

**Untersuchungen zur Bedeutung des Sulfonylharnstoffrezeptors 1
für die Modulation von Apoptose durch 17 β -Estradiol
in rekombinanten HEK (Human Embryonic Kidney) 293-Zellen
und in pankreatischen β -Zellen**

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

**Fakultät Naturwissenschaften
Universität Hohenheim**

Institut für Ernährungsmedizin
Fachgebiet Ernährungsphysiologie

Institut für Pharmakologie und Toxikologie
Universitätsklinikum Tübingen

vorgelegt von
Stefanie Ackermann

aus Heilbronn
2009

Dekan:	Prof. Dr. Heinz Breer
1. berichtende Person:	Prof. Dr. Christiane Bode
2. berichtende Person:	Priv. Doz. Dr. Annette Hambrock
3. Prüfer:	Prof. Dr. Lutz Graeve

Eingereicht am:	04.03.2009
Tag der mündlichen Prüfung:	29.06.2009

Die vorliegende Arbeit wurde am 28.04.09 von der Fakultät Naturwissenschaften der Universität Hohenheim als „Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften“ angenommen.

Für Luze und Betha

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	ATP-sensitive Kaliumkanäle (K_{ATP}-Kanäle)	1
1.1.1	Aufbau und Vorkommen von K _{ATP} -Kanälen	1
1.1.2	Regulation von K _{ATP} -Kanälen	4
1.1.3	Gezielt vorgenommene bzw. (patho)physiologisch vorkommende Mutationen des Sulfonylharnstoffrezeptors (SUR)	4
1.1.4	Die Rolle der K _{ATP} -Kanäle bei der Insulinsekretion	6
1.2	Diabetes mellitus	9
1.2.1	Diabetes mellitus Typ 1 und Typ 2	9
1.2.2	Gestationsdiabetes mellitus (GDM)	10
1.3	Apoptose	12
1.3.1	Apoptose und Nekrose – ein Vergleich	13
1.3.2	Mechanismen des apoptotischen Zelltodes	15
1.3.3	Induktion von Apoptose in pankreatischen β -Zellen	19
1.4	Estrogene	21
1.4.1	Synthese, physiologische Bedeutung und Elimination von Estrogenen	21
1.4.2	Die „klassischen“ Estrogenrezeptoren α und β	23
1.4.3	Biologische Effekte von 17 β -Estradiol	24
2	Fragestellung der Arbeit	26
3	Material und Methoden	28
3.1	Material	28
3.1.1	Chemikalien	28
3.1.2	Geräte und Verbrauchsmaterialien	29
3.1.3	Medien und Lösungen	31
3.1.3.1	Wachstumsmedien für die Zellkultur	31
3.1.3.1.1	Wachstumsmedium für HEK (Human Embryonic Kidney) 293-Zellen	31
3.1.3.1.2	Wachstumsmedium für A-10-Zellen	31
3.1.3.1.3	Wachstumsmedium für HIT-T15- und RIN-m5F-Zellen	31
3.1.3.1.4	Medium zur Kultivierung isolierter Langerhans-Inseln	32
3.1.3.2	Medien zum Einfrieren von Zellen	32

3.1.3.3	Trypsin/EDTA-Lösung	32
3.1.3.4	Paraformaldehyd-Lösung	32
3.1.3.5	Hoechst 33258-Lösung	33
3.1.3.6	Pufferlösungen für die Bestimmung von Caspase-Aktivitäten	33
3.1.3.7	Pentobarbital-Lösung	33
3.1.3.8	Kollagenase-Lösung	33
3.2	Methoden	34
3.2.1	Zellkultur	34
3.2.1.1	Plasmide und Zelllinien	34
3.2.1.2	Gewinnung rekombinanter HEK (Human Embryonic Kidney) 293-Zellen mittels Lipofektion	35
3.2.1.3	Transiente Co-Transfektion von HEK293-Zellen mit dem Sulfonylharnstoffrezeptor (SUR) 1 und der porenbildenden K_{ATP} -Kanal-Untereinheit Kir6.2	36
3.2.1.4	Gewinnung stabil transfizierter HEK293-Zellen am Beispiel der Isolation von Zellen, welche die Mutante SUR1(R1379C) exprimieren	38
3.2.1.5	Kultivierung stabil transfizierter HEK293-Zellen	38
3.2.1.6	Kultivierung von HIT-T15-, RIN-m5F- und A-10-Zellen	39
3.2.1.7	Auftauen von Zellen	40
3.2.1.8	Einfrieren von Zellen	41
3.2.1.8.1	HEK293-Zellen	41
3.2.1.8.2	HIT-T15-, RIN-5mF- und A-10-Zellen	41
3.2.1.9	Versuchstiere	41
3.2.1.9.1	Isolierung von Langerhans-Inseln	42
3.2.2	Apoptose-Nachweise	42
3.2.2.1	Behandlung von Zellen mit verschiedenen Substanzen	42
3.2.2.2	Quantifizierung der Zellablösung	44
3.2.2.3	Anfärbung von Zellkernen mit dem Farbstoff Hoechst 33258	46
3.2.2.4	Bestimmung der Enzymaktivität verschiedener Caspasen	47
3.2.2.4.1	Aufarbeitung von HEK293-Zellen für die Bestimmung der Caspase-Aktivität	47
3.2.2.4.2	Messung der Enzymaktivitäten von Caspase-3, -8 und -9	48
3.2.2.4.3	Proteinbestimmung nach Bradford	49
3.2.2.5	Statistik	51

4	Ergebnisse	52
4.1	Bestimmung unterschiedlicher apoptotischer Parameter nach Behandlung verschiedener Zellen mit 17β-Estradiol	52
4.1.1	Wirkung von 17 β -Estradiol auf HEK293-Zellen, welche den Sulfonylharnstoffrezeptor (SUR) 1 exprimieren	52
4.1.1.1	Einfluss der Co-Expression von SUR1 und der porenbildenden K _{ATP} -Kanal-Untereinheit Kir6.2 auf die Zellablösung nach Behandlung mit 17 β -Estradiol	55
4.1.2	Wirkung von 17 β -Estradiol auf HEK293-Zellen, welche den SUR1 exprimieren, im Vergleich zu anderen Substanzen	57
4.1.2.1	Vergleich der Wirkung von 17 β -Estradiol und Estron auf HEK293-Zellen, welche den SUR1 exprimieren	60
4.1.3	Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung von 17 β -Estradiol auf HEK293-Zellen, welche den SUR1 exprimieren	63
4.1.4	Bestimmung der Aktivität verschiedener Caspase-Enzyme nach Behandlung mit 17 β -Estradiol	64
4.1.5	Untersuchungen des Effekts des Proteinkinase C-Aktivators Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (TPA) auf die durch 17 β -Estradiol induzierte Apoptose	66
4.1.6	Wirkung von 17 β -Estradiol auf HEK293-Zellen, die verschiedene Isoformen des Sulfonylharnstoffrezeptors exprimieren	69
4.1.7	Einfluss verschiedener Mutationen des SUR auf die apoptotische Wirkung von 17 β -Estradiol	71
4.1.7.1	Einfluss von Mutationen in der Transmembranhelix 17 des SUR auf die apoptotische Wirkung von 17 β -Estradiol	71
4.1.7.2	Einfluss von Mutationen in der Nukleotidbindungsfalte des SUR1 auf die apoptotische Wirkung von 17 β -Estradiol	74
4.1.8	Vergleich der Wirkung von 17 β -Estradiol und Estron auf klonale β -Zellen	76
4.1.8.1	Wirkung von 17 β -Estradiol auf klonale β -Zellen	76
4.1.8.2	Wirkung von Estron auf klonale β -Zellen	79
4.1.9	Wirkung von 17 β -Estradiol auf Langerhans-Inseln von Wildtyp-Mäusen	81
4.1.10	Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung von 17 β -Estradiol auf Langerhans-Inseln von Wildtyp-Mäusen	84
4.1.11	Wirkung von 17 β -Estradiol auf Langerhans-Inseln von Wildtyp-Mäusen im Vergleich zu SUR1-Knockout-Mäusen	85

5	Diskussion	88
5.1	17β-Estradiol moduliert Apoptose in pankreatischen β-Zellen unter Beteiligung des Sulfonylharnstoffrezeptors (SUR) 1	88
5.1.1	17 β -Estradiol verstärkt die Induktion von Apoptose in HEK293-Zellen, welche den SUR1 exprimieren	89
5.1.2	17 β -Estradiol moduliert Apoptose in Zellen, welche den SUR1 endogen exprimieren	90
5.1.3	17 β -Estradiol induziert in HEK293-Zellen, welche den SUR1 exprimieren, deutlich stärker Apoptose als andere ausgewählte Substanzen	93
5.1.4	Das Ausmaß des apoptotischen Effektes von 17 β -Estradiol auf Zellen, welche den SUR1 exprimieren, ist abhängig von Konzentration und Inkubationszeit	94
5.1.5	Die durch 17 β -Estradiol induzierte und für den SUR1 spezifische Apoptose erfordert nicht die Existenz von Kir6.2	95
5.1.6	Verschiedene Mutationen im SUR beeinflussen die apoptotische Wirkung von 17 β -Estradiol	96
5.1.6.1	Mutationen in der Transmembranhelix 17 des SUR beeinflussen die apoptotische Wirkung von 17 β -Estradiol	96
5.1.6.2	Mutationen in der Nukleotidbindungsfalte des SUR1 verstärken die apoptotische Wirkung von 17 β -Estradiol	98
5.1.7	17 β -Estradiol steigert die Aktivität von Caspase-3, -8 und -9 in HEK293-Zellen, welche den SUR1 exprimieren	99
5.1.8	Der Proteinkinase C-Aktivator Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (TPA) reduziert die durch 17 β -Estradiol induzierte Apoptose	100
6	Zusammenfassung und Ausblick	101
7	Summary	107
8	Abkürzungsverzeichnis	112
9	Literaturverzeichnis	115
	Publikationen	136
	Lebenslauf	137
	Danksagung	138
	Eidesstattliche Erklärung	139

1 Einleitung

1.1 ATP-sensitive Kaliumkanäle (K_{ATP} -Kanäle)

1.1.1 Aufbau und Vorkommen von K_{ATP} -Kanälen

ATP-sensitive Kaliumkanäle (K_{ATP} -Kanäle) sind hetero-oktamere Molekülkomplexe (siehe Abbildung 1.1), welche in einer 4:4-Stöchiometrie aus den porenbildenden Kanal-Untereinheiten der Kir6.x-Familie (Kir6.1 oder Kir6.2) und den Sulfonylharnstoffrezeptoren (SURs) als regulatorischen Untereinheiten aufgebaut sind (Clement et al., 1997, Ashcroft und Gribble, 1998, Aguilar-Bryan und Bryan, 1999, Seino, 1999, Seino und Miki, 2003, Mikhailov et al., 2005, Burke et al., 2008).

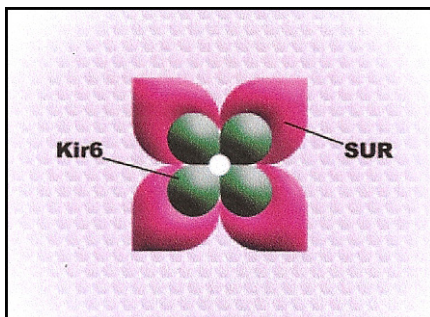


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung eines K_{ATP} -Kanals (aus Burke et al., 2008)

K_{ATP} -Kanäle sind hetero-multimere Komplexe, welche aus zwei Untereinheitentypen aufgebaut sind. Sie bestehen aus den porenbildenden Kanal-Untereinheiten Kir6.x und den Sulfonylharnstoffrezeptoren (SURs) als regulatorischen Untereinheiten.

Die beiden Isoformen Kir6.1 (Inagaki et al., 1995b) und Kir6.2 (Inagaki et al., 1995a, Sakura et al., 1995b), welche durch verschiedene Gene codiert werden, gehören zur Familie der einwärts-gleichgerichteten Kalium-Kanäle. Sie besitzen zwei Transmembrandomänen (TMD) und weisen eine ca. 70 %ige Homologie bezüglich ihrer Aminosäuresequenz auf (Inagaki et al., 1995a).

Der SUR ist ein Mitglied der Subfamilie C der ATP-bindenden Kassettenproteine (ABC-Proteine) (Higgins, 1992), zu welcher außerdem der Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) und das Multidrug Resistance-Related Protein 1 (MRP1) gehören. Bei den ABC-Proteinen handelt es sich um eine der größten Protein-Familien, welche in den Membranen prokaryotischer und eukaryotischer Lebewesen zu finden sind. Trotz ihrer strukturellen Gemeinsamkeiten besitzen diese Proteine sehr unterschiedliche

Funktionen. Viele Mitglieder dieser Familie sind in der Lage, Substrate wie Lipide, Gallensalze oder auch toxische Substanzen durch die Plasmamembran zu transportieren. Die für diese Prozesse erforderliche Energie stammt aus der Hydrolyse von ATP (Klein et al., 1999, Borst und Elferink, 2002). In Prokaryoten sorgen ABC-Proteine zumeist für den Import von Substraten, während sie in Eukaryoten überwiegend eine Rolle bei dem Transport von Substanzen aus der Zelle oder in intrazelluläre Organellen spielen (Hollenstein et al., 2007, Aittoniemi et al., 2009). Da für den SUR solche Transportfunktionen bisher nicht bekannt sind, er jedoch eine regulatorische Funktion im K_{ATP} -Kanal besitzt, wird dieser Rezeptor auch als atypisches ABC-Protein bezeichnet (Burke et al., 2008, Aittoniemi et al., 2009).

Bei SUR werden die zwei Isoformen SUR1 und SUR2 unterschieden, welche von verschiedenen Genen codiert werden. Durch alternatives Spleißen des SUR2-Gens entstehen wiederum die Isoformen SUR2A und SUR2B (Chutkow et al., 1996, Isomoto et al., 1996, Chutkow et al., 1999, Seino und Miki, 2003). Diese unterscheiden sich lediglich in den letzten 42 carboxyterminalen Aminosäuren des Moleküls.

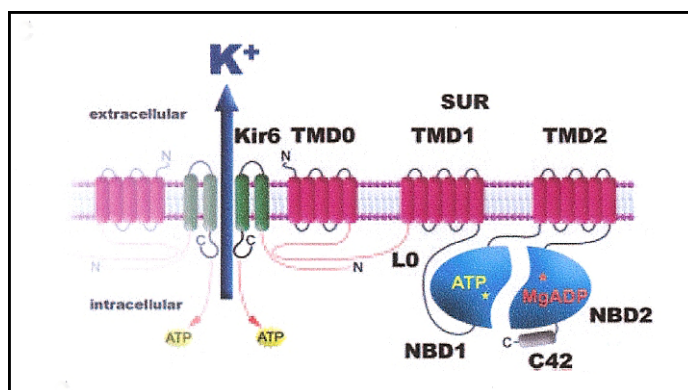


Abbildung 1.2: Molekularer Aufbau des Sulfonylharnstoffrezeptors (SUR) und Kir6.x im ATP-sensitiven Kaliumkanal (aus Burke et al., 2008)

Der SUR (rot) umfasst drei Transmembrandomänen (TMDs), welche jeweils aus fünf bzw. sechs Transmembranhelices aufgebaut sind. Angrenzend an TMD1 und TMD2 sind die beiden cytoplasmatischen Nukleotidbindungsstellen (NBD1 und NBD2) lokalisiert. NBD1 befindet sich zwischen TMD1 und TMD2, NBD2 liegt zwischen TMD2 und dem carboxyterminalen Ende des SURs. SUR interagiert mit der porenbildenden Unter-einheit Kir6.x (grün) über die TMD0 und die Verbindungsregion LO.

Der SUR besitzt 17 Transmembranhelices (TMs), welche in drei Transmembrandomänen (TMDs) angeordnet sind (siehe Abbildung 1.2). TMD0 besteht aus fünf Transmembranhelices, TMD1 sowie TMD2 werden von jeweils sechs Transmembranhelices gebildet (Conti et al., 2001, Seino und Miki, 2003, Burke et al., 2008). Außerdem verfügt der SUR über zwei cytoplasmatische Nukleotidbindungsstellen (NBF1 und NBF2), welche die Sensitivität gegenüber MgATP/MgADP vermitteln (Babenko et al., 1998, Conti et al., 2001, Seino und Miki,

2003, Burke et al., 2008). NBF1 befindet sich zwischen TMD1 und TMD2, NBF2 liegt zwischen TMD2 und dem carboxyterminalen Ende des SURs. Die Aminosäuresequenzen der NBFs der ABC-Proteine sind stark konserviert und enthalten jeweils zwei Regionen, welche für die Bindung bzw. Hydrolyse von ATP verantwortlich sind. NBF2 von SUR1 weist eine höhere ATPase-Aktivität auf als NBF1 (Matsuo et al., 1999, de Wet et al., 2007a, Aittoniemi et al., 2009).

Ursprünglich wurden die K_{ATP} -Kanäle im Herzen entdeckt (Noma, 1983); sie sind jedoch auch in zahlreichen anderen Geweben bzw. Zellen zu finden, z.B. in pankreatischen β -Zellen (Ashcroft et al., 1984, Cook und Hales, 1984, Rorsman und Trube, 1985), in neuronalen Zellen (Ashford et al., 1988, Amoroso et al., 1990, Bernardi et al., 1993), in Skelettmuskelzellen und glatten Muskelzellen (Spruce et al., 1985, Standen et al., 1989) sowie in Nierenzellen (Hunter und Giebisch, 1988).

Die K_{ATP} -Kanäle in pankreatischen β -Zellen und neuronalen Zellen (Aguilar-Bryan et al., 1995, Inagaki et al., 1995a, Sakura et al., 1995b) sind aus SUR1 und Kir6.2 zusammengesetzt, in Herz- (Standen et al., 1989) und Skelettmuskelzellen (Spruce, 1985) sind SUR2A und Kir6.2 assoziiert. In glatten Gefäßmuskelzellen ist die Kombination SUR2B und Kir6.1 (Yamada et al., 1997) zu finden und in nicht vaskulärem glattem Muskelgewebe sind die K_{ATP} -Kanäle aus SUR2B und Kir6.2 (Isomoto et al., 1996) zusammengesetzt. Tabelle 1.1 zeigt eine Übersicht über die Zusammensetzung der K_{ATP} -Kanäle in den unterschiedlichen Geweben (Seino und Miki, 2003).

Tabelle 1.1: Zusammensetzung der K_{ATP} -Kanäle in verschiedenen Geweben (nach Seino und Miki, 2003)

Gewebe bzw. Zelltyp	SUR	Kir
β -Zellen (Pankreas), neuronale Zellen	SUR1	Kir6.2
Herz- und Skelettmuskulatur	SUR2A	Kir6.2
glatte Gefäßmuskulatur	SUR2B	Kir6.1
nicht-vaskuläres glattes Muskelgewebe	SUR2B	Kir6.2

1.1.2 Regulation von K_{ATP} -Kanälen

Da K_{ATP} -Kanäle einer komplexen Regulation durch intrazelluläre Adenosin-Nukleotide unterliegen, erfüllen sie die Funktion eines metabolischen Sensors. Diese Kanäle koppeln den metabolischen Zustand einer Zelle an deren Membranpotential (Nichols, 2006). Prinzipiell hemmt intrazelluläres ATP die Kanäle, während MgADP diese aktiviert, indem es mit den Nukleotidbindungsfalten des Sulfonylharnstoffrezeptors (SUR) interagiert (Noma, 1983, Ashcroft, 1988, Gribble et al., 1997, Shyng et al., 1997).

Der SUR1, die regulatorische Untereinheit pankreatischer K_{ATP} -Kanäle, besitzt wichtige Funktionen. Dieser Rezeptor moduliert die Öffnungswahrscheinlichkeit des Ionenkanals und beeinflusst dessen ATP-Sensitivität. Außerdem verleiht er dem K_{ATP} -Kanal eine Empfindlichkeit für Kanal-Modulatoren, welche direkt an den SUR1 binden und die Aktivität des Kanals verändern können (Proks und Ashcroft, 1997, Tucker et al., 1997, Ashfield et al., 1999, Nichols, 2006, Aittoniemi et al., 2009). So sorgen z.B. Sulfonylharnstoffe, wie Glibenclamid und Tolbutamid, für eine Hemmung (Kanal-Blocker), und Kanal-Öffner, wie Diazoxid, für eine Aktivierung des Kanals. Da die Blocker die K_{ATP} -Kanäle in pankreatischen β -Zellen hemmen und somit die Insulinsekretion steigern, werden verschiedene K_{ATP} -Kanal-Blocker in der Therapie von Diabetes Typ 2 eingesetzt (Sturgess et al., 1985, Trube et al., 1986, Dunne et al., 1987, Nichols und Koster, 2002, Seino und Miki, 2003).

1.1.3 Gezielt vorgenommene bzw. (patho)physiologisch vorkommende Mutationen des Sulfonylharnstoffrezeptors (SUR)

Mutationen im SUR-Gen können bei Menschen zu verschiedenen Erkrankungen, wie z.B. Hyperinsulinämie, neonatalem Diabetes sowie Kardiomyopathie (Ashcroft, 2005, Gloyn et al., 2006) führen. Aus verschiedenen Arbeiten ist bekannt, dass die Isoformen des SUR unterschiedliche Affinitäten für Öffner und Blocker aufweisen. Während SUR1 eine hohe Affinität gegenüber dem Kanal-Blocker Glibenclamid und eine niedrige Affinität für die meisten Kanal-Öffner zeigt, verhält sich SUR2 diesbezüglich invers. So weist SUR2 eine niedrige Affinität für Glibenclamid, jedoch eine hohe Affinität für die meisten Kanal-Öffner auf (Aguilar-Bryan et al., 1995, Inagaki et al., 1996, Seino und Miki, 2003).

Eine für die Glibenclamid-Bindung wichtige Aminosäure ist Serin (S) an der Position 1237 in SUR1 (Ashfield et al., 1999) bzw. Tyrosin (Y) an der Position 1206 bei SUR2. Diese Aminosäuren befinden sich in der cytoplasmatischen Schleife zwischen Transmembranhelix (TM) 14 und TM15. Zur näheren Charakterisierung der Glibenclamid-Bindung an SUR2

wurden Studien an den Mutanten SUR2A(Y1206S) oder SUR2B(Y1206S) durchgeführt. Bei diesen Mutanten wurde das Tyrosin gegen die korrespondierende Aminosäure Serin von SUR1 ausgetauscht. Die Mutationen an Position 1206 bei SUR2 sorgen für eine Verstärkung der sonst relativ geringen Affinitäten von SUR2A und SUR2B für Glibenclamid (Hambrock et al., 2001, Stephan et al., 2005). Aufgrund ihrer erhöhten spezifischen Glibenclamid-Bindung bei gleichzeitig fast kaum veränderter Öffner-Bindung eignen sich die Mutanten SUR2A(Y1206S) und SUR2B(Y1206S) gut für pharmakologische Analysen mit Hilfe von Radioliganden-Bindungsstudien, und erlauben somit auch einen systematischen Vergleich von Bindungsanalysen bei SUR1 und SUR2 unter paralleler Verwendung von ^3H -Glibenclamid als Radioligand.

Wie Moreau et al. (2000) anhand von gezielten Punktmutationen nachweisen konnten, ist die Aminosäure Methionin (M) an der Position 1289 der Transmembranhelix 17 von SUR1 maßgeblich an der Aktivierung der K_{ATP} -Kanäle durch Öffner beteiligt. Hambrock et al., (2004) konnten nachweisen, dass die Mutation SUR1(M1289T) die Bindung für Öffner verbessert, die Bindung von Glibenclamid jedoch nicht beeinflusst. Bei SUR1(M1289T) handelt es sich um eine Mutante, bei der die Aminosäure Methionin an Position 1289 durch Threonin, die Aminosäure, welche sich bei SUR2B an korrespondierender Stelle befindet, ausgetauscht wurde. Die dazu inverse Mutation T1254M bei SUR2 beeinträchtigt die Bindung verschiedener Öffner, die Bindung von Glibenclamid wird jedoch nicht beeinflusst (Hambrock et al., 2005). In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, inwiefern die Mutationen SUR1(M1289T) bzw. SUR2B(T1254M) Einfluss auf die apoptotische Wirkung von 17β -Estradiol (siehe Kapitel 1.4) nehmen.

Innerhalb der Subfamilie C der ABC-Proteine befindet sich ein stark konservierter Tryptophan-Rest in der carboxyterminalen Helix, welcher bei verschiedenen Isoformen des Multidrug Resistance-Related Proteins (MRP) entscheidend an der Bindung von Liganden bzw. Transportsubstraten beteiligt ist (Ito et al., 2001a und 2001b, Zhang et al., 2002, Oleschuk et al., 2003). Die Mutation dieses Tryptophan-Restes, welcher sich bei SUR1 an der Position 1296 befindet, nimmt entscheidenden Einfluss auf die Glibenclamid-Bindung (Hiller et al., 2006). In dieser Arbeit wurden Experimente an einer SUR1-Mutanten durchgeführt, bei welcher der Tryptophan-Rest an Position 1296 durch Alanin ausgetauscht wurde (SUR1(W1296A)), um den Einfluss dieser Mutation auf die apoptotische Wirkung von 17β -Estradiol zu untersuchen.

Es gibt natürlich vorkommende Mutationen, die in der zweiten Nukleotidbindungsfalte des SUR lokalisiert sind und zu einer erhöhten ATPase-Aktivität führen.

Die Mutationen SUR1(R1379C) und SUR1(R1379L) wurden in Patienten mit vorübergehendem neonatalem Diabetes gefunden, in deren Familien teilweise gehäuft Diabetes Typ 2 oder Gestationsdiabetes auftrat (Babenko et al., 2006, de Wet et al., 2007b, Vaxillaire et al., 2007). In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob die durch SUR1 vermittelte Apoptose nach Behandlung mit 17 β -Estradiol an eine korrekte Funktion der Nukleotidbindungsfolten gekoppelt ist.

1.1.4 Die Rolle der K_{ATP} -Kanäle bei der Insulinsekretion

Pankreatische β -Zellen synthetisieren Insulin zunächst in Form einer einzigen Peptidkette, das Prä-Proinsulin. Durch enzymatische Proteolyse entsteht über eine Zwischenstufe (Proinsulin) das eigentliche Insulinmolekül, welches sich aus zwei Peptidketten zusammensetzt. Dieses wird in sekretorischen Vesikeln gespeichert. Wie in Abbildung 1.3 (b) dargestellt ist, wird Blut-Glucose über den Glucose-Transporter Glut2 aus dem Blut in die β -Zellen aufgenommen und metabolisiert. Dies führt zu einer Erhöhung des ATP/ADP-Verhältnisses und zum Schließen von K_{ATP} -Kanälen. Die Folge ist eine Depolarisation der Zellmembran, was wiederum zur Öffnung von spannungsabhängigen L-Typ-Calcium-Kanälen führt. Durch den daraus resultierenden Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration im Cytoplasma wird schließlich die Exozytose von Insulin-Vesikeln ausgelöst (Aguilar-Bryan und Bryan, 1999, Miki et al., 1999, Ashcroft, 2000, Henquin, 2000, Doyle und Egan, 2003, Gribble und Reimann, 2003, Efrat, 2004, Shibasaki et al., 2004, Aittoniemi et al., 2009). Ein niedriger Blutglucosespiegel fördert hingegen eher einen geöffneten Zustand der K_{ATP} -Kanäle (siehe Abbildung 1.3 (a)). Aufgrund der dadurch hervorgerufenen Hyperpolarisation der Plasmamembran bleiben die spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle geschlossen, und die Sekretion von Insulin wird verhindert.

Die regulatorische Funktion des SUR1 in pankreatischen K_{ATP} -Kanälen ist von großer Bedeutung für die Sekretion adäquater Mengen an Insulin. Loss-of-Function- oder auch Gain-of-Function-Mutationen des SUR1-Gens können daher zu Funktionsstörungen wie kongenitaler Hyperinsulinämie einerseits, bzw. neonatalem Diabetes andererseits, führen (Huopio et al., 2002, Ashcroft, 2005, Gloyn et al., 2006, Ashcroft, 2007, Aittoniemi et al., 2009). Loss-of-Function-Mutationen in SUR1 reduzieren die Aktivität von K_{ATP} -Kanälen, was zu einer anhaltenden Depolarisation der Plasmamembran führt. Dieses hat zur Folge, dass spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle geöffnet sind, Calcium in die Zelle einströmt, und es zur anhaltenden Sekretion von Insulin und somit zur Hyperinsulinämie kommt (siehe Abbildung 1.3 (c)). Eine Gain-of-Function-Mutation in SUR1 hingegen führt zur permanenten Öffnung

der K_{ATP} -Kanäle. Dieses hat zur Folge, dass auch bei hohem Blutglucosespiegel die Plasmamembran hyperpolarisiert ist und die spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle geschlossen bleiben. Dieses verhindert die Exozytose von Insulin und kann letztendlich die Ursache von Diabetes mellitus darstellen (siehe Abbildung 1.3 (d)).

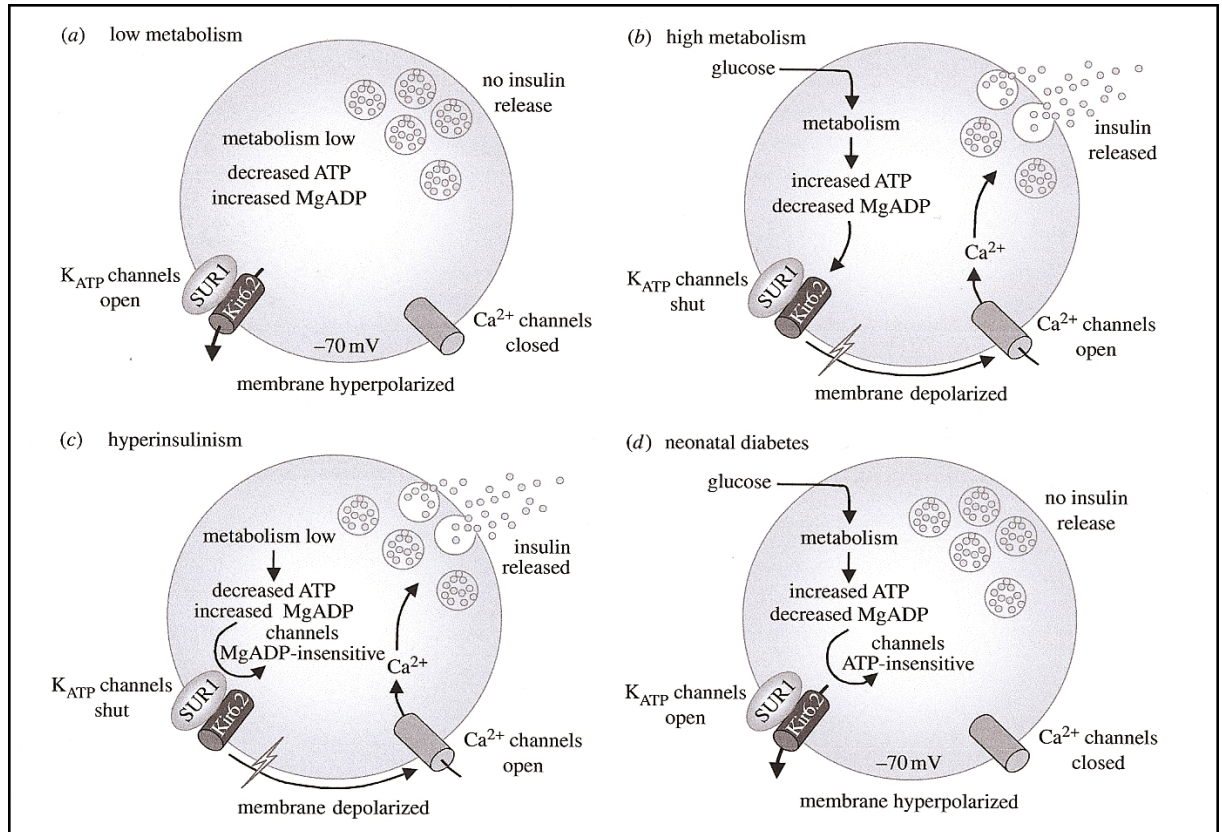


Abbildung 1.3: Die Rolle der K_{ATP} -Kanäle bei der Insulinsekretion in β -Zellen (aus Aittoniemi et al., 2009)
 Bei niedrigem Glucosespiegel sind K_{ATP} -Kanäle geöffnet und führen zu einer Hyperpolarisation der Plasmamembran. Dadurch bleiben spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle geschlossen und die Insulinsekretion wird verhindert (a). Ein hoher Glucosespiegel sorgt für die Erhöhung des ATP/ADP-Verhältnisses in der Zelle, was zum Schließen von K_{ATP} -Kanälen führt. Die dadurch verursachte Depolarisation der Plasmamembran und Öffnung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle induziert den Einstrom von Calcium und die Exozytose von Insulin-Vesikeln (b). Loss-of-Function-Mutationen in SUR1 verursachen Hyperinsulinämie, indem sie dafür sorgen, dass der K_{ATP} -Kanal dauerhaft geschlossen bleibt, was zu einer anhaltenden Insulinsekretion führt (c). Gain-of-Function-Mutationen hingegen sorgen für eine permanente Öffnung der K_{ATP} -Kanäle, so dass die Zellmembran auch bei einem hohen Blutglucosespiegel hyperpolarisiert bleibt. Dieses hemmt die Sekretion von Insulin und führt zu Diabetes mellitus (d).

Die pankreatische Insulinsekretion wird über mehrere Mechanismen kontrolliert (siehe Abbildung 1.4). So wird der K_{ATP} -abhängige Hauptweg der Induktion einer Insulinsekretion, der so genannte „triggering pathway“, durch K_{ATP} -unabhängige Wege, die so genannten „amplifying pathways“ moduliert (Henquin, 2000, Doyle und Egan, 2003, Efrat, 2004). Die exozytotische Freisetzung insulinhaltiger Vesikel wird hierbei wesentlich durch den Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration induziert, wodurch der Effekt des K_{ATP} -Kanal-abhängigen Weges potenziert wird. Nicht nur der Einstrom von Ca^{2+} über spannungsabhängige Calcium-Kanäle nach K_{ATP} -Kanal-vermittelter Membrandepolarisation, sondern auch die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern, trägt zu einer Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration bei (Straub et al., 2001, Seino und Miki, 2003, Efrat, 2004). Diese Freisetzung wird unter anderem über Inositol-1,4,5-triphosphat vermittelt (Doyle und Egan, 2003). Außerdem spielen verschiedene Ca^{2+} -unabhängige Signalwege eine Rolle (Aizawa et al., 1998, Straub et al., 2001).

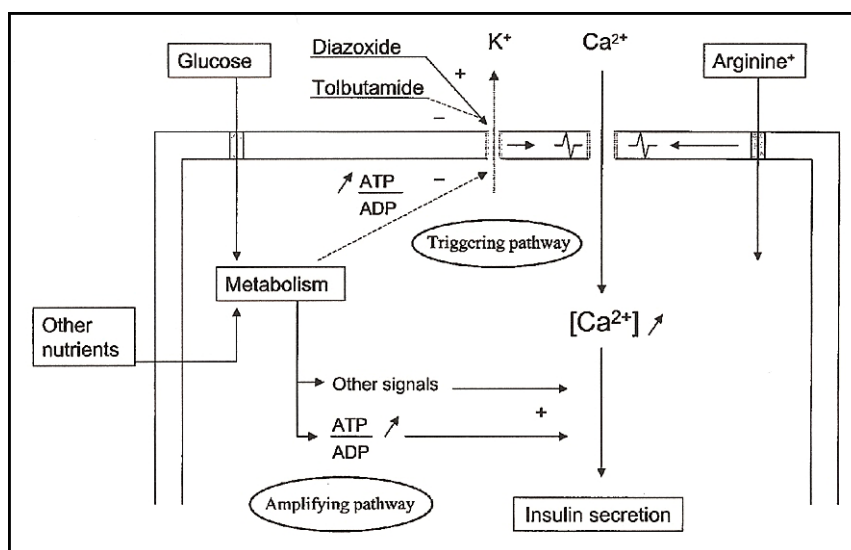


Abbildung 1.4: „Amplifying pathway“ und „triggering pathway“ der Insulinsekretion (aus Henquin, 2000)
Die Insulinsekretion in pankreatischen β -Zellen wird über den K_{ATP} -Kanal-abhängigen und K_{ATP} -Kanal-unabhängigen Mechanismen reguliert.

Des Weiteren geht man davon aus, dass die Menge an sezerniertem Insulin auch über die gesamte pankreatische β -Zellmasse reguliert wird (Ahren, 2005, Rhodes, 2005). Diese Regulation erfolgt durch kontrollierte Apoptose, Neogenese sowie Zellteilung und Regulation der Größe der β -Zellen (Butler et al., 2003, Dickson und Rhodes, 2004, Rhodes, 2005). Diese Kontrolle des Wachstums und der Vitalität von β -Zellen spielt beispielsweise eine große Rolle für die Pathogenese von Diabetes Typ 2. So kann bei übergewichtigen Menschen mit vorliegender Insulinresistenz der erhöhte Insulinbedarf häufig über eine Vergrößerung der β -

Zellmasse erfolgen (Rhodes, 2005). Andererseits zeigen Studien, dass Diabetes-Erkrankungen häufig mit einer verringerten β -Zellmasse einhergehen (Butler et al., 2003, Donath und Halban, 2004, Maedler et al., 2005). Die genauen für die Reduktion der β -Zellmasse verantwortlichen Mechanismen sind derzeit allerdings noch weitgehend unbekannt (Zhou et al., 1998, Donath und Halban, 2004).

1.2 Diabetes mellitus

1.2.1 Diabetes mellitus Typ 1 und Typ 2

Bei Diabetes handelt es sich um eine Gruppe von Stoffwechselerkrankungen, welche durch Hyperglykämie charakterisiert sind. Hyperglykämie entsteht im Allgemeinen dadurch, dass das Insulinangebot nicht ausreicht, um eine normale Regulation des Blutglucosespiegels zu gewährleisten (Buchanan und Xiang, 2005, American Diabetes Association, 2006, Donath und Ehses, 2006). Eine gestörte Insulinsekretion und/oder eine defekte Insulinwirkung können zu Hyperglykämie führen. Hierfür können beispielsweise eine autoimmune Zerstörung der β -Zellen des Pankreas oder eine Insulinresistenz der Gewebe verantwortlich sein. Schädigung, Dysfunktion oder Versagen verschiedener Organe (vor allem Augen, Nieren, Nerven, Herz und Blutgefäße) können die Folge von chronischen Hyperglykämien sein (American Diabetes Association, 2006).

Nach der klassischen Einteilung von Diabetes mellitus, liegt dem Diabetes vom Typ 1 eine autoimmune Zerstörung der pankreatischen β -Zellen zugrunde, welche sowohl bereits in der Kindheit oder auch erst im Erwachsenenalter auftreten kann. Es sind Antikörper gegen Inselgewebe und Insulin nachweisbar. Durch die Zerstörung der β -Zellen und den dadurch verursachten absoluten Insulinmangel sind die Patienten insulinpflichtig. Als Hauptursachen für Diabetes Typ 1 werden sowohl genetische Prädispositionen als auch Umweltfaktoren angesehen (American Diabetes Association, 2006).

Für die weitaus häufigste Form des Diabetes, Diabetes Typ 2 (ca. 90-95 % aller Diabetiker), wird nach der klassischen Einteilung eine Insulinresistenz der Patienten verantwortlich gemacht. Auch bei normaler Insulinausschüttung der β -Zellen können die Zielorgane eine verminderte Empfindlichkeit gegenüber diesem Hormon zeigen. Es liegt somit ein relativer Insulinmangel vor, die Patienten sind nicht notwendigerweise auf die exogene Zufuhr von Insulin angewiesen. Zunächst kann diese Resistenz durch eine Überproduktion an Insulin kompensiert werden. Reicht diese verstärkte Insulinproduktion für die Kontrolle des

Blutzuckerspiegels nicht mehr aus, so kommt es zur Manifestation des Diabetes Typ 2. An einer Entstehung dieser Erkrankung kann eine genetische Prädisposition ebenso wie Übergewicht beteiligt sein. Aber auch zunehmendes Alter und Bewegungsmangel erhöhen das Risiko für Diabetes Typ 2. Da sich eine Hyperglykämie zumeist schleichend entwickelt und von den Betroffenen anfangs noch keine Symptome wahrgenommen werden, bleibt diese Form des Diabetes oft über Jahre hinweg unentdeckt. Als therapeutische Maßnahme wird zunächst eine Gewichtsreduktion empfohlen, sowie die Einnahme oraler Antidiabetika (z.B. Sulfonylharnstoffe, Glinide oder Glitazone). In einem fortgeschrittenen Stadium des Diabetes Typ 2 ist oft die Verabreichung von Insulin nötig (American Diabetes Association, 2006).

Derzeit wird diese strikte Klassifizierung in Diabetes Typ 1 und Typ 2 jedoch diskutiert. So wurden in Patienten mit Diabetes Typ 2 Antikörper gegen Inselzellen sowie erhöhte Cytokin- und Chemokinkonzentrationen nachgewiesen. Autoimmune Zerstörungsprozesse galten bisher jedoch als charakteristisch für Typ 1 (Pietropaolo et al., 2000, Kolb und Mandrup-Poulsen, 2005, Donath und Ehses, 2006). Auch Übergewicht, ein Parameter, welcher bisher mit Insulinresistenz und Diabetes Typ 2 assoziiert wurde, korreliert offensichtlich mit einer erhöhten Inzidenz von Diabetes Typ 1 (Hypponen et al., 2000, Kibirige et al., 2003, Libman et al., 2003, Donath und Ehses, 2006). Die Dysfunktion von β -Zellen bei Patienten mit Diabetes Typ 2 wird vermutlich sowohl durch eine gestörte Insulinsekretion als auch durch eine Verminderung der β -Zellmasse hervorgerufen, wobei letztere Ursachen bisher mit Diabetes Typ 1 assoziiert wurden (Butler et al., 2003, Donath et al., 2005, Rhodes, 2005, Donath und Ehses, 2006). Eine verminderte β -Zellmasse ist somit nicht nur charakteristisch für Diabetes Typ 1, sondern auch für Typ 2 (Donath und Ehses, 2006).

1.2.2 Gestationsdiabetes mellitus (GDM)

Eine weitere Form von Diabetes ist Gestationsdiabetes mellitus (GDM). Dieser wird definiert als Glucoseintoleranz, welche erstmalig in der Schwangerschaft auftritt bzw. diagnostiziert wird. Es handelt sich ebenfalls um eine Form von Hyperglykämie (siehe Kapitel 1.2.1). Von entscheidender Bedeutung ist jedoch, dass diese Art des Diabetes nach der Entbindung zunächst wieder verschwindet (Kim et al., 2002, Turok et al., 2003, Buchanan und Xiang, 2005, Hollander et al., 2007, Shaat und Groop, 2007). Die genaue Inzidenz von GDM ist unbekannt und hängt davon ab, welche Bevölkerung untersucht wurde und welche Kriterien zur Diagnose angewendet wurden. Laut Dornhorst et al., (1992), liegt bei einer Einteilung der

Bevölkerung anhand ihrer ethnischen Herkunft die Häufigkeit von GDM bei 0,4 - 16 % (0,4 % bei Kaukasierinnen, 1,5 % bei afro-amerikanischen Frauen, 7,3 % bei Asiatinnen, 16 % bei amerikanischen Ureinwohnerinnen).

Gewöhnlich kommt es in der Schwangerschaft zu einer gewissen Insulinresistenz, deren Ausmaß im dritten Trimester vergleichbar mit der Insulinresistenz bei Patienten mit Diabetes Typ 2 ist. Für eine solche Insulinresistenz scheinen unter anderem das erhöhte Körpergewicht der Schwangeren sowie Plazentahormone verantwortlich zu sein. Normalerweise steigern β -Zellen zur Kompensation ihre Insulinsekretion. Erfolgt dieses jedoch nicht, kommt es zur Entwicklung von GDM (Jovanovic und Pettitt, 2001, Buchanan und Xiang, 2005). Bei den meisten Frauen mit GDM scheint eine chronische Insulinresistenz zugrunde zu liegen, welche durch die normalerweise leicht erhöhte Insulinresistenz während der Schwangerschaft noch vorübergehend verstärkt wird. So neigen schwangere Frauen mit GDM zu einer ausgeprägteren Insulinresistenz als gesunde Schwangere (Buchanan und Xiang, 2005). Neben dem ethnischen Hintergrund gibt es weitere Risikofaktoren für die Entwicklung von GDM. So zeigen beispielsweise schwangere Frauen, die älter als 25 Jahre sind (Berger et al., 2002, Scott et al., 2002, Brody et al., 2003, Vidaeff et al., 2003) und/oder einen Body Mass Index von über 25 aufweisen, ein größeres Risiko, GDM zu entwickeln (Solomon et al., 1997, Chu et al., 2007). Auch ein Vorkommen von Diabetes mellitus Typ 1 bzw. 2 oder GDM in der Familie ersten Grades (Berger et al., 2002, Scott et al., 2002, Brody et al., 2003, Vidaeff et al., 2003) bzw. eine frühere Erkrankung der Schwangeren an GDM (Moses, 1996) stellen wichtige Risikofaktoren dar. Das Spektrum möglicher physiologischer oder genetischer Ursachen scheint genauso vielfältig zu sein wie beim „klassischen“ Diabetes. Hier wird ebenfalls ein Zusammenspiel von genetischen und umweltbedingten Faktoren vermutet (Shaaf und Groop, 2007). Sowohl Störungen der β -Zellfunktion (Livingstone und Collison, 2002, Buchanan und Xiang, 2005, Shaaf et al., 2005, American Diabetes Association, 2006, Hollander et al., 2007, Shaaf und Groop, 2007) als auch Polymorphismen in Genen, welche für Kir6.2 oder SUR1 codieren (Rissanen et al., 2000, Buchanan und Xiang, 2005, Shaaf et al., 2005), werden in diesem Zusammenhang vermutet.

Kinder von Frauen, bei welchen der GDM unentdeckt bleibt, zeigen ein erhöhtes Risiko für Makrosomie, Fehlbildungen, Frühgeburt sowie Organunreife und Mortalität (Stephenson, 1993, Berger et al., 2002, Scott et al., 2002, Brody et al., 2003, Turok et al., 2003, Langer et al., 2005, Tuffnell et al., 2005). Außerdem kann ein Diabetes mellitus während der Schwangerschaft auch zu langfristigen Folgen für Mutter und Kind führen. So haben Frauen, bei welchen GDM diagnostiziert wurde, ein erhöhtes Risiko zu einem späteren Zeitpunkt an

Diabetes mellitus Typ 2 zu erkranken (O'Sullivan und Mahan, 1964, Catalano et al., 1991, Henry et al., 1993, Kjos et al., 1995, Mohamed und Dooly, 1998, Kim et al., 2002, Tamas und Kerényi, 2002). Die Kinder von Müttern mit GDM entwickeln mit einer größeren Wahrscheinlichkeit Diabetes Typ 2, Übergewicht oder auch neuropsychologische Probleme als Kinder von gesunden Müttern (Pettitt et al., 1991, Rizzo et al., 1991).

1.3 Apoptose

Der Begriff „Apoptose“ (griech.: das Abfallen, der Niedergang) bezeichnet einen physiologischen Prozess der Eliminierung von Zellen, welcher nach einem genetisch genau bestimmten Programm erfolgt und deshalb auch „programmierter Zelltod“ genannt wird (Kerr et al., 1972). Gräper postulierte 1914, Apoptose als Pendant zur Mitose zu sehen. Am Beispiel des Nematoden *Caenorhabditis elegans* konnte gezeigt werden, dass zu genetisch festgelegten Zeitpunkten der Entwicklung dieses Tieres 131 der insgesamt 1090 somatischen Zellen mittels Apoptose eliminiert werden (Horvitz, 1999).

Apoptose spielt beispielsweise eine entscheidende Rolle bei der physiologischen Zellhomöostase, bei der Entwicklung und Funktionalität des Immunsystems, bei hormonbedingten Atrophien, oder aber auch bei der embryonalen Entwicklung eines Organismus. Beispielsweise müssen in der embryonalen Entwicklungsphase in genauer zeitlicher Abstimmung Zellen zwischen den entwickelten Knochen absterben (siehe Abbildung 1.5), damit sich aus den Extremitätenansätzen Finger bzw. Zehen entwickeln können (Wood et al., 2000).

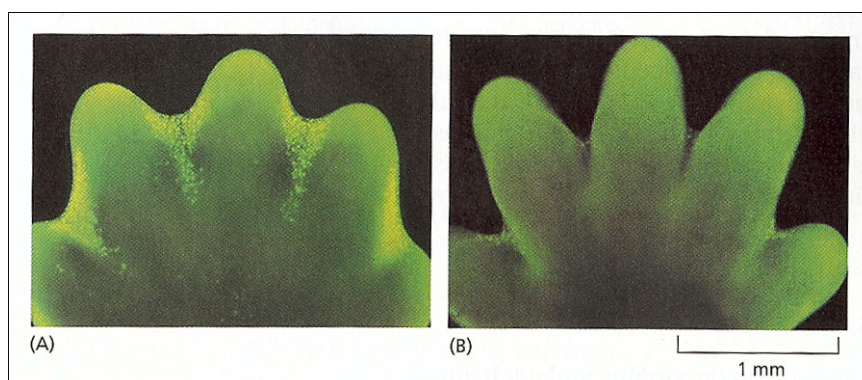


Abbildung 1.5: Modellierung der einzelnen Zehen einer sich entwickelnden Mäusepfote durch Apoptose (aus Wood et al., 2000)

Ein spezieller Farbstoff markiert Zellen aus der Pfote eines Mäuseembryos, welche eine Apoptose durchlaufen haben. Die apoptotischen Zellen erscheinen als hellgrüne Punkte zwischen den sich entwickelnden Zehen (A). Diese ortsspezifische Apoptose entfernt das Gewebe zwischen den Extremitätenknochen (B).

Eine zu hohe oder eine zu niedrige Apoptoserate können wichtige Faktoren bei verschiedenen Erkrankungen des menschlichen Organismus darstellen, z.B. bei neurodegenerativen Erkrankungen, Autoimmunerkrankungen oder auch bei Krebs. Bei der Apoptose kann es sich folglich um einen physiologischen oder aber auch pathophysiologischen Prozess handeln, welcher durch einen Stimulus ausgelöst wird und eine Kaskade von Reaktionen in Gang setzt. Typische morphologische Zellveränderungen, die mit einer Apoptose einhergehen, sind eine Kondensation des Zellkerns und eine Verdichtung des Chromatins („Pyknose“). Infolge des sinkenden Zellvolumens verliert die apoptotische Zelle den Kontakt zu ihren Nachbarzellen. In dieser Phase kommt es zur Fragmentierung des kondensierten Chromatins. Im weiteren Verlauf der Apoptose ist die Bildung von Ausstülpungen an der Plasmamembran zu beobachten, das so genannte „membrane blebbing“. Schließlich beginnen sich die membranumschlossenen Vesikeln („apoptotic bodies“) abzuschneiden. Diese apoptotischen Körperchen bestehen aus Cytoplasma und dicht gepackten Organellen, sie können mit oder ohne Kernfragmente vorkommen, und werden von Makrophagen oder Nachbarzellen eliminiert (Savill et al., 1989). Da die Zellmembran noch über einen längeren Zeitraum intakt bleibt und keine inflammatorischen Mediatoren freigesetzt werden, bleibt eine Entzündungsreaktion aus (Savill und Fadok, 2000, Kurosaka et al., 2003).

1.3.1 Apoptose und Nekrose – ein Vergleich

Während eine „Nekrose“ (griech.: der Tod, das Absterben) durch externe schädliche Stimuli induziert wird, handelt es sich bei der Apoptose um einen vorprogrammierten Prozess, welcher entweder von der Zelle selbst oder durch externe Stimuli, wie Hormone, Cytokine oder auch chemische, physikalische oder virale Substanzen, aktiviert wird. Ob eine Zelle durch Apoptose oder Nekrose stirbt, hängt von verschiedenen Faktoren, wie dem Gewebetyp, dem Entwicklungsstadium oder auch dem physiologischen Milieu ab (Fiers et al., 1999, Zeiss, 2003). Außerdem spielen auch die Intensität und die Dauer des Apoptose-induzierenden Stimulus eine wichtige Rolle (Zeiss, 2003). Denecker et al. (2001) konnten in Studien nachweisen, dass die Hemmung des klassischen Caspase-abhängigen apoptotischen Signalweges (siehe Kapitel 1.3.2) *in vitro* häufig zu nekrotischem Zelltod führt. Somit konnte derselbe Zelltod-induzierende Stimulus, abhängig von der Verfügbarkeit der entsprechenden Caspasen, entweder zu apoptotischem oder zu nekrotischem Zelltod führen.

Tabelle 1.2: Vergleich charakteristischer Eigenschaften von Nekrose und Apoptose

Nekrose	Apoptose
Induktion durch externe Stimuli	Induktion durch die Zelle selbst oder durch externe Stimuli
zumeist Auswirkung auf große Gewebebereiche	zumeist Auswirkung auf Einzelzellen oder Zell-Cluster
passiver, unkontrollierter Prozess	aktiver, kontrollierter Prozess
pathophysiologischer Prozess	physiologischer oder pathophysiologischer Prozess
„Verklumpung“ des Chromatins	Kondensation von Chromatin
Anschwellen der Zelle	Schrumpfen der Zelle
Schädigung der Zellmembran	intakte Zellmembran und „membrane blebbing“
Freisetzung des Cytoplasmas	Einschluss des Cytoplasmas in apoptotischen Körperchen
Entzündungsreaktion	keine Entzündungsreaktion
Dauer im Bereich von Tagen	Dauer im Bereich von Stunden

Im Gegensatz zu einer Apoptose, bei der es sich um einen kontrollierten und aktiven Prozess einer Zelle oder eines Zell-Clusters handelt, ist eine Nekrose ein unkontrollierter und passiver Vorgang, welcher normalerweise große Zellbereiche betrifft. Während bei apoptotischen Prozessen ein Schrumpfen der Zelle zu beobachten ist (Savill et al., 1989, Cohen, 1993), kommt es bei nekrotischen Zellen zum Anschwellen der Zelle. Bei dieser Art von Zelltod kommt es außerdem, anders als bei einer Apoptose, bereits sehr früh zur Schädigung sämtlicher Zellorganellen und schließlich zur Ruptur der Zellmembran (Kerr et al., 1972, Majno und Joris, 1995, Trump et al., 1997). Aufgrund des Verlustes der Membranintegrität der nekrotischen Zelle kommt es durch die Freisetzung cytoplasmatischer Bestandteile zur Aussendung chemotaktischer Signale, was Ödembildungen, Gefäßdilataationen sowie eine Rekrutierung inflammatorischer Zellen hervorrufen kann.

Ein weiteres bedeutendes Merkmal einer Apoptose ist die Aktivierung spezifischer calcium- und magnesiumabhängiger DNasen, welche die genomische DNA in charakteristische Bruchstücke schneiden. Die aktivierten Endonucleasen schneiden die DNA nur an bestimmten Stellen zwischen den Nucleosomen. Um jedes Nucleosom windet sich DNA in einer Länge von 140-150 Basenpaaren. Dieser DNA-Abschnitt ist durch Histonproteine vor dem Angriff von Endonucleasen geschützt. Die so genannte „Verbindungs-DNA“ zwischen

den Nucleosomen ist in der Regel 50-60 Basenpaare lang (Löffler et al., 2007). Bei der gelelektrophoretischen Auftrennung der DNA-Fragmente ergibt sich ein charakteristisches Bandenmuster, auch als „DNA-Leiter“ bezeichnet. Die typischen Unterschiede zwischen Apoptose und Nekrose in der Übersicht sind Abbildung 1.6 sowie Tabelle 1.2 zu entnehmen (Kuan and Passaro, 1998, Elmore, 2007, Löffler et al., 2007).

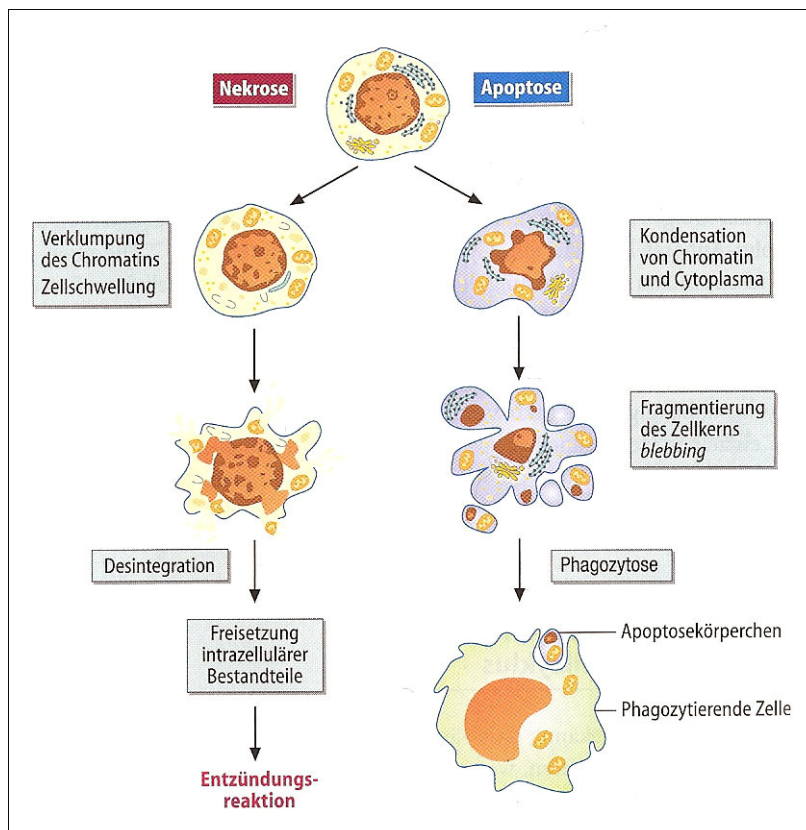


Abbildung 1.6: Strukturelle Veränderungen von Zellen bei Nekrose und Apoptose (aus Löffler et al., 2007)

1.3.2 Mechanismen des apoptotischen Zelltodes

Der apoptotische Prozess kann über verschiedene Signalwege ausgelöst werden, deren gemeinsames Merkmal normalerweise die Initiierung einer Caspase-Kaskade ist. Caspasen sind eine Gruppe proteolytischer Enzyme, welche eine zentrale Rolle bei der Apoptose spielen. Sie besitzen ein Cystein im aktiven Zentrum und spalten Peptidbindungen auf der carboxyterminalen Seite von Aspartat (C-asp-ase, engl. **cysteiny-l-aspartate-cleaving protease**). Aufgrund ihrer proteolytischen Aktivität werden Caspasen als inaktive Pro-Caspasen synthetisiert, die durch proteolytische Spaltung durch andere Mitglieder der Caspasefamilie aktiviert werden. Jedes aktivierte Caspasmolekül kann viele Pro-Caspasmoleküle aktivieren, welche wiederum andere Pro-Caspasmoleküle spalten. Dieses

führt zu einer explosionsartigen Aktivierung vieler Pro-Caspase-Enzyme. Der apoptotische Zelltod wird unwiderruflich eingeleitet, indem letztendlich Schlüsselproteine der Zelle, z.B. cytosolische Proteine und Kernlamine (siehe Abbildung 1.7), gespalten werden.

Aufgrund ihrer Substratspezifität unterscheidet man unter anderem die Initiator-Caspasen (Caspasen-2,-8,-9 und -10) von den Effektor-Caspasen (Caspase-3,-6 und -7) (Cohen, 1997, Rai et al., 2005). Die Initiator-Caspasen weisen im Gegensatz zu den Effektor-Caspasen eine Pro-Domäne auf, welche Aminosäuresequenzen für die Selbstassoziation und für die Bindung an aktivierende Adapterproteine enthalten. Zusammen mit diesen Adaptoren bilden Initiator-Caspasen oftmals Proteinkomplexe aus (Sternnicke und Salvesen, 2000). So ist beispielsweise die Pro-Caspase-9 mit dem Adapterprotein Apaf-1 (apoptotic protease-activating factor-1) assoziiert (siehe Abbildung 1.8).

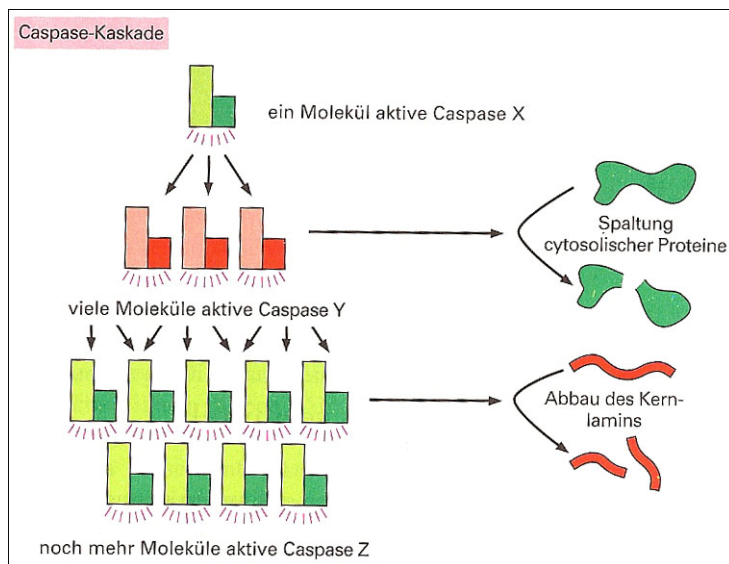


Abbildung 1.7: Die apoptotische Caspase-Kaskade (aus Alberts et al., 2004)

Eine anfängliche Aktivierung von wenigen Pro-Caspasemolekülen führt durch eine Kaskade zur explosionsartigen Aktivierung vieler Pro-Caspase-Enzyme.

Schematisch lässt sich die Apoptose in eine Initiationsphase und eine Exekutionsphase unterteilen. Bei der Initiationsphase unterscheidet man im Wesentlichen zwei verschiedene Wege: den extrinsischen und den intrinsischen Weg (Riedl und Shi, 2004).

Der extrinsische Signalweg (siehe Abbildung 1.9) wird durch Ligandenbindung an „Todesrezeptoren“ der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)-Rezeptorfamilie eingeleitet (Locksley et al., 2001). Diese Transmembran-Rezeptoren besitzen in ihrem cytoplasmatischen Teil eine Todesdomäne („death domain“), welche ca. 80 Aminosäuren umfasst (Ashkenazi und Dixit,

1998). Diese Domäne ist von großer Bedeutung für die Vermittlung des Todessignals von der Zelloberfläche zu den intrazellulären Signalwegen. TNF und andere Cytokine binden an die Todesrezeptoren und induzieren auf diese Weise eine Reihe von Reaktionen, welche zur Aktivierung der Pro-Caspase-8 führen. Aktive Caspase-8-Enzyme aktivieren weitere Caspase-8-Moleküle, es kommt zu einer selbstverstärkenden Wirkung, welche den Vollzug der Apoptose einleitet (Nagata, 1999, Peter und Kramer, 2003, Riedl und Shi, 2004).

Die Stimuli, die den intrinsischen Signalweg (siehe Abbildung 1.8) initiieren, erzeugen intrazelluläre Signale, welche direkt auf verschiedene Zielobjekte innerhalb der Zelle wirken und häufig Mitochondrien-vermittelt ablaufen. Diese erzeugten intrazellulären Signale können sich unterschiedlich auf apoptotische Prozesse auswirken. Beispielsweise unterdrückt die Anwesenheit von bestimmten Wachstumsfaktoren, Hormonen oder Cytokinen die Induktion von Apoptose. Fehlen diese so genannten „Überlebensfaktoren“, so kommt es zur Aktivierung des Apoptose-Mechanismus. Die Anwesenheit von anderen Stimuli, wie z.B. Toxinen, viralen Infektionen oder freien Radikalen, führt hingegen direkt zur Induktion von Apoptose. So kann sowohl das Fehlen als auch die Anwesenheit bestimmter Faktoren zur Induktion des apoptotischen Zelltodes führen, indem sie Veränderungen in der inneren Mitochondrienmembran hervorrufen. Dies führt unter anderem zur Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien in das Cytoplasma und zur Aktivierung des Caspase-9-abhängigen mitochondrialen Signalweges. Cytochrom c bindet und aktiviert Apaf-1 und Pro-Caspase-9 (siehe Abbildung 1.8), es kommt zur Bildung eines „Apoptosoms“ (Chinnaiyan, 1999, Hill et al., 2004, Nelson und Cox, 2008). Die Aggregation von Pro-Caspase-9 führt zur Aktivierung dieses proteolytischen Enzyms, wodurch eine weitere Caspase-Kaskade ausgelöst wird, bei der auch Caspase-3 und Caspase-7 eine große Rolle spielen (Li et al., 1997, Rodriguez und Lazebnik, 1999, Saleh et al., 1999, Jiang und Wang, 2000, Adams und Cory, 2002, Shi, 2002, Riedl und Shi, 2004).

Nicht nur der intrinsische Weg, sondern auch der extrinsische Weg münden in diese Exekutionsphase, welche durch die Aktivierung der Effektor-Caspasen (Caspase-3, -6 und -7) eingeleitet wird. Effektor-Caspasen aktivieren sowohl cytoplasmatische Endonucleasen als auch Proteasen, welche die Kernsubstanz und Proteine des Cytoskeletts zerlegen. Dies führt schließlich zu den morphologischen und biochemischen Veränderungen der apoptotischen Zelle (Slee et al., 2001). Caspase-3 gilt als die wichtigste Effektor-Caspase und wird durch sämtliche Initiator-Caspasen (Caspase-8, -9 und -10) aktiviert.

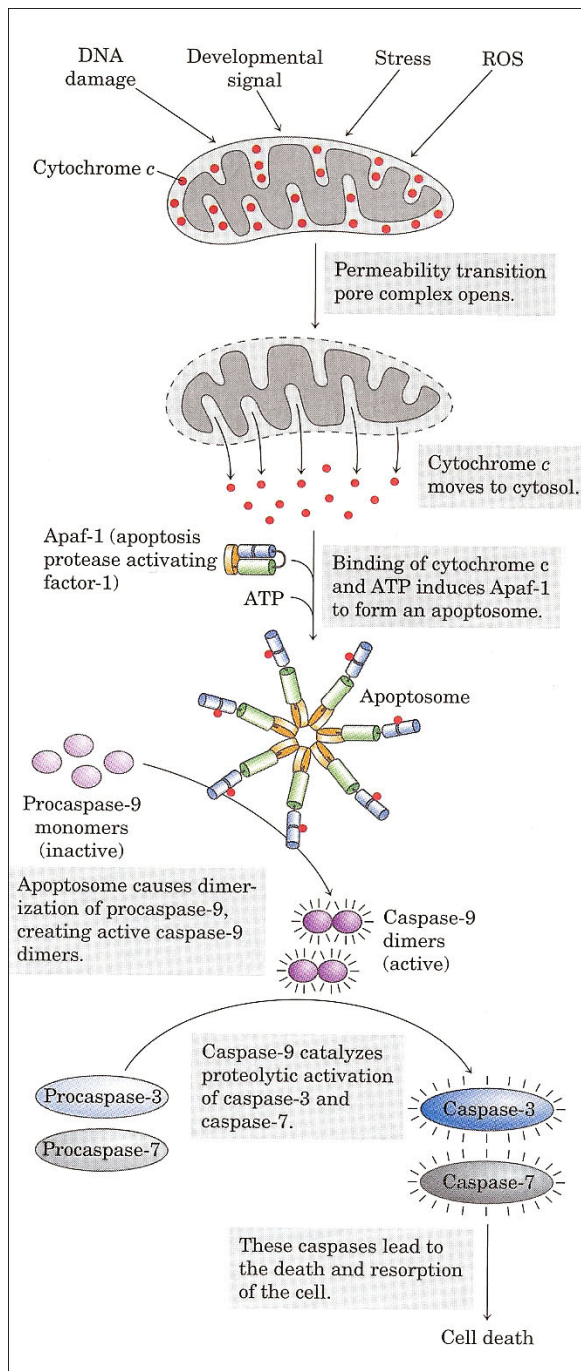


Abbildung 1.8: Der intrinsische Signalweg der Apoptose (aus Nelson und Cox, 2008)

Verschiedene Faktoren führen zur Induktion des Caspase-9-abhängigen apoptotischen Signalweges, indem sie Veränderungen in der inneren Mitochondrienmembran hervorrufen.

Die Mitglieder der so genannten Bcl-2-Familie (Cory und Adams, 2002) spielen eine große Rolle bei der Kontrolle und Regulation dieses mitochondrialen Signalweges. Diese Proteinfamilie reguliert die Permeabilität der Mitochondrienmembran und kann sowohl proapoptotischer (z.B. Bak, Bax, Bad, Bid oder Bim) als auch anti-apoptotischer (z.B. Bcl-2 oder Bcl-x) Natur sein (siehe Abbildung 1.9) (Iwahashi et al., 1996, Rabinovitch et al., 1999, Barbu et al., 2002, Löffler et al., 2007). Bim ist mit dem Cytoskelett assoziiert und wird bei dessen Schädigung freigesetzt. Von großer Bedeutung ist auch das Protein Bid, welches durch

die Caspase-8 proteolytisch gespalten wird. Das dabei entstehende Bruchstück tBid (truncated bid) induziert die Freisetzung von Cytochrom c. Dieser Mechanismus verbindet den intrinsischen mit dem extrinsischen Signalweg (Löffler et al., 2007).

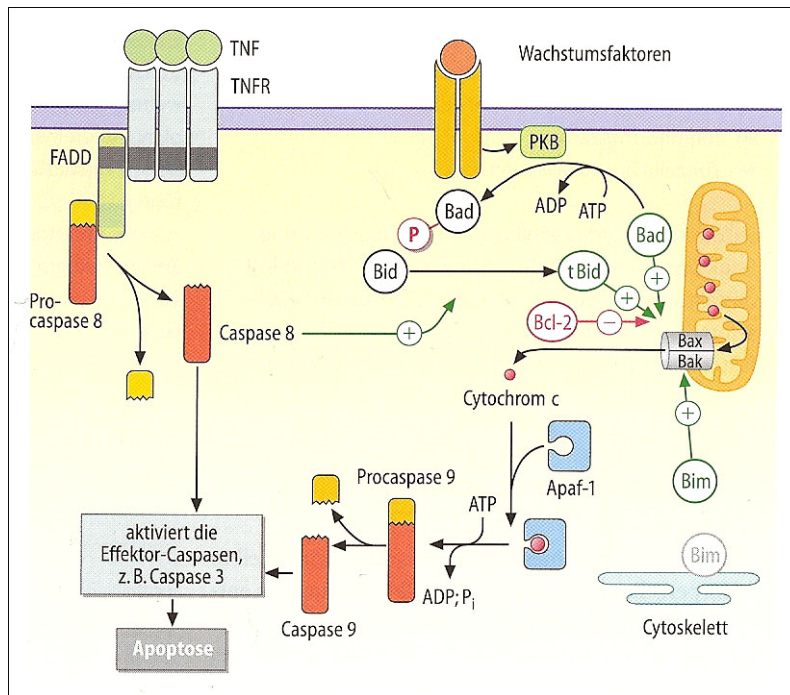


Abbildung 1.9: Der extrinsische und der intrinsische Signalweg der Apoptose (aus Löffler et al., 2007)

1.3.3 Induktion von Apoptose in pankreatischen β -Zellen

Zahlreiche Studien zeigen, dass eine verminderte β -Zellmasse sowohl für Diabetes Typ 1 als auch Typ 2 charakteristisch ist (Bonner-Weir, 2000, Sakuraba et al., 2002, Butler et al., 2003, Yoon et al., 2003, Donath und Halban, 2004, Donath und Ehses, 2006) (siehe Kapitel 1.2). Im Allgemeinen führt ein Ungleichgewicht von Synthese (Neogenese oder Teilung von β -Zellen) und Absterben (Nekrose oder Apoptose) von β -Zellen zu einer Veränderung der β -Zellmasse. Butler et al. (2003) postulierten, dass bei der Reduktion der β -Zellmasse bei Diabetes Typ 2 eine gesteigerte Apoptoserate eine größere Rolle spielt als verminderte Neogenese oder Proliferation. Es gibt verschiedene Faktoren, die zum Absterben von β -Zellen führen. Beispielsweise induzieren hohe Glucose-Konzentrationen Apoptose in menschlichen β -Zellen (Federici et al., 2001, Maedler et al., 2001, Donath und Halban, 2004). Sind β -Zellen zu lange erhöhten Glucose-Konzentrationen ausgesetzt, wird vermehrt Insulin sezerniert, um den erhöhten Insulinbedarf zu decken. Durch eine gesteigerte Synthese von Pro-Insulin werden außerdem die Insulinspeicher aufgefüllt (Halban et al., 2001, Donath und Halban, 2004).

Diese verstärkte Synthese von Pro-Insulin kann ER-Stress verursachen und pro-apoptische Signale in der β -Zelle aktivieren (Harding und Ron, 2002, Araki et al., 2003, Izumi et al., 2003, Donath und Halban, 2004). Chronische Hyperglykämie kann auch zu einer permanent erhöhten cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration führen, welche wiederum Apoptose in der β -Zelle induzieren kann (Grill und Bjorklund, 2001, Donath und Halban, 2004). Außerdem kann eine erhöhte Glucose-Konzentration ROS (Reactive Oxygen Species) generieren, welche besonders toxisch sind für β -Zellen (Ihara et al., 1999, Laybutt et al., 2002, Sawada et al., 2008). Darüber hinaus können erhöhte Glucose-Konzentrationen die Produktion von Interleukin-1 β und die Aktivierung von NF (Nuclear Factor)- κ B und Fas-Signaltransduktionswegen induzieren (Maedler et al., 2002, Donath und Halban, 2004). Auch hohe Konzentrationen von unveresterten Fettsäuren im Blut oder das Hormon Leptin, welches von Adipozyten gebildet wird, induzieren Apoptose in menschlichen β -Zellen (Shimaburuko et al., 1998, Roehrich et al., 2003, Donath und Halban, 2004). Ebenso haben Lipoproteine einen Einfluss auf den Umsatz von β -Zellen. So induzieren VLDL (Very Low Density Lipoprotein) und LDL (Low Density Lipoprotein) Apoptose in β -Zellen, während HDL (High Density Lipoprotein) diese vor Apoptose schützt (Roehrich et al., 2003).

Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass Medikamente, wie die Sulfonylharnstoffe Glibenclamid und Tolbutamid, zu einer Steigerung der Apoptoserate in pankreatischen β -Zellen führen können (Efanova et al., 1998, Iwakura et al., 2000). Diese insulinotropen Substanzen werden in der Therapie von Diabetes Typ 2 eingesetzt, da sie den Blutzuckerspiegel wirksam reduzieren (Proks et al., 2002, Sawada et al., 2008). Sie binden an den SUR1 der β -Zelle und schließen K_{ATP} -Kanäle, was zu einer Depolarisation der Plasmamembran führt. Es kommt zur Aktivierung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle und zur Freisetzung von Insulin. Aufgrund der oben erwähnten Studien wird befürchtet, dass diese Medikamente bei dauerhafter Einnahme jedoch eventuell Dysfunktion und Apoptose von β -Zellen induzieren könnten. Die hierbei zugrunde liegenden genauen molekularen Ursachen sind derzeit nicht bekannt. Eine Vermutung ist, dass diese Apoptose durch die gesteigerte Ca^{2+} -Konzentration im Cytoplasma verursacht wird (Efanova et al., 1998, Iwakura et al., 2000, Donath und Halban, 2004, Maedler und Donath, 2004, Rustenbeck et al., 2004, Maedler et al., 2005, Sawada et al., 2008). Es gibt jedoch auch die Vermutung, dass die Produktion von freien NO-Radikalen durch Stickoxid-Synthetasen an der durch Glibenclamid induzierten Apoptose von Bedeutung ist (Ansari und Ansari, 2006). Außerdem stimuliert Glibenclamid laut Tsubouchi et al. (2005), wie auch hohe Glucose-Konzentrationen, die

Produktion von ROS in der pankreatischen Zelllinie MIN6, was letztendlich Apoptose in β -Zellen induzieren kann.

In vorherigen Arbeiten der Arbeitsgruppe (Hambrock et al., 2006 und 2007) konnte nachgewiesen werden, dass Glibenclamid und Resveratrol in einer für den SUR1 spezifischen Weise Apoptose induzieren können. Aufgrund dieser Ergebnisse soll in der vorliegenden Arbeit das Estrogen 17β -Estradiol diesbezüglich untersucht werden, da diese Substanz funktionelle sowie strukturelle Analogien zu Resveratrol aufweist.

1.4 Estrogene

1.4.1 Synthese, physiologische Bedeutung und Elimination von Estrogenen

Estrogene sind endogen vorkommende C_{18} -Steroidhormone, welche aus Steroiden mit androgener Wirkung gebildet werden (siehe Abbildung 1.10). In der fertilen Phase der Frau werden diese weiblichen Sexualhormone hauptsächlich in den Ovarien gebildet. Dort werden in den Theca-Zellen des Follikelepithels zunächst unter dem Einfluss von Luteinisierungshormon Androgene gebildet. Unter dem Stimulus von FSH (Follikel-stimulierendes-Hormon) werden die Androgene in den Granulosa-Zellen durch das Enzym Aromatase in 17β -Estradiol bzw. Estron umgewandelt. Die Ovarien enthalten das Enzym 17β -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 1 (17β -HSD 1), das die Bildung von Testosteron aus Androstendion und von 17β -Estradiol aus Estron fördert. Aus diesem Grund wird von den Ovarien hauptsächlich 17β -Estradiol ins Blut abgegeben. Es handelt sich hierbei um das wichtigste und wirksamste endogene Estrogen. Im Blutplasma ist etwa 98 Prozent dieses Hormons an SHBG (Sexual Hormone Binding Globuline)-Transportproteine gebunden. Auch außerhalb der Ovarien kommt es zur Synthese von 17β -Estradiol, beispielsweise im subkutanen Fettgewebe. Ausgehend von Dehydroepiandrosteron (DHEA) aus der Nebennierenrinde wird Androstendion gebildet. Anschließend wird es mit Hilfe des Enzyms Aromatase in Estron umgewandelt und ins Blut abgegeben. Dieser Syntheseort bleibt auch nach der Menopause aktiv, wenn die Ovarialfunktion nicht mehr gegeben ist (Thews et al., 1999, Mohr, 2004, Löffler et al., 2007). Die Plasmaspiegel von 17β -Estradiol während des Menstruationszyklus sind Abbildung 1.11 zu entnehmen (Löffler et al., 2007).

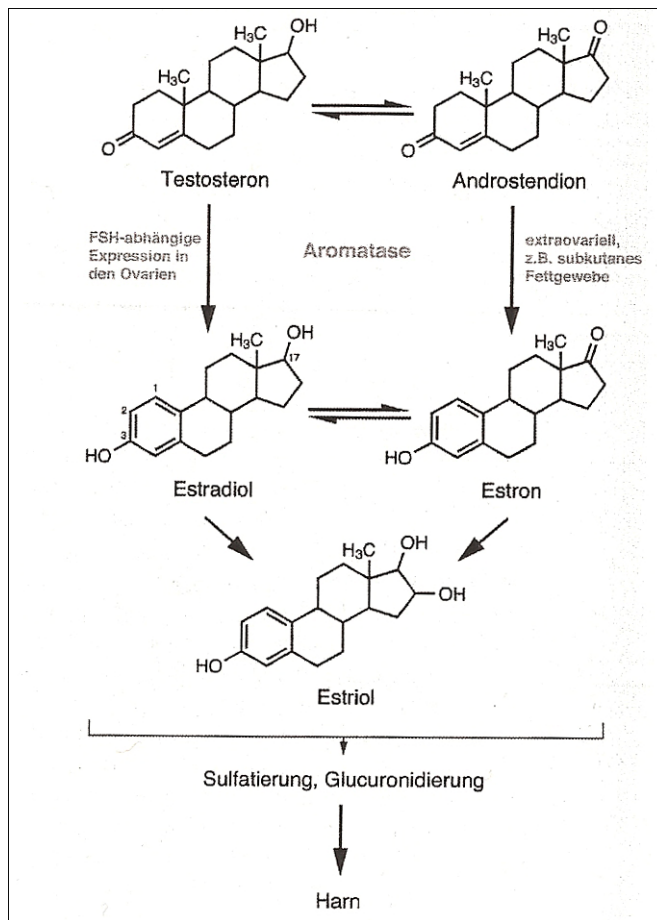


Abbildung 1.10: Synthese und Elimination endogener Estrogene (aus Mohr, 2004)

Eine Aromatase, welche FSH (Follikel-stimulierendes Hormon)-abhängig in den Ovarien oder extraovariell exprimiert wird, bildet aus Testosteron oder Androstendion Estradiol bzw. Estron. Sowohl aus Estradiol als auch Estron wird Estriol gebildet. Nach Sulfatierung bzw. Glucuronidierung werden die Estrogene über die Nieren eliminiert.

Während der Schwangerschaft kommt es außerdem in der Plazenta zur Synthese von großen Mengen an 17β-Estradiol, was zu einer erheblichen Erhöhung des Serumspiegels führt. Im dritten Trimester werden die höchsten 17β-Estradiol-Konzentrationen erreicht, welche um mehr als ein 100-faches über den Spiegeln während des Menstruationszyklus liegen können (Abraham et al., 1972). Estrogene fördern vor allem das Wachstum der Geschlechtsorgane und sorgen für die Entwicklung der sekundären weiblichen Geschlechtsmerkmale. Diese Hormone sind darüber hinaus sowohl bei Frauen als auch bei Männern wichtig für das Knochenwachstum und die Skelettreifung (Thews et al., 1999, Mohr, 2004, Löffler et al., 2007). 17β-Estradiol hat eine Halbwertszeit von wenigen Minuten und wird von der Leber sehr schnell eliminiert. In den Hepatozyten wird es durch eine 17β-HSD vom Typ 2 in Estron überführt. 17β-Estradiol wird auf diesem Weg entweder indirekt über Estron oder aber direkt in Estriol umgewandelt. Durch Glucuronidierung bzw. Sulfatierung der Hydroxylgruppe der Estrogene werden Produkte gebildet, die sehr gut wasserlöslich sind und mit dem Harn über die Nieren ausgeschieden werden (siehe Abbildung 1.10).

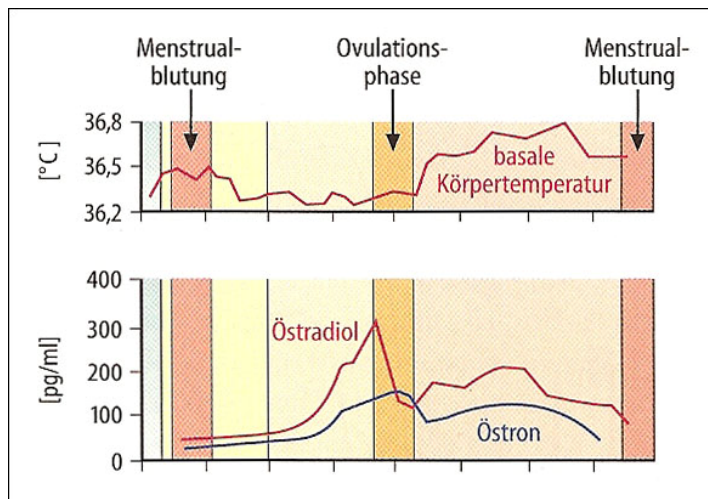


Abbildung 1.11: Plasmaspiegel von 17 β -Estradiol und Estron während des Menstruationszyklus (aus Löffler et al., 2007)

In der zweiten Hälfte der Follikelphase steigen die Plasmaspiegel der Estrogene an. Den Höhepunkt erreicht 17 β -Estradiol zu Beginn der Ovulationsphase.

1.4.2 Die „klassischen“ Estrogenrezeptoren α und β

Zu den „klassischen“ Estrogenrezeptoren (ER) gehören ER α und ER β . Diese beiden ER-Typen sind in den hormonabhängigen Geweben unterschiedlich verteilt. In Leber und Gebärmutter dominiert ER α , in Knochen, Darm, Gefäßwänden sowie Prostata überwiegt ER β . In Brust, Ovarien und Gehirn sind beide Rezeptoren ungefähr gleich stark vertreten. ER α fördert typischerweise die Expression von Genen, während ER β die Expression vieler Gene hemmt. Wenn beide Rezeptor-Typen in einer Zelle vorkommen und diese sich zu Dimeren zusammenlagern, kann die Gen-aktivierende Wirkung von ER α aufgehoben werden. 17 β -Estradiol besitzt zu beiden Rezeptortypen die gleiche Affinität (Rohr, 2006, Löffler et al., 2007).

17 β -Estradiol bindet an diese cytosolischen Steroidrezeptoren, wodurch es zu einer Konformationsänderung des Rezeptorproteins und zur Translokation des 17 β -Estradiol/Rezeptor-Komplexes in den Zellkern kommt. Dieser Komplex kann nun auf verschiedene Weise die Transkription von genetischen Informationen beeinflussen. Zum einen kann der Komplex als Transkriptionsfaktor die Genexpression regulieren, indem er sich in der Promotorregion von Genen anlagert. Zum anderen kann der 17 β -Estradiol/Rezeptor-Komplex durch direkte Kontaktaufnahme mit anderen Transkriptionsfaktoren (z.B. Aktivierendes Protein 1 (AP-1)) deren Funktion verändern. So können auch Gene beeinflusst werden, die nicht über einen Estrogen-empfindlichen Promotorbereich verfügen (Rohr, 2006,

Löffler et al., 2007). Inzwischen gibt es Hinweise darauf, dass neben diesen „klassischen“ Estrogenrezeptoren ER α und ER β weitere „nicht-klassische“ Estrogenrezeptoren, wie GPER oder ER-X existieren (Miller und Duckles, 2008).

1.4.3 Biologische Effekte von 17 β -Estradiol

Wie auch Glibenclamid und Resveratrol ist 17 β -Estradiol in der Lage, als K_{ATP}-Kanal-Blocker zu wirken (Tsai et al., 2002, Tsang et al., 2002, Lee et al., 2003, Unemoto et al., 2003, Kocic et al., 2006, Das und Sarkar, 2006). Es wurde nachgewiesen, dass dieses Estrogen pankreatische K_{ATP}-Kanäle in physiologischen Konzentrationen (100 pM bis 1 nM) reversibel schließen kann (Nadal et al., 1998 und 2004, Al-Majed et al., 2005). Bisher ist noch nicht klar, über welchen Mechanismus 17 β -Estradiol diese insulinotrope Wirkung hervorruft. Es wird darüber diskutiert, ob 17 β -Estradiol seinen K_{ATP}-Kanal-blockierenden Effekt über eine direkte Interaktion mit K_{ATP}-Kanälen oder indirekt über die Vermittlung eines separaten Rezeptors ausübt. Nadal et al. (1998 und 2004) und Al-Majed et al. (2005) postulierten aufgrund ihrer Untersuchungen, dass 17 β -Estradiol an einen noch nicht genau charakterisierten plasmalemalen Rezeptor bindet, welcher sich von den „klassischen“ cytosolischen Estrogenrezeptoren (ER α und ER β) (siehe Kapitel 1.4.2) unterscheidet und über eine intrazelluläre Signalkaskade mit dem K_{ATP}-Kanal verbunden ist.

In verschiedenen Studien wurde nachgewiesen, dass 17 β -Estradiol bzw. 17 β -Estradiol-Konjugate mit verschiedenen ATP-bindenden Kassettenproteinen interagieren können. Beispielsweise sind MRPs in der Lage, das natürlich vorkommende 17 β -Estradiol 17-(β -D-Glucuronid) ATP-abhängig zu transportieren (Loe et al., 1996, Chen et al., 2005, Grant et al., 2008). Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass 17 β -Estradiol in der Lage ist, den CFTR-vermittelten Ionentransport in pankreatischen Epithelzellen zu inhibieren (Swezey et al., 1996).

Für 17 β -Estradiol wurden darüber hinaus zahlreiche weitere, zum Teil gegensätzliche Effekte beschrieben. So kann dieses Estrogen sowohl Apoptose induzieren (Contreras et al., 2002, Choi et al., 2005, Le May et al., 2006, Lu et al., 2007), als auch Zellen davor schützen (Zecchi-Orlandini et al., 1999, Do et al., 2002, Lewis et al., 2005, Marino et al., 2006, Taylor et al., 2006, Hirano et al., 2007). Auch wurden anti-diabetische (Nadal et al., 2004, Al-Majed et al., 2005, Ordóñez et al., 2008) bzw. Effekte, welche eine Entstehung von Diabetes fördern, (McMahon et al., 1998, Livingstone und Collison, 2002) nachgewiesen. Außerdem kann 17 β -

Estradiol cardioprotektiv (Gilligan et al., 1994, Lee et al., 2000, Ranki et al., 2002, Lee et al., 2003, Das und Sarkar, 2006) und gefäßprotektiv (Unemoto et al., 2003) wirken.

2 Fragestellung der Arbeit

In vorherigen Arbeiten (Hambrock et al., 2006 und 2007) konnte nachgewiesen werden, dass der Sulfonylharnstoffrezeptor (SUR) an der Induktion von Apoptose in pankreatischen β -Zellen durch den Sulfonylharnstoff Glibenclamid bzw. durch den Naturstoff *trans*-Resveratrol beteiligt ist. Diese Experimente haben Hinweise darauf geliefert, dass der SUR neben der Regulation der elektrischen Aktivität von pankreatischen K_{ATP} -Kanälen noch eine zusätzliche Funktion übernehmen kann, welche in der spezifischen Induktion apoptotischer Prozesse durch diese Substanzen besteht. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob es Substanzen gibt, welche in einem stärkeren Ausmaß Apoptose induzieren können, als es Glibenclamid und *trans*-Resveratrol vermögen. Es sollte insbesondere untersucht werden, inwieweit 17β -Estradiol eine Apoptose induzieren kann, welche spezifisch für die Expression von SUR1 ist. Bei 17β -Estradiol handelt sich um ein endogen vorkommendes Estrogen, welches strukturelle und funktionelle Analogien zum „Phytoestrogen“ Resveratrol zeigt. So ist 17β -Estradiol, ebenso wie Resveratrol, in der Lage, die Aktivität von K_{ATP} -Kanälen zu reduzieren und Apoptose in verschiedenen experimentellen Systemen zu induzieren. Dabei sollte vergleichend die Bedeutung der beiden SUR-Isoformen SUR1 und SUR2 sowie verschiedener SUR-Mutanten für die Induktion von Apoptose durch 17β -Estradiol untersucht werden. Hierfür wurden rekombinante HEK (Human Embryonic Kidney) 293-Zellen verwendet, welche verschiedene SUR-Isoformen und SUR-Mutanten exprimierten. Folgende Mutanten waren von besonderem Interesse: Bei der Mutation SUR1(M1289T) wurde das Methionin an Position 1289 durch die korrespondierende Aminosäure (Threonin) von SUR2 ausgetauscht. Laut Moreau et al. (2000) ist dieser Methionin-Rest in der Transmembranhelix 17 von SUR1 maßgeblich an der Aktivierung der K_{ATP} -Kanäle durch Öffner beteiligt. Hambrock et al. (2004) konnten nachweisen, dass die Mutation SUR1(M1289T) die Bindung für Öffner verbessert, jedoch keinen Einfluss auf die Bindung von Glibenclamid nimmt. Andererseits wird durch diese Punktmutation der für Zellen, welche SUR1 exprimieren, spezifische apoptotische Effekt von Glibenclamid (Hambrock et al., 2006) bzw. Resveratrol (Hambrock et al., 2007) komplett aufgehoben. In der vorliegenden Arbeit wurde außerdem die dazu inverse Mutation SUR2(T1254M) untersucht, welche die Bindung verschiedener K_{ATP} -Kanal-Öffner beeinträchtigt, die Bindung des K_{ATP} -Kanal-Blockers Glibenclamid jedoch nicht beeinflusst (Hambrock et al., 2005). Des Weiteren wurde die Mutante SUR1(W1296A) untersucht, bei welcher der Tryptophan-Rest an Position 1296 von SUR1

durch Alanin ausgetauscht wurde. Innerhalb der Subfamilie C der ATP-bindenden Kassettenproteine ist dieser Tryptophan-Rest stark konserviert und befindet sich in der carboxyterminalen Helix. Er ist bei verschiedenen MRP (Multidrug Resistance-Related Protein)-Isoformen entscheidend an der Bindung von Liganden bzw. Transportsubstraten beteiligt (Ito et al., 2001a und 2001b, Zhang et al., 2002, Oleschuk et al., 2003). Hiller et al. (2006) konnten nachweisen, dass die Mutation SUR1(W1296A) entscheidenden Einfluss auf die Glibenclamid-Bindung nimmt. Um außerdem zu erforschen, ob die durch SUR1 vermittelte Apoptose nach Behandlung mit 17β -Estradiol an eine korrekte Funktion der Nukleotidbindungsfalten gekoppelt ist, wurden die Mutanten SUR1(R1379C) bzw. SUR1(R1379L) in Experimenten untersucht. Beide Mutationen sind in der Nukleotidbindungsfalte des SUR1 lokalisiert und führen dort zu einer erhöhten ATPase-Aktivität (de Wet et al., 2007b). Diese Mutationen wurden in Patienten mit vorübergehendem neonatalem Diabetes gefunden, in deren Familien teilweise gehäuft Diabetes Typ 2 oder Gestationsdiabetes auftrat (Babenko et al., 2006, de Wet et al., 2007b, Vaxillaire et al., 2007).

Nach der Behandlung mit 17β -Estradiol wurden verschiedene Parameter quantifiziert, welche für einen Vitalitätsverlust bzw. eine Induktion von Apoptose charakteristisch sind, z.B. der Verlust der Adhärenz der Zellen, die Veränderungen in der Kernmorphologie, sowie die Aktivität verschiedener Caspasen.

Funktionstüchtige K_{ATP} -Kanäle pankreatischer β -Zellen setzen sich aus der regulatorischen Untereinheit SUR1 sowie der porenbildenden Untereinheit Kir6.2 zusammen. Um zu überprüfen, ob Kir6.2 bei der durch 17β -Estradiol induzierten Apoptose eine wichtige Rolle spielt, wurden Experimente mit co-transfizierten HEK293-Zellen (SUR1 und Kir6.2) durchgeführt.

Des Weiteren sollte untersucht werden, welche Wirkung 17β -Estradiol auf Zellen ausübt, welche endogen SUR exprimieren. Hierfür wurden Zellen der klonalen β -Zelllinien RIN-m5F- und HIT-T15-Zellen, welche SUR1 exprimieren, sowie Zellen der Zelllinie A-10 (glatte Gefäßmuskelzellen), welche SUR2B exprimieren, verwendet. Zum Test der physiologischen Relevanz und der Konzentrationsabhängigkeit des Effektes von 17β -Estradiol wurden außerdem Experimente an isolierten Langerhans-Inseln aus weiblichen und männlichen SUR1-Knockout- und Wildtyp-Mäusen verschiedenen Alters durchgeführt.

Außerdem wurden Substanzen, welche mit 17β -Estradiol chemisch verwandt sind, in Experimenten untersucht, um eventuell nähere Erkenntnisse bezüglich der für die Wirkung verantwortlichen Molekülregionen zu erlangen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Ac-DEVD-AFC N-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-AFC (7-Amino-4-Trifluoromethyl-Coumarin)	Biomol, Hamburg
Ac-IETD-AFC N-acetyl-Ile-Glu-Thr-Asp-AFC (7-Amino-4-Trifluoromethyl-Coumarin)	Biomol, Hamburg
Ac-LEHD-AFC N-acetyl-Leu-Glu-His-Asp-AFC (7-Amino-4-Trifluoromethyl-Coumarin)	Biomol, Hamburg
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad Laboratories, München
BSA (Rinder-Serum-Albumin), 98 %	Sigma, Steinheim
CASYton-Elektrolytlösung	Innovatis, Reutlingen
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Lonza, BioWhittaker, Schweiz
DMSO (Dimethylsulfoxid), $\geq 99,9$ %	Fluka, Buchs
DTT (1,4-Dithio-DL-threitol)	Fluka, Buchs
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Merck, Darmstadt
17 β -Estradiol, 98 %	Sigma, Steinheim
Estron, 99 %	Sigma, Steinheim
Ethanol, p.a. 99,9 %	Merck, Darmstadt
Etoposid	Calbiochem Merck, Darmstadt
FCS (Fötale Kälberserum)	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe
Geneticin (G418-Sulfat)	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe
Gentamicin	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe
Glibenclamid	Sigma, Steinheim
HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution)	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe
HEPES, ≥ 99 % (N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure)	Roth, Karlsruhe
Hoechst 33258 (Bisbenzimid)	Sigma, Steinheim
Kaisers Glyceringelatine	Merck, Darmstadt
Kollagenase Typ IV	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe

Lipofectamin	Invitrogen, Karlsruhe
MEM (Minimum Essential Medium) + Earl's, + L-Glutamin	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe
NaCl, 99,5 %	Fluka, Buchs
Nonidet P 40	Fluka, Buchs
OPTI-MEM	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe
Paraformaldehyd, 95 %	Fluka, Buchs
PBS (Phosphate-Buffered Saline)	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin (100 units/ml)/Streptomycin (0,1 mg/ml)	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe
Pterostilben	Calbiochem Merck, Darmstadt
Resveratrol, 99 %	Sigma, Steinheim
RPMI (Roswell Park Memorial Institute) + L-Glutamin, + bzw. – D-Glucose	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe
TPA (Phorbol-12-Myristat-13-Acetat)	Calbiochem Merck, Darmstadt
TRIS, 99,9 %	Sigma, Steinheim
Trypsin/EDTA-Lösung	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe
Zimtsäure	Sigma, Steinheim

3.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Analysewaage Kern 770	Kern, Balingen
CASY Cellcounter Analyser System TT	Innovatis, Reutlingen
CO ₂ -Inkubator für Zellkultur Hera Cell	Heraeus, Hanau
Deckgläser; Ø 30 mm, Ø 50 mm	Hecht, Sondheim Menzel, Braunschweig
Falcon Tubes; 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Gewebekulturschalen; steril 94 x 16 mm, 60 x 15 mm, 35 x 10 mm	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Kryoröhrchen Cryosteril; 2 ml	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Mikroskop Diaphot TMD	Nikon Corporation, Düsseldorf
Mikroskop ECLIPSE TE2000-U	Nikon Corporation, Düsseldorf
Mikroskop Laborlux D	Leitz, Wetzlar
Mikroskop-Kamera CF 20 DXC	Kappa opto-electronics, Gleichen
Milli-Q System, Wasseraufbereitungsanlage	Millipore, USA
Photometer Dynatech MR500	Dynatech, USA

Pipetten graduiert, mit Spitze; steril; 5 ml	Costar Corning Incorporation, Niederlande
Pipetten graduiert, mit Spitze; steril; 10 ml	Costar Corning Incorporation, Niederlande
Pipetten graduiert, mit Spitze; steril; 25 ml	Costar Corning Incorporation, Niederlande
Pipetten (verschiedene Volumina)	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf; Biohit, Rosbach
Pipettenspitzen (verschiedene Volumina)	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf; Sarstedt, Nümbrecht
PP Röhrchen; steril; 50 ml	Greiner Bio-one, Frickenhausen
PP Röhrchen; steril; 15 ml	Greiner Bio-one, Frickenhausen
PS Microplatte 96 well;	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Reaktionsgefäße; 1,5 ml; Safe Lock Tubes	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Reaktionsgefäße; 2 ml; Safe Lock Tubes	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Spritze; steril; 10 ml	Becton Dickinson, USA
Spritzenfilter; steril; 0,2 µm	Schleier & Schuell, Dassel
Sterilbank Hera safe KS	Kendro, Langenselbold
Vortex Mixer UNIMAG ZX	Vetter, Wiesloch
Wallac Victor 1420 Fluoreszenzreader	Perkin Elmer, USA
Wasserbad (mit Schüttelfunktion) SBK 25	Salvis, Reussbühl
Wasserbad W12	Störk-Tronic, Stuttgart
Zentrifuge 5810R Eppendorf	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Zentrifuge 5417R Eppendorf	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf

3.1.3 Medien und Lösungen

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Medien bei 4 °C aufbewahrt und vor Gebrauch auf 37 °C im Wasserbad erwärmt.

Das in dieser Arbeit verwendete FCS wurde vor Gebrauch einmalig bei 58 °C für 60 min hitzeinaktiviert.

3.1.3.1 Wachstumsmedien für die Zellkultur

3.1.3.1.1 Wachstumsmedium für HEK (Human Embryonic Kidney) 293-Zellen

MEM

- + FCS 10 %
- + Gentamycin 20 µg/ml

Zur Kultivierung stabil transfizierter HEK293-Zellen, welche den Vektor pcDNA mit einem Neomycin-Resistenzgen enthielten, wurde zusätzlich Geneticin (300 µg/ml in HEPES 100 mmol/l; pH 7,4) zugegeben, um über den Selektionsdruck durch dieses Antibiotikum einen Verlust des transfizierten Plasmids zu vermeiden (siehe Kapitel 3.2.1.2).

3.1.3.1.2 Wachstumsmedium für A-10-Zellen

DMEM

- + FCS 10 %
- + Penicillin 100 units/ml
- + Streptomycin 0,1 mg/ml

3.1.3.1.3 Wachstumsmedium für HIT-T15- und RIN-m5F-Zellen

RPMI 1640

- + FCS 10 %
- + Penicillin 100 units/ml
- + Streptomycin 0,1 mg/ml

3.1.3.1.4 Medium zur Kultivierung isolierter Langerhans-Inseln

RPMI 1640	1 Teil
+ RPMI 1640 ohne Glucose	1 Teil
+ FCS	10 %
+ Penicillin	100 units/ml
+ Streptomycin	0,1 mg/ml

3.1.3.2 Medien zum Einfrieren von Zellen

Je nach Zelllinie wurden hierfür die Medien eingesetzt, welche auch zur Kultivierung der verschiedenen Zelllinien verwendet wurden (vgl. Kapitel 3.1.3.1):

HEK293-Zellen	MEM
A-10-Zellen	DMEM
HIT-T15- und RIN-m5F-Zellen	RPMI

Medium A:

Kulturmedium	
+ FCS	40 %

Medium B:

Kulturmedium	
+ DMSO	20 %

Medium B wurde vor Gebrauch auf Eis gestellt.

3.1.3.3 Trypsin/EDTA-Lösung

Trypsin/EDTA	0,5 %
--------------	-------

Für das enzymatische Ablösen von Zellen wurde diese Trypsin/EDTA-Lösung im Verhältnis 1:2 mit PBS verdünnt. Die Lagerung der Lösung erfolgte bei -20 °C.

3.1.3.4 Paraformaldehyd-Lösung

PBS	
+ Paraformaldehyd	3 %

Die Lagerung der Lösung erfolgte bei 4 °C.

3.1.3.5 Hoechst 33258-Lösung

Aq. bidest.

+ Hoechst 33258 1 mg/ml

Diese Stammlösung wurde bei -20 °C gelagert und unmittelbar vor Gebrauch im Verhältnis 1:100 mit PBS verdünnt.

3.1.3.6 Pufferlösungen für die Bestimmung von Caspase-Aktivitäten

Stammlösung für den Lysispuffer:

TRIS-HCl (pH 8,0) 50 mM

+ NaCl 120 mM

+ EDTA (pH 8,0) 5 mM

+ Nonidet P 40 0,5 %

+ Aq. bidest. ad 100 ml

Zur Herstellung von TRIS-HCl und der verwendeten EDTA-Lösung wurden TRIS bzw. EDTA jeweils in Aq. bidest. gelöst und mit HCl bzw. NaOH auf pH 8,0 eingestellt.

Caspase-Lysispuffer:

Stammlösung für den Lysispuffer 1 Teil

+ PBS 1 Teil

+ DTT 5 mM

Das hier verwendete DTT wurde in Aq. bidest. gelöst (1 M Stammlösung) und bei -20 °C aufbewahrt.

3.1.3.7 Pentobarbital-Lösung

85 %ige NaCl-Lösung

+ Pentobarbital 10 mg/ml

3.1.3.8 Kollagenase-Lösung

HBSS

+ Kollagenase Typ IV 708 units/ml

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

Die Kultur von Zelllinien stellt ein häufig verwendetes Modellsystem zur Untersuchung wichtiger zellbiologischer Prozesse dar. So können Stoffwechsel, Teilung oder auch die Wirkung von Substanzen auf die Signaltransduktion oder auch toxische Effekte dieser Substanzen auf eine Zelle erforscht werden.

Mit Hilfe der Zellkultur können Zellen und Gewebe in einem Nährmedium außerhalb des Organismus kultiviert werden. Man unterscheidet hierbei die Kultivierung von permanenten und primären Zelllinien (Primärkultur). Bei einer Primärkultur handelt es sich um nicht immortalisierte Zellen, welche direkt aus dem Gewebe entnommen und nach mechanischer bzw. enzymatischer Zerkleinerung in Kultur gebracht werden. Diese Zellen zeigen noch weitgehend die für das Ursprungsgewebe typischen Eigenschaften; allerdings sind sie meist in ihrer Lebensfähigkeit stark begrenzt und müssen somit immer wieder neu gewonnen werden. Permanente Zelllinien hingegen wurden immortalisiert, was z.B. durch Transformation mit einem Fragment eines Tumorgens erreicht werden kann. Diese Zellen sind „unsterblich“ und lassen sich dementsprechend über einen sehr langen Zeitraum durch regelmäßiges Passagieren kultivieren.

Verschiedene Zelltypen wachsen bei unterschiedlichen Bedingungen und benötigen deshalb häufig speziell an ihre Bedürfnisse angepasste Wachstumsmedien.

3.2.1.1 Plasmide und Zelllinien

Zur pharmakologischen und biochemischen Charakterisierung verschiedener Isoformen und Mutanten des Sulfonylharnstoffrezeptors (SUR) wurden rekombinante HEK (Human Embryonic Kidney) 293-Zellen verwendet. HEK293-Zellen wurden ursprünglich aus menschlichen embryonalen Nierenzellen gewonnen, welche mit einem Teil eines Tumorgens immortalisiert wurden (Graham et al., 1977). Die in dieser Arbeit verwendeten HEK293-Zellen wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig) bezogen. Die Zellen wurden jeweils stabil mit dem pcDNA3.1-Expressionsvektor (Invitrogen, Karlsruhe) transfiziert, welcher die cDNA von SUR1 (GenBank X97279), SUR2A (GenBank D86037) oder SUR2B (GenBank D86038) enthielt. Außerdem wurden die HEK293-Zellen mit den Genen für die Mutanten SUR1(M1289T), SUR1(W1296A), SUR1(R1379C), SUR1(R1379L) oder SUR2B(Y1206S, T1254M) stabil

transfiziert. Als Kontrollzellen wurden mit leerem pcDNA3.1-Vektor transfizierte HEK293-Zellen (pcDNA-Zellen) verwendet. Die Mutagenese und die Isolation der stabilen Zelllinien wurden von Frau PD Dr. A. Hambrock und Frau C. Müller durchgeführt, wie in Hambrock et al., (2002) beschrieben. Die Methode der Transfektion von HEK293-Zellen ist den Abschnitten 3.2.1.2 und 3.2.1.3 zu entnehmen. Die Isolation einer stabilen Zelllinie wurde, wie unter Kapitel 3.2.1.4 am Beispiel der die Mutante SUR1(R1379C) exprimierenden Zelllinie beschrieben, durchgeführt. Die Plasmide mit der cDNA für SUR1, SUR2 oder Kir6.2 wurden freundlicherweise von Dr. C. Derst (Berlin) bzw. von Y. Kurachi und Y. Horio (Osaka, Japan) zur Verfügung gestellt.

3.2.1.2 Gewinnung rekombinanter HEK (Human Embryonic Kidney) 293-Zellen mittels Lipofektion

Als „Transfektion“ bezeichnet man das Einbringen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen mittels physikalischer oder chemischer Methoden. Hier unterscheidet man zwischen dem nur zeitweiligen Einbringen des Plasmids in die Wirtszelle (transiente Transfektion) und dem dauerhaften Einbau in das Genom (stabile Transfektion). Fremde DNA wird in eukaryotischen Zellen normalerweise relativ schnell abgebaut, durch den Einbau in das Wirtsgenom wird dieses jedoch in der Regel verhindert.

In dieser Arbeit wurden Transfektionen mit kationischen Liposomen durchgeführt (siehe Kapitel 3.2.1.3). Bei der so genannten „Lipofektion“ handelt es sich um ein Verfahren, bei dem Liposomen mit kationischer Nettoladung mit der negativ geladenen DNA aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen Komplexe bilden. Das Mischungsverhältnis von DNA und Liposomen spielt dabei eine große Rolle und wird so gewählt, dass die Plasmid-DNA vollständig von den Liposomen komplexiert wird und eine insgesamt leicht positive Nettoladung entsteht (Felgner et al., 1987 und 1989). Die Aufnahme der Komplexe in die Zelle erfolgt durch Fusion mit der Plasmamembran.

Um aus den transient transfizierten Zellen stabil transfizierte Zelllinien zu gewinnen, wurden die positiv transfizierten Zellen selektioniert. Diese Selektion basierte auf einem Antibiotikaresistenzgen, welches bei erfolgreicher Transfektion mit dem hier verwendeten Expressionsvektor pcDNA3.1 in die Zelle eingebracht wurde. Dieses Resistenzgen bewirkt eine Resistenz der Zelle gegenüber Neomycin und verleiht der Zelle ebenfalls eine Resistenz gegenüber Geneticin. Die transfizierten Zellen wurden so lange mit einer höheren Geneticin-Dosis (700 µg/ml) behandelt, bis nur noch die positiv transfizierten Zellen übrig blieben. Zur

Erhaltung der Resistenz wurden die Zellen in der Folge in Gegenwart einer niedrigeren Genitacin-Konzentration (300 µg/ml) kultiviert.

3.2.1.3 Transiente Co-Transfektion von HEK293-Zellen mit dem Sulfonylharnstoffrezeptor (SUR) 1 und der porenbildenden K_{ATP} -Kanal-Untereinheit Kir6.2

Um zu untersuchen, ob das Protein Kir6.2 (porenbildende Untereinheit des K_{ATP} -Kanals, siehe Kapitel 1.1.1) bei der durch den Sulfonylharnstoffrezeptor vermittelten Apoptose eine wichtige Rolle spielt, wurden HEK293-Zellen mit den Genen für SUR1 und Kir6.2 co-transfiziert (siehe Tabelle 3.3).

Die HEK293-Zellen wurden in Kulturschalen (94 x 16 mm) bei 37 °C, 5 % CO₂, 95 % Luft und hoher Luftfeuchtigkeit in einem Inkubationsschrank kultiviert. Pro Transfektion wurden Schalen eingesetzt, welche einen Konfluenzgrad von 60-80 % aufzeigten.

Pro Schale wurden 2 Reaktionsgefäße für die Mischung der Transfektionsreagenzien vorbereitet. Das Transfektionsmedium OPTI-MEM wurde auf 37 °C vorgewärmt.

Tabelle 3.1: Ansätze für die Transfektion von HEK293-Zellen

Pro Schale wurden 2 Reaktionsgefäße für die Mischung der Transfektionsreagenzien vorbereitet. In allen Reaktionsgefäßen wurde OPTI-MEM vorgelegt und Lipofectamin (Ansatz 1) bzw. die entsprechende Menge an DNA (Ansatz 2) zugegeben.

Ansatz 1 (1,5 ml Reaktionsgefäß)	Ansatz 2 (2 ml Reaktionsgefäß)
800 µl OPTI-MEM	800 µl OPTI-MEM
+ 50 µl Lipofectamin	+ entsprechende Menge DNA

Wie der Tabelle 3.1 zu entnehmen ist, wurden in alle Reaktionsgefäße je 800 µl OPTI-MEM vorgelegt. Zu Ansatz 1 wurden je 50 µl Lipofectamin zugefügt und durch Auf- und Abpipettieren vorsichtig vermischt. Zu Ansatz 2 wurden die entsprechenden Mengen an DNA zugefügt und ebenfalls gemischt. Die DNA-Mengen wurden so berechnet und eingesetzt, dass jeder Ansatz äquimolare Mengen der unterschiedlich großen Plasmidkonstrukte enthielt (siehe Tabelle 3.2). Die optimale Lipofectamin-Menge, 25 µl pro DNA-Komponente, war in früheren Versuchsreihen ermittelt worden.

Um einen Verlust der DNA durch weiteres Pipettieren zu verhindern, wurde nun Ansatz 1 in das Reaktionsgefäß mit Ansatz 2 überführt, vorsichtig gemischt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die Komplexbildung zwischen Liposomen und DNA (siehe Kapitel 3.2.1.2) zu ermöglichen. In der Zwischenzeit wurde das Wachstumsmedium (MEM)

aus den Schalen mit den zu transfizierenden Zellen abgesaugt und durch 10 ml OPTI-MEM pro Schale ersetzt.

Tabelle 3.2: Größen der verschiedenen Plasmidkonstrukte und daraus resultierende DNA-Mengen

Die DNA-Mengen wurden so berechnet und eingesetzt, dass jeder Ansatz äquimolare Mengen der unterschiedlich großen Plasmidkonstrukte enthielt.

Plasmidkonstrukt	Größe/Plamid	eingesetzte DNA-Menge/Schale
SUR1	≈10,15 kb	5,82 µg
Kir6.2	≈6,6 kb	4,0 µg
pcDNA	≈5,4 kb	3,14 µg

Tabelle 3.3: Co-Transfektion von HEK293-Zellen mit SUR1 und Kir6.2

HEK293-Zellen wurden mit DNA von SUR1 + pcDNA, SUR1 + Kir6.2, pcDNA + Kir6.2 bzw. pcDNA + pcDNA transfiziert (je 6 Schalen pro Ansatz). Das Transfektionsgemisch setzte sich zusammen aus OPTI-MEM, Lipofectamin und der jeweiligen DNA in den entsprechenden Mengen.

Schalen 1-6	Schalen 7-12	Schalen 13-18	Schalen 19-24
HEK293-Zellen	HEK293-Zellen	HEK293-Zellen	HEK293-Zellen
OPTI-MEM 1600 µl/Schale	OPTI-MEM 1600 µl/Schale	OPTI-MEM 1600 µl/Schale	OPTI-MEM 1600 µl/Schale
+ Lipofectamin 50 µl/Schale	+ Lipofectamin 50 µl/Schale	+ Lipofectamin 50 µl/Schale	+ Lipofectamin 50 µl/Schale
+ SUR1-DNA 5,82 µg/Schale	+ SUR1-DNA 5,82 µg/Schale		
+ pcDNA3.1-DNA 3,14 µg/Schale		+ pcDNA3.1-DNA 3,14 µg/Schale	+ pcDNA3.1-DNA 2 x 3,14 µg/Schale
	+ Kir6.2-DNA 4,0 µg/Schale	+ Kir6.2-DNA 4,0 µg/Schale	

Nach der 30-minütigen Inkubationszeit wurde das Gemisch der Transfektionsansätze zu jeweils 6,3 ml OPTI-MEM gegeben, welches in 15 ml Falcon Tubes vorgelegt wurde, und vorsichtig gemischt. Nachdem das OPTI-MEM wieder abgesaugt wurde, wurden die Zellen vorsichtig mit dem jeweiligen Transfektionsgemisch überschichtet. Nach 5-stündiger Inkubation der Zellen im Inkubationsschrank wurden pro Schale je 8 ml eines vorgewärmten MEM-Mediums mit 20 % FCS (ohne Zusatz von Antibiotika) hinzugefügt. 24 Stunden nach der Transfektion wurde das Transfektionsgemisch abgesaugt und durch 10 ml frisches Zellkulturmedium (MEM + 10 % FCS + Gentamycin, siehe Kapitel 3.1.3.1.1) ersetzt.

Anschließend wurden die Zellen mit einer bestimmten Konzentration der zu untersuchenden Substanz bzw. mit dem entsprechenden Lösungsmittel inkubiert, um nach einem definierten Zeitraum die Menge der abgelösten Zellen zu quantifizieren (siehe Kapitel 3.2.2.2).

3.2.1.4 Gewinnung stabil transfizierter HEK293-Zellen am Beispiel der Isolation von Zellen, welche die Mutante SUR1(R1379C) exprimieren

Die Transfektion der HEK293-Zellen mit cDNA, welche für die Mutante SUR1(R1379C) codiert, wurde entsprechend Kapitel 3.2.1.3 durchgeführt.

Die eingesetzten Mengen an Lipofectamin und SUR1(R1379C)-DNA (10,15 kb/Plasmid) sind Tabelle 3.4 zu entnehmen. Die positiv transfizierten Zellen wurden durch Zugabe des Antibiotikums Geneticin in einer Konzentration von 700 µg/ml selektioniert (siehe Kapitel 3.2.1.2). Während der Selektionsphase wurde täglich das Medium gewechselt und Geneticin zugegeben. Diese Phase dauerte so lange an, bis alle nicht stabil transfizierten Zellen abgestorben waren (ca. 7 Tage). Die so gewonnenen stabil transfizierten Zellen wurden danach weiterhin mit Geneticin in einer Konzentration von 300 µg/ml kultiviert (siehe Kapitel 3.1.3.1.1).

Tabelle 3.4: Transfektion von HEK293-Zellen mit SUR1(R1379C)-DNA

HEK293-Zellen wurden mit 5,82 µg SUR1(R1379C)-DNA und 30 µl Lipofectamin pro Schale transfiziert. Das Transfektionsgemisch setzte sich zusammen aus OPTI-MEM, Lipofectamin und DNA, vgl. Tabelle 3.1.

HEK293-Zellen
OPTIMEM
1600 µl/Schale
+ Lipofectamin
30 µl/Schale
+ SUR1(R1379C)-DNA
5,82 µg/Schale

3.2.1.5 Kultivierung stabil transfizierter HEK293-Zellen

Die Kultivierung der HEK293-Zellen erfolgte in Kulturschalen mit Wachstumsmedium (siehe Kapitel 3.1.3.1.1) bei 95 % Luft, 5 % CO₂ und hoher Luftfeuchtigkeit in einem Inkubationsschrank bei 37 °C. Um die Zellen in einem teilungsfähigen Zustand zu erhalten, wurden die Kulturschalen zweimal pro Woche im Abstand von 3 bzw. 4 Tagen bei einer Konfluenz von 60-80 % passagiert. Hierzu wurde das Medium abgesaugt, und die Zellen

einer Schale, im Fall einer Verdünnung im Verhältnis 1:3, mit 3 ml Wachstumsmedium (37 °C) abgelöst. Je 1 ml der Zellsuspension wurde in eine neue Schale (94 x 16 mm) mit 9 ml Wachstumsmedium und 300 µg/ml Geneticin gegeben und durch Mischen gleichmäßig in der Schale verteilt. Um einen möglichst konstanten Konfluenzgrad zu Beginn der verschiedenen Experimente zu erhalten, bzw. um den gleichen Passagerhythmus beibehalten zu können, wurden Schalen mit niedrigerem Konfluenzgrad im Verhältnis 1:2 bzw. 1:2,5 verdünnt und ausgesät.

Für das Anfärben der Zellkerne mittels Farbstoff Hoechst 33258 (siehe Kapitel 3.2.2.3) wurden die HEK293-Zellen in kleineren Petrischalen (35 x 10 mm) kultiviert. Um eine den großen Schalen entsprechende Konfluenz zu erhalten, wurden die Zellen einer 94 x 16 mm Schale mit 3 ml Medium abgelöst, 1 ml davon in weiteren 14 ml Medium aufgenommen und à 3 ml auf 5 kleinere Petrischalen verteilt und kultiviert.

3.2.1.6 Kultivierung von HIT-T15-, RIN-m5F- und A-10-Zellen

HIT-T15-Zelllinie

Bei der HIT-T15-Zelllinie handelt es sich um β -Zellen aus den Langerhans-Inseln des syrischen Goldhamsters (*Mesocricetus auratus*). Diese Zelllinie wurde aus einer Primärkultur dieser Inselzellen gewonnen und anschließend mit SV40 transformiert. HIT-T15-Zellen exprimieren K_{ATP} -Kanäle in der Kombination SUR1 und Kir6.2 und sind in der Lage Insulin zu sezernieren. Die Fähigkeit zur Insulinsekretion nimmt jedoch mit der Dauer der Kultivierungszeit ab. Die HIT-T15-Zellen (ATCC: CRL-1777, Lot. No.: 30 3092548) wurden von der American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, USA) bezogen (Santerre et al., 1981, Lord und Ashcroft, 1984, Aguilar-Bryan et al., 1992).

RIN-m5F-Zelllinie

Ursprünglich stammt die RIN-m5F-Zelllinie aus entarteten β -Zellen pankreatischer Langerhans-Inseln der Ratte (*Rattus norvegicus*). Es handelt sich hierbei um einen Klon der RIN-m Inselzellen der Ratte. RIN-m5F-Zellen weisen, wie HIT-T15-Zellen, in ihren K_{ATP} -Kanälen die Kombination SUR1 und Kir6.2 auf und sezernieren Insulin. RIN-m5F-Zellen (ATCC: CRL-11605, Lot. No.: 30 4367727) wurden von der American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, USA) bezogen (Gazdar et al., 1980, Bhathena et al., 1984).

A-10-Zelllinie

Die klonale β -Zelllinie A-10 wurde von B. Kimes und B. Brandt (Kimes und Brandt, 1976) aus der Brusttaorta von DB1X Rattenembryonen (*Rattus norvegicus*) gewonnen. Die Zelllinie zeigt viele charakteristische Eigenschaften glatter Muskelzellen und exprimiert K_{ATP} -Kanäle in der Kombination SUR2B und Kir6.2. A-10-Zellen (ATCC: CRL-1476) wurden von der American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, USA) bezogen.

Die Kultivierung von HIT-T15-, RIN-m5F- und A-10-Zellen erfolgte in Kulturschalen mit dem entsprechenden Wachstumsmedium (siehe Kapitel 3.1.3.1.3 bzw. 3.1.3.1.2) bei 95 % Luft, 5 % CO_2 und hoher Luftfeuchtigkeit im Inkubationsschrank bei 37 °C.

Alle 3-4 Tage erfolgte ein Mediumwechsel, passagiert wurde einmal pro Woche bei einem Konfluenzgrad von 50-70 %. Hierzu wurde das Medium abgesaugt, und die adhärennten Zellen wurden mit vorgewärmten PBS gewaschen. Im Anschluss wurde zu jeder Schale 1 ml einer 0,25 % Trypsin/EDTA-Lösung (siehe Kapitel 3.1.3.3) zugegeben, für 2 min bei 37 °C inkubiert und mit 8 ml des entsprechenden Mediums abgelöst. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml Falcon Tube überführt und für 3 min bei 300 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet, je nach Konfluenzgrad, mit 3-5 ml Medium aufgenommen. Je 1 ml Zellsuspension wurde in eine neue Schale mit 9 ml des entsprechenden Mediums gegeben und durch Mischen in der Kulturschale verteilt.

Für das Anfärben der Zellkerne mittels Farbstoff Hoechst 33258 wurden die Zellen in kleineren Petrischalen (35 x 10 mm) kultiviert. Hierfür wurden die Zellen einer 94 x 16 mm Schale nach Waschen mit PBS und Behandlung mit Trypsin/EDTA mit 3-5 ml des entsprechenden Mediums abgelöst, 1 ml davon in weiteren 14 ml Medium aufgenommen und à 3 ml auf 5 kleinere Petrischalen verteilt.

3.2.1.7 Auftauen von Zellen

Die in Kryoröhrchen eingefrorenen Zellen wurden dem Stickstofflagertank entnommen und aufgetaut. Hierfür wurde der Inhalt eines Röhrchens (1 ml) mit 10-15 ml des entsprechenden Wachstumsmediums (37 °C) in ein 50 ml Falcon Tube überführt. Die Zellsuspension wurde für 3 min bei 300 g und 4 °C zentrifugiert, um das vorhandene DMSO (siehe Kapitel 3.2.1.8) zu entfernen. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 10 ml Wachstumsmedium resuspendiert und in einer Kulturschale ausgesät. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Inkubationsschrank bei 37 °C, 5 % CO_2 , 95 % Luft und hoher Luftfeuchtigkeit. Nach

einem Tag wurde das Medium abgesaugt und frisches Medium zugegeben. Nach zwei weiteren Tagen konnten die Schalen bei einem Konfluenzgrad von 60-80 % (HEK293-Zellen) bzw. 50-70 % (HIT-T15-, RIN-5mF- und A-10-Zellen) passagiert und bei rekombinanten HEK293-Zellen das Genitacin (300 µg/ml) zugegeben werden.

3.2.1.8 Einfrieren von Zellen

3.2.1.8.1 HEK293-Zellen

Bei einem Konfluenzgrad von 60-80 % wurde das Medium der Kulturschale abgesaugt, die Zellen wurden mit ca. 5 ml von Medium A (siehe Kapitel 3.1.3.2) abgelöst und in ein 50 ml Falcon Tube überführt. Die Zellen wurden bei 500 g und 4 °C für 6 min zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstands wurden die Zellen einer Schale in je 500 µl Medium A und Medium B (siehe Kapitel 3.1.3.2) resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Das Einfrieren der Zellen erfolgte langsam, indem sie 1-2 Tage bei -80 °C gelagert wurden, bevor sie in den Stickstofflagertank überführt wurden.

3.2.1.8.2 HIT-T15-, RIN-5mF- und A-10-Zellen

Bei einem Konfluenzgrad von 50-70 % wurde das Medium der Kulturschale abgesaugt und die adhärennten Zellen wurden mit vorgewärmten PBS gewaschen. Im Anschluss wurde zu jeder Schale 1 ml einer 0,25 % Trypsin/EDTA-Lösung (siehe Kapitel 3.1.3.3) zugegeben, für 2 min bei 37 °C inkubiert und die Zellen mit 5 ml von Medium A (siehe Kapitel 3.1.3.2) abgelöst. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml Falcon Tube überführt und bei 4 °C und 500 g für 6 min zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstands wurden die Zellen einer Schale in je 500 µl Medium A und Medium B (siehe Kapitel 3.1.3.2) resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Das Einfrieren der Zellen erfolgte langsam, indem sie 1-2 Tage bei -80 °C gelagert wurden, bevor sie in den Stickstofflagertank überführt wurden.

3.2.1.9 Versuchstiere

Aus Wildtyp (WT)- und SUR1-Knockout (SUR1KO)-Mäusen wurde das Pankreas entnommen und die Langerhans-Inseln isoliert. Die SUR1KO-Mäuse wurden freundlicherweise von Frau Dr. Lydia Aguilar-Bryan und Herrn Prof. Dr. Joseph Bryan (Seattle, Washington, USA) zur Verfügung gestellt. Sie wurden wie bei Seghers et al. (2000) beschrieben, generiert und stammen aus der C57Bl/6-Linie. Deshalb dienten C57Bl/6-Wildtyp-Mäuse als Kontrollen, welche von der Charles River GmbH (Sulzfeld) bezogen

wurden. Es wurden sowohl weibliche als auch männliche Tiere verschiedenen Alters (5-7 Wochen bzw. 20-32 Wochen) untersucht. Das Körpergewicht der Mäuse lag bei ca. 13-28 g (Alter: 5-7 Wochen) bzw. ca. 22-46 g (Alter: 20-32 Wochen). Gezüchtet und kultiviert wurden die Tiere im Tierstall des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Tübingen (Wildtyp-Mäuse) bzw. im Tierstall des Pharmazeutischen Instituts (SUR1KO- und Wildtyp-Mäuse), Arbeitsgruppe Prof. Dr. Gisela Drews, und uns freundlicherweise für die Experimente zur Verfügung gestellt.

3.2.1.9.1 Isolierung von Langerhans-Inseln

Zur Isolierung der Langerhans-Inseln wurde die Maus mit 100 µl Pentobarbital-Lösung (10 mg/ml in 85 %iger NaCl-Lösung) pro 10 g Körpergewicht (siehe Kapitel 3.1.3.7) narkotisiert, welche intraperitoneal verabreicht wurde. Das Abdomen wurde geöffnet und der Ductus pancreaticus an der Leber abgeklemmt. Eine atraumatische Kanüle wurde in den Gallengang eingeführt und das Pankreas mit 2 ml einer Kollagenaselösung, Typ IV, (siehe Kapitel 3.1.3.8) aufgebläht. Das Organ wurde von Duodenum, Magen und Milz abgetrennt und herausgeschnitten. Die Organentnahmen wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Hartmut Oßwald bzw. Frau PD Dr. Almut Grenz durchgeführt. Das Pankreas wurde unmittelbar nach der Organentnahme in ein 15 ml Falcon Tube überführt und mit weiteren 2 ml der Kollagenaselösung bei 37 °C im Wasserbad geschüttelt. Nach ca. 2-15 Minuten wurde der Kollagenaseverdau mit kaltem HBSS-Puffer (ca. 2 ml) abgestoppt und bei 300 g für 3 min zentrifugiert. Das Pankreas wurde zwei weitere Male mit 3 ml HBSS gewaschen und abzentrifugiert. Anschließend wurde das Gewebe mit 10 ml RPMI-Medium (siehe Kapitel 3.1.3.1.4) aufgenommen und auf zwei Petrischalen (60 x 15 mm) verteilt. Die Langerhans-Inseln wurden unter dem Mikroskop isoliert, in kleinere Petrischalen (35 x 10 mm) mit je 3 ml des RPMI-Mediums überführt und bei 5 % CO₂, 95 % Luft sowie hoher Luftfeuchtigkeit in einem Inkubationsschrank bei 37 °C bis zur Behandlung kultiviert.

3.2.2 Apoptose-Nachweise

3.2.2.1 Behandlung von Zellen mit verschiedenen Substanzen

Für die Experimente in dieser Arbeit wurden verschiedene stabil transfizierte HEK293-Zellen (siehe Kapitel 3.2.1.4) sowie HIT-T15-, RIN-m5F- und A-10-Zellen (siehe Kapitel 3.2.1.6) in Petrischalen mit 10 ml (Schalen mit den Abmessungen 94 x 16 mm) bzw. 3 ml (Schalen mit den Abmessungen 35 x 10 mm) des entsprechenden Kulturmediums bei 5 % CO₂, 95 % Luft,

hoher Luftfeuchtigkeit und 37 °C im Inkubationsschrank kultiviert. Bei der letzten Passage vor Durchführung des jeweiligen Experiments wurde auf die Zugabe von Geneticin bei rekombinanten HEK293-Zellen verzichtet. Transient transfizierte HEK293-Zellen wurden 24 h nach der Transfektion mit der entsprechenden Substanz behandelt (siehe Kapitel 3.2.1.3). In den Experimenten wurden Schalen eingesetzt, welche bei Versuchsbeginn eine Konfluenz von 60-80 % (HEK293-Zellen) bzw. 50-70 % (HIT-T15-, RIN-m5F-, A-10-Zellen) aufwiesen.

Isolierte Langerhans-Inseln wurden in 35 x 10 mm-Petrischalen mit 3 ml Kulturmedium bei 5 % CO₂, 95 % Luft, hoher Luftfeuchtigkeit und einer Temperatur von 37 °C im Inkubationsschrank inkubiert (siehe Kapitel 3.2.1.9.1). Je nach geplanter Behandlungsdauer wurde noch am Tag der Isolation (48 h und längere Behandlungsdauer) bzw. am nächsten Tag (24 h und kürzere Behandlungsdauer) die entsprechende Substanz zugegeben.

In jedem einzelnen Experiment wurden pro Ansatz mindestens zwei Schalen mit der zu untersuchenden Substanz bzw. dem entsprechenden Lösungsmittel inkubiert. Nach einem bestimmten Zeitraum erfolgte dann die Messung der verschiedenen apoptotischen Parameter (siehe Kapitel 3.2.2.2, 3.2.2.3 bzw. 3.2.2.4).

Die eingesetzten Substanzen, die Lösungsmittel sowie die Konzentrationen der jeweiligen Stammlösungen sind in Tabelle 3.5 dargestellt. Die Endkonzentrationen in der Kulturschale sowie die Inkubationszeiten sind den jeweiligen Experimenten (siehe Kapitel 4) zu entnehmen.

Tabelle 3.5: In den Experimenten eingesetzte Substanzen, deren Lösungsmittel sowie die Konzentrationen der jeweiligen Stammlösungen

Substanz	Lösungsmittel	Konzentration der Stammlösung
17β-Estradiol	DMSO/Ethanol	100 mM
Estron	DMSO/Ethanol	100 mM
Etoposid	DMSO	50 mM
Glibenclamid	DMSO/Ethanol	100 mM
Pterostilben	DMSO	100 mM
Resveratrol	DMSO	100 mM
TPA	DMSO/Ethanol	1 mg/ml
Zimtsäure	DMSO	200 mM

3.2.2.2 Quantifizierung der Zellablösung

Das Ablösen adhärent wachsender Zellen vom Schalenboden ist häufig ein charakteristisches Merkmal des Zelltodes. Frühere Untersuchungen (Hambrock et al., 2006 und 2007) haben gezeigt, dass absterbende HEK293-Zellen sich aus dem Zellverband lösen und in den Überstand der Schale übergangen. Zur Quantifizierung der Zellablösung nach Substanzzugabe wurden mit Hilfe eines CASY TT Analyser Systems die Menge der Zellen im Überstand gemessen. Hierfür werden die Zellen in einer isotonen Elektrolytlösung (CASY[®]ton) suspendiert und mit konstanter Strömungsgeschwindigkeit durch eine Präzisionsmesspore gezogen. Während jeder Messung wird über zwei Platinelektroden ein mit 1 MHz getaktetes Niederspannungsfeld an die Kapillarstrecke angelegt. Die Messpore ist mit Elektrolytlösung gefüllt und stellt einen definierten elektrischen Widerstand dar. Beim Durchtritt durch die Messpore verdrängen die Zellen eine ihrem Volumen entsprechende Menge dieser Elektrolytlösung. Intakte Zellen wirken hier als Isolator und erhöhen den elektrischen Widerstand über die Kapillarstrecke, was wiederum als Maß für das Zellvolumen herangezogen wird. Tote Zellen werden nur mit der Größe ihres Zellkerns erfasst, da ihre Zellmembran beschädigt ist und keine elektrische Barriere mehr darstellt. Voraussetzung ist, dass die Zellen einzeln durch die Messpore gesaugt werden. Ob dies gewährleistet ist, wird anhand des so genannten „Aggregationsfaktors“ sichtbar. Ist dieser Parameter erhöht, so ist von einer starken Verklumpung der Zellen auszugehen, was zu einer Verfälschung des Messergebnisses führen kann. Bei einem zu hohen Aggregationsfaktor sollten die Zellen deshalb resuspendiert werden und die Messung sollte anschließend wiederholt werden. Das Messsignal wird durch das Messgerät hochfrequent abgetastet. Nicht nur die Amplitude des Messsignals, sondern auch der gesamte Signalverlauf wird hierbei erfasst. Aus den Einzelmessungen wird schließlich das Integral des Messsignals berechnet, und es können Parameter, wie z.B. Zellvolumen, Gesamtzellzahl und Vitalität der Zellen, bestimmt werden. Das Gerät musste zunächst auf die zu messende HEK293-Zelllinie geeicht werden, indem die durchschnittlichen Zelldurchmesser toter (Zellen wurden gezielt abgetötet) bzw. lebender (hier wurden sehr vitale Zellen eingesetzt) Zellen erfasst wurden, welche bei den späteren Messungen der Beurteilung der Zellvitalität zugrunde gelegt wurden. Der durchschnittliche Zelldurchmesser toter HEK293-Zellen lag zwischen 7,63 µm und 12,75 µm. Zellen, deren Durchmesser größer als 12,75 µm waren, wurden als lebende Zellen gezählt (siehe Abbildung 3.1).

Zur Quantifizierung der Zellen im Überstand wurde das Medium einer Schale in ein 50 ml Falcon Tube überführt und durch Auf- und Abpipettieren gründlich suspendiert. Hierbei war unbedingt auf die Vermeidung von Luftblasen zu achten. Pro Schale wurden für eine Dreifachbestimmung je 100 µl der Zellsuspension entnommen und in je 10 ml CASY[®] ton verdünnt. Im Anschluss erfolgte die Messung mit dem CASY TT Analyser System.

Pro Ansatz wurden mindestens zwei Schalen mit der zu untersuchenden Substanz bzw. mit Lösungsmittel inkubiert (siehe Kapitel 3.2.2.1) und nach einem bestimmten Zeitraum wurde die Zellzahl im Überstand pro Schale mit der oben beschriebenen Methode quantifiziert. Es wurden außerdem unbehandelte Schalen unmittelbar vor Versuchsbeginn gemessen, um deren Zustand zu diesem Zeitpunkt zu erfassen.

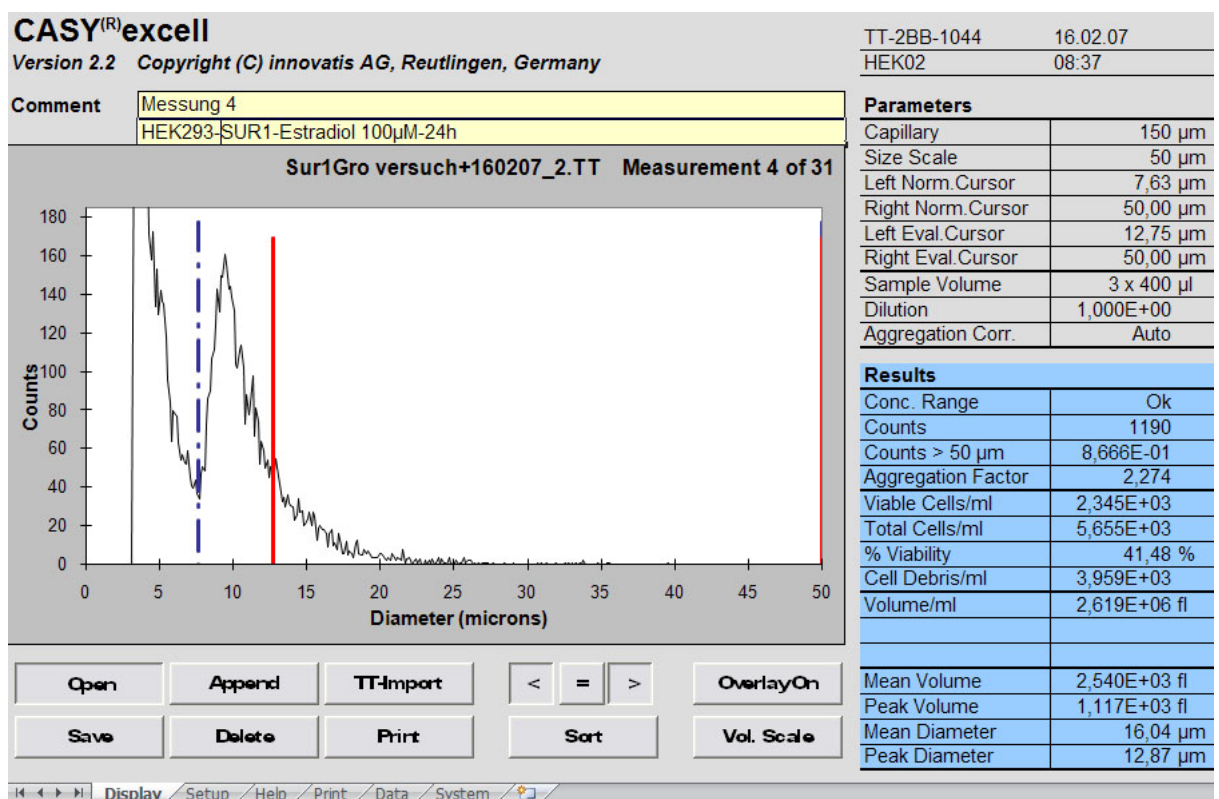


Abbildung 3.1: Beispiel für die Quantifizierung der Zellzahl einer Probe mit dem CASY TT Analyser System

Mit Hilfe des CASY TT Analyser Systems können Parameter wie Volumen, Gesamtzahl und Vitalität suspendierter Zellen gemessen werden. Der Bereich zwischen der blauen und der roten senkrechten Linie, welcher durch die Eichung des Gerätes auf die zu messende Zelllinie (HEK293) festgelegt wurde, erfasst die toten Zellen. Der Bereich rechts der roten Grenzlinie erfasst die lebendigen Zellen.

3.2.2.3 Anfärbung von Zellkernen mit dem Farbstoff Hoechst 33258

Ein charakteristisches Merkmal des apoptotischen Zelltodes ist die Kondensation und Fragmentierung der Zellkerne. Um die Veränderung der Kernmorphologie nach Inkubation mit der zu untersuchenden Substanz bzw. dem entsprechenden Lösungsmittel zu bestimmen, wurden die Zellkerne mit dem Farbstoff Hoechst 33258 angefärbt. Zur Anfärbung der Zellkerne wurden die Zellen in kleineren Petrischalen (35 x 10 mm) kultiviert (siehe Kapitel 3.2.1.5, 3.2.1.6 bzw. 3.2.1.9.1) und pro Ansatz mindestens zwei Schalen mit der zu untersuchenden Substanz bzw. dem entsprechenden Lösungsmittel für einen bestimmten Zeitraum inkubiert (siehe Kapitel 3.2.2.1). Der membrangängige Farbstoff Hoechst 33258 lässt sich nach Bindung an die DNA unter einem Fluoreszenzmikroskop mit einem UV-2A Filtersystem (Anregung: 330-380 nm, Emission: 420 nm) detektieren. Die Zellen wurden mit einem Laborlux D-Fluoreszenzmikroskop analysiert und mit einer digitalen Kamera (CF 20 DXC) fotografiert.

Hoechst 33258-Färbung bei HEK293-, HIT-T15-, RIN-m5F- und A-10-Zellen

Das Medium der behandelten Schalen (35 x 10 mm) wurde abgesaugt, die adhären Zellen wurden mit je 3 ml PBS (Raumtemperatur) gewaschen und für 10 min mit 3 ml einer eiskalten 3 %igen Paraformaldehydlösung (siehe Kapitel 3.1.3.4) auf Eis fixiert. Danach wurden die Schalen für 5 min mit je 3 ml PBS gewaschen, kurz mit Aq. bidest. gespült und sofort mit Druckluft getrocknet. In diesem Zustand konnten die Schalen bis zur Färbung bei Raumtemperatur aufbewahrt werden. Für die Färbung wurden die Schalen erneut mit je 3 ml PBS für 5 min gewaschen und danach mit 500 µl Hoechst 33258-Lösung (siehe Kapitel 3.1.3.5) für 20 min im Dunkeln inkubiert.

Danach wurde die Farbstoff-Lösung mit je 3 ml PBS abgespült und die Zellen wurden erneut mit 3 ml frischem PBS für 5 min gewaschen. Die Schalen wurden mit Aq. bidest. gespült, um das Ausfallen von Kristallsalzen zu vermeiden. Nach vollständigem Absaugen des Wassers wurden die Zellen mit erwärmter Glyceringelatine (37 °C) beschichtet und mit einem Deckglas (Ø 30 mm) bedeckt. Die gefärbten Dauerpräparate wurden lichtgeschützt aufbewahrt, um ein Ausbleichen des Farbstoffs zu verhindern.

Hoechst 33258-Färbung bei Langerhans-Inseln

Die aus Bauchspeicheldrüsen von Mäusen isolierten Langerhans-Inseln aus jeweils einer Schale (vgl. Kapitel 3.2.1.9.1) wurden mit dem Kulturmedium in ein beschriftetes Reaktionsgefäß überführt und bei 1800 g für 5 min zentrifugiert. Nach Absaugen des

Überstands wurde das Pellet mit 1 ml PBS (Raumtemperatur) gewaschen und für 10 min mit 1 ml einer eiskalten 3 %igen Paraformaldehydlösung (siehe Kapitel 3.1.3.4) auf Eis fixiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet wieder mit PBS gewaschen und im Anschluss mit 600 µl Hoechst 33258-Lösung (siehe Kapitel 3.1.3.5) für 20 min im Dunkeln inkubiert. Nach Abzentrifugieren der Farbstofflösung wurde das Pellet wieder mit PBS (1 ml) gewaschen. Nachdem das PBS vorsichtig mit einer Pipette abgesaugt wurde, wurde das Pellet mit ca. 50 µl Ethanol resuspendiert und in die Mitte einer großen Petrischale (94 x 16 mm) überführt. Die Inseln wurden mit erwärmter Glyceringelatine (37 °C) beschichtet und mit einem Deckglas (Ø 50 mm) bedeckt. Mit Hilfe von kleinen Kügelchen aus Knetmasse zwischen Schalenboden und Deckglas wurde verhindert, dass die Inseln durch das Gewicht des Deckglases deformiert wurden. Die gefärbten Dauerpräparate wurden lichtgeschützt aufbewahrt, um ein Ausbleichen des Farbstoffs zu verhindern.

3.2.2.4 Bestimmung der Enzymaktivität verschiedener Caspasen

3.2.2.4.1 Aufarbeitung von HEK293-Zellen für die Bestimmung der Caspase-Aktivität

Nachdem die Schalen mit der zu untersuchenden Substanz bzw. dem entsprechenden Lösungsmittel für einen bestimmten Zeitraum inkubiert wurden (siehe Kapitel 3.2.2.1), wurden die Zellen für die Bestimmung der Aktivität verschiedener Caspasen aufgearbeitet. Hierzu wurden die Zellen einer Schale mit dem Kulturmedium im Überstand abgelöst, in ein 50 ml Falcon Tube überführt und für 6 min bei 500 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend verworfen und das Pellet in 1 ml PBS resuspendiert. Für die Messung der Caspase-Aktivitäten wurden 500 µl dieser Zellsuspension in ein vorgekühltes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 10 min bei 1400 rpm und 4 °C zentrifugiert (Eppendorf 5417R). Nach der Zentrifugation wurde das Zellpellet entweder sofort für die Messung der Enzymaktivität aufgearbeitet oder bei -80 °C eingefroren. Zur weiteren Aufarbeitung wurde das Pellet mit 1 ml Lysispuffer (siehe Kapitel 3.1.3.6) versetzt, gründlich resuspendiert und für 10 min bei 37 °C inkubiert. Während der Inkubation wurde die Probe mit Hilfe eines Vortex-Gerätes regelmäßig gemischt. Im Anschluss wurde die Probe erneut für 10 min einer Zentrifugation bei 13.000 rpm (Eppendorf 5417R) unterzogen. Der Überstand wurde in ein gekühltes Reaktionsgefäß überführt und gründlich gemischt. 100 µl der Probe wurden für die Proteinbestimmung entnommen und in ein weiteres gekühltes Reaktionsgefäß überführt. Der restliche Überstand wurde umgehend für die Messung der Caspase-Aktivitäten eingesetzt oder bis zur Messung bei -80 °C aufbewahrt.

3.2.2.4.2 Messung der Enzymaktivitäten von Caspase-3, -8 und -9

Caspasen besitzen die Eigenschaft bestimmte Peptidsequenzen spezifisch zu spalten. Für die Quantifizierung der Aktivität verschiedener Caspase-Enzyme wird an diese kurzen Peptide (Caspase-3: DEVD, Caspase-8: IETD; Caspase-9: LEHD) eine 7-Amino-4-Trifluoromethyl-Coumarin-Gruppe gekoppelt, welche nach proteolytischer Abspaltung durch die entsprechende Caspase Fluoreszenz zeigt. Der Enzymaktivitätsbestimmung liegt das Prinzip einer photometrischen Fluoreszenzmessung zugrunde. Obwohl die Caspase-Enzyme hochspezifisch arbeiten, kann nicht ausgeschlossen werden, dass andere Enzyme mit niedrigerer Substrataffinität auch Spaltungen der eingesetzten Peptide vornehmen. Deshalb wird mit dieser Methode genau genommen die Aktivität Caspase-3-, Caspase-8-, bzw. Caspase-9-ähnlicher-Enzyme gemessen.

Die Caspase-Substrate wurden als 10 mM Stammlösung in DMSO bei -20 °C gelagert und unmittelbar vor Gebrauch lichtgeschützt aufgetaut. Für die Messung wurden die Substrate zunächst so mit Lysispuffer (siehe Kapitel 3.1.3.6) verdünnt („Substrat-Mix“), wie es Tabelle 3.6 zu entnehmen ist. Nach Zugabe der zu untersuchenden Probe konnte die Messung der Enzymaktivität durchgeführt werden. Konzentrationen und Volumina der entsprechenden Substrate und Proben sind Tabelle 3.6 zu entnehmen.

Tabelle 3.6: Aktivitätsbestimmung der Caspasen-3, -8 und -9

In dieser Tabelle sind das Verdünnungsverhältnis der verschiedenen Substrate und Lysispuffer (Substrat-Mix), sowie die Volumina von Substrat-Mix und Probe bzw. Lysispuffer (Leerwert) pro Ansatz dargestellt. AFC = 7-Amino-4-Trifluoromethyl-Coumarin, Ac-DEVD-AFC = N-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-AFC, Ac-IETD-AFC = N-acetyl-Ile-Glu-Thr-Asp-AFC, Ac-LEHD-AFC = N-acetyl-Leu-Glu-His-Asp-AFC

Caspase	Substrat	Verdünnungsverhältnis von Substrat und Lysispuffer im Substrat-Mix	Substrat-Mix-Volumen pro Ansatz	Proben- bzw. Lysispuffervolumen pro Ansatz
3	Ac-DEVD-AFC	1:200	50 µl	50 µl
8	Ac-IETD-AFC	1:50	25 µl	75 µl
9	Ac-LEHD-AFC	1:10	10 µl	90 µl

Die Aktivitätsmessungen der verschiedenen Caspasen (3, 8 und 9) erfolgte in einem Wallac-Fluorometer unter folgenden Messbedingungen: Messung bei Raumtemperatur; Anregung: 390 nm; Emission: 510 nm; je 8 Doppelmessungen im Abstand von 20 min; Messzeit: je 2 sec;

Um die unspezifische Fluoreszenz zu ermitteln, wurde außerdem ein Leerwert bestimmt, bei dem anstatt der Probe dasselbe Volumen an Lysispuffer zu dem entsprechenden Substrat-Mix

in die Mikrotiterplatte pipettiert wurde. Dieser Leerwert wurde bei der Auswertung von den jeweiligen Messwerten subtrahiert. Aus den resultierenden Werten wurde der Anstieg der Fluoreszenz zwischen 20 und 160 min in einem zeitlichen Messabstand von 20 min ermittelt. Der Steigungswert wurde auf den Proteingehalt der Probe in der Mikrotiterplatte bezogen (Steigung/Proteinmenge).

3.2.2.4.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Bei der Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976) handelt es sich um eine photometrische Methode zur Quantifizierung von Proteinen. Die Messung beruht auf der differentiellen Farbänderung des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G-250 in Gegenwart verschiedener Protein-Konzentrationen. Der Farbstoff bindet primär an basische und aromatische Aminosäuren, vor allem an Arginin. Das Absorptionsmaximum einer sauren Lösung des Farbstoffs verschiebt sich bei der Bindung an Proteine von 465 nm auf 595 nm. Durch Messung der Absorption bei dieser Wellenlänge (595 nm) kann die Konzentration einer Proteinlösung bestimmt werden. Voraussetzung hierfür ist, dass das für die Eichung verwendete und das zu quantifizierende Protein einen annähernd gleichen Gehalt an basischen Aminosäuren haben. Rinder-Serum-Albumin (BSA) eignet sich aus diesem Grund gut als Standard für die Eichung. Der Extinktionskoeffizient des Farbstoff-Protein-Komplexes bleibt dabei über einen 10-fachen Konzentrationsbereich konstant.

Tabelle 3.7: Herstellung der BSA-Standard-Lösungen zur Erstellung einer Eichgeraden

Zur Erstellung einer Eichgeraden wurden Standardlösungen mit unterschiedlichen Protein-Konzentrationen aus einer BSA-Stammlösung (5 mg/ml in Aq. bidest.) durch entsprechende Verdünnung mit Aq. bidest. und Lysispuffer hergestellt.

Konzentration des BSA-Standards [$\mu\text{g/ml}$]	eingesetzte Menge an BSA (5 mg/ml) [μl]	eingesetzte Menge an Aq. bidest [μl]	eingesetzte Menge an Lysispuffer [μl]
0	0	900	100
25	5	895	100
50	10	890	100
75	15	885	100
100	20	880	100
125	25	875	100
150	30	870	100
200	40	860	100

Tabelle 3.8: Proteinbestimmung nach Bradford

Je 50 µl der verdünnten Probe, des verdünnten Lysispuffers (Leerwert) bzw. je 50 µl der Standardprotein-Lösungen wurden mit 450 µl des verdünnten Farbreagenzes versetzt, gründlich gemischt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

BSA-Standard	50 µl Standardprotein-Lösung	+ Farbreagenz: 375 µm Aq. bidest. + 75 µm Bio-Rad-Lösung
Leerwert	45 µl Aq. bidest. + 5 µl Lysispuffer	
Probe	45 µl Aq. bidest. + 5 µl Zelllysat	

Zur Erstellung einer Eichgeraden wurden Standardlösungen mit unterschiedlichen Protein-Konzentrationen aus einer BSA-Stammlösung (5 mg/ml in Aq. bidest.) hergestellt. Dies erfolgte durch entsprechende Verdünnung dieser Stammlösung mit Aq. bidest. und Lysispuffer (siehe Tabelle 3.7). Die Lagerung der Proteinlösungen erfolgte bei -20 °C.

A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
200 µl Aq. bidest.	200 µl Aq. bidest.	200 µl Stand. 0 µg/ml	200 µl Stand. 0 µg/ml	200 µl Stand. 25 µg/ml	200 µl Stand. 25 µg/ml	200 µl Stand. 50 µg/ml	200 µl Stand. 50 µg/ml	200 µl Stand. 75 µg/ml	200 µl Stand. 75 µg/ml	200 µl Stand. 100 µg/ml	200 µl Stand. 100 µg/ml
Wert 1	Wert 2	Wert 1	Wert 2	Wert 1	Wert 2	Wert 1	Wert 2	Wert 1	Wert 2	Wert 1	Wert 2
B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12
200 µl Stand. 125 µg/ml	200 µl Stand. 125 µg/ml	200 µl Stand. 150 µg/ml	200 µl Stand. 150 µg/ml	200 µl Stand. 200 µg/ml	200 µl Stand. 200 µg/ml	200 µl Probe 1	200 µl Probe 1	200 µl Probe 1	200 µl Probe 1	200 µl Probe 1	200 µl Probe 1
Wert 1	Wert 2	Wert 1	Wert 2	Wert 1	Wert 2	Wert 1	Wert 1	Wert 2	Wert 2	Wert 3	Wert 3
C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	Cx	Cx+1	Cx+2	Cx+3
200 µl Probe 2	200 µl Probe 2	200 µl Probe 2	200 µl Probe 2	200 µl Probe 2	200 µl Probe 2	200 µl LW	200 µl LW	200 µl LW	200 µl LW
Wert 1	Wert 1	Wert 2	Wert 2	Wert 3	Wert 3			Wert 1	Wert 1	Wert 2	Wert 2

Abbildung 3.2: Pipettierschema einer Mikrotiterplatte zur Messung der Protein-Konzentration der Proben

Pro Well wurde ein Volumen von 200 µl pipettiert: A1-A2: Aq. bidest., A3-B6: Proteinstandards (Stand.), verschiedene Konzentrationen, ab B7: zu messende Probe(n) und im Anschluss der Leerwert (LW).

Wie Tabelle 3.8 zu entnehmen ist, wurden die Zellysate (siehe Kapitel 3.2.2.4.1) bzw. der Lysispuffer (Leerwert) zunächst 1:10 mit Aq. bidest. verdünnt. Je 50 µl der verdünnten Probe, des verdünnten Lysispuffers bzw. je 50 µl der verschiedenen Proteinstandards wurden mit 450 µl des verdünnten Farbreagenzes (Bio-Rad) versetzt, gründlich gemischt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert (siehe Tabelle 3.8). Für jede Probe wurden drei Ansätze pipettiert.

Noch vor Ablauf der Inkubationszeit wurden je 200 µl der Ansätze in eine Mikrotiterplatte überführt (siehe Abbildung 3.2). Nach 30 min erfolgte die Messung der Protein-Konzentration pro Vertiefung der Mikrotiterplatte im Spectrophotometer (Dynatech) bei 630 nm. Anhand der resultierenden Eichgeraden wurde die Protein-Konzentration der Probe ermittelt.

3.2.2.5 Statistik

Die gezeigten Daten sind Mittelwerte aus einzelnen Experimenten \pm SEM. Die statistischen Auswertungen wurden mittels Prism 4 Software (GraphPad Software, San Diego, USA) durchgeführt. Je nach Fragestellung wurden der „two-tailed Student's unpaired t-test“ bzw. „two-tailed Student's paired t-test“ oder eine „one-way ANOVA-Analyse“ in Kombination mit dem „Tukey's post hoc test“ angewendet.

4 Ergebnisse

4.1 Bestimmung unterschiedlicher apoptotischer Parameter nach Behandlung verschiedener Zellen mit 17 β -Estradiol

4.1.1 Wirkung von 17 β -Estradiol auf HEK293-Zellen, welche den Sulfonylharnstoffrezeptor (SUR) 1 exprimieren

Um apoptotische Effekte von 17 β -Estradiol in Abhängigkeit von der Expression von SUR1 zu untersuchen, wurden rekombinante HEK293-Zellen mit 100 μ M 17 β -Estradiol bzw. dem entsprechenden Lösungsmittel DMSO/Ethanol für einen Zeitraum von 24 h inkubiert (siehe Kapitel 3.2.2.1). Hierzu wurden Zellen verwendet, welche entweder mit cDNA, welche für SUR1 codiert und in den Expressionsvektor inseriert ist (SUR1-Zellen) oder mit leerem pcDNA-Expressionsvektor (pcDNA-Kontrollzellen) stabil transfiziert worden waren. Die relativ hohe 17 β -Estradiol-Konzentration von 100 μ M wurde zunächst gewählt, um die Ergebnisse mit vorherigen Daten (Hambrock et al., 2006 und 2007) besser vergleichen zu können, um klare Effekte nach möglichst kurzer Behandlungsdauer zu sehen, sowie unerwünschte Faktoren wie Zellalterung, Nährstoffmangel oder die Anreicherung toxischer Metabolite zu vermeiden.

Nach der Inkubationszeit wurden verschiedene apoptotischer Parameter, wie die Zellablösung vom Kulturschalenboden (siehe Kapitel 3.2.2.2), die apoptotischen Veränderungen in der Kernmorphologie (siehe 3.2.2.3) und die Aktivität verschiedener Caspasen (siehe Kapitel 3.2.2.4) quantifiziert (Tabelle 4.1). Es konnte eine deutliche Korrelation zwischen den verschiedenen apoptotischen Parametern (siehe Abbildung 4.1) gemessen werden.

Wie in Abbildung 4.1A zu sehen ist, lösten sich nach Behandlung mit 17 β -Estradiol hochsignifikant mehr von den Zellen aus dem Zellverband ab, welche SUR1 exprimierten, als pcDNA-Kontrollzellen. Außerdem wurde ein signifikanter Unterschied zwischen den mit 17 β -Estradiol behandelten Zellen und den entsprechenden mit Lösungsmittel behandelten Zellen gemessen. Zwischen den mit Lösungsmittel behandelten pcDNA- und SUR1-Zellen, deren Morphologie vergleichbar mit derer zu Versuchsbeginn war, gab es hingegen keinen signifikanten Unterschied.

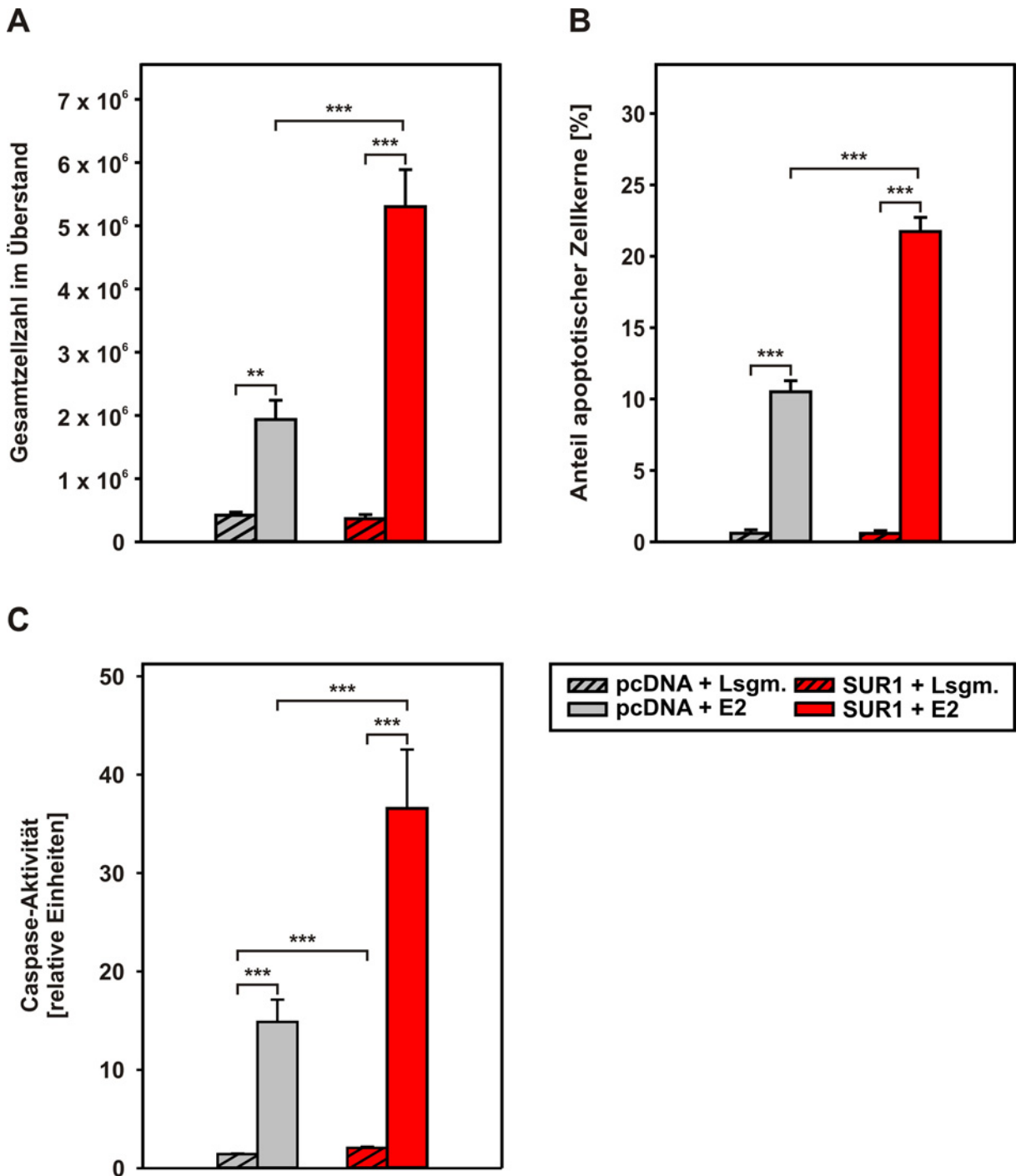


Abbildung 4.1: Wirkung von 17β-Estradiol auf HEK293-Zellen, welche SUR1 exprimieren

Nach 24-stündiger Inkubation von HEK293-Zellen, welche SUR1 exprimieren (SUR1), und pcDNA-Kontrollzellen mit 100 μM 17β-Estradiol (E2) bzw. Lösungsmittel (Lsgm.), wurden die Zellablösung vom Schalenboden (A), die Veränderung der Kernmorphologie (B) sowie die Aktivität Caspase-3-ähnlicher Enzyme (C) quantifiziert. Der prozentuale Anteil apoptotisch veränderter Zellkerne wurde bestimmt, indem die Zellkerne mit dem Farbstoff Hoechst 33258 angefärbt und ca. 1300-2300 Kerne aus verschiedenen Aufarbeitungen pro Behandlungsgruppe ausgezählt wurden. Die Zellablösung wurde in 5 Versuchsreihen bestimmt, für die Quantifizierung der Caspase-Aktivität (Steigung der Fluoreszenz pro Minute, bezogen auf die Protein-Konzentration der Probe) wurden insgesamt 9 Versuchsreihen durchgeführt. **, p < 0,01; ***, p < 0,001.

Um apoptotische Veränderungen in der Kernmorphologie nach Behandlung mit 17 β -Estradiol bzw. DMSO/Ethanol zu bestimmen, wurden die Zellkerne mit Hilfe des Farbstoffs Hoechst 33258 angefärbt. Die Gesamtkernzahl sowie der prozentuale Anteil apoptotisch veränderter Zellkerne wurde quantifiziert, indem ca. 100-150 zufällig gewählte Teilflächen (50 x 50 μm^2) aus verschiedenen Aufarbeitungen pro Behandlungsgruppe ausgezählt wurden.

Die Behandlung mit 17 β -Estradiol führte zu einem hochsignifikant stärkeren Anteil apoptotisch veränderter Zellkerne in Zellen, welche SUR1 exprimierten, als in pcDNA-Kontrollzellen (Abbildung 4.1B). Außerdem konnten jeweils signifikante Unterschiede zwischen den mit 17 β -Estradiol und den entsprechenden mit Lösungsmittel behandelten Ansätzen gemessen werden. Die Behandlung mit Lösungsmittel jedoch führte wiederum zu keiner verstärkten Kondensation und Fragmentierung der Zellkerne, verglichen mit Zellen vor Versuchsbeginn.

Auch die Aktivität (Steigung der Fluoreszenz pro Minute, bezogen auf die Proteinkonzentration der Probe) der Caspase-3-ähnlichen-Enzyme war nach Behandlung mit 17 β -Estradiol in Zellen, welche SUR1 exprimierten, hochsignifikant höher als in pcDNA-Kontrollzellen (Abbildung 4.1C). Auch bezüglich der Caspase-Aktivität konnten signifikante Unterschiede zwischen den jeweils mit 17 β -Estradiol und den entsprechenden mit Lösungsmittel behandelten Zellen gemessen werden.

Tabelle 4.1: Wirkung von 17 β -Estradiol auf HEK293-Zellen, welche SUR1 exprimieren

Nach 24-stündiger Inkubation von HEK293-Zellen, welche SUR1 exprimieren (SUR1), und pcDNA-Kontrollzellen mit 100 μM 17 β -Estradiol (E2) bzw. Lösungsmittel (Lsgm.), wurden die Gesamtzellzahl im Überstand, der Anteil apoptotisch veränderter Zellkerne sowie die Aktivität Caspase-3-ähnlicher Enzyme quantifiziert.

	Gesamtzellzahl im Überstand [$\times 10^3$]	Anteil apoptotisch veränderter Zellkerne [%]	Caspase-Aktivität [relative Einheiten]
pcDNA + Lsgm.	421,4 \pm 47,5	0,6 \pm 0,3	1,4 \pm 0,1
pcDNA + E2	1935 \pm 303,8	10,5 \pm 0,8	14,9 \pm 2,3
SUR1 + Lsgm.	365,2 \pm 66,2	0,6 \pm 0,2	2,1 \pm 0,1
SUR1 + E2	5301,0 \pm 585,8	21,7 \pm 1,0	36,6 \pm 6,0

4.1.1.1 Einfluss der Co-Expression von SUR1 und der porenbildenden K_{ATP} -Kanal-Untereinheit Kir6.2 auf die Zellablösung nach Behandlung mit 17β -Estradiol

Wie in Kapitel 1.1.1 beschrieben wurde, setzen sich funktionstüchtige K_{ATP} -Kanäle pankreatischer β -Zellen aus den regulatorischen SUR1-Untereinheiten sowie den porenbildenden Kir6.2-Untereinheiten zusammen.

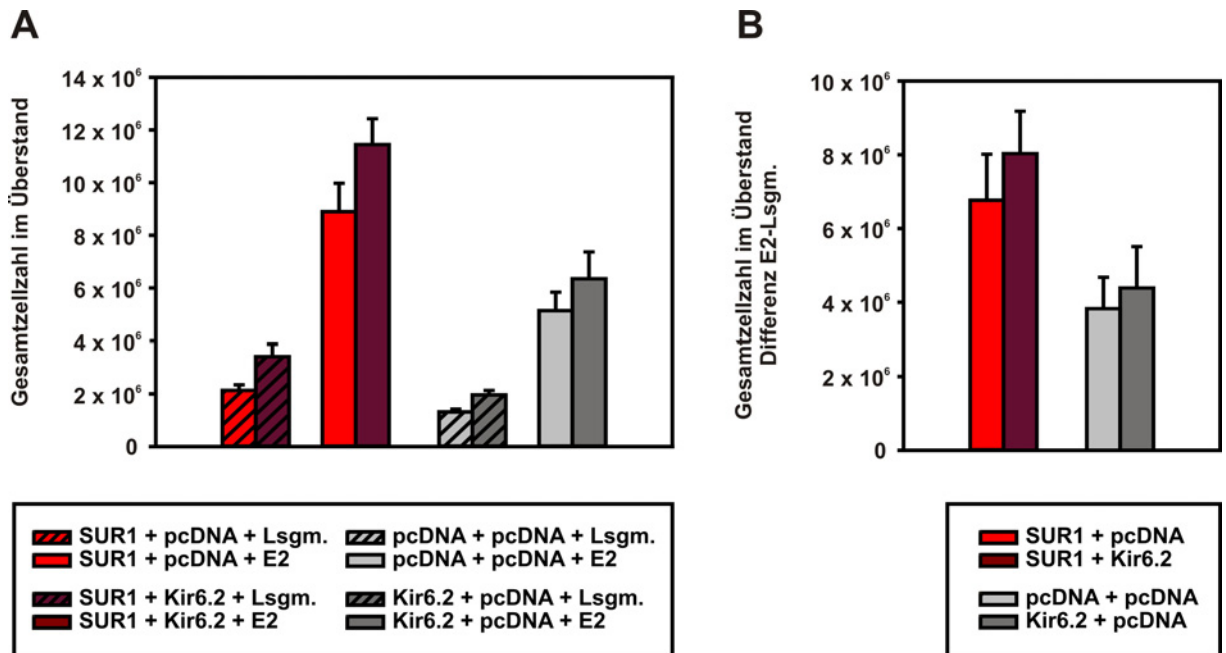


Abbildung 4.2: Einfluss der Co-Expression von SUR1 und Kir6.2 auf die Zellablösung vom Schalenboden nach 17β -Estradiol-Behandlung

HEK293-Zellen wurden transient mit pcDNA3.1-Expressionsvektoren transfiziert, welche cDNAs von SUR1 und/oder Kir6.2 enthielten. Außerdem wurde zur Kontrolle auch leerer pcDNA3.1-Expressionsvektor eingesetzt. 24 h nach Beginn der Transfektion wurden die Zellen mit $100 \mu\text{M}$ 17β -Estradiol (E2) bzw. Lösungsmittel (Lsgm.) für einen Zeitraum von 24 h inkubiert und dann die Zellzahl im Überstand bestimmt (A). Da die verschiedenen Transfektionsansätze nach Inkubation mit Lsgm. jedoch bei den verschiedenen Versuchsreihen bereits gewisse Schwankungen bezüglich der Ablöserate aufwiesen, wurde der jeweilige Hintergrund, d.h. die Zahl der abgelösten Zellen nach Behandlung mit Lsgm. von der Zahl abgelöster Zellen nach Behandlung mit E2 subtrahiert (B). Hierbei ergeben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Ansätzen. Es wurden 5 parallele Versuchsreihen durchgeführt. SUR1 + pcDNA: Lsgm. vs. E2, $p < 0,001$; SUR1 + Kir6.2: Lsgm. vs. E2, $p < 0,001$; pcDNA + pcDNA: Lsgm. vs. E2, $p < 0,01$; Kir6.2 + pcDNA: Lsgm. vs. E2, $p < 0,01$; Lsgm: SUR1 + pcDNA vs. SUR1 + Kir6.2, SUR1 + Kir6.2 vs. Kir6.2 + pcDNA, SUR1 + Kir6.2 vs. pcDNA + pcDNA, $p < 0,05$; E2: SUR1 + Kir6.2 vs. Kir6.2 + pcDNA, SUR1 + Kir6.2 vs. pcDNA + pcDNA, $p < 0,05$ (A).

Um zu überprüfen, ob Kir6.2 bei der durch den Sulfonylharnstoffrezeptor vermittelten Apoptose ebenfalls eine wichtige Rolle spielt, wurden Versuche mit co-transfizierten HEK293-Zellen durchgeführt. HEK293-Zellen wurden transient mit pcDNA3.1-Expressionsvektoren transfiziert, welche cDNAs von SUR1 und/oder Kir6.2 enthielten. Außerdem wurde zur Kontrolle auch leerer pcDNA3.1-Expressionsvektor in entsprechenden Mengen eingesetzt (siehe Kapitel 3.2.1.3). So wurden die Ansätze SUR1 + pcDNA, SUR1 + Kir6.2 sowie

pcDNA + pcDNA und Kir6.2 + pcDNA untersucht. 24 h nach Beginn der Transfektion wurden die Zellen mit 100 μM 17 β -Estradiol bzw. dem Lösungsmittel DMSO/Ethanol für einen Zeitraum von 24 h inkubiert und dann die Zellzahl im Überstand gemessen (Abbildung 4.2 und Tabelle 4.2). Hierbei wurden jeweils signifikante Unterschiede zwischen den mit 17 β -Estradiol und den entsprechenden mit Lösungsmittel behandelten Ansätzen gemessen. Auch bei der transienten Transfektion wurde ein deutlicher Unterschied zwischen Zellen, welche SUR1 exprimierten, und pcDNA-Kontrollzellen nachgewiesen. Dies bestätigt die Ergebnisse der Experimente mit stabil transfizierten Zellen (siehe Kapitel 4.1.1).

Tabelle 4.2: Einfluss der Co-Expression von SUR1 und Kir6.2 auf die Zellablösung nach Behandlung mit 17 β -Estradiol

HEK293-Zellen wurden transient mit pcDNA3.1-Expressionsvektoren transfiziert, welche cDNAs von SUR1 und/oder Kir6.2 enthielten. Außerdem wurde zur Kontrolle auch leerer pcDNA3.1-Expressionsvektor eingesetzt. 24 h nach Beginn der Transfektion wurden die Zellen mit 100 μM 17 β -Estradiol (E2) bzw. Lösungsmittel (Lsgm.) für einen Zeitraum von 24 h inkubiert und dann die Zellzahl im Überstand bestimmt.

	Gesamtzellzahl im Überstand [$\times 10^3$]	Gesamtzellzahl im Überstand Differenz E2-Lsgm.
SUR1 + pcDNA + Lsgm.	2130,8 \pm 212,7	6764,9 \pm 1204,2
SUR1 + pcDNA + E2	8895,7 \pm 1077,5	
SUR1 + Kir6.2 + Lsgm.	3410,7 \pm 467,9	8030,9 \pm 1146,7
SUR1 + Kir6.2 + E2	11441,6 \pm 986,2	
pcDNA + pcDNA + Lsgm.	1313,5 \pm 109,9	3822,9 \pm 852,6
pcDNA + pcDNA + E2	5136,5 \pm 700,3	
Kir6.2 + pcDNA + Lsgm.	1960,0 \pm 168,2	4384,2 \pm 1121,9
Kir6.2 + pcDNA + E2	6344,3 \pm 1023,7	

Da die verschiedenen Transfektionsansätze nach Inkubation mit dem Lösungsmittel jedoch bei den verschiedenen Versuchsreihen bereits gewisse Schwankungen bezüglich der gemessenen Ablöserate aufwiesen (Abbildung 4.2A), war es schwierig, einen direkten Vergleich der einzelnen Versuchsansätze anzustellen. Bei den Experimenten mit transient transfizierten HEK293-Zellen wurden insgesamt größere Schwankungen bezüglich der Zellablösung gemessen als bei Experimenten mit stabil transfizierten HEK293-Zellen. Dies könnte u.a. durch die gewisse Toxizität des Lipofectamins begründet sein. Um den spezifischen Effekt von 17 β -Estradiol zu ermitteln, wurde deshalb der jeweilige Hintergrund,

d.h. die Zahl der Zellen, die bereits nach Behandlung mit Lösungsmittel abgelöst waren, von der Zahl abgelöster Zellen nach Behandlung mit 17β -Estradiol subtrahiert (Abbildung 4.2B). Beide Arten der Auswertung ergaben, dass der für den SUR1 spezifische Effekt von 17β -Estradiol durch die Co-Expression mit Kir6.2 nur geringfügig verstärkt wurde. Auch die Zellablösung bei pcDNA-exprimierenden HEK293-Zellen wurde durch die Coexpression mit Kir6.2. kaum beeinflusst.

4.1.2 Wirkung von 17β -Estradiol auf HEK293-Zellen, welche den SUR1 exprimieren, im Vergleich zu anderen Substanzen

In vorherigen Arbeiten der Arbeitsgruppe (Hambrock et al., 2006 und 2007) konnte bereits nachgewiesen werden, dass die K_{ATP} -Kanal-Blocker Glibenclamid und Resveratrol in einer für den Sulfonylharnstoffrezeptor (SUR) 1 spezifischen Weise Apoptose induzieren können. Im Gegensatz dazu konnte für den klassischen Apoptose-Induktor Etoposid, welcher unter anderem auch Einsatz in der Chemotherapie findet, keine SUR1-Abhängigkeit in der Induktion von Apoptose gemessen werden.

Für 17β -Estradiol wurden neben seiner strukturellen Ähnlichkeit zu dem „Phytoestrogen“ Resveratrol auch verschiedene funktionelle Gemeinsamkeiten mit dieser Substanz nachgewiesen. So ist auch 17β -Estradiol in der Lage als K_{ATP} -Kanal-Blocker zu wirken und unter bestimmten Bedingungen Apoptose zu induzieren. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit die apoptotische Wirksamkeit von 17β -Estradiol genauer untersucht.

Es wurden ergänzend weitere Substanzen, welche strukturelle und/oder funktionelle Analogien zu den oben genannten Verbindungen zeigen, bezüglich ihrer Fähigkeit eine für den SUR1 spezifische Apoptose auszulösen, untersucht (Abbildung 4.3 und Tabelle 4.3). Hierzu wurden HEK293-Zellen, welche stabil mit cDNA von SUR1 (SUR1-Zellen) bzw. leerem pcDNA-Expressionsvektor (pcDNA-Zellen) transfiziert waren, mit je $100\ \mu\text{M}$ Substanz bzw. dem entsprechenden Lösungsmittel für 24 h, 48 h bzw. 96 h inkubiert. Anschließend wurde die Gesamtzellzahl im Überstand der Kulturschale quantifiziert.

Nach Behandlung mit 17β -Estradiol (24 h) kam es zu einer für den SUR1 spezifischen Induktion von Apoptose, wobei das Ausmaß der durch 17β -Estradiol vermittelten Apoptose deutlich stärker ausgeprägt war als bei Resveratrol (3-fach) oder Glibenclamid ($> 4,5$ -fach); hierbei ist außerdem die deutliche längere Inkubationszeit (48 h) von Glibenclamid zu beachten.

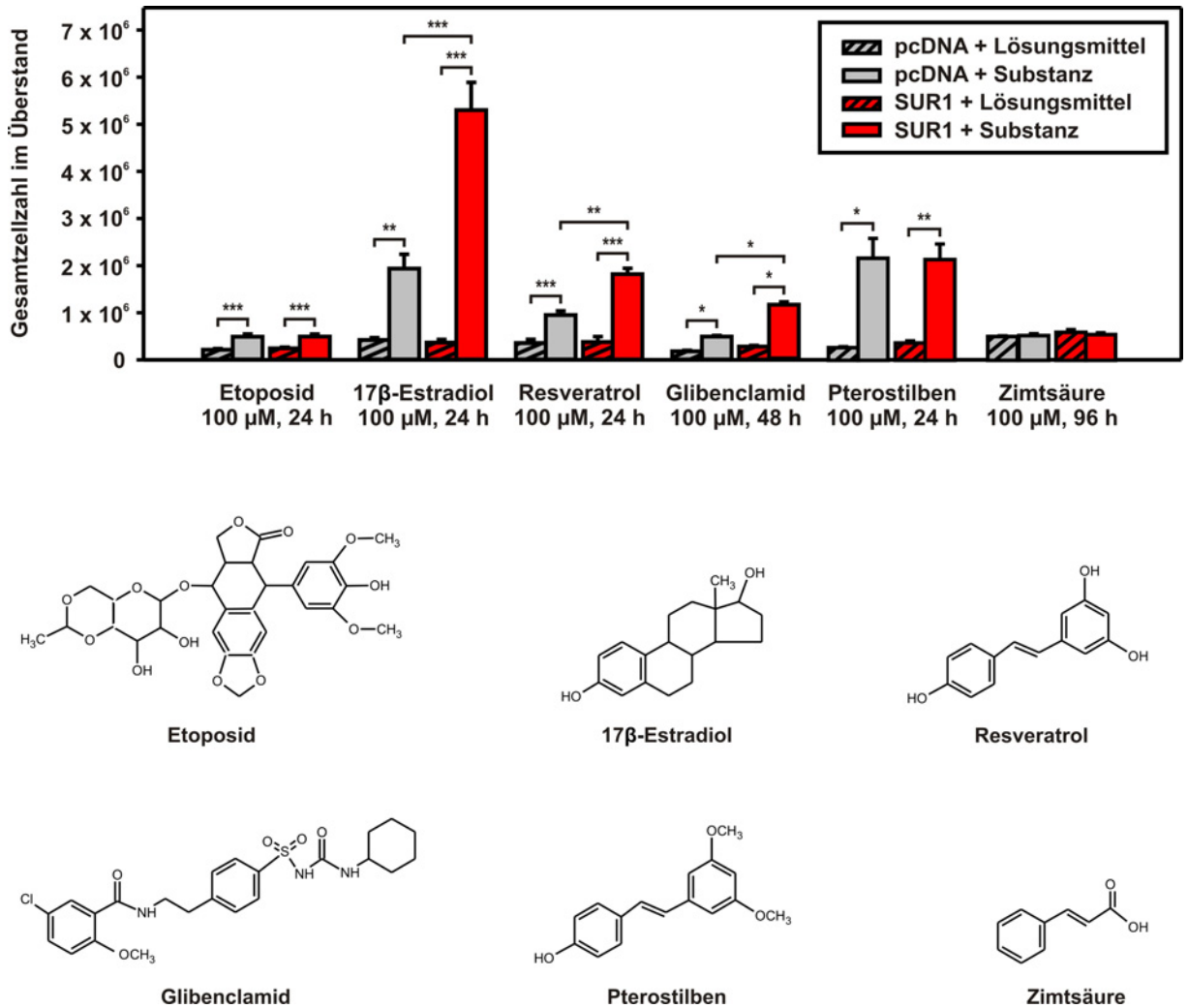


Abbildung 4.3: Wirkung von 17β-Estradiol auf HEK293-Zellen, welche SUR1 exprimieren, im Vergleich zu anderen Substanzen

HEK293-Zellen, welche SUR1 exprimieren (SUR1), bzw. mit leeren pcDNA-Expressionsvektor transfizierte Kontrollzellen (pcDNA) wurden mit verschiedenen Substanzen für die jeweils angegebene Zeitdauer inkubiert. Anschließend wurde das Ausmaß der Zellablösung über die Bestimmung der Gesamtzellzahl im Überstand der Kulturschale quantifiziert. Als Lösungsmittel wurde entweder Ethanol (Resveratrol), DMSO (Etoposid, Pterostilben und Zimtsäure) oder ein Ethanol/DMSO (1:1)-Gemisch (Glibenclamid, 17β-Estradiol) eingesetzt. Bei den gezeigten Daten handelt es sich um Mittelwerte aus 3-6 Versuchsreihen. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

Im Gegensatz zu diesen, für den SUR1 spezifischen apoptotischen Effekten von Glibenclamid, Resveratrol und 17β-Estradiol, konnte für den klassischen Apoptose-Induktor Etoposid keine SUR-abhängige Induktion von Apoptose gemessen werden.

Sowohl die Behandlung mit Pterostilben (Methylierung der beiden bei Resveratrol vorhandenen OH-Substituenten des zweiten aromatischen Ringes) als auch mit Zimtsäure (Fehlen des zweiten bei Resveratrol vorhandenen aromatischen Ringes) führten nicht zur Auslösung einer für den SUR1 spezifischen Apoptose. Pterostilben induzierte nach 24 h zwar eine generell verstärkte Zellablösung, allerdings konnten keine spezifischen Unterschiede

zwischen SUR1- und pcDNA-Zellen gemessen werden. Zwar ist Zimtsäure laut Castelli et al. (1999) in der Lage durch die Plasmamembran zu gelangen, dennoch konnte nach Zugabe dieser Substanz auch nach einer längeren Inkubationsdauer von 96 h keine Zunahme der Zellablösung im Vergleich zur Lösungsmittel-Kontrolle gemessen werden.

Tabelle 4.3: Wirkung von 17 β -Estradiol auf HEK293-Zellen, welche SUR1 exprimieren, im Vergleich zu anderen Substanzen

HEK293-Zellen, welche SUR1 exprimieren (SUR1), bzw. mit leeren pcDNA-Expressionsvektor transfizierte Kontrollzellen (pcDNA) wurden mit verschiedenen Substanzen (je 100 μ M) bzw. mit dem entsprechenden Lösungsmittel (Lsgm.) für die jeweils angegebene Zeitdauer inkubiert. Anschließend wurde das Ausmaß der Zellablösung quantifiziert.

	Gesamtzellzahl im Überstand [$\times 10^3$]			
	pcDNA + Lsgm.	pcDNA + Substanz	SUR1 + Lsgm.	SUR1 + Substanz
Etoposid (24 h)	215,7 \pm 21,4	490,2 \pm 57,6	243,2 \pm 22,9	492,9 \pm 51,8
17 β -Estradiol (24 h)	421,0 \pm 47,5	1935,5 \pm 303,8	365,2 \pm 66,2	5301,0 \pm 585,8
Resveratrol (24 h)	354,8 \pm 77,94	951,2 \pm 85,0	378,0 \pm 114,5	1819,8 \pm 120,6
Glibenclamid (48 h)	180,8 \pm 19,2	492,9 \pm 22,7	281,5 \pm 22,27	1147,8 \pm 58,1
Pterostilben (24 h)	270,8 \pm 16,2	2117,4 \pm 411,5	362,2 \pm 38,5	2088,9 \pm 322,3
Zimtsäure (96 h)	497,2 \pm 14,7	517,3 \pm 38,0	584,6 \pm 56,1	537,5 \pm 71,1

4.1.2.1 Vergleich der Wirkung von 17 β -Estradiol und Estron auf HEK293-Zellen, welche den SUR1 exprimieren

Neben der Wirkung von 17 β -Estradiol wurde untersucht, wie sich ein weiteres endogen vorkommendes Estrogen, das Estron, bezüglich einer für den SUR1 spezifischen Induktion von Apoptose verhält.

Tabelle 4.4: Wirkung von 17 β -Estradiol auf HEK293-Zellen, welche SUR1 exprimieren, im Vergleich zu Estron

HEK293-Zellen, welche SUR1 exprimieren (SUR1), bzw. mit leerem pcDNA-Expressionsvektor transfizierte Kontrollzellen (pcDNA) wurden mit je 100 μ M 17 β -Estradiol (E2) bzw. Estron (E1) sowie mit Lösungsmittel (Lsgm.) für 24 h inkubiert. Anschließend wurden verschiedene apoptotische Parameter quantifiziert.

A: Gesamtzellzahl im Überstand

Versuchsansatz	Gesamtzellzahl im Überstand [$\times 10^3$]
pcDNA + Lsgm.	464,3 \pm 44,2
pcDNA + E1	578,5 \pm 67,6
pcDNA + E2	3216,3 \pm 340,9
SUR1 + Lsgm.	475,4 \pm 23,6
SUR1 + E1	931,6 \pm 44,1
SUR1 + E2	6104,9 \pm 589,8

B: Prozentualer Anteil apoptotisch veränderter Zellkerne

Substanz	Versuchsansatz	Anteil apoptotisch veränderter Zellkerne [%]
E1	pcDNA + Lsgm.	1,4 \pm 0,3
	pcDNA + Substanz	1,5 \pm 0,4
	SUR1 + Lsgm.	1,5 \pm 0,3
	SUR1 + Substanz	2,9 \pm 0,5
E2	pcDNA + Lsgm.	0,6 \pm 0,3
	pcDNA + Substanz	10,5 \pm 0,8
	SUR1 + Lsgm.	0,6 \pm 0,2
	SUR1 + Substanz	21,7 \pm 1,0

Estron unterscheidet sich strukturell von 17 β -Estradiol ausschließlich darin, dass am Kohlenstoffatom an Position 17 anstatt einer Hydroxylgruppe eine Carbonylgruppe vorhanden ist (Abbildung 4.4).

Auch in diesen Experimenten wurden HEK293-Zellen, welche SUR1 exprimierten (SUR1), bzw. mit leerem pcDNA-Expressionsvektor (pcDNA) transfizierte Kontrollzellen für 24 h mit je 100 μ M 17 β -Estradiol oder Estron bzw. dem Lösungsmittel DMSO/Ethanol inkubiert.

Im Anschluss wurde das Ausmaß der Zellablösung über die Bestimmung der Gesamtzellzahl im Überstand vorgenommen (Abbildung 4.5A und Tabelle 4.4). Um auch apoptotische Veränderungen in der Kernmorphologie nach Behandlung mit den Estrogenen zu bestimmen, wurden die Zellkerne mit Hilfe des Farbstoffs Hoechst 33258 angefärbt (Abbildung 4.5C). Die Gesamtkernzahl sowie der prozentuale Anteil apoptotisch veränderter Zellkerne wurden quantifiziert, indem ca. 100-150 zufällig gewählte Teilflächen (50 x 50 μ m²) aus verschiedenen Aufarbeitungen pro Behandlungsgruppe ausgezählt wurden (Abbildung 4.5B und Tabelle 4.4).

Zwar konnte für beide Estrogene eine für den SUR1 spezifische Induktion von Apoptose nachgewiesen werden, das Ausmaß nach Behandlung mit 17 β -Estradiol war allerdings um den Faktor 5,5 stärker als nach Inkubation mit Estron. Demnach ist die oben genannte Hydroxylgruppe bei der für den SUR1 spezifischen Induktion von Apoptose von großer Bedeutung.

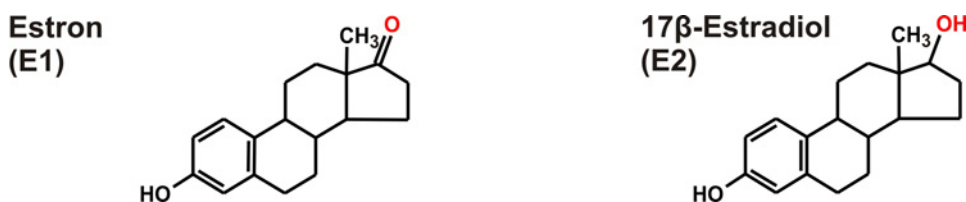


Abbildung 4.4: Strukturformeln von Estron und 17 β -Estradiol

Die beiden Estrogene unterscheiden sich ausschließlich durch den Rest an C-Atom 17.

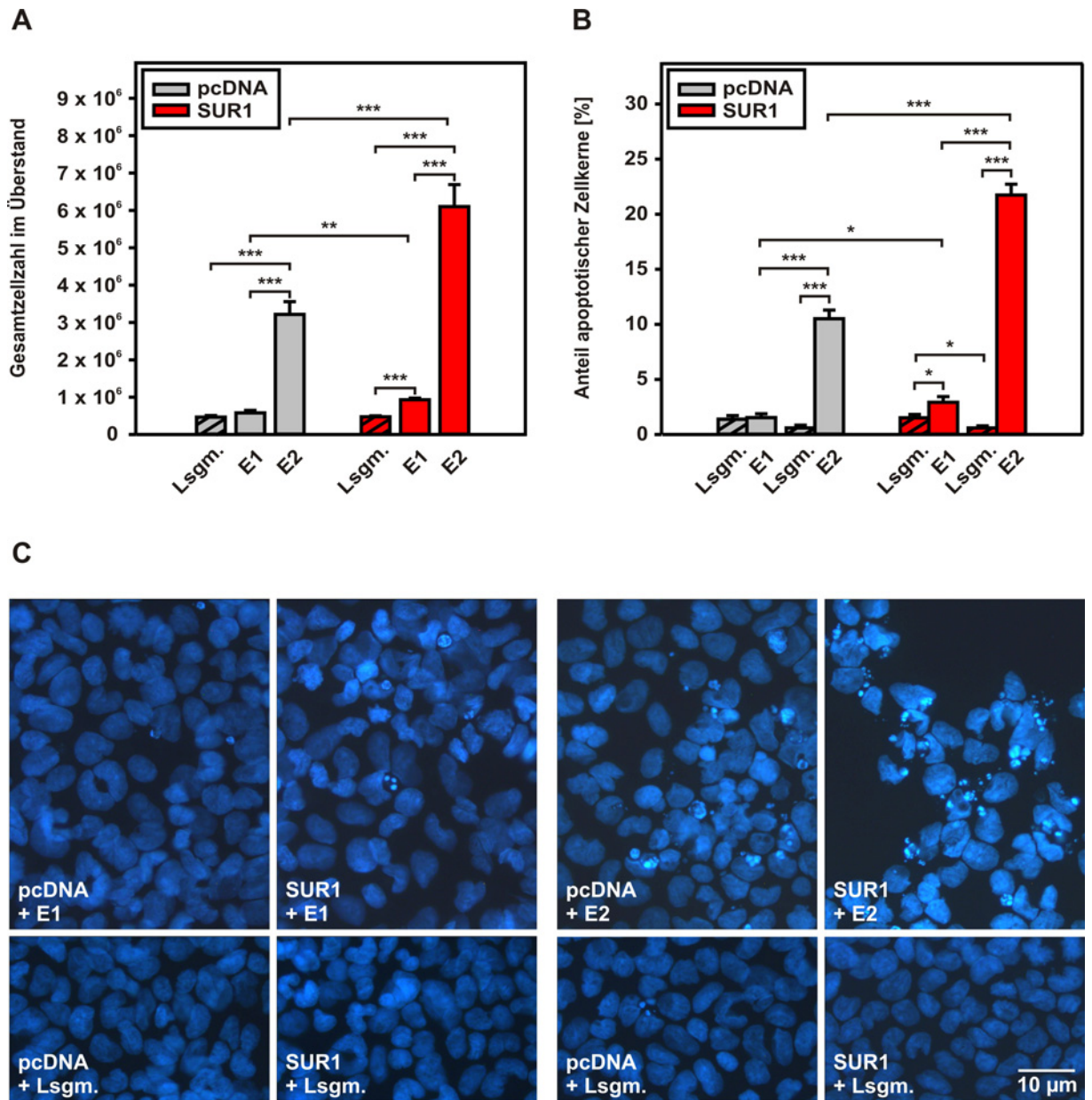


Abbildung 4.5: Wirkung von 17 β -Estradiol auf HEK293-Zellen, welche SUR1 exprimieren, im Vergleich zu Estron

HEK293-Zellen, welche SUR1 exprimieren, bzw. mit leerem pcDNA-Expressionsvektor transfizierte Kontrollzellen wurden mit je 100 μ M 17 β -Estradiol (E2) bzw. Estron (E1) sowie mit Lösungsmittel (Lsgm.) für 24 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellablösung (A) sowie apoptotische Veränderungen in der Zellmorphologie nach Hoechst 33258-Färbung (B, C) quantifiziert. Apoptotisch veränderte Zellkerne sind fragmentiert, kondensiert und hell leuchtend, während die nicht-apoptotisch veränderten Zellkerne eine gleichmäßige Färbung aufweisen. Die in (A) gezeigten Daten sind Mittelwerte aus 4-9 verschiedenen Experimenten. Für die Quantifizierung des prozentualen Anteils apoptotisch veränderter Zellkerne wurden insgesamt ca. 1200-2300 Kerne auf 100-150 zufällig gewählten Teilflächen (50 x 50 μ m²) aus verschiedenen Aufarbeitungen pro Behandlungsgruppe ausgezählt (B, C). *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

4.1.3 Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung von 17 β -Estradiol auf HEK293-Zellen, welche den SUR1 exprimieren

Um die Konzentrationsabhängigkeit des für den SUR1 spezifischen Effekts von 17 β -Estradiol zu untersuchen, wurden HEK293-Zellen, welche SUR1 exprimierten, bzw. mit leerem pcDNA-Expressionsvektor transfizierte Kontrollzellen mit unterschiedlichen Konzentrationen (0,1 μ M; 0,5 μ M; 1 μ M; 5 μ M; 15 μ M) an 17 β -Estradiol bzw. mit Lösungsmittel DMSO/Ethanol für 96 h inkubiert.

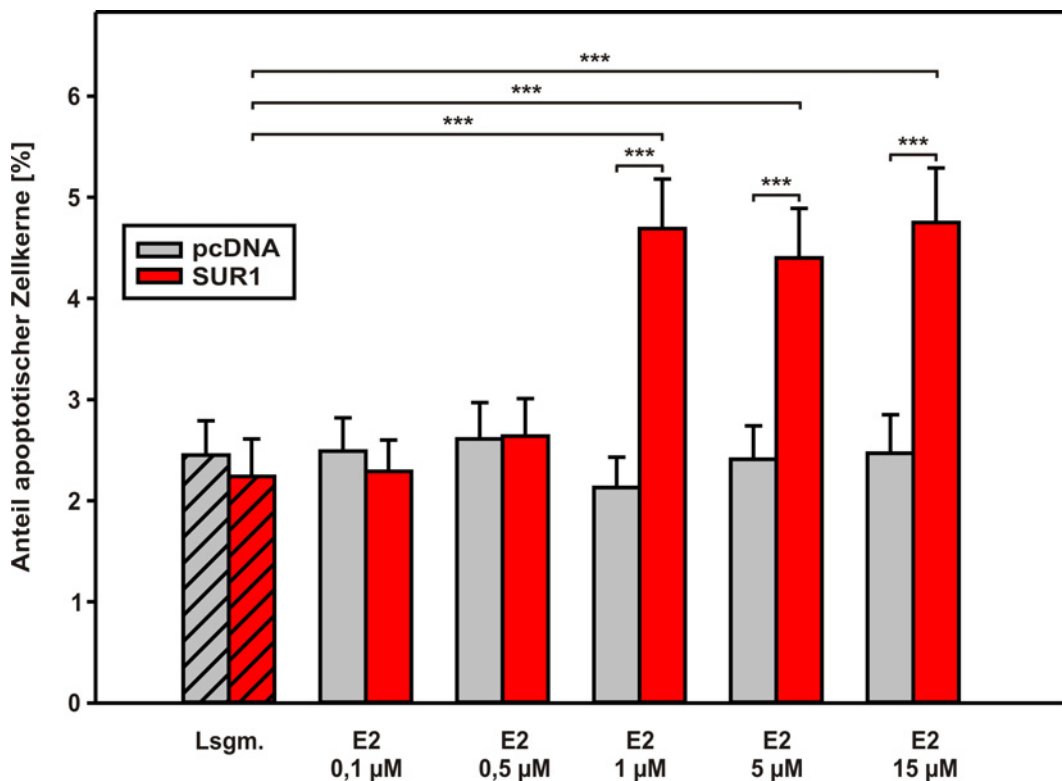


Abbildung 4.6: Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung von 17 β -Estradiol auf HEK293-Zellen, welche SUR1 exprimieren

HEK293-Zellen, welche SUR1 exprimieren (SUR1), bzw. mit leerem pcDNA-Expressionsvektor transfizierte Kontrollzellen (pcDNA) wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen (0,1 μ M; 0,5 μ M; 1 μ M; 5 μ M; 15 μ M) an 17 β -Estradiol (E2) bzw. mit Lösungsmittel (Lsgm.) für 96 h inkubiert. Im Anschluss wurde der prozentuale Anteil apoptotisch veränderter Zellkerne quantifiziert. Hierfür wurden diese mit dem Farbstoff Hoechst 33258 angefärbt und in 150 Teilflächen (50 x 50 μ m²) insgesamt ca. 2000-2500 Kerne aus verschiedenen Aufarbeitungen pro Behandlungsgruppe ausgezählt. ***, p < 0,001.

Im Anschluss wurde der prozentuale Anteil apoptotisch veränderter Zellkerne quantifiziert (Tabelle 4.5). Hierfür wurden die Zellkerne mit dem Farbstoff Hoechst 33258 angefärbt und jeweils 150 Teilflächen (50 x 50 μ m²) aus verschiedenen Aufarbeitungen pro Behandlungsgruppe ausgezählt.

Abbildung 4.6 ist zu entnehmen, dass eine Korrelation zwischen der eingesetzten Konzentration an 17 β -Estradiol und dem Ausmaß der Veränderungen in der Zellmorphologie besteht. Hochsignifikante Unterschiede zwischen SUR1-Zellen und pcDNA-Kontrollzellen wurden nach 96 h bereits ab einer 17 β -Estradiol-Konzentration von 1 μ M gemessen.

Tabelle 4.5: Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung von 17 β -Estradiol auf HEK293-Zellen, welche SUR1 exprimieren

HEK293-Zellen, welche SUR1 exprimieren (SUR1), bzw. mit leerem pcDNA-Expressionsvektor transfizierte Kontrollzellen (pcDNA) wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen (0,1 μ M; 0,5 μ M; 1 μ M; 5 μ M; 15 μ M) 17 β -Estradiol (E2) bzw. mit Lösungsmittel (Lsgm.) für 96 h inkubiert. Im Anschluss wurde der prozentuale Anteil apoptotisch veränderter Zellkerne quantifiziert.

Versuchsansatz	Anteil apoptotisch veränderter Zellkerne [%]	
	pcDNA	SUR1
Lsgm.	2,5 \pm 0,3	2,2 \pm 0,4
0,1 μ M E2	2,5 \pm 0,3	2,3 \pm 0,3
0,5 μ M E2	2,6 \pm 0,4	2,6 \pm 0,4
1 μ M E2	2,1 \pm 0,3	4,7 \pm 0,5
5 μ M E2	2,4 \pm 0,3	4,4 \pm 0,5
15 μ M E2	2,5 \pm 0,4	4,8 \pm 0,5

4.1.4 Bestimmung der Aktivität verschiedener Caspase-Enzyme nach Behandlung mit 17 β -Estradiol

Wie bereits in Kapitel 1.3.2 erläutert wird, können verschiedene Caspase-Enzyme an der Auslösung apoptotischer Prozesse beteiligt sein. Da Caspase-3 hierbei als zentrales Schlüsselenzym gilt, dient die Bestimmung der Aktivität dieses Enzyms als typischer apoptotischer Parameter. Mit Hilfe der Aktivitätsbestimmung anderer typischer Caspase-Enzyme kann die Eingrenzung des beteiligten Transduktionssignalweges erfolgen. Caspase-8 gilt als Schlüsselenzym bei der Induktion von Apoptose über den „Todesrezeptor“ und Caspase-9 kommt eine sehr wichtige Rolle bei dem mitochondrialen apoptotischen Weg zu (siehe auch Kapitel 1.3.2).

Obwohl die verschiedenen Caspase-Enzyme jeweils hochspezifisch bestimmte Substrate erkennen und spalten (Caspase-3: DEVD, Caspase-8: IETD, Caspase-9: LEHD), kann nicht ausgeschlossen werden, dass andere Enzyme mit niedriger Substrataffinität auch Spaltungen der Peptidsequenzen vornehmen (Wanke et al., 2004). Deshalb werden genau genommen die Aktivitäten Caspase-3-, Caspase-8- bzw. Caspase-9-ähnlicher Enzyme bestimmt.

HEK293-Zellen, welche SUR1 exprimieren (SUR1), bzw. mit leerem pcDNA-Expressionsvektor transfizierte Kontrollzellen (pcDNA) wurden für 24 h mit 100 μ M 17 β -Estradiol bzw. DMSO/Ethanol inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen wie in Kapitel 3.2.2.4 beschrieben aufgearbeitet und die Aktivitäten der Caspase-3-, Caspase-8- und Caspase-9-ähnlichen Enzyme als Steigung der Fluoreszenz pro Minute, bezogen auf die Protein-Konzentration der Probe, quantifiziert (Tabelle 4.6).

Wie Abbildung 4.7 zu entnehmen ist, waren die Caspase-Aktivitäten nach Behandlung mit 17 β -Estradiol gegenüber der Aktivität nach Behandlung mit Lösungsmittel generell hochsignifikant erhöht. Das Ausmaß dieser für den SUR1 spezifischen Steigerung der Enzymaktivität nach Behandlung mit 17 β -Estradiol war bei Caspase-3 am stärksten ausgeprägt, aber auch die Aktivität von Caspase-9 war in Zellen, welche SUR1 exprimierten, deutlich höher als in pcDNA-Kontrollzellen. Bei Caspase-8 hingegen wurden vergleichsweise geringere Unterschiede gemessen.

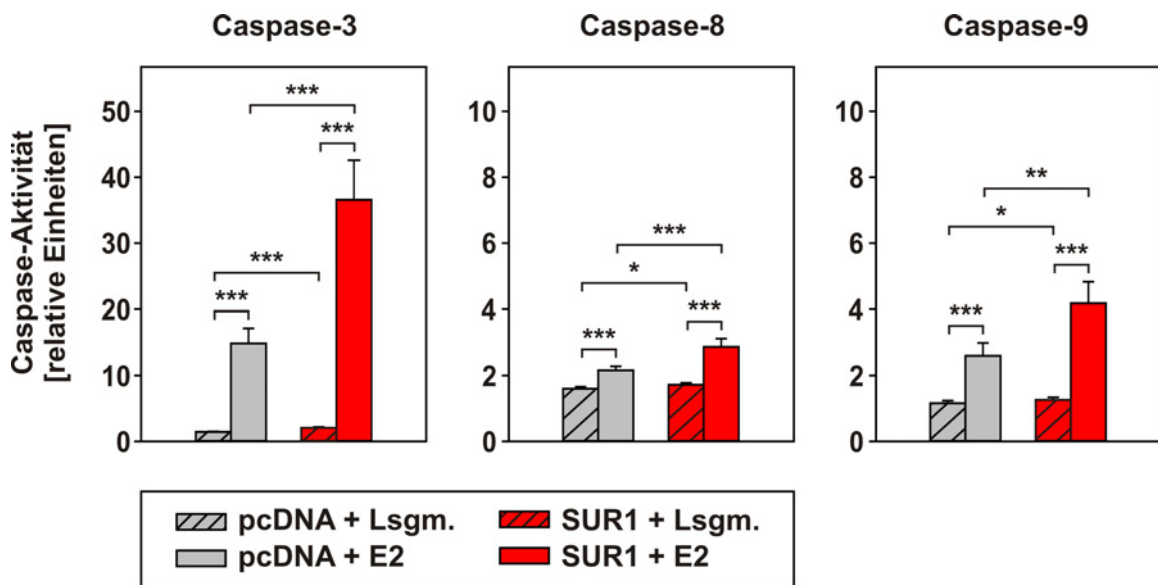


Abbildung 4.7: Nachweis der Aktivität verschiedener Caspase-Enzyme nach Behandlung mit 17 β -Estradiol

HEK293-Zellen, welche SUR1 exprimieren (SUR1), bzw. mit leerem pcDNA-Expressionsvektor transfizierte Kontrollzellen (pcDNA) wurden für 24 h mit 100 μ M 17 β -Estradiol (E2) bzw. DMSO/Ethanol (Lsgm.) inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen aufgearbeitet und die Aktivitäten der Caspase-3-, Caspase-8- und Caspase-9-ähnlicher Enzyme als Steigung der Fluoreszenz pro Minute, bezogen auf die Protein-Konzentration der Probe, quantifiziert. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte aus 8-9 verschiedenen Experimenten. Zu beachten sind die unterschiedlichen Skalierungen der Achsen. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

Tabelle 4.6: Nachweis der Aktivität verschiedener Caspase-Enzyme nach Behandlung mit 17 β -Estradiol
HEK293-Zellen, welche SUR1 exprimieren (SUR1), bzw. mit leerem pcDNA-Expressionsvektor transfizierte Kontrollzellen (pcDNA) wurden für 24 h mit 100 μ M 17 β -Estradiol (E2) bzw. DMSO/Ethanol (Lsgm.) inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen aufgearbeitet und die Aktivitäten der Caspase-3-, Caspase-8- und Caspase-9-ähnlichen Enzyme als Steigung der Fluoreszenz pro Minute, bezogen auf die Protein-Konzentration der Probe, quantifiziert.

	Caspase-Aktivität [relative Einheiten]		
	Caspase-3	Caspase-8	Caspase-9
pcDNA + Lsgm.	1,43 \pm 0,05	1,60 \pm 0,06	1,16 \pm 0,08
pcDNA + E2	14,87 \pm 2,26	2,16 \pm 0,12	2,60 \pm 0,39
SUR1 + Lsgm.	2,06 \pm 0,11	1,72 \pm 0,06	1,26 \pm 0,08
SUR1 + E2	36,57 \pm 5,99	2,87 \pm 0,25	4,18 \pm 0,65

4.1.5 Untersuchungen des Effekts des Proteinkinase C-Aktivators Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (TPA) auf die durch 17 β -Estradiol induzierte Apoptose

In Studien wurde nachgewiesen (Chisamore et al., 2001, Alzamora et al., 2007), dass 17 β -Estradiol die Proteinkinase C (PKC) aktivieren kann. Außerdem ist dieses Enzym in manchen apoptotischen Signalwegen in β -Zellen von Bedeutung. Von Resveratrol, das in früheren Untersuchungen ähnliche apoptotische Effekte wie 17 β -Estradiol zeigte (Hambrock et al., 2007), ist bekannt, dass es als Inhibitor der PKC (Atten et al., 2005) wirken kann. Um zu untersuchen, ob die PKC bei der durch 17 β -Estradiol induzierten Apoptose eine entsprechende Rolle spielt, wurde der PKC-Aktivator, der Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (TPA), eingesetzt.

HEK293-Zellen, welche SUR1 exprimieren (SUR1), bzw. mit leerem pcDNA-Expressionsvektor transfizierte Kontrollzellen (pcDNA) wurden für 24 h mit 100 μ M 17 β -Estradiol und/oder 100 ng/ml TPA bzw. dem Lösungsmittel DMSO/Ethanol (D/E) inkubiert. Im Anschluss wurde das Ausmaß der Zellablösung über die Messung der Gesamtzellzahl im Überstand bestimmt (Tabelle 4.7). Außerdem wurden Kontroll-Experimente mit 100 ng/ml TPA, mit 100 μ M Etoposid (ETO) oder mit 100 ng/ml TPA und 100 μ M Etoposid durchgeführt. Wie in Abbildung 4.8 ersichtlich ist, wurde kein Unterschied zwischen den mit Lösungsmittel und den mit TPA behandelten Zellen gemessen. Der durch die Behandlung mit 17 β -Estradiol induzierte SUR1-spezifische apoptotische Effekt wurde durch die Co-Behandlung mit TPA signifikant um einen Faktor von 1,6 reduziert (Abbildung 4.8A). Im Gegensatz zu der Reduktion der 17 β -Estradiol-induzierten Apoptose durch TPA, sorgte die

Co-Inkubation von Etoposid und TPA für eine Erhöhung der Apoptoserate (Abbildung 4.8B). In weiteren Kontroll-Experimenten (Co-Inkubation mit Etoposid und Lösungsmittel von TPA) konnte ausgeschlossen werden, dass hierfür das Lösungsmittel von TPA (D/E) verantwortlich war (z.B. SUR1 + ETO: $668,7 \times 10^3 \pm 59,7$; SUR1 + ETO + TPA: $1046,0 \times 10^3 \pm 115,6$; SUR1 + ETO + D/E: $752,6 \times 10^3 \pm 31,0$).

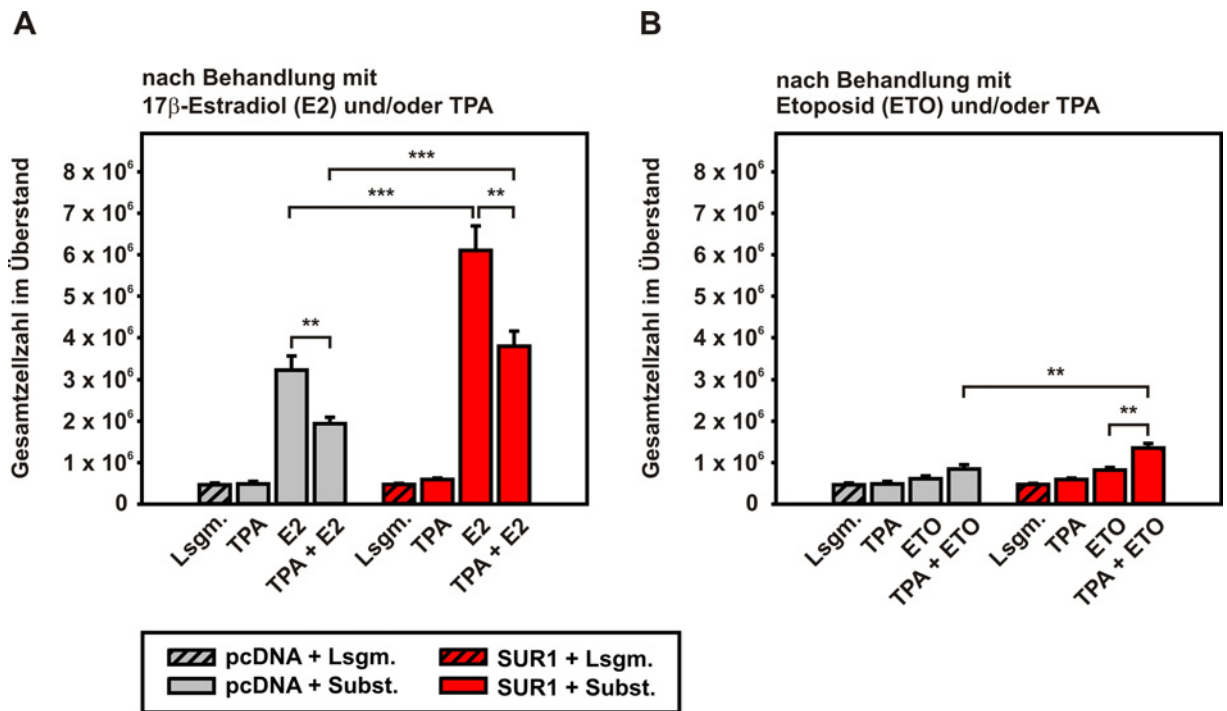


Abbildung 4.8: Untersuchungen des Effekts des Proteinkinase C Aktivators TPA auf die durch 17β-Estradiol induzierte Apoptose

HEK293-Zellen, welche SUR1 exprimieren (SUR1), bzw. mit leerem pcDNA-Expressionsvektor transfizierte Kontrollzellen (pcDNA) wurden für 24 h mit je 100 μM 17β-Estradiol (E2) bzw. Etoposid (ETO) und/oder 100 ng/ml TPA bzw. dem Lösungsmittel (Lsgm.) inkubiert. Anschließend wurde das Ausmaß der Zellablösung über die Messung der Gesamtzellzahl im Überstand ermittelt. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte aus je 5-9 verschiedenen Experimenten. Folgende signifikanten Unterschiede sind in der Abbildung nicht gezeigt: pcDNA: Lsgm. vs. E2, $p < 0,001$; SUR1: Lsgm. vs. TPA, $p < 0,05$; Lsgm. vs. E2, $p < 0,001$ (A); SUR1: Lsgm. vs. TPA, $p < 0,05$; Lsgm. vs. ETO, $p < 0,001$ (B). **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

Tabelle 4.7: Untersuchungen des Effekts des Proteinkinase C Aktivators TPA auf die durch 17 β -Estradiol induzierte Apoptose

HEK293-Zellen, welche SUR1 exprimieren (SUR1), bzw. mit leerem pcDNA-Expressionsvektor transfizierte Kontrollzellen (pcDNA) wurden für 24 h mit je 100 μ M 17 β -Estradiol bzw. Etoposid und/oder 100 ng/ml TPA bzw. dem Lösungsmittel inkubiert. Anschließend wurde das Ausmaß der Zellablösung über die Bestimmung der Gesamtzellzahl im Überstand ermittelt.

	Gesamtzellzahl im Überstand [$\times 10^3$]
pcDNA + Lösungsmittel	464,3 \pm 44,2
pcDNA + TPA	486,7 \pm 61,6
pcDNA + 17 β -Estradiol	3216,3 \pm 340,9
pcDNA + 17 β -Estradiol + TPA	1939,5 \pm 154,9
pcDNA + Etoposid	610,7 \pm 69,9
pcDNA + Etoposid + TPA	844,8 \pm 104,0
SUR1 + Lösungsmittel	475,4 \pm 23,6
SUR1 + TPA	594,1 \pm 34,3
SUR1 + 17 β -Estradiol	6104,9 \pm 589,8
SUR1 + 17 β -Estradiol + TPA	3789,8 \pm 367,8
SUR1 + Etoposid	822,7 \pm 61,3
SUR1 + Etoposid + TPA	1353,9 \pm 109,3

4.1.6 Wirkung von 17 β -Estradiol auf HEK293-Zellen, die verschiedene Isoformen des Sulfonylharnstoffrezeptors exprimieren

Wie bereits in Kapitel 1.1 erläutert wurde, stellen die Sulfonylharnstoffrezeptoren (SURs) die regulatorischen Untereinheiten von ATP-sensitiven Kaliumkanälen (K_{ATP} -Kanäle) dar. Man unterscheidet dabei zwischen den in unterschiedlichen Geweben vorkommenden Isoformen SUR1 (β -Zellen des Pankreas, neuronale Zellen) SUR2A (Herz- und Skelettmuskelzellen) und SUR2B (glatte Gefäßmuskulatur und nicht-vaskuläres glattes Muskelgewebe).

In weiteren Experimenten im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von 17 β -Estradiol auf HEK293-Zellen, welche SUR1 exprimieren, mit der Wirkung von 17 β -Estradiol auf HEK293-Zellen, welche die anderen SUR-Isoformen exprimieren, verglichen.

HEK293-Zellen, welche stabil mit für SUR1, SUR2A oder SUR2B codierender cDNA bzw. mit leerem pcDNA-Expressionsvektor transfiziert waren, wurden hierfür mit 100 μ M 17 β -Estradiol bzw. dem entsprechenden Lösungsmittel DMSO/Ethanol für 24 h inkubiert. Im Anschluss wurde das Ausmaß der Zellablösung über die Bestimmung der Gesamtzellzahl im Überstand gemessen (Abbildung 4.9A und Tabelle 4.8). Um die Veränderungen in der Kernmorphologie nach Behandlung mit 17 β -Estradiol zu bestimmen, wurden die Zellkerne mit Hilfe des Farbstoffs Hoechst 33258 angefärbt (Abbildung 4.9C). Die Gesamtkernzahl sowie der prozentuale Anteil apoptotisch veränderter Zellkerne wurde quantifiziert, indem ca. 100-150 zufällig gewählte Teilflächen (50 x 50 μ m²) aus verschiedenen Aufarbeitungen pro Behandlungsgruppe ausgezählt wurden (Abbildung 4.9B und Tabelle 4.8). Im Gegensatz zu den Zellen, welche SUR1 exprimierten, wurde durch die Behandlung mit 17 β -Estradiol in Zellen, welche SUR2A oder SUR2B exprimierten, keine verstärkte Zellablösung induziert. Analog war auch der prozentuale Anteil apoptotisch veränderter Zellkerne bei Zellen, welche SUR1 exprimierten, gegenüber den Zellen, die SUR2A oder SUR2B exprimierten, signifikant erhöht.

Sowohl anhand der Bestimmung der Zellablösung als auch der Erfassung apoptotisch veränderter Zellkerne konnte nachgewiesen werden, dass 17 β -Estradiol signifikant mehr Apoptose in Zellen induzierte, welche die pankreatische Isoform SUR1 exprimierten, als in Zellen, welche die kardiale Isoform SUR2A oder die vaskuläre Isoform SUR2B exprimierten. Das Ausmaß der Induktion von Apoptose durch 17 β -Estradiol war bei beiden SUR2-Spleißvarianten vergleichbar mit der von pcDNA-Kontrollzellen. Der Unterschied zwischen den mit 17 β -Estradiol und den entsprechenden mit Lösungsmittel behandelten Zellen war bei allen

Isoformen und den pcDNA-Kontrollzellen signifikant. Zwischen den mit Lösungsmittel behandelten Zellen wurden hingegen keine signifikanten Unterschiede gemessen.

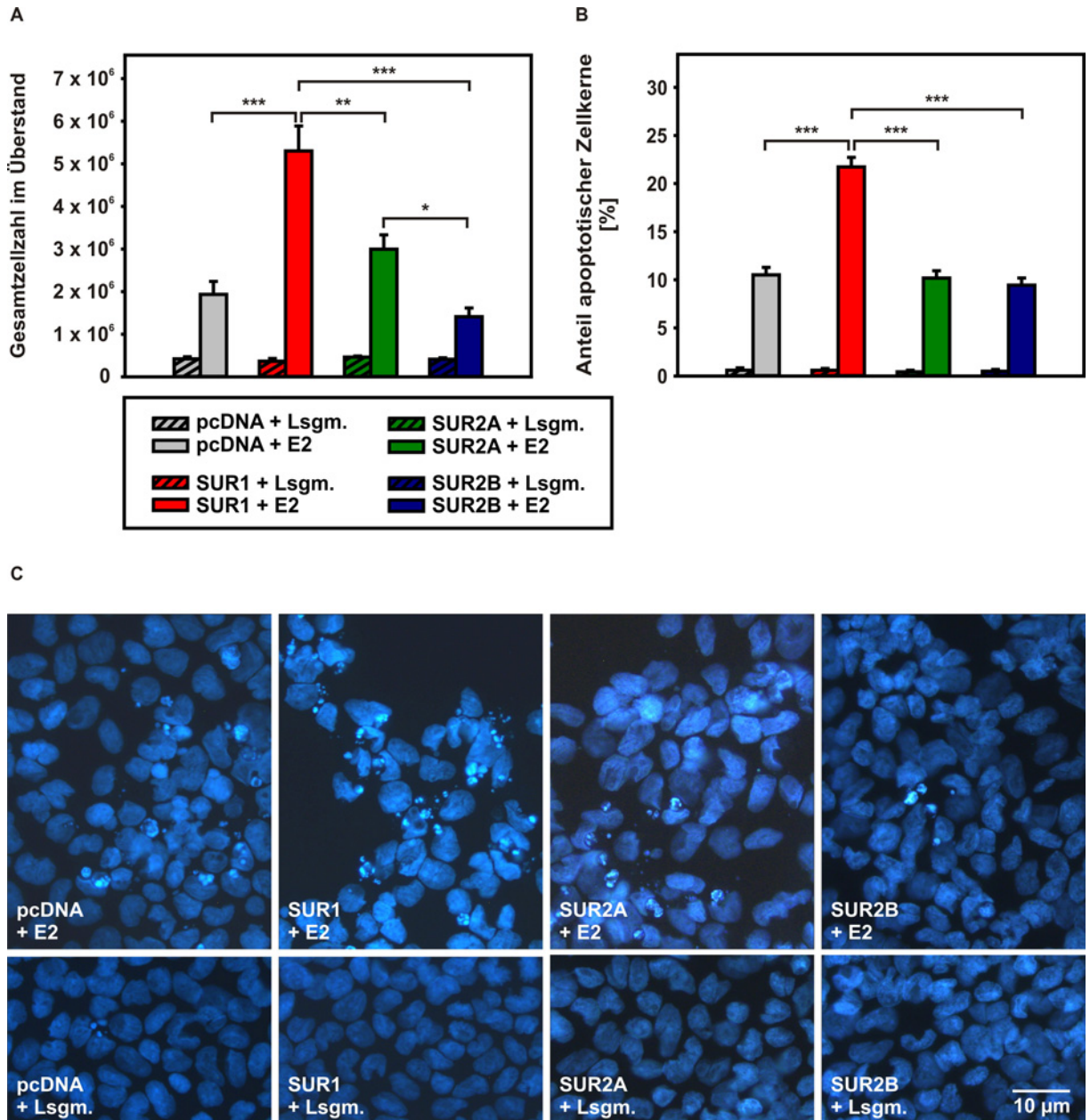


Abbildung 4.9: Wirkung von 17 β -Estradiol auf HEK293-Zellen, die verschiedene SUR-Isoformen exprimieren

HEK293-Zellen, welche stabil mit für SUR1, SUR2A oder SUR2B codierender cDNA bzw. mit leerem pcDNA-Expressionsvektor transfiziert waren, wurden mit 100 μ M 17 β -Estradiol (E2) bzw. mit DMSO/Ethanol (Lsgm.) für 24 h inkubiert. (A) zeigt das Ausmaß der Zellablösung (Mittelwerte aus 5 Versuchsreihen), in (B) ist der Anteil apoptotisch veränderter Zellkerne dargestellt. Der prozentuale Anteil apoptotisch veränderter Zellkerne wurde quantifiziert, indem auf ca. 100-150 Teilflächen (50 x 50 μ m²) insgesamt 1300-2300 Zellkerne aus verschiedenen Aufarbeitungen pro Behandlungsgruppe ausgezählt wurden. (C) zeigt die Kernmorphologie nach Anfärben mit dem Farbstoff Hoechst 33258; apoptotisch veränderte Zellkerne sind fragmentiert, kondensiert und hell leuchtend, während die nicht-apoptotisch veränderten Zellkerne eine gleichmäßige Färbung aufweisen. pcDNA: Lsgm. vs. E2 , $p < 0,01$; SUR1: Lsgm. vs. E2 , $p < 0,001$; SUR2A: Lsgm. vs. E2 , $p < 0,001$; SUR2B: Lsgm. vs. E2 , $p < 0,01$ (A); pcDNA: Lsgm. vs. E2 , $p < 0,001$; SUR1: Lsgm. vs. E2 , $p < 0,001$; SUR2A: Lsgm. vs. E2 , $p < 0,001$; SUR2B: Lsgm. vs. E2 , $p < 0,001$ (B); * , $p < 0,05$; ** , $p < 0,01$; *** , $p < 0,001$.

Tabelle 4.8: Wirkung von 17 β -Estradiol auf HEK293-Zellen, die verschiedene SUR-Isoformen exprimieren

HEK293-Zellen, welche stabil mit cDNA von SUR1, SUR2A oder SUR2B bzw. mit leerem pcDNA-Expressionsvektor transfiziert waren, wurden mit 100 μ M 17 β -Estradiol (E2) bzw. mit DMSO/Ethanol (Lsgm.) für 24 h inkubiert. Im Anschluss wurden die Gesamtzellzahl im Überstand sowie der prozentuale Anteil apoptotisch veränderter Zellkerne quantifiziert.

	Gesamtzellzahl im Überstand [$\times 10^3$]	Anteil apoptotisch veränderter Zellkerne [%]
pcDNA + Lsgm.	421,4 \pm 47,5	0,6 \pm 0,3
pcDNA + E2	1935,5 \pm 303,8	10,51 \pm 0,8
SUR1 + Lsgm.	365,2 \pm 66,2	0,6 \pm 0,2
SUR1 + E2	5301,0 \pm 585,8	21,7 \pm 1,0
SUR2A + Lsgm.	2995,2 \pm 335,5	0,4 \pm 0,2
SUR2A + E2	461,0 \pm 27,0	10,2 \pm 0,8
SUR2B + Lsgm.	410,2 \pm 34,2	0,5 \pm 0,2
SUR2B + E2	1409,3 \pm 205,6	9,4 \pm 0,8

4.1.7 Einfluss verschiedener Mutationen des SUR auf die apoptotische Wirkung von 17 β -Estradiol

4.1.7.1 Einfluss von Mutationen in der Transmembranhelix 17 des SUR auf die apoptotische Wirkung von 17 β -Estradiol

Der Einfluss von gezielten Mutationen in der Transmembranhelix 17 des Sulfonylharnstoffrezeptors (SUR) (siehe Kapitel 1.1.3) auf die apoptotische Wirkung von 17 β -Estradiol wurde an HEK293-Zellen untersucht, welche stabil mit für SUR1, SUR1(M1289T), SUR1(W1296A), SUR2B oder SUR2B(Y1206S, T1254M) codierender cDNA bzw. leerem pcDNA-Expressionsvektor transfiziert waren.

Die Zellen dieser rekombinanten Zelllinien wurden für 24 h mit 100 μ M 17 β -Estradiol bzw. dem entsprechenden Lösungsmittel DMSO/Ethanol inkubiert. Anschließend wurde das Ausmaß der Zellablösung über die Messung der Gesamtzellzahl im Überstand ermittelt (siehe Abbildung 4.10 und Tabelle 4.9) sowie die Veränderungen in der Zellkernmorphologie nach Anfärben mit dem Farbstoff Hoechst 33258 untersucht.

Aufgrund der hochsignifikanten Unterschiede im apoptotischen Potential von 17 β -Estradiol auf Zellen, welche SUR1 bzw. SUR2 exprimieren (siehe Abbildung 4.9) wurde die Punktmutante SUR1(M1289T) untersucht, bei der eine einzige Aminosäure in Transmem-

branhelix 17 durch die korrespondierende Aminosäure von SUR2 (Threonin an Position 1254) ausgetauscht wurde. Es konnte nachgewiesen werden, dass diese Mutation sowohl die Bindung (Hambrock et al., 2004) als auch die Aktivität (Moreau et al., 2000) verschiedener K_{ATP} -Kanal-Öffner beeinflusst. Der für den SUR1 spezifische Effekt von 17β -Estradiol wurde durch diese Mutation aufgehoben. Dies deutet darauf hin, dass diese Helix eine wichtige Rolle bei der durch 17β -Estradiol induzierten und für den SUR1 spezifischen Apoptose spielt.

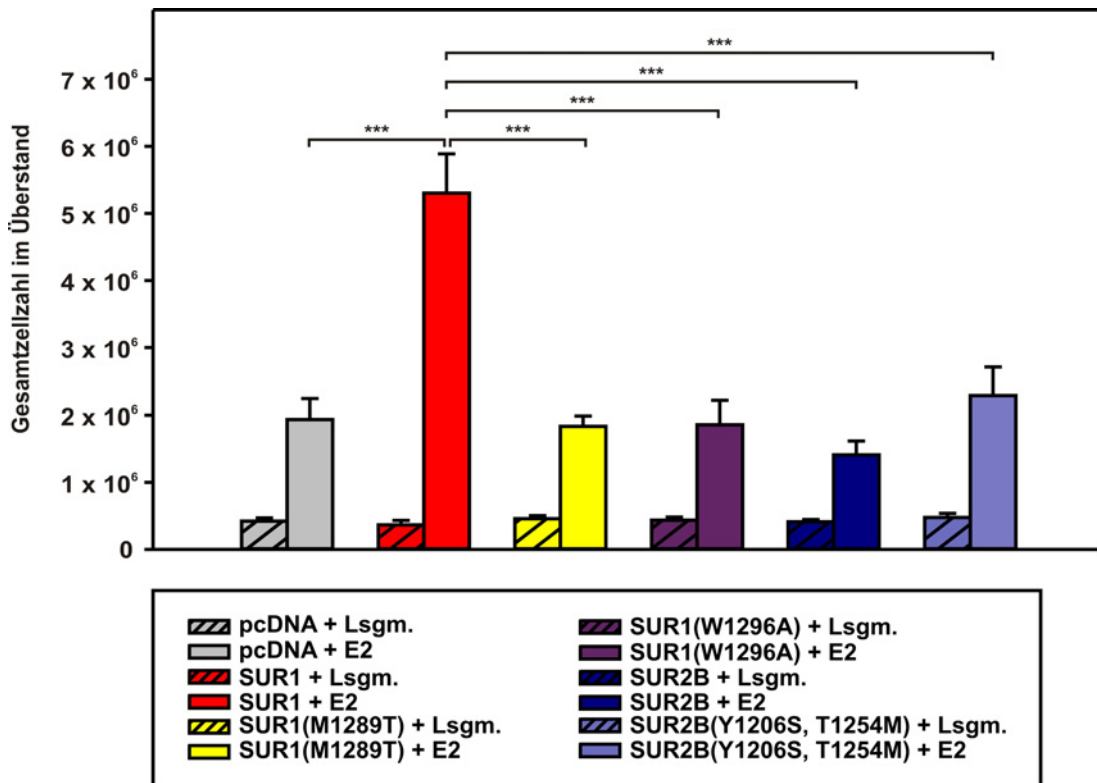


Abbildung 4.10: Einfluss von Mutationen in der Transmembranhelix 17 des SUR auf die apoptotische Wirkung von 17β -Estradiol

HEK293-Zellen, welche stabil mit für SUR1, SUR1(M1289T), SUR1(W1296A), SUR2B oder SUR2B(Y1206S, T1254M) codierender cDNA bzw. leerem pcDNA-Expressionsvektor transfiziert waren, wurden für 24 h mit $100 \mu\text{M}$ 17β -Estradiol (E2) bzw. DMSO/Ethanol (Lsgm.) inkubiert. Anschließend wurde das Ausmaß der Zellablösung über die Bestimmung der Gesamtzellzahl im Überstand in 4-6 Versuchsreihen ermittelt. In der Abbildung sind folgende signifikante Unterschiede zwischen Lösungsmittel- und 17β -Estradiol-Behandlung nicht eingetragen: pcDNA: Lsgm. vs. E2, $p < 0,01$; SUR1: Lsgm. vs. E2, $p < 0,001$; SUR1(M1289T): Lsgm. vs. E2, $p < 0,001$; SUR1(W1296A): Lsgm. vs. E2, $p < 0,01$; SUR2B: Lsgm. vs. E2, $p < 0,01$; SUR2B(Y1206S, T1254M): Lsgm. vs. E2, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

Außerdem wurde untersucht, ob die reziproke Mutation, d.h. der Austausch der Aminosäure Threonin an Position 1254 von SUR2 durch die korrespondierende Aminosäure von SUR1 (Methionin) zu einer Verstärkung des apoptotischen Effekts von 17β -Estradiol in Zellen, welche SUR2B exprimierten, führte. Um parallel zu diesen Experimenten auch Radio-liganden-Bindungsstudien in der Arbeitsgruppe durchführen zu können, wurde die Affinität

von SUR2B für Glibenclamid erhöht, indem zusätzlich die Mutation SUR2B(Y1206S) eingeführt wurde. Bei dieser Mutanten SUR2B(Y1206S, T1254M) wurde hingegen, wie auch bei SUR2B, keine verstärkte Induktion von Apoptose durch 17 β -Estradiol gemessen, d.h. diese inverse Mutation T1254M bei SUR2B reichte offensichtlich nicht aus, um den für SUR1 typischen apoptotischen Effekt zu erzielen.

Tabelle 4.9: Einfluss von Mutationen in der Transmembranhelix 17 des SUR auf die apoptotische Wirkung von 17 β -Estradiol

HEK293-Zellen, welche stabil mit für SUR1, SUR1(M1289T), SUR1(W1296A), SUR2B oder SUR2B(Y1206S, T1254M) codierender cDNA bzw. leerem pcDNA-Expressionsvektor transfiziert waren, wurden für 24 h mit 100 μ M 17 β -Estradiol (E2) bzw. DMSO/Ethanol (Lsgm.) inkubiert. Anschließend wurde das Ausmaß der Zellablösung quantifiziert.

	Gesamtzellzahl im Überstand [x 10 ³]
pcDNA + Lsgm.	421,4 \pm 47,5
pcDNA + E2	1935,5 \pm 303,8
SUR1 + Lsgm.	365,2 \pm 66,2
SUR1 + E2	5301,0 \pm 585,8
SUR1(M1289T) + Lsgm.	456,1 \pm 46,7
SUR1(M1289T) + E2	1832,9 \pm 155,1
SUR1(W1296A) + Lsgm.	434,7 \pm 46,5
SUR1(W1296A) + E2	1856,6 \pm 356,0
SUR2B + Lsgm.	410,2 \pm 34,2
SUR2B + E2	1409,3 \pm 205,6
SUR2B(Y1206S, T1254M) + Lsgm.	474,4 \pm 62,7
SUR2B(Y1206S, T1254M) + E2	2283,9 \pm 426,9

Außerdem wurde die Wirkung von 17 β -Estradiol auf eine SUR1-Mutante untersucht, bei welcher an Position 1296 die Aminosäure Tryptophan durch die neutrale Aminosäure Alanin ausgetauscht wurde. Dieser Tryptophan-Rest ist innerhalb der Subfamilie C der ABC-Proteine stark konserviert und ist bei verschiedenen MRP-Isoformen von großer Bedeutung für die Bindung von Liganden (Ito et al., 2001b, Zhang et al., 2002, Oleschuk et al., 2003). Die Quantifizierung der Zellzahl im Überstand nach Behandlung mit 17 β -Estradiol bewies, dass auch durch diese Punktmutation in der Transmembranhelix 17 der für den SUR1 spezifische Effekt aufgehoben wurde. Das Ausmaß der Zellablösung nach Behandlung mit 17 β -Estradiol war bei allen drei Mutanten vergleichbar mit dem von pcDNA-Kontrollzellen.

Zwischen allen mit Lösungsmittel behandelten Zelllinien untereinander wurden hingegen keine signifikanten Unterschiede gemessen.

4.1.7.2 Einfluss von Mutationen in der Nukleotidbindungsfalte des SUR1 auf die apoptotische Wirkung von 17 β -Estradiol

Um festzustellen, ob die durch SUR1 vermittelte Apoptose an eine korrekte Funktion der Nukleotidbindungsfalten gekoppelt ist, wurde der Einfluss der Mutationen R1379C und R1379L in der zweiten Nukleotidbindungsfalte von SUR1 auf die apoptotische Wirkung von 17 β -Estradiol untersucht. Es ist bekannt, dass diese beiden Mutationen zu einer gesteigerten ATPase-Aktivität von SUR führen (de Wet et al., 2007b).

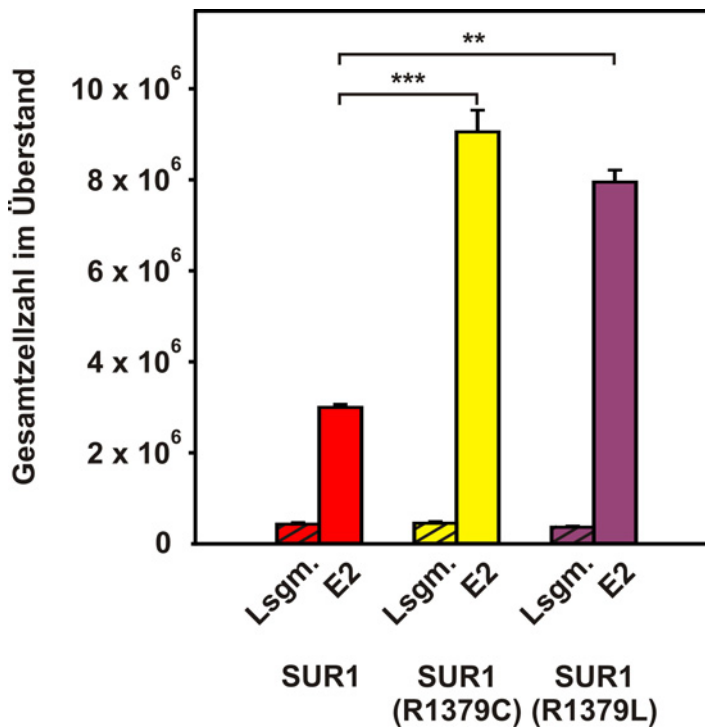


Abbildung 4.11: Einfluss von Mutationen in der Nukleotidbindungsfalte des SUR auf die apoptotische Wirkung von 17 β -Estradiol in Bezug auf die Zellablösung

HEK293-Zellen, welche stabil mit cDNA von SUR1, SUR1(R1379C) oder SUR1(R1379L) waren, wurden für 24 h mit 100 μ M 17 β -Estradiol (E2) bzw. DMSO/Ethanol (Lsgm.) inkubiert. Anschließend wurde das Ausmaß der Zellablösung über die Messung der Gesamtzellzahl im Überstand in 5 Versuchsreihen ermittelt. In der Abbildung sind folgende signifikante Unterschiede zwischen Lösungsmittel- und 17 β -Estradiol-Behandlung nicht eingetragen: SUR1: Lsgm. vs. E2 , $p < 0,001$; SUR1(R1379C): Lsgm. vs. E2 , $p < 0,001$; SUR1(R1379L): Lsgm. vs. E2 , $p < 0,001$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

HEK293-Zellen, welche stabil mit für SUR1, SUR1(R1379C) oder SUR1(R1379L) codierender cDNA transfiziert waren, wurden für 24 h mit 100 μ M 17 β -Estradiol bzw. mit dem Lösungsmittel DMSO/Ethanol inkubiert. Im Anschluss wurden das Ausmaß der

Zellablösung über die Messung der Gesamtzellzahl im Überstand (Abbildung 4.11 und Tabelle 4.10) sowie der prozentuale Anteil apoptotisch veränderter Zellkerne nach Anfärbung mit dem Farbstoff Hoechst 33258 (Abbildung 4.12) quantifiziert.

Der für den SUR1 spezifische Effekt von 17 β -Estradiol wurde durch die Mutation R1379C bzw. R1379L signifikant verstärkt: Im Vergleich zu SUR1 war die Zellablösung um den Faktor 3,0 bzw. 2,7 gesteigert und der prozentuale Anteil apoptotisch veränderter Zellkerne war bei beiden Mutanten um ungefähr das 3-fache erhöht. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen mit Lösungsmittel behandelten Zelllinien gemessen.

Tabelle 4.10: Einfluss von Mutationen in der Nukleotidbindungsfalte des SUR auf die apoptotische Wirkung von 17 β -Estradiol

HEK293-Zellen, welche stabil mit cDNA von SUR1, SUR1(R1379C) oder SUR1(R1379L) transfiziert waren, wurden für 24 h mit 100 μ M 17 β -Estradiol (E2) bzw. DMSO/Ethanol (Lsgm.) inkubiert. Anschließend wurde das Ausmaß der Zellablösung quantifiziert.

	Gesamtzellzahl im Überstand [$\times 10^3$]
SUR1 + Lsgm.	430,3 \pm 57,3
SUR1 + E2	2995,5 \pm 262,7
SUR1(R1379C) + Lsgm.	448,9 \pm 75,7
SUR1(R1379C) + E2	9049,8 \pm 1107,6
SUR1(R1379L) + Lsgm.	363,8 \pm 94,2
SUR1(R1379L) + E2	7946,6 \pm 856,8

In Abbildung 4.12 ist die Veränderung der Kernmorphologie von SUR1-Zellen im Vergleich zu Zellen, welche die Mutanten SUR1(M1289T) (Mutation in der Transmembranhelix 17) oder SUR1(R1379C) (Mutation in der zweiten Nukleotidbindungsfalte) exprimieren, bzw. zu pcDNA-Kontrollzellen nach Behandlung mit 17 β -Estradiol bzw. Lösungsmittel dargestellt.

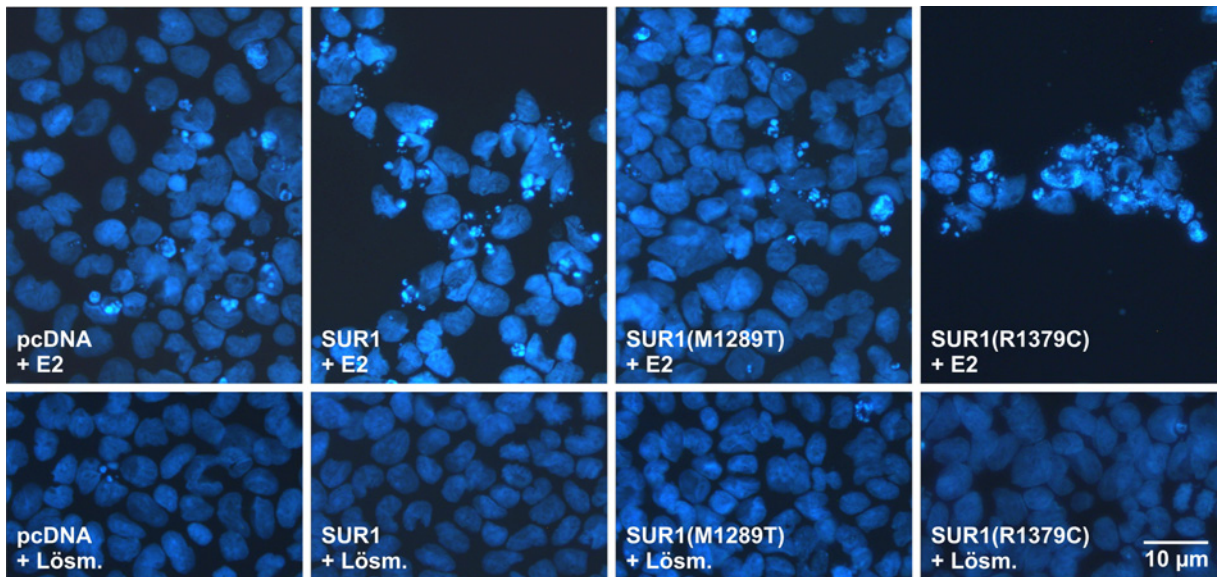


Abbildung 4.12: Einfluss von Mutationen des SUR1-Gens auf die apoptotische Wirkung von 17 β -Estradiol in Bezug auf die Veränderung der Kernmorphologie

HEK293-Zellen, welche stabil mit cDNA von SUR1, SUR1(M1289T) oder SUR1(R1379C) bzw. mit leerem pcDNA-Expressionsvektor transfiziert waren, wurden mit 100 μ M 17 β -Estradiol (E2) bzw. mit DMSO/Ethanol (Lsgm.) für 24 h inkubiert. Nach Anfärben mit dem Farbstoff Hoechst 33258 wurde die Veränderung in der Kernmorphologie untersucht. Apoptotisch veränderte Zellkerne sind fragmentiert, kondensiert und hell leuchtend, während die nicht-apoptotisch veränderten Zellkerne eine gleichmäßige Färbung aufweisen.

4.1.8 Vergleich der Wirkung von 17 β -Estradiol und Estron auf klonale β -Zellen

4.1.8.1 Wirkung von 17 β -Estradiol auf klonale β -Zellen

Um auszuschließen, dass es sich bei dem für den SUR1 spezifischen Effekt nach Behandlung mit 17 β -Estradiol nur um ein Artefakt der Expression im rekombinanten Zellsystem handelte, wurden außerdem Experimente mit Zellen durchgeführt, welche SUR1 endogen exprimierten. Hierzu wurden die pankreatischen β -Zelllinien HIT-T15 und RIN-m5F, welche SUR1 exprimieren, für 24 h mit 100 μ M 17 β -Estradiol bzw. DMSO/Ethanol inkubiert und auch entsprechende Experimente mit der glatten Gefäßmuskel-Zelllinie A-10 (endogene SUR2B-Expression) durchgeführt. Anschließend wurde die Veränderung in der Zellkernmorphologie nach Anfärben mit dem Farbstoff Hoechst 33258 quantifiziert (Tabelle 4.11 und Abbildung 4.13). Abbildung 4.13A ist zu entnehmen, dass die mit 17 β -Estradiol behandelten klonalen β -Zellen eine hochsignifikant ($p < 0,001$) stärkere Fragmentierung und Kondensierung der Zellkerne aufwiesen als die entsprechenden mit Lösungsmittel behandelten Zellen. Während für die mit Lösungsmittel behandelten HIT-T15- und RIN-m5F-Zellen kein Unterschied im Vergleich untereinander gemessen wurde, war das Ausmaß der durch 17 β -Estradiol induzierten Apoptose bei HIT-T15 Zellen um den Faktor 4,2 höher als bei RIN-m5F-Zellen.

Der Unterschied zwischen den mit 17β -Estradiol und den mit Lösungsmittel behandelten A-10-Zellen war nicht so ausgeprägt ($p < 0,05$) wie bei den klonalen β -Zellen. Bei manchen Kernen der A-10-Zellen konnten blasenartige Veränderungen in der Kernmorphologie nach Behandlung mit 17β -Estradiol nachgewiesen werden (Abbildung 4.13B), die sich aber deutlich von den typischen apoptotischen Kernveränderungen unterschieden.

Da bei den klonalen β -Zellen im Vergleich zu den A-10-Zellen nach Inkubation mit dem Lösungsmittel bereits unterschiedliche prozentuale Anteile an apoptotisch veränderten Zellkernen zu messen waren, war es schwierig einen direkten Vergleich anzustellen. Um den spezifischen Effekt von 17β -Estradiol auf die einzelnen Zellen zu ermitteln, wurde ein so genannter „Induktionsfaktor“ berechnet, welcher die Apoptoserate nach Behandlung mit 17β -Estradiol ins Verhältnis zu der Apoptoserate nach Behandlung mit Lösungsmittel setzt (RIN-m5F: 6,4; HIT-T15: 21,0; A-10: 1,8).

Dieses Ergebnis korrelierte mit den Ergebnissen der Versuche an rekombinanten Zellen (siehe Abbildung 4.9). Hier wurde nach Behandlung mit 17β -Estradiol in HEK293-Zellen, welche SUR1 exprimierten, eine deutlich stärkere Apoptose gemessen als in HEK293-Zellen, welche SUR2B exprimierten.

Tabelle 4.11: Wirkung von 17β -Estradiol auf klonale β -Zellen und die Gefäßmuskelzellen A-10

RIN-m5F-, HIT-T15- sowie A-10-Zellen wurden mit $100 \mu\text{M}$ 17β -Estradiol (E2) bzw. mit DMSO/Ethanol (Lsgm.) für 24 h inkubiert und der prozentuale Anteil apoptotisch veränderter Zellkerne wurde quantifiziert.

	Anteil apoptotisch veränderter Zellkerne [%]
RIN-m5F + Lsgm.	$0,6 \pm 0,2$
RIN-m5F + E2	$3,7 \pm 0,6$
HIT-T15 + Lsgm.	$0,7 \pm 0,2$
HIT-T15 + E2	$15,5 \pm 1,9$
A-10 + Lsgm.	$2,1 \pm 0,5$
A-10 + E2	$3,8 \pm 0,6$

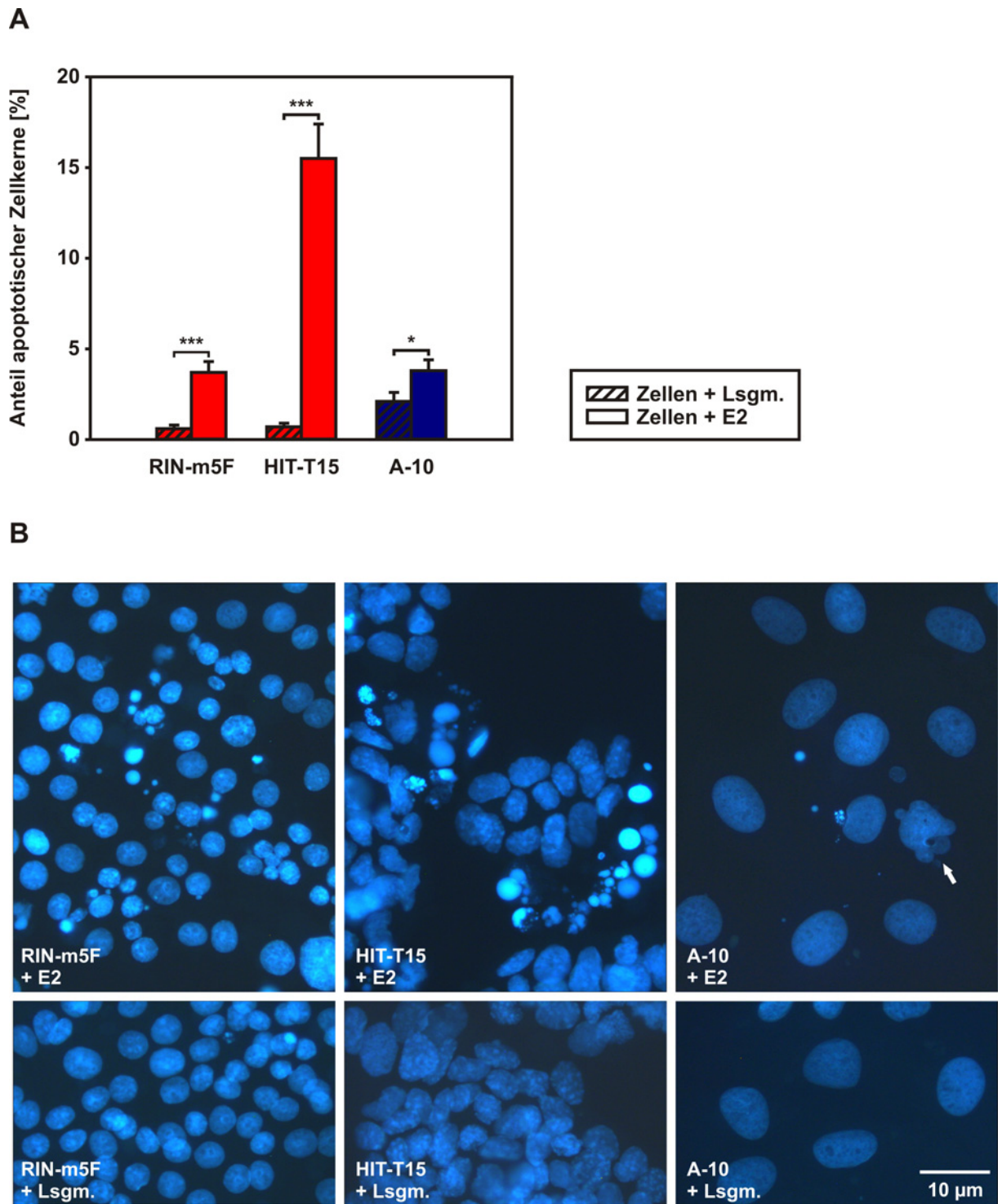


Abbildung 4.13: Wirkung von 17 β -Estradiol auf die klonalen β -Zellen RIN-m5F und HIT-T15 sowie die glatten Gefäßmuskelzellen A-10

RIN-m5F-, HIT-T15- sowie A-10-Zellen wurden mit 100 μ M 17 β -Estradiol (E2) bzw. mit DMSO/Ethanol (Lsgm.) für 24 h inkubiert. Der prozentuale Anteil apoptotisch veränderter Zellkerne (A) wurde quantifiziert, indem ca. 1000-1400 Zellkerne aus verschiedenen Aufarbeitungen pro Behandlungsgruppe gezählt wurden. (B) zeigt die Kernmorphologie nach Anfärben mit dem Farbstoff Hoechst 33258. Apoptotisch veränderte Zellkerne sind fragmentiert, kondensiert und hell leuchtend, während die nicht-apoptotisch veränderten Zellkerne eine gleichmäßige Färbung aufweisen. Der Pfeil markiert eine blasenartige Veränderung eines Zellkerns einer A-10-Zelle nach Behandlung mit E2, die sich deutlich von den typischen apoptotischen Kernveränderungen (s.o.) unterscheidet. **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

4.1.8.2 Wirkung von Estron auf klonale β -Zellen

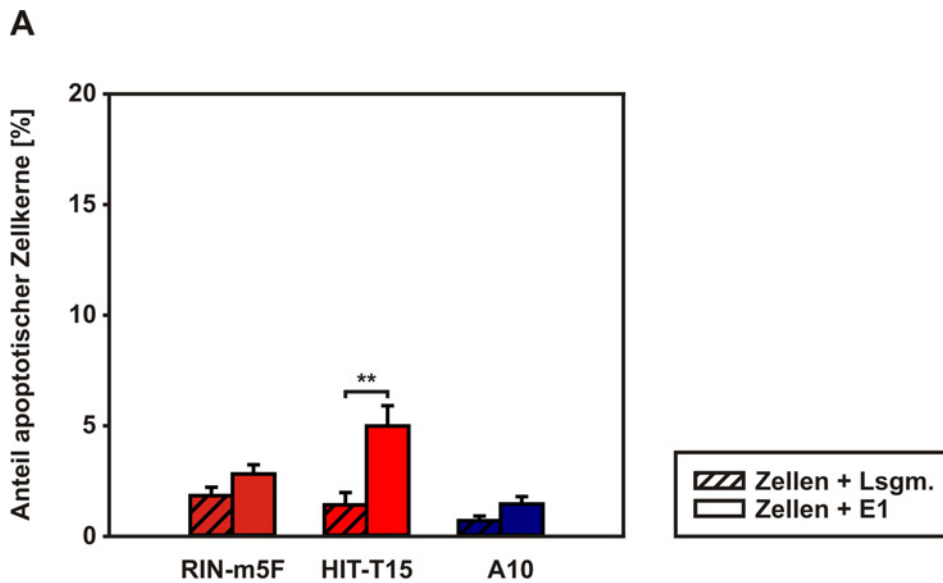
Entsprechende Experimente wurden außerdem mit 100 μ M Estron bzw. dem Lösungsmittel DMSO/Ethanol durchgeführt (Tabelle 4.12 und Abbildung 4.14). Nur bei HIT-T15-Zellen, nicht jedoch bei RIN-m5F- und A-10-Zellen, wurde ein signifikanter Unterschied ($p < 0,01$) zwischen Estron- und Lösungsmittel-behandelten Zellen gemessen. Generell konnte bei HIT-T15-Zellen eine stärkere apoptotische Antwort nach Behandlung mit 17β -Estradiol bzw. Estron nachgewiesen werden als bei RIN-m5F-Zellen.

Die Ergebnisse dieser Experimente mit Estron korrelierten mit den Daten aus vorherigen Versuchen (siehe Abbildung 4.5), welche nachwiesen, dass dieses Estrogen zwar SUR1-spezifische Apoptose induzierte, das Ausmaß jedoch deutlich geringer war als nach Behandlung mit 17β -Estradiol.

Tabelle 4.12: Wirkung von Estron auf klonale β -Zellen und die Gefäßmuskelzelllinie A-10

RIN-m5F-, HIT-T15- sowie A-10-Zellen wurden mit 100 μ M Estron (E1) bzw. mit DMSO/Ethanol (Lsgm.) für 24 h inkubiert und der prozentuale Anteil apoptotisch veränderter Zellkerne wurde quantifiziert.

	Anteil apoptotisch veränderter Zellkerne [%]
RIN-m5F + Lsgm.	$1,8 \pm 0,4$
RIN-m5F + E1	$2,8 \pm 0,4$
HIT-T15 + Lsgm.	$1,4 \pm 0,6$
HIT-T15 + E1	$5,0 \pm 0,9$
A-10 + Lsgm.	$0,7 \pm 0,2$
A-10 + E1	$1,4 \pm 0,3$



B

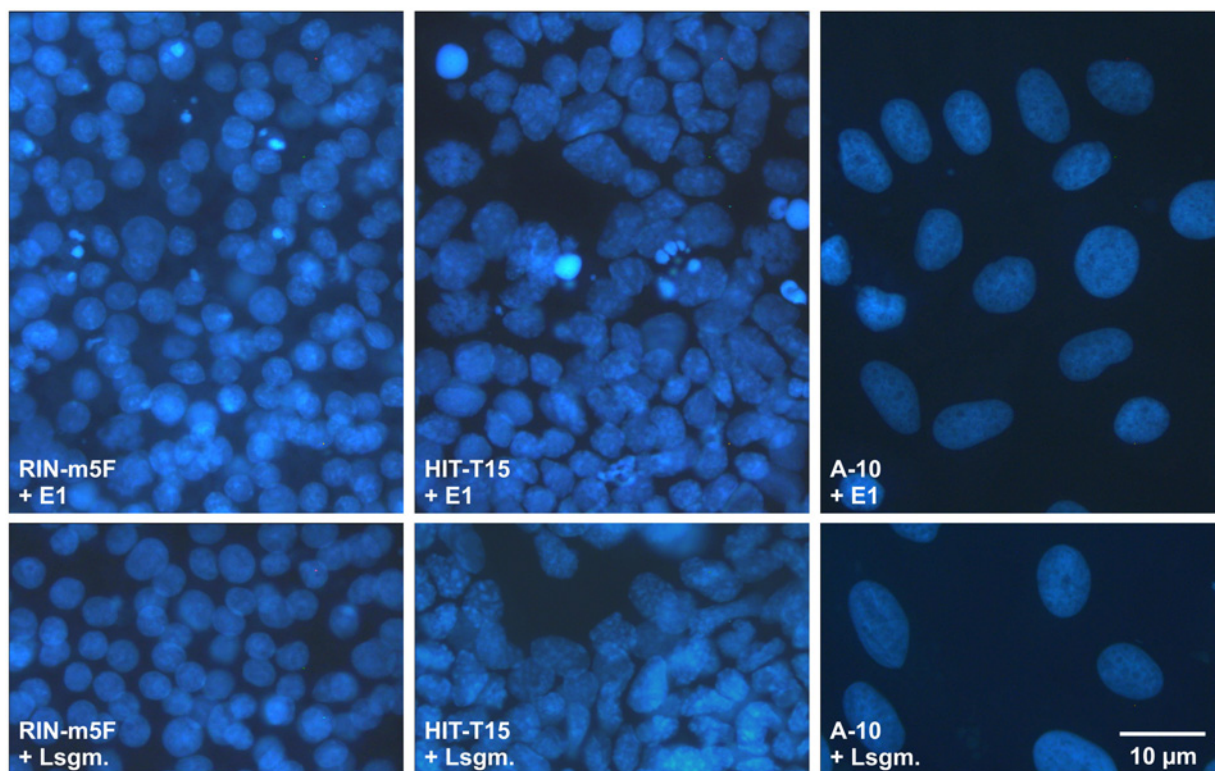


Abbildung 4.14: Wirkung von Estron auf die klonalen β -Zellen RIN-m5F und HIT-T15 sowie die glatten Gefäßmuskelzellen A-10

RIN-m5F-, HIT-T15- sowie A-10-Zellen wurden mit 100 μ M Estron (E1) bzw. mit DMSO/Ethanol (Lsgm.) für 24 h inkubiert. Der prozentuale Anteil apoptotisch veränderter Zellkerne (A) wurde quantifiziert, indem ca. 1500-1600 Zellkerne aus verschiedenen Aufarbeitungen pro Behandlungsgruppe ausgezählt wurden (**, $p < 0,01$). (B) zeigt die Kernmorphologie nach Anfärben mit dem Farbstoff Hoechst 33258. Apoptotisch veränderte Zellkerne sind fragmentiert, kondensiert und hell leuchtend, während die nicht-apoptotisch veränderten Zellkerne eine gleichmäßige Färbung aufweisen.

4.1.9 Wirkung von 17 β -Estradiol auf Langerhans-Inseln von Wildtyp-Mäusen

Neben der Wirkung von 17 β -Estradiol auf rekombinante HEK293-Zellen und auf die klonalen β -Zellen der Zelllinien HIT-T15 und RIN-m5F wurde auch die Wirkung von 17 β -Estradiol auf pankreatische Langerhans-Inseln (Abbildung 4.15) aus männlichen und weiblichen C57BL/6-Mäusen verschiedenen Alters (5-7 bzw. 20-32 Wochen) untersucht. Insgesamt wurden 81 dieser Wildtyp-Mäuse in den Experimenten eingesetzt.

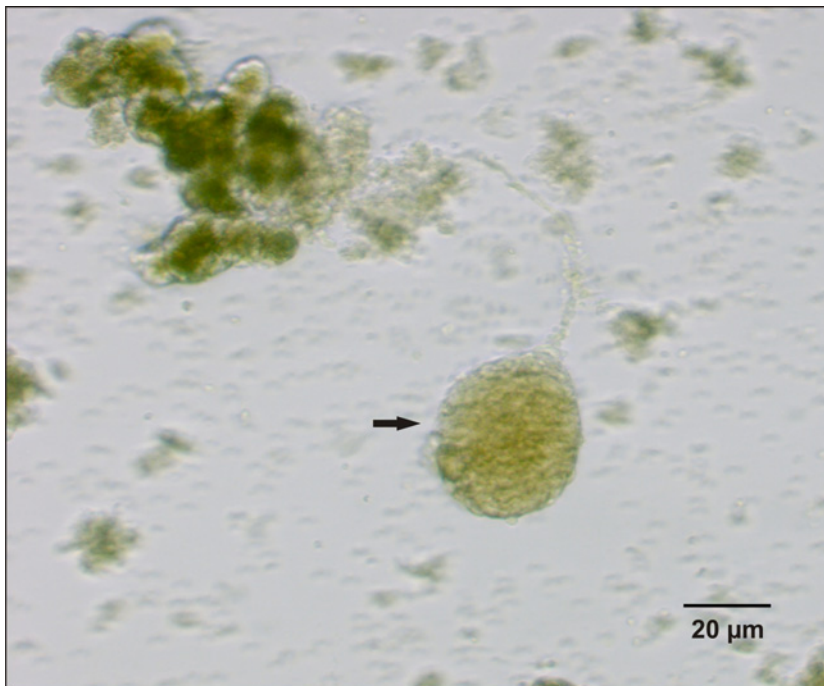


Abbildung 4.15: Langerhans-Insel einer weiblichen Wildtyp-Maus

In der Abbildung ist eine mikroskopische Aufnahme einer Pankreaspräparation nach Kollagenaseverdau mit freiliegender Langerhans-Insel (Pfeil) zu sehen.

Zur Untersuchung des Effektes von 17 β -Estradiol wurden die Langerhans-Inseln isoliert (siehe auch 3.2.1.9.1) und mit 100 μ M 17 β -Estradiol bzw. dem Lösungsmittel DMSO/Ethanol für verschiedene Zeiträume inkubiert. Nach Anfärben der Zellkerne mit dem Farbstoff Hoechst 33258 wurde der Anteil apoptotisch veränderter Zellkerne für jede Insel quantifiziert (siehe Abbildung 4.16 und Tabelle 4.14).

Um ausschließen zu können, dass bereits die Inkubation mit Lösungsmittel einen Effekt auf die Kernmorphologie der Inselzellen ausübte, wurden außerdem unbehandelte Inseln in den Experimenten mitgeführt. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass sich die mit Lösungsmittel behandelten Inselzellen generell nicht von den unbehandelten Inselzellen unterscheiden.

Im Gegensatz zu dem deutlichen apoptotischen Effekt von 17β -Estradiol in HEK293-Zellen, welche SUR1 exprimieren, oder in klonalen β -Zellen, führte die Behandlung isolierter Langerhans-Inseln von Wildtyp-Mäusen mit 17β -Estradiol entweder zur Induktion von Apoptose oder zum Schutz vor apoptotischem Zelltod. Dieser Effekt war zum einen abhängig vom Alter der Mäuse und wurde zum anderen auch vom Geschlecht der Mäuse beeinflusst. Bei der Auswertung der entsprechenden Versuche war darüber hinaus zu beachten, dass a) für mit Lösungsmittel behandelte Inselzellen aus jungen Mäusen (5-7 Wochen) und älteren Mäusen (20-32 Wochen) ein unterschiedlich hohes Ausmaß an Apoptose gemessen wurde, b) dieses Ausmaß außerdem in Männchen und Weibchen unterschiedlich war, und c) die Inselzellen aus jungen oder älteren und/oder männlichen oder weiblichen Mäusen im Verlauf der Kultivierung unterschiedlich beeinflusst wurden.

Behandlung von Langerhans-Inseln aus 20-32 Wochen alten Mäusen mit 17β -Estradiol

Die Behandlung von Langerhans-Inseln aus weiblichen älteren Tieren (20-32 Wochen) mit $100\ \mu\text{M}$ 17β -Estradiol induzierte einen signifikanten Anstieg des prozentualen Anteils apoptotisch veränderter Zellkerne im Vergleich zu Lösungsmittel-behandelten Inseln (Abbildung 4.16B). Der Anteil apoptotisch veränderter Zellkerne stieg nach der 17β -Estradiol-Behandlung für 18 h um das 2-fache und um das 4,5-fache nach einer Inkubationszeit von 72 h an.

In den Inselzellen aus männlichen Mäusen konnte nach Behandlung mit 17β -Estradiol ebenfalls ein geringfügiger Anstieg des prozentualen Anteils apoptotisch veränderter Zellkerne im Vergleich zur Lösungsmittel-Kontrolle nach 18 h nachgewiesen werden. Es gab jedoch keinen Unterschied zwischen den generell höheren Apoptoseraten nach 72 h zwischen den mit Lösungsmittel und den mit 17β -Estradiol behandelten Inselzellen.

Behandlung von Langerhans-Inseln aus 5-7 Wochen alten Mäusen mit 17β -Estradiol

Nach der Behandlung von Langerhans-Inseln aus jungen männlichen bzw. weiblichen Mäusen (5-7 Wochen) mit $100\ \mu\text{M}$ 17β -Estradiol für verschiedene Inkubationszeiträume, war der Anteil apoptotisch veränderter Zellkerne in weiblichen Inselzellen um den Faktor 5,1 (18 h), 3,9 (24 h) oder 5,6 (48 h) reduziert, in männlichen Inselzellen nur um den Faktor 1,5 (18 h) oder 2,7 (24 h, 48 h) (Abbildung 4.16A). Im Allgemeinen war der prozentuale Anteil apoptotisch veränderter Zellkerne in mit Lösungsmittel behandelten Zellen aus jungen Mäusen deutlich höher als in Zellen älterer Mäuse. Außerdem war die Apoptoserate in Inselzellen aus jungen weiblichen Mäusen nach 18-stündiger Behandlung mit Lösungsmittel

signifikant höher als in Inselzellen aus jungen männlichen Mäusen. Nach einer Inkubationsdauer von 48 h war das Ausmaß der apoptotischen Veränderungen in der Kernmorphologie in Inselzellen aus jungen weiblichen Mäusen etwas kleiner als nach 18 h, während bei den jungen männlichen Mäusen nach 48 h ein Anstieg der Apoptoserate zu verzeichnen war.

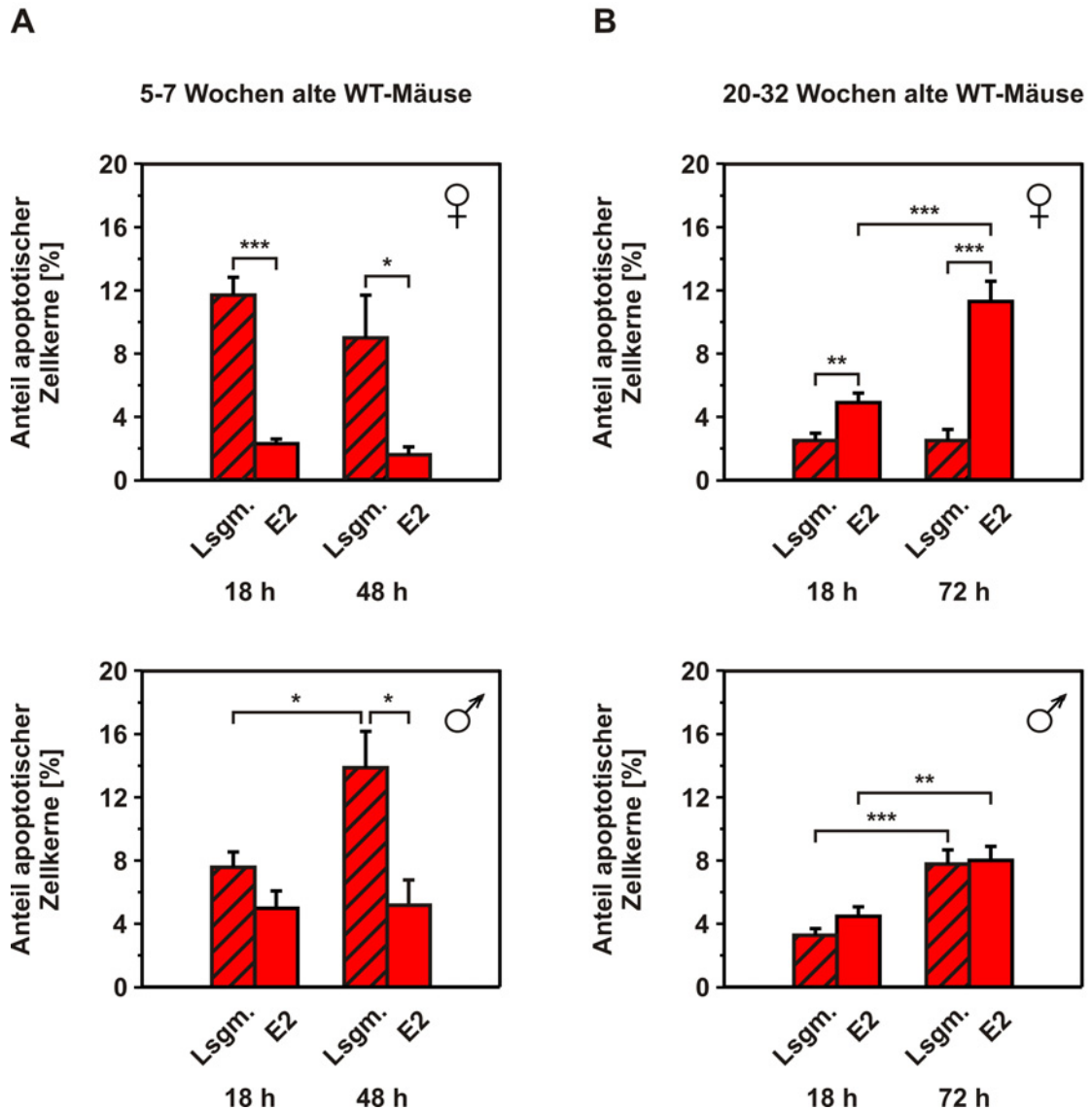


Abbildung 4.16: Wirkung von 17 β -Estradiol auf Langerhans-Inseln von Wildtyp (WT)-Mäusen

Das Ausmaß apoptotischer Veränderungen in der Kernmorphologie pankreatischer Inselzellen aus weiblichen oder männlichen Wildtyp-Mäusen nach der Inkubation mit 100 μ M 17 β -Estradiol (E2) wurde ermittelt, indem Inseln aus 5-7 Wochen alten Mäusen für 18 h bzw. 48 h und Inseln aus 20-32 Wochen alten Mäusen für 18 h bzw. 72 h mit 17 β -Estradiol oder Lösungsmittel (Lsgm.) inkubiert wurden. Nach Anfärbung der Zellkerne mit dem Farbstoff Hoechst 33258 wurde der prozentuale Anteil apoptotisch veränderter Zellkerne an der Gesamtkernzahl quantifiziert. Dabei wurden alle isolierten Inseln (pro Behandlungsgruppe mindestens 23-92 Inseln, d.h. 1700-10.000 Zellkerne) komplett ausgezählt und je ein Mittelwert für alle Inseln einer Maus bestimmt. Die Daten in der Abbildung sind Mittelwerte aus 4-12 verschiedenen Mäusen bzw. 4-8 verschiedenen Aufarbeitungen. p < 0,05; **, p < 0,01; ***, p < 0,001.

4.1.10 Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung von 17 β -Estradiol auf Langerhans-Inseln von Wildtyp-Mäusen

Um die Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung von 17 β -Estradiol auf isolierte Langerhans-Inseln aus älteren (20-32 Wochen) Wildtyp-Mäusen zu untersuchen, wurden diese mit verschiedenen Konzentrationen an 17 β -Estradiol bzw. dem Lösungsmittel DMSO/Ethanol für 72 h inkubiert. Nach Anfärben der Zellkerne mit dem Farbstoff Hoechst 33258 wurde der Anteil apoptotisch veränderter Zellkerne quantifiziert (Abbildung 4.17 und Tabelle 4.13).

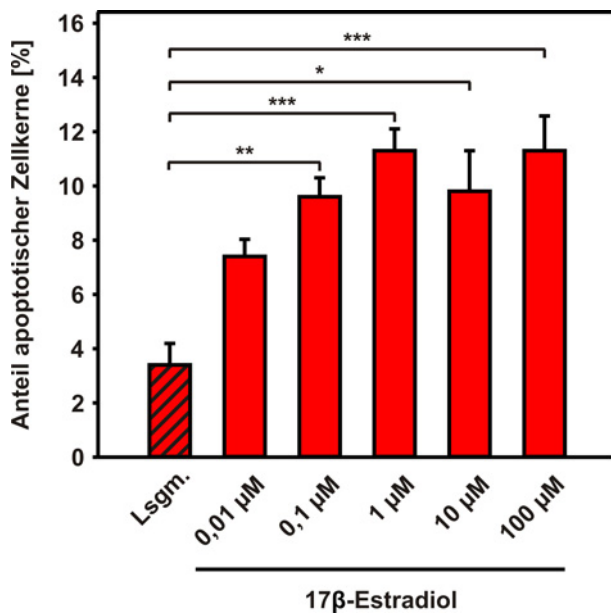


Abbildung 4.17: Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung von 17 β -Estradiol auf die Langerhans-Inseln von Wildtyp-Mäusen

Isolierte Inseln aus 20-32 Wochen alten weiblichen Wildtyp-Mäusen wurden für 72 h mit verschiedenen Konzentrationen an 17 β -Estradiol inkubiert. Anschließend wurden mit Hilfe des Farbstoffs Hoechst 33258 die Zellkerne angefärbt und der Anteil apoptotischer Zellkerne quantifiziert. Pro Behandlungsgruppe wurden je 500-1300 Zellkerne aus 3-7 Mäusen ausgezählt. $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

Tabelle 4.13: Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung von 17 β -Estradiol auf die Langerhans-Inseln von 20-32 Wochen alten weiblichen Wildtyp-Mäusen

Isolierte Inseln aus 20-32 Wochen alten weiblichen Wildtyp-Mäusen wurden für 72 h mit verschiedenen Konzentrationen an 17 β -Estradiol inkubiert. Anschließend wurden mit Hilfe des Farbstoffs Hoechst 33258 die Zellkerne angefärbt und der Anteil apoptotisch veränderter Zellkerne quantifiziert.

Versuchsansatz	Anteil apoptotisch veränderter Zellkerne [%]
Lsgm.	3,4 ± 0,8
0,01 μ M	7,4 ± 0,6
0,1 μ M	9,6 ± 0,7
1 μ M	11,3 ± 0,8
10 μ M	9,8 ± 1,5
100 μ M	11,3 ± 1,3

Signifikante Unterschiede zwischen den mit 17 β -Estradiol und den mit Lösungsmittel behandelten Inselzellen weiblicher Mäuse konnten bereits bei sehr niedrigen 17 β -Estradiol-Konzentrationen gemessen werden. So führte bereits die Inkubation mit 10 nM 17 β -Estradiol für 72 h zu einem deutlichen Anstieg der Apoptoserate im Vergleich zu den mit Lösungsmittel behandelten Zellen; die Effekte von 100 nM und 1 μ M 17 β -Estradiol waren noch stärker ausgeprägt. Mit Konzentrationen \geq 1 μ M wurde hingegen keine weitere Steigerung des apoptotischen Effektes gemessen.

4.1.11 Wirkung von 17 β -Estradiol auf Langerhans-Inseln von Wildtyp-Mäusen im Vergleich zu SUR1-Knockout-Mäusen

Neben der Wirkung von 17 β -Estradiol auf pankreatische Inselzellen aus Wildtyp-Mäusen wurde auch dessen Wirkung auf Inselzellen aus SUR1-Knockout (SUR1KO)-Mäusen verschiedenen Alters (5-7 bzw. 20-32 Wochen) untersucht.

Hierzu wurden die Inseln isoliert (siehe Kapitel 3.2.1.9.1) und mit 100 μ M 17 β -Estradiol bzw. dem Lösungsmittel DMSO/Ethanol für verschiedene Zeiten inkubiert.

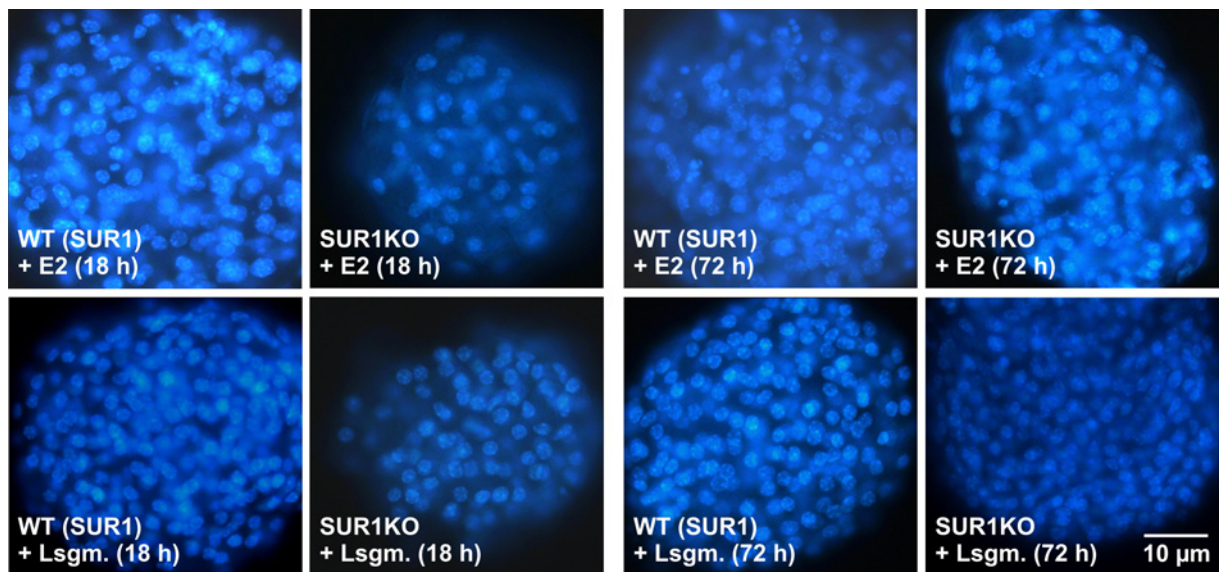


Abbildung 4.18: Wirkung von 17 β -Estradiol auf Langerhans-Inselzellen von Wildtyp-Mäusen im Vergleich zu SUR1-Knockout (SUR1KO)-Mäusen

Das Ausmaß apoptotischer Veränderungen in der Kernmorphologie pankreatischer Inselzellen von 20-32 Wochen alten weiblichen Wildtyp (WT)- bzw. SUR1KO-Mäusen nach der Inkubation mit 100 μ M 17 β -Estradiol (E2) für 18 h bzw. 72 h. Nach Anfärben der Zellkerne mit dem Farbstoff Hoechst 33258 sind apoptotisch veränderte Zellkerne fragmentiert, kondensiert und hell leuchtend, während die nicht-apoptotisch veränderten Zellkerne eine gleichmäßige Färbung aufweisen.

Nach Anfärben der Zellkerne mit dem Farbstoff Hoechst 33258 wurde der Anteil apoptotisch veränderter Zellkerne quantifiziert (siehe Abbildung 4.18 und Abbildung 4.19 sowie Tabelle 4.14). In Kontrollexperimenten mit Wildtyp-Mäusen, die in verschiedenen Tierställen gehalten worden waren, konnte nachgewiesen werden, dass die unterschiedliche Haltung des Instituts für Pharmakologie und des Instituts für Pharmazie (siehe Kapitel 3.2.1.9) offensichtlich keinen Einfluss auf die hier durchgeführten Experimente hatte.

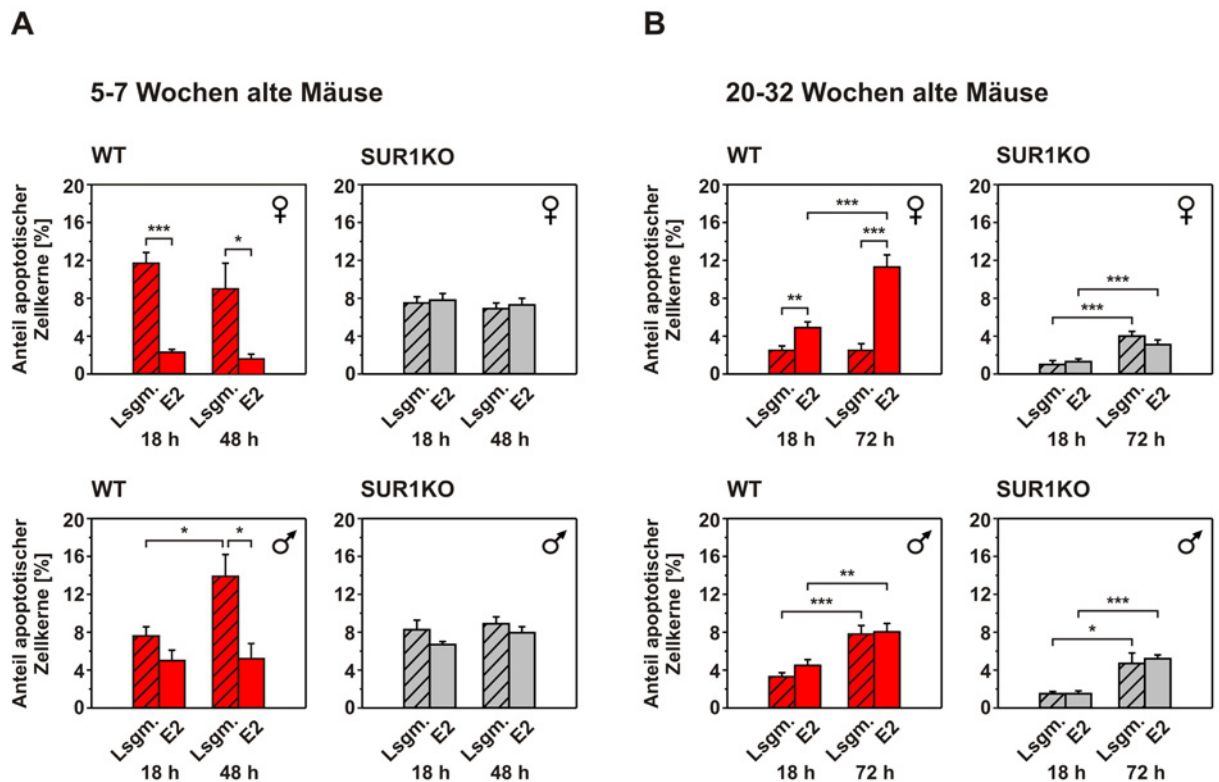


Abbildung 4.19: Wirkung von 17 β -Estradiol auf Langerhans-Inseln von Wildtyp-Mäusen im Vergleich zu SUR1-Knockout (SUR1KO)-Mäusen

Das Ausmaß apoptotischer Veränderungen in der Kernmorphologie pankreatischer Inselzellen aus weiblichen oder männlichen Wildtyp (WT)- (siehe auch Abbildung 4.16) bzw. SUR1KO-Mäusen nach der Inkubation mit 100 μ M 17 β -Estradiol (E2) wurde ermittelt, indem Inseln aus 5-7 Wochen alten Mäusen für 18 h bzw. 48 h und Inseln aus 20-32 Wochen alten Mäusen für 18h bzw. 72 h mit 17 β -Estradiol oder Lösungsmittel (Lsgm.) inkubiert wurden. Nach Anfärbung der Zellkerne mit dem Farbstoff Hoechst 33258, wurde der prozentuale Anteil apoptotisch veränderter Zellkerne an der Gesamtkernzahl quantifiziert. Dabei wurden alle isolierten Inseln (pro Behandlungsgruppe mindestens 12-92 Inseln, d.h. 1700-10000/800-4000 (WT/SUR1KO) Kerne komplett ausgezählt und je ein Mittelwert für alle Inseln einer Maus bestimmt. Die Daten in der Abbildung sind Mittelwerte aus 4-12/4-9 verschiedenen Mäusen bzw. 4-8/3-4 verschiedenen Aufarbeitungen. $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

Im Gegensatz zu den Inselzellen aus Wildtyp-Mäusen, wurde bei den Inselzellen aus SUR1KO-Mäusen, welche mit 17 β -Estradiol oder mit Lösungsmittel behandelt worden waren, kein signifikanter Unterschied bezüglich apoptotischer Veränderungen in der Kernmorphologie gemessen. Dieses Ergebnis wurde sowohl für weibliche als auch männliche

Inselzellen beider Altersgruppen gemessen. Vor allem bei den mit Lösungsmittel behandelten Inselzellen von jungen Mäusen, welche eine generell höhere Apoptoserate aufwiesen, war das Ausmaß der Apoptose in Inselzellen aus SUR1KO-Mäusen etwas niedriger als in Inselzellen aus Wildtyp-Mäusen.

Tabelle 4.14: Wirkung von 17 β -Estradiol auf Langerhans-Inselzellen von Wildtyp-Mäusen im Vergleich zu SUR1-Knockout (SUR1KO)-Mäusen

Das Ausmaß der apoptotischen Veränderungen in der Kernmorphologie pankreatischer Inselzellen aus weiblichen oder männlichen Wildtyp (WT)- bzw. SUR1KO-Mäusen nach der Inkubation mit 100 μ M 17 β -Estradiol (E2) wurde ermittelt, indem nach Anfärbung der Zellkerne mit dem Farbstoff Hoechst 33258, der prozentuale Anteil apoptotisch veränderter Zellkerne an der Gesamtkernzahl quantifiziert wurde.

Alter [Wochen]	Geschlecht der Mäuse	Inkubations- zeitraum	Versuchs- ansatz	Anteil apoptotisch veränderter Zellkerne [%]	
				WT-Mäuse	SUR1KO-Mäuse
5-7	weibl.	18 h	Lsgm.	11,7 \pm 1,1	7,5 \pm 0,7
			E2	2,3 \pm 0,3	7,8 \pm 0,7
		24 h	Lsgm.	9,7 \pm 1,5	-
			E2	2,5 \pm 0,5	-
		48 h	Lsgm.	9,0 \pm 2,7	6,9 \pm 0,6
			E2	1,6 \pm 0,5	7,3 \pm 0,7
	männl.	18 h	Lsgm.	7,6 \pm 1,0	7,9 \pm 1,0
			E2	5,0 \pm 1,1	6,4 \pm 0,3
		24 h	Lsgm.	12,6 \pm 1,7	-
			E2	4,6 \pm 1,3	-
		48 h	Lsgm.	13,9 \pm 2,3	8,5 \pm 0,7
			E2	5,2 \pm 1,6	7,6 \pm 0,6
20-32	weibl.	18 h	Lsgm.	2,5 \pm 0,5	1,0 \pm 0,4
			E2	4,9 \pm 0,6	1,3 \pm 0,3
		72 h	Lsgm.	2,5 \pm 0,7	4,0 \pm 0,5
			E2	11,3 \pm 1,3	3,1 \pm 0,5
	männl.	18 h	Lsgm.	3,3 \pm 0,4	1,5 \pm 0,2
			E2	4,5 \pm 0,6	1,5 \pm 0,3
		72 h	Lsgm.	7,8 \pm 0,9	4,7 \pm 1,1
			E2	8,0 \pm 0,9	5,2 \pm 0,4

5 Diskussion

In verschiedenen Studien wurde nachgewiesen, dass bestimmte Substanzen toxische Nebenwirkungen auf pankreatische β -Zellen haben. So können bei langfristig erhöhter Konzentration nicht nur Glucose sondern auch Lipide den Zelltod von β -Zellen verursachen (Donath und Halban, 2004, Cnop et al., 2005). Auch insulinotrope Medikamente, wie die Sulfonylharnstoffe Glibenclamid und Tolbutamid, können unter bestimmten Versuchsbedingungen eine Steigerung der Apoptose in isolierten pankreatischen Zellen hervorrufen (Efanova et al., 1998, Iwakura et al., 2000, Donath und Halban, 2004, Rustenbeck et al., 2004, Maedler et al., 2005). Die hier zugrunde liegenden Mechanismen sind derzeit noch nicht bekannt. Es wird angenommen, dass die Apoptose von pankreatischen β -Zellen eine Rolle für die Pathophysiologie sowohl von Diabetes Typ 1 als auch Typ 2 spielt (Lee and Pervaiz, 2006).

In vorherigen Arbeiten aus der Arbeitsgruppe (Hambrock et al., 2006 und 2007) konnte nachgewiesen werden, dass der Sulfonylharnstoffrezeptor (SUR) an der Induktion von Apoptose in pankreatischen β -Zellen durch Glibenclamid bzw. durch den Naturstoff *trans*-Resveratrol beteiligt ist. Diese Arbeiten lieferten Hinweise darauf, dass der SUR neben der Regulation der elektrischen Aktivität von pankreatischen K_{ATP} -Kanälen eine zusätzliche Funktion besitzt, welche in der spezifischen Induktion apoptotischer Prozesse durch bestimmte Substanzen besteht.

5.1 17 β -Estradiol moduliert Apoptose in pankreatischen β -Zellen unter Beteiligung des Sulfonylharnstoffrezeptors (SUR) 1

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob es Substanzen gibt, die stärker als Glibenclamid und Resveratrol eine Apoptose in Zellen induzieren können, welche abhängig von der Expression des SUR1 ist. Im Mittelpunkt der Arbeit steht das Steroidhormon 17 β -Estradiol. Es handelt sich hierbei um ein endogen vorkommendes Estrogen, welches strukturelle und funktionelle Analogien zu dem „Phytoestrogen“ Resveratrol aufweist. Ebenso wie Resveratrol ist auch 17 β -Estradiol in der Lage, als K_{ATP} -Kanal-Blocker zu wirken (Tsai et al., 2002, Tsang et al., 2002, Lee et al., 2003, Unemoto et al., 2003, Kocic et al., 2006, Das und Sarkar, 2006). Wie in verschiedenen Untersuchungen gemessen wurde, kann 17 β -Estradiol pankreatische K_{ATP} -Kanäle in physiologischen

Konzentrationen (100 pM bis 1 nM) reversibel schließen (Nadal et al., 1998 und 2004, Al-Majed et al., 2005). Es wird diskutiert, ob 17β -Estradiol direkt mit K_{ATP} -Kanälen (Al-Majed et al., 2005) interagiert oder ob diese Substanz an „nicht-klassische“ plasmalemmale Estrogenrezeptoren bindet, welche derzeit noch nicht identifiziert sind und vermutlich über intrazelluläre Signalkaskaden mit K_{ATP} -Kanälen in Verbindung stehen (Nadal et al., 1998, Soria et al., 2004, Ropero et al., 2006).

17β -Estradiol kann β -Zellen unter bestimmten Bedingungen vor dem Zelltod schützen und somit zum Erhalt der β -Zellmasse beitragen. Choi et al. (2005) haben nachgewiesen, dass 17β -Estradiol und/oder körperliche Bewegung zur Erhöhung der β -Zellfunktion und -masse nach Ovariectomie in diabetischen Ratten führen. Außerdem konnte von Contreras et al. (2002) belegt werden, dass 17β -Estradiol isolierte menschliche Langerhans-Inselzellen vor einem Zelltod schützen kann, welcher durch pro-inflammatorische Cytokine induziert wurde. Auch weiteren Studien von Le May et al. (2006) und Eckhoff et al. (2004) zufolge schützt 17β -Estradiol β -Zellen vor dem Zelltod. Zwar werden Estrogene im Allgemeinen mit einer proliferativen und anti-apoptotischen Wirkung auf Zellen assoziiert, es sind jedoch auch apoptotische Wirkungen dieser Steroidhormone bekannt (Song, 2001). Luo et al. (2008) konnten an glatten Muskelzellen aus der Prostata von Ratten nachweisen, dass 17β -Estradiol sowohl die Proliferation dieser Zellen fördern als auch deren Apoptose induzieren kann. Aufgrund dieser kontroversen Effekte auf Zellen sprechen Santen und Allred (2007) von einem so genannten „estrogen paradox“.

5.1.1 17β -Estradiol verstärkt die Induktion von Apoptose in HEK293-Zellen, welche den SUR1 exprimieren

In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass 17β -Estradiol in HEK293-Zellen, welche die Isoform SUR1 exprimieren, deutlich stärker Apoptose induziert als in Zellen, welche SUR2A oder SUR2B exprimieren. Die Intensität der apoptotischen Antwort in den Zellen, welche SUR2 exprimieren, ist vergleichbar mit derjenigen in Kontrollzellen, welche mit leerem Expressions-Vektor transfiziert (pcDNA-Zellen) worden waren. Diese erhöhte Empfindlichkeit von Zellen, welche SUR1 exprimieren, gegenüber 17β -Estradiol wurde mit Hilfe verschiedener apoptotischer Parameter wie Zellablösung vom Kulturschalenboden, Veränderung in der Zellkernmorphologie sowie durch Messung der Caspase-3-Aktivität nachgewiesen. Für Zellen, welche SUR1 exprimieren, wurden nach Behandlung mit 17β -Estradiol bezüglich aller untersuchter Parameter erhöhte Werte im Vergleich zu den

pcDNA-Zellen gemessen. Auch in diesen Kontrollzellen konnte zwar Apoptose nachgewiesen werden, jedoch in einem deutlich geringeren Ausmaß als in Zellen, welche SUR1 exprimieren. Allerdings waren in Zellen, welche SUR1 exprimieren, im Vergleich zu den pcDNA-Kontrollzellen bereits nach Behandlung mit Lösungsmittel Unterschiede in der Caspase-3-Aktivität zu messen. Bezüglich der Zellablösung und der Veränderung in der Zellkernmorphologie ist dieser Unterschied jedoch nicht vorhanden. Möglicherweise wird durch die Expression von SUR1 bereits ohne zusätzliche Behandlung eine gewisse Erhöhung der Caspase-3-Aktivität in der Zelle induziert. Dies könnte eventuell durch eine Interaktion von SUR1 mit endogenen Bestandteilen der HEK293-Zellen verursacht werden.

Zusammengefasst konnte wie bereits für Glibenclamid und Resveratrol (Hambrock et al., 2006 und 2007), auch für 17 β -Estradiol eine apoptotische Wirkung nachgewiesen werden, welche spezifisch für die Expression des SUR1 ist. Das Ausmaß der Induktion von Apoptose durch 17 β -Estradiol war jedoch deutlich stärker als durch die Behandlung mit Glibenclamid oder Resveratrol. Außerdem scheinen rekombinante HEK293Zellen, in welchen die pankreatische Isoform SUR1 exprimiert wird, empfindlicher gegenüber 17 β -Estradiol-induzierter Apoptose zu sein, als Zellen, in welchen die cardiale Isoform SUR2A bzw. die vaskuläre Isoform SUR2B exprimiert wird.

5.1.2 17 β -Estradiol moduliert Apoptose in Zellen, welche den SUR1 endogen exprimieren

Um auszuschließen, dass dieser für den SUR1 spezifische Effekt nach der Behandlung mit 17 β -Estradiol nur ein Artefakt der Expression im rekombinanten Zellsystem war, wurden außerdem Experimente mit Zellen durchgeführt, welche SUR1 endogen exprimieren.

So wurde in Untersuchungen an Zellen der klonalen β -Zelllinien HIT-T15 (Santerre et al., 1981, Lord und Ashcroft, 1984, Aguilar-Bryan et al., 1992) und RIN-m5F (Gazdar et al., 1980, Bhathena et al., 1984, Miller et al., 1999) nachgewiesen, dass durch 17 β -Estradiol auch in diesen Zellen Apoptose induziert werden kann. Nach Behandlung mit 17 β -Estradiol kam es in diesen Zellen zu einer starken Kondensation und Fragmentierung der Zellkerne. Bei Zellen der klonalen Gefäßmuskelzelllinie A-10 (Kimes und Brandt, 1976, Miller et al., 1999), welche endogen SUR2B exprimieren, war der Unterschied nach Behandlung mit 17 β -Estradiol im Vergleich zur Behandlung mit Lösungsmittel hingegen deutlich schwächer ausgeprägt. Diese Ergebnisse korrelieren mit den Versuchsergebnissen, welche beweisen, dass 17 β -Estradiol in HEK293-Zellen, welche SUR1 exprimieren, eine deutlich stärkere

Apoptose induziert als in HEK293-Zellen, welche SUR2B exprimieren (vgl. Kapitel 5.1.1). In manchen Kernen der A-10-Zellen traten nach Behandlung mit 17 β -Estradiol blasenartige Veränderungen in der Kernmorphologie auf. Hierbei handelt es sich allerdings vermutlich nicht um apoptotische Veränderungen.

Eine deutliche Induktion von Apoptose durch 17 β -Estradiol konnte ebenso in pankreatischen Inselzellen aus Mäusen im Alter von 20-32 Wochen nachgewiesen werden. Auch die β -Zellen der Langerhans-Inseln exprimieren SUR1 endogen (Inagaki et al., 1995b, Sakura et al., 1995a, Clement et al., 1997, Shyng und Nichols, 1997). In den Inselzellen aus weiblichen 20-32 Wochen alten Wildtyp-Mäusen konnte nach Behandlung mit 17 β -Estradiol eine deutlich ausgeprägte Kondensierung und Fragmentierung der Zellkerne nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu, war nach Behandlung mit 17 β -Estradiol in Inselzellen aus SUR1KO-Mäusen des gleichen Alters, ebenso wie in Inselzellen aus Wildtyp- oder SUR1KO-Mäusen nach Behandlung mit Lösungsmittel bzw. ohne Behandlung, kaum Apoptose zu messen. Das Ausbleiben der starken Apoptose nach Behandlung mit 17 β -Estradiol bei Experimenten mit Inselzellen aus SUR1KO-Mäusen liefert einen weiteren Hinweis für einen Zusammenhang zwischen der Expression von SUR1 und der durch 17 β -Estradiol induzierten Apoptose.

Allerdings führte die Behandlung von pankreatischen Inselzellen aus älteren männlichen Wildtyp- und SUR1KO-Mäusen mit 17 β -Estradiol zu keiner nennenswerten Erhöhung der Apoptoserate im Vergleich zu den mit Lösungsmittel behandelten Inselzellen. Auffallend ist hierbei, dass das Ausmaß der Apoptose in Inselzellen, die mit Lösungsmittel behandelt worden waren, größer ist als bei den entsprechenden weiblichen Mäusen.

Im Gegensatz zu der klaren Induktion von Apoptose in den Inselzellen aus älteren Mäusen, konnte nach Behandlung von Inselzellen aus jungen Mäusen (Alter: 5-7 Wochen) mit 17 β -Estradiol eine deutliche *anti-apoptotische* Wirkung nachgewiesen werden. Auch dieser *protektive* Effekt ist spezifisch für die Expression von SUR1, da er in entsprechenden Experimenten mit Inselzellen aus SUR1KO-Mäusen ausblieb. In den Inselzellen aus jungen Mäusen wurde nach Behandlung mit Lösungsmittel bzw. ohne Behandlung starke Apoptose nachgewiesen, welche durch die Inkubation mit 17 β -Estradiol reduziert wurde. Diese erhöhte basale Apoptoserate steht möglicherweise im Zusammenhang mit einer ausgeprägten adaptiven Veränderung der β -Zellmasse in diesem frühen Entwicklungsstadium (Kassem et al., 2000).

Die Apoptoserate in unbehandelten bzw. mit Lösungsmittel behandelten Inselzellen aus älteren Mäusen war vergleichsweise niedrig, was möglicherweise darauf zurückzuführen ist, dass eine Veränderung der β -Zellmasse im erwachsenen Alter vermindert ist (Kassem et al.,

2000, Butler et al., 2007). In den Inselzellen aus älteren Mäusen führte die Behandlung mit 17β -Estradiol zur Induktion von Apoptose, analog zu den vorliegenden Experimenten mit Zelllinien, welche den SUR1 exprimieren.

Ein Schutz von β -Zellen vor Apoptose kann einen interessanten Ansatz in der pharmakologischen Diabetes-Therapie darstellen, beispielsweise nach der Transplantation von Langerhans-Inseln (Baggio und Drucker, 2006, Butler et al., 2007, de Koning et al., 2008). Zum einen wurde die Verwendung von 17β -Estradiol für den Erhalt der β -Zellmasse vorgeschlagen, da dieses Steroidhormon unter bestimmten Versuchsbedingungen *protektive* Effekte auf β -Zellen ausübte (Contreras et al., 2002, Eckhoff et al., 2004, Choi et al., 2005, Le May et al., 2006). Zum anderen sind jedoch auch *apoptotische* Wirkungen von 17β -Estradiol auf Zellen bekannt (Song, 2001, Luo et al., 2008). Die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen sowohl *anti-apoptotischen* als auch *pro-apoptotischen* Effekte von 17β -Estradiol auf Zellen könnten möglicherweise eine gute Erklärung für die in der Literatur beschriebenen unterschiedlichen Wirkungen dieses Steroidhormons liefern (Negulescu et al., 2002, Santen und Allred, 2007, Luo et al., 2008). Auffallend ist, dass in den Studien, welche von einem *protektiven* (Schutz vor Zelltod) Effekt von 17β -Estradiol in β -Zellen berichten (Contreras et al., 2002, Eckhoff et al., 2004, Le May et al., 2006), entweder Inseln von jungen Tieren verwendet wurden oder die Inseln mit apoptotischen Stimuli, wie z.B. Cytokine, Streptozotocin oder H_2O_2 , vorbehandelt wurden.

Den vorliegenden Versuchsergebnissen ist zu entnehmen, dass sowohl das Alter als auch das Geschlecht der Organismen wichtige Faktoren darstellen, welche Einfluss auf die Wirkungsweise von 17β -Estradiol nehmen. Diese Erkenntnis muss bei der Erforschung *protektiver* bzw. *apoptotischer* Wirkungen bestimmter Substanzen auf Zellen berücksichtigt werden. Auch Maedler et al. (2006) berichten von einer Korrelation zwischen Alter und Veränderungen im Umsatz der β -Zellen und einer erhöhten Sensibilität gegenüber Glucose-induzierter Apoptose von β -Zellen, was eine Erklärung für die erhöhte Inzidenz von Diabetes Typ 2 mit zunehmendem Alter sein könnte.

5.1.3 17 β -Estradiol induziert in HEK293-Zellen, welche den SUR1 exprimieren, deutlich stärker Apoptose als andere ausgewählte Substanzen

Neben 17 β -Estradiol wurden weitere ausgewählte Substanzen im Hinblick auf ihre Fähigkeit zur Auslösung einer Apoptose untersucht, welche spezifisch für die Expression von SUR1 ist. So wurden Experimente mit einem weiteren endogen vorkommenden Estrogen, dem Estron, durchgeführt. Estron unterscheidet sich von 17 β -Estradiol ausschließlich darin, dass am Kohlenstoffatom an Position 17 anstelle einer Hydroxylgruppe eine Carbonylgruppe vorhanden ist (siehe Kapitel 1.4.1 und 4.1.2.1). Trotz dieses relativ geringfügigen strukturellen Unterschiedes, führte die Behandlung von HEK293-Zellen, welche den SUR1 exprimieren, sowie HIT-T15- und RIN-m5F-Zellen mit Estron zwar zu einem für die Expression von SUR1 spezifischen, aber deutlich schwächeren apoptotischen Effekt als eine vergleichbare Behandlung mit 17 β -Estradiol. Die Hydroxylgruppe scheint somit von großer Bedeutung für diese ausgeprägte SUR1-spezifische Induktion von Apoptose zu sein.

17 β -Estradiol führte nach 24 h außerdem zu einer deutlich stärkeren Apoptose in HEK293-Zellen, welche SUR1 exprimieren, als es für den Sulfonylharnstoff Glibenclamid nach 48 h (> 4,5-fache Verstärkung des Effektes) und das „Phytoestrogen“ Resveratrol nach 24 h (3-fache Verstärkung des Effektes) gemessen wurde (vgl. Hambrock et al., 2006 und 2007). Mit 17 β -Estradiol konnte demnach ein endogener K_{ATP} -Blocker identifiziert werden, welcher deutlich stärkere Apoptose induziert als die Blocker Glibenclamid (Hambrock et al., 2006) und Resveratrol (Hambrock et al., 2007).

Im Gegensatz zur Auslösung dieser für den SUR1 spezifischen Apoptose durch die genannten Substanzen, konnte für den klassischen Apoptose-Induktor Etoposid keine SUR-abhängige Induktion von Apoptose gemessen werden (Hambrock et al., 2006 und 2007).

Auch Zimtsäure oder Pterostilben haben nicht die Fähigkeit zur Induktion einer für SUR1 spezifischen Zellablösung vom Schalenboden. Laut Castelli et al. (1999) ist Zimtsäure zwar in der Lage, durch die Plasmamembran zu gelangen, nach Behandlung der Zellen mit dieser Substanz konnte jedoch auch nach 96 h keine Zunahme der Zellablösung im Vergleich zu den Zellen, welche mit Lösungsmittel behandelt wurden, gemessen werden. Dieser ausbleibende Effekt ist möglicherweise auf das Fehlen des zweiten aromatischen Ringes bei der Zimtsäure zurückzuführen, welcher bei Resveratrol vorhanden ist (siehe Kapitel 4.1.2).

Pterostilben induzierte nach 24 h zwar eine generell verstärkte Zellablösung in der Kulturschale, allerdings konnten keine spezifischen Unterschiede zwischen Zellen, welche SUR1 exprimieren, und pcDNA-Zellen gemessen werden. Im Gegensatz zu Resveratrol sind

bei Pterostilben die beiden Hydroxylgruppen am zweiten aromatischen Ring methyliert. Möglicherweise sorgt diese Methylierung für das Ausbleiben des von SUR1 abhängigen apoptotischen Effekts nach Pterostilben-Behandlung (siehe Kapitel 4.1.2).

5.1.4 Das Ausmaß des apoptotischen Effektes von 17 β -Estradiol auf Zellen, welche den SUR1 exprimieren, ist abhängig von Konzentration und Inkubationszeit

Die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden größtenteils mit einer Konzentration von 100 μ M 17 β -Estradiol und einem Inkubationszeitraum von 24 h durchgeführt, um die Ergebnisse mit vorherigen Experimenten (Hambrock et al., 2006 und 2007) besser vergleichen zu können und um klare Effekte nach kurzer Behandlungsdauer zu sehen. Auch störende Faktoren, wie Zellalterung, Nährstoffmangel oder die Anreicherung toxischer Metabolite sollten vermieden werden. Klare apoptotische Effekte konnten allerdings auch schon bei deutlich niedrigeren Konzentrationen und längeren Inkubationszeiträumen nachgewiesen werden. So traten in Experimenten mit HEK293-Zellen nach 96 h bereits ab einer 17 β -Estradiol-Konzentration von 1 μ M hochsignifikante Unterschiede zwischen Zellen, welche SUR1 exprimieren, und pcDNA-Kontrollzellen auf.

In den Zellen isolierter Langerhans-Inseln (weibliche Mäuse, Alter: 20-32 Wochen) wurde bereits nach Behandlung mit 10 nM 17 β -Estradiol für 3 Tage eine deutliche Apoptose gemessen. Die Inselzellen sind offensichtlich empfindlicher gegenüber der Behandlung mit niedrigeren Konzentrationen an 17 β -Estradiol als rekombinante HEK293-Zellen, welche SUR1 exprimieren. Auch in vorherigen Versuchen der Arbeitsgruppe (Hambrock et al., 2006) mit Glibenclamid im HEK293-Zellsystem waren höhere Konzentrationen nötig, um den für den SUR1 spezifischen apoptotischen Effekt zu erzielen, während Maedler et al. (2005) eine signifikante apoptotische Wirkung in isolierten Langerhans-Inseln des Menschen bereits nach einer 4-tägigen Behandlung mit 1-10 nM Glibenclamid nachweisen konnten.

Im menschlichen Organismus kommt es während der Schwangerschaft zu einem beträchtlichen Anstieg der Konzentration an 17 β -Estradiol. Im dritten Schwangerschaftstrimester können Konzentrationen von ungefähr 50 bis 100 nM erreicht werden (Loriaux et al., 1972, Lindberg et al., 1974, de Hertogh et al., 1975). Im Vergleich zu den Serumkonzentrationen während des Menstruationszyklus (Follikelphase: ca. 0,1-1,0 nM; Lutealphase: ca. 0,5-2,0 nM) kann in dieser Phase der Schwangerschaft die Konzentration an 17 β -Estradiol im Serum der Mutter um bis zu mehr als das 100-fache erhöht sein (Abraham et al., 1972). Vorstellbar

wäre außerdem, dass noch weitaus niedrigere Konzentrationen an 17β -Estradiol als 10 nM über einen längeren Zeitraum apoptotische Effekte induzieren können.

Wie verschiedenen Studien zu entnehmen ist, wird Gestationsdiabetes (GDM) nicht ausschließlich durch eine Verstärkung der Insulinresistenz verursacht, sondern auch durch ein breites Spektrum anderer Faktoren (Buchanan et al., 2007). Es gibt verschiedene Untersuchungen, in welchen erhöhte Konzentrationen an 17β -Estradiol im Serum bei schwangeren Frauen mit GDM, im Vergleich zu gesunden Schwangeren nachgewiesen wurden (Montelongo et al., 1992, Couch et al., 1998). Grigorakis et al. (2000) hingegen haben keine signifikanten Unterschiede bezüglich der 17β -Estradiol-Konzentrationen bei normalgewichtigen Frauen mit GDM und gesunden Schwangeren gemessen. Laut Livingstone und Collison (2002) leisten physiologische Konzentrationen von 17β -Estradiol und Testosteron einen Beitrag zur normalen Insulin-Sensitivität. Außerhalb dieses „normalen“ physiologischen Konzentrationsbereichs, beispielsweise während einer Schwangerschaft, können diese Steroide jedoch offensichtlich zu einer Insulinresistenz führen (Hollingsworth, 1983, Rajkhowa et al., 1994, Legro et al., 1999).

Durch 17β -Estradiol vermittelte Veränderungen in der β -Zellmasse könnten einen interessanten Aspekt im Bezug auf die möglichen Ursachen für die Entwicklung von Gestationsdiabetes darstellen. Diese Überlegung würde mit der Erkenntnis von van Assche et al. (1980) übereinstimmen, dass bei schwangeren diabetischen Ratten die Anzahl der β -Zellen nicht in dem Ausmaß zunimmt, wie es im Vergleich bei schwangeren nicht-diabetischen Ratten der Fall ist.

5.1.5 Die durch 17β -Estradiol induzierte und für den SUR1 spezifische Apoptose erfordert nicht die Existenz von Kir6.2

Der K_{ATP} -Kanal in β -Zellen des Pankreas setzt sich aus der regulatorischen Untereinheit SUR1 und der porenbildenden Untereinheit Kir.6.2 zusammen. Mit Hilfe von co-transfizierten HEK293-Zellen wurde in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen, dass eine zusätzliche Expression von Kir6.2 den apoptotischen Effekt von 17β -Estradiol bei Zellen, welche SUR1 exprimieren, nur geringfügig verstärkt. Allgemein geht man davon aus, dass die gemeinsame Expression von SUR und Kir die Voraussetzung für den Transport beider Untereinheiten aus der Zelle zur Plasmamembran und für die Ausbildung funktionsfähiger K_{ATP} -Kanäle ist (Neagoe und Schwappach, 2005). Allerdings könnte eine solche Transportkontrolle durchaus auch durch andere Faktoren beeinflusst werden. So können beispielsweise

die Temperatur oder die Art der untersuchten Zelllinie eine Rolle spielen (Giblin et al., 2002). Nach Mikhailov et al. (1998) kann das Transportverhalten eines Proteins im rekombinanten System durch die Überexpression des jeweiligen Proteins beeinflusst werden. In einigen Untersuchungen wurde nachgewiesen, dass SUR bzw. SUR-ähnliche Proteine neben der plasmalemalen Lokalisation auch intrazellulär, z.B. in Insulin-sezernierenden Vesikeln, lokalisiert sein können (Carpentier et al., 1986, Ozanne et al., 1995, Barg et al., 1999, Geng et al., 2003). Daher wird von Neagoe and Schwappach (2005) gefolgert, dass es verschiedene intrazelluläre Transportwege für die K_{ATP} -Kanal-Untereinheiten gibt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, dass die durch 17β -Estradiol induzierte und für den SUR1 spezifische Apoptose unabhängig von der Existenz funktionsfähiger pankreatischer K_{ATP} -Kanäle (SUR1 und Kir6.2) erfolgt. Diese Daten unterstützten die Hypothese einer zusätzlichen Funktion von SUR1, die der Rezeptor neben seiner regulatorischen Funktion im K_{ATP} -Kanal ausübt (Hambrock et al., 2006 und 2007).

5.1.6 Verschiedene Mutationen im SUR beeinflussen die apoptotische Wirkung von 17β -Estradiol

Um ein besseres Verständnis für die pharmakologischen Eigenschaften des Sulfonylharnstoffrezeptors (SUR) zu erlangen, wurde in der vorliegenden Arbeit die Bedeutung verschiedener Molekülregionen dieses Rezeptors auf den apoptotischen Effekt von 17β -Estradiol analysiert.

Hierbei wurde sowohl der Einfluss bestimmter Mutationen in der Transmembranhelix 17 als auch in der zweiten Nukleotidbindungsfalte (NBF2) des SUR untersucht.

5.1.6.1 Mutationen in der Transmembranhelix 17 des SUR beeinflussen die apoptotische Wirkung von 17β -Estradiol

Innerhalb der Familie der ATP-bindenden Kassettenproteine (ABC-Proteine), zu welcher der SUR gehört, ist die letzte carboxyterminale Transmembranhelix stark konserviert und spielt eine große Rolle in der Bindung bzw. dem Transport von Substraten (Ito et al., 2001b, Oleschuk et al., 2003). Glucuronidiertes 17β -Estradiol ist ein Transportsubstrat verschiedener Multidrug Resistance-Related Proteine (MRPs). Der Transport von 17β -Estradiol 17-(β -D-Glucuronid) wird durch Mutationen in der Transmembranhelix 17 (TM17) dieser MRPs reduziert (Ito et al., 2001a und 2001b, Zhang et al., 2002).

Mutationen in der TM17 von SUR können die Affinität von Kanal-Modulatoren beeinflussen (Moreau et al., 2000, Hambrock et al., 2004). Hambrock et al. (2004) konnten eine direkte Beteiligung der Aminosäuren an den Positionen 1285 und 1289 an der Bindung verschiedener K_{ATP} -Kanal-Öffner an SUR1 nachweisen. Die Aminosäuresequenz in der TM17 ist bei SUR1 und SUR2B weitgehend identisch, sie unterscheiden sich in nur fünf Aminosäuren.

Bei der Mutanten SUR1(M1289T) wurde die Aminosäure Methionin an der Position 1289 von SUR1 durch die korrespondierende Aminosäure Threonin von SUR2B ausgetauscht. Durch diese Punktmutation wird der für den SUR1 spezifische apoptotische Effekt nach Behandlung mit 17β -Estradiol komplett aufgehoben, offensichtlich ohne die Bindung dieser Substanz an SUR1 direkt zu beeinflussen (Ackermann et al., 2008). In vorherigen Arbeiten der Arbeitsgruppe konnte ein ähnlicher Effekt für die K_{ATP} -Kanal-Blocker Glibenclamid (Hambrock et al., 2006) und Resveratrol (Hambrock et al., 2007) nachgewiesen werden. Somit gibt es keine direkte Korrelation zwischen der Affinität von SUR1 bzw. SUR1(M1289T) für 17β -Estradiol und dem Ausmaß der apoptotischen Wirkung dieser Substanz auf Zellen, die SUR1 bzw. SUR1(M1289T) exprimieren.

Anhand elektrophysiologischer Experimente konnten Moreau et al. (2000) nachweisen, dass die SUR1(M1289T)-Mutante zusammen mit Kir6.2 funktionsfähige K_{ATP} -Kanäle ausbilden kann, was unter anderem ein Hinweis darauf ist, dass diese SUR1-Mutante exprimiert wird und zusammen mit dem Kir zur Plasmamembran transportiert werden kann.

Bei SUR2B(T1254M) wurde eine zu SUR1(M1289T) inverse Mutation eingebaut. Hierbei wurde die Aminosäure Threonin an der Position 1254 in der Transmembranhelix 17 von SUR2B durch die korrespondierende Aminosäure von SUR1, das Methionin, ausgetauscht. Um zu untersuchen, ob 17β -Estradiol ein spezifischer Ligand des SUR ist, wurden in der Arbeitsgruppe außerdem heterologe Kompetitionsexperimente durchgeführt. Als Radioligand wurde ^3H -markiertes Glibenclamid, ein K_{ATP} -Kanal-Blocker, und als Inhibitor 17β -Estradiol eingesetzt. Hierfür wurde außerdem an der Position 1206 von SUR2B(T1254M) das Tyrosin durch die korrespondierende SUR1-Aminosäure, das Serin, ausgetauscht. Diese Mutation erhöht die Affinität der Isoform SUR2B für Glibenclamid, welche normalerweise im Vergleich zu SUR1 eine deutlich geringere Affinität für diesen Liganden besitzt. Wie in früheren Versuchen von Bernardo de Oliveira Franz (2008) nachgewiesen wurde, hat die Mutation SUR2B(Y1206) keinen Einfluss auf die Induktion von Apoptose durch Resveratrol. In Rahmen der vorliegenden Arbeit führte auch die Mutation SUR2B(T1254M) zu keiner Steigerung der Apoptoserate nach Behandlung mit 17β -Estradiol, verglichen mit SUR2B.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Aminosäure Methionin an der Position 1289 in der Transmembranhelix 17 offensichtlich von großer Bedeutung für die durch 17 β -Estradiol induzierte Apoptose ist, welche spezifisch von der Expression des SUR1 abhängt. Im umgekehrten Fall ist der entsprechende Aminosäureaustausch T1254M bei SUR2B offensichtlich nicht ausreichend, um bei SUR2B eine erhöhte Sensibilität gegenüber der durch 17 β -Estradiol induzierten Apoptose zu erzeugen.

Viele ABC-Transporter besitzen in der Transmembranhelix 17 einen hochkonservierten Tryptophan-Rest, welcher von großer Bedeutung für den Transport verschiedener Substrate bei diesen ABC-Proteinen ist (Ito et al., 2001b, Zhang et al., 2002, Oleschuk et al., 2003). Er befindet sich bei SUR1 an der Position 1296. Hiller et al. (2006) konnten nachweisen, dass die Mutation SUR1(W1296A), bei der das Tryptophan durch die Aminosäure Alanin ausgetauscht wurde, anders als die Mutante SUR1(M1289T) (Hambrock et al. 2004), nicht die Bindung verschiedener K_{ATP} -Kanal-Öffner, sondern die Bindungseigenschaften des Kanal-Blockers Glibenclamid beeinflusst.

Die Punktmutation an Position 1296 von SUR1 führte, wie auch die Mutation SUR1(M1289T), zur Aufhebung des für den SUR1 spezifischen apoptotischen Effekts nach Behandlung mit 17 β -Estradiol.

Diese Daten weisen auf eine große Bedeutung der Transmembranhelix 17 für die spezifische Induktion von Apoptose durch 17 β -Estradiol in Zellen hin, welche SUR1 exprimieren.

5.1.6.2 Mutationen in der Nukleotidbindungsfalte des SUR1 verstärken die apoptotische Wirkung von 17 β -Estradiol

Um zu untersuchen, ob die durch den SUR1 vermittelte Apoptose in Zellen nach Behandlung mit 17 β -Estradiol an eine korrekte Funktion der Nukleotidbindungsfalten gekoppelt ist, wurden Versuche mit den Mutanten SUR1(R1379C) bzw. SUR1(R1379L) durchgeführt. Beide Mutationen befinden sich in der zweiten Nukleotidbindungsfalte und führen zu einer gesteigerten ATP-Hydrolyse des SUR (de Wet et al., 2007b). Diese Punktmutationen wurden in Patienten mit vorübergehendem neonatalem Diabetes gefunden, in deren Familien zum Teil gehäuft Diabetes Typ 2 oder Gestationsdiabetes aufgetreten war (Babenko et al., 2006, de Wet et al., 2007b, Vaxillaire et al., 2007).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass diese SUR1-Mutanten eine deutlich erhöhte Empfindlichkeit gegenüber der durch 17 β -Estradiol induzierten Apoptose besitzen als Zellen, welche SUR1 exprimieren. Die Funktion der Nukleotidbindungsfalten

von SUR1 scheint in diesem Zusammenhang von großer Bedeutung zu sein. Hiermit wurden Mutanten gefunden, welche anders als die Mutante SUR1(M1289T), nicht die Empfindlichkeit gegenüber der durch 17 β -Estradiol induzierten Apoptose herabsetzen, sondern sie sogar steigern. Für die Patienten mit einer solchen Mutation könnte diese Erkenntnis von großer Bedeutung für die Pathophysiologie von Diabetes sein.

Zusammenfassend kann man sagen, dass Mutationen im SUR den Effekt des endogen vorkommenden 17 β -Estradiol beeinflussen können und somit von großer pathophysiologischer Bedeutung für die Entstehung von Krankheiten, wie z.B. Krebs oder Diabetes sind.

5.1.7 17 β -Estradiol steigert die Aktivität von Caspase-3, -8 und -9 in HEK293-Zellen, welche den SUR1 exprimieren

Um Hinweise darüber zu erhalten, über welche zellulären Signalwege 17 β -Estradiol in Zellen, welche SUR1 exprimieren, Apoptose auslöst, wurde neben der Aktivität der zentralen Caspase-3 auch die Aktivität von Caspase-8 und -9 gemessen. Caspase-8 gilt als Schlüsselenzym des extrinsischen Signalweges (Peter und Krammer, 2003, Riedl und Shi, 2004), Caspase-9 ist von großer Bedeutung für den intrinsischen Signalweg der Apoptose (Li et al., 1997, Rodriguez und Lazebnik, 1999, Saleh et al., 1999, Jiang und Wang, 2000, Nelson und Cox, 2008). Für alle drei Caspasen wird eine deutlich erhöhte Aktivität nach Behandlung mit 17 β -Estradiol gemessen, welche spezifisch von der Expression des SUR1 abhängt. Jedoch weisen bereits auch die mit Lösungsmittel behandelten Zellen, welche SUR1 exprimieren, leichte Unterschiede im Vergleich zu den pcDNA-Kontrollzellen auf. Derartige Unterschiede konnten bezüglich der Zellablösung oder der Veränderung in der Zellkernmorphologie allerdings nicht festgestellt werden. Möglicherweise führt die Expression von SUR1 ohne zusätzliche Behandlung bereits zu einer Erhöhung der Aktivitäten von Caspase-3, -8 und -9 in der Zelle, was gegebenenfalls durch eine Interaktion von SUR1 mit endogenen Bestandteilen der HEK293-Zellen verursacht werden könnte.

Auffallend ist die generell deutlich höhere Aktivität von Caspase-3 im Vergleich zu Caspase-8 und -9. Ein wichtiger Grund hierfür ist sicherlich die zentrale Bedeutung dieser Effektor-Caspase im apoptotischen Prozess. Sie wird kaskadenartig von so genannten Initiator-Caspasen aktiviert, zu welchen auch Caspase-8 und -9 gehören. Aber auch die Aktivität von Caspase-9 in Zellen, welche SUR1 exprimieren, ist nach Behandlung mit 17 β -Estradiol deutlich höher als in pcDNA-Kontrollzellen. Diese Daten korrelieren mit den Ergebnissen

von Hambrock et al. (2007) nach entsprechenden Versuchen mit Resveratrol und geben einen wichtigen Hinweis darauf, dass der mitochondriale Signalweg bei der für den SUR1 spezifischen Induktion von Apoptose eine große Rolle spielt.

5.1.8 Der Proteinkinase C-Aktivator Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (TPA) reduziert die durch 17 β -Estradiol induzierte Apoptose

In vielen Studien wurde nachgewiesen, dass die Proteinkinase C (PKC) in der Lage ist, apoptotische Prozesse zu modulieren. So kann eine Aktivierung der PKC sowohl Apoptose induzieren (Lucas und Sánchez-Margalet, 1995, Carpenter et al., 2002, Eitel et al., 2003, Tanaka et al., 2003, Santiago-Walker et al., 2005) als auch Zellen vor Apoptose schützen (Lucas und Sánchez-Margalet, 1995, Mayne und Murray, 1998, Whelan und Parker, 1998, Bertolotto et al., 2000, Gómez-Angelats et al., 2000).

Nach Untersuchungen von Eitel et al. (2003) ist die Aktivierung der PKC auch bei der durch Fettsäuren induzierten Apoptose Insulin-sezernierender Zellen von großer Bedeutung. Ebenso kann dieses Enzym an der Modulation der Insulinsekretion in der β -Zelle beteiligt sein. Die Aktivität der PKC kann durch 17 β -Estradiol moduliert werden. So ist 17 β -Estradiol in der Lage, die PKC zu aktivieren (Peters et al., 2000, Alzamora et al., 2007, Yun et al., 2008). Chisamore et al. (2001) postulierten, dass 17 β -Estradiol bei Brusttumoren, welche PKC α überexprimieren, einen Antitumoreffekt zeigt.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des PKC-Aktivators Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (TPA) (Kontny et al., 1992, Liu und Heckman, 1998) auf die durch 17 β -Estradiol induzierte Apoptose untersucht. Hierbei wurde durch die Co-Inkubation mit TPA die durch 17 β -Estradiol induzierte Apoptose deutlich reduziert, was einen Hinweis auf die Beteiligung dieses Enzyms liefert. Die Aktivierung der PKC führte in diesen Versuchen zu einem *anti-apoptischen* Effekt. Da diese protektive Wirkung jedoch sowohl in HEK293-Zellen, welche SUR1 exprimieren, als auch in pcDNA-Kontrollzellen zu messen war, scheint es sich hierbei offensichtlich nicht um einen Effekt zu handeln, welcher ausschließlich spezifisch für die Expression von SUR1 ist. Es wäre z.B. denkbar, dass für den Effekt in den pcDNA-Kontrollzellen möglicherweise andere ABC-Proteine, die auch in den HEK293-Zellen vorhanden sein könnten, wie z.B. bestimmte ABC-Transporter, die sich in der Niere finden, verantwortlich sein könnten. Im Gegensatz zur Reduktion der durch 17 β -Estradiol induzierten Apoptose durch TPA, führte die gleichzeitige Inkubation von TPA mit Etoposid jedoch zu einer Verstärkung der durch Etoposid induzierten Apoptose.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Der Sulfonylharnstoffrezeptor (SUR) 1 ist die regulatorische Untereinheit pankreatischer ATP-sensitiver Kalium-Kanäle (K_{ATP} -Kanäle), welche von großer Bedeutung für die Insulinsekretion der β -Zelle sind. Neben der Auslösung einer Insulinsekretion über einen K_{ATP} -Kanal-abhängigen Weg, wird die Freisetzung von Insulin außerdem durch zusätzliche K_{ATP} -Kanal-unabhängige Wege moduliert. Darüber hinaus kann die Menge an freigesetztem Insulin über eine Regulation der gesamten β -Zellmasse infolge von Apoptose oder Proliferation und/oder Neogenese von β -Zellen beeinflusst werden. Es wird angenommen, dass Apoptose von pankreatischen β -Zellen eine Rolle für die Pathophysiologie von sowohl Diabetes Typ 1 als auch Typ 2 spielt (Lee und Pervaiz, 2006).

In vorherigen Arbeiten aus der Arbeitsgruppe konnte nachgewiesen werden, dass der insulinotrope Sulfonylharnstoff Glibenclamid und der Naturstoff Resveratrol unter bestimmten Bedingungen verstärkt apoptotische Prozesse, welche spezifisch an die Expression des SUR1 gekoppelt sind, induzieren können (Hambrock et al., 2006 und 2007). Somit konnte für den SUR, neben seiner Aufgabe bei der Regulation der Insulinsekretion, eine zusätzliche Funktion nachgewiesen werden, welche in der spezifischen Induktion apoptotischer Prozesse durch bestimmte Substanzen besteht und somit eine Rolle bei der Regulation der Insulinsekretion über die β -Zellmasse spielen könnte.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob es Substanzen gibt, welche stärker Apoptose in Zellen induzieren können als Glibenclamid und Resveratrol. Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit steht 17β -Estradiol, welches strukturelle und funktionelle Analogien zu dem „Phytoestrogen“ Resveratrol aufweist. So ist dieses endogen vorkommende Estrogen ebenso wie Resveratrol in der Lage, in verschiedenen experimentellen Zellsystemen Apoptose zu induzieren. Außerdem ist bekannt, dass 17β -Estradiol bei K_{ATP} -Kanälen in β -Zellen als K_{ATP} -Kanal-Blocker wirken kann. Es wird diskutiert, ob 17β -Estradiol hierzu direkt mit K_{ATP} -Kanälen (Al-Majed et al., 2005) interagiert oder ob diese Substanz an „nicht-klassische“ plasmalemmale Estrogenrezeptoren bindet, welche derzeit noch nicht identifiziert sind und über intrazelluläre Signalkaskaden mit K_{ATP} -Kanälen in Verbindung stehen (Nadal et al., 1998, Soria et al., 2004, Ropero et al., 2006). In der Arbeitsgruppe konnte anhand von heterologen Konkurrenzexperimenten nachgewiesen werden, dass 17β -Estradiol neben Glibenclamid und Resveratrol (Hambrock et al., 2007, Ackermann et al. 2008) ein

spezifischer Ligand des SUR ist. Somit kann SUR1 offensichtlich als „nicht-klassischer“ Estrogenrezeptor fungieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde überprüft, ob auch 17β -Estradiol eine Apoptose spezifisch in Zellen induziert, welche SUR1 exprimieren. Außerdem sollte vergleichend die Bedeutung der beiden SUR-Isoformen SUR1 und SUR2 sowie verschiedener SUR-Mutanten bei der Induktion von Apoptose durch 17β -Estradiol untersucht werden. Hierfür wurden Experimente mit rekombinanten HEK293-Zellen durchgeführt, welche jeweils die verschiedenen SUR-Isoformen exprimieren. Als Kontrollzellen dienten Zellen, welche mit leerem Expressionsvektor transfiziert worden waren (pcDNA-Kontrollzellen). Anhand der Quantifizierung verschiedener Parameter, wie Zellablösung, apoptotische Veränderungen in der Zellkernmorphologie sowie gesteigerte Aktivität des Caspase-3-Enzyms, konnte nachgewiesen werden, dass 17β -Estradiol Apoptose spezifisch in Zellen induziert, welche SUR1 exprimieren. So wurde in Zellen, welche die pankreatische Isoform SUR1 exprimieren, nach Behandlung mit 17β -Estradiol eine deutlich stärkere Apoptose gemessen als in pcDNA-Kontrollzellen bzw. Zellen, welche die cardiale Isoform SUR2A oder die vaskuläre Isoform SUR2B exprimieren. Außerdem induziert 17β -Estradiol in Zellen, welche SUR1 exprimieren, eine deutlich stärkere Apoptose als Glibenclamid oder Resveratrol (Hambrock et al., 2006 und 2007).

Der K_{ATP} -Kanal in β -Zellen des Pankreas setzt sich aus der regulatorischen Untereinheit SUR1 und der porenbildenden Untereinheit Kir6.2 zusammen. In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die Co-Expression von SUR1 mit Kir6.2 in HEK293-Zellen die durch SUR1 vermittelte Apoptose nach Behandlung mit 17β -Estradiol kaum beeinflusst. Diese Daten weisen darauf hin, dass die durch 17β -Estradiol induzierte Apoptose offensichtlich nicht die Existenz funktionsfähiger pankreatischer K_{ATP} -Kanäle (welche aus den Untereinheiten SUR1 und Kir6.2 gebildet werden) erfordert. Diese Ergebnisse bestätigen die bisherigen Hinweise, dass der SUR als pankreatischer Rezeptor, neben seiner regulatorischen Funktion in K_{ATP} -Kanälen, spezifisch an einer adaptiven Veränderung der β -Zellmasse beteiligt sein könnte und so zur Regulation der Insulinsekretion über die Beeinflussung der β -Zellmasse beitragen könnte (Hambrock et al., 2006 und 2007).

Ergänzend wurden Experimente mit Zellen der klonalen β -Zelllinien HIT-T15 und RIN-m5F durchgeführt, welche SUR1 endogen exprimieren. Auch in diesen Untersuchungen wurde nachgewiesen, dass die Behandlung mit 17β -Estradiol in diesen Zellen Apoptose induzieren kann. In parallelen Versuchen mit der klonalen Gefäßmuskelzelllinie A-10, welche endogen

SUR2B exprimiert, ist der Unterschied nach Behandlung mit 17 β -Estradiol im Vergleich zum Lösungsmittel sichtlich schwächer ausgeprägt.

Eine deutliche Induktion von Apoptose durch 17 β -Estradiol konnte auch in pankreatischen Inselzellen aus Mäusen im Alter von 20-32 Wochen nachgewiesen werden. Auch die β -Zellen der Langerhans-Inseln exprimieren SUR1 endogen. In Inselzellen aus Wildtyp-Mäusen traten nach der Behandlung mit 17 β -Estradiol starke apoptotische Veränderungen in der Zellkernmorphologie auf, während in Inselzellen aus SUR1-Knockout (SUR1KO)-Mäusen des gleichen Alters ebenso wie in Inselzellen aus Wildtyp- und SUR1KO-Mäusen nach Behandlung mit Lösungsmittel bzw. ohne Behandlung keine deutlichen Anzeichen von Apoptose gefunden wurde. Dass dieser apoptotische Effekt in Inselzellen aus SUR1KO-Mäusen ausbleibt, ist ein weiterer Hinweis auf eine durch den Sulfonylharnstoffrezeptor 1 vermittelte Apoptose.

Das Ausmaß der Apoptose in Zellen, welche den SUR1 exprimieren, ist abhängig von der Konzentration an 17 β -Estradiol und der Inkubationszeit. So wurde in isolierten Langerhans-Inseln (aus weiblichen Mäusen, Alter: 20-32 Wochen) bereits nach 3-tägiger Behandlung mit 10 nM 17 β -Estradiol eine deutliche Apoptose gemessen. Die Inselzellen sind offensichtlich empfindlicher gegenüber der Behandlung mit niedrigeren Konzentrationen an 17 β -Estradiol als rekombinante HEK293-Zellen, welche SUR1 exprimieren. Im menschlichen Organismus kommt es während der Schwangerschaft zu einem beträchtlichen Anstieg der Plasmakonzentration an 17 β -Estradiol. Im dritten Schwangerschaftstrimester können Konzentrationen von ungefähr 50 bis 100 nM erreicht werden (Loriaux et al., 1972, Lindberg et al., 1974, de Hertogh et al., 1975). Im Vergleich zu den Serumkonzentrationen während des Menstruationszyklus (Follikelphase: ca. 0,1-1,0 nM; Lutealphase: ca. 0,5-2,0 nM) kann in dieser Phase der Schwangerschaft die Konzentration an 17 β -Estradiol im Serum der Mutter um bis zu mehr als das 100-fache erhöht sein (Abraham et al., 1972).

Im Gegensatz zu den Inselzellen aus älteren Mäusen (männlich oder weiblich, 20-32 Wochen alt), können nach Behandlung von Inselzellen aus jungen Mäusen (männlich oder weiblich, 5-7 Wochen alt) mit 17 β -Estradiol deutliche *anti-apoptotische* Effekte nachgewiesen werden. Auch dieser Effekt ist spezifisch für den SUR1, da er in Experimenten mit Inselzellen aus SUR1KO-Mäusen ausbleibt. In Inselzellen aus jungen Mäusen (männlich oder weiblich) wurde nach Behandlung mit Lösungsmittel bzw. ohne Behandlung ein hohes Maß an Apoptose gemessen, welches durch die Behandlung mit 17 β -Estradiol reduziert wurde. Diese Versuchsergebnisse geben wichtige Hinweise darauf, dass das Alter demnach einen wichtigen Faktor darstellt, welcher den Effekt von 17 β -Estradiol beeinflussen kann.

Durch 17β -Estradiol vermittelte Veränderungen in der β -Zellmasse könnten einen interessanten Aspekt im Bezug auf die Entwicklung von Gestationsdiabetes (GDM) darstellen. Bei GDM handelt es sich um eine Glucose-Intoleranz unterschiedlichen Ausmaßes, welche meist erst im letzten Trimester der Schwangerschaft auftritt bzw. diagnostiziert wird.

Neben 17β -Estradiol wurden weitere Substanzen, welche strukturelle und/oder funktionelle Analogien zu 17β -Estradiol aufweisen, im Hinblick auf ihre Fähigkeit zur Auslösung einer Apoptose untersucht, welche spezifisch für die Expression des SUR1 ist. Ein weiteres endogen vorkommendes Estrogen, das Estron, weist in Experimenten mit HEK293-Zellen, welche SUR1 exprimieren, sowie mit Zellen der klonalen β -Zelllinien HIT-T15 und RIN-m5F ebenfalls die Fähigkeit auf, eine für die Expression von SUR1 spezifische Apoptose zu induzieren. Das Ausmaß ist allerdings deutlich geringer als nach Behandlung mit 17β -Estradiol, obwohl sich 17β -Estradiol von Estron ausschließlich darin unterscheidet, dass am Kohlenstoffatom an Position 17 anstelle einer Carbonylgruppe eine Hydroxylgruppe vorhanden ist. Diese Hydroxylgruppe scheint somit eine große Rolle bei dieser ausgeprägten und für den SUR1 spezifischen Induktion von Apoptose durch 17β -Estradiol zu spielen. Für Zimtsäure und Pterostilben konnte keine Fähigkeit zur Induktion von Apoptose gemessen werden, welche spezifisch für die Expression des SUR1 ist.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde außerdem die Bedeutung verschiedener Mutationen im SUR-Gen untersucht. So handelt es sich bei SUR1(M1289T) um eine Mutante, bei der in der Transmembranhelix 17 (TM17) die Aminosäure Methionin an Position 1289 durch Threonin, die Aminosäure, welche sich bei SUR2B an korrespondierender Stelle befindet, ausgetauscht wurde.

Außerdem wurde die dazu inverse Punktmutante untersucht, bei welcher die Aminosäure Threonin an der Position 1254 von SUR2B durch die korrespondierende Aminosäure von SUR1, durch das Methionin, ersetzt wurde. Die durchgeführten Experimente belegen, dass die Aminosäure Methionin an der Position 1289 in der TM17 offensichtlich eine große Rolle für die durch 17β -Estradiol induzierte Apoptose spielt, welche spezifisch für die Expression von SUR1 ist. Durch diese Punktmutation wurde der für den SUR1 spezifische apoptotische Effekt nach Behandlung mit 17β -Estradiol komplett aufgehoben, offensichtlich ohne die Bindung dieser Substanz an SUR1 direkt zu beeinflussen (Ackermann et al., 2008). In vorherigen Arbeiten der Arbeitsgruppe konnte ein ähnlicher Zusammenhang bereits für die K_{ATP} -Kanal-Blocker Glibenclamid (Hambrock et al., 2006) und Resveratrol (Hambrock et al., 2007) nachgewiesen werden. Somit besteht vermutlich keine direkte Korrelation zwischen der

Affinität von SUR1 bzw. SUR1(M1289T) für 17β -Estradiol und dem Ausmaß der apoptotischen Wirkung dieser Substanz auf Zellen, die SUR1 bzw. die Mutante SUR1(M1289T) exprimieren. Im umgekehrten Fall ist der entsprechende Aminosäureaustausch T1254M bei SUR2B jedoch offensichtlich nicht ausreichend, um in Zellen, welche SUR2B exprimieren, die für den SUR1 typische erhöhte Suszeptibilität gegenüber einer Induktion von Apoptose durch 17β -Estradiol zu erzeugen.

Viele Mitglieder der ABC-Proteinfamilie, zu welcher auch der SUR gehört, besitzen in der letzten carboxyterminalen Helix einen hochkonservierten Tryptophan-Rest, welcher von großer Bedeutung für den Transport verschiedener Substrate ist (Ito et al., 2001b, Zhang et al., 2002, Oleschuk et al., 2003). Durch eine Mutation in SUR1, bei welcher dieser Tryptophan-Rest an Position 1296 von SUR1 durch die Aminosäure Alanin substituiert wurde, wird der für den SUR1 spezifische apoptotische Effekt nach Behandlung mit 17β -Estradiol aufgehoben. Somit scheinen verschiedene Aminosäuren in der Transmembranhelix 17 von SUR1 eine große Rolle bei dem für den SUR1 spezifischen apoptotischen Effekt von 17β -Estradiol zu spielen.

Um zu untersuchen, ob die durch SUR1 vermittelte Apoptose nach Behandlung mit 17β -Estradiol an eine korrekte Funktion der Nukleotidbindungsfalten gekoppelt ist, wurden Versuche mit den Mutanten SUR1(R1379C) bzw. SUR1(R1379L) durchgeführt. Beide Mutationen sind in der zweiten Nukleotidbindungsfalte von SUR1 lokalisiert und führen zu einer gesteigerten ATP-Hydrolyse an den NBFs (de Wet et al., 2007b). Diese natürlich vorkommenden Mutationen wurden bei Patienten mit vorübergehendem neonatalem Diabetes gefunden (Babenko et al., 2006, de Wet et al., 2007b, Vaxillaire et al., 2007). Die Expression dieser Mutanten in HEK293-Zellen führt nach Behandlung mit 17β -Estradiol zu einer deutlich stärkeren Induktion von Apoptose als in Zellen, welche SUR1 exprimieren.

Da bestimmte Mutationen in SUR1 den Effekt von endogen vorkommendem 17β -Estradiol beeinflussen könnten, könnten solche Mutationen möglicherweise von großer pathophysiologischer Bedeutung für die Entstehung von Erkrankungen wie z.B. Krebs oder Diabetes sein.

Die Messungen der Aktivität verschiedener Caspase-Enzyme nach Behandlung mit 17β -Estradiol gaben einen Hinweis darauf, dass der mitochondriale Signalweg bei der durch SUR1 vermittelten Apoptose eine große Rolle spielt.

Um zu untersuchen, ob die Proteinkinase C (PKC) eine Rolle bei der durch 17β -Estradiol induzierten Apoptose spielt, wurden Versuche mit dem PKC-Aktivator Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (TPA) durchgeführt. Die Co-Inkubation mit TPA reduziert zwar die durch 17β -

Estradiol induzierte Apoptose deutlich, allerdings ist dieser protektive Effekt sowohl in HEK293-Zellen, welche SUR1 exprimieren, als auch in pcDNA-Kontrollzellen nach Behandlung mit 17β -Estradiol zu messen. Die PKC scheint die durch 17β -Estradiol induzierte Apoptose zu beeinflussen, es handelt sich dabei jedoch wahrscheinlich nicht um einen Effekt, welcher ausschließlich spezifisch für die Expression von SUR1 ist.

Von zukünftigem Interesse wird eine genauere Aufklärung der Signalwege sein, über welche der SUR1 an der durch 17β -Estradiol induzierten Apoptose beteiligt ist. In diesem Zusammenhang müssen auch diejenigen Faktoren identifiziert werden, welche bewirken, ob schlussendlich *apoptotische* oder *protektive* (Schutz vor Zelltod) Effekte durch 17β -Estradiol in der Zelle induziert werden, wie sie in Mäusen unterschiedlichen Alters nachgewiesen wurden.

7 Summary

The sulfonylurea receptor (SUR) 1 forms the regulatory subunit of pancreatic ATP-sensitive potassium channels (K_{ATP} channels) which are essential for triggering insulin secretion in the β -cell. Insulin secretion is modulated by additional K_{ATP} channel-independent pathways and by adaptive variation of β -cell mass due to apoptosis, proliferation and/or neogenesis of β -cells. Apoptosis of β -cells is assumed to be involved in the pathophysiology of diabetes type 1 and 2 (Lee and Pervaiz, 2006). Previously it has been shown, that the insulinotropic sulfonylurea glibenclamide and the natural compound resveratrol can induce enhanced apoptosis and that this effect is specifically linked to the expression of SUR1 (Hambrock et al., 2006 and 2007).

These data provide evidence for an additional function of sulfonylurea receptor 1 apart from regulating electrical activity of the K_{ATP} channel and suggest that this receptor is involved in specific induction of apoptosis by certain substances which could be important for regulating the insulin secretion via β -cell mass.

In the present work, it has been investigated whether there are substances that are more potent in inducing apoptosis than glibenclamide and resveratrol. Thereby the main focus was put on 17β -estradiol which shows structural and functional analogies to the “phytoestrogen” resveratrol. Like resveratrol, this naturally occurring estrogen is able to induce apoptosis in different experimental systems. Furthermore, it is known that 17β -estradiol is able to decrease K_{ATP} channel activity in β -cells acting as a K_{ATP} channel blocker. It is still discussed whether 17β -estradiol directly interacts with K_{ATP} channels (Al-Majed et al., 2005) or whether it binds to so far unidentified “non-classical” plasmalemmal estrogen receptors which are linked to K_{ATP} channels via an intracellular signaling cascade (Nadal et al., 1998, Soria et al., 2004, Ropero et al., 2006). In heterologous competition experiments, Ackermann et al. (2008) were able to show that 17β -estradiol is a specific ligand of SUR like glibenclamide and resveratrol (Hambrock et al., 2007).

In the present work it was investigated whether 17β -estradiol induces apoptosis that is specifically linked to the expression of SUR1. Furthermore, the role of the SUR-isoforms SUR1 and SUR2 and of several SUR-mutants in the induction of apoptosis by 17β -estradiol was investigated. Therefore, experiments were performed with recombinant HEK293-cells expressing the different isoforms of SUR. Cells that were transfected with empty pcDNA expression vector (pcDNA-cells) were used as control cells. By quantification of different

apoptotic parameters such as cell detachment, changes in nuclear morphology as well as increased activity of caspase-3, it was shown that 17 β -estradiol induces specific apoptosis in cells expressing SUR1. In cells expressing the pancreatic isoform SUR1, treatment with 17 β -estradiol resulted in massive apoptosis while cells expressing the cardiac isoform SUR2A or the vascular isoform SUR2B as well as sham-transfected control-cells were less affected. Furthermore, 17 β -estradiol is more potent in inducing apoptosis in cells expressing SUR1 than glibenclamide or resveratrol (Hambrock et al., 2006 and 2007).

The pancreatic K_{ATP} channel consists of the regulatory subunit SUR1 and the pore-forming unit Kir6.2. In the present work, it has been proven that this SUR1-dependent effect of 17 β -estradiol was not significantly modified by coexpression with Kir6.2. These data show that apoptosis induced by 17 β -estradiol does not require the existence of functional pancreatic K_{ATP}-channels (formed by SUR1 and Kir6.2 subunits). These results provide evidence for an additional function of SUR1 apart from regulating electrical activity of the pancreatic K_{ATP} channels. SUR1 might be specifically involved in an adaptive change of the β -cell mass and could contribute to the regulation of insulin secretion via influencing β -cell mass (Hambrock et al., 2006 and 2007). Additional experiments with cells from the clonal β -cell lines HIT-T15 and RIN-m5F, endogenously expressing SUR1, showed that treatment with 17 β -estradiol can induce apoptosis in these cells. In parallel experiments with cells from the smooth muscle cell line A-10, endogenously expressing the SUR2B isoform, differences between cells treated with 17 β -estradiol and cells treated with solvent were less pronounced.

In pancreatic islet cells from mice aged 20-32 weeks, a clear induction of apoptosis after treatment with 17 β -estradiol was observed. β -Cells of Langerhans also express SUR1 endogenously. Treatment of islet cells from wildtype mice with 17 β -estradiol resulted in intensive changes in nuclear morphology while islet cells from SUR1 knockout (SUR1KO) mice of the same age as well as untreated or solvent-treated islet cells from wildtype and SUR1KO mice did not show any marked signs of apoptosis. The absence of this apoptotic effect in SUR1KO mice provides further evidence for the involvement of SUR1 in 17 β -estradiol induced apoptosis. The extent of apoptosis in cells expressing SUR1 depends on the concentration of 17 β -estradiol and the period of incubation. Clear apoptotic effects were already observed in isolated islets of Langerhans (from female mice, aged 20-32 weeks) after treatment with 10 nM 17 β -estradiol for 3 days. Obviously islet cells are more susceptible to treatment with lower concentrations of 17 β -estradiol than recombinant HEK293-cells expressing SUR1. During pregnancy, plasma concentrations of 17 β -estradiol in humans markedly increase. In the third trimester of pregnancy, 17 β -estradiol concentrations between

approximately 50 and 100 nM can be readily achieved (Loriaux et al., 1972, Lindberg et al., 1974, de Hertogh et al., 1975). At this point of time, the concentration of maternal serum 17 β -estradiol can be elevated up to more than 100 times compared to serum concentrations during the normal menstrual cycle (follicular phase: \approx 0.1-1.0 nM; luteal phase: \approx 0.5-2.0 nM) (Abraham et al., 1972). In contrast to islet cells from elderly mice aged 20-32 weeks (male or female), clear *anti-apoptotic* effects were detected in islet cells from young mice aged 5-7 weeks (male or female) after treatment with 17 β -estradiol. This effect also is specific to the expression of SUR1 as it was missing in experiments with islet cells from SUR1KO mice. In untreated or solvent-treated islet cells from young mice (male or female) apoptosis was measured to a large extent, which was reduced by treatment with 17 β -estradiol. These results provide evidence that age is obviously an important factor which can influence the effect of 17 β -estradiol. Changes in β -cell mass mediated by 17 β -estradiol might contribute to the etiology of gestational diabetes mellitus (GDM). GDM is defined as glucose intolerance that appears or is first recognized during the last trimester of pregnancy.

In addition, other substances showing structural and/or functional analogies to 17 β -estradiol were examined in view of their ability to induce apoptosis in a way that is specific for the expression of SUR1. Estron, another endogenously occurring estrogen, also shows the ability to induce apoptosis in HEK293-cells expressing SUR1 as well as in cells from the SUR1 expressing clonal β -cell lines HIT-T15 and RIN-m5F. However, the extent of apoptosis after treatment with estron is much lower than after treatment with 17 β -estradiol, although estron differs from 17 β -estradiol only in lacking one hydroxyl group. This hydroxyl group seems to be important for this pronounced SUR1-specific induction of apoptosis by 17 β -estradiol. Cinnamic acid and pterostilbene did not show the ability to induce apoptosis which is specific for the expression of SUR1.

In the present work, also the role of different SUR-mutants was examined. SUR1(M1289T) is a mutant, in which the amino acid methionine at position 1289 in transmembrane helix 17 (TM17) of SUR1 was exchanged by the corresponding amino acid of SUR2B (threonine). Furthermore, the inverse point mutant was investigated, in which the amino acid threonine at position 1254 of SUR2B was exchanged by the corresponding amino acid of SUR1 (methionine). The experiments indicate that the amino acid methionine at position 1289 in TM17 obviously plays an important role in apoptosis which is induced by 17 β -estradiol and is specific for the expression of SUR1. This apoptotic effect after treatment with 17 β -estradiol is abolished by this single mutation, obviously without affecting binding of this hormone to SUR1 (Ackermann et al., 2008). Previously, a similar situation has been shown for the K_{ATP}

channel blockers glibenclamide (Hambrock et al., 2006) and resveratrol (Hambrock et al., 2007). Therefore, there obviously is no direct correlation between the affinity of SUR1 or SUR1(M1289T), respectively, for 17β -estradiol and the extent of the apoptotic effect of this hormone in cells expressing SUR1 or the mutant SUR1(M1289T). In the inverse case, the respective amino acid exchange T1254M in SUR2B is not sufficient to create that level of susceptibility to apoptosis induced by 17β -estradiol which is typical for cells expressing SUR1.

The sulfonylurea receptor belongs to the family of ATP-binding cassette proteins. Various members of this family possess a highly conserved tryptophan residue in their last carboxyterminal helix, which is important for the transport of several substrates (Ito et al., 2001b, Zhang et al., 2002, Oleschuk et al., 2003). The apoptotic effect after treatment with 17β -estradiol in which SUR1 is specifically involved is abolished by exchanging this tryptophan residue at position 1296 of SUR1 by alanine. Transmembrane helix 17 seems to be very important for this apoptotic effect which is specific for the expression of SUR1 induced by 17β -estradiol.

To investigate whether this apoptotic effect after treatment with 17β -estradiol was linked to a correct function of the nucleotide binding folds, experiments with the mutants SUR1(R1379C) and SUR1(R1379L) were performed. Both mutations are located in the second nucleotide binding fold of SUR1 and result in an enhanced ATP-hydrolysis at the NBFs (de Wet et al., 2007b). These naturally occurring mutations were found in patients with neonatal diabetes with some of them showing a family history in adult-onset type 2 diabetes or GDM (Babenko et al., 2006, de Wet et al., 2007b, Vaxillaire et al., 2007). The expression of these mutants in HEK293-cells leads to a much stronger induction of apoptosis than the expression of SUR1. The observation that apoptosis induced by 17β -estradiol can be influenced by certain mutations of SUR could be of particular importance for the pathophysiology of diseases like cancer or diabetes. The enhanced activity of caspase-9 in cells expressing SUR1 after treatment with 17β -estradiol suggests that the mitochondrial pathway might play a major role in this apoptotic process.

To investigate whether protein kinase C (PKC) is important for the induction of apoptosis by 17β -estradiol, experiments with the PKC activator phorbol-12-myristate-13-acetate (TPA) were performed. Coincubation with TPA leads to a clear reduction of apoptosis induced by 17β -estradiol. However, this protective effect was found in HEK293-cells expressing SUR1 as well as in sham-transfected control-cells. Consequently, PKC seems to affect apoptosis

induced by 17β -estradiol, but probably it is not an effect which is exclusively linked to the expression of SUR1.

The identification of the precise signaling pathways which form the link between SUR1 and the induction of apoptosis after treatment with 17β -estradiol will be of future interest. In this context, also the factors which finally induce the *apoptotic* or *protective* effects of 17β -estradiol which have been observed in mice of different age will have to be identified.

8 Abkürzungsverzeichnis

A	Alanin
ABC-Protein	ABC-bindendes Kassettenprotein
ADP	Adenosindiphosphat
AFC	7-Amino-4-Trifluoromethyl-Coumarin
Aq. bidest.	bidestilliertes Wasser
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinder-Serum-Albumin
°C	Grad Celcius
C	Cystein
Ca	Calcium
CASY	Cell Analysing System
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
CO ₂	Kohlendioxid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
DTT	1,4-Dithio-DL-threitol
E1	Estron
E2	17β-Estradiol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FCS	Fötales Kälberserum
g	Gramm
h	Stunde
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HCl	Salzsäure
HEK	Human Embryonic Kidney
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
K _{ATP} -Kanal	ATP-sensitiver Kaliumkanal

Kir	K ⁺ inwardly rectifying
KO	Knockout
L	Leucin
Lsgm.	Lösungsmittel
LW	Leerwert
M	Methionin
M	Mol
MEM	Minimum Essential Medium
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
Mg	Magnesium
min	Minute
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
mm	Millimeter
µM	Mikromol
mM	Millimol
MRP	Multidrug Resistance-Related Protein
n	Versuchszahl, Anzahl Versuchstiere
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
NBF	Nucleotide Binding Fold (Nukleotidbindungsfolde)
ng	Nanogramm
nM	Nanomol
p	Signifikanzniveau
PBS	Phosphate-Buffered Saline
pg	Pikogramm
PKC	Proteinkinase C
R	Arginin
rpm	round per minute (Umdrehung pro Minute)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
S	Serin
SEM	Standardfehler
Subst.	Substanz

SUR	Sulfonylharnstoffrezeptor
T	Threonin
TM	Transmembranhelix
TMD	Transmembrandomäne
TPA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
W	Tryptophan
WT	Wildtyp
Y	Tyrosin

9 Literaturverzeichnis

- Abraham GE, Odell WD, Swerdloff RS, and Hopper K (1972). Simultaneous radioimmunoassay of plasma FSH, LH, progesterone, 17-hydroxyprogesterone, and estradiol-17 beta during the menstrual cycle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 34:312-318.
- Ackermann S, Hiller S, Osswald H, Lösle M, Grenz A, and Hambrock A (2008). 17 β -Estradiol modulates apoptosis in pancreatic β -cells by specific involvement of the sulfonylurea receptor (SUR) isoform SUR1. *J. Biol. Chem.* Epub 18 Dec 2008.
- Adams JM and Cory S (2002). Apoptosomes: engines for caspase activation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14:715-720.
- Aguilar-Bryan L, Nichols CG, Rajan AS, Parker C, and Bryan J (1992). Co-expression of sulfonylurea receptors and K_{ATP} channels in hamster insulinoma tumor (HIT) cells. Evidence for direct association of the receptor with the channel. *J. Biol. Chem.* 267:14934-14940.
- Aguilar-Bryan L, Nichols CG, Wechsler SW, Clement JP, Boyd AE, Gonzalez G, Herrera SH, Nguy K, Bryan J, and Nelson DA (1995). Cloning of the beta cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. *Science* 268:423-426.
- Aguilar-Bryan L and Bryan J (1999). Molecular biology of adenosine triphosphate-sensitive potassium channels. *Endocr. Rev.* 20:101-135.
- Ahren B (2005). Type 2 diabetes, insulin secretion and beta-cell mass. *Curr. Mol. Med.* 5:275-286.
- Aittoniemi J, Fotinou C, Craig TJ, de Wet H, Proks P, and Ashcroft FM (2009). SUR1: a unique ATP-binding cassette protein that functions as an ion channel regulator. *Phil. Trans. R. Soc. B* 364:257-267.
- Aizawa T, Komatsu M, Asanuma N, Sato Y, and Sharp GWG (1998). Glucose action 'beyond ionic events' in the pancreatic β cell. *Trends Pharmacol. Sci.* 19:496-499.
- Al-Majed HT, Squires PE, Persaud SJ, Huang GCC, Amiel S, Whitehouse BJ, and Jones PM (2005). Effect of 17 β -estradiol on insulin secretion and cytosolic calcium in MIN6 mouse insulinoma cells and human islets of Langerhans. *Pancreas* 30:307-313.
- Alberts B, Johnson J, Lewis J, Raff M, Roberts K, and Walter P (2004). Molekularbiologie der Zelle. *WILEY-VCH Verlag, Weinheim* 4. Auflage.
- Alzamora LR, Brown LR, and Harvey BJ (2007). Direct binding and activation of protein kinase C isoforms by aldosterone and 17beta-estradiol. *Mol. Endocrinol.* 21:2637-2650.
- American Diabetes Association (2006). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 29:S43-S48.

- Amoroso S, Schmid-Antomarchi H, Fosset M, and Lazdunski M (1990). Glucose, sulfonylureas, and neurotransmitter release: role of ATP-sensitive K^+ channels. *Science* 247:852-854.
- Ansar MM and Ansari M (2006). Nitric oxide involvement in pancreatic beta cell apoptosis by glibenclamide. *Nitric Oxide* 14:39-44.
- Araki E, Oyadomari S, and Mori M (2003). Impact of endoplasmic reticulum stress pathway on pancreatic beta-cells and diabetes mellitus. *Exp. Biol. Med.* 228:1213-1217.
- Ashcroft FM (2005). ATP-sensitive potassium channelopathies: focus on insulin secretion. *J. Clin. Invest.* 115:2047-2058.
- Ashcroft FM (1988). Adenosine 5'-triphosphate-sensitive potassium channels. *Annu. Rev. Neurosci.* 11:97-118.
- Ashcroft FM, Harrison DE, and Ashcroft SJ (1984). Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic beta-cells. *Nature* 312:446-448.
- Ashcroft FM (2007). ATP-sensitive K^+ channels and disease: from molecule to malady. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 293:E880-E889.
- Ashcroft FM and Gribble FM (1998). Correlating structure and function in ATP-sensitive K^+ channels. *Trends Neurosci.* 21:288-294.
- Ashcroft SJH (2000). The β -cell K_{ATP} channel. *J. Membr. Biol.* 176:187-206.
- Ashfield R, Gribble FM, Ashcroft SJH, and Ashcroft FM (1999). Identification of the high-affinity tolbutamide site on the SUR1 subunit of the K_{ATP} channel. *Diabetes* 48:1341-1347.
- Ashford ML, Sturgess NC, Trout NJ, Gardner NJ, and Hales CN (1988). Adenosine-5'-triphosphate-sensitive ion channels in neonatal rat cultured central neurones. *Pflugers Arch.* 412:297-304.
- Ashkenazi A and Dixit VM (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281:1305-1308.
- Atten MJ, Godoy-Romero E, Attar BM, Milson T, Zopel M, and Holian O (2005). Resveratrol regulates cellular PKC alpha and delta to inhibit growth and induce apoptosis in gastric cancer cells. *Invest. New Drugs* 23:111-119.
- Babenko AP, Aguilar-Bryan L, and Bryan J (1998). A view of SUR/ $K_{IR6.X}$, K_{ATP} channels. *Annu. Rev. Physiol.* 60:667-687.
- Babenko AP, Polak M, Cave H, Busiah K, Czernichow P, Scharfmann R, Bryan J, Aguilar-Bryan L, Vaxillaire M, and Froguel P (2006). Activating mutations in the ABCC8 gene in neonatal diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* 355:456-466.

- Baggio LL and Drucker DJ (2006). Therapeutic approaches to preserve islet mass in type 2 diabetes. *Annu. Rev. Med.* 57:265-281.
- Barbu AR, Akusjarvi G, and Welsh N (2002). Adenoviral-induced islet cell cytotoxicity is not counteracted by Bcl-2 overexpression. *Mol. Med.* 8:733-741.
- Barg S, Renström E, Berggren P-O, Bertorello A, Bokvist K, Braun M, Eliasson L, Holmes WE, Köhler M, Rorsman P, and Thévenod F (1999). The stimulatory action of tolbutamide on Ca^{2+} -dependent exocytosis in pancreatic β cells is mediated by a 65-kDa mdr-like P-glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96:5539-5544.
- Berger H, Crane J, and Farine D (2002). Screening for gestational diabetes mellitus. *J. Obstet. Gynaecol. Can.* 24:894-912.
- Bernardi H., de Weille JR, Epelbaum J, Mourre C, Amoroso S, Slama A, Fosset M, and Lazdunski M (1993). ATP-modulated K^+ channels sensitive to antidiabetic sulfonylureas are present in adenohipophysis and are involved in growth hormone release. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:1340-1344.
- Bernardo de Oliveira Franz C (2008). Untersuchungen zur Bedeutung der Sulfonylharnstoffrezeptoren für die spezifische Induktion von Apoptose nach Behandlung mit Glibenclamid oder Resveratrol. Tübingen, Dissertation.
- Bertolotto C, Maulon L, Filippa N, Baier G, and Auberger P (2000). Protein kinase C theta and epsilon promote T-cell survival by a rsk-dependent phosphorylation and inactivation of BAD. *J. Biol. Chem.* 275:37246-37250.
- Bhathena SJ, Awoke S, Voyles NR, Wilkins SD, Recant L, Oie HK, and Gazdar SF (1984). Insulin, glucagon, and somatostatin secretion by cultured rat islet cell tumor and its clones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 175:35-38.
- Bonner-Weir S (2000). Islet growth and development in the adult. *J. Mol. Endocrinol.* 24:297-302.
- Borst P and Elferink RO (2002). Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu. Rev. Biochem.* 71:537-592.
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Brody SC, Harris R, and Lohr K (2003). Screening for gestational diabetes: a summary of the evidence for the US Preventive Services Task Force. *Obstet. Gynecol.* 101:380-392.
- Buchanan TA and Xiang AH (2005). Gestational diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.* 115:485-491.
- Buchanan TA, Xiang A, Kjos SL, and Watanabe R (2007). What is gestational diabetes? *Diabetes Care* 30:S105-S111.

- Burke MA, Mutharasan RK, and Ardehali H (2008). The sulfonylurea receptor, an atypical ATP-binding cassette protein, and its regulation of the K_{ATP} channel. *Circ. Res.* 102:164-176.
- Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, and Butler PC (2003). β -Cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* 52:102-110.
- Butler PC, Meier JJ, Butler AE, and Bhushan A (2007). The replication of β -cells in normal physiology, in disease and for therapy. *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* 3:758-768.
- Carpenter L, Cordery D, and Biden TJ (2002). Inhibition of protein kinase C delta protects rat INS-1 cells against interleukin-1beta and streptozotocin-induced apoptosis. *Diabetes* 51:317-324.
- Carpentier JL, Sawano F, Ravazzola M, and Malaisse WJ (1986). Internalization of 3H-glibenclamide in pancreatic islet cells. *Diabetologia* 29:259-261.
- Castelli F, Uccella N, Trombetta D, and Saija A (1999). Differences between coumaric and cinnamic acids in membrane permeation as evidenced by time-dependent calorimetry. *J. Agric. Food Chem.* 47:991-995.
- Catalano PM, Vargo KM, and Bernstein IM (1991). Incidence and risk factors associated with abnormal postpartum glucose tolerance in women with gestational diabetes. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 165:914-919.
- Chen ZS, Guo Y, Belinsky MG, Kotova E, and Kruh GD (2005). Transport of bile acids, sulfated steroids, estradiol 17-beta-D-glucuronide, and leukotriene C4 by human multidrug resistance protein 8 (ABCC11). *Mol. Pharmacol.* 67:545-557.
- Chinnaiyan AM (1999). The apoptosome: heart and soul of the cell death machine. *Neoplasia* 1:5-15.
- Chisamore MJ, Ahmed Y, Bentrem DJ, Jordan VC, and Tonetti DA (2001). Novel antitumor effect of estradiol in athymic mice injected with a T47D breast cancer cell line overexpressing protein kinase C alpha. *Clin. Cancer Res.* 7:3156-3165.
- Choi SB, Jang JS, and Park S (2005). Estrogen and exercise may enhance β -cell function and mass via insulin receptor substrate 2 induction in ovariectomized diabetic rats. *Endocrinology* 146:4786-4794.
- Chu SY, Callaghan WM, and Kim SY (2007). Maternal obesity and risk of gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care* 30:2070-2076.
- Chutkow WA, Makielski JC, Nelson DJ, Burant CF, and Fan Z (1999). Alternative splicing of *sur2* exon 17 regulates nucleotide sensitivity of the ATP-sensitive potassium channel. *J. Biol. Chem.* 274:13656-13665.

- Chutkow WA, Simon MC, Le Beau MM, and Burant CF (1996). Cloning, tissue expression, and chromosomal localization of SUR2, the putative drug-binding subunit of cardiac, skeletal muscle, and vascular K_{ATP} channels. *Diabetes* 45:1439-1445.
- Clement IV JP, Kunjilwar K, Gonzalez G, Schwanstecher M, Panten U, Aguilar-Bryan L, and Bryan J (1997). Association and stoichiometry of K_{ATP} channel subunits. *Neuron* 18:827-838.
- Cnop M, Welsh N, Jonas JC, Jorns A, Lenzen S, and Eizirik DL (2005). Mechanisms of pancreatic β -cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities. *Diabetes* 54 Suppl 2:S97-S107.
- Cohen GM (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J.* 326:1-16.
- Cohen JJ (1993). Apoptosis: the physiologic pathway of cell death. *Hosp. Pract.* 28:35-43.
- Conti LR, Radeke CM, Shyng SL, and Vandenberg VA (2001). Transmembrane topology of the sulfonylurea receptor SUR1. *J. Biol. Chem.* 276:41270-41278.
- Contreras JL, Smyth CA, Bilbao G, Young CJ, Thompson JA, and Eckhoff DE (2002). 17β -Estradiol protects isolated human pancreatic islets against proinflammatory cytokine-induced cell death: molecular mechanisms and islet functionality. *Transplantation* 74:1252-1259.
- Cook DL and Hales CN (1984). Intracellular ATP directly blocks K^+ channels in pancreatic B-cells. *Nature* 311:271-273.
- Cory S and Adams JM (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat. Rev. Cancer* 2:647-656.
- Couch SC, Philipson EH, Bendel RB, Pujda LM, Milvae RA, and Lammi-Keefe CJ (1998). Elevated lipoprotein lipids and gestational hormones in women with diet-treated gestational diabetes mellitus compared to healthy pregnant controls. *J. Diabetes Complic.* 12:1-9.
- Das B and Sarkar C (2006). Similarities between ischemic preconditioning and 17β -estradiol mediated cardiomyocyte K_{ATP} channel activation leading to cardioprotective and antiarrhythmic effects during ischemia/reperfusion in the intact rabbit heart. *Cardiovasc. Pharmacol.* 47:277-286.
- de Hertogh R, Thomas K, Bietlot Y, Vanderheyden I, and Ferin J (1975). Plasma levels of unconjugated estrone, estradiol and estriol and of HCS throughout pregnancy in normal women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 40:93-101.
- de Koning EJP, Bonner-Weir S, and Rabelink TJ (2008). Preservation of β -cell function by targeting β -cell mass. *Trends Pharmacol. Sci.* 29:218-227.
- de Wet H, Mikhailov MV, Fotinou C, Dreger M, Craig TJ, Venien-Bryan V, and Ashcroft FM (2007a). Studies of the ATPase activity of the ABC protein SUR1. *FEBS Journal* 274:3532-3544.

- de Wet H, Rees MG, Shimomura K, Aittoniemi J, Patch AM, Flanagan SE, Ellard S, Hattersley AT, Sansom MSP, and Ashcroft FM (2007b). Increased ATPase activity produced by mutations at arginine-1380 in nucleotide-binding domain 2 of ABCC8 causes neonatal diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 104:18988-18992.
- Denecker G, Vercammen D, Declercq W, and Vandenaabeele P (2001). Apoptotic and necrotic cell death induced by death domain receptors. *Cell. Mol. Life Sci.* 58:356-370.
- Dickson LM and Rhodes CJ (2004). Pancreatic beta-cell growth and survival in the onset of type 2 diabetes: a role for protein kinase B in the Akt? *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 287:E192-E198.
- Do Y, Ryu S, Nagarkatti M, and Nagarkatti PS (2002). Role of death receptor pathway in estradiol-induced T-cell apoptosis in vivo. *Toxicol. Sci.* 70:63-72.
- Donath MY and Ehses JA (2006). Type 1, type 1.5, and type 2 diabetes: *NOD* the diabetes we thought it was. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:12217-12218.
- Donath MY, Ehses JA, Maedler K, Schumann DM, Ellingsgaard H, Eppler E, and Reinecke M (2005). Mechanisms of β -cell death in type 2 diabetes. *Diabetes* 54 Suppl 2:S108-S113.
- Donath MY and Halban PA (2004). Decreased beta-cell mass in diabetes: significance, mechanisms and therapeutic implications. *Diabetologia* 47:581-589.
- Dornhorst A, Paterson CM, and Nicholls JSD (1992). High prevalence of gestational diabetes in women from ethnic minority groups. *Diabet. Med.* 9:820-825.
- Doyle ME and Egan JM (2003). Pharmacological agents that directly modulate insulin secretion. *Pharmacol. Rev.* 55:105-131.
- Dunne MJ, Illot MC, and Peterson OH (1987). Interaction of diazoxide, tolbutamide and ATP^{4-} on nucleotide-dependent K^+ channels in an insulin-secreting cell line. *J. Membr. Biol.* 99:215-224.
- Eckhoff DE, Eckstein C, Smyth CA, Vilatoba M, Bilbao G, Rahemtulla FG, Young CJ, Anthony Thompson J, Chaudry IH, and Contreras JL (2004). Enhanced isolated pancreatic islet recovery and functionality in rats by 17β -estradiol treatment of brain death donors. *Surgery* 136:336-345.
- Efanova IB, Zaitsev SV, Zhivotovsky B, Kohler M, Efendic S, Orrenius S, and Berggren PO (1998). Glucose and tolbutamide induce apoptosis in pancreatic β -cells - a process dependent on intracellular Ca^{2+} concentration. *J. Biol. Chem.* 273:33501-33507.
- Efrat S (2004). Regulation of insulin secretion - insights from engineered beta-cell lines. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1014:88-96.

- Eitel K, H.Staiger H, J.Rieger J, Mischak H, Brandhorst H, Brendel MD, Bretzel RG, Häring HU, and Kellerer M (2003). Protein kinase C delta activation and translocation to the nucleus are required for fatty acid-induced apoptosis of insulin-secreting cells. *Diabetes* 52:991-997.
- Elmore S (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* 35:495-516.
- Federici M, Hribal M, and Perego L (2001). High glucose causes apoptosis in cultured human pancreatic islets of Langerhans: a potential role for regulation of specific Bcl family genes toward an apoptotic cell death program. *Diabetes* 50:1290-1301.
- Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, and Danielsen M (1987). Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7413-7417.
- Felgner PL, Holm M, and Chan H (1989). Cationic liposome mediated transfection. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 32:115-121.
- Fiers W, R.Beyaert R, Declercq W, and Vandenabeele P (1999). More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. *Oncogene* 18:7719-7730.
- Gazdar AF, Chick WL, Oie HK, Sims HL, King DL, Weir GC, and Lauris (1980). Continuous, clonal, insulin- and somatostatin-secreting cell lines established from a transplantable rat islet cell tumor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:3619-3523.
- Geng XH, Li LH, Watkins S, Robbins PD, and Drain P (2003). The insulin secretory granule is the major site of K_{ATP} channels of the endocrine pancreas. *Diabetes* 52:767-776.
- Giblin JP, Quinn K, and Tinker A (2002). The cytoplasmic C-terminus of the sulfonylurea receptor is important for K_{ATP} channel function but is not key for complex assembly or trafficking. *Eur. J. Biochem.* 269:5303-5313.
- Gilligan DM, Quyyumi AA, and Cannon RO (1994). Effects of physiological levels of estrogen on coronary vasomotor function in postmenopausal women. *Circulation* 89:2545-2551.
- Gloyn AL, Siddiqui J, and Ellard S (2006). Mutations in the genes encoding the pancreatic beta-cell K_{ATP} channel subunits Kir6.2 (KCNJ11) and SUR1 (ABCC8) in diabetes mellitus and hyperinsulinism. *Hum. Mut.* 27:220-231.
- Gómez-Angelats M, Bortner CD, and Cidlowski JA (2000). Protein kinase C (PKC) inhibits fas receptor-induced apoptosis through modulation of the loss of K^+ and cell shrinkage. A role for PKC upstream of caspases. *J. Biol. Chem.* 275:19609-19619.
- Graham FL, Smiley J, Russell WC, and Nairn R (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* 36:59-74.
- Grant CE, Gao M, Degorter MK, Cole SP, and Deeley RG (2008). Structural determinants of substrate specificity differences between human Multidrug Resistance Protein (MRP) 1 (ABCC1) and MRP3 (ABCC3). *Drug. Metab. Dispos.* 36:2571-2581.

- Gräper L (1914). Eine neue Anschauung über physiologische Zellausschaltung. *Arch. Zellforsch.* 12:373-394.
- Gribble FM and Reimann F (2003). Sulphonylurea action revisited - the post-cloning era. *Diabetologia* 46:875-891.
- Gribble FM, Tucker SJ, and Ashcroft FM (1997). The interaction of nucleotides with the tolbutamide block of cloned ATP-sensitive K⁺ channel currents expressed in *Xenopus* oocytes: a reinterpretation. *J. Physiol.* 504:35-45.
- Grigorakis SI, Alevizaki M, Beis C, Anastasiou E, Alevizaki CC, and Souvatzoglou A (2000). Hormonal parameters in gestational diabetes mellitus during the third trimester: high glucagon levels. *Gynecol. Obstet. Invest.* 49:106-109.
- Grill V and Bjorklund A (2001). Overstimulation and beta-cell function. *Diabetes* 50:122-124.
- Halban PA, Kahn SE, Lernmark A, and Rhodes CJ (2001). Gene and cell-replacement therapy in the treatment of type 1 diabetes: how high must the standards be set? *Diabetes* 50:2181-2191.
- Hambrock A, Bernardo de Oliveira Franz C, Hiller S, Grenz A, Ackermann S, Schulze DU, Drews G, and Osswald H (2007). Resveratrol binds to the sulphonylurea receptor (SUR) and induces apoptosis in a SUR subtype-specific manner. *J. Biol. Chem.* 282:3347-3356.
- Hambrock A, Bernardo de Oliveira Franz C, Hiller S, and Osswald H (2006). Glibenclamide-induced apoptosis is specifically enhanced by expression of the sulphonylurea receptor isoform SUR1 but not by expression of SUR2B or the mutant SUR1(M1289T). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 316:1031-1037.
- Hambrock A, Hiller S, Stumpp D, and Osswald H. (2005). Effects of one mutation in TM17 of sulphonylurea receptor SUR2B on MgATP-dependence of K_{ATP} channel opener binding. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 371:R58.
- Hambrock A, Kayar T, Stumpp D, and Osswald H (2004). Effect of two amino acids in TM17 of sulphonylurea receptor SUR1 on the binding of ATP-sensitive K⁺ channel modulators. *Diabetes* 53:S128-S134.
- Hambrock A, Löffler-Walz C, and Quast U (2002). Glibenclamide binding to sulphonylurea receptor subtypes: dependence on adenine nucleotides. *Br. J. Pharmacol.* 136:995-1004.
- Hambrock A, Löffler-Walz C, Ruß U, Lange U, and Quast U (2001). Characterization of a mutant sulphonylurea receptor SUR2B with high affinity for sulphonylureas and openers: differences in the coupling to Kir6.x subtypes. *Mol. Pharmacol.* 60:190-199.
- Harding HP and Ron D (2002). Endoplasmic reticulum stress and the development of diabetes: a review. *Diabetes* 51 Suppl 3:S455-S461.

- Henquin JC (2000). Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. *Diabetes* 49:1751-1760.
- Henry OA, Beischer NA, and Sheedy MT (1993). Gestational diabetes and follow-up among immigrant Vietnam-born women. *Aust. N. Z. J. Obstet. Gynecol.* 33:109-114.
- Higgins CF (1992). ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu. Rev. Cell Biol.* 8:67-113.
- Hill MM, Adrain C, Duriez PJ, Creagh EM, and Martin SJ (2004). Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. *EMBO J.* 23:2134-2145.
- Hiller S, Bernardo de Oliveira Franz C, Osswald H, and Hambrock A (2006). Binding of glibenclamide to the sulfonylurea receptor is influenced by mutation of a conserved tryptophan-residue in TM17 of SUR. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 372:63.
- Hirano S, Furutama D, and Hanafusa T (2007). Physiologically high concentrations of 17beta-estradiol enhance NF-kappaB activity in human T cells. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 292:1465-1471.
- Hollander MH, Paarlberg KM, and Huisjes AJM (2007). Gestational diabetes: a review of the current literature and guidelines. *Obstet. Gynecol. Surv.* 62:125-136.
- Hollenstein K, Dawson RJ, and Locher KP (2007). Structure and mechanism of ABC transporter proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 17:412-418.
- Hollingsworth DR (1983). Alterations of maternal metabolism in normal and diabetic pregnancies: differences in insulin-dependent, non-insulin-dependent, and gestational diabetes. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 146:417-429.
- Horvitz HR (1999). Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cancer Res.* 59:1701-1706.
- Hunter M and Giebisch G (1988). Calcium-activated K-channels of *Amphiuma* early distal tubule: inhibition by ATP. *Pflugers Arch.* 412:331-333.
- Huopio H, Shyng SL, Otonkoski T, and Nichols CG (2002). K_{ATP} channels and insulin secretion disorders. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 283:E207-E216.
- Hyponen E, Virtanen SM, Kenward MG, Knip M, and Akerblom HK (2000). Obesity, increased linear growth, and risk of type 1 diabetes in children. *Diabetes Care* 23:1755-1760.
- Ihara Y, Toyokuni S, Uchida K, Odaka H, Tanaka T, Ikeda H, Hiai H, Seino Y, and Yamada Y (1999). Hyperglycemia causes oxidative stress in pancreatic beta-cells of GK rats, a model of type 2 diabetes. *Diabetes* 48:927-932.

- Inagaki N, Gono T, Clement JP, Namba N, Inazawa J, Gonzalez G, Aguilar-Bryan L, Seino S, and Bryan J. (1995a). Reconstitution of I_{KATP} : an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science* 270:1166-1170.
- Inagaki N, Tsuura Y, Namba N, Masuda K, Gono T, Horie M, Seino Y, Mizuta M, and Seino S (1995b). Cloning and functional characterization of a novel ATP-sensitive potassium channel ubiquitously expressed in rat tissues, including pancreatic islets, pituitary, skeletal muscle, and heart. *J. Biol. Chem.* 270:5691-5694.
- Inagaki N, Gono T, Clement IV JP, Wang CZ, Aguilar-Bryan L, Bryan J, and Seino S (1996). A family of sulfonylurea receptors determines the pharmacological properties of ATP-sensitive K^+ channels. *Neuron* 16:1011-1017.
- Isomoto S, Kondo C, Yamada M, Matsumoto S, Higashiguchi O, Horio Y, Matsuzawa Y, and Kurachi Y (1996). A novel sulfonylurea receptor forms with BIR (KIR6.2) a smooth muscle type ATP-sensitive K^+ channel. *J. Biol. Chem.* 271:24321-24324.
- Ito K, Oleschuk CJ, Westlake C, Vasa MZ, Deeley RG, and Cole SPC (2001a). Mutation of Trp¹²⁵⁴ in the multispecific organic anion transporter, multidrug resistance protein 2 (MRP2) (ABCC2), alters substrate specificity and results in loss of methotrexate transport activity. *J. Biol. Chem.* 276:38108-38114.
- Ito K, Olsen SL, Qiu W, Deeley RG, and Cole SPC (2001b). Mutation of a single conserved tryptophan in multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1) results in loss of drug resistance and selective loss of organic anion transport. *J. Biol. Chem.* 276:15616-15624.
- Iwahashi H, Hanafusa T, Eguchi Y, Nakajima H, Miyagawa J, Itoh N, Tomita K, Namba M, Kuwajima M, Noguchi T, Tsujimoto Y, and Matsuzawa Y (1996). Cytokine-induced apoptotic cell death in a mouse pancreatic beta-cell line: inhibition by Bcl-2. *Diabetologia* 39:530-536.
- Iwakura T, Fujimoto S, Kagimoto S, Inada A, Kubota A, Someya Y, Ihara Y, Yamada Y, and Seino Y (2000). Sustained enhancement of Ca^{2+} influx by glibenclamide induces apoptosis in RINm5F cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 271:422-428.
- Izumi T, Yokota-Hashimoto H, Zhao S, Wang J, Halban PA, and Takeuchi T (2003). Dominant negative pathogenesis by mutant proinsulin in the Akita diabetic mouse. *Diabetes* 52:409-416.
- Jiang X and X Wang (2000). Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1. *J. Biol. Chem.* 275:31199-31203.
- Jovanovic L and Pettitt DJ (2001). Gestational diabetes mellitus. *JAMA* 286:2516-2518.
- Kassem SA, Ariel I, Thornton PS, Scheimberg I, and Glaser B (2000). β -Cell proliferation and apoptosis in the developing normal human pancreas and in hyperinsulinism of infancy. *Diabetes* 49:1325-1333.

- Kerr JF, Wyllie AH, and Currie AR (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26:239-257.
- Kibirige M, Metcalf B, Renuka R, and Wilkin TJ (2003). Testing the accelerator hypothesis: the relationship between body mass and age at diagnosis of type 1 diabetes. *Diabetes Care* 26:2865-2870.
- Kim C, Newton KM, and Knopp RH (2002). Gestational diabetes and the incidence of type 2 diabetes: a systematic review. *Diabetes Care* 25:1862-1868.
- Kimes BW and Brandt BL (1976). Characterization of two putative smooth muscle cell lines from rat thoracic aorta. *Exp. Cell Res.* 98:349-366.
- Kjos SL, Peters RK, and Xiang A (1995). Predicting future diabetes in Latino women with gestational diabetes. *Diabetes* 44:586-591.
- Klein I, Sarkadi B, and Váradi A (1999). An inventory of the human ABC proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1461:237-262.
- Kocic I, Gruchala M, and Petruszewicz J (2006). Selective inhibition of pinacidil effects by estrogen in guinea pig heart. *Int. J. Cardiol.* 110:22-26.
- Kolb H and Mandrup-Poulsen T (2005). An immune origin of type 2 diabetes? *Diabetologia* 48:1038-1050.
- Kontny E, Kvanta A, and Fredholm BB (1992). Activation of protein kinase C and elevation of cAMP interact synergistically to raise c-Fos and AP-1 activity in Jurkat cells. *Eur. J. Pharmacol.* 227:333-338.
- Kuan NK and Passaro E Jr (1998). Apoptosis: programmed cell death. *Arch. Surg.* 133:773-775.
- Kurosaka K, Takahashi M, Watanabe N, and Kobayashi Y (2003). Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. *J. Immunol.* 171:4672-4679.
- Langer O, Yogev Y, Most O, and Xenakis E (2005). Gestational diabetes: The consequences of not treating. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 192:989-997.
- Laybutt DR., Kaneto H, Hasenkamp W, Grey S, Jonas JC, Sgroi DC, Groff A, Ferran C, Bonner-Weir S, Sharma A, and Weir GC (2002). Increased expression of antioxidant and antiapoptotic genes in islets that may contribute to beta-cell survival during chronic hyperglycemia. *Diabetes* 51:413-423.
- Le May C, Chu K, Hu M, Ortega CS, Simpson ER, Korach KS, Tsai MJ, and Mauvais-Jarvis F (2006). Estrogens protect pancreatic beta-cells from apoptosis and prevent insulin-deficient diabetes mellitus in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:9232-9237.
- Lee S and Pervaiz S (2006). Apoptosis in the pathophysiology of diabetes mellitus. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39:497-504.

- Lee TM, Su SF, Tsai CC, Lee YT, and Tsai CH (2000). Cardioprotective effects of 17beta-estradiol produced by activation of mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels in canine hearts. *J. Mol. Cell Cardiol.* 32:1147-1158.
- Lee TM, Chou TF, and Tsai CH (2003). Differential role of K_{ATP} channels activated by conjugated estrogens in the regulation of myocardial and coronary protective effects. *Circulation* 107:49-54.
- Legro RS, Kunselman AR, Dodson WC, and Dunaif A (1999). Prevalence and predictors of risk for type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in polycystic ovary syndrome: a prospective, controlled study in 254 affected women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84:165-169.
- Lewis JS, Meeke K, Osipo C, Ross EA, Kidawi N, Li T, Bell E, Chandel NS, and Jordan VC (2005). Intrinsic mechanism of estradiol-induced apoptosis in breast cancer cells resistant to estrogen deprivation. *J. Natl. Cancer Inst.* 97:1746-1759.
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, and Wang X (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91:479-489.
- Libman IM, Pietropaolo M, Arslanian SA, LaPorte RE, and Becker DJ (2003). Evidence for heterogeneous pathogenesis of insulin-treated diabetes in black and white children. *Diabetes Care* 26:2871-2875.
- Lindberg BS, Johansson EDB, and Nilsson BA (1974). Plasma levels of nonconjugated oestrone, oestradiol-17beta and oestriol during uncomplicated pregnancy. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 32:21-36.
- Liu WS and Heckman CA (1998). The sevenfold way of PKC regulation. *Cell Signal.* 10:529-542.
- Livingstone C and Collison M (2002). Sex steroids and insulin resistance. *Clin. Sci.* 102:151-166.
- Locksley RM, Killeen N, and Lenardo MJ (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104:487-501.
- Loe DW, Almquist KC, Deeley RG, Cole SPC (1996). Multidrug resistance protein (MRP)-mediated transport of leukotriene C₄ and chemotherapeutic agents in membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* 271:9675-9682.
- Löffler G, Petrides EP, and Heinrich PC (2007). Biochemie und Pathobiochemie. *Springer Medizin Verlag, Heidelberg* 8. Auflage.
- Lord JM and Ashcroft SJ (1984). Identification and characterization of Ca²⁺-phospholipid-dependent protein kinase in rat islets and hamster beta-cells. *Biochem. J.* 219:547-551.

- Loriaux DL, Ruder HJ, Knab DR, and Lipsett MB (1972). Estrone sulfate, estrone, estradiol and estriol plasma levels in human pregnancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 35:887-891.
- Lu A, M.Frink M, Choudhry MA, Schwacha MG, Hubbard WJ, Rue LW, Bland KI, and Chaudry I (2007). Mitochondria play an important role in 17beta-estradiol attenuation of H₂O₂-induced rat endothelial cell apoptosis. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 292:585-593.
- Lucas M and Sánchez-Margalet V (1995). Protein kinase C involvement in apoptosis. *Gen. Pharmacol.* 26:881-887.
- Luo Y, Waladali W, Li S, Zheng X, Hu L, Zheng H, Hu W, and Chen C (2008). 17β-Estradiol affects proliferation and apoptosis of rat prostatic smooth muscle cells by modulating cell cycle transition and related proteins. *Cell Biol. Int.* 32:899-905.
- Maedler K, Carr RD, Bosco D, Zuellig RA, Berney T, and Donath MY (2005). Sulphonylurea induced β-cell apoptosis in cultured human islets. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 90:501-506.
- Maedler K and Donath MY (2004). Beta-cells in type 2 diabetes: a loss of function and mass. *Horm. Res.* 62 Suppl 3:67-73.
- Maedler K, Fontana A, and Ris F (2002). Glucose-induced beta cell production of IL-1 beta contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. *J. Clin. Invest.* 110:851-860.
- Maedler K, Spinas GA, and Lehmann R (2001). Glucose induces beta-cell apoptosis via upregulation of the fas receptor in human islets. *Diabetes* 50:1683-1690.
- Maedler K, Schumann DM, Schulthess F, Oberholzer J, Bosco D, Berney T, and Donath MY (2006). Aging correlates with decreased β-cell proliferative capacity and enhanced sensitivity to apoptosis: a potential role for fas and pancreatic duodenal homeobox-1. *Diabetes* 55:2455-2462.
- Majno G and Joris I (1995). Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am. J. Pathol.* 146:3-15.
- Marino M, Galluzzo P, Leone S, Acconcia F, and Ascenzu P (2006). Nitric oxide impairs the 17beta-estradiol-induced apoptosis in human colon adenocarcinoma cells. *Endocr. Relat. Cancer* 13:559-569.
- Matsuo M, Kioka N, Amachi T, and Ueda K (1999). ATP binding properties of the nucleotide-binding folds of SUR1. *J. Biol. Chem.* 274:37479-37482.
- Mayne GC and Murray AW (1998). Evidence that protein kinase C epsilon mediates phorbol ester inhibition of calphostin C- and tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in U937 histiocytic lymphoma cells. *J. Biol. Chem.* 273:24115-24121.

- McMahon CD, Elsasser TH, Gunter DR, Sanders LG, Steele BP, and Sartin JL (1998). Estradiol/progesterone implants increase food intake, reduce hyperglycemia and increase insulin resistance in endotoxic steers. *J. Endocrinol.* 159:469-478.
- Mikhailov MV, Campbell JD, de Wet H, Shimomura K, Zadek B, Collins RF, Sansom MSP, Ford RC, and Ashcroft FM (2005). 3-D structural and functional characterization of the purified K_{ATP} channel complex Kir6.2-SUR1. *EMBO J.* 24:4166-4175.
- Mikhailov MV, Proks P, Ashcroft FM, and Ashcroft SJ (1998). Expression of functionally active ATP-sensitive K-channels in insect cells using baculovirus. *FEBS Lett.* 429:390-394.
- Miki T, Nagashima K, and Seino S (1999). The structure and function of the ATP-sensitive K^+ channel in insulin-secreting pancreatic β -cells. *J. Mol. Endocrinol.* 22:113-123.
- Miller TR, Taberb RD, Molinari EJ, Whiteaker KL, Monteggia LM, Scott VE, Brioni JD, Sullivan JP, and Gopalakrishnan M (1999). Pharmacological and molecular characterization of ATP-sensitive K^+ channels in the TE671 human medulloblastoma cell line. *Eur. J. Pharmacol.* 370:179-185.
- Miller VM and Duckles SP (2008). Vascular actions of estrogens: functional implications. *Pharmacol. Rev.* 60:210-241.
- Mohamed N and Dooly J (1998). Gestational diabetes and subsequent development of NIDDM in aboriginal women of northwestern Ontario. *Int. J. Circumpolar Health* 57:355-358.
- Mohr K (2004). Komplexe Wirkungsmechanismen - facettenreiche Wirkbilder. Pharmakologie der Estrogene. *Pharm. unserer Zeit* 5:360-364.
- Montelongo A, Lasunci3n MA, Pallardo LF, and Herrera E (1992). Longitudinal study of plasma lipoproteins and hormones during pregnancy in normal and diabetic women. *Diabetes* 41:1651-1659.
- Moreau C, Jacquet H, Prost AL, D'Hahan N, and Vivaudou M (2000). The molecular basis of the specificity of action of K_{ATP} channel openers. *EMBO J.* 19:6644-6651.
- Moses RG (1996). The recurrence rate of gestational diabetes in subsequent pregnancies. *Diabetes Care* 19:1348-1350.
- Nadal A, Ropero AB, Fuentes E, Soria B, and Ripoll C (2004). Estrogen and xenoestrogen actions on endocrine pancreas: from ion channel modulation to activation of nuclear function. *Steroids* 69:531-536.
- Nadal A, Rovira JM, Laribi O, Leon-Quinto T, Andreu E, Ripoll C, and Soria B (1998). Rapid insulinotropic effect of 17β -estradiol via a plasma membrane receptor. *FASEB J.* 12:1341-1348.
- Nagata S (1999). Fas ligand-induced apoptosis. *Annu. Rev. Genet.* 33:29-55.

- Neagoe I and Schwappach B (2005). Pas de deux in groups of four - the biogenesis of K_{ATP} channels. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 38:887-894.
- Negulescu O, Bogнар I, Lei J, Devarajan P, Silbiger S, and Neugarten J (2002). Estradiol reverses TGF- β 1-induced mesangial cell apoptosis by a casein kinase 2-dependent mechanism. *Kidney Int.* 62:1989-1998.
- Nelson DL and Cox M (2008). Lehninger Principles of Biochemistry. *W.H. Freeman and company, New York* 5. Auflage.
- Nichols CG (2006). K_{ATP} channels as molecular sensors of cellular metabolism. *Nature* 440:470-476.
- Nichols CG and Koster JC (2002). Diabetes and insulin secretion: whither K_{ATP} ? *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 283:E403-E412.
- Noma A (1983). ATP-regulated K^+ channels in cardiac muscle. *Nature* 305:147-148.
- Oleschuk CJ, Deeley RG, and Cole SPC (2003). Substitution of Trp¹²⁴² of TM17 alters substrate specificity of human multidrug resistance protein 3. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 284:G280-G289.
- Ordóñez P, Moreno M, Alonso A, Llanea P, Díaz F, and González C (2008). 17beta-Estradiol and/or progesterone protect from insulin resistance in STZ-induced diabetic rats. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 111:287-294.
- Ozanne SE, Guest PC, Hutton JC, and Hales CN (1995). Intracellular localization and molecular heterogeneity of the sulphonylurea receptor in insulin-secreting cells. *Diabetologia* 38:277-282.
- O'Sullivan JB and Mahan CM (1964). Criteria for the oral glucose tolerance test in pregnancy. *Diabetes* 13:278-285.
- Peter ME and Krammer PH (2003). The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ.* 10:26-35.
- Peters CA, Cutler RE, Maizels ET, Robertson MC, Shiu RP, Fields P, and Hunzicker-Dunn M (2000). Regulation of PKC delta expression by estrogen and rat placental lactogen-1 in luteinized rat ovarian granulosa cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 162:181-191.
- Pettitt DJ, Bennett PH, and Saad MF (1991). Abnormal glucose tolerance during pregnancy in Pima Indian women. long-term effects on offspring. *Diabetes* 40:126-130.
- Pietropaolo M, Barinas-Mitchell E, Pietropaolo SL, Kuller LH, and Trucco M (2000). Evidence of islet cell autoimmunity in elderly patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 49:32-38.
- Proks P and Ashcroft FM (1997). Phentolamine block of K_{ATP} channels is mediated by Kir6.2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:11716-11720.

- Proks P, Reimann F, Green N, Gribble F, and Ashcroft FM (2002). Sulfonylurea stimulation of insulin secretion. *Diabetes* 51:S368-S376.
- Rabinovitch A, Suarez-Pinzon W, Strynaska K, Ju Q, Edelstein D, Brownlee M, Korbitt GS, and Rajotte RV (1999). Transfection of human pancreatic islets with an anti-apoptotic gene (bcl-2) protects beta-cells from cytokine-induced destruction. *Diabetes* 48:1223-1229.
- Rai NK, Tripathi K, Sharma D, and Shukla VK (2005). Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing. *Int. J. Low. Extrem. Wounds* 4:138-144.
- Rajkhowa M, Bicknell J, Jones M, and Clayton RN (1994). Insulin sensitivity in women with polycystic ovary syndrome: relationship to hyperandrogenemia. *Fertil. Steril.* 61:605-612.
- Ranki HJ, Budas GR, Crawford RM, Davies AM, and Jovanovic A (2002). 17 β -estradiol regulates expression of K_{ATP} channels in heart-derived H9c2 cells. *J. Am. Coll. Cardiol.* 40:367-374.
- Rhodes CJ (2005). Type 2 diabetes - a matter of β -cell life and death? *Science* 307:380-384.
- Riedl SJ and Shi Y (2004). Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5:897-907.
- Rissanen J, Mykkanen L, Markkanen A, Kuusisto J, Karkkainen P, Karhapaa P, Pihlajamaki J, Niskanen L, Kekalainen P, and Laakso M (2000). Sulfonylurea receptor 1 gene variants are associated with gestational diabetes and type 2 diabetes but not with altered secretion of insulin. *Diabetes Care* 23:70-73.
- Rizzo T, Metzger BE, and Burns WJ (1991). Correlations between ante partum maternal metabolism and intelligence of off-spring. *N. Engl. J. Med.* 325:911-916.
- Rodriguez J and Lazebnik Y (1999). Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev.* 13:3179-3184.
- Roehrich ME, Mooser V, and Lenain V (2003). Insulin-secreting beta-cell dysfunction induced by human lipoproteins. *J. Biol. Chem.* 278:18368-18375.
- Rohr U (2006). Die Bedeutung des Estrogen-Rezeptors beta. *Deutsche Apotheker Zeitung* 45:68-74.
- Ropero AB, Alonso-Magdalena P, Ripoll C, Fuentes E, and Nadal A (2006). Rapid endocrine disruption: Environmental estrogen actions triggered outside the nucleus. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 102:163-169.
- Rorsman P and Trube G (1985). Glucose dependent K⁺-channels in pancreatic beta-cells are regulated by intracellular ATP. *Pflugers Arch.* 405:305-309.

- Rustenbeck I, Krautheim A, Jörns A, and Steinfeldt HJ (2004). β -Cell toxicity of ATP-sensitive K^+ channel-blocking insulin secretagogues. *Biochem. Pharmacol.* 67:1733-1741.
- Sakura H, Ammälä C, Smith PA, Gribble FM, and Ashcroft FM (1995a). Cloning and functional expression of the cDNA encoding a novel ATP-sensitive potassium channel subunit expressed in pancreatic beta-cells, brain, heart and skeletal muscle. *FEBS Lett.* 377:338-344.
- Sakura H, Ammälä C, Smith PA, Gribble FM, and Ashcroft FM (1995b). Cloning and functional expression of the cDNA encoding a novel ATP-sensitive potassium channel subunit expressed in pancreatic β -cells, brain, heart and skeletal muscle. *FEBS Lett.* 377:338-344.
- Sakuraba H, Mizukami H, Yagihashi N, Wada R, Hanyu C, and Yafihasi S (2002). Reduced beta-cell mass and expression of oxidative stress-related DNA damage in the islet of Japanese Typ II diabetic patients. *Diabetologia* 45:85-96.
- Saleh A, Srinivasula SM, Acharya S, Fishel R, and Alnemri ES (1999). Cytochrome c and dATP-mediated oligomerization of Apaf-1 is a prerequisite for procaspase-9 activation. *J. Biol. Chem.* 274:17941-17945.
- Santen RJ and Allred DC (2007). The estrogen paradox. *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* 3:496-497.
- Santerre RF, Cook RA, Crisel RM, Sharp JD, Schmidt RJ, Williams DC, and Wilson CP (1981). Insulin synthesis in a clonal cell line of simian virus 40-transformed hamster pancreatic beta-cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:4339-4343.
- Santiago-Walker AE, Fikaris AJ, Kao GD, Brown EJ, Kazanietz MG, and Meinkoth JL(2005). Protein kinase C delta stimulates apoptosis by initiating G1 phase cell cycle progression and S phase arrest. *J. Biol. Chem.* 280:32107-32114.
- Savill J and Fadok V (2000). Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 407:784-788.
- Savill, J, Wyllie AH, Henson J, Walport MJ, Henson PM, and Haslett C (1989). Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *J. Clin. Invest.* 83:865-875.
- Sawada F, Inoguchi T, Tsubouchi H, Sasaki S, Fujii M, Maeda Y, Morinaga H, Nomura M, Kobayashi K, and Takayanagi R (2008). Differential effect of sulfonylureas on production of reactive oxygen species and apoptosis in cultured pancreatic beta-cell line, MIN6. *Metab. Clin. Exp.* 57:1038-1045.
- Scott DA, Loveman E, and McIntyre L (2002). Screening for gestational diabetes: a systemic review and economic evaluation. *Health Technol. Assess.* 6:1-161.

- Seghers V, Nakazaki M, DeMayo F, Aguilar-Bryan L, and Bryan J (2000). Sur1 knockout mice. A model for K_{ATP} channel-independent regulation of insulin secretion. *J. Biol. Chem.* 275:9270-9277.
- Seino S (1999). ATP-sensitive potassium channels: a model of heteromultimeric potassium channel/receptor assemblies. *Annu. Rev. Physiol.* 61:337-362.
- Seino S and Miki T (2003). Physiological and pathophysiological roles of ATP-sensitive K^+ channels. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 81:133-176.
- Shaat N, Ekelund M, Lernmark A, Ivarsson S, Almgren P, Berntorp K, and Groop L (2005). Association of the E23K polymorphism in the *KCNJ11* gene with gestational diabetes mellitus. *Diabetologia* 48:2544-2551.
- Shaat N and Groop L (2007). Genetics of gestational diabetes mellitus. *Curr. Med. Chem.* 14:569-583.
- Shi Y (2002). Apoptosome: the cellular engine for the activation of caspase-9. *Structure* 10:285-288.
- Shibasaki T, Sunaga Y, and Seino S (2004). Integration of ATP, cAMP, and Ca^{2+} signals in insulin granule exocytosis. *Diabetes* 53:S59-S62.
- Shimaburuko M, Zhou YT, Levi M, and Unger RH (1998). Fatty acid-induced beta cell apoptosis: a link between obesity and diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:2498-2502.
- Shyng S, Ferrigni T, and Nichols CG (1997). Regulation of K_{ATP} channel activity by diazoxide and MgADP. Distinct functions of the two nucleotide binding folds of the sulfonylurea receptor. *J. Gen. Physiol.* 110:643-654.
- Shyng S and Nichols CG (1997). Octameric stoichiometry of the K_{ATP} channel complex. *J. Gen. Physiol.* 110:655-664.
- Slee EA, Adrain C, and Martin SJ (2001). Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *Cancer Res.* 276:7320-7326.
- Solomon CG, Willett WC, and Carey VJ (1997). A prospective study of pregravid determinants of gestational diabetes mellitus. *JAMA* 278:1078-1083.
- Song RX (2001). Effect of long-term estrogen deprivation on apoptotic responses of breast cancer cells to 17beta-estradiol. *J. Natl. Cancer Inst.* 93:1714-1723.
- Soria B, Quesada I, Ropero AB, Pertusa JA, Martin F, and Nadal A (2004). Novel players in pancreatic islet signalling - from membrane receptors to nuclear channels. *Diabetes* 53:S86-S91.
- Spruce AE, Standen NB, and Stanfield PR (1985). Voltage-dependent ATP-sensitive potassium channels of skeletal muscle membrane. *Nature* 316:736-738.

- Standen NB, Quayle JM, Davies NW, Brayden JE, Huang Y, and Nelson MT (1989). Hyperpolarizing vasodilators activate ATP-sensitive K⁺ channels in arterial smooth muscle. *Science* 245:177-180.
- Stephan D, Stauss E, Lange U, Felsch H, Löffler-Walz C, Hambrock A, Ruß U, and Quast U (2005). The mutation Y1206S increases the affinity of the sulphonylurea receptor SUR2A for glibenclamide and enhances the effects of coexpression with Kir6.2. *Br. J. Pharmacol.* 144:1078-1088.
- Stephenson MJ (1993). Screening for gestational diabetes mellitus: a critical review. *J. Fam. Pract.* 37:277-283.
- Sternnicke HR and Salvesen GS (2000). Caspases - controlling intracellular signals by protease zymogen activation. *Biochim. Biophys. Acta* 1477:299-306.
- Straub SG, Cosgrove KE, Ämmälä C, Shepherd RM, O'Brien RE, Barnes PD, Kuchinski N, Chapman JC, Schaeppi M, Glaser B, Lindley KJ, Sharp GWG, Aynsley-Green A, and Dunne MJ (2001). Hyperinsulinism of infancy - the regulated release of insulin by K_{ATP} channel-independent pathways. *Diabetes* 50:329-339.
- Sturgess NC, Ashford ML, Cook DL, and Hales CN (1985). The sulphonylurea receptor may be an ATP-sensitive potassium channel. *Lancet* 2:474-475.
- Swezey NB, Gauthier C, Gagnon S, Ferretti E, and Kopelman H (1996). Progesterone and estradiol inhibit CFTR-mediated ion transport by pancreatic epithelial cells. *Am. J. Physiol.* 271:747-754.
- Tamas G and Kerényi Z (2002). Current controversies in the mechanisms and treatment of gestational diabetes. *Curr. Diab. Rep.* 2:337-346.
- Tanaka Y, Gavrielides MV, Mitsuuchi Y, Fujii T, and Kazanietz MG (2003). Protein kinase C promotes apoptosis in LNCaP prostate cancer cells through activation of p38 MAPK and inhibition of the Akt survival pathway. *J. Biol. Chem.* 278:33753-33762.
- Taylor RA, Cowin P, Couse JF, Korach K, and Rsibridger GP (2006). 17beta-estradiol induces apoptosis in the developing rodent prostate independently of ERalpha or ERbeta. *Endocrinology* 147:191-200.
- Thews G, Mutschler E, and Vaupel P (1999). Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie des Menschen. *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart* 5. Auflage.
- Trube G, Rorsman P, and Ohno-Shosaku T (1986). Opposite effects of tolbutamide and diazoxide on the ATP-dependent K⁺ channel in mouse pancreatic beta-cells. *Pflugers Arch.* 407:493-499.
- Trump BF, Berezsky IK, Chang SH, and Phelps PC (1997). The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis. *Toxicol. Pathol.* 25:82-88.

- Tsai CH, Su SF, Chou TF, and Lee TM (2002). Differential effects of sarcolemmal and mitochondrial K_{ATP} channels activated by 17beta-estradiol on reperfusion arrhythmias and infarct sizes in canine hearts. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 301:234-240.
- Tsang SY, Yao XQ, Chan HY, Chen ZY, Ming WC, and Huang Y (2002). Effect of 17beta-estradiol exposure on vasorelaxation induced by K^+ channel openers and Ca^{2+} channel blockers. *Pharmacology* 65:26-31.
- Tsubouchi H, Inoguchi T, and Inuo M (2005). Sulfonylurea as well as elevated glucose levels stimulate reactive oxygen species production in the pancreatic beta-cell line, MIN6 - a role of NAD(P)H oxidase in beta-cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 326:60-65.
- Tucker SJ, Gribble FM, Zhao C, Trapp S, and Ashcroft FM (1997). Truncation of Kir6.2 produces ATP-sensitive K^+ channels in the absence of the sulphonylurea receptor. *Nature* 387:179-183.
- Tuffnell DJ, West J, and Walkinshaw SA (2005). Treatments for gestational diabetes and impaired glucose tolerance in pregnancy. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2.
- Turok DK, Ratcliffe SD, and Baxley AG (2003). Management of gestational diabetes mellitus. *Am. Fam. Physician* 68:1769-1772.
- Unemoto T, Honda H, and Kogo H (2003). Differences in the mechanisms for relaxation of aorta induced by 17beta-estradiol or progesterone between normotensive and hypertensive rats. *Eur. J. Pharmacol.* 472:119-126.
- van Assche FA, Gepts W, and Aerts L. (1980). Immunocytochemical study of the endocrine pancreas in the rat during normal pregnancy and during experimental diabetic pregnancy. *Diabetologia* 18:487-491.
- Vaxillaire M, Dechaume A, Busiah K, Cavé H, Pereira S, Scharfmann R, de Nanclares GP, Castano L, Froguel P, Polak M, and the SUR1-Neonatal Diabetes Study Group (2007). New ABCC8 mutations in relapsing neonatal diabetes and clinical features. *Diabetes* 56:1737-1741.
- Vidaeff AC, Yeomans ER, and Ramin SM (2003). Gestational diabetes: a field of controversy. *Obstet. Gynecol. Surv.* 58:759-769.
- Wanke I, Schwarz M and Buchmann A (2004). Insulin and dexamethasone inhibit TGF- β -induced apoptosis of hepatoma cells upstream of the caspase activation cascade. *Toxicology* 204:141-154.
- Whelan RD and Parker PJ (1998). Loss of protein kinase C function induces an apoptotic response. *Oncogene* 16:1939-1944.
- Wood W, Turmaine M, Weber R, Camp V, Maki RA, McKercher SR, and Martin P (2000). Mesenchymal cells engulf and clear apoptotic footplate cells in macrophageless PU.1 null mouse embryos. *Development* 127:5245-5252.

- Yamada M, Isomoto S, Matsumoto S, Kondo C, Shindo T, Horio Y, and Kurachi Y (1997). Sulphonylurea receptor 2B and Kir6.1 form a sulphonylurea-sensitive but ATP-insensitive K⁺ channel. *J. Physiol.* 499:715-720.
- Yoon KH, Ko SH, and Cho JH (2003). Selective beta-cell loss and alpha-cell expansion in patients with type 2 diabetes mellitus in Korea. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88:2300-2308.
- Yun SP, Lee MY, Ryu JM, Song CH, and Han HJ (2008). Role of HIF-1 {alpha} and VEGF in human mesenchymal stem cell proliferation by 17 {beta}-estradiol: involvement of PKC, PI3K/Akt, and MAPKs. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 296:317-326.
- Zecchi-Orlandini S, Formigli L, Tani A, Benvenutin S, Fiorelli G, Papucci L, Capaccioli S, Orlandini GE, and Brandi ML (1999). 17beta-estradiol induces apoptosis in the preosteoclastic FLG 29.1 cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 255:680-685.
- Zeiss CJ (2003). The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice. *Vet. Pathol.* 40:481-495.
- Zhang DW, Cole SPC, and Deeley RG (2002). Determinants of the substrate specificity of multidrug resistance protein 1 - role of amino acid residues with hydrogen bonding potential in predicted transmembrane helix 17. *J. Biol. Chem.* 277:20934-20941.
- Zhou YP, Teng D, Dralyuk F, Ostrega D, Roe MW, Philipson L, and Polonsky KS (1998). Apoptosis in insulin-secreting cells. Evidence for the role of intracellular Ca²⁺ stores and arachidonic acid metabolism. *J. Clin. Invest.* 101:1623-1632.

Publikationen

Teile der Ergebnisse dieser Dissertation wurden bereits in anderen Arbeiten veröffentlicht:

Originalarbeit:

Ackermann S, Hiller S, Osswald H, Lösle M, Grenz A, Hambrock A (2008). 17 β -Estradiol modulates apoptosis in pancreatic β -cells by specific involvement of the sulfonylurea receptor (SUR) isoform 1. *J. Biol. Chem.* Epub 18 Dec 2008.

Kongressbeiträge:

Ackermann S, Hiller S, Osswald H, Hambrock A (2007). 17 β -Estradiol specifically enhances apoptosis in cells expressing sulfonylurea receptor 1. *Diabetologia* 50 0422

Ackermann S, Hiller S, Osswald H, and Hambrock A (2008). 17 β -Estradiol is a ligand of the sulfonylurea receptor (SUR) and induces apoptosis in a SUR1 isoform-specific manner. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 388:158

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Stefanie Ackermann
Geburtsdatum: 04.07.1979
Geburtsort: Heilbronn

Schulausbildung

Aug. 1985 - Juli 1989 Grundschole, Erlenbach
Aug. 1989 - Juni 1998 Albert-Schweitzer-Gymnasium, Neckarsulm
Juni 1998 Allgemeine Hochschulreife

Studium

Okt. 1999 - März 2000 Studium der Biologie an der Ruprecht-Karls-Universität,
Heidelberg
April 2000 - Juni 2005 Studium der Ernährungswissenschaften an der Universität
Hohenheim, Stuttgart (inklusive Praxissemester in der
Nahrungsmittelindustrie)
Dez. 2004 - Juni 2005 Diplomarbeit am Institut für Ernährungsmedizin, Fachgebiet
Ernährungsphysiologie, der Universität Hohenheim, Stuttgart
Juni 2005 Abschluss als Diplom-Ernährungswissenschaftlerin

Promotion

Seit Okt. 2005 Promotion (Dr. rer. nat.) am Institut für Ernährungsmedizin,
Fachgebiet Ernährungsphysiologie, der Universität Hohenheim,
Stuttgart; die Anfertigung der Arbeit erfolgte extern am Institut
für Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums
Tübingen

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Frau Prof. Dr. Christiane Bode für die stets sehr engagierte und kompetente Betreuung dieser Arbeit und das in mich gesetzte Vertrauen.

Des Weiteren möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Hartmut Oßwald bedanken. Seine konstruktiven Ratschläge und seine wertvolle Unterstützung bei der Präparation von Langerhans-Inseln aus Mäusen waren eine sehr große Hilfe.

Mein besonderer Dank gilt Frau Priv. Doz. Dr. Annette Hambrock für die Überlassung dieses interessanten Themas. Sie war mir mit ihrer großartigen und intensiven Betreuung sowie fachlichen Kompetenz eine sehr große Hilfe und hat wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ganz herzlich danke ich meiner Doktoranden-Kollegin Sabrina Hiller, die mir während der laborpraktischen Arbeit mit unermüdlicher Hilfsbereitschaft zur Seite stand. Unsere fachlichen sowie persönlichen und humorvollen Gespräche habe ich sehr geschätzt.

Meinen Kolleginnen Claudia Bernardo de Oliveira Franz, Martina Lösle sowie Claudia Müller danke ich ganz herzlich für die wertvollen Ratschläge und die sehr hilfreiche Unterstützung, die sie mir entgegengebracht haben.

Außerdem danke ich Priv. Doz. Dr. Almut Grenz und Dr. Hua Zhang herzlich für die Unterstützung bei der Präparation von Langerhans-Inseln aus Mäusen. Mein Dank gilt auch Frau Prof. Gisela Drews und Belinda Gier vom Institut für Pharmazie in Tübingen sowie Stefanie Laucher aus der Abteilung Anästhesiologie für die zur Verfügung gestellten Versuchstiere. Frau Dr. Lydia Aguilar-Bryan und Herrn Prof. Dr. Joseph Bryan vom Pacific Northwest Diabetes Research Institute, Seattle, USA, danke ich sehr für die Bereitstellung ihrer Knockout-Mäuse.

Herzlich danken möchte ich auch den Mitarbeitern der Abteilung Toxikologie, insbesondere Dr. Christoph Köhle und Dr. Albert Braeuning für die jederzeit sehr freundliche und kompetente Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt Sascha Gaukler für seine großartige und unverzichtbare Unterstützung sowie für seine unermüdliche Geduld.

Ich bedanke mich ganz herzlich bei meinen wunderbaren Eltern Barbara und Kurt Ackermann, die mir stets den Rücken stärkten und auf deren Unterstützung ich immer zählen konnte.

Ein ganz herzliches Dankeschön geht an meine einzigartige Schwester Nicole Ackermann und an Sascha Seifert, die mich auf ganz wundervolle Weise mit voller Kraft unterstützten.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass die vorliegende Arbeit von mir selbst, lediglich unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt wurde. Wörtlich oder inhaltlich zitierte Stellen wurden als solche kenntlich gemacht.

Stuttgart, im März 2009

Stefanie Ackermann