

Aus dem Institut für Integrative Neuroanatomie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Identifikation und funktionelle Bedeutung des  
K<sub>ATP</sub>-Kanal-verwandten Proteinkomplexes  
K<sub>IR</sub>6.1/SUR2A bei der Regulation von Tight Junctions**

Zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

**Daniel Wittschieber**

aus Göttingen

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. Th. Jöns  
2. Priv.-Doz. Dr. I. E. Blasig  
3. Prof. Dr. D. Drenckhahn

Datum der Disputation: 14. Januar 2008

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. Einleitung</b>	<b>6</b>
1.1 Transepitheliale Permeabilität	7
1.2 Tight Junctions	8
1.2.1 Grundstruktur und Funktionen der Tight Junction	8
1.2.2 Molekularer Aufbau der Tight Junction	10
1.2.3 Regulation parazellulärer Permeabilität am Beispiel des Dünndarmepithels	13
1.3 ATP-sensitive Kaliumkanäle ( $K_{ATP}$ -Kanäle)	15
1.3.1 $K_{ATP}$ -Kanäle bilden eine eigene Subgruppe in der Gruppe der Kaliumkanäle	15
1.3.2 Molekularer Aufbau von $K_{ATP}$ -Kanälen	16
1.3.3 Regulation der $K_{ATP}$ -Kanäle	18
1.3.4 Physiologische Funktionen der $K_{ATP}$ -Kanäle	19
1.4 Fragestellung	22
<b>2. Material</b>	<b>23</b>
2.1 Chemikalien und Reagenzien	23
2.2 Geräte	25
2.3 Gewebe / Tiere	25
2.4 Proteine	26
2.5 Zusätzliche Materialien	26
<b>3. Methoden</b>	<b>27</b>
3.1 Immunfluoreszenzmikroskopie	27
3.1.1 Gewebeeinbettung	27
3.1.2 Immundetektion von Gewebeproteinen	28
3.2 Proteinbiochemie	30
3.2.1 Präparation von Gallenkanälchen aus Rattenleber	30
3.2.2 Proteinauftrennung mittels SDS-PAGE	31
3.2.3 Anfärbung der Proteinbanden in SDS-Polyacrylamidgelen	32
3.2.4 Proteintransfer auf Nitrocellulose	33
3.2.5 Immundetektion der Proteinbanden	34

3.3	Messung der parazellulären Permeabilität des Dünndarmepithels der Ratte	34
3.3.1	Entnahme und Vorbereitung eines Rattendarmsegmentes	34
3.3.2	Die Inkubationslösungen	35
3.3.3	Inkubation eines Rattendarmsegmentes von 50 cm Länge	36
3.3.4	Inkubation eines Rattendarmsegmentes von 15 cm Länge	37
3.3.5	Präparation der Darmstücke	37
3.3.6	Quantitative Proteinbestimmung	38
3.3.7	Messung der Radioaktivität	39
3.3.8	Statistische Auswertung	39
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>40</b>
4.1	Immunfluoreszenzmikroskopie	40
4.1.1	Subzelluläre Lokalisation von $K_{IR6.1}$ und SUR2A in gastrischer Mukosa des Menschen	40
4.1.2	Zur Position von $K_{IR6.1}$ und SUR2A an Interzellularkontakten	44
4.1.3	E-Cadherin ist in gastrischer Mukosa des Menschen mit $K_{IR6.1}$ und SUR2A partiell colokalisiert	44
4.1.4	Perfekte Colokalisation von $K_{IR6.1}$ und SUR2A mit dem Tight-Junction-Protein ZO-1	46
4.1.5	$K_{IR6.1}$ und SUR2A sind auch in Dünndarm und Leber im Bereich der Tight Junction lokalisiert	48
4.1.6	Die Tight Junctions der Sammelrohre der Niere enthalten kein $K_{IR6.1}$ und SUR2A	51
4.2	Proteinbiochemie: Western-Blot-Analyse von Gallenkanalpräparationen	53
4.3	Messung der parazellulären Permeabilität des Dünndarmepithels der Ratte	54
4.3.1	Überlegungen zur Funktion von $K_{IR6.1}$ und SUR2A an Tight Junctions	54
4.3.2	Entwicklung der Modellvorstellung	54
4.3.3	Entwicklung des Modellsystems Rattendarm	55
4.3.4	D-Glucose induziert erwartungsgemäß eine Steigerung parazellulärer Permeabilität	56
4.3.5	Die $K_{ATP}$ -Kanal-Regulatoren Tolbutamid und Diazoxid beeinflussen die parazelluläre Permeabilität	58
4.3.6	Statistische Datenerhebung zur pharmakologischen Beeinflussung parazellulärer Permeabilität durch D-Glucose, Tolbutamid und Diazoxid	61

<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>64</b>
5.1	K <sub>ATP</sub> -Kanäle richten biologische Aktivität auf die Verfügbarkeit von Ressourcen aus	64
5.2	Das Proteinpaar K <sub>IR6.1</sub> /SUR2A und seine Besonderheiten	65
5.3	K <sub>ATP</sub> -Kanäle sind an der Regulation von Gap Junctions beteiligt	65
5.4	Das gewebespezifische Vorkommen des K <sub>IR6.1</sub> /SUR2A-Proteinkomplexes deutet auf eine Funktion bei der Regulation der parazellulären Permeabilität	66
5.5	Die K <sub>ATP</sub> -Kanal-Regulatoren Tolbutamid und Diazoxid bewirken im Modellsystem Rattendarm eine Änderung der parazellulären Permeabilität	68
5.6	Die Bedeutung des K <sub>IR6.1</sub> /SUR2A-Proteinkomplexes für die Regulation der parazellulären Permeabilität an enterozytären Tight Junctions	68
5.7	Zur Bedeutung des K <sub>IR6.1</sub> /SUR2A-Proteinkomplexes für die antidiabetische Therapie mit Sulfonylharnstoffen	72
5.8	Die Bedeutung des K <sub>IR6.1</sub> /SUR2A-Komplexes für den makroskopischen Organismus	73
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>74</b>
<b>7.</b>	<b>Literatur</b>	<b>76</b>

## Abstract

$K_{ATP}$  channels belong to the protein family of potassium channels and occur in numerous tissues. They are characterised by a high sensitivity against ATP and fulfil different functions, for example, the regulation of insulin liberation in the  $\beta$ -cells of the pancreas or the protection of neurons and heart muscle cells during ischemic states. Thus, amongst other things  $K_{ATP}$  channels ensure the survival of the whole organism for a certain time. This diversity of functions is enabled by the combination of different subtypes of  $K_{ATP}$  channel subunits. Principally,  $K_{ATP}$  channels are composed of four pore-forming  $K_{IR6}$  subunits and four surrounding regulatory SUR subunits. So far, two  $K_{IR6}$  ( $K_{IR6.1}$  and  $K_{IR6.2}$ ) and three SUR subunits (SUR1, SUR2A and SUR2B) have been identified in mammals and described in different combinations.

By using highly specific antibodies against the subunits  $K_{IR6.1}$  and SUR2A, a combination of  $K_{ATP}$  channel subunits so far not known in nature conditions is introduced in the present work. Both  $K_{IR6.1}$  and SUR2A revealed a perfect colocalisation with the areas of tight junctions in immune histological investigations of gastrointestinal and renal epithelia of man and other mammals. Interestingly, this new  $K_{IR6.1}/SUR2A$  complex was detectable only at regulated tight junctions and not at impermeable tight junctions like those in the urothelium of the urinary bladder or in the epithelium of renal collecting ducts.

Based on these observations a new model system with rat small intestine was developed to investigate a so far unknown function of a  $K_{IR6}/SUR$  protein complex, the regulation of paracellular nutrient absorption of the small intestinal epithelium. Therefore, morphological well-defined segments of rat small intestine were excised and filled with different incubation buffers. Here, it was used a phenomenon first described in 1987 where intraluminal increased concentrations of D-glucose caused an increase in paracellular permeability of the small intestinal epithelium. By addition of the pharmaceuticals tolbutamide and diazoxide, specific regulators of  $K_{ATP}$  channels, it was possible to influence significantly this increase in paracellular permeability induced by D-glucose. Tolbutamide increased the paracellular permeability, whereas diazoxide decreased it. In this process the  $K_{IR6.1}/SUR2A$  complex does not seem to work as a classical  $K^+$  conducting channel for ions but it presumably interacts purely physically with other tight junction proteins by an ATP hydrolysis-caused change of conformation.

Thus, the data of this work suggest that  $K_{IR6}/SUR$  complexes also execute detectable functions in other ways apart from just forming ion gating  $K_{ATP}$  channels. Surprisingly, the here new described function of the regulation of paracellular permeability provides the organism an adaptation of its biological activity to the supply of available resources as well as the known protective mechanisms in heart and brain. Those observations suggest a superior principle of the purpose of  $K_{IR6}/SUR$  complexes which has been developed during the evolution of that protein family.

## Abkürzungsverzeichnis

<b>ADH</b>	Antidiuretisches Hormon
<b>AQP-2</b>	Aquaporin 2
<b>ASIP</b>	atypical protein kinase C isotype-specific interacting protein
<b>ATP</b>	Adenosin-3'-triphosphat
<b>cAMP</b>	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
<b>cpm</b>	Counts Per Minute
<b>GLUT-2</b>	Glucose-Transporter 2
<b>K<sub>IR</sub></b>	Inwardly rectifying K <sup>+</sup> channel (= einwärts gleichrichtender K <sup>+</sup> -Kanal)
<b>MLCK</b>	myosin light chain kinase (= Myosin-Leichtketten-Kinase)
<b>min.</b>	Minute(n)
<b>mM</b>	Millimol
<b>NBF-1 / -2</b>	nucleotide binding fold (= Nukleotidbindedomäne)
<b>PFA</b>	Paraformaldehyd
<b>PKC</b>	Proteinkinase C
<b>R<sub>C</sub></b>	Widerstand des transzellulären Resorptionsweges
<b>rpm</b>	revolutions per minute (= Umdrehungen pro Minute)
<b>R<sub>S</sub></b>	Widerstand des parazellulären Resorptionsweges
<b>R<sub>T</sub></b>	Gesamtwiderstand eines Epithels
<b>sek.</b>	Sekunde(n)
<b>SGLT-1</b>	sodium glucose transporter 1 (= Na <sup>+</sup> -gekoppelter Glucose-Cotransporter)
<b>SU</b>	sulfonylurea (= Sulfonylharnstoff)
<b>SUR</b>	sulfonylurea receptor (= Sulfonylharnstoffrezeptor)
<b>VAP-33</b>	vamp associated protein, 33 kDa
<b>VDCC</b>	voltage dependent calcium channel (= spannungsabh. Calciumkanal)
<b>ZO-1</b>	Zonula-occludens-Protein 1
<b>ψ</b>	Membrandepolarisation
<b>Ω</b>	Ohm



## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, Daniel Wittschieber, geboren am 16.06.1982 in Göttingen, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift mit dem Thema „Identifikation und funktionelle Bedeutung des  $K_{ATP}$ -Kanal-verwandten Proteinkomplexes  $K_{IR6.1}/SUR2A$  bei der Regulation von Tight Junctions“ selbst und ohne unzulässige Hilfe Dritter verfasst habe. Die Arbeit stellt auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dar. Die benutzten Hilfsmittel und Literaturquellen wurden vollständig angegeben. Frühere Promotionsversuche sind nicht vorhanden.

Datum

Unterschrift

Der Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version der Arbeit nicht mit veröffentlicht.

# Publikationsliste

## I. Originalarbeit:

**JÖNS T.\*, WITTSCHIEBER D.\*, BEYER A., MEIER C., BRUNE A., THOMZIG A., AHNERT-HILGER G., VEH R.** (*\* These authors contributed equally*)  
„K-ATP Channel-Related Protein Complexes – Potential Transducers in the Regulation of Epithelial Tight-Junction Permeability“  
*Journal of Cell Science* (2006) 119, 3087-3097. Epub 2006 Jul 4.

## II. Kongressbeiträge:

**JÖNS T., WITTSCHIEBER D., BEYER A., MEIER C. BRUNE A., THOMZIG A., AHNERT-HILGER G., VEH R.**  
„K-ATP channel-related protein complexes – potential transducers in the regulation of tight-junction permeability“  
*21. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft in Würzburg (29.09.-01.10.2004)*

**WITTSCHIEBER D., BEYER A., MEIER C., BRUNE A., THOMZIG A., AHNERT-HILGER G., VEH R., JÖNS T.**  
„Kir6.1/SUR2A Protein Complexes as Regulators of Tight Junction Permeability“  
*100<sup>th</sup> Annual Meeting of the German Anatomical Society in Leipzig (11.03.-14.03.2005)*