

## 7. DISKUSSION

Die experimentellen Ergebnisse haben gezeigt, dass K<sub>ATP</sub>-Kanäle eine wichtige Rolle in der Regulation der Herzfrequenz und des venös-peripheren Blutflusses spielen. Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass die Expression von Sulfonylharnstoffrezeptortypen einer Veränderung unterliegt, die von der Höhe der Versorgung mit umsetzbarer Energie im Futter bestimmt wird. Hierzu liefert die Literatur noch keine Auskünfte. Beweise für diese Schlussfolgerungen wurden auf mehreren Wegen erhalten. Erstens waren die Wirkungen von Levromakalim, einem K<sub>ATP</sub>-Kanal-Aktivator, dosisabhängig. Zweitens waren die Reaktionen durch Glibenclamid, dem Standardinhibitor der K<sub>ATP</sub>-Kanäle (Linde et al. 1997), reduzierbar oder aufhebbar. Drittens waren die Reaktionen zeitabhängig, d.h. davon bestimmt, ob die Versuchstiere sich in einer Nüchternphase befanden oder Futter aufgenommen hatten. Viertens wurde über die Analyse von Transkripten, die Bestandteile von K<sub>ATP</sub>-Kanäle kodieren, gezeigt, dass sich insbesondere die Sulfonylharnstofftypen im Herzen zwischen Versuchstieren mit einer Aufnahme an umsetzbarer Energie ad libitum von denen mit einer restriktiven Aufnahme deutlich unterscheiden. Die unterschiedliche Affinität zu Glibenclamid von Sulfonylharnstoffrezeptoren der Herzzellen beider Gruppen weist zudem auf eine funktionelle Konsequenz der auf der Transkriptionsebene erhaltenen Befunde hin.

Die diätinduzierten Veränderungen betreffen insbesondere den Sulfonylharnstofftyp 2. Das aktivierte Gen für diesen Typ erzeugt Produkte, die einem Splicing unterliegen (Chutkow et al. 1996), d.h. die mRNA wird durch eine hydrolytische Aktivität in einem bestimmten Abschnitt der Sequenz gespalten. Dadurch entstehen auf epigenetischer Ebene Transkriptvarianten, die nicht direkt vom Gen kodiert, sondern von der Splicingaktivität erzeugt werden. Im Fall von SUR2 entstehen SUR2A- und SUR2B-Typen (Chutkow et al. 1996). Da eine Aufnahme von umsetzbarer Energie ad libitum zur Verschiebung der für das Herz typischen SUR2A-Form in Richtung einer vorrangigen Expression von SUR2B geführt hat, zielt die diätinduzierbare Reaktion auf die Splicingaktivität in Herzzellen. Die Wirkung einer hohen Aufnahme von umsetzbarer Energie auf die Expression des SUR2-Gens verläuft folglich nicht über das SUR2-Gen. Wahrscheinlich sind auch nicht Gene, die für Enzyme mit einer Splicingaktivität kodieren, betroffen, sondern die intrazellulären Bedingungen für diese Aktivität werden durch eine hohe Aufnahme an umsetzbarer Energie verändert. Diese Vermutung ergibt sich aus Berichten, die zeigen, dass der pH-

Wert in Herzzellen mit der metabolen Intensität in Beziehung steht und daß die Aktivität von K<sub>ATP</sub>-Kanälen durch Verringerung des pH-Wertes modifiziert wird (Bethell et al. 1998). Diese Modifikation kann über die Aktivierung von phorbolmyristatazetatsensitiver Proteinkinase C verlaufen (Hu et al. 1996). Das Enzym kann sowohl Sulfonylharnstoffproteine als auch porenbildende Kir6.1/6.2-Proteine phosphorylieren. Die Empfindlichkeit der K<sub>ATP</sub>-Kanalaktivität verändert sich dann sowohl gegenüber physiologischen Regulatoren, einschließlich der intrazellulären ATP/NDP-Konzentrationen, als auch synthetischen Inhibitoren und Aktivatoren, die als Medikamente zur Therapie von Typ II-Diabetes, Bluthochdruck und Angina pectoris angewendet werden (Shimoni et al. 1998). Die vorliegenden Ergebnisse machen wahrscheinlich, dass auch die Veränderung des Sulfonylharnstoffrezeptortyps, damit die Struktur des K<sub>ATP</sub>-Kanals, und nicht nur die molekulare Modifikation durch Phosphorylierung bei metabolisch bedingten Aktivitätsänderungen von K<sub>ATP</sub>-Kanälen eine Rolle spielt.

Die Ergebnisse der Analysen der Transkripte aus Ventrikelpollen stimmten mit den Daten der Glibenclamidbindungsanalysen und den Befunden der In-vivo-Experimente überein. Für die interne Kalibrierung bzw. Konstanthaltung der eingesetzten mRNA in der RT-PCR-Reaktion wurde  $\beta$ -Actin-mRNA verwendet. Die Eichung der Bestimmung unbekannter mRNA-Gehalte über einen geeigneten internen Standard stellt allerdings ein Problem dar, das jedoch allgemein bei Genexpressionsanalysen auftritt und nur für Immunzellen gelöst zu sein scheint. Bei der Verwendung von  $\beta$ -Actin wurde angenommen, dass die  $\beta$ -Actin-mRNA-Häufigkeit unwesentlich durch die oxidative Stoffwechselintensität beeinflusst wird. Der Literatur sind hierzu keine Informationen zu entnehmen. Ein Vergleich der  $\beta$ -Actin-mRNA-cDNA bei Konstanthaltung der eingesetzten Menge an Gesamt-RNA in einem vorhergehenden Experiment ergab, dass individuelle Schwankungen auftraten, die aber auch durch die RNA-Präparation selbst erklärt werden könnten.

Andererseits waren signifikante Differenzen im  $\beta$ -Actin-mRNA-Gehalt zwischen den Diätgruppen nicht nachweisbar. Deshalb wurde angenommen, dass bei Konstanthaltung der eingesetzten Menge an  $\beta$ -Actin-mRNA die Unterschiede durch die RNA-Präparation bedingt waren und damit die Standardisierung über  $\beta$ -Actin-mRNA gerechtfertigt war. Jedoch wurde die Darstellung der Ergebnisse durch Agarosegelelektrophoresemuster

vorgenommen, weil qualitative Analysen weniger anfällig gegenüber Kalibrierungseinflüssen sind.

Die Verschiebung der Expression von SUR2A/SUR2B in Richtung einer vorherrschenden SUR2B-Expression bei einer Aufnahme von umsetzbarer Energie ad libitum kann deutlich physiologische und pharmakologische Konsequenzen nach sich ziehen. SUR-Typen können mit Kir6.1/6.2 in beliebiger Weise zu K<sub>ATP</sub>-Kanäle kombinieren (Liss et al. 1999), so dass die Konzentration der K<sub>ATP</sub>-Kanal-Komponenten den Kanaltyp bestimmt. SUR2B/Kir6.2 reagiert auf Schwankungen im intrazellulären ATP-Spiegel weitaus weniger empfindlich als SUR2A/Kir6.2 und ist deutlich insensitiver gegenüber Glibenclamid (Russ et al. 1999, Matsuoka et al. 2000). Die Empfindlichkeit gegenüber Glibenclamid wird aber stark erhöht, wenn SUR2B in einer Kombination mit Kir6.1 vorliegt (Liss et al. 1999). Nach den Ergebnissen der Transkriptanalysen sind im Rinderherz sowohl Kir 6.1 als auch Kir6.2 vorhanden. Deshalb kann eine unterschiedliche individuelle Kombinationshäufigkeit mit SUR2B die erheblichen Differenzen zwischen den Versuchstieren in der Reaktion ihrer Herzfrequenz und ihres venösen Blutflusses auf eine Öffnung der K<sub>ATP</sub>-Kanäle durch Levromakalim erklären.

Neben der Transkriptionsanalyse geben die Glibenclamidbindungseigenschaften Hinweise auf die Struktur von K<sub>ATP</sub>-Kanälen infolge der unterschiedlichen Affinität von Sulfonylharnstoffrezeptoren und ihrer Kombination mit Kir6.1/6.2 zu Glibenclamid. Eine Aufnahme von umsetzbarer Energie ad libitum verändert die Kanalstruktur von Monozyten offenbar nicht, wenn die Dissoziationskonstante  $K_D$ , unter Gleichgewichtsbedingungen ermittelt, als Kriterium verwendet wird. Gegenwärtig ist berichtet worden, dass SUR2B nicht nur aus SUR2-, sondern auch aus einem SUR2A-Splicing hervorgeht (Chutkow et al. 1996, Matsuoka et al. 2000) und Rindermonozyten über den SUR2B/Kir6.2-Kanaltyp verfügen (Löhrke et al. 1997). Da Herzzellen von einer SUR2A- in eine SUR2B-Expression übergehen, wenn die Tiere umsetzbare Energie ad libitum aufnehmen, und anzunehmen ist, dass eine veränderte Splicing-Aktivität den Übergang hervorruft, kann nicht erwartet werden, dass Monozyten ihre SUR2B-Expression verändern. Deshalb unterstützen die Monozytenbefunde die Annahme, dass die Splicingaktivität den Diäteneffekt vermittelt. Die Ergebnisse der Bestimmung der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten für Glibenclamid in glatten Muskelzellen der Saphenavene weisen ebenfalls nicht auf eine Strukturveränderung ihrer K<sub>ATP</sub>-Kanäle infolge der Aufnahme von umsetzbarer Energie ad

libitum hin. Die Änderung der Expression des SUR2-Gens scheint damit herzspezifisch zu erfolgen bzw. in solchen Zellen vorzustatten zu gehen, die über SUR2A verfügen. Damit wird wahrscheinlich, dass die unterschiedlichen Blutflussreaktionen zwischen den Diätgruppen eher auf der Ebene des Herzens als auf der Saphenavenenebene ausgelöst werden. Die von der Futteraufnahmeabhängigen Reaktionen in der Herzfrequenz und im venösen Blutfluss auf eine Aktivierung der K<sub>ATP</sub>-Kanäle durch Levromakalim weisen jedoch auch auf eine zentralnervöse Regulation hin. Diese durch die Futteraufnahme (und nicht nach der Futteraufnahme) induzierten Reaktionen können mit adrenergen, von K<sub>ATP</sub>-Kanäle regulierten Neuronen in Verbindung gesehen werden, weil  $\alpha$ 2-adrenerge Gehirnzentren einen inhibitorischen Rhythmus für sympathische Nerven entfalten, der mit der Herzfrequenz in Beziehung steht (Orer et al. 1996). Eine K<sub>ATP</sub>-Kanal-Öffnung verringert generell die elektrische Aktivität von K<sub>ATP</sub>-Kanal-positiven Neuronen (Lee et al. 1999). Die Wirkung ähnelt der von  $\alpha$ 2-adrenergen Agonisten, die bei Verabreichung an Rindern die Herzfrequenz herabsetzen (Löhrke et al. 1997). K<sub>ATP</sub>-Kanal-positive,  $\alpha$ 2-adrenerge Neurone, die das Futteraufnahmeverhalten regulieren, kommen im Hypothalamus vor und projizieren zu Zentren mit regulatorischer Aktivität für das sympathische Nervensystem (Levin et al. 1996).

Infolge der unmittelbar durch eine Futteraufnahme ausgelösten Reaktionen in der Herzfrequenz und die Unterschiede zwischen den Diätgruppen in der Reaktion der Herzfrequenz und des venösen Blutflusses kann angenommen werden, dass die Funktion dieser neuronalen K<sub>ATP</sub>-Kanäle durch eine Aufnahme an umsetzbarer Energie ad libitum ähnlich der Funktion der K<sub>ATP</sub>-Kanäle des Herzens veränderlich ist. Die vorliegenden Daten werden unter dieser Annahme interpretierbar. Die Zeitabhängigkeit in den unterschiedlichen Herzfrequenzreaktionen wird dadurch entstehen, dass in einer frühen Zeitspanne nach einer Levromakalimverabreichung die neuronale Aktivität, damit die Herzfrequenz, verringert wird. Falls die Reaktion über K<sub>ATP</sub>-Kanäle verläuft, ist zu erwarten, dass sie durch Glibenclamid aufhebbar ist. Dies stimmt mit den experimentellen Befunden überein. In einer späteren Zeitspanne geht die Levromakalimwirkung zurück, so dass die für die Herzfrequenz dominante, suppressive neuronale Aktivität sich abschwächt. Durch die K<sub>ATP</sub>-Kanal-Öffnung steigt andererseits der Kaliumionenspiegel im extrazellulären Raum des Myocards an (Wirth et al. 1999) und potenziert die normalisierte sympathische Aktivität. Da eine Vorbehandlung mit Glibenclamid den Kaliumausstrom verhindert, wird auch diese Reaktion durch den K<sub>ATP</sub>-Kanalinhibitor aufgehoben oder

reduziert entsprechend der Sensitivität des Kanaltyps gegenüber Glibenclamid. Diese Interpretation der Ergebnisse bedarf allerdings direkter Analysen der K<sub>ATP</sub>-Kanal-Struktur in den relevanten Gehirnbereichen.

Die wahrscheinlich durch eine Zentralnervensystem-Herz-Achse regulierte Verringerung im basalen Saphenablutfluss der Gruppe mit der Aufnahme von umsetzbarer Energie ad libitum gegenüber der restriktiven Diätgruppe schließt nicht aus, sondern macht eher wahrscheinlich, dass mit höherer Aufnahme von umsetzbarer Energie der Blutfluss durch Verdauungsorgane und Leber ansteigt (zumindest beim Rind). Damit geht ein höherer Sauerstoffverbrauch dieser Organe einher, auf die mindestens 50% des Sauerstoffverbrauchanstiegs zurückgehen, denn ihre Wärmeproduktion steigt um 0,13-0,14 kJ/kg<sup>0,75</sup>d mit einem Anstieg um 1 kJ umsetzbare Energie/kg<sup>0,75</sup>d im aufgenommenen Futter (Ortigue & Visseiche 1995). Der Sauerstoffverbrauch der Leber korreliert enger ( $r > 0,8$ ) mit der Glukose – als mit der Harnstoffproduktion ( $r > 0,6$ ) in der Leber von Rindern (Ortigue & Visseiche 1995). Der höhere basale Respirationsquotient in der Gruppe mit einer Aufnahme von umsetzbarer Energie ad libitum gegenüber der restriktiv ernährten Gruppe kann deshalb sowohl mit einer intensiveren Acetat- als auch Glukoseoxidation durch die Verdauungsorgane erklärt werden, denn der Glukosespiegel im Blut wies nur zeitweilig signifikante Differenzen zwischen den Gruppen aus. Diesbezügliche Befunde sind im Ergebnisabschnitt wegen ihres vorläufigen Charakters nicht mit aufgenommen worden. Sie sind jedoch bereits in anderen Publikationen ausführlich beschrieben worden (Eisenmann et al. 1990, Ortigue & Visseiche 1995).

Ein nicht völlig mit den vorgelegten Daten abzuklärendes Problem betrifft die Frage, warum SUR2B bei hoher Aufnahme von umsetzbarer Energie vorherrschend wird. Zumindest für die SUR2B/Kir6.2-Kombination ergibt sich eine Erklärung aus den Eigenschaften dieses K<sub>ATP</sub>-Kanaltyps. Die Regulation seiner Aktivität erfolgt über NDP weitgehend unabhängig vom intrazellulären ATP-Spiegel (Chutkow et al. 1996, Matsuoka et al. 2000). Eine Aktivierung des K<sub>ATP</sub>-Kanals tendiert zu einer Energiedissipation sowohl auf mitochondrialer Ebene (Hu et al. 1999) als auch auf der Ebene der Zelloberflächenmembran, weil Sulfonylharnstoffrezeptoren eine ATPase-Aktivität besitzen (Bienengräber et al. 2000). Bei einem Anstieg im intrazellulären ADP-Spiegel (aber gleichbleibend hohem ATP-Spiegel) durch Intensivierung der Herzfrequenz wird die Kanalöffnung durch SUR2B/Kir6.2 begünstigt, während SUR2A/Kir6.2 geschlossen

bleibt. Die durch die Öffnung des K<sub>ATP</sub>-Kanals eingeleitete Dissipation von überschüssiger Energie bei einer Aufnahme von umsetzbarer Energie ad libitum erscheint in Form von Wärme. Die höhere Wärmeproduktion bei einer Aufnahme von umsetzbarer Energie ad libitum (656 gegenüber 601 kJ/kg<sup>0,75</sup>d) stimmt hiermit überein. Allerdings bleibt zu klären, welchen Anteil die höhere Herzaktivität in der Gruppe mit einer Aufnahme von umsetzbarer Energie ad libitum am Anstieg der basalen Wärmeproduktion hat.