

## 2. LITERATUR

### 2.1. Gesamtstoffwechsel und Energiehaushalt

Tiere sind zur Aufrechterhaltung ihrer Lebensfunktionen auf ständige Zufuhr von Energie angewiesen, die im Normalfall aus der Nahrung stammt und nur zeitweilig aus Energiereserven durch Abbau von Körpersubstanzen gewonnen werden kann. Der oxidative Stoffwechsel stellt die Energie für die Umwandlung der Nahrungsenergie in körpereigene Energieformen bereit.

Die chemischen Reaktionen im Stoffwechsel sind gekoppelt mit einer Wärmeproduktion. Eine Steigerung der Stoffwechselintensität führt deshalb zwangsläufig auch zu einem Anstieg in der Wärmeproduktion. Bei homoiothermen Tieren besteht ein Gleichgewicht zwischen metabolisch produzierter Wärme und von der Umgebung aufgenommener Wärme einerseits und der Wärmeabgabe und der Speicherung von Wärme im Tierkörper andererseits. Die Warmblüter nutzen einen Teil dieser Wärme, um ihre Körpertemperatur aufrechtzuerhalten. Da chemische Reaktionen stark temperaturabhängig sind, ermöglicht eine konstante Körperinnentemperatur eine weitgehende Unabhängigkeit der Regulation des Stoffwechsels von umweltlichen Temperaturschwankungen.

Das für die indirekte Kalorimetrie benutzte bioenergetische Modell für Wiederkäuer (Brouwer et al. 1965) setzt den Sauerstoffverbrauch, die Kohlendioxid- und Methanbildung proportional zur Erzeugung von Wärme. In diesem weithin akzeptierten Modell ist der O<sub>2</sub>-Verbrauch die bestimmende Größe für die Wärmeproduktion, d.h., die chemische Energieumwandlung durch Atmung wird in diesem Modell betont. Die Atmung verläuft in den Mitochondrien. Bei der Kopplung der Atmungskettenaktivität mit der oxidativen Phosphorylierung ist sie mit der Regeneration von ADP zu ATP verbunden, so dass der Sauerstoffverbrauch ein Maß der atmungsgekoppelten Stoffwechselintensität liefert. Für die Gewinnung freier Energie werden die Kohlenwasserstoffverbindungen Glukose und Fettsäuren, aber auch Aminosäuren als oxidierbare Substrate verwendet. Sie stammen aus körpereigenen Reserven und aus dem Futter durch Aufschluss des Futters im Verdauungstrakt. Beim Rind beginnt dieser Aufschluß im Pansen nach der Homogenisierung des Futters durch Wiederkauen. Dort wird die Nahrung einer

mikrobiellen Verdauung unterworfen. Kurzkettige Fettsäuren entstehen, die von Mikroben des Pansens nicht verwertbar sind, aber die wichtigste Energiequelle für den Wiederkäuer darstellen. Sie trägt bis zu 75% der umsetzbaren Futterenergie (Siciliano- Jones & Murphy 1989) zur assimilierbaren Gesamtenergie bei. Die molaren Anteile von mikrobiell erzeugtem Azetat, Propionat und Butyrat variieren von 70:20:10 bei einer Heudät zu 50:35:15 bei einer Getreidedät (Jentsch & Wittenburg 1993). Damit verändert ein höherer Getreideanteil im Futter den oxidierbaren Anteil einer spezifischen Fettsäure. Voraussetzung für intrazelluläre Oxidation ist die Resorption der Substrate. Das Pansenepithel resorbiert 70-85% der kurzkettigen Fettsäuren, der Rest wird vom nachfolgenden Verdauungstrakt aufgenommen (Peters et al. 1990, 1992). Die hohe Resorptionsrate wird durch den Anstieg im Blutfluß durch die intensiv vaskularisierten Pansenzotten ermöglicht. Obwohl die Pansenwand zu etwa gleichen Teilen aus Muskulatur und Epithelmasse besteht, geht der Blutfluss zu 85% (basal) und zu 97% (Futteraufnahme) durch die Pansenzotten (Barnes et al. 1983). Der Transport durch das Pansenzottenepithel schließt einen ouabain-sensitive  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Austausch ein. Die Energie für diesen Austausch, damit für den Transport, liefert eine  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (Kelly et al. 1993). Der Ionentransport erfordert Energie, die letztlich aus einer ATP-Hydrolyse stammt, wenn auch nicht aus der Aktivität einer ouabain-sensitiven  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. Die Regenerierung von ADP, das durch die Enzymaktivität erzeugt wird, erfolgt im Pansenzottenepithel über oxidative Phosphorylierung. Ihr Anteil am Gesamtsauerstoffverbrauch des Epithels beträgt mindestens 20% (Kelly et al. 1993). Substrat für diese Oxidation ist fast ausschließlich CoA-aktiviertes Azetat (Britton & Krehbiel 1993). Dagegen wird über 70% des vom Pansen erzeugten Butyrats zwar in den Pansenzotten metabolisiert, davon erscheinen aber über 80% als Ketokörper (hauptsächlich  $\beta$ -Hydroxybutyrat) in der Zirkulation (Krehbiel et al. 1992). Der Hauptanteil von Propionat und das nicht vom Pansenzottenepithel verbrauchte Azetat wird vom Epithel in die Blutbahn transportiert, bezüglich Propionat teilweise auch in Form von Alanin (Bergman 1990). Die Reduzierung des Anteils der in die Blutbahn abgegebenen underivatisierten Fettsäuren, insbesondere von Butyrat, hängt wahrscheinlich mit der zellschädigenden Wirkung von Fettsäuren mit mehr als zwei Kohlenstoffatomen zusammen (Remond et al. 1995). Insgesamt haben die oxidativen Prozesse in der Pansenwand einen Anteil am Gesamtsauerstoffverbrauch von etwa 15%, während die nachfolgenden Verdauungsabläufe und die Leber je nach umsetzbarer Energie im Futter und der Futteraufnahme einen Anteil von 16-29% und 17-31% am Gesamtsauerstoffverbrauch haben (Ortigue & Vissière 1995). Damit kann der Anteil am

Gesamtsauerstoffverbrauch durch den Verdauungstrakt und die Leber während einer Futteraufnahme auf 60% steigen. Das erfordert eine Sauerstoffanlieferung, die vor allem durch einen Anstieg im Blutfluss durch diese Organe, teilweise auch durch eine intensivere Sauerstoffaufnahme (Sauerstoffextraktion) gewährleistet wird (Ortigues & Visseiche 1995).

Für Organe, die nicht an Verdauungsabläufen beteiligt sind, sind die Informationen zum Zusammenhang zwischen Blutflussreaktion auf die Futteraufnahme und oxidative Stoffwechselintensität uneinheitlich, z.T. widersprüchlich. In einer Übersichtsarbeit (Ortigues & Visseiche 1995) wurde berichtet, dass die Höhe an umsetzbarer Energie in der Diät auf den Blutfluss durch die Hintergliedmaßen des Rindes keinen Einfluss hat, während in anderen Experimenten eine signifikante Wirkung zu beobachten war. Der oxidative Stoffwechsel im Skelettmuskel ist infolge autonomer und systemischer Blutflusskontrollen komplex reguliert (Ye et al. 1995), so daß die experimentellen Bedingungen das Ergebnis wesentlich beeinflussen. Dennoch kann allgemein angenommen werden, daß die Sauerstoffanlieferung über den Blutfluss und der Sauerstoffpartialdruck des Blutes ein wesentliches System zur Regulierung der thermogenen Aktivität der Gewebe, einschließlich der Skelettmuskulatur, darstellt (Elia 1995).

Die Oxidation von Glukose, Fettsäuren, Aminosäuren und Ketokörper liefert verschiedene Mengen an ATP bei unterschiedlichem Sauerstoffverbrauch (DiPrampo 1981). Die Oxidation von sauerstoffreichen Kohlenhydraten und Azetat erfordert eine geringere Sauerstoffanlieferung als die Oxidation sauerstoffarmer länger- und langkettiger Fettsäuren. Gewebe, die vorrangig diese Fettsäuren für die oxidative Energieumwandlung nutzen, haben deshalb einen höheren Blutversorgungsbedarf als Gewebe, die Kohlenhydrate oxidieren. Die aerobe ATP- Gewinnung wird jedoch durch die Verfügbarkeit an Sauerstoff begrenzt. Dieser Begrenzung wirken verschiedene Mechanismen entgegen. Durch Untersuchungen der Skelettmuskulatur als auch anderer Gewebe wurde nachgewiesen, dass ein Sauerstoffmangel zur Vasodilatation führt (Wei et al. 1993). Bei Verringerung des Sauerstoffpartialdruckes kommt es deshalb sowohl zu einem erhöhten Blutfluss als auch zu einer Steigerung der Laktatproduktion im Muskel (Hogan & Welch 1986). Der Blutfluss wird somit durch lokale sauerstoffabhängige Mechanismen beeinflusst, wobei die Kapillaren als Sensoren wirken, die bei

Sauerstoffmangel vasodilatatorische Signale an die Arteriolen senden (Jackson 1993). Fasten verringerte den Sauerstoffverbrauch, die Kohlendioxid- und Methanproduktion sowie die Wärmeproduktion, die Herzfrequenz und den Blutfluss durch die Leber, durch die Portalvene und durch die Hinterviertel von Jungbullern (Eisemann & Nienaber 1990). Eine proportionale Steigerung des Blutflusses bei einer Erhöhung der Aufnahme an umsetzbarer Energie im Futter wurde in der A. iliaca bei wachsenden Schafen nachgewiesen (Harris et al. 1992). Die Reaktionen werden zumindest teilweise endokrin geregelt. Eine Steigerung des Blutflusses im Hinterbein bei laktierenden Kühen um 29 bis 52% wurde bei einer Infusion von Insulin beobachtet (Bequette et al. 2001). Dieses Hormon scheint demnach nicht nur die Glukoseaufnahme durch Zellen, sondern auch den Glukosetransport zu den Zellen zu fördern. Die kardiovaskuläre Aktivität als auch der gewebliche Blutfluss stehen nach diesen Befunden mit dem Gesamtstoffwechsel und mit der Wärmeproduktion in Beziehung.

Die kardiovaskuläre Komponente dieser Beziehung deutet darauf hin, dass eine zentrale Regulation der peripheren Regulation übergeordnet zu sein scheint. Dies steht im Einklang mit experimentellen Ergebnissen, die zeigen, dass thermoregulatorisch notwendige Veränderungen vom Zentralnervensystem gesteuert werden. Die Regulation kann durch direkt im ZNS erzeugte Signale verlaufen, oder die Signalproduktion wird durch Aktivitäten des ZNS über peripher-sympathische Innervationen des Endokrins (Nebenniere) oder über die Hypothalamus-Hypophyse-Achse veranlaßt. Die Anpassung des Stoffwechsels an körperliche Belastung erfolgt primär über das vegetative Nervensystem. Muskelarbeit geht mit einer erhöhten Aktivität des vegetativen Nervensystems einher, die mit einer vermehrten Ausschüttung von Noradrenalin verbunden ist (Franz et al. 1982). Die neuronale Aktivität regt zugleich die Nebenniere zur Sekretion von Adrenalin an. Der Anstieg der Katecholamine wird von Zellen wahrgenommen, die über  $\alpha$ - und/ oder  $\beta$ - Adrenorezeptoren verfügen. Das  $\alpha$ - und  $\beta$ -Adrenorezeptorsystem spielt eine entscheidende Rolle in der Regulation des Sauerstoffverbrauches (Carlisle & Stock 1993), in der Regulation der Wärmeabgabe durch Veränderung des peripheren Blutflusses (Berlan et al. 1994) sowie der Kontrolle der Konzentration von Glukose und Fettsäuren in der Zirkulation (Santi et al. 1994). So haben genannte Rezeptoren nicht nur Einfluß auf Thermoregulation, Sauerstoffverbrauch und zirkulative Aktivität, sondern sie kontrollieren auch die Futteraufnahme (Chen & Romsos 1995). Dadurch übt das sympathische Nervensystem im Wechsel mit dem adrenergen

System eine zentrale Funktion in der Regulation der Wärmeproduktion aus (Landsberg & Young 1983). Werden Jungbullen mit dem  $\alpha$ - Adrenozeptoragonisten Clonidin behandelt, verringert sich die zirkulative Aktivität sowie die Wärmeproduktion und erhöht sich der Glukosespiegel (Löhrke et al. 1997), wahrscheinlich infolge eines Abfalls der Glukosenutzung für den oxidativen Stoffwechsel. Diese Reaktion erwies sich als stark abhängig von der Umgebungstemperatur und der Ernährungsintensität. Die Herzfrequenz und die Wärmeproduktion wurde bei niedriger Umgebungstemperatur und intensiver Ernährung stärker durch Clonidin ausgelenkt als bei thermoneutralen Temperaturen und restriktiver Zufuhr von umsetzbarer Futterenergie. Der enge Zusammenhang zwischen Herztätigkeit und Wärmeproduktion wurde als Hinweis auf eine sympathisch nervöse Steuerung der wärmeproduzierenden Prozesse gedeutet, da bekannt ist, dass die Aktivität der sympathischen Neurone maßgeblich an der Steuerung des kardiovaskulären Systems beteiligt ist, auf der einen Seite direkt über neuronale elektrische Aktivitäten, auf der anderen Seite indirekt über Noradrenalin (Gu et al. 1992). Die Katecholamine wirken über adrenerge Rezeptoren der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Typen, die oft zusammen auf der Oberfläche eines Zelltyps auftreten. Die Affinität von  $\alpha_2$  über  $\alpha_1$  zu  $\beta$ -Rezeptoren zu Katecholaminen nimmt ab, so daß die Katecholaminkonzentration den aktivierten Rezeptortyp bestimmt. Die energiebereitstellende Wirkung der Katecholamine in relativ hoher Konzentration verläuft über die  $\beta$ -Rezeptor-vermittelte Anregung der Lipolyse und Glykogenolyse (Friedholm 1985).

Die Bindung an  $\alpha$ -Rezeptoren bewirkt in einigen Geweben eine Vasokonstriktion (Belfrage 1985). Im perfundiertem Muskel geht sie mit einem Anstieg im Sauerstoffverbrauch einher (Ye et al. 1995), und beide Reaktionen werden durch  $\alpha_1$ -Antagonisten aufgehoben. Im katecholaminangeregten und im Ruhezustand scheint der Sauerstoffgehalt des Blutes und daraus folgend die zentrale und gewebliche Blutzirkulation eine entscheidende Regelgröße der thermogenen Aktivität von Muskelgeweben zu sein. Die sensorischen Fähigkeiten der Kapillaren, bei Sauerstoffmangel vasodilatatorische Signale an die Arteriolen zu senden (Jackson 1993), beschränkt sich aber nicht nur auf Sauerstoff.  $K^+$ ,  $H^+$  und Adenosin wirken ebenfalls vasodilatatorisch, während Noradrenalin, Vasopressin und vasoaktives intestinales Peptid als Vasokonstriktiva gelten (Dietrich & Tyml 1992, Ye et al. 1995). Bei hoher metaboler Aktivität und Sauerstoffmangel reichern sich die vasodilatatorischen Signale in den Kapillaren an und fördern den Blutfluß über die Aktivierung des kapillären Sensorsystems (Song & Tyml 1993).

Die Sensoren wirken auf die Kapillaren derart, dass sie eine Hyperpolarisierung oder Depolarisierung der Kapillarzelle bewirken, wobei die elektrische Aktivität im folgenden von Zelle zu Zelle bis zu den Arteriolen übertragen wird. An der Polarisierung und der Depolarisierung von Herzmuskelzellen sind maßgeblich ATP-sensitive K-Kanäle in der Zellmembran beteiligt (Hilgemann et al. 1996). Ihre Aktivität wird über den intrazellulären Gehalt an ATP und dem Verhältnis ATP/ADP nahe der Zelloberfläche gesteuert. Bei Verringerung dieses Verhältnisses reagieren sie mit einem Ausstrom von Kaliumionen. Dieser Ausstrom führt zu einer Hyperpolarisation der Zelle, Abfall von zytosolischem Kalzium und folglich zur Relaxation.

## 2.2. ATP-sensitive K-Kanäle

### 2.2.1 Vorkommen

ATP-sensitive K-Kanäle (K<sub>ATP</sub>-Kanäle) sind in einer Vielzahl von Geweben und Zellen nachweisbar. Die Kanäle wurden erstmals in den Muskelzellen des Herzens beschrieben (Noma 1983). Daraufhin folgte der Nachweis der Kanäle in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas (Cook & Hales 1984), in der glatten (Standen et al. 1989) und in der Skelettmuskulatur (Spruce et al. 1985), im Gehirn (Ashford et al. 1988), im Nierengewebe (Hunter & Giebisch 1988) sowie in den Mitochondrien (Inoue et al. 1991). Im Gehirn kommen K<sub>ATP</sub>-Kanäle in der Hypophyse (Bernardi et al. 1993), im Hippocampus (Zawar et al. 1999), in der Rinde (Jiang & Haddad 1997) sowie im Hirnstamm (Pierrefiche et al. 1996; Karschin et al. 1998) vor.

### 2.2.2 Struktur von K<sub>ATP</sub>-Kanälen

K<sub>ATP</sub>-Kanäle entstehen durch die Kombination porenbildender Kir-Proteine mit regulativen Proteinen (Clement et al. 1997, Gross et al. 1999), den Sulfonylharnstoffrezeptoren. Die Proteine sind in Membranen von Mitochondrien und der Zellhülle (Plasmamembran) zur Regulation ihrer Ionendurchlässigkeit integriert (Hu et al. 1999). Die regulativen Proteine weisen Rezeptoreigenschaften auf, d.h. sie binden Liganden. Native Liganden sind ATP und Nukleosiddiphosphate (NDP), vor allem ADP, GDP, UDP, während Sulfonylharnstoffe pharmakologische Liganden darstellen. Infolge

ihrer Fähigkeit, Sulfonylharnstoffe zu binden, werden diese Proteine als Sulfonylharnstoffrezeptoren (SUR) bezeichnet (Yokoshiki et al. 1998).

### 2.2.3 Kir-Proteine

Die porenbildende Proteine (Tabelle 1) sind nach ihren elektrophysiologischen Eigenschaften benannt worden (Kir = inward rectifying  $K^+$  current). Ihre Einteilung in Gruppen erfolgt anhand der Ergebnisse der Klonierung der Gene, die sie kodieren, in Kir1.X – 6.X Typen (Clement et al. 1997). Die Zahlennomenklatur widerspiegelt eine bestimmte Kir-Kombination, d.h., es können sowohl homo- als auch heteromere Kombinationen auftreten (Doupnik et al. 1995, Nichols et al. 1996, Liss et al. 1999). Einige dieser Kombinationen bilden auch Verbindungen mit SUR (Tabelle 1).

**Tabelle 1.: Kir- Typen in nativ auftretender SUR- Kombination**

<b>Kir-Typ</b>	<b>Vorkommen</b>	<b>Aktivierung durch</b>	<b>Konduktivität<sup>a</sup></b>	<b>Literatur</b>
1.1	Nierenepithel	MgATP Hydrolyse	31 pS	1)
3.4	Herz	ATP Hydrolyse UDP	70 pS	2)
6.1	Aorta, glatte Muskulatur Nierenepithel Pankreas, Herz	ATP Hydrolyse Diazoxid	( 70 pS)*	3), 4), 5)
6.2	Pankreas Herz Vaskulatur	ATP. Hydrolyse Diazoxid	*	6), 7)

\* Kir6.1/6.2 bilden wahrscheinlich nur in Kombination mit SUR  $K^+$ -Poren.

<sup>a</sup> 140-150mM  $K^+$ , symmetrisch

1) Ho et al. 1993

2) Ashford et al. 1994

3) Surah- Narwal et al. 1999

4) Quast 1996

5) Ämmälä et al.1996

6) Inagaki et al. 1996

7) Isomoto et al. 1996

#### 2.2.4 SUR-Proteine

In unmittelbarer Nachbarschaft zu den Kir- Proteinen sind die Sulfonylharnstoffrezeptoren lokalisiert. Diese Rezeptorproteine wurden in Formen untergliedert, die nach den Hauptexpressionsgeweben bzw. -organen bezeichnet wurden. Aufgrund der Strukturunterschiede entstehen Besonderheiten in Bindungseigenschaften bezüglich pharmakologischer oder nativer Liganden (Tabelle 2).

Die pankreatische SUR1 cDNA Sequenz kodiert ein Protein mit 1582 Aminosäuren bzw. einer relativen Molekülmasse von 177 kDa. Das SUR1 Protein enthält zwei Nukleotidbindungsstellen auf der zytoplasmatischen Seite. Das NH<sub>2</sub>-Ende des Proteins ragt in den extrazellulären Bereich hinaus und verbindet zwei Domänen, die wahrscheinlich aus neun und vier transmembranen Windungen gebildet werden. Die letztere Domäne trennt die beiden Nukleotidbindungsstellen (Aguilar- Bryan et al. 1995). Gegenwärtig wurde gezeigt, daß Hypothalamusneurone (und Neurone des Mittelhirns) eine SUR1 -Form exprimieren, der die zweite Nukleotidbindungsstelle fehlt (SUR1  $\Delta$ 33). Dadurch wird der SUR1  $\Delta$ 33 - Kir6.1 -Typ K<sub>ATP</sub>-Kanal unempfindlich gegen [MgATP], insensitiv gegenüber [ATP]<sub>i</sub>, bleibt aber gegenüber antidiabetischen Sulfonylharnstoffen sensitiv (Sakura et al. 1999).

SUR2B ist ein Protein mit 1456 Aminosäuren. Sie sind zu 97% mit der Aminosäuresequenz der SUR2A -Form identisch, aber nur zu 67% mit der SUR1 -Form. Der heterologe SUR2B Teil der Aminosäuresequenz umfasst 42 Aminosäuren, welche am COOH- terminalen Ende lokalisiert sind. Dieser Teil ist nahezu homolog mit der entsprechenden Sequenz von SUR1. Die homologe SUR2B- SUR1- Sequenz wird deshalb als die diazoxidbindende Region angesehen, da K<sub>ATP</sub>-Kanäle mit diesen Rezeptorformen eine ähnliche Empfindlichkeit gegenüber Diazoxid erlangen (Isomoto et al. 1996).

Die regulativen Eigenschaften von SUR-Formen wurden mit physiologischen Funktionen in Verbindung gebracht, die in der Tabelle 2 dargestellt sind.

**Tabelle 2: Expression und Funktion von SUR- Formen**

<b>Zellen/ Gewebe</b>	<b>SUR- Formen</b>	<b>Funktion</b>	<b>Literatur</b>
<b>Endokrines System</b>			
Pankreas- Inselzellen	SUR1	Einstellung des Basalpotentials Schließung→Depolarisation→	Chutkow et al. 1996
	SUR2	Ca <sup>2+</sup> Einstrom→Sekretion	Isomoto et al. 1996
Pankreas- Vaskulatur	SUR1	Vasodilatation ?	Yokoshiki et al. 1998
Ovarien, Testis, Nebenniere Adenohypophyse		Depolarisierung→Ca <sup>2+</sup> Anstieg→ Hormonsekretion	Bernardi et al. 1993
<b>Verdauungstrakt</b>			
Magen	SUR2B	Schließung→Depolarisierung	Mangel et al. 1994
Dünndarm	SUR2B	→CCK-freisetzung	Inagaki et al. 1996
Colon	SUR2B	( Vasodilatation? )	Isomoto et al. 1996
<b>Gehirn</b>			
		Öffnung→Hyperpolarisierung der präsynaptischen Membran	Heurteaux et al. 1995
Cerebellum	SUR2A	Hemmung der Freisetzung von	Isomoto et al. 1996
Vorderhirn	SUR2B	Neurotransmittern	Isomoto et al. 1996
Hippocampus	SUR2	ATP/ Adenosinfreisetzung	Heurteaux et al. 1995
Hypophyse	SUR2	Depolarisierung→STH Freisetz.	Bernardi et al. 1993
<b>Skelettmuskel</b>			
	SUR2A	Hyperpolarisation	Chutkow et al. 1996
	SUR2B	Hemmung spontaner Kontraktionen Anstieg der Kontraktionsstärke	
<b>Arterien/ Venen</b>			
Endothel/ glatte Muskulatur	SUR2B	Öffnung→Vasodilatation Hyperpolarisation→K <sup>+</sup> - Aus- Strom Basalpotentialeinstellung	Dunne et al. 1990 Newgreen et al. 1990 Kuo & Chancellor 1995 Katnik & Adams 1997
<b>Herz</b>			
Ventrikel	SUR2A	Verkürzung der Aktionspotentiale Hemmung der Ca <sup>2+</sup> - Aufnahme und der Kontraktionsaktivität	Isomoto et al. 1996
<b>Milz</b>			
	SUR2B	Vasodilatation ?	Isomoto et al. 1996
<b>Niere</b>			
	SUR2B	Hyperpolarisation; Hemmung der Ca <sup>2+</sup> Aufnahme→Reninsekretion Reabsorption von Elektrolyten	Isomoto et al. 1996 Quast et al. 1996
<b>Lunge</b>			
Vaskulatur	SUR2	Vasodilatation	Hassessian et al. 1993
<b>Leber</b>			
Vaskulatur	SUR2B	Vasodilatation	Inagaki et al. 1996 Chutkow et al. 1996 Isomoto et al. 1996

### 2.2.5 Kir-SUR-Kombinationen

Native K<sub>ATP</sub>-Kanäle bestehen aus einem Komplex, gebildet durch zwei Untereinheiten (SUR- und Kir-Proteine). Diese Proteine sind heteromultimer angeordnet. SUR-Proteinen fehlt die Porenregion für Kaliumionen. Somit sind sie rein regulative Proteine und können allein keinen funktionierenden Kanal bilden. Bei Kir-Untereinheiten ist die Bildung eines funktionierenden Kanals bisher umstritten, theoretisch wäre ein Kanal ohne SUR-Einheiten denkbar. Charakteristika der verbreitetsten SUR- Kir- Kombinationen sind in der Tabelle 3 zusammengestellt.

**Tabelle 3: Eigenschaften von K<sub>ATP</sub>-Kanalformen**

<b>Kombination</b>	<b>Konduktivität pS</b>	<b>Hemmung durch ATP μM</b>	<b>Hemmung durch Sulfo- nylharnstoffe</b>	<b>Anregung durch Kanalöffner</b>	<b>Literatur</b>
SUR1 + Kir 6.2	56-76	10-28	G, T	D, P	1), 2), 3), 4), 5), 6), 7), 8), 9)
SUR1 + Kir 6.1	22-50	>1000	G, T	D	26), 27), 29)
SUR 2A + Kir 6.2	79	~100	G	C (schwach)	10), 11), 12), 13), 14), 15), 16), 17)
SUR2B + Kir 6.1	15-50	>1000 <100	G	P	18), 19), 20), 21), 22), 23), 24), 25),
SUR2B + Kir 6.2	80	20-300	G, T	D, P	26), 28)

**G** = Glibenclamid; **T** = Tolbutamid

**C** = Chromakalim; **D** = Diazoxid; **P** = Pinacidil

- |                         |                           |                               |
|-------------------------|---------------------------|-------------------------------|
| 1) Ämmälä et al. 1996   | 11) Kakei et al. 1985     | 21) Dart et al. 1995          |
| 2) Gribble et al. 1997  | 12) Nakaya et al. 1991    | 22) Kajioka et al. 1991       |
| 3) Gribble et al. 1997  | 13) Noma et al. 1983      | 23) Kubo et al. 1994          |
| 4) Misler et al. 1986   | 14) Trube et al. 1984     | 24) Yokoshiki et al. 1997     |
| 5) Rorsman et al. 1985  | 15) Tung et al. 1991      | 25) Zhang & Bolton 1995       |
| 6) Trube et al. 1986    | 16) Yokoshiki et al. 1997 | 26) Zhang & Bolton 1996       |
| 7) Nichols et al. 1996  | 17) Yamada et al. 1997    | 27) Surah- Narval et al. 1999 |
| 8) Sakura et al. 1995   | 18) Beech et al. 1993     | 28) Isomoto et al. 1996       |
| 9) Inagaki et al. 1995  | 19) Beech et al. 1993     | 29) Skatchkov et al. 2002     |
| 10) Inagaki et al. 1996 | 20) Dart et al. 1993      |                               |

### 2.2.6 Pharmakologische Eigenschaften von K<sub>ATP</sub>-Kanälen

K<sub>ATP</sub>-Kanäle sind therapeutische Ziele bezüglich Bluthochdruck, Herzrhythmusstörungen und diabetischer Erkrankungen. Der Schwerpunkt beim Einsatz von Modulatoren der K<sub>ATP</sub>-Kanäle ist die Behandlung beim Diabetes. Für die Therapie arrhythmischer Herzkontraktionen (Wirth et al. 1999) und für die Diabetestherapie (Shimoni et al. 1998) werden Sulfonylharnstoffe eingesetzt. Einige von ihnen haben eine hohe Affinität zu der pankreatischen SUR- Form (Tabelle 4). Sie können dadurch in niedriger Dosis eingesetzt werden (Belles et al. 1987) und hemmen dann selektiv die K<sub>ATP</sub>-Kanal-Aktivität von pankreatischen Inselzellen. Da diese Aktivität das Ruhepotential von diesem Zelltyp bestimmt, depolarisieren die Zellen. Dadurch werden potentialabhängige Ca<sup>2+</sup>-Kanäle aktiviert. Depolarisation und Ca<sup>2+</sup>-Einstrom führen dann zur Insulinsekretion (Ashcroft et al. 1984, Dunne et al. 1986, Trube et al. 1986). Eine weitere Verwendungsmöglichkeit von K<sub>ATP</sub>-Öffnern ist der Einsatz bei der Therapie von Bronchospasmen, verabreicht über Aerosole.

Die zahlreichen Untersuchungen zur Reaktion von Herzmuskelzellen auf Pharmaka, die offensichtlich über die Beeinflussung der K<sub>ATP</sub>-Aktivität wirken, haben kein einheitliches Bild über die Wirkungsweise ergeben (Yokoshiki et al. 1998). Unterschiedliche Herangehensweisen für die Charakterisierung der K<sub>ATP</sub>-Kanal-Aktivität (Einzelkanalmessungen oder Erfassung der ATP-sensitiven K<sup>+</sup>-Konduktivität intakter Zellen) scheinen hierfür die Gründe zu sein (Shimoni et al. 1998, Yokoshiki et al. 1998). Wahrscheinlich sind die K<sub>ATP</sub>-Kanäle aus normalen Herzen geschlossen infolge der hohen intrazellulären ATP- Konzentration [ATP]<sub>i</sub>. Bei mangelnder Sauerstoffversorgung (Ischämie), die zum Anstieg von [NDP]<sub>i</sub> und Abnahme von [ATP]<sub>i</sub> führt, werden sie geöffnet. Dadurch wird die Aktionspotentialdauer verkürzt. Das hat eine Verringerung des Ca<sup>2+</sup>- Einstroms und der Kontraktionen zur Folge (Terzic et al. 1995). Die Aktivierung des K<sub>ATP</sub>-Kanals durch einige Pharmaka, welche den K<sub>ATP</sub>-Kanal öffnen (Tabelle 4), führt zu einem ähnlichen Effekt. Zu den Prototypen für eine K<sub>ATP</sub>-Kanalöffnung gehören Pinacidil (ein Pyridinabkömmling), Diazoxid (ein Benzothiadiazin bzw. Sulphonamid) und Cromakalim (ein Benzopyranderivat). Jedoch werden K<sub>ATP</sub>-Kanäle in Kardiomyozyten nur von Pinacidil und von Cromakalim und dessen aktives Enantiomer (Levcromakalim) geöffnet (Escande et al. 1988, Inagaki et al. 1996). Sulfonylharnstoffe sind Antagonisten für diese Reaktion (Quast & Cook 1989), wenn sie in einer Dosis eingesetzt werden, die

100-500 mal höher ist als die Dosis, die eine Reaktion von pankreatischen Zellen auslöst (Tabelle 4). Verwendet werden K<sub>ATP</sub>-Kanal-Öffner als blutdrucksenkende Pharmaka. Diese Wirkungsweise ist wahrscheinlich auf eine Hyperpolarisation von glatten Muskel- und Endothelzellen aus arteriellen und venösen Gefäßen zurückzuführen (Olesen et al. 1988, Newgreen et al. 1990, Hassessian et al. 1993). Im Gegensatz zu Herzzellen werden die K<sub>ATP</sub>-Kanäle dieser Zelltypen auch von Diazoxid geöffnet. Gemessen am K<sup>+</sup>-Ausstrom (Newgreen et al. 1990) und am Blutdruck (Quast & Cook 1989) wirkt Cromakalim jedoch etwa 100-fach stärker als Diazoxid. Die halbmaximale antagonistische Wirkung von Glibenclamid (IC<sub>50</sub>) tritt in vitro bei etwa 0,1 μM in Erscheinung, während in vivo eine deutlich höhere Glibenclamiddosis erforderlich ist (Quast & Cook 1989). Diese Befunde bildeten die Grundlage für die nachfolgend beschriebenen Experimente zur Aufhebung der Effekte, die infolge der Öffnung von K<sub>ATP</sub>-Kanälen durch Levromakalim erschienen, über Glibenclamid.

Die Wirkungen von Cromakalim verlaufen nicht über eine Veränderung in der intrazellulären Konzentration zyklischer Nukleosidmonophosphate, cAMP oder cGMP (Newgreen et al. 1990). Die durch Hyperpolarisation induzierte Vasodilatation von glatten Muskelzellen intakter Portalvenen und arterieller Gefäße (Quast & Cook 1989) ist resistent gegenüber Hemmern von Cyclooxygenasen (Rubanyi et al. 1986) und empfindlich gegenüber einer Entfernung des Endothels (Smiesko et al. 1985). Endothelzellen produzieren vasodilatatorisches NO (Rubanyi et al. 1986) und andere vasodilatatorische Substanzen, die in Reaktion auf verschiedene Stimuli freigesetzt werden (Ralevic et al. 1992). Bezüglich der pharmakologischen Öffnung der K<sub>ATP</sub>-Kanäle spielen insbesondere die Freisetzung von ATP und Adenosin durch das Gefäßendothel eine Rolle (Hassessian et al. 1993). Die Blockade von K<sub>ATP</sub>-Kanälen des Endothels führt zu einer verringerten Ausschüttung von ATP, das an extrazelluläre Purinrezeptoren der Gefäßmuskulatur bindet und über diskutierte Mechanismen zu einer Vasodilatation führt. Ein Anstieg der intrazellulären ATP-Konzentration hätte eine Schließung des Kanals mit nachfolgender Depolarisierung und Vasokonstriktion zur Folge. Zum Nachweis eines spezifischen Zusammenhanges zwischen Vasodilatation und dem daraus folgenden verstärkten Blutfluß einerseits und der pharmakologischen Öffnung der K<sub>ATP</sub>-Kanäle andererseits ist es deshalb erforderlich, zu zeigen, daß die Effekte, die bei Verabreichung eines K<sub>ATP</sub>-Öffners in vivo entstehen, durch einen selektiven K<sub>ATP</sub>-Inhibitor (bisher gilt Glibenclamid als der effektivste und relativ selektivste Inhibitor) aufgehoben oder zumindest signifikant abgeschwächt werden.

Tabelle 4: Pharmakologische Eigenschaften von KATP- Kanälen

Form	Hauptex- pressions- ort	Weitere Ex- pressions- orte	Reaktion auf				
			Aktivatoren				Inhibitoren (IC 50)
			Diazoxid	Pina- cidil	Cromakalim	NDP	Glibencla- mid
SUR1	Pankreas	Gehirn Endokrinum Fett, Herz <sup>12),13)</sup>	++	±	(±)+ <sup>3)</sup>	5 <sup>4)</sup> -100nM <sup>2)9)</sup>	10-40µM <sup>11)</sup>
SUR1Δ33	Hypotha- lamus	Mittelhirn <sup>12)</sup>	±		± <sup>12)</sup>	ca. 10nM <sup>12)</sup>	86µM <sup>12)</sup>
SUR2A	Herz	Skelettmuskel <sup>6)</sup> ZNS-Neurone Pankreas (Ratte) <sup>2)3)</sup>	±	++	+ <sup>5)7)9)10)</sup>	1µM <sup>11)</sup>	40-80µM <sup>1)</sup>
SUR2B	Glatte Muskeln (Vaskulatur, Magen, Darm)	Endothel	+(+)	++	72µM <sup>4),6)</sup>	0,1µM <sup>9)</sup> 1µM <sup>11)</sup>	30µM <sup>8)</sup> 70-300µM <sup>6)</sup>

++ = starke Reaktion; + = schwache Reaktion; ± = keine Reaktion

- |   |                                     |
|---|-------------------------------------|
| 1) Shimoni et al. 1998 (40µM in Diabetes-Cardiozyten) | 7) Terzic et al. 1995               |
| 2) Inagaki et al. 1996                                | 8) Zhang & Bolton 1996 (Portalvene) |
| 3) Dunne et al. 1990                                  | 9) Quast & Cook 1989 (in vitro)     |
| 4) Standen et al. 1989                                | 10) Sakura et al. 1995              |
| 5) Escande et al. 1988                                | 11) Nagao et al. 1996 (in vivo)     |
| 6) Isomoto et al. 1996 (70µM ATP, 300µM MgATP)        | 12) Sakura et al. 1999              |

### 2.2.7 Elektrophysiologische Charakteristik der KATP-Kanäle

Die Aktivität von KATP-Kanälen verläuft nicht zeitabhängig und wird nur gering vom Membranpotential beeinflusst. Die Kanäle weisen bei Depolarisation und Öffnung einen aus der Zelle gerichteten K<sup>+</sup> - Strom auf. Die Öffnung der pankreatischen und Herzmuskel-Kanäle erfolgt plötzlich bei Entfernung von ATP während Patch- clamp- Messungen, während Kanäle in vaskulären glatten Muskelzellen nur schwach auf eine ATP-Verringerung reagieren. Die in unterschiedlichen Geweben gefundenen divergenten

Kanaltypen unterscheiden sich weiterhin in ihrer Leitfähigkeit. K<sub>ATP</sub>-Kanäle in pankreatischen Inselzellen weisen eine Leitfähigkeit von 56 – 75 pS auf ( Misler et al. 1986, Rorsman et al. 1985, Trube et al. 1986), in Herzmuskelzellen beträgt sie etwa 80 pS bei einer symmetrischen K<sup>+</sup>- Konzentration von 140 – 150 mM (Tabelle 3). Die Angaben über die elektrophysiologischen Eigenschaften von vaskulären glatten Muskelzellen sind uneinheitlich. Die Dichte der K<sub>ATP</sub>-Kanäle in diesen Zellen beträgt nur 1/10 der Dichte in Herzmuskelzellen, was die elektrophysiologischen Erhebungen erschwert (Yokoshiki et al. 1998). Glatte Muskelzellen von der Ratte und dem Kaninchen zeigen eine ATP-inhibierbare K<sup>+</sup>- Leitfähigkeit von 100–258 pS (Furspan et al. 1993, Lorenz et al. 1992, Standen et al. 1989). Doch hemmt ATP auch Ca<sup>2+</sup>- aktivierte K<sup>+</sup>- Kanäle in glatten Muskelzellen der Coronararterie von Schweinen (Klockner et al. 1992, Silberberg et al. 1990). Möglicherweise sind deshalb in diesen Untersuchungen andere K<sup>+</sup>-Kanaltypen als K<sub>ATP</sub>-Kanäle gemessen worden (Edwards et al. 1993). Andererseits können multiple Leitfähigkeiten auf multiple K<sub>ATP</sub>-Isoformen hinweisen, wie sie in Myocyten von Portalvenen der Ratte auftreten (Nelson & Quayle 1995, Zhang & Bolton 1996).

Mehrere Studien haben gezeigt, daß die Leitfähigkeit von K<sub>ATP</sub>-Kanäle in vaskulären glatten Muskelzellen eine geringe (15 pS) oder eine mittlere Größenordnung (50 pS) aufweist (Beech et al. 1993, Dart et al. 1993, 1995, Kajioka et al. 1991, Kubo et al. 1994, Yokoshiki et al. 1997, Zhang & Bolton 1995, 1996). Sie kann durch Glibenclamid gehemmt und durch K<sub>ATP</sub>-Öffner und MgNDP aktiviert werden. Eine Aktivierung wird ebenfalls durch Hypoxie (Dart et al. 1995) oder metabole Hemmung (Beech et al. 1993, Zhang & Bolton 1995) evoziert. Im Vergleich zu Herzmuskelzellen scheint jedoch MgNDP statt ATP der entscheidende Regulationsfaktor für K<sub>ATP</sub>-Kanäle mit einer Leitfähigkeit zwischen 20 und 26 pS zu sein (Beech et al. 1993, Zhang & Bolton 1995, 1996). Unterstützt wird diese Auffassung dadurch, dass die Öffnung der Kanäle durch Pharmaka in vitro MgNDP erfordert, MgNDP alleine die Kanalaktivität anregt und eine ATP- Entfernung während Patch- clamp- Messungen keine Aktivierung nach sich zieht (Kajioka et al. 1991, Beech et al. 1993, Zhang & Bolton 1995, 1996, Yokoshiki et al. 1997). Wahrscheinlich sind für die elektrophysiologischen Unterschiede zwischen den K<sub>ATP</sub>-Kanälen des pankreatischen /myocardialen Typs und des Typs der glatten Muskulatur in Gefäßen sowohl Eigenschaften der SUR2B Isoform als auch der K<sub>ATP</sub>-Kanalformen, die durch Kombination mit Kir6.1/ Kir6.2 entstehen, verantwortlich (Gribble et al. 1997).

## 2.2.8 Regulation der ATP/NDP- sensitiven $K^+$ - Kanäle

### 1. Regulation über ATP/NDP

Herz- und pankreatische Kanalformen ähneln sich in ihrer ATP- Empfindlichkeit. Dagegen sind die Befunde über Kanalformen der vaskulären glatten Muskulatur uneinheitlich. Obwohl ihre Leitfähigkeit ebenfalls durch metabolische Inhibition (Beech et al. 1993, Zhang & Bolton 1995) oder Sauerstoffversorgung (Dart & Standen 1995) evoziert wird, scheint der intrazelluläre Spiegel an MgNDP (insbesondere ADP und GDP) der entscheidende, die Aktivität auslösende Faktor (zumindest für den 20 – 26 pS-  $K^+$ - Typ) zu sein (Beech et al. 1993, Zhang & Bolton 1995, Yokoshiki et al. 1997). Die Heterogenität in der Struktur innerhalb und zwischen verschiedenen Blutgefäßen erschwert die Bestimmung der Empfindlichkeit des Gefäßtyps gegenüber ATP und NDP. In arteriellen (A. mesenterica, Coronararterien) Gefäßen scheinen ATP/NDP- sensitive-  $K^+$ - Kanäle zusammen mit  $Ca^{2+}$ -regulierten  $K^+$ - Kanälen exprimiert zu werden (Silberberg et al. 1990, Edwards & Weston 1993). Venöse Gefäße (Myocyten der Portalvene) exprimieren multiple Formen in der Empfindlichkeit gegenüber ATP/NDP (Nelson & Quayle 1995, Zhang & Bolton 1996). Die Unterschiede in den elektrophysiologischen Eigenschaften werden deshalb auf die Heterogenität in den Kanaltypen zurückgeführt werden können (Yokoshiki et al. 1998).

### 2. Regulation über den intrazellulären pH-Wert ( $[pH]_i$ )

Die Öffnungswahrscheinlichkeit und die Konduktivität von Kanälen der Pankreas (Proks et al. 1994) und der Herzmyocyten (Cuevas et al. 1991, Shimoni et al. 1998) verringert sich mit einer  $[pH]_i$  Abnahme auf  $<6,8$  bei ATP- Mangel. Dagegen regt Acidose in Gegenwart von ATP die Kanalaktivität an, wahrscheinlich infolge ansteigender Stabilität von  $[ATP]_i$  (Kayano et al. 1993, Proks et al. 1994). Ob die pH-Abhängigkeit der Kanalaktivität eine Bedeutung für eine Diabetestherapie hat, die auf die Beeinflussung der Aktivität von  $KATP$ -Kanälen zielt, ist umstritten (Shimoni et al. 1998). Der mit einem Insulinmangel auftretende Abfall im  $[pH]_i$  von Herzmuskelzellen ist wahrscheinlich eher mit einer Beeinträchtigung der  $Na^+ / H^+$ - Austauscher zu erklären. Die höhere Stabilität von ATP bei  $pH < 7,0$  scheint dann die größere Unempfindlichkeit von diabetischen Herzmuskelzellen gegenüber einer ATP- Belastung zu erklären (Smith & Wahler 1996).

### 3. Beeinflussung über Hormone und Phosphorylierungen

Die Aktivität der  $K_{ATP}$ -Kanäle in Kardiomyocyten wird bei einer Unterfunktion der Schilddrüse gegenüber einer ATP- Inhibition insensitive (Jagdish et al. 1996, Light et al. 1998). Andererseits verringern Diabetesformen, die mit einem Insulinmangel einhergehen, in Herzmuskelzellen die halbmaximale Inhibitionskonstante für ATP (Shimoni et al. 1998). Hormone, deren Wirkung über G- Proteine verlaufen, können die ATP-Inhibition in Herzmuskelzellen (Kirsch et al. 1990, Terzic et al. 1995) und Neuronen (Terzic et al. 1994) abschwächen. Die Tabelle 5 fasst einige dieser Wirkungsweisen zusammen.

Die Kanaltypen unterscheiden sich hinsichtlich der Reaktion auf Phosphorylierung ihrer Strukturkomponenten. Eine Phosphorylierung des vaskulären Typs durch PKA oder PKG regt seine Aktivität an, während eine PKC- katalysierte Phosphorylierung hemmend wirkt (Nelson et al. 1995), wahrscheinlich infolge der Unterschiede in den phosphorylierten Domänen. In Herzmuskelzellen wird die Aktivität der  $K_{ATP}$ -Kanäle entweder angeregt oder gegenüber einer Anregung empfänglicher bei metabolischer Inhibition, wenn PKC aktiviert wurde (Liu et al. 1996, Hu et al. 1996). Doch sind diese Effekte von  $[ATP]_i$  abhängig. Eine Anregung wird bei  $\geq 1\text{mM}$   $[ATP]_i$  und eine Hemmung bei  $<100\mu\text{M}$   $[ATP]_i$  beobachtet (Light et al 1996). In insulinsekretierenden Zellen ist die Öffnung von  $K_{ATP}$ -Kanälen durch Diazoxid mit einer Proteinphosphorylierung verbunden (Dunne 1989). Da dieser Effekt für die Diabetestherapie von Bedeutung ist, sind die strukturellen Komponenten, die dem Reaktionsmechanismus zugrunde liegen, intensiv untersucht worden. Sowohl SUR1- als auch SUR2-Formen weisen potentielle Phosphorylierungsorte auf. SUR1 enthält 3 potentielle PKA und 20 PKC- Erkennungsmotive. Davon befinden sich 9 Motive in den beiden Nukleotidbindungsstellen. Zwei PKA- und 3 PKC Motive sind in der 2. (COOH- terminalen) Nukleotidbindungsstelle lokalisiert. Davon kann ein PKC Motiv durch Phosphorylierung die Nukleotidbindungseigenschaft ändern (Aguilar- Bryan et al. 1995). Das durch Phosphorylierung modifizierbare Potential der  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität bei einer Porenkombination mit SUR2B unterscheidet sich von SUR1. SUR2B weist 16 PKA und 2 PKC Erkennungsmotive auf, wovon 3 PKA Motive und 1 PKC Motiv in der terminalen Nukleotidbindungsregion lokalisiert sind (Isomoto et al. 1996). Da die PKA- Aktivität von Signalen, die den intrazellulären cAMP-Spiegel erhöhen (u.a. Katecholamine, Adenosin), angeregt wird, ist angenommen worden, daß die SUR2B- $K_{ATP}$ -Kanalaktivität im Gegensatz zur SUR1-  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität vorrangig über eine PKA- vermittelte Signaltransduktion modifizierbar ist (Yokoshiki et al. 1998).

Die Aktivierung von zentralnervösen- dopaminergen und zentralnervösen sowie peripheren noradrenergen Neurotransmittern bei bzw. nach Futteraufnahme kann deshalb eine Adaptation im Zellmetabolismus über eine die Kanalaktivität modifizierende SUR- Phosphorylierung unabhängig von einer Insulinsekretion auslösen. Eine hinreichende vasodilatatorische Funktion von SUR2B, deren Empfindlichkeit gegenüber NDP durch Phosphorylierung abnimmt, wird jedoch über eine Erhöhung der Anzahl an KATP-Kanälen ausgeglichen werden können. Werden die Kanäle pharmakologisch geöffnet, wird der vasodilatatorische Effekt und damit der Blutfluss höher sein als bei Expression einer geringeren Anzahl an KATP- Kanälen. Die Unterschiede in der Regulation zwischen SUR2B und SUR2A bzw. SUR1- Formen erschweren andererseits eine Vorhersage für die Reaktion des oxidativen Stoffwechsels.

**Tabelle 5: Physiologische Regulatoren der KATP- Kanal- Aktivität in ventrikulären Myocyten**

<b>Aktivator/ Modulator</b>	<b>Wirkung</b>	<b>Literatur</b>
T3	Hypothyroidose verringert die ATP- inhibitorische Sensitivität	Jagdish et al. 1996 Light et al. 1998
Insulin	Insulinmangel verringert ca. 2fach die halbmaximale inhibitorische ATP-Konzentration	Shimoni et al. 1998
[pH] <sub>i</sub>	Senkung des intrazellulären pH- Wertes von 7,4 auf 6,8 erhöht ca. 1,7fach die halbmaximale inhibitorische ATP-Konzentr.	Shimoni et al. 1998
Entzündungs- mediatoren	Anregung der Aktivität in Herzmuskel KATP- Kanälen PKC- katalysierte SUR- Phosphorylierung bei ATPi ≥1mM, Hemmung bei ATPi <50µm Hemmung der Aktivität vaskulärer Kanäle durch PKC	Hu et al. 1996 Light et al. 1996 Liu et al 1994, 1996 Nelson et al. 1995
Phosphatidylinositol Phosphorylierung	[ Plasmalemma Ca <sup>2+</sup> Pumpe; Phospholipase D ]	Hilgemann & Ball 1996
cAMP/ cGMP	G- Proteine/ SUR- Phosphorylierung	Furukawa et al. 1996 Ito et al. 1992 Aguilar- Bryan et al. 1995 Schwanstecher et al. 1992
Adenosin	A1- Rezeptoraktivierung Aktivierung von GTP- bindenden Proteinen	Kirsch et al. 1990 Terzic et al. 1995

## 2.2.9 Physiologische Rolle der ATP/NDP-sensitiven $K^+$ -Kanäle

### 1. Generelle Gesichtspunkte

Die Zellen des Säugetierorganismus bilden über ihre Zellmembran ein Potential aus, welches Voraussetzung für verschiedene physiologische Grundprozesse ist, z.B. als Triebkraft für transmembrane Transportprozesse. Dieses Potential entsteht durch unterschiedliche ionale Zusammensetzung intra- und extrazellulär und durch die (semi-) Permeabilität der Zellmembran. Intrazellulär besteht bei  $Na^+$  eine Konzentration von 5-20 mmol/l, bei  $K^+$  100-160mmol/l und bei  $Cl^-$  3-10mmol/l, extrazellulär  $Na^+$  140-150mmol/l, bei  $K^+$  3-5mmol/l und bei  $Cl^-$  100-130mmol/l. Dem zweiten Gesetz der Thermodynamik entsprechend haben Ionen die Tendenz, Konzentrationsgradienten abzubauen und sich mit konstanter Konzentration homogen im Raum zu verteilen. Dieser Bewegung werden aber durch die Zellmembran Schranken gesetzt, wobei die Membran nur eine selektive Passage bestimmter Ionen ermöglicht. Die Anreicherung von  $K^+$  und die Aufrechterhaltung einer niedrigen  $Na^+$ -Konzentration ist für eine normale Zellstofffunktion notwendig, denn  $K^+$  ist entscheidend an der Erstellung eines niedrigen Membranpotentials beteiligt. Deshalb hält die Zelle unter Aufwendung von Energie den intrazellulären  $K^+$ - und  $Na^+$ - Spiegel über eine  $Na^+/K^+$ -ATPase nahezu konstant. Diese ATPase transportiert entgegen dem elektrochemischen Gradienten  $Na^+$  aus der Zelle und  $K^+$  aus dem umgebenden Medium in die Zelle. Der Transport wird von einem Transporterprotein ausgeübt, das  $Na^+$  an der Innenseite der Membran aufnimmt, an der Außenseite abgibt und sich mit  $K^+$  belädt, welches wiederum an der Innenseite freigesetzt wird. Die Umwandlung in den  $Na^+$ -bindenden Zustand ist energiebedürftig. Die Energie wird über eine ATP-Hydrolyse durch eine Mg-abhängige,  $Na^+/K^+$ -ATPase (Kelly et al. 1993) oder andere, mit dem Ionenaustausch verknüpfte ATPasen bereitgestellt. Der Anteil am Gesamtenergieverbrauch beträgt in Geweben mit intensiver chemischer oder physikalischer Arbeit bis zu 50% der Gesamt-ATP-Produktion (Altman & Dittmer 1968).

Eine mangelnde Versorgung mit Sauerstoff kann deshalb zu einer Stoffwechselsituation führen, die das Überleben der Zellen aus diesen Geweben gefährdet. Die Überwindung einer solchen Situation wird auf zwei Wegen möglich. Zum einen trägt die Drosselung der intrazellulären Stoffwechselintensität, d.h. der ATP-Verbrauch, zu einer Verringerung des Sauerstoffverbrauches durch die Atmung bei. Zum andern wird ein hoher Antransport von Sauerstoff durch Erhöhung des Blutflusses über eine Vasodilatation die

Stoffwechselsituation normalisieren. Möglicherweise spielt die Aktivierung K<sub>ATP</sub>-Kanälen für die Auslösung dieser Reaktionen eine Rolle. Mehrere Argumente sprechen für eine solche Beteiligung der Kanäle.

K<sub>ATP</sub>-Kanäle sind sowohl in der Zellmembran als auch in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert (Hu et al. 1999, Hoy et al. 2000). Beide Membranen sind für Ionen über Ca<sup>2+</sup> oder potentialabhängige Kanäle und über komplex gebaute Transporter, die unter anderem pH, NO, G-proteine und ATP abhängig sein können, passierbar. Der Elektronenfluß der Atmungskette wird durch die Aktivität einer Pumpe, die Protonen in einer Richtung quer durch die Mitochondrienmembran pumpt, aufrechterhalten. Der entstehende pH-Gradient erzeugt ein negatives Membranpotential, das um so höher ist, je aktiver die Mitochondrien atmen (Wu et al. 1990). Eine Depolarisierung kann durch pharmakologische Öffnung der K<sub>ATP</sub>-Kanäle ausgelöst werden (Hu et al. 1999).

Zum anderen wird durch die Öffnung der ATP/ NDP- sensitiven K<sup>+</sup>- Kanäle in der Zelloberflächenmembran vasoaktives Adenosin oder ATP, das über extrazelluläre Nukleotidasen leicht zu Adenosin umgewandelt werden kann, freigesetzt. Diese Freisetzung ist sowohl bei Herzzellen (Kirsch et al. 1990, Haedrick 1996), im Zentralnervensystem (Heurteaux et al. 1995), in der Skelettmuskulatur (Vergauwen et al. 1994) als auch beim Endothel der Lungengefäße (Hassessian et al. 1993) nachgewiesen worden. Die vasodilatatorische Wirkung führt zu erhöhtem Blutfluss, damit zur verbesserten Versorgung mit Sauerstoff und Substraten.

Wahrscheinlich wird die Heterogenität der ATP/ NDP- sensitiven K<sup>+</sup>-Kanäle mit den verschiedenen adaptiven Reaktionen der unterschiedlichen Zelltypen in Verbindung stehen. Sie erfordern eine Koordination und eine differenzierte Regulation der Kanalaktivität, die sich in den Unterschieden in der Basalaktivität, in der Empfindlichkeit gegenüber ATP, NDP und Phosphorylierungen von Kanalbestandteilen widerspiegelt.

## 2. Pankreas

K<sub>ATP</sub>-Kanäle von pankreatischen Inselzellen im Basalzustand sind aktiv bei einem Blutglukosespiegel von 2-3mM. In diesem Zustand ist die intrazelluläre Konzentration an Mg-ADP relativ hoch, so dass die Proteinfalte für die Bindung von NDP im SUR1- Molekül

durch NDP okkupiert wird und die  $K^+$ -Durchlässigkeit anregen kann (Gribble et al. 1997). Die Aktivität stellt das Membranpotential in die Nähe des  $K^+$ -Gleichgewichtspotential ein. Dadurch reduziert sich die Anregbarkeit der Zellen zur Insulinsekretion. Der Anstieg der Blutglukose auf 5-7mM nach einer Mahlzeit lässt den intrazellulären ATP-Spiegel ansteigen. Die Erhöhung der intrazellulären ATP Konzentration bei gleichzeitiger Abnahme von MgADP veranlaßt die Schließung der  $K_{ATP}$ -Kanäle und depolarisiert die Plasmamembran der Inselzellen (Cook & Hales 1984, Gribble et al. 1997). Die Depolarisation aktiviert potentialabhängige  $Ca^{2+}$ - Kanäle. Der Anstieg der intrazellulären  $Ca^{2+}$ - Konzentration löst eine Exocytose der Insulingranula aus. Die Aufnahme von Insulin durch die pankreatischen Blutgefäße führt dann zur Erhöhung des zirkulierenden Insulin-Spiegels (Rorsman et al. 1985, Nichols et al. 1996).

### 3. Herz

Die Herzleistung (der durch die Herzarbeit erzeugte Blutfluss) ist mit der Sauerstoffaufnahme eng ( $r > 0,9$ ) und linear korreliert. Der Regressionskoeffizient beträgt  $5 \pm 11$  Sauerstoff je 11 Blut/min Pumpleistung und ist wenig von Geschlecht, Körpermasse, Arbeit und Trainingszustand abhängig (Detry et al. 1972, Hossack et al. 1981). Dagegen wird die Kapazität der Sauerstoffaufnahme von diesen Parametern deutlich beeinflusst. Die Energie für die Herzleistung wird in Kardiomyocyten aller Warmblüter fast ausschließlich durch Atmung bereitgestellt. Kardiomyocyten weisen deshalb normalerweise ständig einen hohen ATP- Gehalt auf. Dass das Plasmamembranpotential dennoch weitgehend von aktiven  $K_{ATP}$ -Kanälen bestimmt wird (Tung & Kurachi 1991, Terzic et al. 1995), hängt mit der hohen Insensitivität dieses Kanaltyps gegenüber ATP zusammen (Terzic et al. 1995, Wellman et al. 1999). An einer Aktivierung nehmen jedoch auch G- Proteine teil (Krapivinsky et al. 1995). Die Aktivierung dieser Proteine kann über Adenosinrezeptoren erfolgen (Kirsch et al. 1990). Die extrazelluläre Wirkung von ATP über Purinrezeptoren und G-proteinen steht in keinem Zusammenhang mit der intrazellulären Wirkung auf  $K_{ATP}$ . Durch die Öffnung von  $K_{ATP}$  - Kanälen kommt es zu einer Hyperpolarisation von Geweben, woraufhin es zur Sekretion von ATP kommt. Diese Sekretion verläuft nicht durch die Kanalpore, da diese selektiv für  $K^+$  ist. Die Öffnung von  $K_{ATP}$ - Kanälen ist durch Glibenclamid hemmbar (Hassessian et al. 1993). Die Hemmung verstärkt den coronaren Tonus (Samaha et al. 1992) und reduziert folglich den coronaren Blutfluss (Imamura et al. 1992). Die Reaktion weist darauf hin, dass zumindest im coronaren Gefäßsystem  $K_{ATP}$ -Kanäle unter physiologischen Bedingungen aktiv sind. Wahrscheinlich

stellen sie die basale Leitfähigkeit der Gefäßzellen ein und normieren damit den basalen vaskulären Tonus der Coronargefäße (Daut et al. 1994, Dellsperger 1996). Ob und inwieweit dadurch die Aktivität der  $K_{ATP}$ -Kanäle der Kardiomyocyten beeinflusst wird, ist nicht bekannt. Dagegen liegen zahlreiche Informationen über die Wirkung einer pharmakologischen Öffnung der Kanäle in Herzmuskelzellen vor (Murry et al. 1986, Gross et al. 1992, Schulz et al. 1994, Hu et al. 1996, Schaffer et al. 1999, Wellman et al. 1999). Der Aktivierung wird ein Schutz vor einer myokardialen Schädigung bei zeitweiser Sauerstoffunterversorgung (milde bis drastische Ischämie) zugeschrieben. Durch die Öffnung der  $K^+$  - Kanäle hyperpolarisiert das Membranpotential der Zelle, wodurch die Ausbildung eines Aktionspotentials und folglich die Öffnung der  $Ca^{2+}$  - Kanäle mit nachfolgender Kontraktion verhindert wird. Die resultierende Einsparung an ATP senkt den Sauerstoffverbrauch, so dass angiogene Reparaturmechanismen bezüglich der defizitären Zirkulation in Kraft treten können, einschließlich einer Aktivierung von PKC durch Entzündungsmediatoren (Hu et al. 1996, Light et al. 1996, Liu et al. 1994, 1996). Eine nachfolgende Wiederholung der ischämischen Situation wird bei einer Vorbehandlung mit  $K_{ATP}$ -Kanal-Öffnern schneller überstanden (ischämische Präkonditionierung). Durch  $K_{ATP}$ -Kanal-Inhibitoren (Tolbutamid oder Glibenclamid) wird die Reaktion abgeschwächt oder aufgehoben (Tomai et al. 1994, Cleveland et al. 1997). Wahrscheinlich steht deshalb die Aktivierung von  $K_{ATP}$ -Kanälen an zentraler Stelle in den zugrundeliegenden Mechanismen (Dart & Standen 1993, Kajioka et al. 1991, Zhang & Bolton 1995, Nagao et al. 1996). Im Gegensatz dazu und in Übereinstimmung mit der vermutlichen  $K_{ATP}$ -Kanal-Funktion fördert die Öffnung der  $K_{ATP}$ -Kanals das Überleben während einer akuten Ischämie (Wirth et al. 1999).

#### 4. Vaskulatur

Die Kenntnisse über die physiologische Rolle von  $K_{ATP}$ -Kanälen, die in vaskulären glatten Muskel- und Endothelzellen exprimiert werden (Janigro et al. 1993, Katnik & Adams 1997, Kuo & Chancellor 1995), sind im Vergleich zu denen über pankreatische Kanäle noch sehr lückenhaft. Vaskuläre  $K_{ATP}$ -Kanäle werden bei Sauerstoffmangel aktiviert (Dart & Standen 1995). Der Aktivierung der Kanäle wird eine gefäßerweiternde Funktion sowohl in kleinen mesenterialen (Mc Pherson et al. 1991, Murphy & Brayden 1995, Nelson et al. 1990, Quayle et al. 1995), koronaren (Dart et al. 1995, Eckman et al. 1992, Samaha et al. 1992) und vertebrealen (Nagao et al. 1996, Weidelt et al. 1997) Arterien, in der Aorta (Quast & Cook 1989, Janigro et al. 1993) als auch in venösen Gefäßen (Quast &

Cook 1989, Beech et al. 1993, Zhang & Bolton 1996) zugeschrieben. Da eine Vasodilatation von mehreren anderen Faktoren *in vivo* veranlaßt werden kann, ist unklar geblieben, inwieweit die K<sub>ATP</sub>-Kanal-Aktivität in diese Reaktion einbezogen ist (Furspan et al. 1993). Jedoch scheint festzustehen, dass eine Vasodilatation, die durch eine Aktivierung der K<sub>ATP</sub>-Kanäle ausgelöst wird, unabhängig von Prostaglandinen verläuft, weil eine Hemmung von Cyclooxygenasen keinen Einfluss auf die vasodilatatorische K<sub>ATP</sub>-Wirkung ausübt (Rubanyi et al. 1986, Quast & Cook 1989). Dagegen werden Vasodilatationen, welche über das NO-System ablaufen, durch eine Aktivierung von K<sub>ATP</sub>-Kanälen in vaskulären glatten Muskeln vermittelt (Kubo et al. 1994, Murphy & Brayden 1995). An derartigen Auslösungen von Vasodilatationen *in situ* und *in vivo* wird das vaskuläre Endothel entscheidend beteiligt sein, weil eine Entfernung des Endothels (Smiesko et al. 1985) Blutgefäße gegenüber K<sub>ATP</sub>-Kanal-Öffnern unempfindlich macht (Quast & Cook 1989).

Endothelzellen können benachbarte glatte Muskelzellen infolge ihrer Fähigkeit, NO freizusetzen, beeinflussen. Die vaskulären glatten Muskelzellen reagieren auf NO mit einer Hyperpolarisierung ihrer Zellmembran infolge Aktivierung ihrer K<sub>ATP</sub>-Kanäle (Murphy & Brayden 1995). Andererseits führt die Öffnung der Kanäle in Endothelzellen zur Freisetzung von ATP und Adenosin in den extrazellulären Raum. Diese Öffnung erfolgt während hypoxischer, anoxischer bzw. ischämischer Phasen (Herz-, Gehirn-, Skelettmuskelgefäße), ist mit einem Anstieg im Blutfluss verbunden und kann über eine K<sub>ATP</sub>-Inhibition durch Glibenclamid rückgängig gemacht werden (Hassessian et al. 1993, Heurteaux et al. 1995).

## 5. Endokrinum

K<sub>ATP</sub>-Kanäle werden nicht nur von pankreatischen  $\beta$ - Zellen und in den pankreatischen  $\alpha$ -Zellen, in denen sie an der Regulation der Glucagonfreisetzung beteiligt sind (Hoy et al. 2000), exprimiert, sondern auch von Zellen der Adenohypophyse (Bernardi et al. 1993), von Cholecystinin- (CCK)- produzierenden intestinalen Zellen (Mangel et al. 1994), von folliculären ovariellen und reninsekretierenden Nierenzellen (Quast 1996). Die Physiologie der K<sub>ATP</sub>-Kanäle in der Adenohypophyse ähnelt der von pankreatischen Kanälen. Diazoxid öffnet sie und induziert eine Hyperpolarisierung der Zellen. Glukose und antidiabetische Sulfonylharnstoffe depolarisieren die Zellen, dadurch öffnen sich Ca<sup>2+</sup>- Kanäle und vermitteln einen Ca<sup>2+</sup>-Einstrom. Die Öffnung der K<sub>ATP</sub>-Kanäle hemmt die Sekretion von

Wachstumshormonen. Die Hemmung kann durch antidiabetische Sulfonylharnstoffe aufgehoben werden (Bernardi et al. 1993).

Wie bei den Adenohypophysenzellen exprimieren intestinale CCK-Zellen KATP-Kanäle in der Zellmembran in einer Größenordnung, die hinreichend ist, um bei Öffnung oder Schließung der Kanäle die gesamte, mit einem  $K^+$ -Durchfluss verbundene Stromstärke zu regeln (Mangel et al. 1994). Der Kanal wird durch 5-20mM Glukose inhibiert. Dadurch depolarisiert die Zelle, der intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Spiegel erhöht sich und CCK wird freigesetzt. Dieser Mechanismus der durch KATP-Kanal-Hemmung ausgelösten Depolarisation mit nachfolgender  $Ca^{2+}$ - induzierten Hormonfreisetzung scheint in den meisten endokrinen Zelltypen abzulaufen. Als eine der wenigen Ausnahmen verläuft die Reninsekretion durch Glomerulazellen der Niere über eine Hyperpolarisation, die durch Chromakalim ausgelöst werden kann (Ferrier et al. 1989). Wahrscheinlich hängt die Reninsekretion mit der Verringerung des intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Spiegels zusammen, da eine KATP-Kanal-Aktivierung die Glomerulazellen hyperpolarisiert und dadurch potentialabhängige  $Ca^{2+}$ -Kanäle geschlossen werden. Ein sinkender  $Ca^{2+}$ -Spiegel veranlasst dann die Reninsekretion (Quast 1996). Durch KATP-Kanal-Öffnung hyperpolarisieren ebenfalls Zellen im tubulären Bereich der Niere. Der damit verbundene  $K^+$ -Ausstrom im tubulären Bereich scheint eine Bedeutung für den Elektrolythaushalt innerhalb der Niere zu haben (Quast 1996) und möglicherweise die Filtration von Harnstoff aus dem Blut zu begünstigen.