

# 1. Einleitung

Die Epithelgewebe von Mensch und Tier bedecken die äußeren und inneren Oberflächen des Körpers und lassen sich funktionell in Oberflächen-, Drüsen- und Sinnesepithelien unterteilen. Durch Ausbildung von Barrieren verhindern sie den Verlust von Wasser oder das Eindringen von pathogenen Keimen. Diese Barrierefunktion ist in den verschiedenen Epithelien unterschiedlich stark ausgeprägt und unterliegt oftmals sogar einer Regulation, um beispielsweise ein resorbierendes Epithel des Gastrointestinaltraktes situationsabhängig den unterschiedlichen Bedingungen während der Verdauung anpassen zu können. Zwischen den einzelnen Epithelzellen bildet die Tight Junction, welche auch als Zonula occludens bezeichnet wird, das morphologische Korrelat dieser Barriere. Daher bestimmen im Wesentlichen die Tight Junctions die Dichtigkeit und parazelluläre Permeabilität eines Epithels. Zur Beeinflussung der Tight Junctions konnte bis heute bereits eine Vielzahl unterschiedlichster Signalstoffe und Proteine identifiziert werden, wenngleich ihr genaues Zusammenspiel noch viele Fragen offen lässt. Eine bislang nicht bekannte Komponente der Tight-Junction-Regulation stellt die Gruppe der ATP-sensitiven Kaliumkanäle ( $K_{ATP}$ -Kanäle) dar, deren Bedeutung für die Regulation der parazellulären Permeabilität in dieser Arbeit untersucht wurde.

Um zu verdeutlichen welche Formen von Permeabilität in einem Epithel vorliegen und wie solche im Zellsystem betrachtet und gemessen werden können, wird im Folgenden zunächst der Begriff der transepithelialen Permeabilität vorgestellt (**1.1**), bevor im Anschluss daran näher auf den Aufbau und die Funktionsweise der Tight Junction (**1.2**) sowie der  $K_{ATP}$ -Kanäle (**1.3**) eingegangen werden soll.

## 1.1 Transepitheliale Permeabilität

Die Bewegung von kleinen Molekülen wie Wasser, Ionen oder Nährstoffen durch ein Epithel können auf zwei möglichen Transportwegen erfolgen, dem transzellulären und dem parazellulären Weg. Während der transzelluläre Transport aktiv und passiv durch spezifische Membranpumpen, Transporter und Ionenkanäle ermöglicht wird, erfolgt der parazelluläre Transport rein passiv durch den Interzellulärraum zweier benachbarter Epithelzellen hindurch. Die treibende Kraft hierfür bilden elektroosmotische Gradienten, die entweder durch den transzellulären Transport selbst, wie zum Beispiel im distalen Nierentubulus durch die Rückresorption von NaCl, oder extrinsisch, beispielsweise durch die Nährstoffhöhung im Darmlumen nach einer Mahlzeit, erzeugt werden (VAN ITALLIE AND ANDERSON, 2004). Ferner verläuft der parazelluläre Transport nicht in eine bestimmte Richtung, sondern kann sowohl nach luminal wie auch nach subepithelial erfolgen.

Um transepitheliale Permeabilität messbar zu machen, werden Epithelien vereinfacht als Kreisläufe von Batterien und Widerständen betrachtet. Zur elektrophysiologischen Beschreibung des transzellulären und parazellulären Transportweges werden prinzipiell der zelluläre Widerstand  $R_C$  und der Widerstand des parazellulären Weges  $R_S$  (= „Shunt-Weg“) betrachtet.  $R_C$  und  $R_S$  bilden zusammen den Gesamtwiderstand des Epithels  $R_T$ , so dass gilt:  $R_T = R_C + R_S$ . Beide dieser epithelialen Barrieren weisen zwei experimentell messbare Eigenschaften auf: die allgemeine Barrieren-Permeabilität, welche den elektrischen Widerstand quantifiziert, sowie die so genannte Barrieren-Permeabilität, die ein qualitatives Maß für die Fähigkeit zur Unterscheidung zwischen Anionen und Kationen darstellt (BOULPAEP AND SACKIN, 1979 / SCHULTZ, 1979 / POWELL, 1981).

Anhand der Barrieren-Permeabilität lassen sich Epithelien in „dichte“ („tight“) und „undichte“ („leaky“) Epithelien subklassifizieren. Zu den Organen mit „undichten“ Epithelien, die sich durch Gesamtwiderstände unterhalb von  $1000 \Omega \cdot \text{cm}^2$  auszeichnen, gehören beispielsweise die Gallenblase und der Dünndarm (MUNCK AND SCHULTZ, 1974). Das Urothel der Harnblase hingegen stellt bei den Säugetieren mit einem Gesamtwiderstand von  $R_T = 5000$  bis  $10000 \Omega \cdot \text{cm}^2$  einen typischen Vertreter für ein „dichtes“ Epithel dar (LEWIS et al., 1976).

Bei Betrachtung der Permeabilität lassen sich messtechnisch in verschiedensten Geweben unterschiedlicher Spezies deutliche Unterschiede vor allem zwischen dem transzellulären und

dem parazellulären Transportweg feststellen. Während die Permeabilität der apikalen und basolateralen Zellmembranen, also die Permeabilität des transzellulären Weges, im Wesentlichen die jeweilige Ausstattung mit Carriern, Pumpen und Ionenkanälen widerspiegelt, zeigten Untersuchungen der Permeabilität für den parazellulären Weg bei Säugetieren eine deutliche Kationenselektivität ( $P_{K^+}$  und  $P_{Na^+} > P_{Cl^-}$ ) (WRIGHT, 1966 / FRIZZELL AND SCHULTZ, 1972).

Sowohl der transzelluläre, als auch der parazelluläre Transportweg unterliegen einer strikten Regulation. Während sich beim transzellulären Weg eine Vielzahl von Regulationsformen findet, auf die hier nicht näher eingegangen werden soll, wird der parazelluläre Weg hauptsächlich durch Veränderung der Permeabilität seiner wesentlichsten Barriere, den Tight Junctions, reguliert.

## 1.2 Tight Junctions

### 1.2.1 Grundstruktur und Funktionen der Tight Junction

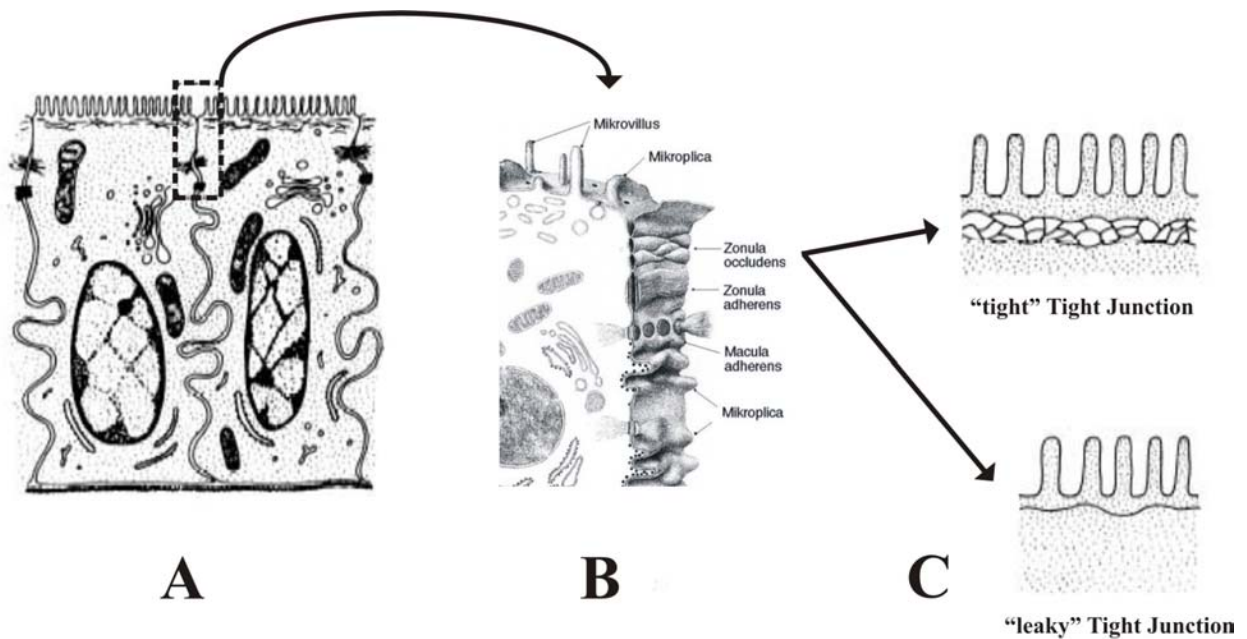
Der Begriff der Tight Junction oder Zonula occludens bezeichnet einen in den Endo- und Epithelien von Wirbeltieren vorkommenden Interzellularkontakt, welcher neben den eher seltenen Fasciae und Maculae occludentes sowie den in Invertebraten vorkommenden Septated Junctions zur Gruppe der Barrierenkontakte gehört (DRENCKHAHN, 2003). Tight Junctions umschließen gürtelförmig den apikalen Zellpol und finden sich in einschichtigen Epithelien charakteristischerweise am apikalsten Ende der lateralen Plasmamembran. Sie sind dort Teil einer Trias von Interzellularkontakten, welche als Schlussleistenkomplex oder Junctional Complex bezeichnet wird (FARQUHAR AND PALADE, 1963). Hierbei sind stets Zonula occludens, Zonula adherens und Macula adherens von apikal nach basal eng hintereinander angeordnet (**Abb. 1.1 B**).

Unter Verwendung der Gefrierbruchtechnik, bei welcher eine Aufspaltung zwischen den beiden Lipidlamellen der Zellmembran erfolgt, stellt sich die Tight Junction im Elektronenmikroskop als Serie nietenähnlicher Kontakte („kisses“) dar (FARQUHAR AND PALADE, 1963 / STAEHLIN, 1974 / CERELJIDO, 1992). Diese Kontakte sind wabenartig zu leistenförmigen Verschlusslinien angeordnet (**Abb. 1.1 C, oberer Teil**) und verbinden die äußeren Lipidlamellen zweier

benachbarter Zellen miteinander. Tight Junctions formen durch diese Occludens-Leisten selektiv-permeable Diffusionsbarrieren, die in der Lage sind den Interzellularraum vollständig für gelöste Stoffe und Pathogene abzudichten, aber auch selektiv bestimmte Moleküle oder Ionen hindurch zu lassen (POWELL, 1981 / REUSS, 1991). Auf diese Weise lassen sich zwei Gewebekompartimente unterschiedlichen chemischen Milieus, wie zum Beispiel das Darmlumen und das subepitheliale Interstitium, gegeneinander abtrennen.

Die vertikale Ausdehnung der Tight-Junction-Stränge, also die Anzahl an parallelen Occludens-Leisten, variiert epithelspezifisch und korreliert mit dem elektrischen Widerstand und somit mit der Dichtigkeit eines Epithels. „Dichte“ Epithelien weisen stets mehrere Occludens-Leisten auf, während sich in „undichten“ Epithelien meistens nur ein bis zwei komplette Leisten finden (CLAUDE AND GOODENOUGH, 1973 / CLAUDE, 1978 / REUSS, 1991). Tight Junctions werden daher in Anlehnung an die Nomenklatur der Epitheleigenschaften in „dichte“ („tight“) und „undichte“ („leaky“) Tight Junctions unterteilt (**Abb. 1.1 C**). Die parazelluläre Permeabilität eines Epithels hängt somit in hohem Maße von der Ausprägung der Tight Junctions ab.

Neben der Abdichtung des Interzellularraumes bildet die Tight Junction gleichzeitig auch eine Barriere innerhalb der Lipiddoppelschicht, um eine laterale Diffusion von integralen Membranproteinen zwischen der apikalen und basolateralen Plasmamembran zu verhindern (VAN MEER AND SIMONS, 1986). Dieses trifft ebenso für die Lipide der äußeren Lamelle der Plasmamembran zu, nicht jedoch für die der inneren Lamelle. Durch diese Barriere innerhalb der Lipiddoppelschicht spielen Tight Junctions daher auch eine zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung der molekularen Heterogenität von apikalem und basolateralem Membrankompartiment und sind essentiell für die Ausbildung der Polarität der Plasmamembran und der gesamten Zelle (NELSON AND VESHNOCK, 1986). Diese polare Differenzierung stellt die Hauptvoraussetzung für einen gerichteten transzellulären Transport von Molekülen durch ein Epithel dar.



**Abb. 1.1: Position und Struktur der Tight Junction**

- (A) Zwei benachbarte Epithelzellen eines einschichtigen Epithels im Schema. Im apikalsten Bereich der lateralen Plasmamembran befindet sich die Trias der untereinander gestaffelten Interzellularkontakte, welche als Schlussleistenkomplex oder Junctional Complex bezeichnet wird.
- (B) Im Schlussleistenkomplex sind stets Zonula occludens (Tight Junction), Zonula adherens (Gürteldesmosom) und Macula adherens (Fleckdesmosom) von apikal nach basal dicht untereinander angeordnet. Während Zonula und Macula adherens für die Zell-Zell-Haftung verantwortlich sind, stellen die Tight Junctions die für die parazelluläre Permeabilität entscheidenden Interzellularkontakte dar. Sie liegen in apikalster Position des Schlussleistenkomplexes und bilden eine Barriere zwischen lumenalem und interstitiellem Milieu.
- (C) Tight Junctions lassen sich bereits morphologisch anhand der Anzahl ihrer Occludens-Leisten in „dichte“ („tight“) und „undichte“ („leaky“) Tight Junctions unterteilen. Die Art der Tight Junction („tight“ oder „leaky“) bestimmt somit in hohem Maße die parazelluläre Permeabilität des jeweiligen Epithels.

(modifiziert nach POWELL, 1981, und DRENCKHAHN, 2003)

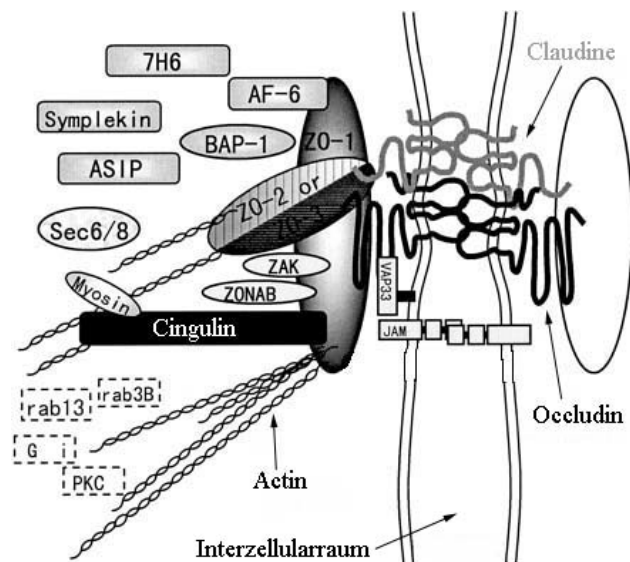
## 1.2.2 Molekularer Aufbau der Tight Junction

Tight Junctions stellen sich ultrastrukturell als membranständige Proteinkomplexe dar, die aus mindestens 20 verschiedenen Proteinen bestehen. Es lassen sich hierbei Transmembranproteine von Plaqueproteinen unterscheiden.

Die Transmembranproteine durchspannen die Zellmembran und überbrücken den Interzellularspalt, um mit einem gleichartigen Proteipartner der Nachbarzelle eine homophile Verbindung einzugehen, welche den Interzellularraum verschließt. Diese Proteingruppe umfasst das Occludin (FURUSE et al., 1993), die Claudine (FURUSE et al., 1998) sowie das Junctional Adhesion Molecule (JAM) (MARTIN-PADURA et al., 1998). Während vom Occludin nur ein einziges Gen bekannt ist, werden bis heute bei den Säugetieren mindestens 24 Claudine unterschieden (TEPASS, 2003). Vieles spricht dafür, dass die Claudine für die Selektivität der Tight Junction bezüglich der passierenden Teilchengrößen und Teilchenladungen verantwortlich sind. Ermöglicht werden diese Eigenschaften dadurch, dass die Claudine innerhalb des intrazellulären Spaltes „selektive Poren“ formen, die wie parazelluläre Kanäle funktionieren. Diese Poren sind durch die negativen Ladungen der extrazellulären Proteinketten der Claudinmoleküle ausgekleidet, wodurch der parazelluläre Fluss von Kationen, wie es Jahrzehnte zuvor bereits allgemein für den parazellulären Transportweg beobachtet wurde (**siehe 1.1**), begünstigt wird. Die eigentliche Porengröße ist abhängig vom jeweiligen Claudin-Typ und schwankt je nach Epithel zwischen 7 und 15 Å für den maximal durchlässigen Molekülradius. Bestimmte Claudin-Typen werden zudem gewebespezifisch exprimiert, so dass die resultierenden unterschiedlichen Porengrößen und elektrostatischen Verhältnisse sehr wahrscheinlich die unterschiedlich selektiven Barriereigenschaften der Tight Junctions verschiedener Gewebe erklären (TSUKITA AND FURUSE, 2000 / COLEGIO et al., 2002 / VAN ITALLIE AND ANDERSON, 2004). Gestützt wird diese Theorie dadurch, dass Defekte in Claudingenen mit einer Vielzahl von Krankheiten assoziiert sind. Beispielsweise führt eine Mutation des Claudin-16 (= Paracellin-1), einem spezifischen Claudin des distalen Nierentubulus, zu einer erhöhten Ausscheidung der strukturverwandten Kationen  $Mg^{2+}$  und  $Ca^{2+}$  im Urin und als Folge davon zu einem  $Mg^{2+}$ -Mangel im Blut (hereditäre Hypomagnesiämie) (SIMON et al., 1999). Ein weiteres Beispiel stellt eine autosomal-rezessive Form der Taubheit dar, die mit einer Mutation des Claudin-14 in Verbindung gebracht wird. Dieses Claudin findet sich ausschließlich in den Tight Junctions des CORTI-Organs des Ductus cochlearis und ist für die Aufrechterhaltung des elektrochemischen Gradienten zwischen der  $K^+$ -reichen Endolymphe und den umgebenden Geweben verantwortlich (WILCOX et al., 2001).

Bei Betrachtung der zytoplasmatischen Seite der Tight Junction zeigt sich unterhalb der genannten Transmembranproteine ein elektronendichtes Areal, welches als Tight-Junction-Plaque oder Junctional Plaque bezeichnet wird und sich aus einer großen Anzahl verschiedenster Plaqueproteine zusammensetzt. Zum einen finden sich hier phosphorylierbare Proteinkinasen

wie die Proteinkinase C (PKC) und das ASIP (atypical protein kinase C isotype-specific interacting protein), aber auch Proteine, die in den intrazellulären Vesikeltransport involviert sind, wie das VAP-33 und kleine G-Proteine der Rab-Familie (LAPIERRE, 2000 / D'ATRI AND CITI, 2002). Die für die Tight-Junction-Plaques charakteristische Proteingruppe stellen jedoch die Zonula-occludens-Proteine (ZO-1, ZO-2 und ZO-3) dar, welche alle als Verankerungsproteine für die Transmembranproteine dienen, indem sie eine Verknüpfung zum Actinfilamentsystem herstellen (**Abb. 1.2**) (MADARA, 1987 / FANNING et al., 1998 / ITOH et al., 1999 / WITTCHEN et al., 1999). F-Actin bildet auf Höhe der Zonula adherens zusammen mit Myosinfilamenten einen gürtelförmigen, perijunktionalen Ring („perijunctional actomyosin-ring“), welcher über ausscherende Actinfilamente zu Proteinen der Tight-Junction-Plaques einen Kontakt hält. Eine Kontraktion dieses Actomyosin-Ringes, die beispielsweise durch die Myosin-Leicht-Ketten-Kinase (MLCK) ausgelöst werden kann, trägt durch Verringerung des Zelldurchmessers an dieser Stelle zu einer Verbreiterung des Interzellularspaltes bei und ist dadurch sehr wahrscheinlich auch an der Regulation der parazellulären Permeabilität direkt beteiligt (HIROKAWA AND TILNEY, 1982 / MADARA et al., 1988 / LAPIERRE, 2000).



**Abb. 1.2:**  
**Molekularer Aufbau der Tight Junction im Schema**

Das Zonula-occludens-Protein 1 (ZO-1) im Zentrum der Tight-Junction-Plaques interagiert sowohl mit den Transmembranproteinen (Claudine und Occludin) als auch mit ZO-2, ZO-3 und verschiedenen weiteren Plaques-assoziierten Proteinen (siehe Text). Die ZO-Proteine halten ebenso wie das myosinähnliche Cingulin einen Kontakt zum Actinfilamentsystem und dem perijunktionalen Actomyosin-Ring (nicht gezeigt).

(nach MITIC et al., 2000)

In der vorliegenden Arbeit werden mit den  $K_{ATP}$ -Kanal-Untereinheiten  $K_{IR6.1}$  und SUR2A zwei Proteine vorgestellt (**siehe 1.3**), die auf ihre Funktion bei der Regulation von Tight Junctions im Dünndarm der Ratte untersucht worden sind. Im Folgenden soll daher ein besonders gut

verstandener Mechanismus der physiologischen Tight-Junction-Regulation des Dünndarmepithels näher erläutert werden.

### 1.2.3 Regulation parazellulärer Permeabilität am Beispiel des Dünndarmepithels

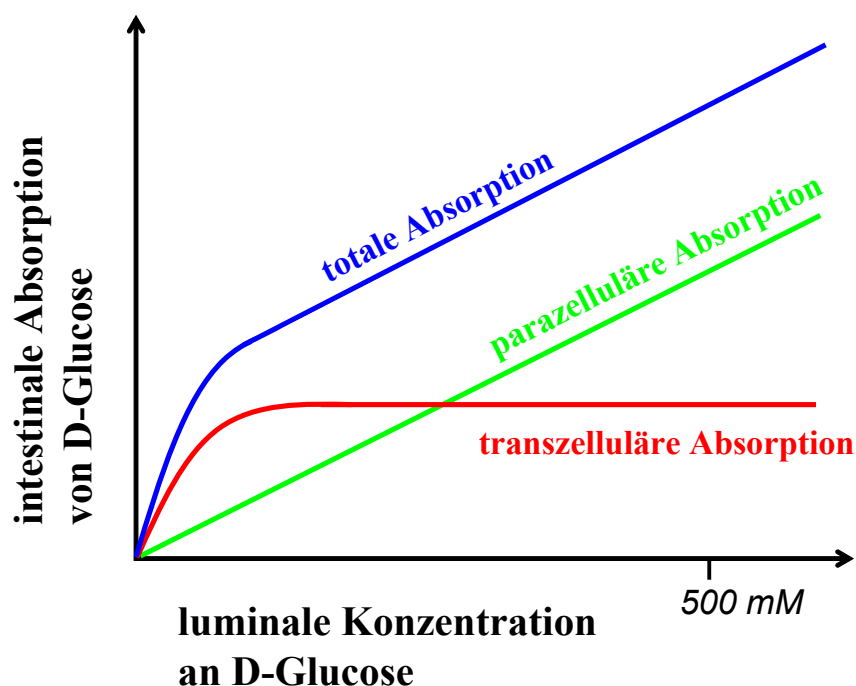
Verschiedene Arbeiten der letzten Jahrzehnte konnten zeigen, dass pathologische Stimuli wie Bakterientoxine, Zytokine oder Hypoxie in der Lage sind die parazelluläre Permeabilität eines Epithels zu beeinflussen (NUSRAT et al., 2000). Auch Mechanismen der physiologischen Tight-Junction-Regulation durch verschiedene Signalkaskaden sind bekannt. Das am besten untersuchte Beispiel hierfür ist die 1987 erstmals beschriebene Permeabilitätssteigerung von Tight Junctions des Dünndarmepithels der Ratte als Reaktion auf einen Anstieg der luminalen D-Glucose-Konzentration (PAPPENHEIMER, 1987 / PAPPENHEIMER AND REISS, 1987 / MADARA AND PAPPENHEIMER, 1987). Einhergehend mit einer Aktivierung des Phloridzin-sensitiven Natriumgekoppelten Glucose-Transporters SGLT-1 der apikalen Plasmamembran der Enterozyten konnten signifikante Anstiege der Wasser- und Creatininabsorption sowie ein paralleler Abfall des transmukosalen Widerstandes um das zwei- bis dreifache gemessen werden. Man spricht hierbei auch von der D-Glucose-induzierten Steigerung der parazellulären Permeabilität.

Der  $K_M$ -Wert des SGLT-1-Carriers liegt *in vivo* beim Menschen zwischen 6 und 23 mM, so dass für die D-Glucose-Absorption via SGLT-1 eine Sättigung zwischen 30 und 50 mM angenommen wird (FERRARIS et al., 1990 / DEBNAM AND LEVIN, 1975). Weitere Studien zeigten jedoch, dass sogar beim Vorliegen von bis zu 500 mM D-Glucose im Darmlumen die intestinale Absorption sich nach wie vor nahezu proportional zur luminalen Konzentration verhält (**blau in Abb. 1.3**) (HOLDSWORTH AND DAWSON, 1964 / CUMMINS, 1952). Dieses Phänomen kann nicht allein durch aktiven Transport via SGLT-1 erklärt werden, da dieser Carrier ja bereits weit unterhalb von 500 mM seinen Sättigungspunkt erreicht hat (**rot in Abb. 1.3**). Die Arbeiten von PAPPENHEIMER, REISS und MADARA (1987) konnten diese Diskrepanz erstmalig durch die Entdeckung der passiv ablaufenden, parazellulären Wasser- und Nährstoffresorption, den sie als „Solvent Drag“ bezeichneten, erklären (**grün in Abb. 1.3**). Durch den interzellulären Spaltraum gelangen unter bestimmten Bedingungen neben Wasser und D-Glucose auch verschiedene andere monomere Nährstoffe wie Aminosäuren oder auch andere Zucker in das subepitheliale Interstitium. Neben den elektrophysiologischen Ergebnissen beschrieben die genannten Autoren auch morphologische Korrelate der Tight-Junction-gesteuerten Erhöhung der parazellulären



Permeabilität. So konnte elektronenmikroskopisch eine Kondensation des perijunktionalen Zytoskeletts festgestellt werden, welche als Kontraktion des Actomyosin-Ringes zur mechanischen Öffnung der Tight Junctions interpretiert wurde. Der Effekt der D-Glucose-induzierten Steigerung der parazellulären Permeabilität wird außerdem auch bei der Aktivierung anderer Natrium-gekoppelter Transportsysteme beobachtet, wie zum Beispiel beim Aminosäure-Symport (PAPPENHEIMER, 1993).

Bislang konnte nicht geklärt werden durch welchen Mechanismus die D-Glucose die Erhöhung der parazellulären Permeabilität des Dünndarmepithels bewirkt. Mit der Gruppe der  $K_{ATP}$ -Kanäle wird im Rahmen dieser Arbeit eine neue Komponente der Tight-Junction-Regulation untersucht, welche auch in den Vorgang der D-Glucose-induzierten Permeabilitätssteigerung integriert zu sein scheint. Im Folgenden sollen daher die  $K_{ATP}$ -Kanäle näher vorgestellt werden.



**Abb. 1.3: Kinetik der intestinalen Absorption von D-Glucose**

Während die transzelluläre Absorption (rot) via SGLT-1 ihr Maximum bereits bei geringen Konzentrationen an D-Glucose erreicht, steigt die parazelluläre Absorption (grün) direkt proportional mit der luminalen D-Glucose-Konzentration an. Daher steigt auch die Gesamtabsorption (totale Absorption, blau) weiter an nachdem die transzelluläre Absorption ihren Sättigungspunkt erreicht hat.

(nach TURNER, 2000)

### 1.3 ATP-sensitive Kaliumkanäle ( $K_{ATP}$ -Kanäle)

#### 1.3.1 $K_{ATP}$ -Kanäle bilden eine eigene Subgruppe in der Gruppe der Kaliumkanäle

Kaliumkanäle bilden in allen zellulär aufgebauten Organismen eine große und vielseitige Gruppe von Membranproteinen, welche in sämtlichen erregbaren und nicht-erregbaren Zellen exprimiert werden. Über 80 unterschiedliche Untereinheiten von  $K^+$ -selektiven Kanälen sind bis heute allein bei den Säugetieren kloniert bzw. durch verschiedene Genomprojekte identifiziert worden, was mit einem großen Repertoire an Funktionen einhergeht. Sie stabilisieren beispielsweise das Membranruhepotential, wirken regulierend bei der Homöostase des Salz- und Wasserhaushaltes und steuern die Sekretion von Hormonen. Strukturell unterscheidet man drei Familien von Kaliumkanälen:

1. Spannungsabhängige Kaliumkanäle ( $K_V$ -Kanäle), welche durch sechs Transmembrandomänen (S1-S6) und eine Porenregion (P) charakterisiert sind. Sie sind im Ruhezustand der Zelle geschlossen und werden erst bei Depolarisation der Membran aktiviert. Der anschließende Kaliumauswärtsstrom dient dann der Repolarisation der Membran, beispielsweise in Neuronen während eines Aktionspotentials (BIRNBAUM et al., 2004 / RUDY AND MCBAIN, 2001).
2. Einwärtsgleichrichtende Kaliumkanäle ( $K_{IR}$ -Kanäle), deren Unterfamilie  $K_{IR6}$  beim Aufbau der ATP-sensitiven Kaliumkanäle ( $K_{ATP}$ -Kanäle) beteiligt ist (REIMANN AND ASHCROFT, 1999). Diese Unterfamilie umfasst im Säuger die Proteine  $K_{IR6.1}$  und  $K_{IR6.2}$ . Eine  $K_{IR}$ -Untereinheit weist stets zwei Transmembrandomänen (M1 und M2) sowie eine dazwischen liegende Porenregion (P) auf (INAGAKI et al., 1995a). Die Besonderheit dieser Kaliumkanäle besteht darin, dass sie bei negativen Membranpotentialen  $K^+$ -Einwärtsströme wesentlich besser leiten als  $K^+$ -Auswärtsströme bei positiven Potentialen, weshalb diese Kaliumkanäle den Zusatz IR (= inwardly rectifying) erhielten (KATZ, 1949). Neben der starken Einwärtsgleichrichtung ist für die physiologische Bedeutung der  $K_{IR}$ -Kanäle allerdings vorwiegend der geringe Stromfluss in die Auswärtsrichtung von Bedeutung, da sie im Ruhezustand der Zelle zumeist geöffnet sind und leichte Depolarisationen ausgleichen (Stabilisation des Membranruhepotentials). Bei zunehmender Depolarisation schließen sich die  $K_{IR}$ -Kanäle (spannungsabhängige

Blockierung), was durch intrazelluläres  $Mg^{2+}$  oder positiv geladene Amine wie Spermin und Spermidin vermittelt wird (FAKLER et al., 1995).

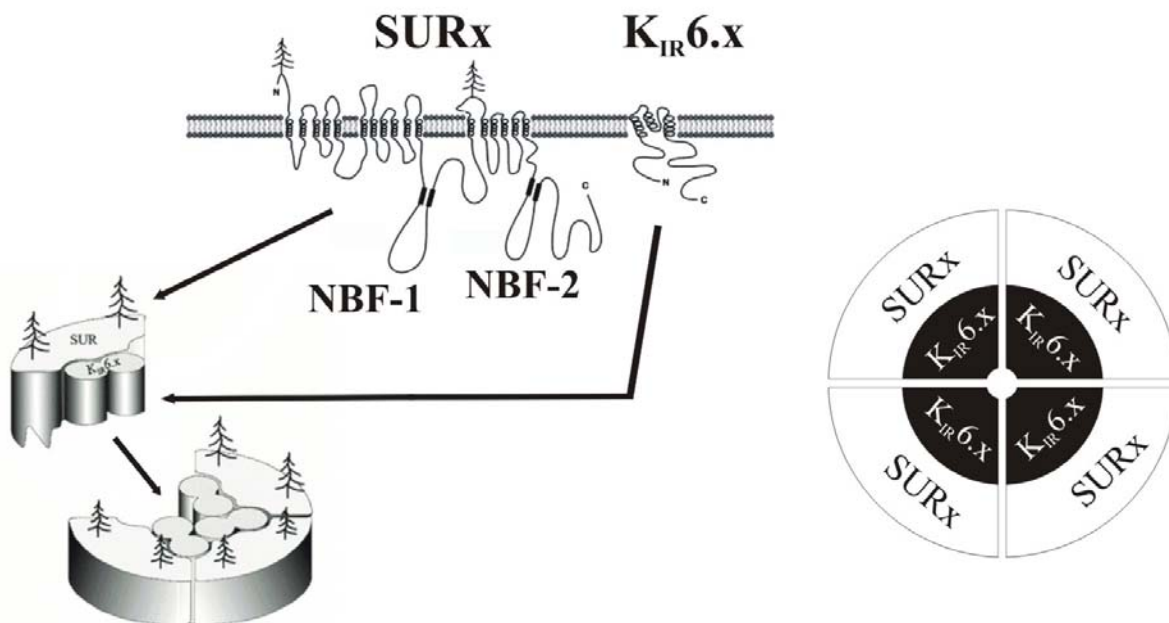
3.  $K_{2P}$ -Kaliumkanäle, bei welchen die Peptidkette einer Untereinheit aus zwei  $K_{IR}$ -Kanal-Motiven (M1-P-M2) besteht und somit zwei Porenregionen und vier Transmembrandomänen enthält. Anders als bei den  $K_V$ - und  $K_{IR}$ -Kanälen, bei welchen sich stets vier Untereinheiten zu einem funktionsfähigen Kanal zusammenlagern müssen, genügt bei den  $K_{2P}$ -Kanälen eine Dimerisierung (GOLDSTEIN et al., 2001 / PATEL AND HONORE, 2001).

### 1.3.2 Molekularer Aufbau von $K_{ATP}$ -Kanälen

ATP-sensitive Kaliumkanäle ( $K_{ATP}$ -Kanäle) sind heteromere Proteinkomplexe, welche in einer Vielzahl von Geweben vorkommen. Sie setzen sich aus zwei verschiedenen Untereinheiten zusammen, den  $K_{IR6}$ - und den SUR-Untereinheiten.

Im Innern des  $K_{ATP}$ -Kanal-Komplexes befinden sich vier Proteine der Unterfamilie  $K_{IR6}$ , welche die eigentliche Ionenpore bilden und zu den einwärtsgleichrichtenden Kaliumkanälen gehören. Die vier  $K_{IR6}$ -Proteine werden von vier SUR-Proteinen (sulfonylurea receptor) umgeben, welche regulatorisch auf die  $K_{IR6}$ -Untereinheiten einwirken. Immunopräzipitationen zeigten, dass zur Regulation der Kanalpore die SUR-Untereinheiten physikalisch mit den  $K_{IR6}$ -Untereinheiten interagieren können (LORENZ AND TERZIC, 1999). SUR-Proteine gehören zur Familie der ATP-bindenden Kassettenproteine (ABC proteins) und zeichnen sich strukturell durch 17 Transmembrandomänen und zwei intrazelluläre Nukleotidbindedomänen (NBF-1 und NBF-2) aus (**Abb. 1.4**). Bislang sind drei verschiedene Subtypen kloniert worden: SUR1 (AGUILAR-BRYAN et al., 1995), SUR2A und SUR2B (INAGAKI et al., 1996 / CHUTKOW et al., 1996 / ISOMOTO et al., 1996).

Ein funktionsfähiger  $K_{ATP}$ -Kanal besteht somit aus vier  $K_{IR6}$ -Untereinheiten und vier SUR-Untereinheiten, so dass der Gesamtkomplex als ein Protein-Oktamer zu bezeichnen ist (CLEMENT et al., 1997). Die Kombination der verschiedenen Untereinheiten bestimmt die jeweiligen gewebespezifischen Eigenschaften verschiedener  $K_{ATP}$ -Kanal-Typen (**siehe Tabelle 1.1**).


**Abb. 1.4: Molekularer Aufbau der  $K_{ATP}$ -Kanäle**

Jeweils vier  $K_{IR6}$ - und SUR-Untereinheiten bilden den oktameren Proteinkomplex eines  $K_{ATP}$ -Kanals. Die im Innern des Komplexes liegenden  $K_{IR6}$ -Untereinheiten formen die eigentliche Ionenpore, während die sie umgebenden SUR-Untereinheiten eine regulatorische Funktion ausüben.

Gewebe	$K_{IR6}$ -Untereinheit	SUR-Untereinheit	Referenzen
Pankreas	$K_{IR6.2}$	SUR1 (Pankreastyp)	(a)
Herz- / Skelettmuskel	$K_{IR6.2}$	SUR2A (kardialer Typ)	(b)
vaskulärer glatter Muskel	$K_{IR6.1}$	SUR2B (glattmuskulärer Typ)	(c)
vaskuläre und andere glatte Muskelzellen	$K_{IR6.2}$	SUR2B (glattmuskulärer Typ)	(d)

**Tabelle 1.1: Gewebespezifische Kombinationen von  $K_{IR6}$ - und SUR-Untereinheiten**

(a) COOK AND HALES, 1984 / INAGAKI et al., 1995b

(b) INAGAKI et al., 1995b / INAGAKI et al., 1996

(c) YAMADA et al., 1997

(d) ISOMOTO et al., 1996 / NELSON AND QUAYLE, 1995

Die hier aufgeführte Tabelle stellt lediglich die im jeweiligen Gewebe vorherrschenden  $K_{IR6}$ /SUR-Kombinationen vor. In glatter Gefäßmuskulatur konnte beispielsweise sowohl  $K_{IR6.1}$  als auch  $K_{IR6.2}$  nachgewiesen und einer Funktion zugeordnet werden (Review: BABENKO et al., 1998).

### 1.3.3 Regulation der $K_{ATP}$ -Kanäle

Die Öffnungswahrscheinlichkeit der  $K_{ATP}$ -Kanäle wird in erster Linie über den intrazellulären ATP/ADP-Quotienten reguliert, wodurch der Energiestoffwechsel einer Zelle mit ihrer elektrischen Aktivität verbunden wird.

ATP interagiert hierbei direkt mit Bindedomänen der porenformenden  $K_{IR6}$ -Untereinheiten und induziert über einen noch unvollständig verstandenen Mechanismus eine Schließung des Kanals (TUCKER et al., 1997 / Nichols, 2006). Dieser Umstand war es, der den  $K_{ATP}$ -Kanälen ursprünglich ihren Namen verlieh. Neben einer ATP-Bindedomäne besitzt eine  $K_{IR6}$ -Untereinheit auch eine Bindedomäne für das in jede Zellmembran integrierte Phospholipid Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat ( $PIP_2$ ), welches eine Öffnung der Kanalpore bewirkt. Einer dieser beiden Liganden, ATP oder  $PIP_2$ , ist stets an die  $K_{IR6}$ -Untereinheit gebunden, da  $K_{IR6}$  ohne die Bindung eines Liganden instabil wäre. Eine zeitgleiche Bindung beider Liganden ist nicht möglich (ENKVETCHAKUL AND NICHOLS, 2003 / NICHOLS, 2006).

Im Gegensatz zum ATP bewirken ADP und auch andere Nukleotiddiphosphate (NDP's) an den Nukleotidbindedomänen (NBF-1 und NBF-2) der SUR-Proteine (GRIBBLE et al., 1998), insbesondere in Anwesenheit von  $Mg^{2+}$  (FINDLAY, 1987), eine Aktivierung des  $K_{ATP}$ -Kanals, so dass sich die Ionenpore öffnet (DUNNE AND PETERSON, 1986a / DUNNE AND PETERSON, 1986b). Es handelt sich hierbei also nicht um einen kompetitiven Effekt zwischen ATP und ADP, da sie unterschiedliche Bindungsstellen an dem  $K_{ATP}$ -Kanal besetzen.

Die SUR-Untereinheiten zeigen darüber hinaus eine Sensitivität gegenüber Sulfonylharnstoffen wie Tolbutamid oder Glibenclamid, welche einen inhibitorischen Effekt auf den  $K_{ATP}$ -Kanal ausüben und eine Schließung der Ionenpore bewirken (FOSSET et al., 1988 / TRUBE et al., 1986). Therapeutisch werden Sulfonylharnstoffe bei der Behandlung des nicht-insulinabhängigen Diabetes mellitus angewendet (**siehe 1.3.4**).

Antagonistisch zu den Sulfonylharnstoffen existiert neben dem ATP eine weitere Gruppe von Substanzen, welche in der Lage ist  $K_{ATP}$ -Kanäle zu aktivieren. Sie werden allgemein als KCO's ( $K^+$  channel openers) bezeichnet und in drei chemische Subklassen unterteilt, deren Hauptvertreter Pinacidil, Diazoxid und Cromakalim darstellen. Ihr Wirkprinzip beruht darauf, dass sie  $Mg^{2+}$ -ADP an der SUR-Untereinheit halten und dadurch den aktivierten, geöffneten

Zustand des  $K_{ATP}$ -Kanal stabilisieren (BIENENGRÄEBER et al., 2000 / ZINGMAN et al., 2001). Ihr klinischer Einsatz als Vasodilatoren ist heute obsolet. Diazoxid wird jedoch auch heute noch bei der Therapie des kongenitalen Hyperinsulinismus (PHHI, **siehe 1.3.4**) eingesetzt.

Regulator	Wirkung	Angriffsort
ATP	Inhibition	$K_{IR6}$ -Untereinheit
$PIP_2$	Stimulation	$K_{IR6}$ -Untereinheit
$Mg^{2+}$ -ADP	Stimulation	SUR-Untereinheit
andere NDP's	Stimulation	SUR-Untereinheit
Sulfonylharnstoffe	Inhibition	SUR-Untereinheit
KCO's	Stimulation	SUR-Untereinheit

**Tabelle 1.2: Regulatoren von  $K_{ATP}$ -Kanälen** (nach YOKOSHIKI et al., 1998, und NICHOLS, 2006)

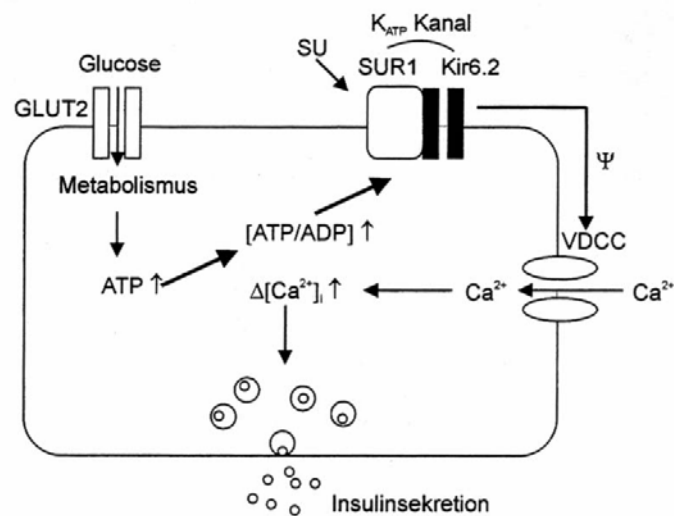
### 1.3.4 Physiologische Funktionen der $K_{ATP}$ -Kanäle

ATP-sensitive Kaliumkanäle sind seit ihrer Entdeckung in Herzmuskelzellen (NOMA, 1983) in einer Vielzahl weiterer Gewebe beschrieben worden. Zu diesen Geweben gehören die Skelettmuskulatur und die glatte Muskulatur, verschiedene endokrine Organe wie Adenohypophyse oder Pankreas, der juxtaglomeruläre Apparat des Vas afferens der Niere, vaskuläre und avaskuläre Endothelien, die Follikelzellen des Ovars sowie die Neuronen und Astrozyten bestimmter Regionen des Zentralnervensystems (EDWARDS AND WESTON, 1993 / QUAIST, 1996 / JIANG AND HADDAD, 1997).

In Gehirn und Myokard scheinen  $K_{ATP}$ -Kanäle an protektiven Mechanismen während ischämischer Zustände beteiligt zu sein. Der Sauerstoff- und Glucosemangel während einer Gewebeischämie bewirkt durch den folglich intrazellulären ATP-Mangel eine Unterfunktion der  $Na^+$ - $K^+$ -ATPase, was zu einem Verlust der Ionengradienten und infolge dessen zu einer Depolarisation der Zellmembran führt. Extrazelluläres Chlorid kann nun ungehindert in die Zelle strömen und führt durch das begleitende Wasser zu einer Zellschwellung, welche letztlich den

Tod der Zelle verursacht. Die Depolarisation induziert zudem die Öffnung spannungsabhängiger Calciumkanäle und führt durch Calcium-bedingte Hemmung der mitochondrialen Atmung zu einer Verstärkung des ATP-Mangels. Die durch den ATP-Mangel bedingte Öffnung der  $K_{ATP}$ -Kanäle wirkt nun durch einen Kaliumausstrom dieser Depolarisation entgegen (kompensatorische Hyperpolarisation), wodurch beispielsweise der spannungsabhängige Calciumeinstrom zeitweilig verhindert wird (YOKOSHIKI et al., 1998 / FREEDMAN AND LIN, 1996). Die  $K_{ATP}$ -Kanäle ermöglichen dadurch ein mittelfristiges Überleben der betreffenden Zelle bzw., unter Betrachtung des Gesamtorgans Gehirn oder Herz, auch das Überleben des gesamten Organismus.

Besonders gut verstanden ist die Funktion der  $K_{ATP}$ -Kanäle bei der Glucose-induzierten Freisetzung von Insulin in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas (**Abb. 1.5**). Bei einem Anstieg des Blutglucosespiegels nach einer kohlenhydratreichen Mahlzeit von 2-3 auf ca. 5-7 mM kommt es über GLUT-2-Kanäle zu einem vermehrten Einstrom von Glucose in die  $\beta$ -Zellen, welche dort umgehend dem Metabolismus der Zelle zugeführt wird. Die dabei ansteigende Konzentration des intrazellulären ATP-Spiegels bewirkt eine Inhibition der  $K_{ATP}$ -Kanäle, so dass sich ihre Ionenporen verschließen und es durch Verhinderung des  $K^+$ -Ausstroms zu einer Depolarisation der Zellmembran kommt. Durch die Depolarisation öffnen sich spannungsabhängige Calciumkanäle, was einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration zur Folge hat und dadurch die Exozytose der Insulingranula stimuliert (MISLER, 1995 / MIKI et al., 1999). Da Sulfonylharnstoffe wie Tolbutamid oder Glibenclamid durch Interaktion mit der SUR1-Untereinheit des pankreatischen  $K_{ATP}$ -Kanals ebenfalls eine Inhibition des Kanals und infolge dessen eine Insulinsekretion bewirken, werden entsprechende Präparate bei der Behandlung des nicht-insulinabhängigen Diabetes mellitus (= NIDDM oder Diabetes mellitus Typ 2) eingesetzt. Auch der seltene kongenitale Hyperinsulinismus (= persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy, PHHI) verdeutlicht die Bedeutung der  $K_{ATP}$ -Kanäle bei der Insulinfreisetzung. Bei dieser autosomal-rezessiven Erbkrankheit von Neugeborenen und Kleinkindern führen Mutationen der SUR1-Untereinheit (THOMAS et al., 1995) oder der  $K_{IR6.2}$  Untereinheit (THOMAS et al., 1996) zu einem Verlust der pankreatischen  $K_{ATP}$ -Kanal-Aktivität. Das Krankheitsbild ist durch einen ständigen Glucosemangel im Blut charakterisiert, welcher durch eine permanente Insulinausschüttung verursacht wird. Zur Therapie dieses Syndroms gehört unter anderem die Reduktion der Insulinsekretion durch den  $K_{ATP}$ -Kanal-Aktivator Diazoxid.



**Abb. 1.5: Modellvorstellung der Insulinsekretion durch die  $\beta$ -Zellen des Pankreas**

Die via GLUT-2 (= Glucosetransporter 2) aufgenommene Glucose verursacht durch den zelleigenen Metabolismus einen Anstieg der intrazellulären ATP-Konzentration. Das ATP inhibiert den pankreatischen K<sub>ATP</sub>-Kanal K<sub>IR</sub>6.2/SUR1, was eine Depolarisation der Zellmembran ( $\psi$ ) zur Folge hat. Die Spannungsänderung bewirkt eine Öffnung spannungsabhängiger Calciumkanäle (VDCC = voltage dependent calcium channel), wodurch es über einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration zu einer Freisetzung des in den Granula befindlichen Insulins kommt. Sulfonylharnstoffe (= SU) wie Tolbutamid oder Glibenclamid blockieren diesen Mechanismus der Insulinsekretion, indem sie mit der SUR1-Untereinheit interagieren und dadurch eine Inhibition des K<sub>ATP</sub>-Kanals (= Schließung der Ionenpore) bewirken.

(nach MIKI et al., 1999)



## 1.4 Fragestellung

Alle Zellen eines Organismus haben entsprechend ihrer Funktion eine genetisch festgelegte und hochspezifische Ausstattung mit Kaliumkanälen. Dieses ermöglicht eine feine Ausbalancierung der Zellhomöostase und ist für eine flexible Anpassungsfähigkeit an unterschiedliche physiologische und pathophysiologische Situationen unentbehrlich.

Von der Gruppe der ATP-sensitiven Kaliumkanäle ( $K_{ATP}$ -Kanäle) sind bisher sehr unterschiedliche Funktionen beschrieben worden, wie die Freisetzung von Insulin im Pankreas oder der Protektion von Herz- und Nervenzellen während ischämischer Zustände. Das gewebespezifische Vorkommen bestimmter  $K_{ATP}$ -Kanal-Subtypen ließ den Schluss zu, dass bislang noch nicht identifizierte Kombinationen von  $K_{ATP}$ -Kanal-Untereinheiten in anderen Geweben weitere noch nicht bekannte Funktionen ausüben könnten.

In einem ersten Schritt sollte daher das Vorkommen sowie die genaue subzelluläre Verteilung von  $K_{ATP}$ -Kanälen in peripheren Organen untersucht werden. Hierfür standen hochspezifische Antiseren gegen die bei Säugetieren bekannten  $K_{ATP}$ -Kanal-Untereinheiten ( $K_{IR6.1}$ ,  $K_{IR6.2}$ , SUR1, SUR2A und SUR2B) zur Verfügung. Voruntersuchungen im Labor von T. Jöns deuteten auf ein Vorkommen von  $K_{ATP}$ -Kanälen in verschiedenen Epithelien hin. Aufbauend auf diesen Untersuchungen sollte im Rahmen dieser Arbeit insbesondere der Frage nach der zellulären und subzellulären Verteilung sowie der physiologischen Bedeutung der Untereinheiten  $K_{IR6.1}$  und SUR2A nachgegangen werden. Neben der rein morphologischen Beschreibung sollten darüber hinaus auch funktionelle Ansätze entwickelt werden, welche möglicherweise auf neue Funktionen von  $K_{ATP}$ -Kanälen schließen lassen.