werden? 3) Wird durch Humaninsulin oder ein Insulinalogon die Proliferation von Pankreaskarzinomzellen induziert und die Überlebensdauer von Patienten nach Operation eines Pankreaskarzinoms verkürzt?

Isolierte humane Inseln wurden über einen Zeitraum von 4 Wochen bei 5mM Glukose kultiviert und in wöchentlichen Abständen hinsichtlich ihrer Funktion (Insulinsekretionsanalysen), Morphologie (Insulin, CHOP) und des Zellturnovers (Ki-67, TUNEL) untersucht (n=3 Organspender). In der Betazelllinie INS-1 wurde nach Inkubation mit Glukose (11 und 30mM) und TNF- α (100ng/ml) oder IL-1 β (50U/ml) zeitabhängig (1, 8, 16, 24, 48 Stunden) die Expression von ER-Stressmarkern (p-eIF2 α , p-JNK, ATF-6) mittels Western Blot bestimmt (n=3 Experimente). Isolierte humane Inseln wurden mit Glukose (5 und 30mM) und TNF- α (10ng/ml) oder IL-1 β (50U/ml) über 48 Stunden statisch inkubiert und anschließend hinsichtlich ihrer Funktion (Insulinsekretionsanalysen), Morphologie (Insulin, CHOP) und Apoptose (TUNEL) untersucht (n=3 Organspender). Zusätzlich wurden humane Inseln unter identischen Bedingungen mit Exenatide (50nM) oder Glimperid (10 μ M) inkubiert. Humane Pankreaskarzinomzellen (Colo-357) wurden mit Humaninsulin oder Insulin Glargin 72 Stunden inkubiert (0-100nM) und anschließend durchflusszytometrisch hinsichtlich Replikation (Ki-67) und Apoptose (Annexin-V) analysiert. Die Expression des Insulin-Rezeptors, IGF-I-Rezeptors und IRS 2 als Bestandteil beider Rezeptorsignalkaskaden wurde mittels Western Blot semiquantitativ ausgewertet. Patienten (n=125) mit oder ohne Diabetes mellitus und einem Pankreaskarzinom wurden nach Pankreatektomie über 22 Monate (Median) beobachtet und deren Überlebensdauer in Abhängigkeit von der durchgeführten Insulintherapie untersucht.

Über den Kultivierungszeitraum von 4 Wochen war sowohl die Betazellfunktion als auch die CHOP-Expression, Replikations- und Apoptoserate in isolierten humanen Inseln im Vergleich

zur Langerhans'schen Insel in situ signifikant verändert, jedoch konnten sich die Betazellfunktion und der Inselturnover mit zunehmender Kultivierungsdauer stabilisieren. In INS-1 Zellen wurden durch Glukose, TNF- α und IL-1 β verschiedene ER-Stresssignalkaskaden (p-eIF2 α , p-JNK, ATF-6) zeitabhängig aktiviert. In humanen Inseln wurde die Expression des ER-Stressmarkers CHOP durch Glukose, TNF- α und IL-1 β gesteigert. Die Inseln funktion war nach 48 Stunden Inkubation mit TNF- α eingeschränkt, während nach Inkubation mit 30mM Glukose oder IL-1 β in diesen Akutexperimenten keine signifikanten Funktionsveränderungen beobachtet wurden. Analysen des Apoptosemarkers TUNEL zeigten eine erhöhte Apoptoseaktivität nach Inkubation mit 30mM Glukose, TNF- α oder IL-1 β . Durch Inkubation mit Exenatide wurde die Stressinduktion in humanen Inseln (CHOP) nach Inkubation mit IL-1 β reduziert. Eine gleichzeitige Inkubation mit Glimperid und TNF- α , alleine oder mit 30mM Glukose, und IL-1 β führte zu einer reduzierten CHOP-Expression. Die Zahl TUNEL-positiver Zellen wurde weder durch Exenatide noch Glimperid verändert. Bei Inkubation der Colo-357 Zellen mit Humaninsulin oder Insulin Glargin zeigten sich über das gesamte Konzentrationspektrum keine signifikanten Unterschiede der Proliferationsrate oder der Anzahl der apoptotischen Zellen. Die Expression des Insulin-Rezeptors, IGF-I-Rezeptors und IRS 2 war bei beiden Insulinen gleich, der Insulin-Rezeptor wurde sowohl durch Humaninsulin als auch Insulin Glargin konzentrationsabhängig weniger exprimiert. Die mediane Überlebensdauer von Patienten nach Pankreatektomie aufgrund eines Pankreaskarzinoms lag bei 15 Monaten. Eine Survival-Analyse (Kaplan-Meier) zeigte, dass der zeitabhängige Anteil der überlebenden Patienten unabhängig von der Insulinbehandlung war.

Zusammenfassend sind isolierte humane Inseln nach Isolation für 2-3 Wochen ein geeignetes in vitro Modell für Untersuchungen von Betazellfunktion, Morphologie und Inselturnover. Da zumindest die Parameter des Inselzellturnovers aber im Vergleich zur Insel in situ gesteigert sind, müssen die Experimente im zeitgleichen Paralleldesign und standardisiert zu festen Zeitpunkten durchgeführt werden. Glukose, TNF- α und IL-1 β aktivieren in Betazellen unterschiedliche ER-Stresssignalkaskaden und induzieren Betazellapoptose in humanen Inseln. Exenatide und Glimperid als etablierte Therapieprinzipien können ER-Stress in Betazellen reduzieren. ER-Stress, Betazellfunktion und Betazellapoptose werden jedoch nicht parallel reguliert. Weder Humaninsulin noch Insulin Glargin führt in humanen Pankreaskarzinomzellen zu einer Veränderung der Proliferations- oder Apoptoserate. Die Überlebensdauer von Patienten nach Pankreatektomie wegen Pankreaskarzinom wird durch Insulin nicht verändert. Insulin scheint somit für die Therapie des Diabetes mellitus auch bei Patienten mit maligner Erkrankung geeignet zu sein.