

**Untersuchungen zum Einfluss ausgewählter
Mutationen in den Nukleotidbindungsfalten des
Sulfonylharnstoffrezeptors SUR1 auf die
SUR-vermittelte Apoptose-Modulation nach
Behandlung mit 17β -Estradiol**

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Diplom-Biologin Martina Lösle
aus Lörrach

Tübingen
2013

Tag der mündlichen Qualifikation:

27.05.2014

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Hanspeter A. Mallot

2. Berichterstatter:

PD Dr. Annette Hambrock

3. Berichterstatter:

Prof. Dr. Peter Ruth

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| Inhaltsverzeichnis | 1 |
| Einleitung | 4 |
| 1.1 Ionenkanäle | 4 |
| 1.2 Der ATP-sensitive K ⁺ -Kanal (K _{ATP} -Kanal) | 5 |
| 1.2.1 Regulation der K _{ATP} -Kanäle über Nukleotidbindungsfalten..... | 7 |
| 1.2.2 Pharmakologische Bedeutung des SUR | 9 |
| 1.2.3 Pathophysiologische Veränderungen der regulatorischen Untereinheit des K _{ATP} -Kanals..... | 10 |
| 1.3 Apoptose..... | 12 |
| 1.3.1 Der extrinsische Apoptosepfad..... | 13 |
| 1.3.2 Der intrinsische Apoptosepfad..... | 13 |
| 1.3.3 Apoptose in β-Zellen..... | 15 |
| 1.4 Estrogene | 16 |
| 1.4.1 Synthese von Estrogenen..... | 16 |
| 1.4.2 Physiologische Effekte von 17β-Estradiol..... | 17 |
| 1.4.3 Estrogenrezeptoren | 18 |
| 1.4.4 Selektive Estrogenrezeptormodulatoren (SERMs)..... | 20 |
| 2 Zielsetzung der Arbeit | 21 |
| 3 Material | 23 |
| 3.1 Geräte..... | 23 |
| 3.2 Verbrauchsmaterialien..... | 25 |
| 3.3 Chemikalien | 25 |
| 3.4 Medien und gepufferte Salzlösungen | 27 |
| 3.5 Kits..... | 27 |
| 3.6 Kulturmedien, Puffer und Lösungen | 27 |
| 3.6.1 Wachstumsmedien für die Zellkultur..... | 27 |
| 3.6.1.1 Medium für Human Embryonic Kidney (HEK) 293-Zellen | 27 |
| 3.6.1.2 Medium für Michigan Cancer Foundation (MCF) 7-Zellen..... | 28 |
| 3.6.1.3 Medium für Insulinoma (INS) 1-Zellen | 28 |
| 3.6.2 Medium für isolierte Langerhans-Inseln..... | 28 |
| 3.6.3 Medien zum Einfrieren von Zellen | 28 |
| 3.6.4 Trypsin/EDTA-Lösung | 29 |
| 3.6.5 Paraformaldehyd-Lösung | 29 |
| 3.6.6 HOECHST 33258-Lösung | 29 |
| 3.6.7 Lösungen für die Caspase Aktivitäts-Bestimmungen | 29 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 3.6.7.1 | Caspase Lysepuffer..... | 29 |
| 3.6.8 | Pentobarbital-Lösung..... | 30 |
| 3.6.9 | Kollagenase-Lösung..... | 30 |
| 3.6.10 | Lösungen für die Radioligandenbindungsstudien..... | 30 |
| 3.6.10.1 | Inkubationspuffer..... | 30 |
| 3.6.10.2 | Hypotoner-Puffer..... | 31 |
| 3.6.10.3 | Waschpuffer..... | 31 |
| 3.7 | Primer SUR1..... | 31 |
| 3.8 | Genexpressionsanalyse via Microarray..... | 31 |
| 3.9 | EDV..... | 31 |
| 4 | Methoden..... | 32 |
| 4.1 | Zellkultur..... | 32 |
| 4.1.1 | Plasmide und Zelllinien..... | 33 |
| 4.1.2 | Herstellung von Punktmutanten am Beispiel von SUR1(R1379C) und SUR1(R1379L) | 33 |
| 4.1.2.1 | Mutagenese über DNA-Amplifikation durch Polymerase Kettenreaktion (PCR)..... | 34 |
| 4.1.2.2 | <i>DpnI</i> -Verdau..... | 36 |
| 4.1.2.3 | Transformation von <i>E. coli</i> , Ansetzten von Bakterienkulturen..... | 36 |
| 4.1.2.4 | Plasmidisolierung aus transformierten Bakterien..... | 37 |
| 4.1.2.5 | Kontrolle einer erfolgreichen Mutation durch Sequenzierung..... | 37 |
| 4.1.3 | Gewinnung rekombinanter HEK293-Zellen durch Transfektion..... | 37 |
| 4.1.3.1 | Gewinnung stabil transfizierter HEK293-Zellen..... | 38 |
| 4.1.3.2 | Kultivierung stabil transfizierter HEK293-Zellen..... | 39 |
| 4.1.3.3 | Kultivierung von MCF7-Zellen und INS1-E-Zellen..... | 40 |
| 4.1.3.4 | Auftauen von Zellen..... | 41 |
| 4.1.3.5 | Einfrieren von Zellen..... | 41 |
| 4.1.4 | Aufarbeitung von HEK293-Zellen für die Microarray-Analyse..... | 42 |
| 4.1.5 | Membranaufarbeitungen von HEK293-Zellen..... | 42 |
| 4.2 | Versuchstierhaltung..... | 43 |
| 4.2.1 | Isolation von Langerhans-Inseln..... | 43 |
| 4.3 | Methoden zum Nachweis von Apoptose..... | 44 |
| 4.3.1 | Quantifizierung der Zellablösung..... | 44 |
| 4.3.2 | Kernfärbung mit dem Farbstoff HOECHST 33258..... | 45 |
| 4.3.2.1 | Fixierung der Zellen..... | 45 |
| 4.3.2.2 | HOECHST 33258-Färbung..... | 45 |
| 4.3.2.3 | Fixierung und Färbung von isolierten Langerhans-Inseln..... | 46 |
| 4.3.3 | Aktivitätsbestimmung von Caspase-Enzymen..... | 46 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 4.4 | Radioligandenbindungsstudien..... | 48 |
| 4.4.1 | Kompetitionsexperimente | 48 |
| 4.4.2 | Eingesetzter Radioligand: ³ H-Glibenclamid | 49 |
| 4.4.3 | Durchführung der Radioligandenbindungsstudien..... | 49 |
| 4.4.4 | Bestimmung der Radioaktivität | 51 |
| 4.4.4.1 | Das Massenwirkungsgesetz | 51 |
| 4.4.5 | Auswertung von Kompetitionsexperimenten | 52 |
| 4.5 | Proteinbestimmung nach Bradford | 56 |
| 5 | Ergebnisse | 57 |
| 5.1 | Bestimmung der Apoptoserate in Zellen, die SUR1 und SUR1-Mutationen exprimieren nach Behandlung mit E2 | 58 |
| 5.1.1 | Bestimmung der Rate der Zellablösung in HEK293-Zellen nach Behandlung mit E2 | 58 |
| 5.1.2 | Bestimmung des Ausmaß der veränderten Kernmorphologie in HEK293-Zellen nach Behandlung mit E2 | 60 |
| 5.1.3 | Bestimmung der Aktivität verschiedener Caspase-Enzyme in HEK293-Zellen nach Behandlung mit E2 | 62 |
| 5.2 | Untersuchungen zur Wirkung von E2 in ER positiven Zelllinien | 65 |
| 5.2.1 | Bestimmung der Rate der Zellablösung in mit SUR1-cDNA transfizierten MCF7-Zellen nach Behandlung mit E2..... | 66 |
| 5.2.2 | Bestimmung der Rate der Zellablösung in SUR1 exprimierenden INS1-E-Zellen nach Behandlung mit E2 | 70 |
| 5.2.3 | Untersuchung der Sensitivität verschiedener Zellen gegenüber einer Behandlung mit E2 | 71 |
| 5.3 | Ermittlung der Auswirkung von ER-Modulatoren auf die Zellvitalität von SUR1 exprimierende Zellen..... | 73 |
| 5.3.1 | Auswirkung der Behandlung von rekombinanten HEK293-Zellen und isolierten Langerhansinseln mit Tamoxifen auf die Zelladhäsion und Kernmorphologie | 73 |
| 5.3.2 | Auswirkung der Behandlung von rekombinanten HEK293-Zellen mit Fulvestrant auf die Zelladhäsion..... | 76 |
| 5.4 | Auswirkung der Behandlung mit Estradiol, Tamoxifen und Fulvestrant auf die Zellvitalität von MCF7-Zellen..... | 78 |
| 5.5 | Radioligandenbindungsstudien zur Untersuchung einer möglichen Interaktion von Tamoxifen mit dem SUR1 | 79 |
| 5.6 | Analyse der Genexpression nach Behandlung mit E2 in HEK293-Zellen die pcDNA, SUR1 oder SUR1(R1379C) exprimieren..... | 81 |
| 5.6.1 | Veränderungen in der Expression bestimmter Gene nach Behandlung mit E2 | 82 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 5.6.2 | Unterschiede bezüglich der Expression bestimmter Gene zwischen den Zelltypen vor und nach Behandlung mit E2..... | 84 |
| 5.6.3 | Untersuchung der Genexpressions-Analysen auf endogen vorkommende Estrogenrezeptoren, ABC-Proteine und wichtige Enzyme | 85 |
| 6 | Diskussion..... | 87 |
| 6.1 | Bestimmte Mutationen in den Nukleotidbindungsfalten des SUR1 können die Apoptose-Induktion durch E2 beeinflussen..... | 87 |
| 6.1.1 | Untersuchungen zum Einfluss von endogenen Estradiolrezeptoren (ER) auf die E2 induzierten, SUR1 vermittelten Apoptose..... | 91 |
| 6.1.2 | Untersuchung der E2-Sensitivität von Zellen, welche die analysierten SUR1-Mutanten exprimieren | 93 |
| 6.2 | Untersuchungen zum Einfluss von Estrogenrezeptor-Modulatoren auf die SUR1 vermittelten Verluste der Zellvitalität nach Behandlung mit E2 | 94 |
| 6.2.1 | Analyse der Wirkung einer kombinierten Behandlung von Tamoxifen und E2 auf rekombinante HEK293-Zellen und isolierte Langerhans-Inseln | 94 |
| 6.2.2 | Untersuchung des Effektes von Fulvestrant in Kombination mit E2 auf rekombinanten HEK293-Zellen | 97 |
| 6.2.3 | Untersuchungen eines Effektes der Behandlung mit Estradiol, Tamoxifen oder Fulvestrant auf die Zellvitalität von MCF7-Zellen..... | 98 |
| 6.3 | Untersuchungen zur möglichen Interaktion von Tamoxifen mit SUR1 | 99 |
| 6.4 | Untersuchung zur Beeinflussung der Expression bestimmter Gene in HEK293-Zellen durch die Expression von SUR1 oder SUR1(R1379C)..... | 100 |
| 6.4.1 | Analyse der E2 induzierten Expressionsveränderungen in den untersuchten Zellen | 101 |
| 6.4.2 | Analyse des Einflusses der Expression von SUR1 und SUR1(R1379C) auf die spezifische Aktivierung bestimmter Gene..... | 102 |
| 7 | Zusammenfassung und Ausblick | 104 |
| 8 | Abkürzungsverzeichnis | 108 |
| 9 | Literaturverzeichnis..... | 111 |
| | Danksagung..... | 124 |
| | Publikationen..... | 125 |
| | Eidesstattliche Erklärung | 126 |

Einleitung

1.1 Ionenkanäle

Klassische Ionenkanäle sind passive Transportsysteme, welche sehr hohe Transportgeschwindigkeiten erreichen können. Die Geschwindigkeiten, mit denen Ionen über die Membran transportiert werden, können an die Diffusionsraten der einzelnen Ionen in wässriger Lösung heranreichen. Dabei reagieren Ionenkanäle auf physikalische und chemische Veränderungen in ihrer Umgebung mit zeitlich exakten Konformationsänderungen. Viele Ionenkanäle sind hochselektiv, so gibt es Kanäle, die nur von Kationen oder nur von Anionen durchquert werden können, aber auch Kanäle die den Durchfluss nur eines einzigen Ions wie zum Beispiel K^+ erlauben. Die Kanäle können reguliert und kontrolliert zwischen offenem und geschlossenem Zustand wechseln. Dabei erfolgt die Kontrolle des Zustandes entweder ligandengesteuert über die Bindung einer bestimmten Substanz oder spannungsgesteuert über ein elektrisches Membranpotential (Stryer, 2003). Ionenkanäle kommen in der Plasmamembran und in Membranen intrazellulärer Organellen aller Zellen vor. Dabei werden verschiedenste Funktionen wie die Neurotransmission, die Kontraktion von Muskeln, die Sekretion verschiedener Stoffe und die Kontrolle des Zellvolumens über Ionenkanal-Aktivitäten gesteuert (Aguilar-Bryan and Bryan, 1999).

Ein Beispiel für Ionenkanäle und für diese Arbeit von besonderem Interesse ist der ATP-sensitive Kalium (K_{ATP})-Kanal.

1.2 Der ATP-sensitive K^+ -Kanal (K_{ATP} -Kanal)

Der K_{ATP} -Kanal ist ein hetero-oktamerer Komplex. Dieser Komplex setzt sich aus vier porenbildenden Untereinheiten und vier regulatorischen Untereinheiten in einer 4:4 Stöchiometrie zusammen. Dabei wird durch Mitglieder der Familie der einwärts-gleichgerichteten Kalium-Kanäle (Kir6.x) die Pore gebildet, wohingegen Sulfonylharnstoffrezeptoren (SUR) die regulatorischen Untereinheiten ausmachen (Aguilar-Bryan and Bryan, 1999; Ashcroft, 1998; Burke et al., 2008; Clement et al., 1997; Seino and Miki, 2003).

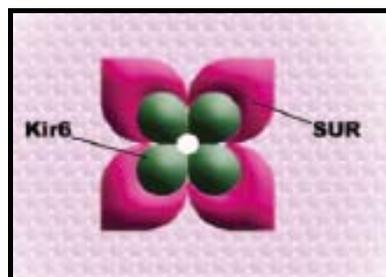


Abb.1: Schematische Darstellung des K_{ATP} -Kanals, aus Burke et al., 2008. Der Kanal ist ein hetero-oktamerer Komplex aus 4 porenbildenden Kir6-Untereinheiten und 4 regulatorischen SUR-Untereinheiten.

Die generelle Funktion des K_{ATP} -Kanals ist die Verknüpfung des zellulären Energiestoffwechsels mit dem Membranpotential. Im Wesentlichen erfolgt dies über die Perzeption des intrazellulären ATP-Level. Die Kir6.x-Untereinheit reguliert den Transport von Kalium während die SUR-Untereinheit eine regulatorische Rolle in Bezug auf die Kanalaktivität, abhängig vom ATP-Level der Zelle, spielt (Burke et al., 2008).

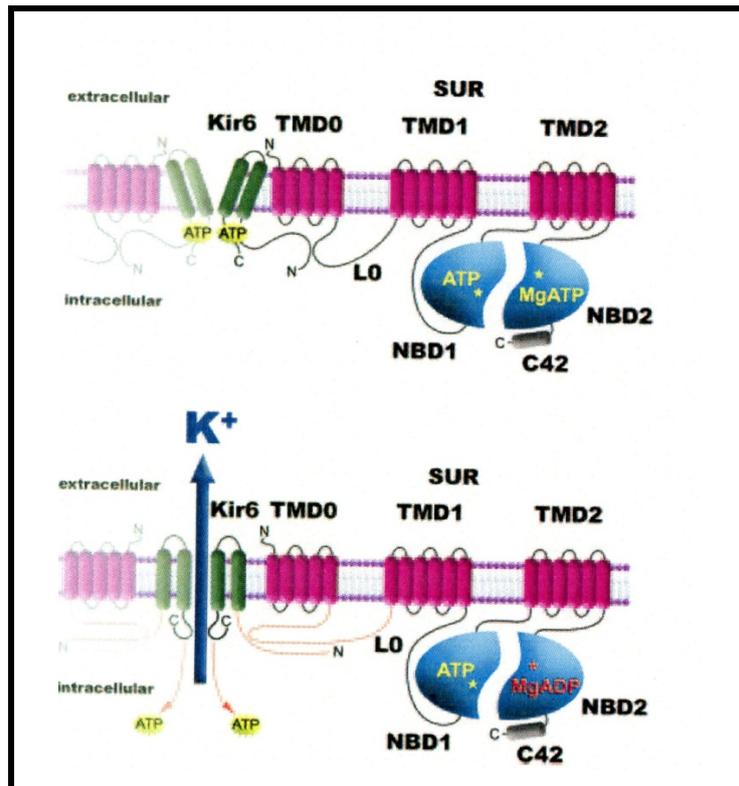


Abb.2: Schematische Darstellung des K_{ATP} -Kanals auf molekularer Ebene, aus Burke et al., 2008. Der N-Terminus der porenbildenden Untereinheit Kir6 (grün) interagiert mit der Linkerregion (L0) und der Transmembran-Domäne 0 (TMD0) des SUR (rot). Die Nukleotidbindungsstellen (NBF) zwischen den Transmembran-Domänen TMD1 und TMD2 sind der Ort der ATP-Hydrolyse. In Anwesenheit von ATP ist der Kanal geschlossen, nach der Hydrolyse von ATP befindet sich der Kanal im offenen Zustand.

Die Kir6.x Untereinheit besteht überwiegend aus 2 transmembranären Helices. Sowohl der C-Terminus als auch der N-Terminus sind intrazellulär lokalisiert. Bisher sind zwei Isoformen der Kir6.x Familie beschrieben: Kir6.1 und Kir6.2 (Inagaki, 1995). Die regulatorische Untereinheit SUR besteht aus 17 transmembranären Helices, welche in 3 Transmembrandomänen (TMD) angeordnet sind. Eine cytoplasmatische Linkerregion (L0) verbindet TMD0 und TMD1 miteinander. Der extrazellulär liegende N-Terminus an TMD0 und die L0-Region stehen in direkter Interaktion mit der porenbildenden Untereinheit des Kir6.x. Zwischen TMD1 und TMD2 befindet sich auf intrazellulärer Seite die Nukleotidbindungsstelle 1 (NBF1) und an TMD2 liegt intrazellulär nahe des C-Terminus die

NBF2. Die Nukleotidbindungsfalten (*engl. Nucleotide Binding Domains, NBDs*) interagieren miteinander und stellen den Ort der ATP-Hydrolyse dar. Der SUR kann damit über die NBFs als Sensor des metabolischen Zustandes wirken und moduliert so die Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals. Das intrazelluläre Verhältnis von ATP zu ADP ist dabei für den Zustand des Kanals von entscheidender Bedeutung. In Anwesenheit von gebundenem ATP befindet sich der Kanal eher im geschlossenen Zustand. Nach der Hydrolyse von ATP ist die Öffnungswahrscheinlichkeit erhöht und K^+ -Ionen können die Membran passieren (Bryan et al., 2007; Hosy et al., 2007; Schwappach, 2000). Der Sulfonylharnstoffrezeptor ist Mitglied der Familie der ATP bindenden Kassettenproteine (ATP binding cassettes (ABC) proteins). Im Gegensatz zu den „klassischen“ ABC-Proteinen (z.B. MDR-Protein) ist für den SUR bis heute keine Transportfunktion beschrieben (Borst and Elferink, 2002; Inagaki, 1995). Es gibt zwei SUR-Isoformen, SUR1 und SUR2, wobei SUR1 vom *ABCC8* und SUR2 vom *ABCC9* Gen codiert werden. Beide können zusätzlich in zahlreichen verschiedenen Splicevarianten vorkommen, zum Beispiel SUR2A und SUR2B welche sich in der Sequenz der letzten 42 Aminosäuren carboxyterminal unterscheiden (Aguilar-Bryan and Bryan, 1999).

Der SUR verleiht über diese Eigenschaften dem K_{ATP} -Kanal eine Sensitivität gegenüber Kanal-Modulatoren, welche die Kanal-Aktivität über direkte Interaktion mit dem SUR beeinflussen können (Aittoniemi et al., 2009; Nichols, 2006; Proks, 1997).

Je nach Gewebe unterscheidet sich die Zusammensetzung des K_{ATP} -Kanals. Nach Burke et al., 2008 liegen in Herz, Auge, Gehirn und Darm überwiegend die Kombinationen Kir6.1 x SUR2B und Kir6.2 x SUR2B vor, im Herz vor allem die Kombination Kir6.2 x SUR2A und im Gehirn und Pankreas die Kombination Kir6.2 x SUR1. Es gibt jedoch auch Hinweise auf das Vorkommen von SUR1 im Atrium des Herzens (Lefer, 2009). Der pankreatischen K_{ATP} -Kanal mit der Kombination Kir6.2 x SUR1 ist einer der am besten charakterisierten Kanäle dieser Familie. In den β -Zellen der Langerhans-Inseln des Pankreas ist der K_{ATP} -Kanal an der Regulation der Insulinausschüttung maßgeblich beteiligt. Ist viel Glukose vorhanden, verschiebt sich Stoffwechsel-bedingt das ATP/ADP Verhältnis in der Zelle auf die Seite von ATP. Ein erhöhter ATP-Spiegel führt zum Schließen der K_{ATP} -Kanäle. Dadurch kommt es zur Depolarisation der Plasmamembran, wodurch spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle in der Plasmamembran geöffnet werden. Der Ca^{2+} Influx führt dann zur Freisetzung von Insulinvesikeln (Aguilar-Bryan, 1995; Hinke, 2009; Proks et al., 2006). Die Insulinsekretion wird, außer über die Aktivität von K_{ATP} -Kanälen, zudem moduliert und verstärkt durch K_{ATP} -Kanal unabhängige Wege z.B. über Inkretinhormone (Aizawa, 1998; Straub S. G.; Cosgrove, 2001) oder auch K_{ATP} -Kanal unabhängig über Glukose (Henquin, 2000). Zusätzlich wird die totale Menge an sezerniertem Insulin durch adaptive Veränderungen der β -Zellmasse reguliert. Man nimmt an, dass diese Regulation über

verschiedene Mechanismen wie der β -Zell Neogenese, der Proliferation der β -Zellen und deren Apoptose erfolgen kann (Butler, 2003; Butler et al., 2007).

1.2.1 Regulation der K_{ATP} -Kanäle über Nukleotidbindungsfalten

Die komplexe Regulation der K_{ATP} -Kanäle kann unter anderem über Faktoren wie negative geladene langkettige Lipide, wie zum Beispiel Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) oder Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP_3), Proteinkinasen, trimere G-Proteine, Temperatur oder den pH-Wert erfolgen (Seino and Miki, 2003). Eine große Bedeutung für die Steuerung haben die Nukleotide ATP und ADP, da diese den metabolischen Zustand der Zelle signalisieren.

Für die Regulation des K_{ATP} -Kanals über die NBF des SUR spielt die An- bzw. Abwesenheit von Mg^{2+} eine Rolle, nicht jedoch bei der Kir6.x vermittelten Regulation bei welcher ATP eine direkte Interaktion mit der Kir6.x-Untereinheit eingeht und zur Schließung des Kanals führt (Ashcroft and Kakei, 1989). Die Bindung von ATP an NBF1 des SUR1 wird stabilisiert durch die Bindung von MgADP beziehungsweise MgATP an NBF2 und einer dadurch induzierten Konformationsänderung. Ohne diese Stabilisierung wird die Bindung von ATP an NBF1 geschwächt und es kommt zu einer Schließung des K_{ATP} -Kanals (Ueda, 1999b). Den komplexen Vorgang vereinfacht dargestellt, werden K_{ATP} -Kanäle inhibiert durch ATP/MgATP und aktiviert durch MgATP/MgADP, wobei die Hemmung über Kir6.x und die Aktivierung über den SURx vermittelt wird (Nichols, 2006). In einem Modell von Yamada et al. für die Nukleotidregulation des SUR1, werden zwei Konformationszustände von NBF1 und NBF2 angenommen. Im inaktiven Zustand des K_{ATP} -Kanals liegen die NBFs in einem nicht-dimerisierten Zustand vor, während die Bindung von ATP zu einer Dimerisierung der NBFs und einer damit einhergehenden Konformationsänderung führt. Diese Konformationsänderung wird über die Transmembrandomänen an den Kir6.2 weitergeleitet und der Kanal geöffnet (Yamada and Kurachi, 2004). Die durch ATP ausgelöste Dimerisierung der NBFs und die damit einhergehende Konformationsänderung beeinflusst auch die Bindung von K_{ATP} -Kanal Modulatoren. So liegt die Bindestelle für Kanalöffner aber auch für den Kanalblocker Glibenclamid in TMD2, welche mit beiden NBFs in Verbindung steht. Es wird angenommen, dass auch die ATP-Hydrolyse eine Konformationsänderung hervorruft, welche die Affinität der Kanalöffner an die Bindestelle des SUR erhöht (Schwanstecher, 1998; Yamada et al., 2004). Zusätzlich wirken die gebundenen Kanalöffner positiv verstärkend auf die ATP-Hydrolyserate, wodurch die Konzentration an dem physiologischen Öffner MgADP erhöht wird (Bienengraeber, 2000). Weiterhin reduziert ATP die SUR1-Bindung zu GBC in Anwesenheit von Mg^{2+} , vermutlich über die ATPase-Aktivität von NBF1 (Hambrock, 2002). Auch MgADP kann die GBC-Bindung an den SUR1 inhibieren (Ashcroft, 1990; Hambrock, 2002). Die meisten Kanalöffner haben eine hohe Affinität zu SUR2 (Babenko A.P.; Gonzales, 2000; Moreau et al., 2005), während die Kanalblocker eine

höhere Affinität zu SUR1 aufweisen (Winkler et al., 2007). Bei SUR2 ist die Anwesenheit von hydrolysierbarem ATP unabdingbar für eine hohe Affinität von Kanalöffnern (Hambrock, 1998; Schwanstecher, 1998), jedoch konnte auch eine geringe Affinität der Kanalöffner in Abwesenheit von MgATP zu SUR und damit ein SUR-ATPase unabhängiger Weg der Kanalöffnung nachgewiesen werden (Russ et al., 2003).

1.2.2 Pharmakologische Bedeutung des SUR

Die regulatorische Funktion des SUR innerhalb des K_{ATP} -Kanals kann pharmakologisch genutzt werden. Sulfonylharnstoffe wie zum Beispiel Glibenclamid und Tolbutamid wirken als Kanal-Blocker und bewirken eine Hemmung des K_{ATP} -Kanals. Im Vergleich dazu wirkt Diazoxid als Kanal-Öffner und trägt zu einer Aktivierung des K_{ATP} -Kanals bei. Die Hemmung über die Blocker der K_{ATP} -Kanäle in pankreatischen β -Zellen, führt zu einer gesteigerten Insulinsekretion, und machen die Kanal-Blocker zu einem Werkzeug in der Therapie von Diabetes Typ 2 (Sturgess 1985, Seino und Miki 2003).

Die unter 1.2 beschriebenen Isoformen des SUR weisen unterschiedliche Affinitäten für die einzelnen Öffner und Blocker des K_{ATP} -Kanals auf. So zeigt SUR1 eine hohe Affinität gegenüber dem Kanal-Blocker Glibenclamid, jedoch eine geringe Affinität gegenüber den meisten Öffnern. Bei SUR2 verhält es sich genau umgekehrt. SUR2 zeigt eine geringe Affinität gegenüber Glibenclamid, jedoch eine hohe Affinität gegenüber den meisten Kanal-Öffnern (Aguilar-Bryan, 1995; Inagaki, 1996; Seino and Miki, 2003). Für die Glibenclamid-Bindung spielt unter anderem die Aminosäure Serin (S) an Position 1237 in SUR1 eine wichtige Rolle. In SUR2 ist es die Aminosäure Tyrosin (Y) an der Position 1206 (Ashfield, 1999). Beide Aminosäuren befinden sich zwischen den Transmembranhelices 14 und 15, welche eine Binderegion für GBC am SUR darstellt. In den SUR2 Splicevarianten SUR2A und SUR2B wurde gezielt das Tyrosin des SUR2 gegen die korrespondierende Aminosäure Serin aus SUR1 ausgetauscht und damit die Affinität zu Glibenclamid des SUR2 erhöht.

Durch diese Erhöhung der Affinität zu Glibenclamid, ohne wesentliche Veränderung in der Öffner-Bindung von P1075, können die Mutanten SUR2A und SUR2B für Analysen der komplexen Beziehung zwischen Sulfonylharnstoffen und Kanalöffnern durch Radioliganden-Bindungsstudien unter Einsatz von ^3H -Glibenclamid oder ^3H -P1075 verwendet werden (Hambrock, 2001; Stephan et al., 2005). Eine weitere Binderegion für GBC am SUR befindet sich wahrscheinlich in der cytoplasmatischen Schleife zwischen den Transmembranhelices 5 und 6 (Mikhailov, 2001). Die beschriebenen Binderegionen am SUR können auch Bindestellen für in ihrer chemischen Struktur GBC ähnlichen Kanalblockern darstellen. Der Mechanismus der Bindung der K_{ATP} -Kanal-Inhibitoren an den SUR ist komplex und noch nicht im Detail geklärt. Man kann die unterschiedlichen Kanalblocker je nach Bindungsverhalten in A-Liganden (z.B. Tolbutamid), A+B-Liganden (z.B. Glibenclamid)

und B-Liganden (z.B. Repaglinid) einteilen, welche sich in der Anzahl und Ausrichtung der lipophilen Zentren unterscheiden (Winkler et al., 2007).

1.2.3 Pathophysiologische Veränderungen der regulatorischen Untereinheit des K_{ATP} -Kanals

Mutationen, welche die Funktion des pankreatischen K_{ATP} -Kanals betreffen, können verschiedene Krankheitsausprägungen zur Folge haben. Viele dieser Mutationen mit pathophysiologischer Bedeutung liegen in der SUR1-Untereinheit. Ein Beispiel dafür ist das Syndrom des neonatalen Hyperinsulinismus (*Persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy* (PHHI)). PHHI ist charakterisiert durch eine übermäßige Insulinausschüttung trotz vorliegender Hypoglykämie. Mildere Ausprägungen der Krankheit sind behandelbar, ansonsten ist PHHI letal (Nichols, 1996). Andere Mutationen können zu einer kontinuierlichen Aktivierung des K_{ATP} -Kanals führen. Dies resultiert in einem Mangel an freigesetztem Insulin und trägt so zu einer unterschiedlicher Ausprägungen des Diabetes mellitus bei (Gloyn et al., 2005; Patch et al., 2007). Bei dieser Form der Erkrankung ist aber eine Therapie mit Sulfonylharnstoffen oder Sulfonylharnstoff-Analoga möglich (Hirst et al., 2013).

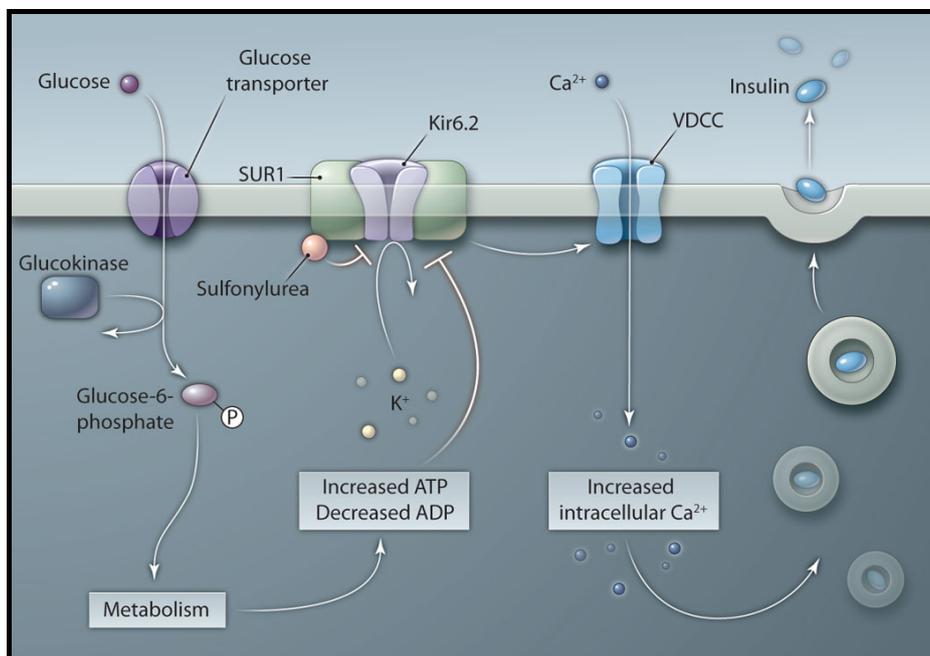


Abb.3: Modell der Rolle des K_{ATP} -Kanals in der Insulinfreisetzung, aus Hinke 2009. β -Zell K_{ATP} -Kanäle schließen als Antwort auf die Bindung von Sulfonylharnstoffen oder eines erhöhten ATP-Levels, welches aus dem Glukosemetabolismus resultiert. Dadurch kommt es zur Depolarisierung der Membran, wodurch spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle geöffnet werden. Der Ca^{2+} Influx in die Zelle führt zur Exocytose der Insulinvesikel.

Es gibt eine große Zahl von Mutationen, die zur Entstehung von neonatalem Diabetes mellitus führen können. Nachfolgend wird ein Schema des SUR1 vorgestellt, in welchem diese Mutationen aufgezeigt werden.

Alle gezeigten Mutationen liegen im *ABCC8*-Gen. Sie sind in Patienten ohne Kir6.x (*KCNJ11*) Mutationen gefunden worden. Das bedeutet, dass die gestörte Insulinausschüttung in diesen Fällen wahrscheinlich über den SUR1 vermittelt wird. Auffallend ist, dass es 2 Regionen gibt, in welchen Mutationen gehäuft auftreten. Einmal in der Linkerregion L0 und eine weitere in der Nukleotidbindungsfolde 2 (NBF2), dem Ort der Mg-ATP-Hydrolyse. Die Mutation, die zahlenmäßig am häufigsten auftritt, liegt in der NBF2 an Position 1380 (Patch et al., 2007; Proks, 2013).

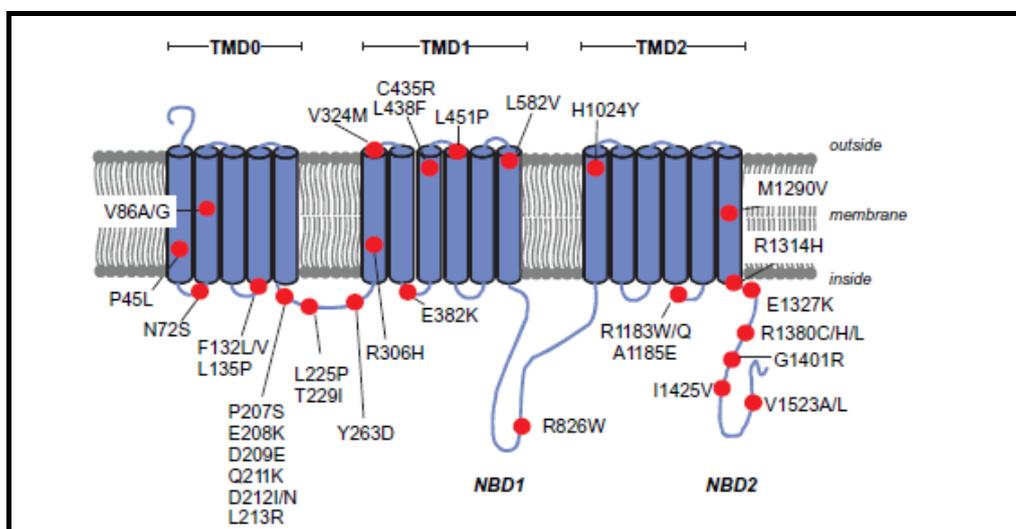


Abb.4: Schema des SUR1 mit Lokalisation der Mutationen welche zu neonatalem Diabetes mellitus führen, von Patch et al., 2007.

Eine besondere Form des Diabetes mellitus ist der Gestationsdiabetes (GDM). Gestationsdiabetes wird am häufigsten im 3. Trimester der Schwangerschaft diagnostiziert und Frauen mit GDM haben ein erhöhtes Risiko später an Diabetes mellitus (DM) Typ 2 zu erkranken (Buchanan et al., 2007). Für den Fetus besteht durch einen GDM unter anderem die Gefahr einer gestörten Plazentaentwicklung und einer Störung der Lungenreifung (Geburtshilfe, 2006).

Man geht davon aus, dass nicht nur die Insulinresistenz sondern auch eine durch vermehrte Apoptose verursachte verminderte β -Zellmasse zu GDM oder Diabetes Mellitus Typ 2 führen kann. Aufgrund geringer Raten der Replikation und Neogenese von β -Zellen wird das Wachstum der β -Zellmasse mit zunehmendem Alter immer langsamer (Devlieger et al., 2008; Van Assche, 1980). Van Assche erhielt bereits 1980 (Van Assche, 1980) durch Versuche an schwangeren, diabetischen Mäusen Hinweise darauf, dass eine Anpassung der β -Zellmasse an den erhöhten Insulinbedarf gestört ist. Vor allem in Nagetieren sind diese Veränderungen bereits näher untersucht, jedoch auch im menschlichen Organismus spielt

die Anpassung der Insulinsekretion an den Bedarf eine große Rolle. Kommt es, zum Beispiel, in der Schwangerschaft zu einem erhöhten Bedarf an Insulin, kommt es zur adaptiven Expansion der β -Zellmasse und gesteigerter Insulinsekretion (Devlieger et al., 2008). Das Verständnis der molekularen Mechanismen dieser reversiblen Adaption der β -Zellmasse ist wichtig für Vorhersagen und die Behandlung von GDM und Diabetes (Ernst et al., 2011).

1.3 Apoptose

In vielzelligen Organismen ist die Differenzierung der verschiedenen Gewebe und Organe während der Wachstumsphase sowie die Aufrechterhaltung konstanter Organgrößen und die Rückbildung von Organen unter verschiedenen physiologischen und pathologischen Bedingungen nicht nur vom ungestörten Ablauf der Zellproliferation und Differenzierung abhängig, sondern auch davon, dass Zellen unter entsprechenden Bedingungen eliminiert werden können. Diese Eliminierung erfolgt genau programmiert, individuell und kontrolliert. Darum wird dieser Prozess auch als „der programmierte Zelltod“ oder „Apoptose“ bezeichnet (Löffler, 2003), (Kerr, 1972). Der Begriff Apoptose kommt aus dem Griechischen und bedeutet „Abfallen“, ursprünglich wurde damit das Fallen des Laubes im Herbst bezeichnet. Bei der Apoptose von Zellen handelt es sich um einen induzierbaren, energieabhängigen chemischen Prozess mit gesteigerter RNA- und Proteinbiosynthese. Der Apoptoseprozess ist durch verschiedene morphologische Charakteristika gekennzeichnet und damit klar unterscheidbar von dem Prozess der Nekrose (griechisch: Absterben). Bei der Apoptose beginnt das Zellsterben, morphologisch betrachtet, mit einer Kondensation des Zellkerns, es folgen Abschnürungen von Vesikeln an der Plasmamembran und schließlich die Fragmentierung der Zelle. Die Fragmente werden anschließend von Makrophagen aufgenommen ohne dass es zu einer Entzündungsreaktion kommt. Die Nekrose hingegen wird als toxischer, energieunabhängiger Todesprozess beschrieben und betrifft meist mehrere Zellen eines betroffenen Organs. Eine nekrotische Zelle ist durch das Anschwellen sowohl der Organellen als auch der gesamten Zelle gekennzeichnet, was schließlich zum Platzen der Zelle führt. Dabei werden zytoplasmatische Zellbestandteile in das umliegende Gewebe entlassen und es kommt zu einer Entzündungsreaktion (Löffler, 2003), (Elmore, 2007). Auch wenn beide Wege des Zelltodes unterschiedlich sind, kommt es in den Signalkaskaden zu Überlappungen beider Prozesse. Auch ein Hybridmechanismus ist möglich, bei welchem die Apoptose induziert und schließlich die Nekrose eingeleitet wird (Nekroptose) (Degterev et al., 2005; Zeiss, 2003). Ein weiterer Weg der zum Zelltod führen kann und dessen Signalkaskade eng mit der der Apoptose verknüpft ist, ist die Autophagie. Bei der Autophagie werden in erster Linie Zellbestandteile wie Proteine und Zellorganellen

abgebaut und wieder verwertet. Dieser Prozess kann als Antwort auf Stress-Faktoren jedoch bis hin zum Zelltod führen (Rubinstein and Kimchi, 2012).

Auf molekularer Ebene wird der apoptotische Zelltod enzymatisch eingeleitet. Dies geschieht über Cysteinproteasen mit einer Spezifität für Asparaginsäuren, sogenannten Caspasen (Csp). Unterschiedliche Caspasen erkennen die Asparaginsäure in verschiedenen Sequenzabschnitten von Proteinen. Sind sie einmal aktiviert, führt dies beinahe unweigerlich zum Zelltod. Bis heute wurden über 10 Caspasen identifiziert und grob in Initiator- (Beispielsweise Csp 8 und Csp 9), Effektor- (zum Beispiel Csp 3) und Entzündungs-Caspasen unterteilt (Cohen, 1997; Rai et al., 2005). Darüber hinaus gibt es weitere Caspasen, wie zum Beispiel Csp 12, welche über Stress des Endoplasmatischen Retikulums (ER) oder Amyloid- β Zytotoxizität aktiviert werden (Nakagawa, 2000). Alle Caspasen liegen bis zu ihrer Aktivierung als inaktives Proenzym vor. Einmal aktiviert, können sie weitere Caspasen aktivieren und so die Proteasekaskade initiieren (Elmore, 2007).

Die Apoptose selbst wird durch unterschiedliche Signalwege induziert, die nachfolgend näher beschrieben werden.

1.3.1 Der extrinsische Apoptosepfad

Der extrinsische Signalweg initiiert Apoptose über Transmembran-Rezeptor vermittelte Interaktionen. Dies beinhaltet Todes-Rezeptoren der Tumor-Nekrose-Faktor (*tumor necrosis factor* (TNF)) Superfamilie (Locksley, 2001). Zu den am besten charakterisierten Liganden und zugehörigen Todesrezeptoren gehört die Kombination des Fettsäure-Synthetase-Ligand (*fatty acid synthetase ligand* (FasL)) mit dem Fettsäure-Synthetase Rezeptor (*fatty acid synthetase receptor* (FasR)). Nach der Bindung des Liganden werden zytoplasmatische Adapter-Proteine rekrutiert, die intrazellulär an den Rezeptor binden. Die Bindung von FasL an FasR resultiert in der Bindung von FADD (*fas-associated protein with death domain*) (Wajant, 2002). Das an den Rezeptor gebundene FADD assoziiert dann mit Procaspase 8 über eine Dimerisierung der Todes-Effektor-Domäne. Ab diesem Moment bildet der Komplex den so genannten *death-inducing signaling complex* (DISC), der zu einer autokatalytischen Aktivierung von Procaspase 8 führt (Kischkel, 1995). Ist Caspase 8 einmal aktiviert, ist die ausführende Phase der Apoptose gestartet. Die Todesrezeptor vermittelte Apoptose kann über ein Protein namens c-FLIP inhibiert werden, welches an FADD und Procaspase 8 bindet und diese im inaktiven Zustand hält (Chang, 2002; Kataoka, 1998).

1.3.2 Der intrinsische Apoptosepfad

Der intrinsische Apoptosesignalweg beinhaltet ein ganzes Spektrum an nicht-Rezeptor-vermittelten Stimuli, die zu intrazellulären Signalen führen, welche eine Mitochondrien-assoziierte Apoptosekaskade aktivieren. Diese Stimuli können positiv oder negativ Apoptose-auslösend wirken. Negative Signale beinhalten das Fehlen von

Wachstumsfaktoren, Hormonen und Zytokinen welches zu einer fehlerhaften Suppression des Todesprogramms führt und darüber hinaus Apoptose auslöst. Andere Stimuli, wie beispielsweise Strahlung, Gifte, Hypoxie, virale Infektionen und freie Radikale wirken positiv. Alle diese Stimuli führen zu Veränderungen der inneren Mitochondrienmembran, welche in einem Öffnen der *mitochondrial permeability transition pores* (MPT-Poren) resultieren. Der dadurch entstehende Verlust des mitochondrialen Transmembranpotentials führt zur Freisetzung von unterschiedlichen proapoptotischen Proteinen aus dem Intermembranraum ins Zytosol (Saelens et al., 2004). Zu diesen Proteinen gehört Cytochrom c, Smac/DIABLO und die Serinprotease HtrA2/Omi, welche einen Caspase-abhängigen mitochondrialen Apoptosepfad aktivieren. Cytochrom c bindet und aktiviert das zytosolische Protein Apaf-1 und Procaspase 9 und formiert so das Apoptosom, welches die aktive Form von Caspase 9 darstellt. Smac/DIABLO und HtrA2/Omi verstärken das Apoptosesignal indem sie IAP, ein Inhibitor für Apoptose-Proteine, in seiner Wirkung hemmen (Elmore, 2007). Die Kontrolle und Regulation über die mitochondriale Apoptose erfolgt über Mitglieder der Bcl-2 Familie. Diese überwachen die Permeabilität der Mitochondrienmembran und können pro- oder antiapoptotisch wirken (Löffler, 2003) (Elmore, 2007).

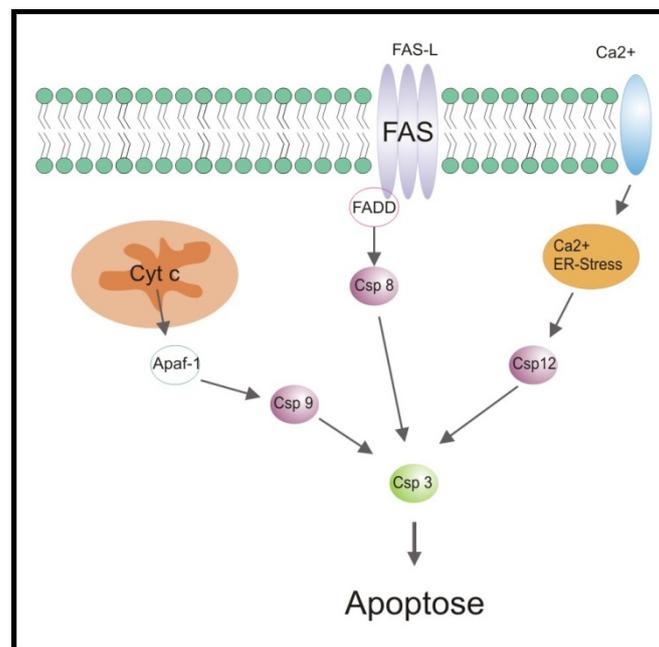


Abb. 5: Übersicht verschiedener Apoptose Signalwege, stark vereinfacht nach Poster von BA Biosciences; Quiagen company: http://www.sabiosciences.com/pathway.php?sn=Caspase_Cascade.

Ein *Cross-talk* der beiden Apoptosewege wird diskutiert. So spaltet zum Beispiel Caspase 8, welche über den extrinsischen Apoptoseweg aktiviert wird, Bid, ein Protein, welches eine Rolle bei dem intrinsischen mitochondrialen Apoptoseweg spielt (Esposti, 2002). Beide Apoptosewege münden einheitlich in die ausführende Phase der Apoptose. Dabei aktivieren die Initiator-Caspasen die Effektor-Caspasen, welche verschiedene Substrate einschließlich

Zytokeratinen, PARP (Poly(ADP-ribose)Polymerase), Zytoskelett und Proteine des Nukleus spalten und damit die charakteristischen morphologischen und biochemischen Veränderungen in apoptotischen Zellen auslösen. Die prominenteste Effektor-Caspase ist dabei Csp 3 (Löffler, 2003) (Elmore, 2007; Slee et al., 2001).

1.3.3 Apoptose in β -Zellen

Man nimmt an, dass ein moderner Lebensstil, mit einem übermäßigen Konsum an energiereichen Lebensmitteln und einer reduzierten physischen Aktivität, die Häufigkeit an Diabetes mellitus (DM) Typ 2 Erkrankungen deutlich gesteigert hat (Back et al., 2012). Starkes Übergewicht ist dabei oft direkt mit DM Typ 2 und der Insulinresistenz verbunden. Um das gesteigerte metabolische Aufkommen zu bewältigen, steigern die gesunden pankreatischen Inseln normalerweise ihre β -Zell Masse sowie ihre Insulinproduktion. Dies geschieht durch β -Zell Proliferation, Neogenese und eine gesteigerte β -Zell Funktion (Back et al., 2012; Steil G.M.; Trivedi, 2001). Eine gestörte Anpassung an dieses gesteigerte metabolische Aufkommen kann jedoch in einem progressiven Verlust der β -Zell Funktionen bis hin zum Zelltod resultieren. In einer Konsequenz daraus entwickeln Betroffene oft, ausgehend von einer normalen Glukosetoleranz, eine verminderte Glukosetoleranz bis hin zu einer etablierten DM Typ 2. Dabei spielt wahrscheinlich die β -Zell Apoptose eine größere Rolle als eine verminderte Neogenese oder Proliferation der Zellen (Back et al., 2012; Butler, 2003).

Ein Verlust der β -Zellen kann auf verschiedene Stress-Faktoren folgen. So wirkt beispielsweise eine erhöhte Konzentration an Glukose toxisch auf die β -Zellen. In der Regel kommt es dadurch zur gesteigerten Insulinproduktion, was in der Zelle zu ER-Stress und damit der Freisetzung intrazellulärer Ca^{2+} Speicher führen kann, zum anderen kann es zu einer gesteigerten Produktion an ROS (Reactive Oxygen Species) kommen. Hohe Glukose Konzentrationen können über verschiedene Mediatoren auch zur Aktivierung extrinsischer Apoptosesignalwege führen, was ebenfalls in der Apoptose von β -Zellen resultiert. Auch Lipide beeinflussen die Funktion und Vitalität von β -Zellen, so wirken Fettsäuren toxisch, wenn sie dauerhaft in hohen Konzentrationen in der β -Zelle vorliegen (Donath and Halban, 2004; Gier et al., 2009; Poitout, 2002; Robertson, 2004).

In der Therapie von DM Typ 2 werden Sulfonylharnstoffe als Antidiabetika zur Steigerung der Insulinfreisetzung eingesetzt (Mechanismus siehe 1.2). Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass die Sulfonylharnstoffe Glibenclamid und Tolbutamid bei dauerhafter Einnahme zu einer gesteigerten Apoptose in β -Zellen führen können (Efanova, 1998; Iwakura et al., 2000) (Back et al., 2012). Die molekularen Mechanismen die der β -Zell Dysfunktion und Apoptose zu Grunde liegen, sind dabei noch nicht aufgeklärt. In vorausgegangenen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe, konnte eine SUR1 spezifische Apoptoseinduktion durch den Sulfonylharnstoff

Glibenclamid und das Phytoestrogen Resveratrol in SUR1 exprimierenden HEK293-Zellen nachgewiesen werden, nicht jedoch in SUR2A und SUR2B exprimierenden HEK293-Zellen (Hambrock et al., 2007; Hambrock et al., 2006). In einer weiteren Arbeit der Gruppe konnte gezeigt werden, dass der SUR1 spezifische Apoptose-Effekt in rekombinanten HEK293-Zellen, im Vergleich zu Resveratrol und Glibenclamid, durch das endogen vorkommende Estrogen 17 β -Estradiol deutlich höher ist. Auch für Langerhans-Inseln konnte eine SUR1 abhängige Apoptose-Modulation nachgewiesen werden. Diese ist sowohl altersabhängig als auch geschlechterspezifisch. So wurde über die Erfassung der apoptotisch veränderten Nuklei gezeigt, dass bei jungen wildtyp-Tieren und beiden Geschlechtern E2 protektiv auf das Ausmaß der Apoptose wirken kann, jedoch bei älteren weiblichen Tieren die Apoptoserate durch eine E2-Behandlung gesteigert und bei älteren männlichen Tieren kein E2 induzierter Effekt erkennbar wird (Ackermann et al., 2009). Dieser Nachweis einer SUR1 vermittelten Apoptose-Modulation, könnte dem SUR1 neben der Funktion als regulatorische Untereinheit des K_{ATP} -Kanals in der Signalkaskade der Insulinausschüttung in pankreatischen β -Zellen eine weitere, vom kompletten K_{ATP} -Kanal unabhängige Rolle, als möglicher nicht-klassischer Estrogenrezeptor, zuweisen. Auf diesen Ergebnissen aufbauend sollen in dieser Arbeit der molekulare Mechanismus und die Auswirkung unterschiedlicher SUR1 Mutationen auf die SUR-vermittelte Apoptosemodulation durch das Estrogen 17 β -Estradiol näher untersucht werden.

1.4 Estrogene

Der Name Estrogen kommt aus dem Griechischen und bedeutet so viel wie „Stachel, Leidenschaft“. Estrogene sind die wichtigsten weiblichen Sexualhormone aus der Klasse der Steroidhormone. Die C18 Körper dieser Moleküle werden in Estron (E1), Estradiol (E2) und Estriol (E3) unterschieden, der wichtigste Vertreter der Estrogene ist 17 β -Estradiol (E2). Die Hauptaufgabe der Estrogene liegt in der Entwicklung der sekundären weiblichen Geschlechtsmerkmale und der Funktionserhaltung des weiblichen Fortpflanzungssystems, analog zu den Funktionen der männlichen Androgene wie zum Beispiel Testosteron (Campbell, 2000). Der Hauptsyntheseort der Estrogene sind die Gonaden, vor allem die weiblichen Ovarien. In kleineren Mengen können Estrogene auch in der Nebennierenrinde oder bei Männern in den Hoden gebildet werden. Weiterhin ist während der Schwangerschaft die Plazenta als Estrogensyntheseort bekannt. Darüber hinaus gibt es auch verschiedene metabolische Funktionen von Estrogenen, so spielen sie auch eine Rolle beim Fett- und Kohlehydratmetabolismus, der Knochenmineralisierung und dem Schließen der Epiphyse. Dazu werden Estrogene auch außerhalb der Gonaden gebildet und wirken so unabhängig von der im Blut zirkulierenden Estrogenkonzentration parakrin oder intrakrin im entsprechenden Gewebe (Simpson and Davies, 2001).

1.4.1 Synthese von Estrogenen

Das Ausgangsmolekül für alle Steroidhormone ist Cholesterin, welches hauptsächlich in der Leber und den Schleimhäuten des Darmes gebildet wird. In den Mitochondrien kommt es zu einer enzymatischen Umwandlung von Cholesterin zu Pregnenolon. Pregnenolon ist sowohl die Ausgangsverbindung zur Bildung der Geschlechtshormone als auch der Corticoide Cortisol und Aldosteron in der Nebennierenrinde. Im Ovar wird Pregnenolon zu Progesteron umgewandelt, welches dann durch die 17α -Hydroxylase (CYP17) und C17,20-Lyase zu Androstenedion konvertiert wird. Androstenedion wird hauptsächlich über Aromatase (CYP19) in Estron umgewandelt. Ein kleiner Teil wird jedoch zu Testosteron, welches wiederum durch CYP19 zu Estradiol umgewandelt wird. Über das Enzym 17β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase können die einzelnen Estrogene (E1 und E2) ineinander umgewandelt werden.

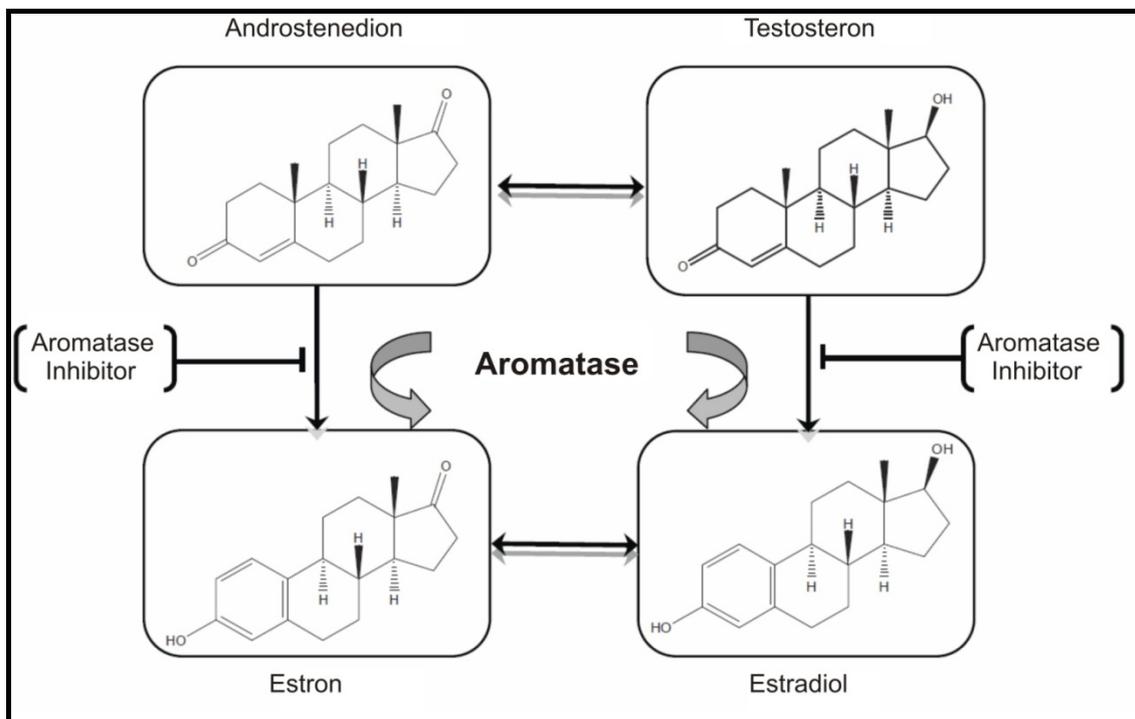


Abb.6.: Schematisches Diagramm der Aromatase katalysierten Estradiolbildung aus Khan 2011.

Die Ovarien setzen jedoch nicht nur Estrogene, vor allem E2, frei, sondern auch das Prohormon Androstenedion. Dies kann in extragonadalen Geweben wie Fettgewebe, Muskel, Leber und Gehirn über den Aromatasekomplex ebenfalls zu Estrogenen umgesetzt werden. E2 hat eine Halbwertszeit von wenigen Minuten und wird dann über Hydroxylierungsreaktionen abgebaut. Teilweise können die Estrogene auch nach einer Glucuronidierung oder Sulfatierung über die Galle und Urin ausgeschieden werden (Cambell 2000, Löffler 2003) (Mohr, 2004).

1.4.2 Physiologische Effekte von 17 β -Estradiol

Bereits seit 30 Jahren ist bekannt, dass E2 Langzeit Transkriptionseffekte über die klassischen Estrogenrezeptoren (siehe 1.4.3) vermittelt. Neben den bereits in 1.4 erwähnten Funktionen von E2, sind auch Effekte auf das Gehirn bei der Organisation der Neurogenese und der neuronalen Verknüpfung während der Embryogenese und der neonatalen Entwicklung bekannt (Campbell, 2000)(Roepke, 2011). In letzter Zeit mehren sich jedoch Hinweise auf weitere Funktionen von E2. Die schnellen, über nicht-klassische ER vermittelte Effekte von E2 wurden im Uterus, im Hippocampus und in verschiedenen hypothalamischen Zellen identifiziert (Kelly et al., 1984; Szego, 1967). Membran-initiierte E2 Signalwege beinhalten die schnelle Aktivierung von verschiedenen Proteinkinase-Signalwegen. Dazu gehören unter anderem die Proteinkinase C (PKC), Proteinkinase A (PKA), Phosphatidylinositol-3 Kinase (PI3-Kinase) und die Mitogen-Aktivierte Proteinkinase (MAPK), welche die Signaltransduktion, die Proteinphosphorylierung und die Aktivität von Kationen-Kanälen modulieren. E2 beeinflusst auch die metabolische Homöostase, die Mineralisierung von Knochen und die Vasodilatation (Roepke, 2011; Simpson and Davies, 2001). Im Hypothalamus spielt die E2 vermittelte schnelle Aktivierung von Estrogenrezeptoren eine Rolle in der Gonadotropin Sekretion und geschlechtsspezifischem Verhalten. Weiterhin scheinen auch die Funktionen, welche über klassische ER's vermittelt werden, über die nicht-klassischen ER-Signalwege moduliert zu werden (Roepke, 2011). Wie Resveratrol (Hambrock et al., 2007) und Glibenclamid (Babenko A.P.; Aguilar-Bryan, 1998) kann auch E2 als K_{ATP} -Kanal Blocker wirken (Ackermann et al., 2009). Dieser Effekt zeigt sich bereits bei physiologischen Konzentrationen und ist reversibel. Der Mechanismus der Blockierung des K_{ATP} -Kanals und ob es sich um eine direkte oder eine indirekte Interaktion von E2 mit dem K_{ATP} -Kanal handelt, ist dabei noch nicht geklärt (Nadal et al., 2004; Nadal, 1998; Soria, 2004). Hinweise darauf, dass eine direkte Interaktion von E2 mit Sulfonylharnstoffrezeptoren möglich ist, konnte in unserer Arbeitsgruppe bereits gezeigt werden (Ackermann et al., 2009). Ebenfalls kann E2 eine proapoptotische Wirkung, ähnlich Glibenclamid und Resveratrol (Ackermann et al., 2009), oder eine antiapoptotische Wirkung ausüben (Ackermann et al., 2009; Contreras et al., 2002; Le May et al., 2006). In der Arbeit von Ackermann et al. (2009) konnte dabei gezeigt werden, dass Bedingungen wie das Alter der Versuchstiere eine entscheidende Rolle bei der Frage spielen können, ob ein anti- oder ein proapoptotischer Effekt durch E2 hervorgerufen wird. E2 ist als Estrogen eine endogen vorkommende Substanz mit hoher physiologischer Relevanz. So sind die Serumkonzentrationen von E2 während einer Schwangerschaft beim Menschen mit Werten von 2 – 100nM deutlich erhöht. Die Werte für Frauen liegen außerhalb der Schwangerschaft bei 0,1-2 nM, während bei Männern und Frauen in der Menopause die

Serumkonzentrationen an E2 Werte von 0,05-0,02 nM betragen (Abraham, 1972; deHertogh, 1975).

1.4.3 Estrogenrezeptoren

In der Literatur werden verschiedene Estrogenrezeptoren (ER) beschrieben und diskutiert. Unterteilt werden die Estrogenrezeptoren in klassische und nicht-klassische ER.

Die ersten Rezeptoren, die in den 1950er Jahren entdeckt und beschrieben wurden, zählen zu den klassischen Estrogenrezeptoren, die auch Liganden-aktivierte Transkriptionsfaktoren genannt werden. Man unterteilt diese in ER α und ER β , beides Mitglieder der nukleären Hormon-Rezeptor Superfamilie, die von unterschiedlichen Genen (*ESR1* und *ESR2*) codiert werden und an verschiedenen Stellen auf den Chromosomen 6 und 14 liegen. In hormonabhängigen Geweben können diese beiden ER-Typen unterschiedlich verteilt oder gleichzeitig vertreten sein. Hormonabhängig kommt es zur Dimerisierung, wobei je nach Verteilung Homodimere ER $\alpha\alpha$ (Leber und Uterus), ER $\beta\beta$ (Knochen, Darm, Prostata und Vaskulatur) oder Heterodimere ER $\alpha\beta$ (Gehirn, Ovar und Brust) gebildet werden können (Dahlman-Wright et al., 2006; Kuiper, 1996), (Löffler, 2003). Bei diesen klassischen ERs handelt es sich um zytosolische Steroidrezeptoren mit einer konservierten DNA-Bindedomäne, welche mit verschiedenen *hormone-response* Elementen im Genom interagieren und so Einfluss auf die Genexpression nehmen können. Dabei können unterschiedliche Liganden gebunden werden. Dazu gehören verschiedene Metabolite von Estrogen aber auch Stoffe, wie zum Beispiel Bisphenol A oder DDT (Dichlor-diphenyl-trichlorethan), die aus der Umwelt aufgenommen werden. Jeder Ligand induziert eine andere Konformation des Rezeptors, was zur Bindung unterschiedlicher Co-Aktivatoren und Co-Rezeptoren führt und letztlich in unterschiedlichen Effekten resultiert (Heldring, 2007; Miller and Duckles, 2008).

Neben den Effekten, welche über ER α und ER β vermittelt werden, gibt es Beobachtungen dass Estrogen seine Wirkung auch über Plasmamembranrezeptoren, also nicht-genomisch, entfalten kann. Hier spricht man von nicht-klassischen Estrogenrezeptoren, zu denen der G-Protein gekoppelten Estrogenrezeptoren (GPER), GPR30 gezählt wird. (Hasbi et al., 2005; Prossnitz and Barton, 2011; Revankar, 2005). Dieser Rezeptor ist auch in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums lokalisiert und bindet hier spezifisch Estrogen. Die Bindung von Estrogen an GPR30 im des Endoplasmatischen Retikulum führt, beispielsweise in COS7-Zellen, zur Mobilisierung von intrazellulärem Calcium und der Synthese von nuklearem Phosphatidylinositol 3,4,5-Triphosphat (Hasbi et al., 2005; Miller and Duckles, 2008; Revankar, 2005). Diesen nicht-klassischen ERs spricht man vor allem die schnellen Effekte, ausgelöst durch Estrogen, zu. Eine der am besten beschriebenen schnellen Effekte ist die Fähigkeit von Estrogen, Stickstoffmonoxid Synthasen (NOS) zu aktivieren. NO besitzt eine Vielzahl von physiologischen Effekten, unter anderem das

Auslösen der Vasodilatation. Die Aktivierung der NO-Synthase erfolgt so schnell, dass eine genomische Regulation dafür nicht in Frage kommt (Li et al., 2007; Miller and Duckles, 2008; Williams et al., 1992). Allerdings ist es bis heute nicht geklärt, ob diese schnellen Effekte über nicht-klassische Estrogenrezeptoren oder nicht auch über eine Bindung der klassischen ERs an große Proteinkomplexe in Caveolae, Einbuchtungen der Plasmamembran, mit anschließender Aktivierung des MAP-Kinase oder PI₃-Kinase Signalweges, vermittelt werden. Dabei käme es durch die Aktivierung klassischer Estrogenrezeptoren zur Induktion von nicht-genomische Effekten (Hasbi et al., 2005; Miller and Duckles, 2008; Moriarty et al., 2006).

Mittlerweile sind einige der komplexen Mechanismen der ER Funktionen bekannt, jedoch können die ausgelösten Effekte sehr unterschiedlich, abhängig von dem jeweiligen Gewebekontext sein. Diese Vielfalt ermöglicht ein beachtliches Potential für weitere Entwicklungen von selektiven, therapeutisch wirksamen, Substanzen (Miller and Duckles, 2008). Es sind bereits einige Selektive-Estrogen-Rezeptor-Modulatoren (SERMs) in der therapeutischen Anwendung beziehungsweise in der klinischen Entwicklung.

1.4.4 Selektive Estrogenrezeptormodulatoren (SERMs)

Eine ganze Anzahl an selektiven Estrogenrezeptormodulatoren (SERMs) wurden bereits entwickelt und werden teilweise bereits klinisch eingesetzt. Die FDA (Food and Drug Administration) hat zunächst die SERMs Tamoxifen, Raloxifen und Toremifen zur klinischen Verwendung freigegeben (Riggs, 2003). Die SERMs stellen eine Gruppe von chemisch unterschiedlichen Strukturen dar, die nicht die Steroidstruktur der Estrogene aufweist, jedoch eine tertiär-Struktur besitzen die eine Bindung an Estrogenrezeptoren erlaubt. Durch diese Heterogenität der der SERMs kommt es auch zu teilweise unterschiedlichen Wirkungen.

Dabei kann sich die Einnahme von SERMs auf das Risiko von Brustkrebs, Hitzewallungen, Uterus-Blutungen, das Risiko eines Endometrium-Karzinoms, Osteoporose, cardiovaskuläre Risiken und die Entstehung von venösen Thrombosen sowohl positiv als auch negativ auswirken (Barrett-Conner, 2006; Riggs, 2003). Bei einer Behandlung mit SERMs sollte daher das am besten geeignete für die entsprechende Therapie ausgewählt werden, um die Selektivität der Estrogenrezeptormodulatoren optimal zu nutzen und die Vorteile und Nachteile günstig gegeneinander abzuwägen (Cuzick et al., 2013). Es gibt aus Untersuchungen zur Hormon-Ersatztherapie Hinweise darauf, dass neben der gewebespezifischen Wirkung auch das Alter der Patientinnen eine Rolle auf die veränderte Antwort auf Estrogene spielen kann (Harman et al., 2005). Die Auswirkung der einzelnen SERMs wurden und werden in verschiedenen Studien, wie zum Beispiel ATLAS (Davies et al., 2013), STAR oder RUTH, untersucht (Riggs, 2003). Auf diesen Studien basierend empfiehlt die FDA Tamoxifen zur Prävention und Behandlung von Brustkrebs, Toremifen zur

Behandlung von Brustkrebs in fortgeschrittenem Stadium und Raloxifen zur Prävention und Behandlung von postmenopausaler Osteoporose zu verwenden.

In der vorliegenden Arbeit wurden die SERMs Tamoxifen und Fulvestrant verwendet. Tamoxifen (TAM) ist ein SERM, der unter anderem zur Behandlung von ER-positiven Mammakarzinomen eingesetzt wird (Fisher, 1998; Katzenellenbogen, 2000). Hierbei wirkt Tamoxifen als Prodrug, welches enzymatisch durch CYP2D6 in die aktive Form Hydroxytamoxifen umgesetzt wird und eine kompetitive Hemmung der Estrogenrezeptoren bewirkt. CYP2D6, welches zur P450 Familie gehört, ist auch in HEK293 Zellen exprimiert (Hasler, 1999). Die beobachtete Effizienz von 70% durch TAM wird sowohl dem Wachstumsstop als auch der Induktion von Apoptose in Brustkrebszellen zugeschrieben. Man geht davon aus, dass der hauptsächliche Wirkungspfad über die Inhibition von klassischen ERs verläuft. Es verstärken sich jedoch die Hinweise darauf, dass es zusätzliche nicht ER vermittelte Mechanismen gibt (Mandelkar, 2001). So konnte zum Beispiel nachgewiesen werden, dass im Herzen transmembran-Ströme an K_{ATP} -Kanälen durch TAM inhibiert werden können. Dabei wird die Interaktion zwischen dem Kanal und Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat (PIP₂) gestört. Gleichzeitig existieren Studien, in denen gezeigt wurde, dass TAM eher mit der Kir6.2 Untereinheit interagiert, als mit dem SUR (Ponce-Balbuena et al., 2010). Tamoxifen kann als Agonist und/oder als Antagonist wirken. Eine gewebeabhängige unterschiedliche Wirkungsweise von TAM ist bekannt. Deshalb müssen bei einer Therapie von Mammakarzinomen aufgrund der agonistischen Wirkung auf das Endometrium hier regelmäßige Kontrollen durchgeführt werden (Fisher, 1998; Schmidt, 2006).

Ein bekannter strikter ER Antagonist ist Fulvestrant (ICI 182,780). Fulvestrant (Fv) wird als Selektiver Estrogenrezeptor Down-Regulator (SERD) beschrieben (Wakeling, 1991), soll jedoch auch an der Degradation von ER's beteiligt sein (Wardell et al., 2011).

Fv besitzt ein rein antiöstrogenes Profil mit einem, im Vergleich zu anderen SERMs, unterschiedlichen Wirkmechanismus. Fv blockiert die Dimerisierung der ERs, hierdurch erfolgt die Degradation des ER mit resultierender Reduktion des zytosolischen ER-Gehalts. Dies stellt einen der wichtigsten auf Fv zurückzuführenden Mechanismen dar (Nelson, 2008; Ohmichi, 2005).

2 Zielsetzung der Arbeit

Eine wichtige Funktion des K_{ATP} -Kanals ist die Verknüpfung des zellulären Energiestoffwechsels mit dem Membranpotential. Im Wesentlichen erfolgt dies über die Perzeption des intrazellulären ATP-Levels (Burke et al., 2008).

Dieser Arbeit vorausgehend wurde in unserer Arbeitsgruppe (Hambrock et al., 2007; Hambrock et al., 2006) nachgewiesen, dass der Sulfonylharnstoffrezeptor (SUR), die regulatorische Untereinheit des K_{ATP} -Kanals, auch in Abwesenheit der Porenbildenden Kanal-Untereinheit Kir6.x an der Modulation von Apoptose durch den Sulfonylharnstoff Glibenclamid bzw. durch den Naturstoff *trans*-Resveratrol beteiligt sein kann. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass E2 einen deutlich stärkeren apoptotischen Effekt als Glibenclamid oder Resveratrol haben kann. Dabei wurde unter anderem die Wirkung unterschiedlicher E2 Konzentrationen auf isolierte murine Langerhans-Inseln untersucht. Hier zeigte bereits eine Behandlung mit 10 nM E2 eine deutliche Erhöhung der Apoptoserate und eine Behandlung mit Konzentrationen ≥ 100 nM eine signifikante Erhöhung der Apoptoserate (Ackermann et al., 2009).

Bei den Untersuchungen zur E2 induzierten Apoptose-Modulation in der vorliegenden Arbeit lag der Schwerpunkt auf der Analyse des Einflusses von Mutationen in den Nukleotidbindungsfalten (NBF's). Diese sind von besonderem Interesse, da die untersuchten Mutationen in den sogenannten Walkerregionen der NBFs liegen. Diese Regionen sind hochkonservierte Aminosäuresequenzbereiche und charakteristisch für alle NBF's von ABC-Proteinen. Motiv A und Motiv B sind über einen Linker miteinander verbunden. Der Lysinrest in Walker A interagiert mit dem $\beta\gamma$ -Phosphat des ATPs und Walker B bindet den Adeninring, so dass es zu einer für die Hydrolyse optimalen Positionierung des ATP-Moleküls kommt. In diesen Bereichen sind zahlreiche Mutationen bekannt, welche in Patienten mit neonatalem Diabetes nachgewiesen wurden (Patch et al., 2007). Zusätzlich befinden sich wesentliche Bereiche der Bindungs-Region für Substanzen die als Kanalöffner oder Kanalblocker wirken in TMD2, welche mit beiden NBF's in verbunden ist.

Die von mir untersuchten Mutationen an Position 1379 ([R1379C], [R1379L]) liegen in der Walker A Region der NBF2 von SUR1. Wie von Ashcroft und deWet beschrieben (de Wet et al., 2007b), führen diese Mutationen zu einer Erhöhung der ATP-Hydrolyserate und somit zu einer Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit des Kanals. Beide Mutationen konnten bei Patienten mit neonatalem Diabetes häufiger gefunden werden (Proks, 2013). Vergleichend dazu wurden von mir 2 weitere Mutationen des SUR1 untersucht, die sich in der Walker A Region von NBF1, beziehungsweise an korrespondierender Stelle in NBF2, befinden. Für diese beiden Mutationen ([K719R]; [K1384M]) wurde eine ATP-Hydrolyserate senkende Wirkung beschrieben (de Wet et al., 2007a). Diese entspricht einer Erhöhung der Geschlossenwahrscheinlichkeit des Kanals.

Es ist aus vorausgegangenen Arbeiten der Arbeitsgruppe bekannt, dass bereits einzelne Punktmutationen, wie zum Beispiel SUR1(M1289T), einen großen Einfluss auf die Aktivierung des K_{ATP} -Kanals über eine verbesserte Bindungsaffinität für Kanalöffner haben können (Hambrock, 2004). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass diese Mutation an Position 1289 des SUR1 die E2 induzierte Apoptose in rekombinanten HEK293-Zellen vollständig aufheben kann und die Mutationen SUR1(R1379C) und SUR1(R1379L) zu einer gesteigerten E2 induzierten Apoptoserate führen (Ackermann et al., 2009). Vor diesem Hintergrund wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit Untersuchungen durchgeführt, um die Auswirkung der Mutationen SUR1(R1379C), SUR1(R1379L), SUR1(K719R) und SUR1(K1384M) vergleichend auf die E2 induzierte Apoptoserate zu analysieren.

Bei der Bestimmung der Apoptoserate nach Behandlung mit E2 wurden SUR1 oder SUR1-Mutanten exprimierende, rekombinante HEK293-Zellen verwendet. Als Kontrolle wurden HEK293-Zellen mit dem leeren Expressionsvektor stabil transfiziert. Nach der Behandlung mit E2 wurden verschiedene apoptotische Parameter, wie die Zellablösung, die Zellkernkondensation und Fragmentierung und die Aktivität verschiedener Caspasen quantitativ untersucht. Dabei wurde das Ausmaß der Apoptoserate und Hinweise auf mögliche involvierte Signalwege ermittelt. Weiterhin wurden Versuche mit unterschiedlichen E2 Konzentrationen zur Sensitivität der Zellen gegenüber E2 durchgeführt. Dabei sollte überprüft werden, ob nach einer E2 Behandlung der Verlust der Zellvitalität in den untersuchten Mutationen SUR1(R1379C), SUR1(R1379L), SUR1(K719R) und SUR1(K1384M) bereits bei geringeren Konzentrationen als in SUR1 exprimierenden Zellen einsetzt.

Um zu überprüfen, ob bekannte Estrogenrezeptormodulatoren ebenfalls eine Auswirkung auf die Vitalität der untersuchten Zellen haben, wurden vergleichend zu E2 die selektiven Estrogenrezeptormodulatoren (SERMs) Tamoxifen (TAM) und Fulvestrant (Fv) untersucht. Dazu wurde sowohl TAM als auch Fv alleine und in Kombination mit E2 getestet. Aus einer vorhergehenden Arbeit der Arbeitsgruppe konnte anhand von Radioliganden-Bindungsstudien gezeigt werden, dass E2 direkt mit SUR1 interagieren kann (Ackermann et al., 2009). Darauf aufbauend sollte in dieser Arbeit überprüft werden, ob dies auch für ausgewählte SERMs gilt. Zur Untersuchung einer direkten Interaktion von TAM mit dem SUR1 wurden heterologe Radioliganden-Bindungsstudien unter Verwendung von, mit Tritium markiertem, Glibenclamid durchgeführt.

Um zu klären, ob der SUR1-vermittelte Vitalitätsverlust, ausgelöst durch E2, auf der Ebene der Enzyme/Proteine oder auf der Ebene der Genexpression reguliert wird, soll eine Mikrochip-Genanalyse vorgenommen werden. Aus diesen Untersuchungen erhoffen wir uns weitere Hinweise auf mögliche involvierte Mechanismen auf der molekularen Ebene bei der SUR1-spezifischen E2 vermittelten Apoptose-Modulation.

3 Material

3.1 Geräte

| | |
|--|---|
| Analysenwaage Kern 770 | Kern, Balingen |
| Analysenwaage Precisa 100A-300M | PAK OERLIKON AG, Zürich |
| Autoklav | TECNOMARA Deutschland GmbH, Fernwald |
| Bio Photometer | Eppendorf, Wesseling-Berzdorf |
| CASY Cellcounter Analyser System TT | Roche (Innovatis), Reutlingen |
| CO ₂ Inkubator für Zellkultur | Heraeus, Hanau |
| Hera Cell Heraeus | |
| Dispensette | Brand, Wertheim |
| Dispergiergerät Ultra Turrax [®] T8 | IKA –Werke [®] , Staufen |
| Eismaschine | Eufrigor Ice Makers, Italien |
| Gefrierschränke -20°C Premium No Frost | Liebherr, Ochsenhausen |
| Gefrierschränke -80°C VIP Series | Sanyo, München |
| Kühlschränke 4°C | Siemens AG, München |
| Mehrfachdispenser HandyStep [®] | Brand, Wertheim |
| Mikroskop Diaphot TMD | Nikon Corporation, Düsseldorf |
| Mikroskop ECLIPSE TE200-U | Nikon Corporation, Düsseldorf |
| Mikroskop-Kamera CF 20 DXC | Kappa opto-electronics, Gleichen |
| PCR Gerät Gene Amp 9700 [®] | Applied Biosystems |
| pH-Meter 776 Calimatic | Knick, Berlin |
| Photometer Dynatech MR 5000 | Dynatech, USA |
| Pipetten | Eppendorf, Wessling-Berzdorf |
| | Biohit, Rosbach |
| | Labsystems, Finnland |
| Pipettierhilfe | Hirschmann, Eberstadt |
| Sicherheitswerkbank HERAsafe [®] | Heraeus, Hanau |
| Sterilbank Hera safe KS | Kendro, Langenselbold |
| Stickstofftank Chronos | Cryotherm GmbH, Euteneuen |
| Szintillationszähler | Packard Bioscience Company, Niederlande |
| Liquid Scintillation Analyzer 2550TR TriCarb | |
| Ultrazentrifuge Optima L-70 | Beckmann, Krefeld |
| Vortex UNIMAG ZX | Vetter, Wiesloch |
| Wallac Victor 1420 Fluoreszenzreader | Perkin Elmer, USA |

| | |
|--|------------------------------|
| Wärmeblock 1101 | Duxford, Cambridge |
| Wasseraufbereitungsanlage Milli-Q System | Millipore, USA |
| Wasserbad (mit Schüttelfunktion) SBK 25 | Salvis, Reussbühl |
| Wasserbad SW 20C | Julabo, Selbach |
| Wasserbad W12 | Störk-Tronic, Stuttgart |
| Zentrifuge 5417R Eppendorf | Eppendorf, Wessling-Berzdorf |
| Zentrifuge 5810R Eppendorf | Eppendorf, Wessling-Berzdorf |

3.2 Verbrauchsmaterialien

| | |
|---|--|
| Deckgläser ø 30 mm und 50 mm | Hecht, Sondheim; Menzel, Braunschweig |
| Gewebekulturschalen steril; 94/16 mm mit Nocken | Greiner Bio-one, Frickenhausen |
| Glass-Microfiber-Filter GF-B Porengröße 1µmol/l | Whatman® International, England |
| Kanüle Microlance3 sterican 0,8 x 40mm | Becton Dickinson, USA |
| Kryoröhrchen Cyosteril; 2 ml | Greiner Bio-one, Frickenhausen |
| PD Microplatte 96 well; F-Form | Greiner Bio-one, Frickenhausen |
| Pipette graduiert mit Spitze; steril; 5,10 und 25 ml | Costar Corning Incorporation, Australien |
| Pipettenspitzen | Sarstedt, Nümbrecht Greiner Bio-one, Frickenhausen bicappaLAB srl, Italien |
| Polypropylen Rundbodenröhrchen; 5 ml | Becton Dickinson, USA |
| PP Röhrchen steril; 50 und 15 ml | Greiner Bio-one, Frickenhausen |
| Reaktionsgefäße; 1,5 ml und 2 ml | Greiner Bio-one, Frickenhausen |
| Reaktionsgefäße; Safe lock Tubes; 1,5 und 2 ml | Eppendorf, Wessling-Berzdorf |
| Spritze steril Plastikpak™ Luer-Lok™; 20 ml | Becton Dickinson, USA |
| Szintillationsgefäße Super Polyethylen Vial; 20 ml | Packard Bioscience Company, Niederlande |

3.3 Chemikalien

| | |
|--|-------------------------------------|
| [³ H] Glibenclamid (50,2Ci/mmol) | Perkin Elmer, USA |
| 17β-Estradiol, 98% | Sigma, Steinheim |
| Ac-DEVD-AFC | Biomol, Hamburg; ENZO Life Science, |

| | |
|--|--|
| (7-Amino-4-Trifluoamethyl-Coumarin) | Lörrach |
| Ac-IETD-AFC | Biomol, Hambur; ENZO Life Science, |
| (7-Amino-4-Trifluoamethyl-Coumarin) | Lörrach |
| Ac-LEHD-AFC | Biomol, Hambur; ENZO Life Science, |
| (7-Amino-4-Trifluoamethyl-Coumarin) | Lörrach |
| Ac-ATAD-AFC | MBL international, USA |
| (7-Amino-4-Trifluoamethyl-Coumarin) | |
| Agar-Agar | ICN Biomedicals, USA |
| Ampicillin | Roth, Karlsruhe |
| ATP, Dinatrium Salz; Spezial quality | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim |
| BioRad-Protein Assay Dye Reagent Concentrate | BioRad Laboratories, München |
| BSA (Rinder-Serum-Albumin); 98% | Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim |
| CASYton- Elektrolytlösung | Innovatis, Reutlingen |
| DMSO Dimethylsulfoxid, 99,9% | Fluka Chemika, Buchs |
| DTT (1,4-Dithio-DL-threitol) | Fluka Chemika, Buchs |
| EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure), reinst, 98-100% | Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim |
| Ethanol, p.a. 99,9% | Merck, Darmstadt |
| Fulvestrant (ICI182,780) | Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim |
| G418 Sulfate, Geneticin [®] | GIBCO Invitrogen, Karlsruhe; Biochrom AG, Berlin |
| Gentamicin | GIBCO Invitrogen, Karlsruhe |
| Glibenclamid | Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim |
| Glycerin wasserfrei, 99,5% | Fluka Chemika, Buchs |
| HCl, 32% | Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim |
| Hefeextrakt | ICN Biomedicals, USA |
| HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure), 99,9% | Roth, Karlsruhe |
| Hoechst 33258 (Bisbenzimid) | Sigma, Steinheim |
| Kaisers Glyceringelantine | Merck, Darmstadt |
| KCl, p.a. 99,5% | Fluka Chemika, Buchs |
| Kollagenase Typ IV | GIBCO Invitrogen, Karlsruhe |
| Lipofektamin | Invitrogen, Karlsruhe |
| Magnesiumchlorid-Hexahydrat, p.a.99-100% | Merck, Darmstadt |
| MgSO ₄ | |
| NaCl, p.a. 99,5% | Merck, Darmstadt |

| | |
|---|--|
| Nonidet P40 | Fluka Chemika, Buchs |
| Paraformaldehyd, 95% | Fluka Chemika, Buchs |
| Poly-D-Lysin | Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim |
| Sodium Pyruvate | Biochrom AG, Berlin |
| Tamoxifen, >99% | Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim |
| TRIS, 99,9% | Sigma, Steinheim |
| Trizma [®] Base, 99,9% Titration | Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim |
| Trypsin/EDTA-Lösung | GIBCO Invitrogen, Karlsruhe |
| Trypton | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| Ultima Gold (Szintillationsflüssigkeit) | Packard Biosciences Company, Niederlande |
| β-Mercaptoethanol | |

3.4 Medien und gepufferte Salzlösungen

| | |
|---|-------------------------------|
| DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) | Lonza, Bio Whittaker, Schweiz |
| FKS (Fötiales Kälberserum) | GIBCO Invitrogen, Karlsruhe |
| HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution) | GIBCO Invitrogen, Karlsruhe |
| MEM (Minimum Essential Media) | GIBCO Invitrogen, Karlsruhe |
| OPTI-MEM | GIBCO Invitrogen, Karlsruhe |
| PBS (Phosphate-Buffered Saline) | GIBCO Invitrogen, Karlsruhe |
| RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 + L-Glutamine (mit und ohne Glukose) | GIBCO Invitrogen, Karlsruhe |
| SOC Medium | GIBCO Invitrogen, Karlsruhe |

Die verwendeten Medien wurden bei 4°C aufbewahrt. Das FKS wurde einmalig für 1h auf 58°C erhitzt (Hitzeinaktivierung) und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

3.5 Kits

| | |
|---|-----------------|
| QIAprep [®] Miniprep Kit | Qiagen, USA |
| EndoFree Plamid Maxi [®] Kit | Qiagen, USA |
| QuikChange [®] Site-Directed Mutagenesis Kit | Stratagene, USA |

3.6 Kulturmedien, Puffer und Lösungen

Alle Kulturmedien, Puffer und Lösungen wurden, wenn nicht anders beschrieben bei 4°C gelagert. Die für die Zellkultur eingesetzten Medien wurden vor Gebrauch auf 37°C erwärmt.

3.6.1 Wachstumsmedien für die Zellkultur

3.6.1.1 Medium für Human Embryonic Kidney (HEK) 293-Zellen

MEM

+ FKS 10%

+ Gentamycin 20µg/ml

3.6.1.2 Medium für Michigan Cancer Foundation (MCF) 7-Zellen

RPMI1640 + L-Glutamine mit Glukose

+ FKS 10%

+ Gentamycin 20µg/ml

3.6.1.3 Medium für Insulinoma (INS) 1-Zellen

RPMI1640 + L-Glutamine

+ FKS 10%

+ HEPES 10mM

+ β-Mercaptoethanol 35µl/l

+ Natrium Pyruvat 1mM

+ Pen/Strep* 5ml

* Penicillin 100 Einheiten/ml und Streptomycin 0,1 mg/ml als Stocklösung ansetzen. Aliquotes bei -20°C lagern.

Bei allen Zelllinien in Kultur, die den Vektor pcDNA mit endogenem Neomycin Resistenzgen enthielten, wurde zusätzlich 300 µg/ml Geneticin (in HEPES 100 mM; pH 7,4) zugegeben. Dadurch wird der Selektionsdruck erhöht, um den Verlust der transfizierten Plasmide zu verhindern (siehe 4.1.3.1).

3.6.2 Medium für isolierte Langerhans-Inseln

RPMI1640 + L-Glutamine

+ RPMI1640 mit Glukose 1Teil

+ RPMI1640 ohne Glukose 1Teil

+ FKS 10%

+ Penicillin 100 Einheiten/ml

+ Streptomycin 0,1 mg/ml

3.6.3 Medien zum Einfrieren von Zellen

Hierfür wurde als Basis jeweils das Medium eingesetzt, welches zur Kultivierung der einzelnen Zelllinien verwendet wurde. Aus diesen Medien wurden dann die zum Einfrieren verwendeten Medien (Medium A und Medium B) hergestellt.

| | |
|---------------|-----------------------------------|
| HEK293-Zellen | MEM |
| MCF7-Zellen | RPMI1640 + L-Glutamin mit Glukose |
| INS1-Zellen | RPMI1640 + L-Glutamin mit Glukose |
| <hr/> | |
| Medium A | |
| <hr/> | |
| Kulturmedium | |
| + FKS 40% | |
| <hr/> | |
| Medium B | |
| <hr/> | |
| Kulturmedium | |
| + DMSO 20% | |
| <hr/> | |

3.6.4 Trypsin/EDTA-Lösung

Trypsin/EDTA 5%

Diese Lösung wurde zum enzymatischen Ablösen der Zellen vom Schalenboden eingesetzt. Dazu wurde die Lösung im Verhältnis 1:2 in PBS verdünnt. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

3.6.5 Paraformaldehyd-Lösung

| |
|--------------------------|
| <hr/> |
| Paraformaldehyd-Lösungen |
| <hr/> |
| PBS |
| + Paraformaldehyd 3% |
| <hr/> |

Diese Lösung wurde zum Fixieren der Zellen am Schalenboden eingesetzt.

3.6.6 HOECHST 33258-Lösung

| |
|------------------------|
| <hr/> |
| HOECHST 33258-Lösung |
| <hr/> |
| Wasser bi-distilliert |
| + HOECHST 33258 1mg/ml |
| <hr/> |

Diese zum Färben der Zellkerne eingesetzte HOECHST 33258-Stammlösung wurde in Aliquoten bei -20°C gelagert, bei Bedarf lichtgeschützt aufgetaut und direkt vor Gebrauch 1:100 in PBS verdünnt.

3.6.7 Lösungen für die Caspase Aktivitäts-Bestimmungen

3.6.7.1 Caspase Lysepuffer

Stammlösung für den Lysepuffer

TRIS-HCl (pH 8) 50 mM

+ NaCl 120mM

+ EDTA (pH 8) 5 mM

+ Nonidet P40 0,5%

+ Aq. bidest. ad 100 ml

TRIS und EDTA wurden jeweils in bidestilliertem Wasser (Aq. bidest.) gelöst und mit HCl beziehungsweise NaOH auf einen pH-Wert von 8 eingestellt.

Lysepuffer

Stammlösung für den Lysepuffer 1Teil

+ PBS 1Teil

+ DTT 5 mM

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

3.6.8 Pentobarbital-Lösung

Pentobarbital-Lösung

NaCl-Lösung 85%

+ Pentobarbital 10 mg/ml

3.6.9 Kollagenase-Lösung

Kollagenase-Lösung

HBSS

+ Kollagenase Typ IV 236 Einheiten/mg

(3 mg/ml)

3.6.10 Lösungen für die Radioligandenbindungsstudien

3.6.10.1 Inkubationspuffer

Inkubationspuffer

+ HEPES 5 mM

+ KCl 5 mM

+ NaCl 139 mM

Aq. bidest à 1 l, pH 7,4

3.6.10.2 Hypotoner-Puffer

Hypotoner-Puffer

+ HEPES 10 mM

+ EGTA 1 mM

Aq. bidest

Dieser Puffer wurde über Nacht bei 4°C gelagert, bevor der pH-Wert auf 7,4 eingestellt wurde.

3.6.10.3 Waschpuffer

Waschpuffer

+ Trizma 50 mM

+ NaCl 154 mM

Aq. bidest

Dieser Puffer wurde über Nacht bei 4°C gelagert, bevor der pH-Wert mit HCl auf 7,4 eingestellt wurde.

3.7 Primer SUR1

Ratte 201 bp :

F_X97279_P3

5'-actgctcttcgctcctcgtgt-3'

R_X97279_P3

5'-aaggccagggtccagtagat-3'

Die RT-PCR mit diesen Primern wurde freundlicherweise von Frau Dr. Claudia Bernardo de Oliveira Franz wie in 5.2.1 beschrieben durchgeführt.

3.8 Genexpressionsanalyse via Microarray

Mit der Chipanalyse der Genexpression nach Behandlung mit E2 wurde die Firma Miltenyi Biotec GmbH beauftragt. Es wurde ein *Agilent Whole Human Genom Oligo Microarray (one color)* durchgeführt. Die Ergebnisse wurden uns nach bioinformatischer Aufarbeitung (näher erläutert in Kapitel 5.6) in einem Service Report zusammengefasst übergeben.

3.9 EDV

Hardware

PC

Software

CorelDraw X3 (CorelCorporation)
EndNote X (Thompson ISI Researchsoft)
GraphPad Prism (GraphPad Software Inc)
Photoshop, Acrobat (Adobe)
SigmaPlot 11.0 (Systat Software Inc)
Word, Excel, Powerpoint (Microsoft)

4 Methoden

4.1 Zellkultur

Unter Zellkultur versteht man das Anzüchten und Vermehren von lebenden Zellen unter sterilen Bedingungen in Nährmedien. Zellen stellen ein geeignetes Modellsystem für die Untersuchung biologischer Prozesse auf molekularer Ebene dar. So können Zellen außerhalb des Organismus mit Blick auf Stoffwechsel, Wachstumsverhalten Zell-Zell-Interaktion, interzelluläre Kommunikation oder die Reaktion von Zellen auf bestimmte Substanzen relativ unkompliziert untersucht werden. Man unterscheidet grundsätzlich zwischen zwei Arten der Zellkultur, der Kultivierung von primären Zellen und der Kultivierung von permanenten Zellen. Der Unterschied liegt unter anderem in der Lebensspanne der Zellen. Primärzellen sind Zellen, die direkt aus dem Gewebe entnommen und in Kultur gebracht werden. Außerhalb des Organismus sind Zellen jedoch nur begrenzt lebensfähig und beginnen mit der Entnahme aus dem Gewebe mit einem Alterungsbeziehungsweise Sterbeprozess. Diese Zellen sind in Kultur je nach Zelltyp ein paar Tage lebensfähig und müssen ständig neu gewonnen werden. Permanente Zelllinien sind immortalisiert, das bedeutet sie wurden beispielsweise durch Fusion mit einer Krebszelle oder durch Transformation mit Fragmenten von entsprechenden Virusgenen unsterblich gemacht. Die so erhaltenen Zelllinien lassen sich bei entsprechenden Bedingungen über längere Zeit in Kultur halten.

4.1.1 Plasmide und Zelllinien

In dieser Arbeit wurden zur funktionellen Untersuchung des Sulfonylharnstoffrezeptors 1 (SUR1) sowie verschiedener Mutanten des SUR1, vor allem HEK293-Zellen verwendet. Dabei handelt es sich um eine Zelllinie, die ursprünglich aus menschlichen embryonalen Nierenzellen stammt, welche durch Transformation mit fragmentierter DNA des Adenovirus Typ 5 immortalisiert wurde (Graham, 1977). Die verwendeten HEK293-Zellen wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig) bezogen. Die Zellen wurden jeweils stabil oder transient mit dem pcDNA3.1-Expressionsvektor (Invitrogen, Karlsruhe) transfiziert, welcher die cDNA für SUR1 (GenBank X97279) enthielt. Weiterhin wurden die HEK293-Zellen mit der cDNA für die Punktmutanten SUR1(K719R), SUR1(K1384M), SUR1(R1379C) und SUR1(R1379L) transfiziert. Als Kontrolle wurden HEK293-Zellen verwendet, die mit dem leeren pcDNA3.1-Vektor transfiziert wurden. Bereits vor Beginn dieser Arbeit wurde die Mutagenese und Isolation von einigen der verwendeten stabilen Zelllinien von Frau PD Dr. A. Hambrock und Frau C. Müller wie in Hambrock et al., (2002) beschrieben durchgeführt. Das Plasmid, welches die cDNA für SUR1 enthält, wurde uns freundlicherweise von Herrn

Dr. C. Derst (Berlin) zur Verfügung gestellt. Die Gewinnung spezifischer Punktmutationen in SUR1 wird nachfolgend beschrieben. Die Methode der Transfektion bzw. Isolation einer Zelllinie sieht man in Kapitel (4.1.3). In HEK293-Zellen wurden die klassischen Estradiol-Rezeptoren (ER) (ER α oder ER β) nicht, oder in einem kaum detektierbaren Maße nachgewiesen (Albanito et al., 2008; Gonzalez-Arenas et al., 2006; Kahlert et al., 2000; Tang et al., 2006).

4.1.2 Herstellung von Punktmutanten am Beispiel von SUR1(R1379C) und SUR1(R1379L)

Um den Einfluss einer spezifischen Aminosäure für funktionell relevante Bereiche innerhalb des SUR1 näher zu charakterisieren, wurden in dieser Arbeit verschiedene Punktmutationen innerhalb des Proteins durchgeführt.

4.1.2.1 Mutagenese über DNA-Amplifikation durch Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Mutagenesen wurden mithilfe des QuikChange[®] Site-Directed Mutagenesis Kit nach modifiziertem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die hierfür verwendeten Primer mit einer Länge zwischen 24 und 45 Basenpaaren, welche die gewünschten Mutationen enthielten, wurden bereits im Vorfeld dieser Arbeit in der Arbeitsgruppe hergestellt. Das Primerdesign erfolgte mithilfe des Programms Generunner, entsprechende Primer wurden von der Firma Operon hergestellt.

Das Ausgangsmaterial bildete die native SUR1-cDNA. In diese wurden spezifisch eine Punktmutation an Aminosäure Position 1379 durch den Austausch von Tryptophan zu Cystein bzw. Lysin eingebracht. Die Mutagenese erfolgte über eine Polymerase Kettenreaktion (PCR) wobei jede Mutation im doppelten Ansatz pipettiert wurde. Folgende in der Tabelle aufgeführten Reagenzien, Primer und PCR-Programme wurden verwendet:

| | | |
|-----------------------|---------|---|
| 10x Reaktions-Puffer: | 100 mM | KCl |
| | 100 mM | (NH ₄) ₂ SO ₄ |
| | 200 mM | Tris HCl pH 8,3 |
| | 20 mM | MgSO ₄ |
| | 1% | Triton [®] X-100 |
| | 1 mg/ml | nuclease-free BSA |

| | |
|----------------------|---|
| SUR1 | 5'- GGG ATC TGC GGC GGC ACA GGC AGT GGA AAA TCC-3' |
| | 3'- CCC TAG ACG CCG CCG TGT CCG TCA CCT TTT AGG-5' |
| Primer: | |
| SUR1_R1379C_a | 5'- GGG ATC TGC GGC TGC ACA GGC AGT GGA AAA TCC-3' |
| SUR1_R1379C_b | 5'- GGA TTT TCC ACT GCC TGT GCA GCC GCA GAT CCC -3' |
| SUR1_R1379L_a | 5'- GGG ATC TGC GGC CTC ACA GGC AGT GGA AAA TCC-3' |
| SUR1_R1379L_b | 5'- GGA TTT TCC ACT GCC TGT GAG GCC GCA GAT CCC -3' |

Die PCR dient hier der Amplifizierung des gewünschten Sequenzbereiches unter Einbringung der zu untersuchenden Mutation. Zunächst wird die Ausgangs-DNA bei hohen Temperaturen (95°C) denaturiert. In der Hybridisierungsphase (55°C) kommt es zur Anlagerung der Primer an die Einzelstränge, die während der Elongationsphase (68°C) durch die DNA-Polymerase verlängert werden und so einen komplementären DNA-Strang bilden. Die Punktmutation ist in den Primersequenzen enthalten. Durch die geschickte Wahl der Hybridisierungstemperatur für die Anlagerung der Primer kann gewährleistet werden, dass der Primer trotz des Austausches einer Base an den Einzelstrang bindet, elongiert wird und so die gewünschte Punktmutation eingefügt wird. Da die Primer im Überschuss vorliegen und es pro PCR-Zyklus zu einer Verdoppelung der bereits gebildeten Stränge kommt, liegt am Ende der PCR ausreichend cDNA mit der jeweiligen Punktmutation vor.

Tabelle 1: Pipettierschema PCR.

| Reagenz | Konzentration | SUR1(R1379C) | | SUR1(R1379L) | |
|-------------------------------|---------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | | Ansatz 1 | Ansatz 2 | Ansatz 1 | Ansatz 2 |
| 10x Reaktions-Puffer | | 5 µl | 5 µl | 5 µl | 5 µl |
| DNA SUR1 | 50 ng/µl | 1 µl | 2 µl | 1 µl | 2 µl |
| Primer SUR1(R1379Ca) | 100 ng/µl | 1,25 µl | 1,25 µl | | |
| Primer SUR1(R1379Cb) | 100 ng/µl | 1,25 µl | 1,25 µl | | |
| Primer SUR1(R1379La) | 100 ng/µl | | | 1,25 µl | 1,25 µl |
| Primer SUR1(R1379Lb) | 100 ng/µl | | | 1,25 µl | 1,25 µl |
| dNTP Mix | | 1 µl | 1 µl | 1 µl | 1 µl |
| H₂O bidest. | | 40,5 µl | 39,5 µl | 40,5 µl | 39,5 µl |
| Gesamtansatz | | 50 µl | 50 µl | 50 µl | 50 µl |
| Pfu-Turbo- Polymerase | 2,5 U/µl | 1µl | 1µl | 1µl | 1µl |

Die PCR wurde mit folgendem Programm durchgeführt:

Tabelle 2: PCR Programm.

| Segment | Zyklen | Temperatur | Zeit |
|---------|--------|------------|----------|
| 1 | 1 | 95°C | 30 sek |
| 2 | 18 | 95°C | 30 sek |
| | | 55°C | 1 min |
| | | 68°C | 26 min |
| Kühlung | | 4°C | bis Ende |

Bis zur Weiterverarbeitung wurden die Proben bei 4°C aufbewahrt.

4.1.2.2 *DpnI*-Verdau

Die durch Amplifikation in dem Bakterium *Escherichia coli* (*E. coli*) gewonnene Ausgangs-DNA liegt noch im natürlichen, methylierten Zustand in dem PCR-Gemisch vor. Um diese von den synthetisch über PCR hergestellten, nicht-methylierten DNA-Fragmenten zu trennen, wurde ein enzymatischer Restriktionsverdau der eingesetzten natürlichen, nicht-mutierten SUR1-DNA vorgenommen. Dazu wurde jedem PCR-Ansatz 1 µl des Restriktionsenzym *DpnI* [10 U/µl] aus dem Kit zugesetzt und für 2 h bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte durch Hitzebehandlung bei 58°C für 10 min. Die so gewonnene DNA wurde dann zur Transformation von Bakterien und damit der Plasmidproduktion verwendet.

4.1.2.3 Transformation von *E. coli*, Ansetzten von Bakterienkulturen

Zur Amplifikation des pcDNA3.1 Vektors mit der gewünschten Mutation wurden kompetente Bakterien (*E. coli*, Stamm DH5 α) eingesetzt. Organismen nennt man „kompetent“ wenn sie die Fähigkeit besitzen, Fremd-DNA aufzunehmen. Den Vorgang des Einbringens von DNA in Prokaryonten, Algen, Pilze und Pflanzen wird Transformation genannt.

Für eine erfolgreiche Transformation sollte ein Bakterium möglichst nur ein Plasmid aufnehmen. Um dies zu gewährleisten, setzte man die Bakterien im Überschuss ein. Bakterien und PCR-Plasmide wurden langsam auf Eis für 30 min aufgetaut. Zu 50 µl der Suspension mit kompetenten Zellen wurden jeweils 2 µl des PCR-Produktes gegeben und zur Anlagerung der DNA an die Bakterien wurde das Gemisch für weitere 30 min auf Eis inkubiert. Die Aufnahme der Fremd-DNA erfolgte durch eine Hitzeschock-induzierte Porenbildung in den Bakterienzellwänden. Dazu wurde das Gemisch im Heizblock für 45 sek auf 42°C erhitzt. Zur Erholung der Zellen wurden die Ansätze 2 min auf Eis inkubiert, bevor jeweils 1 ml auf 37°C vorgewärmtes SOC-Medium zugegeben und die Zellen für 1,5 h bei 37°C im Brutschrank geschüttelt wurden. Anschließend wurden je 300 µl der Bakteriensuspension auf jeweils 3 Agar-Platten mit Ampicillin (100 µg/ml Medium)

ausgebracht und über Nacht im Brutschrank bei 37°C kultiviert. Das Antibiotikum Ampicillin diente zur Selektion auf Bakterien, welche das Plasmid aufgenommen haben. In dem pcDNA3.1-Vektor ist ein bakterielles Antibiotika-Resistenzgen gegen Ampicillin enthalten.

Am Tag darauf wurden die Klone auf den einzelnen Schalen gezählt. Wurde die Schale nicht direkt weiter verwendet, wurden die Schalen mit Parafilm umwickelt und bei 4°C für maximal eine Woche aufbewahrt.

Zum Ansetzen von Bakterienkulturen zur Plasmidproduktion mit anschließender Plasmidisolierung in Mini- und Maxipräparationen (siehe 4.1.2.4 und 4.1.2.5) wurden einzeln gewachsene Bakterienkolonien auf den Agar-Platten verwendet.

4.1.2.4 Plasmidisolation aus transformierten Bakterien

Für eine Minipräparation wurde zunächst pro genutzte Kolonie 5 ml LB-Medium in ein 14 ml Gefäß mit 100 µg/ml Ampicillin vorgelegt. Das LB-Medium wurde mit Bakterien angeimpft, indem eine sterile Pipettenspitze durch die Kolonie gezogen und in das Gefäß gegeben wurde. Der Ansatz wurde über Nacht bei 37°C unter Schütteln im Brutschrank kultiviert.

Bevor mit der Plasmidisolierung (siehe 4.1.2.4) begonnen wurde, wurde zunächst von jedem Ansatz ein Glycerinstock zur Aufbewahrung bis zur Maxipräparation angelegt. Dazu wurden 850 µl der Bakteriensuspension mit 150 µl Glycerol gemischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

Zur Plasmidisolierung in Minipräparationen wurde die Bakteriensuspension für 20 min bei 3000 rpm und Raumtemperatur (RT) zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet direkt eingesetzt. Um größere Plasmidmengen durch eine Maxipräparation zu erhalten, wurden die Glycerinstocks mit der gewünschten DNA aufgetaut. Ein Tropfen der Bakteriensuspension wurde in Flaschen zu 200 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin gegeben und über Nacht bei 37°C unter Schütteln im Brutschrank gezogen. Anschließend wurde die Bakteriensuspension in 50 ml Gefäße aliquotiert und für 20 min bei 4°C und 2500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet für die Plasmidisolation eingesetzt, oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Sowohl die Mini- als auch die Maxipräparation wurde mit Kits der Firma Qiagen nach Protokoll des Herstellers durchgeführt (QIAprep® Miniprep Kit; EndoFree Plasmid Maxi® Kit).

4.1.2.5 Kontrolle einer erfolgreichen Mutation durch Sequenzierung

Um sicher zu stellen, dass die Mutagenese erfolgreich war und die gewünschte Mutation in die ursprüngliche SUR1-Sequenz eingebaut wurde, wurden nach einer Minipräparation, zur Gewinnung geringer Plasmidmengen, 90 ng/ml der DNA mit passenden Primern zur Sequenzierung an die Firma „4base lab“ in Reutlingen gegeben. Zur Identifikation der positiven Klone erfolgte ein Vergleich der erhaltenen Sequenz mit der original SUR1-Sequenz der Ausgangs-DNA über das BLAST (Basic Local Alignment Search

Tool)-Programm der Firma GATC Biotech (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Nach positivem Ergebnis wurden anschließend durch eine Maxipräparation größere Plasmidmengen gewonnen.

4.1.3 Gewinnung rekombinanter HEK293-Zellen durch Transfektion

Das Einbringen von Fremd-DNA in eukaryotische Tierzellen bezeichnet man als Transfektion. Normalerweise wird Fremd-DNA in eukaryotischen Zellen relativ schnell abgebaut. Der Abbau kann aber durch den zufälligen stabilen Einbau der Fremd-DNA in das Wirtsgenom verhindert werden.

Die Transfektion erfolgte im Rahmen dieser Arbeit chemisch, mittels kationischer Lipide.

Bei dieser sogenannten Lipofektion wird ein Liposomen-Reagenz mit positiver Nettoladung zur negativ geladenen DNA gegeben. Die dabei spontan entstehenden Liposom-DNA-Vesikel fusionieren mit der Plasmamembran und werden so von der Zelle aufgenommen.

4.1.3.1 Gewinnung stabil transfizierter HEK293-Zellen

Jede Transfektion wurde in Gewebekulturschalen (94 x 16 mm) mit einem Zell-Konfluenzgrad von 60-80% durchgeführt. Pro Schale wurden 2 Reaktionsgefäße zum Ansetzen der Transfektionsreagenzien vorbereitet.

Tabelle 3: Ansätze der Transfektionsreagenzien.

| Ansatz 1 (1,5 ml Reaktionsgefäß) | Ansatz 2 (2 ml Reaktionsgefäß) |
|----------------------------------|--------------------------------|
| 800 µl OPTIMEM | 800 µl OPTIMEM |
| + 50 µl Lipofektamin | + entsprechende DNA-Menge |

In beide Reaktionsgefäße wurde 800 µl OPTIMEM (37°C) vorgelegt. OPTIMEM ist ein spezielles Medium welches die Menge an benötigtem Serum zum optimalen Wachstum der Zellen senkt und die Proliferationsrate positiv beeinflusst. Zu Ansatz 1 wurden 50 µl Lipofektamin, zu Ansatz 2 die entsprechende Menge an DNA zugegeben und durch Auf- und Abpipettieren vorsichtig gemischt. Die optimale Menge an Lipofektamin (25 µl/DNA-Komponente) war in früheren Versuchen der Arbeitsgruppe ermittelt worden. Die eingesetzten DNA-Mengen der unterschiedlich großen Plasmidkonstrukte lagen in den einzelnen Ansätzen in äquimolaren Mengen für vor.

Tabelle 4: Eingesetzte Menge der Plasmidkonstrukte.

| Plasmid | Größe | Eingesetzte Menge/Schale |
|-------------------------|----------|--------------------------|
| pcDNA3.1 | 5,4 kb | 3,14 µg |
| pcDNA3.1 + SUR1 | 10,15 kb | 5,82 µg |
| pcDNA3.1 + SUR1(K719R) | 10,15 kb | 5,82 µg |
| pcDNA3.1 + SUR1(K1384M) | 10,15 kb | 5,82 µg |
| pcDNA3.1 + SUR1(M1379C) | 10,15 kb | 5,82 µg |
| pcDNA3.1 + SUR1(M1379L) | 10,15 kb | 5,82 µg |

Ansatz 1 wurde zu Ansatz 2 gegeben und nach vorsichtigem Mischen zur Bildung von Liposom-DNA-Vesikeln 30 min offen unter der Sterilbank bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Während dieser Inkubationszeit wurden die Zellen mit, auf 37°C vorgewärmten, OPTIMEM gewaschen. Dazu wurde das Kulturmedium abgesaugt, die Zellen mit 10 ml OPTIMEM pro Schale überschichtet und bis zum nächsten Schritt zurück in den Brutschrank gestellt. Für jede zu transfizierende Schale wurden in einem 15 ml Gefäß 6,3 ml OPTIMEM vorgelegt, das entsprechende Transfektionsgemisch nach Ablauf der Inkubationszeit zugegeben und gemischt. Dann wurde das OPTIMEM von den Schalen abgesaugt und die Zellen vorsichtig mit dem OPTIMEM-Transfektionsgemisch überschichtet. Nach einer Inkubation für 5 h bei 37°C wurden pro Schale 8 ml MEM + 20% FCS (37°C) (Endkonzentration: 10% FCS/Schale) zugegeben. 24 h nach Beginn der Transfektion wurde das Transfektionsgemisch von den HEK293-Zellen entfernt und durch das sonst verwendete Kulturmedium (siehe 3.6.1.1) ersetzt.

Bis hier entspricht das Vorgehen dem Protokoll einer transienten, d.h. nicht permanenten, Transfektion. Um aus diesen transient transfizierten Zellen eine stabil transfizierte Zelllinie zu gewinnen, erfolgte zunächst eine Selektion auf positiv transfizierte Zellen. Hierfür nutzte man ein Säuger-Antibiotikaresistenzgen, welches mit dem Expressionssvektor pcDNA3.1 in die Zelle eingebracht wurde. In diesem Fall handelte es sich um ein Neomycin-Resistenzgen, das der Zelle neben einer Neomycin-Resistenz zusätzlich eine Resistenz gegenüber Geneticin verleiht. Ab Tag 2 nach der Transfektion wurden die Zellen mit 700 µg/ml Geneticin behandelt, wodurch ein Absterben der nicht transfizierten Zellen erreicht wurde. Die Selektionsphase dauerte ca. 7 Tage, bis ausschließlich Zellen mit Geneticin -Resistenz übrig blieben. Um in dieser Phase ein zusätzliches Absterben der Zellen durch, von gestressten und bereits sterbenden Zellen, abgesonderte Toxine zu verhindern, erfolgte täglich ein Mediumwechsel. Anschließend wurde die Geneticinkonzentration auf 300 µg/ml reduziert und während der gesamten Kulturzeit zum Erhalt der Resistenz beibehalten.

4.1.3.2 Kultivierung stabil transfizierter HEK293-Zellen

Die adhären wachsenden HEK293-Zellen wurden im Brutschrank in Gewebekulturschalen (94 x 16 mm) bei 37°C, 5% CO₂ und hoher Luftfeuchtigkeit in 10 ml Wachstumsmedium (siehe 3.6.1.1) kultiviert. Die Zellen bilden einen einschichtigen Zellrasen, mit zunehmendem Konfluenzgrad verlangsamt sich das Wachstum, es bilden sich Zellhaufen und schließlich lösen sich ganze Bereiche des Zellrasens vom Schalenboden ab. Da die Verdopplungszeit der HEK293-Zellen ca. 24-30 h beträgt, wurde, um die Zellen in einem optimalen teilungsfähigen Zustand zu halten, zweimal pro Woche passagiert. Bei einem Konfluenzgrad von 60-80% wurden die Zellen, je nach Zelldichte, 1:2 beziehungsweise 1:3 verdünnt und wie nachfolgend beschrieben passagiert. Nach Absaugen des Mediums erfolgte die mechanische Ablösung der Zellen vom Schalenboden durch Spülen mit einer Pipette, im Fall einer 1:2-Verdünnung, mit 2 ml Wachstumsmedium (37°C). Anschließend wurde die Zellsuspension auf zwei neue Gewebekulturschalen mit je 9 ml Wachstumsmedium (37°C) und einer Genitocinkonzentration von 300 µg/ml zum Erhalt der Resistenz verteilt. Bei der letzten Passage, vor Verwendung der stabil transfizierten HEK293-Zellen für einen Versuch, wurde auf die Zugabe von Genitocin verzichtet, um mögliche Einflüsse des Antibiotikums auf die Wirkung verschiedener Substanzen zu vermeiden.

4.1.3.3 Kultivierung von MCF7-Zellen und INS1-E-Zellen

4.1.3.3.1 MCF7-Zelllinie

Die MCF7-Zelllinie ist eine adhären wachsende humane Zelllinie, die aus dem Adenomakarzinom einer kaukasischen Frau gewonnen wurde. Es handelt sich dabei um immortalisierte, ursprünglich epitheliale Zellen der Brustdrüse, welche Estrogenrezeptoren exprimieren (Brooks S.C.; Locke, 1973). Bei den Estrogenrezeptoren handelt es sich um ER α und ER β , wobei ER α in den Zellen in einer 450fach höheren Menge als ER β vorliegt (Effenberger, 2004; Maggiolini, 2001). Die verwendeten MCF7-Zellen stammen ursprünglich von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig) und wurden uns freundlicherweise von Frau Prof. Dr. Kloor (Tübingen) zur Verfügung gestellt.

Die MCF7-Zellen wurden in Gewebekulturschalen (94 x 16 mm) bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit in 10 ml Wachstumsmedium (siehe 3.6.1.2) kultiviert. Der Passage-Rhythmus und die Durchführung entsprachen denen der HEK293-Zellen (siehe 4.1.3.2).

4.1.3.3.2 INS1-E-Zelllinie

Die insulinsezernierende Zelllinie INS1-E wurde von der Gruppe um CB Wollheim 1992 aus einem durch Röntgenstrahlung induzierten Insulinom, d.h. einem Tumor der endokrinen

Zellen (Langerhans-Inseln) des Pankreas einer Ratte (*Rattus norvegicus*) generiert. Die INS1-E-Zellen sind gut differenziert, was sie zu einem geeigneten Modell zur Untersuchung von verschiedenen Aspekten der β -Zell-Funktionen macht. So weisen INS1-E-Zellen eine durch Glukose induzierbare Insulinfreisetzung auf. Die Insulinfreisetzung geht mit einer Depolarisierung der Plasmamembran und einem folgenden Ca^{2+} -Einstrom einher. Die Verknüpfung des metabolischen Zustandes und der Freisetzung der Insulinvesikel in den INS1-E-Zellen geschieht wahrscheinlich über den K_{ATP} -Kanal, da eine Hemmung mit Diazoxid möglich ist (Asfari, 1992). Entsprechend der β -Zellen, weisen die INS1-E-Zellen sowohl die zytoplasmatischen Estrogenrezeptoren $\text{ER}\alpha$ und $\text{ER}\beta$ als auch den membranständigen Estrogenrezeptor GPER auf (Tiano and Mauvais-Jarvis, 2012). Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen stammen ursprünglich aus dem Labor von Prof. Dr. CB Wollheim (Genf, Schweiz) (Asfari, 1992) und wurden uns nach seiner Genehmigung freundlicherweise von Frau Prof. Dr. Ullrich (Tübingen) überlassen.

Die adhärenenten Zellen wurden in Gewebekulturschalen (94 x 16 mm) bei 37°C, 5% CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit in 10 ml Wachstumsmedium (siehe 3.6.1.3) kultiviert. INS-1 Zellen wachsen im Vergleich zu HEK293-Zellen unter den gleichen Bedingungen langsamer und bilden keinen gleichmäßigen Zellrasen aus. Aus diesem Grund war eine einmalige Passage pro Woche ausreichend. Nach Entfernung des Wachstumsmediums erfolgte das Ablösen der Zellen vom Schalenboden mit 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung (siehe 3.6.4) nach 3-minütiger Inkubation. Anschließend wurden die Zellen in der entsprechenden Menge des Wachstumsmediums (37°C) aufgenommen und je 1 ml der Zellsuspension zu 9 ml vorgelegtes Wachstumsmedium gegeben. Ein Mediumwechsel fand alle 4 Tage statt.

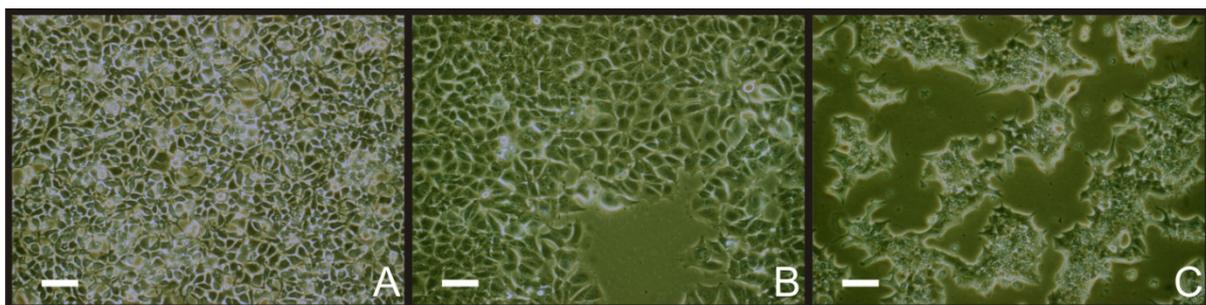


Abb.7.: Lichtmikroskopische Aufnahmen von HEK293-, MCF7- und INS1-E-Zellen. Auf den Bildern ist die Morphologie der unterschiedlichen Zelllinien und deren Wachstumseigenschaften zu erkennen. Der Maßstab repräsentiert 50 μm . A. 100%-konfluente einschichtige HEK293-Zellen; B. 90%-konfluente einschichtige MCF7-Zellen C. 60%-konfluente INS1-Zellen.

4.1.3.4 Auftauen von Zellen

Um in flüssigem Stickstoff eingefrorene Zellen erneut in Kultur nehmen zu können, ist ein schnelles und relativ schonendes Auftauen nötig. Die eingefrorenen Zellen wurden mit etwas Wachstumsmedium (37°C) in 10 ml Wachstumsmedium in ein 50 ml Gefäß überführt. Nach einem 3-minütigen Zentrifugationsschritt bei 4°C und 300 g konnte das im Einfriermedium

vorhandene DMSO entfernt werden, indem der Überstand verworfen wurde. Anschließend wurde das Zellpellet in 10 ml des entsprechenden Wachstumsmediums (37°C) resuspendiert und die Zellen in Gewebekulturschalen ausgebracht. Die Kultur der Zellen erfolgte wie in 4.1.3.2 und 4.1.3.3 beschrieben. 24 h nach dem Auftauen fand ein Mediumwechsel statt. Nach zwei weiteren Tagen Inkubation und entsprechendem Konfluenzgrad war die Zellpassage möglich. Bei rekombinanten Zellen enthielt das Wachstumsmedium von diesem Zeitpunkt an Genitacin (300 µg/ml).

4.1.3.5 Einfrieren von Zellen

HEK293-Zellen wurden bei einem Konfluenzgrad von 70-90%, MCF- und INS1-E-Zellen bei einem Konfluenzgrad von 60-80% eingefroren. Um den Zellverlust durch das schnelle Bilden von Eiskristallen so gering wie möglich zu halten, ist es notwendig den Einfriervorgang möglichst langsam vorzunehmen.

Zum Einfrieren der Zellen wurde das Wachstumsmedium aus den Kulturschalen abgesaugt und die Zellen durch Spülen mit 5 ml Medium A (siehe 3.6.3) mechanisch vom Schalenboden abgelöst. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein 50 ml Gefäß überführt und bei 4°C und 500 g für 6 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in je 500 µl Medium A und 500 µl Medium B (siehe 3.6.3) pro Schale resuspendiert und zu je 1 ml in Kryoröhrchen überführt. Nach der Lagerung der Zellen über Nacht bei -80°C wurden die Zell-Aliquotes in flüssigen Stickstoff überführt.

4.1.4 Aufarbeitung von HEK293-Zellen für die Microarray-Analyse

Zur bioinformatischen Analyse von Änderungen in der Genregulation innerhalb der stabil transfizierten HEK293-Zellen nach Behandlung mit 17β-Estradiol wurden die Zellen an die Firma Mitltenyi Biotec GmbH gegeben, um ein *Agilent Whole Human Genom Oligo Microarray (one color)* durchführen zu lassen.

Als frühestmöglicher Zeitpunkt für die Analyse des Signalweges wurden die Zellen für 8 h mit 100 µM 17β-Estradiol inkubiert. Die Aufarbeitung der Zellen zum Versand erfolgte, nach einem Abgleich mit dem Protokoll der Firma, wie nachfolgend beschrieben.

Pro Behandlungsansatz wurden 3 Schalen mit einem Konfluenzgrad von 60-80% verwendet. Nach der Inkubationszeit wurden die 3 Schalen in einem 50 ml Gefäß zusammengeführt und bei 4°C und 500 g für 6 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 3 ml PBS resuspendiert und in jeweils 1 ml Aliquotes davon in vorbereitete 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Anschließend wurden die Zellen bei 4°C und 208 g für 10 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Gefäße mit den Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Insgesamt wurden 3 Aufarbeitungen zur bioinformatischen Analyse durchgeführt. Bis zum Versand auf Trockeneis wurden die Zellen bei -80°C gelagert.

4.1.5 Membranaufarbeitungen von HEK293-Zellen

Membrane, die für in dieser Arbeit durchgeführte Radioligandenbindungsstudien verwendet wurden, wurden aus mit verschiedenen Plasmidkonstrukten stabil transfizierten HEK293-Zellen isoliert. Für die Membranisolation wurden der Inkubationspuffer (siehe 3.6.10.1) und zur Zell-Lyse der hypotone Puffer (siehe 3.6.10.2) verwendet. Den Zellen wurde bei der letzten Passage vor der Membranaufarbeitung kein Geneticin mehr zugesetzt. Um Protease-Aktivitäten während der Isolation möglichst niedrig zu halten, erfolgten alle Schritte bei 4°C. Je 20-24 Schalen mit einem Konfluenzgrad von 70-90% wurden mit 5 ml des Wachstumsmediums pro Kulturschale abgelöst und die Zellsuspension in ein auf Eis stehendes 50 ml Gefäß überführt. Nach einer Zentrifugation bei 4°C und 500 g für 6 min, wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet zur Lyse in 4 ml hypotonem Puffer pro Schale resuspendiert. Anschließend wurden die lysierten Zellen bei 4°C und 100 000 g für 1 h in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet durch saches Schwenken mit 4-5 ml Inkubationspuffer gewaschen. Das Zellpellet wurde in 0,5 ml Inkubationspuffer pro Schale aufgenommen und erst mit einer Pipettenspitze resuspendiert und dann mithilfe einer Spritze und Kanüle (0,8 x 40 mm) durch fünffaches auf- und abziehen fein dispergiert. Das so erhaltene Lysat wurde zu je 1 ml aliquotiert und bis zur Weiterverwendung bei -80°C eingefroren.

4.2 Versuchstierhaltung

Es wurden ausschließlich männliche C57/BL6 Mäuse der Linie VASP im Wildtyp verwendet. Die Tierhaltung erfolgte unter konventionellen Bedingungen. Die Temperatur in den Mäuseräumen betrug 21-23°C, die Luftfeuchtigkeit 45-60 %. Die Mäuse lebten mit einem Tag-Nacht-Rhythmus von 12 Stunden Licht (6-18 Uhr) und 12 Stunden Dunkelheit.

4.2.1 Isolation von Langerhans-Inseln

Für die Isolation der Langerhans-Inseln wurden die Mäuse durch die intraperitoneale Gabe von 100 µl Pentobarbital-Lösung (10 mg/ml in 85%-iger NaCl-Lösung) pro 10 g Körpergewicht narkotisiert. Nach der Eröffnung des Abdomens wurde der *Ductus pancreaticus* an der Leber mit einem chirurgischen Faden abgebunden. Mithilfe einer Kanüle wurden über den Gallengang 2 ml Kollagenaselösung Typ IV (siehe 3.6.9) in das Pankreas injiziert. Anschließend wurde das Pankreas von Magen, Milz und dem Zwölffingerdarm abgetrennt.

Die Organentnahme wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Oßwald durchgeführt.

Direkt nach der Entnahme wurde das Organ in ein 15 ml Gefäß überführt, in welchem 2 ml der Kollagenaselösung vorgelegt worden war, und für 2-15 min bei 37°C im Wasserbad

geschüttelt. Der Kollagenaseverdau wurde durch Zugabe von ca. 2 ml kaltem HBSS-Puffer gestoppt und das Gemisch bei 4°C und 300 g für 3 min zentrifugiert. Nachfolgend wurde das verdaute Gewebe zweimal mit je 3 ml HBSS-Puffer gewaschen, bevor es in 10 ml RPMI-Medium (siehe 3.6.2) aufgenommen und auf zwei Gewebekulturschalen (60 x 15 mm) verteilt wurde. Unter dem Mikroskop wurden die Inseln mit einer Pipette gepickt, und so von exokrinem Pankreasgewebe getrennt. Anschließend wurden die Inseln in kleinere Kulturschalen (35 x 10 mm) mit jeweils 3 ml des entsprechenden RPMI-Mediums überführt. Bis zur Behandlung beziehungsweise Aufarbeitung wurden die isolierten Langerhans-Inseln bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank kultiviert. Die Behandlung erfolgte direkt nachdem die Insel-Isolation abgeschlossen war.

4.3 Methoden zum Nachweis von Apoptose

In dieser Arbeit wurden HEK293-, MCF7- und INS1-Zellen sowie isolierte Langerhans-Inseln stabil transfiziert (siehe 4.1.3.1) oder direkt zur Untersuchung verschiedener apoptotischer Parameter eingesetzt. Die Zellen wurden wie in den Kapiteln 4.1.3.2 und 4.1.3.3 beschrieben kultiviert und die Behandlung mit der entsprechenden Substanz, beispielsweise 17β-Estradiol (E2), oder die Durchführung der entsprechenden Kontrollversuche erfolgte in Antibiotika-freiem Kulturmedium bei einem Konfluenzgrad von 60-80%.

Die Langerhans-Inseln wurden wie in Kapitel 4.2.1 beschrieben kultiviert und die Zugabe verschiedener Substanzen erfolgte direkt nach abgeschlossener Isolation. Nach einer bestimmten Inkubationszeit wurde dann die Bestimmung der unterschiedlichen apoptotischen Parameter, wie nachfolgend beschrieben, durchgeführt. Die unterschiedlich eingesetzten Konzentrationen der entsprechenden Substanzen und die verwendeten Inkubationszeiten können dem Ergebnisteil dieser Arbeit (Kapitel 5) entnommen werden.

4.3.1 Quantifizierung der Zellablösung

Ein charakteristisches Merkmal für den Zelltod von adhärent wachsenden HEK293-Zellen ist oft das Verlassen des Zellverbandes durch das Ablösen vom Schalenboden. Zur Quantifizierung der beispielsweise nach Estradiol-Zugabe abgelösten Zellen im Überstand, wurde das CASY TT Analyser System eingesetzt. Für diese Methode wurden die Zellen zunächst in einer isotonen Elektrolytlösung (CASY[®]ton) verdünnt und resuspendiert. Die Messung selbst erfolgte mit dem CASY-Zellzähl-Gerät, in welchem die Zellsuspension mit konstanter Strömungsgeschwindigkeit durch eine Präzisionsmesspore gezogen wird. An die Messkapillare wird über zwei Platinelektroden ein Spannungsfeld (1 MHz) angelegt und die mit Elektrolytflüssigkeit gefüllte Messpore stellt einen definierten Widerstand dar. Die einzeln durch die Pore gesaugten Zellen verdrängen dabei eine ihrem Volumen entsprechende Menge der Elektrolytlösung. Zellen mit intakter Plasmamembran wirken hier als Isolator und

erhöhen den elektrischen Widerstand, der als Maß für das Zellvolumen genutzt wird. Tote Zellen werden nur mit der Größe ihres Zellkerns erfasst, da ihre Zellmembran beschädigt ist. Um eine genaue Messung zu erreichen, muss sichergestellt sein, dass die Zellen einzeln an der Messpore vorbei gesaugt werden. Ein Maß hierfür ist der sogenannte Aggregationsfaktor. Ist dieser Faktor erhöht, liegt sehr wahrscheinlich eine Verklumpung der Zellen vor und die Zellen sollten resuspendiert und gegebenenfalls noch einmal verdünnt werden bevor eine erneute Messung erfolgt. Während der Messung wird das Signal hochfrequent abgetastet und sowohl die Amplitude als auch der Signalverlauf werden erfasst. Aus mehreren Einzelmessungen wird das Integral gebildet, welches Aufschluss über Parameter wie Gesamtzellzahl, Vitalität und das Zellvolumen gibt.

Bevor eine Zelllinie das erste Mal mit dem CASY-Gerät gemessen werden kann, muss eine Eichung auf die Größe der Zellen einer bestimmten Zelllinie vorgenommen werden. Dies geschieht, indem man gezielt abgetötete Zellen misst und mit lebenden Zellen vergleicht, beziehungsweise die Größen-Parameter für tote und lebende Zellen festlegt. Sind diese Parameter definiert, kann die eigentliche Messung vorgenommen werden.

Pro verwendeter Behandlung und Inkubationszeit wurden zwei Gewebekulturschalen gewählt. Für jeden zu untersuchenden Ansatz wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Dafür wurde der Mediumüberstand der Zellkulturschalen in ein 50 ml Gefäß überführt und durch 20-faches Auf- und Abpipettieren suspendiert um zusammenhängende Zellen zu vereinzeln. Jeweils 100 µl der in 10 ml CASY[®]ton-Lösung verdünnten Zellsuspension wurden für die Messungen eingesetzt.

4.3.2 Kernfärbung mit dem Farbstoff HOECHST 33258

Neben dem Verlassen des Zellverbandes ist die Kondensation und Fragmentierung der Zellkerne ein weiteres Merkmal der Apoptose. Um den Zustand der Zellkerne quantitativ und qualitativ beurteilen zu können, wurden die einzelnen Zellen und Langerhans-Inseln nach entsprechender Behandlung und Inkubationszeit fixiert und die Zellkerne mit dem Farbstoff HOECHST 33258 gefärbt.

4.3.2.1 Fixierung der Zellen

Die Fixierung der Zellen erfolgte direkt in den Gewebekulturschalen (94 x 16 mm) nach entsprechender Behandlung. Zu Beginn wurde das Kulturmedium abgesaugt, die Zellen kurz mit jeweils 8 ml PBS bei RT gespült und anschließend mit eiskalter 3%-iger Paraformaldehydlösung zur Fixierung für 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurden alle Schalen für 5 min mit ca. 8 ml PBS gewaschen und dann kurz mit bi-destilliertem Wasser gespült. Nach vollständigem Abziehen der Flüssigkeit wurden die Schalen mit Druckluft getrocknet und bis zur Färbung bei Raumtemperatur aufbewahrt.

4.3.2.2 HOECHST 33258-Färbung

Der fluoreszierende Farbstoff HOECHST 33258 kann die Membran passieren und interkaliert in die DNA des Zellkerns. In apoptotischen Zellen kommt es häufig zu einer Veränderung der Kernmorphologie. Apoptotische Zellkerne kondensieren und fragmentieren. In diesen konzentrierteren DNA-Bereichen leuchtet der Fluoreszenzfarbstoff nach Anregung viel heller und stärker. Die Analyse erfolgte über ein Laborlux D-Fluoreszenzmikroskop. Über eine integrierte Kamera (CF20 DXC) konnten die Zellen fotografiert werden. Die Anregung des Farbstoffes erfolgte bei 330-380 nm die Emission lag bei 420 nm. Die qualitative Auswertung erfolgte mikroskopisch, indem in einer definierten Fläche die Zellkerne (Gesamtanzahl der Kerne, Anzahl der apoptotischen Kerne) ausgezählt wurden.

Zunächst wurde die HOECHST-Lösung in entsprechender Menge angesetzt. Für jede zu färbende Schale benötigte man 2 ml. Dazu wurde die HOECHST 33258-Stammlösung (siehe 3.6.6) (1 mg/ml) 1:100 in PBS verdünnt. Die angesetzte HOECHST-Lösung wurde lichtgeschützt aufbewahrt. Die fixierten Zellen wurden kurz mit 8 ml PBS gewaschen. Zur Färbung wurden 2 ml der HOECHST-Lösung pro Schale zugegeben und die Schalen für 20 min in Dunkelheit inkubiert. Die HOECHST-Lösung wurde mit 8 ml PBS abgespült und die Schalen dann für weitere 5 min mit PBS gewaschen, bevor sie kurz mit bi-distilliertem Wasser gespült wurden. Abschließend wurden die Zellen mit vorgewärmter Glyceringelantine (37°C) beschichtet und mit einem runden Deckglas (Ø 50 mm) bedeckt. Da der Farbstoff unter Lichteinwirkung schnell ausbleicht, wurden die Präparate lichtgeschützt aufbewahrt, bevor die Kerne mittels Mikroskop nach Form und Fluoreszenzintensität analysiert wurden..

4.3.2.3 Fixierung und Färbung von isolierten Langerhans-Inseln

Die isolierten Langerhans-Inseln (siehe 4.2.1) wurden nach der Behandlung mit einer Pipette aufgenommen, in ein Reaktionsgefäß überführt und bei 1800 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und das Gewebe mit 1 ml PBS gewaschen (dabei vortexen) und erneut bei 1800 g für 5 min zentrifugiert. Nachdem der Überstand vorsichtig abgenommen wurde, wurden die Inseln in je 1 ml eiskaltem 3% Paraformaldehyd für 10 min auf Eis fixiert. Nach einer Zentrifugation bei 1800 g für 5 min wurde die Paraformaldehyd-Lösung vorsichtig mit der Pipette abgenommen und die Insel-Zellen erneut in je 1 ml PBS gewaschen. Auch die Färbung wurde in dem Reaktionsgefäß durchgeführt. Nach erneuter Zentrifugation wurde das PBS abgenommen und die Langerhans-Inseln zur Färbung für 20 min in je 55 µl HOECHST 33258-Lösung (1 mg/ml Stammlösung, 1:100 in PBS verdünnt) lichtgeschützt inkubiert. Es wurde erneut bei 1800 g für 5 min zentrifugiert, die HOECHST-Lösung abgenommen und die Inseln wiederholt in PBS gewaschen. Abschließend wurden die Langerhans-Inseln nach einer Zentrifugation bei 1800 g für 5 min

in die Mitte der Kulturschale überführt, das Reaktionsgefäß mit 50 µl PBS gespült und die Lösung mit eventuell im Gefäß verbliebenen Inseln ebenfalls in die Kulturschale gegeben und kurz gewartet das sich die Inseln absetzen. Es folgt das Eindecken mit vorgewärmter Glyceringelantine (37°C) und runden Deckgläsern (Ø 50 mm). Damit die Langerhans-Inseln nicht zerdrückt wurden, wurden Knetmassefüßchen unter dem Deckglas angebracht.

4.3.3 Aktivitätsbestimmung von Caspase-Enzymen

Während der Apoptose werden verschiedene Caspasen aktiviert. Dabei handelt es sich je nach Zeitpunkt in der Signalkaskade um Initiator- oder Effektor-Enzyme, welche zu einem kontrollierten Abbau von Zellbestandteilen wie Actin, Laminin und DNA führen. Über verschiedene Signalwege können unterschiedliche Caspasen aktiviert werden, die zum Zelltod führen. Die Aktivitätsbestimmung dieser Enzyme kann Hinweise darüber geben, über welchen Signalweg die Apoptose eingeleitet wurde.

Nach Behandlung der Zellen mit E2 beziehungsweise der Lösungsmittelkontrolle und nach entsprechender Inkubationszeit wurden die Caspaseaktivitäten bestimmt. Für die Aufarbeitung wurden die Zellen, mitsamt Kulturmedium, mit einer Pipette durch Spülen vom Schalenboden abgelöst und in ein 50 ml Gefäß überführt. Nach einer Zentrifugation bei 4°C und 500 g für 6 min wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 1 ml PBS resuspendiert. 500 µl der Zellsuspension wurden in ein vorgekühltes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 4°C und 208 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 1 ml Lysispuffer (siehe 3.6.7.1) resuspendiert und für 10 min bei 37°C im Heizblock inkubiert. Während dieser Inkubationszeit erfolgte regelmäßiges Vortexen der Proben. Nach einer Zentrifugation des Zell-Lysates bei 4°C und 1931 g für 10 min wurde der Überstand in ein neues vorgekühltes Reaktionsgefäß überführt, 100 µl für die spätere Proteinbestimmung abgenommen, und der Rest zur Aktivitätsmessung der Caspasen eingesetzt.

Die Enzymaktivität wurde über eine Fluoreszenzmessung bestimmt. Caspasen sind hochspezifische Enzyme die isoformspezifisch eine bestimmte Peptidsequenz in Proteinen erkennen und an dieser Stelle die Peptidbindung spalten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Caspaseaktivität anhand fluoreszenzmarkierter 7-Amino-4-Trifluormethyl-Coumarin-Gruppen (AFC) bestimmt. Es kamen Caspase-spezifische AFC-markierte Substrate zum Einsatz (siehe Tabelle 5), die von der jeweiligen Caspase erkannt und gespalten werden. Dabei wird die Fluoreszenz-aktive AFC-Gruppe freigesetzt. Die Fluoreszenzintensität kann anschließend fluorimetrisch (Wallac Victor 1420) gemessen werden und gibt Aufschluss über die jeweilige Enzymaktivität.

Tabelle 5: Eingesetzte Verdünnungen der verwendeten Caspase-Substrate.

| Caspase | Substrat | Endverdünnung des Substrates | Eingesetzte Menge Substrat-Mix |
|---------|-------------------------------|------------------------------|--------------------------------|
| 3 | Ac-Asp-Glu-Val-Asp-(DEVD)-AFC | 1:200 | 50 µl |
| 8 | Ac-Ile-Glu-Thr-Asp-(IETD)-AFC | 1:50 | 25 µl |
| 9 | Ac-Leu-Glu-His-Asp-(LEHD)-AFC | 1:10 | 10 µl |
| 12 | Ac-Ala-Thr-Ala-Asp-(ATAD)-AFC | 1:20 | 5 µl |

Die Caspase-Substrate wurden als 10 mM Stammlösung (Caspase 12 als 1 mM Stammlösung) in DMSO gelöst bei -20°C gelagert und erst direkt vor Gebrauch lichtgeschützt aufgetaut. Für die Messung wurde ein Substrat-Mix in Lysispuffer (siehe 3.6.7.1) angesetzt und in entsprechender Menge (siehe Tabelle 5) in 96er-well-Platten eingesetzt. Die zu untersuchende Probe plus den Substrat-Mix ergaben zusammen ein Gesamtvolumen von 100 µl pro Ansatz.

Die Messung des Fluoreszenzanstiegs über die Zeit und damit die Bestimmung der Caspase-Aktivität erfolgte mit einem Fluorometer Wallac Victor 1420. Es erfolgten 8 Doppelmessungen im Abstand von 20 Minuten bei einer Messzeit von je 2 Sekunden. Die Anregung erfolgte bei 390 nm, die Emission bei 510 nm. Caspase 3, 8 und 9 wurden durchgehend bei Raumtemperatur gemessen, bei Caspase 12 wurde die Platte zwischen den einzelnen Messungen, wie vom Hersteller vorgeschrieben, bei 37°C inkubiert. Zur Ermittlung der unspezifischen Fluoreszenz wurde ein „Leerwert“ bestimmt. Hier wurde anstatt der zu untersuchenden Probe die entsprechende Menge an Lysepuffer eingesetzt. Dieser Leerwert wurde zur Auswertung der Daten von allen Werten abgezogen. Die erhaltenen Ergebnisse gaben den Anstieg der Fluoreszenz über die gemessene Zeit (insgesamt 160 min) an. Um verschiedene Messungen miteinander vergleichen zu können, wurde dieser Steigungswert auf den Proteingehalt der jeweiligen Probe bezogen (Proteinbestimmung siehe 4.5).

4.4 Radioligandenbindungsstudien

Ein Radioligand ist eine mit einem Radionuklid markierte Substanz, welche als Ligand an ein Zielprotein, beispielsweise einen Rezeptor, binden kann. Die über die radioaktive Markierung des Liganden erreichte Detektierbarkeit der Substanz macht Radioligandenbindungsstudien zu einer Standardmethode bei der Untersuchung von Rezeptoren. Über die Analyse der Rezeptor-Liganden-Interaktion lassen sich Rezeptoren identifizieren, isolieren und charakterisieren. In dieser Arbeit wurden Gleichgewichtsexperimente durchgeführt, das bedeutet, nach einer definierten Zeitspanne liegen Assoziation und Dissoziation des Rezeptor-Liganden-Komplexes im Gleichgewicht vor. Somit gilt das Massenwirkungsgesetz. Der Zeitraum, nach dem keine Änderung der Bindung mit der Zeit mehr beobachtet werden

kann, wird in dieser Arbeit als Inkubationszeit eingesetzt. Gleichgewichtsexperimente können in Sättigungs- und Konkurrenzexperimente unterschieden werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Konkurrenzexperimente zur Untersuchung des membranständigen Sulfonylharnstoffrezeptors 1 durchgeführt. Das Rezeptormaterial wurde aus stabil, mit dem Expressionsvektor pcDNA3.1, welcher die cDNA für SUR1 enthält, transfizierten HEK293-Zellen durch Membranaufarbeitungen (siehe 4.1.5) gewonnen.

4.4.1 Konkurrenzexperimente

Bei dieser Art des Gleichgewichtsexperimentes konkurrieren markierter und unmarkierter Ligand um dieselbe Bindungsstelle am Rezeptor. Die Verdrängung kann direkt kompetitiv an der Bindungsstelle erfolgen, oder es kommt durch die Bindung des einen Liganden zu einer allosterischen Hemmung der Bindung des zweiten Liganden. In den Konkurrenzexperimenten wird zur konstanten Rezeptorkonzentration und zur konstanten Konzentration des Radioliganden eine zunehmend höhere Konzentration des unmarkierten Liganden (= Inhibitor) gegeben. Anschließend wird die Konzentration des Rezeptor-Liganden-Komplexes bei entsprechender Inhibitorkonzentration gemessen. Verschiedene Informationen wie z.B. die Konzentration des Inhibitors die zur halbmaximalen Verdrängung (IC_{50} -Wert) benötigt wird, oder das Ausmaß der Hemmung (Amplitude) können aus diesen Experimenten gewonnen werden (Hiller, 2005).

4.4.2 Eingesetzter Radioligand: ^3H -Glibenclamid

Als radioaktiver Marker wurde in dieser Arbeit Tritium (^3H) verwendet. Tritium ist ein natürlich vorkommendes Isotop von Wasserstoff. Da Tritium 3 Protonen im Verhältnis zu einem Elektron aufweist, wird Tritium aufgrund seiner Masse auch als überschwerer Wasserstoff bezeichnet (Mortimer, 2001). Die spezifische Aktivität von Tritium mit 30-50 Ci/mmol ist vergleichsweise gering, jedoch liegt mit 12,26 Jahren eine längere Halbwertszeit vor. Im Vergleich dazu liegen die Halbwertszeiten von ^{35}S bei 87,51Tagen und von ^{125}I bei 59,39 Tagen.

Von Glibenclamid (GBC) ist bekannt, dass dieser Sulfonylharnstoff an den SUR bindet. GBC bindet an die SUR1-Isoform deutlich stärker als an die SUR2-Isoformen (Hambrock, 1998, 2002; Schwanstecher, 1998).

Der radioaktiv markierte Sulfonylharnstoff ^3H -GBC wurde von uns bei der Firma PerkinElmer Life Science (USA) mit einer spezifischen Aktivität von 34-53 Ci/mmol in Ethanol gelöst bezogen.

4.4.3 Durchführung der Radioligandenbindungsstudien

Die Bindungsexperimente wurden an Membranpräparationen aus HEK293-Zellen durchgeführt. Bei den Konkurrenzversuchen handelt es sich um heterologe

Verdrängungsversuche, das bedeutet, der markierte Ligand $^3\text{H-GBC}$ ist nicht identisch mit der Substanz des Verdränger-Liganden. In den Versuchen wurden die totale Bindung (B_{tot}) und die Nicht-Spezifische Bindung (B_{NS}) ermittelt und daraus die Spezifische Bindung (B_{S}) errechnet.

Die Membranpräparationen wurden direkt vor dem Versuch aus dem -80°C Gefrierfach entnommen und nach dem Antauen zu der gewünschten Menge an Inkubationspuffer (siehe 3.6.10.1) gegeben. In noch halbgefrorenem Zustand wurde das Membran-Inkubationspuffer-Gemisch mit dem Ultra-TURRAX auf Stufe 6 homogenisiert und bis zum Versuch auf Eis aufbewahrt. Vor Versuchsbeginn wurde bereits ein Teil des Membran-Inkubationspuffer-Gemisches zur Proteinbestimmung bei -20°C eingefroren (siehe auch Kapitel 4.5).

Für die Ermittlung von B_{tot} und B_{NS} wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt. Nachfolgend ist das Pipettierschema zur Vorbereitung der Versuchsansätze dargestellt.

Tabelle 6: Pipettierschema für Radioligandenbindungsstudien- als Beispiel Konkurrenzexperiment mit Tamoxifen als Inhibitor. In Klammern ist die jeweilige Konzentration im Ansatz aufgeführt.

| B_{tot}: | Radioaktivität ohne Inhibitor (Summe aus spezifischer und unspezifischer Bindung) | B_{NS}: | max. Inhibitorkonzentration | Inhibitor-Konzentrations Reihe: |
|--|---|--|--|--|
| 10 μl Ethanol/DMSO | 25 μl $^3\text{H-GBC}$ (40 nM) | 10 μl GBC 1 mM (10 μM) | 25 μl $^3\text{H-GBC}$ (40 nM) | 10 μl Tamoxifen |
| 2,2 μl MgCl_2 , 1 M (2,2 mM) | 10 μl Na_2ATP , 100 mM (1 mM) | 2,2 μl MgCl_2 , 1 M (2,2 mM) | 2,2 μl MgCl_2 , 1 M (2,2 mM) | 2,2 μl MgCl_2 , 1 M (2,2 mM) |
| 852,8 μl Inkubationspuffer | 100 μl Protein | 10 μl Na_2ATP , 100 mM (1 mM) | 100 μl Inkubationspuffer | 10 μl Na_2ATP , 100 mM (1 mM) |
| $\Sigma = 1000 \mu\text{l}$ | | $\Sigma = 1000 \mu\text{l}$ | | 852,8 μl Inkubationspuffer |
| | | | | 100 μl Protein |
| | | | | $\Sigma = 1000 \mu\text{l}$ |

Inkubationspuffer, MgCl_2 und Na_2ATP wurden direkt vor Versuchsbeginn als Mastermix angesetzt. In allen Versuchen wurde die Inkubationszeit mit der Zugabe der Membranpräparation (= Protein) gestartet. Die Inkubationszeit für $^3\text{H-GBC}$ von 15 min wurde bereits vor Beginn dieser Arbeit ermittelt und erfolgte in einem Wasserbad oder einem Heizblock bei 37°C . Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden Radioligand-Rezeptor-Komplex und ungebundener Radioligand durch Filtration voneinander getrennt. Dazu wurden aufeinander folgend drei Aliquotes von jeweils 300 μl mithilfe einer Vakuumpumpe über

einen GF/B-Filter (Whatman, Porengröße 1 µmol/l) gesaugt. Um die verbliebenen Membranen mit gebundenem Radioliganden vollständig vom ungebundenen Liganden zu trennen, wurde jeweils 4-mal mit 4 ml eiskaltem Waschpuffer (siehe 3.6.10.2) gespült. Auf diese Weise wurde jeder Messpunkt dreifach bestimmt. Die Filter wurden direkt nach der Filtration in ein Szintillationsgefäß (20 ml) gegeben. Zusätzlich wurden von jeder Probe 20 µl direkt entnommen und in ein Szintillationsgefäß gegeben, um die Totalaktivität des Ansatzes zu bestimmen. Nach der Filtration aller Proben wurden zu jedem Szintillationsgefäß 5 ml Szintillationsflüssigkeit (Ultima-Gold) gegeben und die Anzahl der Zerfälle des Radioliganden in einem Szintillationszähler (Liquid Szintillation Analyzer 2550 TriCarb) ermittelt. Aus den Ergebnissen der drei Einzelmessungen jeder einzelnen Probe wurde zur weiteren Auswertung der Mittelwert der radioaktiven Zerfälle pro Minute für diese Probe bestimmt.

4.4.4 Bestimmung der Radioaktivität

Der Szintillationszähler erfasst die radioaktiven Zerfälle pro Minute (dpm), diese Ergebnisse können nach folgender Gleichung in molare Konzentrationen umgerechnet werden:

$$c \text{ [mol/l]} = \frac{\text{ermittelte dpm}}{2,2 \cdot 10^{12} \text{ [dpm/ Ci]} * SA \text{ [Ci/ mmol]} * V \text{ [ml]}} \quad \text{Gleichung (1)}$$

c = Konzentration in mol/l

1 Curie (Ci) = $2,2 \cdot 10^{12}$ dpm

SA = spezifische Aktivität des Radioliganden in Ci/ mmol

V = Volumen des filtrierten Aliquots (0,3 ml)

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen handelt es sich wie in Abschnitt 4.4 beschrieben um Gleichgewichtsexperimente, daher gilt das Massenwirkungsgesetz (4.4.4.1).

4.4.4.1 Das Massenwirkungsgesetz

Die Inkubationsdauer wurde so gewählt, dass die Bildung eines Radioliganden-Rezeptor-Komplexes mit der Dissoziation des Komplexes im Gleichgewicht liegt. Es gilt:



R = freier Rezeptor (mol/l)

L = freier Ligand (mol/l)

RL = Rezeptor-Liganden-Komplex (mol/l)

Im Gleichgewicht gilt das Massenwirkungsgesetz:

$$K_D [\text{mol/l}] = \frac{R * L}{(RL)} \quad \text{Gleichung (3)}$$

Dabei ist K_D die Dissoziationskonstante im Gleichgewicht. Diese ist im Idealfall die Ligandenkonzentration, bei welcher die freie Rezeptorkonzentration der Konzentration des Rezeptor-Liganden-Komplexes entspricht. Da während der Messung nicht zwischen freiem Liganden und Liganden im Komplex unterschieden wird, werden die totalen Liganden-Konzentrationen bestimmt. Es gelten die Erhaltungsgleichungen:

$$R_0 = R + (RL) \text{ und } L_0 = L + (RL) \quad \text{Gleichung (4)}$$

R_0 = totale Rezeptorkonzentration

L_0 = totale Ligandenkonzentration

Dadurch gilt für die Ermittlung des K_D -Wertes, unter Berücksichtigung von Gleichung 3 und Gleichung 4, folgende Gleichung:

$$K_D [\text{mol/l}] = \frac{(R_0 - (RL)) * (L_0 - (RL))}{(RL)} \quad \text{Gleichung (5)}$$

Allgemein gilt, dass die gesamte (= totale) Bindung eines Radioliganden (B_{tot}) sowohl die spezifische Bindung (B_S) als auch die Nicht-spezifische Bindung (B_{NS}) enthält. B_{NS} wird gesondert bestimmt, indem ein Überschuss an unmarkierten Liganden so eingesetzt wird, dass der Radioligand aus B_S nicht jedoch B_{NS} verdrängt wird. Es gilt die Gleichung:

$$B_S = B_{\text{tot}} - B_{\text{NS}} = (RL) \quad \text{Gleichung (6)}$$

4.4.5 Auswertung von Konkurrenzexperimenten

Konkurrenzexperimente werden meistens so angelegt, dass die totale Ligandenkonzentration viel größer ist, als die totale Rezeptorkonzentration. Dies bedeutet, dass experimentell stets weniger als 5 % des Radioliganden gebunden vorliegen sollte.

$$R_0 \ll L_0 \text{ und damit: } L_0 \approx L \quad \text{Gleichung (7)}$$

Dadurch lässt sich Gleichung 5 wie folgt vereinfachen und umformen:

$$K_D [\text{mol/l}] = \frac{R_0 - (RL) * L_0}{(RL)} \quad \text{Gleichung (8)}$$

$$(RL)[\text{mol/l}] = \frac{R_0 * L_0}{K_D + L_0} \quad \text{Gleichung (9)}$$

Über eine nicht lineare Regression können K_D und R_0 ermittelt werden.

Bei einem Konkurrenzexperiment misst man die Bindung des Radioliganden bei steigender Konzentration des Inhibitors. Sowohl Radioligand als auch Inhibitor werden im Überschuss eingesetzt. Die freie Konzentration von beiden entspricht dabei annähernd der totalen Konzentration. Es gilt folgendes Reaktionsschema:



mit:

I = Konzentration des Inhibitors (mol/l)

R = Rezeptorkonzentration (mol/l)

L = (Radio)ligandenkonzentration (mol/l)

(IR) = Konzentration des Inhibitor-Rezeptor-Komplexes (mol/l)

(RL) = Konzentration des Rezeptor-Liganden-Komplexes

Dabei konkurrieren Inhibitor und Radioligand um eine konstante Anzahl an Rezeptoren. Mit steigender Inhibitorkonzentration kommt es im Experiment zu einer Abnahme des Rezeptor-Liganden-Komplexes. In der Auswertung wird dies durch eine charakteristische Hemmkurve angezeigt. Bei diesen Versuchen gilt es, neben der Dissoziationskonstante K_D für die Ligandenbindung, auch die inhibitorische Dissoziationskonstante K_i für die Bindung des Inhibitors an den Rezeptor zu berücksichtigen. Damit gilt nach dem Massenwirkungsgesetz:

$$K_D [\text{mol/l}] = \frac{R \cdot L}{(RL)} \quad \text{und} \quad K_i [\text{mol/l}] = \frac{R \cdot I}{(RI)} \quad \text{Gleichung (11)}$$

Der K_i -Wert gilt dabei als Maß für die Affinität des Verdrängers zum untersuchten Rezeptor. Da sowohl Ligand als auch Inhibitor im Überschuss eingesetzt werden müssen auch hier (wie bei Gleichung 4) die Erhaltungsgleichungen gelten:

$$R_0 = R + (RL) + (RI) \qquad \text{Gleichung (12)}$$

Nun kann das Verhältnis von Liganden-Rezeptor-Komplex zur Anzahl an Rezeptoren wie folgt beschrieben werden:

$$\frac{(RL)}{R_0} = \frac{(RL)}{R + (RL) + (RI)} \quad \text{Gleichung (13)}$$

Ersetzt man nun (RL) und (RI) unter Berücksichtigung von Gleichung 11 ergibt sich:

$$\frac{(RL)}{R_0} = \frac{L}{K_D} * \frac{K_i}{K_i * (1 + (L/K_D)) + I} \quad \text{Gleichung (14)}$$

Aus weiteren Umformungen ergibt sich zur Berechnung von (RL) folgende Gleichung:

$$(RL) = R_0 * \underbrace{\frac{L}{K_D}}_{\text{Term 1}} * \underbrace{\frac{1}{1+(L/K_D)} * \frac{K_i * (1 + (L/K_D))}{K_i * (1 + (L/K_D)) + I}}_{\text{Term 2}} \quad \text{Gleichung (15)}$$

Term 1 entspricht hier der Bindung des markierten Liganden an den Rezeptor in Abwesenheit des Inhibitors. Term 2 beschreibt die Abnahme der freien Rezeptoren mit steigender Konzentration des Inhibitors und hat graphisch die Form einer Hyperbel. Der Term $K_i * (1 + (L/K_D))$ gibt den Mittelpunkt der Kurve an, bei welchem die inhibitorische Inhibitor-Konzentration 50 % der Kurvenamplitude entspricht. Nach Cheng und Prusoff (Cheng, 1973) wird der Term $K_i * (1 + (L/K_D))$ auch IC_{50} genannt. Daher kann man über den IC_{50} -Wert die Affinität des Inhibitors zum Rezeptor wie folgt ermitteln:

$$K_i = IC_{50} / (1 + (L/K_D)) \quad \text{Gleichung (16)}$$

Setzt man den IC_{50} -Wert in Gleichung 15 ein, so erhält man:

$$(RL) = (RL)_{(0)} * \frac{IC_{50}}{IC_{50} + I} \quad \text{Gleichung (17)}$$

Durch Logarithmieren erhält man folgende Gleichung:

$$(RL) = \frac{(RL)_{(0)}}{1 + 10^{pIC_{50} - pl}} \quad \text{Gleichung (18)}$$

Dabei ist $-\log IC_{50} = pIC_{50}$ und $-\log I = pl$.

Der Kurvenverlauf, ob steiler oder flacher, gibt einen Hinweis auf die Komplexität des Bindungsverhaltens. Als Maß für die Steilheit der Kurve kann der Hill-Koeffizient (n_H) betrachtet werden. Bei einer einfachen Bindung, bei der die einzelnen Bindestellen nicht miteinander interagieren, ist der Hill-Koeffizient = 1. Wird dieser Koeffizient in die Berechnung einbezogen, ergibt sich folgende Gleichung:

$$(RL) = \frac{(RL)_{(0)}}{1 + 10^{n_H(pIC_{50} - pl)}} \quad \text{Gleichung (19)}$$

Der Hill-Koeffizient ermöglicht folgende Einteilung der Radioligandenbindung:

- $n_H = 1$: Es liegt nur eine Klasse von Bindungsstellen vor, welche nicht miteinander interagieren.
- $n_H > 1$: Vorkommen von positiver Kooperativität, das heißt, mehrere Ligandenmoleküle binden mit steigender Affinität an den Rezeptor.
- $n_H < 1$: Hinweis auf negative Kooperativität oder die Membran enthält verschiedene Rezeptoren mit ähnlicher Affinität zum Liganden.

Wie bereits zu Beginn dieses Kapitels (4.4.4) erwähnt, wurden die aus den Messungen erhaltenen Ergebnisse (dpm) in molekulare Konzentrationen umgerechnet. Zuvor wurden die dreifach bestimmten Werte für einen Messpunkt gemittelt. Die spezifische Bindung ($B_S = (RL)$) wurde durch Differenzbildung von B_{tot} und der nicht-spezifischen Bindung (B_{NS}) ermittelt (siehe Gleichung 6). Um einzelne Versuche besser miteinander vergleichen zu können, wurden die einzelnen Messpunkte normiert, indem die B_S -Werte in % angegeben wurden. Hier entsprach B_{tot} dem Wert bei 100 %. Um eine Verdrängungskurve zu erhalten, wurde B_S (%) gegen den negativ dekadischen Logarithmus der steigenden Inhibitorkonzentration aufgetragen. Die Kurven haben ihr Maximum meist in Abwesenheit des Inhibitors. Bindet der Ligand nur an eine bestimmte Rezeptor-Bindestelle, spricht man von einer monophasischen Bindungskurve. In diesem Fall liegt nur ein Kurvenmaximum bzw. –minimum vor. Hier gilt die Gleichung:

$$f = b + \frac{(a - b)}{1 + 10^{n_H(x-k)}} \quad \text{Gleichung (20)}$$

Mit:

b = Kurvenmaximum (= 100 %)

a = Kurvenminimum (festgelegt $a > 0$), somit ergibt $b - a$ die Amplitude der Kurve

x = negativ dekadischer Logarithmus der Inhibitorkonzentration

k = negativ dekadischer Logarithmus des IC_{50} -Wertes

n_H = Hill-Koeffizient

Bindet der Ligand an zwei Typen von Bindungsstellen und die Kurve weist mehr als ein Kurvenmaximum und –minimum auf, spricht man von einer biphasischen Bindungskurve. Dies ist der Fall, wenn n_H deutlich unter 1 liegt ($n_H < 0,6$). Hier sollte folgende Gleichung als Fit eingesetzt werden:

$$f = b - \frac{a1}{1 + 10^{(x-k1)}} - \frac{a2}{1 + 10^{(x-k2)}} \quad \text{Gleichung (21)}$$

Dabei entsprechen $a1$ und $a2$ den Amplituden der zwei Kurvenbestandteile und $k1$ und $k2$ den jeweiligen pIC_{50} -Werten.

Die Kurven wurden mithilfe des Programms SigmaPlot 11.0 unter Vorgabe der Gleichungen 20 beziehungsweise 21 aus den Messpunkten erstellt. Aus den Kurven konnten der $pI_{C_{50}}$ -Wert sowie das Kurvenminimum (a) mittels nichtlinearer Regression ermittelt werden. Aus diesen Parametern kann die Amplitude der Kurve und über Gleichung 16 der K_i -Wert ermittelt werden.

4.5 Proteinbestimmung nach Bradford

Für die Versuche zur Aktivitätsbestimmung der Caspase-Enzyme aus Zellen (4.3.3) und den Radioligandenbindungsstudien an Zellmembranen (4.4) wurde die eingesetzte Proteinmenge als Bezugsgröße verwendet. Die photometrische Bestimmung der Proteinmenge erfolgte gemäß der Methode von Bradford (Bradford, 1976). Das Absorptionsmaximum liegt bei ungebundenem Farbreagenz (Assay Dye Reagent, BioRad) bei 465 nm und bei an Proteine gebundenem Farbreagenz bei 595 nm und konnte mit Hilfe des Photometers (Microplate Reader 5000/7000, Dynatech) detektiert werden. Um eine genaue Bestimmung der Proteinkonzentration zu gewährleisten, musste eine Eichung mittels „Standardprotein“ durchgeführt werden. Hierzu wurde eine Rinderserum-Albumin-(BSA) Konzentrationsreihe angesetzt, die bei jeder Messung mit vermessen wurde. BSA eignet sich in diesem Fall als Standard, da es eine ähnliche Zusammensetzung an sauren und basischen Aminosäuren aufweist, wie die zu untersuchenden Proteine. Nachfolgend ist das Pipettierschema zum Ansetzen der Standardreihe am Beispiel der verdünnten BSA-Lösungen die für die Proteinbestimmung an Membranen eingesetzt wurde, aufgeführt.

Tabelle 7: Pipettierschema zum Ansetzen der BSA-Standard Proteinreihe für Versuche an Membranen *.

| Proteinkonzentration der Standardlösung [$\mu\text{g/ml}$] | Eingesetzte Menge an BSA (1 mg/ml) [μl] | Eingesetzte Menge an Inkubationspuffer [μl] | Eingesetzte Menge an Aqua bidest. [μl] |
|--|---|--|--|
| 0 | - | 200 | 800 |
| 10 | 10 | 200 | 790 |
| 20 | 20 | 200 | 780 |
| 30 | 30 | 200 | 770 |
| 40 | 40 | 200 | 760 |
| 60 | 60 | 200 | 740 |
| 80 | 80 | 200 | 720 |
| 100 | 100 | 200 | 700 |
| 120 | 120 | 200 | 680 |
| 150 | 150 | 200 | 650 |

*Für Versuche mit Zellen wurde die Standardreihe entsprechend mit den BSA-Konzentrationen 0, 25, 50, 75, 100, 125, 150 und 200 $\mu\text{g/ml}$ angesetzt.

Es war darauf zu achten, dass die BSA-Standardreihe denselben Anteil des entsprechenden Puffers aufweist, wie die zu untersuchende Proteinlösung. Im Fall der

Radioligandenbindungsstudien war dies der Inkubationspuffer (3.6.10.1), bei den Caspaseversuchen handelt es sich um den Lysepuffer (3.6.7.1). Die Standardreihen können mehrfach verwendet werden und wurden bei -20°C gelagert.

Zu 50 µl BSA-Standard beziehungsweise Probe wurden jeweils 375 µl H₂O und 75 µl Farbreagenz gegeben. Dazu wurde ein Mastermix mit H₂O und Farbreagenz in entsprechender Menge angesetzt und davon rasch 450 µl zu jeder Probe dazu gegeben. Die Inkubationszeit von 30 min wurde ab dem Zeitpunkt der Mastermix Zugabe gemessen. Jede Probe wurde durch Vortexen gut gemischt.

Anschließend wurden je 200 µl nach erneutem Vortexen in eine 96-well Platte überführt und die Farbtintensitäten mit einem Photometer bestimmt. Als Negativkontrolle wurden im Doppelansatz 200 µl H₂O mitgeführt.

Tabelle 8: Pipettierschema zum Auftragen der Proben auf eine 96-well-Platte, zur photometrischen Proteinbestimmung.

| | | | | | | | | | | | |
|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| A1 | A2 | A3 | A4 | A5 | A6 | A7 | A8 | A9 | A10 | A11 | A12 |
| Aaqua bidest. | Aaqua bidest. | Standard 1 | Standard 1 | Standard 2 | Standard 2 | Standard 3 | Standard 3 | Standard 4 | ... | ... | ... |
| B1 | B2 | B3 | B4 | B5 | B6 | B7 | B8 | B9 | B10 | B11 | B12 |
| ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | Probe 1 1. Wert | Probe 1 2. Wert |
| C1 | C2 | C3 | C4 | C5 | C6 | C7 | C8 | C9 | C10 | C11 | C12 |
| Probe 2 1. Wert | Probe 2 2. Wert | Probe 3 1. Wert | Probe 3 2. Wert | Probe 4 1. Wert | Probe 5 2. Wert | Probe 6 1. Wert | Probe 7 2. Wert | Probe 7 1. Wert | Probe 8 2. Wert | ... | ... |

Die Werte der Standardreihe wurden in Doppelansätzen pipettiert und vermessen.

Anschließend wurden die Doppelwerte gemittelt und für die Berechnung der Standardkurve verwendet. Die Konzentration jeder Probe wurde anhand von Dreifachbestimmungen im Doppelansatz ermittelt. Diese 3 Werte für einen Messpunkt, beziehungsweise eine Probe, wurden anschließend gemittelt und der Mittelwert mit Standardabweichung (SEM) angegeben.

5 Ergebnisse

Um die Rolle der regulatorischen Untereinheit SUR1 des pankreatischen K_{ATP} -Kanals, bei der Induktion von Apoptose nach 17β -Estradiolbehandlung näher zu untersuchen, wurden verschiedene apoptotische Parameter analysiert. Als Apoptoseindikatoren diente zum einen die Zellablösung vom Schalenboden (4.3.1), welche als Indikator des Vitalitätsverlustes der Zellen betrachtet wurde. Zum anderen die direkten Apoptoseparameter wie die Veränderung der Nukleus-Morphologie (4.3.2) sowie die Aktivität verschiedener Caspasen (4.3.3). Die Auswertung dieser unterschiedlichen Parameter zeigte eine direkte Korrelation zwischen der Apoptoserate und der Expression der regulatorischen SUR1-Untereinheit. In der vorliegenden Arbeit lag dabei der Schwerpunkt auf der Untersuchung, welche direkten Auswirkungen unterschiedliche SUR1-Punktmutationen auf die Apoptoserate in rekombinanten Zellsystemen haben. Hierfür wurden in der Literatur beschriebene Mutationen analysiert, die in Patienten mit transientem neonatalem Diabetes mellitus (Patch et al., 2007) entdeckt wurden und für welche eine Steigerung der ATP-Hydrolyserate beschrieben wurde [SUR1(R1379C) und SUR1(R1379L)] (siehe auch Aufgabenstellung). Diese wurden mit Mutationen verglichen, für welche eine Senkung der ATP-Hydrolyserate beschrieben wurde [SUR1(K719R) und SUR1(K1384M)] (de Wet et al., 2007a; de Wet et al., 2007b). Alle untersuchten Mutationen liegen in hochkonservierten Bereichen, den Nukleotid-Bindungsfalten (NBFs), des SUR1.

5.1 Bestimmung der Apoptoserate in Zellen, die SUR1 und SUR1-Mutationen exprimieren nach Behandlung mit E2

Für die Versuche wurden unter anderem stabil transfizierte HEK293-Zellen verwendet. Diese Zellen enthielten entweder cDNA, welche für SUR1 oder entsprechende SUR1-Mutationen (SUR1(K719R), SUR1(K1384M), SUR1(R1379C), SUR1(R1379L)) codierte und in den Expressionsvektor pcDNA3.1(+) inseriert war oder nur den leeren Transfektionsvektor pcDNA. Die Zellen die den leeren Transfektionsvektor enthalten, werden im folgenden Text als pcDNA-Kontrollzellen bezeichnet. Als Lösungsmittelkontrolle zu den Behandlungen mit verschiedenen Substanzen wurde für alle Versuche ein 1:1 Gemisch von DMSO/EtOH (D/E) verwendet.

5.1.1 Bestimmung der Rate der Zellablösung in HEK293-Zellen nach Behandlung mit E2

Um die Anzahl apoptotischer Zellen nach Behandlung mit $100\ \mu\text{M}$ 17β -Estradiol (E2) zu überprüfen, wurden Versuche mit HEK293-Zellen, die den SUR1 beziehungsweise SUR1(NBF-Mutation) exprimieren, durchgeführt. Die Zellen wurden mit einem Konfluenzgrad

von 70-90% für die Versuche eingesetzt. Als möglicher Apoptoseindikator wurde die Zellablösung vom Schalenboden als Maß des Verlustes der Zellvitalität der normalerweise adhären wachsenden HEK293-Zellen verwendet. Nach 24h Inkubation wurde die Zellzahl im Überstand mittels Casy-Zellzählgerät ermittelt (siehe 4.3.1).

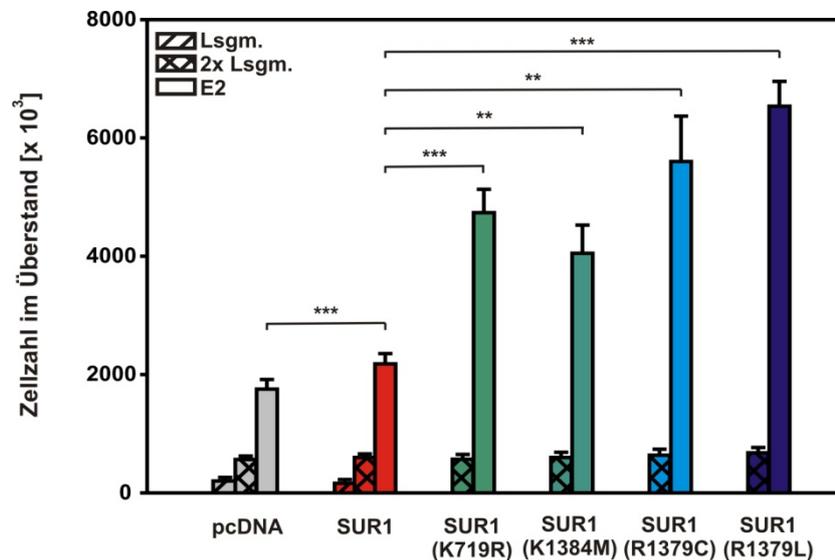


Abb. 1: E2 steigert die Rate der Zellablösung in HEK293-Zellen die eine SUR1-Punktmutante exprimieren. Dargestellt ist die Anzahl der vom Schalenboden abgelösten Zellen nach Behandlung mit 100µM E2. Als Lösungsmittel (Lsgm.) wurde DMSO/EtOH eingesetzt. Die Inkubation erfolgte für 24h. Einfache Lsgm.-Kontrolle n=3, für die zweifach-Lösungsmittelkontrollen und E2 behandelten Zellen gilt n=12-16. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte ± Standardfehler. Eine Oneway ANOVA zeigt keine Unterschiede zwischen den zweifach-Lösungsmittelkontrollen. Die unterschiedlichen Zelllinien wurden mit dem Student-T-Test zweiseitig gepaart (*p<0,05;**p<0,01;***p<0,001) verglichen.

Hierfür wurden mehrere Kontrollen mitgeführt. Als Referenz für das Maß an Steigerung der Apoptoserate dienten HEK293-Zellen, die nur den „leeren“ Transfektionsvektor pcDNA exprimieren (pcDNA-Kontrollzellen). Die gestreiften Balken zeigen die Lösungsmittelkontrolle (DMSO/EtOH), die Balken mit Rautenmuster zeigen den Effekt nach zweifacher Lösungsmittelkontrolle und die Balken ohne Muster zeigen den Effekt nach Behandlung mit 17β-Estradiol. Die zweifache Lösungsmittelkontrolle wurde durchgeführt, da im Laufe dieser Arbeit auch gleichzeitige Behandlungen mit zwei verschiedenen Substanzen erfolgt sind. Die Inkubation erfolgte für 24h. Die Bestimmung der Zellzahl im Überstand zeigt, dass alle E2 behandelten Proben zu entsprechender zweifach-Kontrolle eine signifikant erhöhte Zellablösungsrate (p<0,001) aufweisen. Weiterhin ist die Zellablösungsrate nach Behandlung mit E2 nicht nur in SUR1-exprimierenden Zellen im Vergleich zu den pcDNA-Kontrollzellen signifikant erhöht, sondern auch in Zellen, welche SUR1-Mutanten (SUR1(K719R), SUR1(K1384M), SUR1(R1379C) und SUR1(R1379L)) exprimieren. Alle untersuchten Mutationen zeigen eine deutlich gesteigerte Rate der Zellablösung im Vergleich zu SUR1-exprimierenden HEK293-Zellen.

Tabelle 9.: Wirkung von E2 auf HEK293-Zellen die SUR1 oder eine SUR1-Punktmutante exprimieren. Die Messung der Zellzahl im Überstand als Maß des Adhärenzverlustes erfolgte nach Inkubation mit 100 µM E2 beziehungsweise DMSO/EtOH als Lösungsmittelkontrolle (Lsgm.) für 24h. Untersucht wurden HEK293-Zellen, die SUR1 exprimieren, im Vergleich zu SUR1(K719R), SUR1(K1384M), SUR1(R1379C) und SUR1(R1379L) exprimierenden Zellen. Als Kontrolle dienten pcDNA-Kontrollzellen.

| Behandlung | Gesamtzellzahl im Überstand [$\times 10^3$] | Anzahl der Versuche (n) |
|------------------------|---|-------------------------|
| pcDNA + Lsgm. | 198,8 ± 62,4 | 3 |
| pcDNA + 2xLsgm. | 562,7 ± 59,7 | 13 |
| pcDNA + E2 | 1753,1 ± 163,8 | 16 |
| SUR1 + Lsgm. | 161,9 ± 61,7 | 3 |
| SUR1 + 2xLsgm. | 597,5 ± 60,5 | 13 |
| SUR1 + E2 | 2180,4 ± 173,1 | 16 |
| SUR1(K719R) + 2xLsgm. | 568,1 ± 81,4 | 10 |
| SUR1(K719R) + E2 | 4735,2 ± 396,6 | 10 |
| SUR1(K1384M) + 2xLsgm. | 598,2 ± 86,5 | 10 |
| SUR1(K1384M) + E2 | 4049,1 ± 478,1 | 10 |
| SUR1(R1379C) + 2xLsgm. | 635,1 ± 102,2 | 9 |
| SUR1(R1379C) + E2 | 5601,3 ± 768,4 | 12 |
| SUR1(R1379L) + 2xLsgm. | 675,4 ± 91,3 | 10 |
| SUR1(R1379L) + E2 | 6536,0 ± 420,2 | 10 |

5.1.2 Bestimmung des Ausmaß der veränderten Kernmorphologie in HEK293-Zellen nach Behandlung mit E2

Als weiterer Parameter neben der Zellablösung wurden apoptotische Veränderungen in der Zellkernmorphologie untersucht. Dazu wurden HEK293-Zellen nach einer Behandlung mit E2 (100µM) fixiert und Färbungen mit dem DNA bindenden Farbstoff HOECHST 33258 durchgeführt (siehe 4.3.2). Apoptotische Kerne kondensieren und fragmentieren und erscheinen deshalb unter dem Fluoreszenzmikroskop deutlich heller fluoreszierend als intakte Zellkerne.

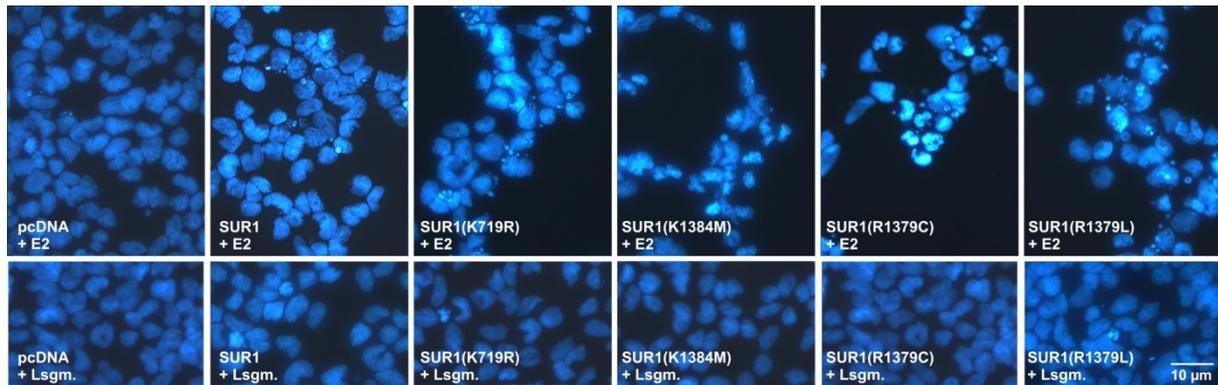


Abb. 9: Gesteigerte Apoptoserate in SUR1 exprimierenden HEK293-Zellen und Zellen die eine SUR1-Punktmutante exprimieren nach Behandlung mit E2. Die Zellen wurden für 24h mit 100 μ M 17 β -Estradiol behandelt. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen nach der HOECHST 33258-Färbung zeigen Kerne nach Lösungsmittel- (kleine Abbildungen) und E2-Behandlung (große Abbildungen).

Alle Zellkulturschalen wurden mit einem Konfluenzgrad von 70-90% eingesetzt. Der Verlust der Adhärenz der E2 behandelten Zellen im Vergleich zu den Zellen, die mit Lösungsmittel behandelt wurden, ist in Abb.9 deutlich zu erkennen. Die fluoreszierenden Kerne und das Ausmaß der freien Stellen am Schalenboden korrelieren gut mit den gemessenen Daten zur Zellablösung (siehe 5.1.1). Die Ergebnisse der mikroskopischen Untersuchungen sind nach einer Quantifizierung in Abb.10 dargestellt.

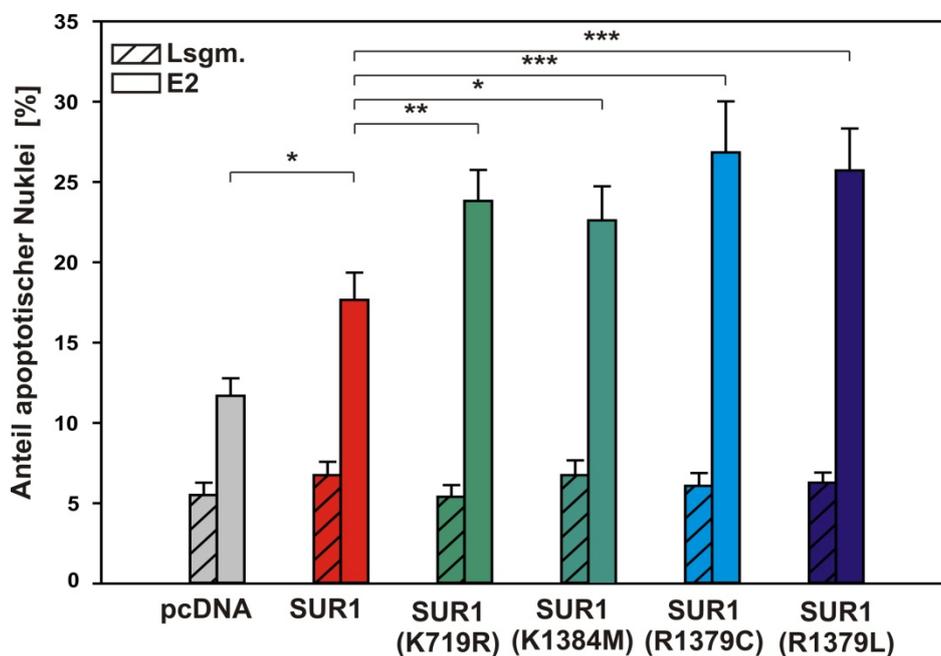


Abb. 10: Steigerung der Rate apoptotisch veränderter Nuklei in SUR1 exprimierenden HEK293-Zellen und Zellen die eine SUR1-Punktmutante exprimieren nach Behandlung mit E2. Abbildung der Ergebnisse aus der Quantifizierung der HOECHST 33258-Färbungen. In der Abbildung ist der prozentuale Anteil apoptotisch veränderter Nuklei nach Behandlung mit E2 graphisch gezeigt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler. Die einzelnen Zelllinien wurden beim direkten Vergleich analysiert über einen Student-t-Test zweiseitig gepaart (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Es gilt für die Behandlung mit 100 μ M 17 β -Estradiol für 24h $n = 8$. Eine Oneway ANOVA zeigt keine signifikanten Unterschiede beim Vergleich aller Zelllinien behandelt mit der Lösungsmittelkontrolle.

Im Vergleich zu den pcDNA-Kontrollzellen ist die Apoptoserate in SUR1 exprimierenden Zellen signifikant erhöht. Eine weitere Steigerung des Effektes ist in Zellen, die SUR1(K719R), SUR1(K1384M), SUR1(R1379C) oder SUR1(R1379L) exprimieren, sichtbar.

Tabelle 10.: Anzahl apoptotisch veränderter Nuklei [%] nach Behandlung von HEK293-Zellen die SUR1 oder eine SUR1-Mutante (SUR1(K719R), SUR1(K1384M), SUR1(R1379C) und SUR1(R1379L)) exprimieren mit E2. Analysiert wurden HEK293-Zellen die SUR1 exprimieren im Vergleich zu SUR1(K719R), SUR1(K1384M), SUR1(R1379C) und SUR1(R1379L) exprimierenden Zellen. Als Kontrolle dienten pcDNA-Kontrollzellen. Die Zellen wurden nach einer 24stündigen Behandlung mit 100 μ M E2 fixiert und der Anteil apoptotisch veränderter Nuklei quantifiziert. Es gilt n=8.

| Behandlung | Anzahl apoptotisch veränderter Nuklei [%] |
|----------------------|---|
| pcDNA + Lsgm. | 5,5 \pm 0,8 |
| pcDNA + E2 | 11,7 \pm 1,1 |
| SUR1 + Lsgm. | 6,8 \pm 0,8 |
| SUR1 + E2 | 17,7 \pm 1,7 |
| SUR1(K719R) + Lsgm. | 5,4 \pm 0,7 |
| SUR1(K719R) + E2 | 23,8 \pm 1,9 |
| SUR1(K1384M) + Lsgm. | 6,8 \pm 0,9 |
| SUR1(K1384M) + E2 | 22,6 \pm 2,1 |
| SUR1(R1379C) + Lsgm. | 6,1 \pm 0,8 |
| SUR1(R1379C) + E2 | 26,8 \pm 3,2 |
| SUR1(R1379L) + Lsgm. | 6,3 \pm 0,6 |
| SUR1(R1379L) + E2 | 25,7 \pm 2,6 |

5.1.3 Bestimmung der Aktivität verschiedener Caspase-Enzyme in HEK293-Zellen nach Behandlung mit E2

Um erste Hinweise auf beteiligte Signalwege bei der Apoptoseinduktion durch 17 β -Estradiol in rekombinanten HEK293-Zellen zu erhalten, wurde die Aktivität verschiedener Caspase-Isoenzyme analysiert (siehe 4.3.3). Caspasen sind Enzyme, die als Initiator oder Effektor direkt am Apoptoseprozess beteiligt sind. Dieser Arbeit vorausgehend konnte in der Arbeitsgruppe bereits gezeigt werden, dass besonders die Aktivität von Caspase 3 und Caspase 9 in SUR1-exprimierenden Zellen nach Behandlung mit 17 β -Estradiol erhöht ist, im Vergleich zu den pcDNA-Kontrollzellen (Ackermann et al., 2009). Nun wurden im Rahmen dieser Arbeit weitere Untersuchungen zu SUR1 und den Mutanten SUR1(R1379C), SUR1(R1379L), SUR1(K719R) und SUR1(K1384M) durchgeführt.

Zunächst wurden die Aktivitäten verschiedener Caspasen nach Behandlung mit 17 β -Estradiol bestimmt. Die Caspase-Aktivität wurde fluorometrisch ermittelt und ergibt sich

aus einer Steigerung der Caspase-Aktivität (Substratumsetzung) über die Zeit, bezogen auf die eingesetzte Proteinmenge.

Dies wurde in SUR1- und, exemplarisch für die NBF-Mutanten, in SUR1(R1379C) exprimierenden HEK293-Zellen untersucht.

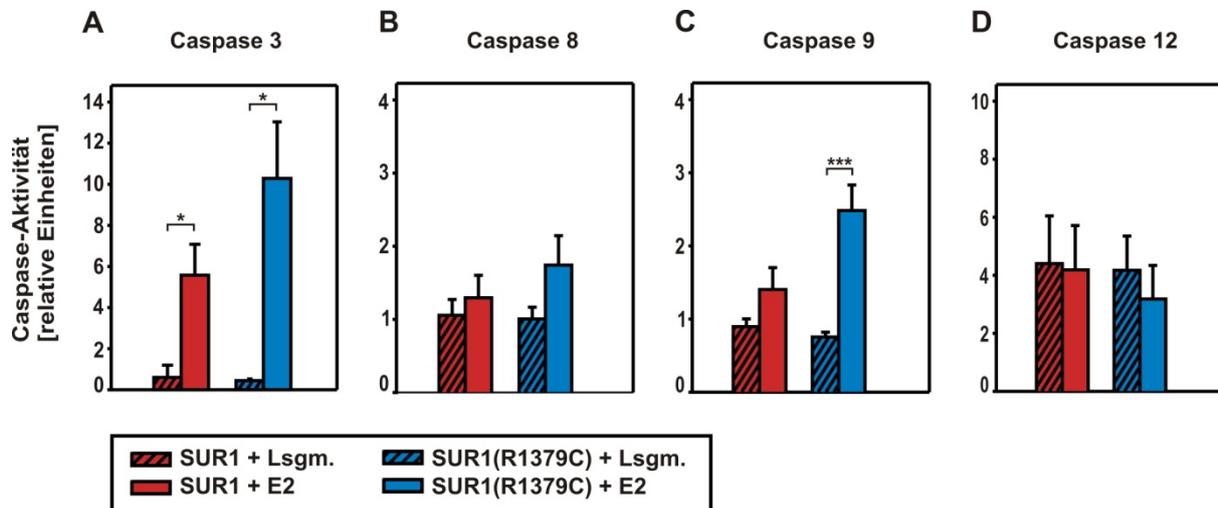


Abb. 11: Fluorometrisch bestimmte Aktivitäten unterschiedlicher Caspasen sind erhöht nach Behandlung mit E2. (A) Die E2-Behandlung induziert die Caspase-3-Aktivität in SUR1- (rot) und SUR1(R1379C)- (blau) exprimierenden Zellen im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle. Weder Caspase-8 (B) noch Caspase-12 (D) werden durch E2 signifikant aktiviert. (C) E2 induziert nur in den SUR1(R1379C) (blau), nicht aber in SUR1-transfizierten Zellen die Caspase-9-Aktivität. Es sind die Mittelwerte \pm Standardfehler dargestellt. Dabei gilt für A-C $n=7$ für SUR1 und $n=6$ für SUR1(R1379C) und für D jeweils $n=5$. Gemessen wurde nach Behandlung mit E2 (100 μ M) für 24h. Als Test wurde ein gepaarter zweiseitiger Student-t-Test (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$) durchgeführt.

Einen deutlichen Anstieg kann man bei der Aktivität von Caspase 3 (Abb.11A), welche als Effektor-Caspase eine Rolle als zentrales Schlüsselenzym in Apoptoseprozessen einnimmt, nach Behandlung mit 100 μ M E2 erkennen. Dies gilt sowohl beim Vergleich der E2 behandelten Zellen zu den Lösungsmittel-Kontrollzellen, aber auch beim Vergleich von SUR1- zu SUR1(R1379C) exprimierenden Zellen nach Behandlung mit E2. Die Caspase 3 kann über die Initiator-Caspasen 8, 9 und 12 aktiviert werden. Caspase 8, die über den FAS-Ligand Todesrezeptor aktiviert wird, zeigt lediglich eine leichte Erhöhung ihrer Aktivität nach Behandlung mit E2 im Vergleich zu der Lösungsmittelkontrolle. Einen deutlichen E2-induzierten Effekt zeigt die Caspase 9 in ihrer Aktivität, vor allem in SUR1(R1379C) exprimierenden Zellen (Abb.11C). Caspase 9 wird über die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien aktiviert. Caspase 12, welche im Endoplasmatischen Retikulum stressinduziert oder über Ca^{2+} -Influx aktiviert wird, zeigt keine Veränderung in ihrer Aktivität nach Behandlung mit E2 (Abb.11D). Da bei diesem Vergleich Caspase 3 und Caspase 9 die prominentesten Veränderungen ihrer Aktivität zeigten, wurden diese Caspasen in den Zellen welche SUR1(K719R), SUR1(K1384M), SUR1(R1379C) und SUR1(R1379L) exprimieren vergleichend zu SUR1 exprimierenden Zellen näher untersucht (Abb.12).

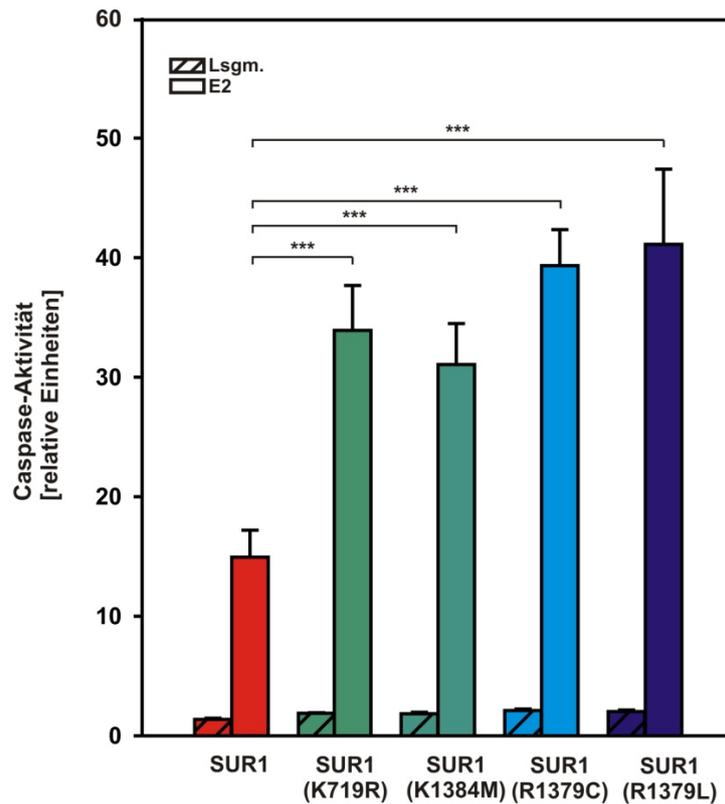


Abb. 12: Gesteigerte Aktivität von Caspase 3 nach Behandlung mit E2. Es sind die Mittelwerte \pm Standardfehler der Caspase 3 Aktivität dargestellt. Dabei gilt jeweils $n=5$. Gemessen wurde nach Behandlung mit E2 ($100\mu\text{M}$) für 24h. Ausgewertet wurde über einen Student-t-Test zweiseitig gepaart ($*p<0,05$; $**p<0,01$; $***p<0,001$) und eine Oneway ANOVA, welche keine signifikanten Unterschiede zwischen den Lösungsmittelkontrollen ergab.

Es zeigt sich, dass alle Zellen welche SUR1(K719R), SUR1(K1384M), SUR1(R1379C) oder SUR1(R1379L) exprimieren, eine signifikante Steigerung der Caspase 3 Aktivität nach Behandlung mit E2 im Vergleich zu SUR1 exprimierenden Zellen aufweisen. Für Caspase 9 wurden die entsprechenden Versuche durchgeführt. Dabei erhielt man ein vergleichbares Ergebnis. In allen untersuchten Mutanten kam es zu einer signifikanten E2-induzierten Steigerung der Caspase 9-Aktivität, lediglich die Gesamtaktivität war geringer als bei Caspase 3. Um beide Caspase-Aktivitäten vergleichen zu können, wird nachfolgend der Induktionsfaktor (IF) verwendet (Abb.13). Dieser wird ermittelt, um den spezifischen Effekt von E2 auf die unterschiedlichen Zellen zu beschreiben, da er die Apoptoserate nach Behandlung mit E2 ins Verhältnis zur Apoptoserate nach Behandlung mit Lösungsmittel setzt. Der Induktionsfaktor gibt das Verhältnis des Anstiegs der Fluoreszenz, bezogen auf die Proteinmenge aus E2 behandelten Zellen zu dem Anstieg der Fluoreszenz, bezogen auf die Proteinmenge aus Lösungsmittel-behandelten Zellen, wieder.

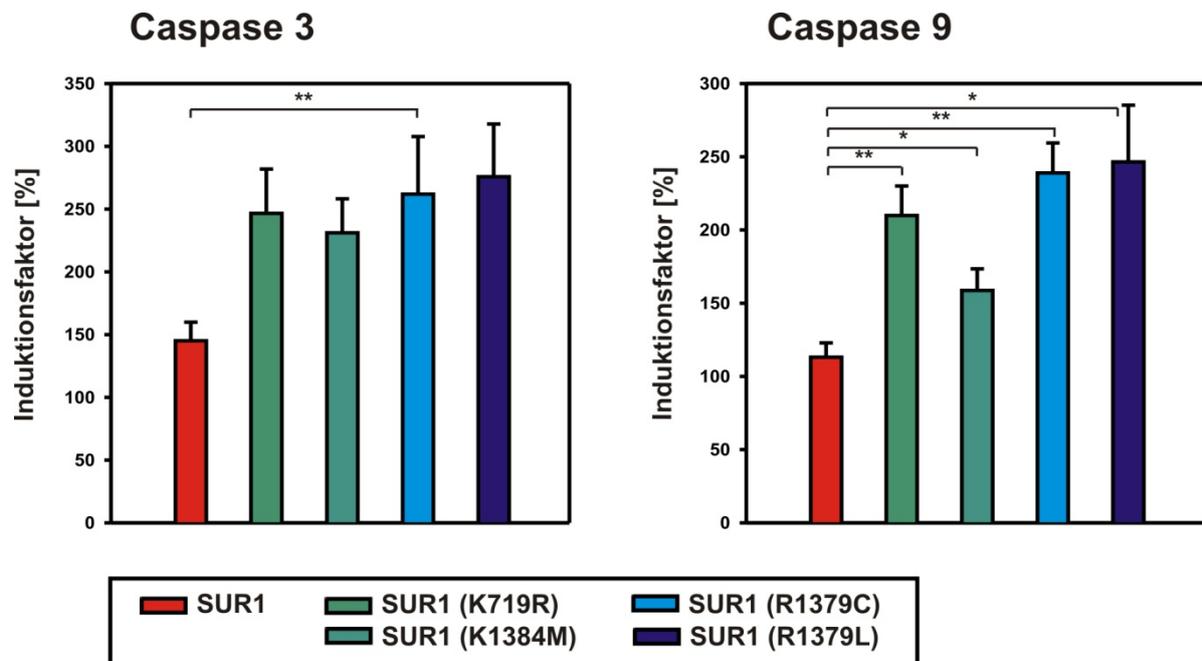


Abb. 13: Vergleich der Induktionsfaktoren (IF) von Caspase 3 und 9 nach Behandlung mit E2. IF=(Anstieg Fluoreszenz/Proteinmenge E2)/(Anstieg Fluoreszenz/Proteinmenge Lsgm.) Für die dargestellten Mittelwerte \pm Standardfehler gilt: Caspase 3 n=5, Caspase 9 n=6, E2 (100 μ M) für 24h, Student-t-Test zweiseitig gepaart (*p<0,05;**p<0,01;***p<0,001).

Somit kann in rekombinanten HEK293-Zellen nicht nur über die Parameter der Zellablösung und der veränderten Kernmorphologie, sondern auch über eine gesteigerte Aktivität der Caspasen 3 und 9 eine deutliche Steigerung der Apoptoserate in Zellen, die eine NBF-Mutation exprimieren (SUR1(K719R), SUR1(K1384M), SUR1(R1379C) und SUR1(R1379L)) im Vergleich zu SUR1 exprimierenden Zellen aufgezeigt werden. Die untersuchten Mutanten mit den ATP-Hydrolyserate senkenden (SUR1(K719R), SUR1(K1384M)) und den ATP-Hydrolyserate steigernden Mutationen (SUR1(R1379C), SUR1(R1379L)) zeigen einheitlich eine gesteigerte Apoptoserate im Vergleich zu SUR1 exprimierenden Zellen.

5.2 Untersuchungen zur Wirkung von E2 in ER positiven Zelllinien

E2 zeigt bereits bei Konzentrationen von 0,1 – 1,0 nM einen schnellen insulinotropen Effekt indem pankreatische K_{ATP} -Kanäle geblockt werden (Nadal, 1998). Ob E2 dabei direkt mit dem pankreatischen K_{ATP} -Kanal interagiert oder mit einem bisher nicht näher charakterisierten nicht-klassischen Estrogenrezeptor, der über intrazelluläre Signalwege mit dem K_{ATP} -Kanal assoziiert ist, wird derzeit diskutiert (Al-Majed, 2005; Nadal, 1998; Ripoll et al., 2008; Ropero et al., 2006; Soria, 2004). Bindungsexperimente an Membranen von rekombinanten HEK293-Zellen zeigen, dass E2 direkt mit dem SUR1 interagieren kann (Ackermann et al., 2009).

In HEK293-Zellen ist der endogene Estradiol-Rezeptor (ER) in Form des klassischen Rezeptors ER α oder ER β nicht, oder in einem kaum detektierbaren Maße nachgewiesen

(Albanito et al., 2008; Gonzalez-Arenas et al., 2006; Kahlert et al., 2000; Tang et al., 2006). Dieser mögliche Anteil an ERs kann über die vergleichende Untersuchung der entsprechenden Kontrollzellen erfasst werden. Da die bisher in dieser Arbeit dargelegten Ergebnisse zeigen, dass in Kontrollzellen mit dem pcDNA-Vektor eine Erhöhung der Apoptoserate nach Estradiolbehandlung erkennbar ist (Abb.: 8 und 10), wurden im Folgenden einzelne der bereits oben aufgeführten Versuche in anderen Zelllinien wiederholt, für welche eine stärkere Expression von Estradiolrezeptoren als in HEK293-Zellen nachgewiesen ist (MCF7-Zellen). Ergänzend wurden Zellen verwendet, welche typische Charakteristika einer nativen β -Zelle zeigen (INS1-Zellen) (siehe 3 und 4). Diese Versuche wurden durchgeführt um SUR1 vermittelte Effekte nach E2 Behandlung von möglicherweise ER vermittelten Effekten ab zu grenzen.

Des Weiteren wurden verschiedene Estradiol-Rezeptor Modulatoren in verschiedenen Zelllinien alleine und in Kombination mit E2-Behandlung hinsichtlich der Auswirkung auf die Apoptose-Induktion untersucht.

5.2.1 Bestimmung der Rate der Zellablösung in mit SUR1-cDNA transfizierten MCF7-Zellen nach Behandlung mit E2

Als Indikator für apoptotische Vorgänge in der Zelle wurde die Zellablösung von adhären wachsenden, ER positiven MCF7-Zellen nach Behandlung mit E2 betrachtet. Dazu wurde die Zellzahl im Überstand mittels Casy-Zellzählgerät nach unterschiedlichen Zeitpunkten ermittelt. In den nachfolgend dargestellten Versuchen wurden stabil transfizierte MCF7-Zellen eingesetzt. Transfiziert wurden die Zellen mit dem Vektor pcDNA3.1 alleine (pcDNA-Kontrollzellen) oder entsprechend mit dem Vektor pcDNA3.1 mit einer Insertion eines Gens, welches für SUR1 oder die Mutation SUR1(R1379C) codiert.

Zunächst erfolgte eine Überprüfung der erfolgreichen stabilen Transfektion von MCF7-Zellen mit dem Vektor pcDNA3.1 mit einer Insertion für SUR1. Dies erfolgte über die Ermittlung der spezifischen Bindung von Tritium- markiertem Glibenclamid (^3H -GBC) (Abb. 14) und einer RT-PCR (Abb. 15).

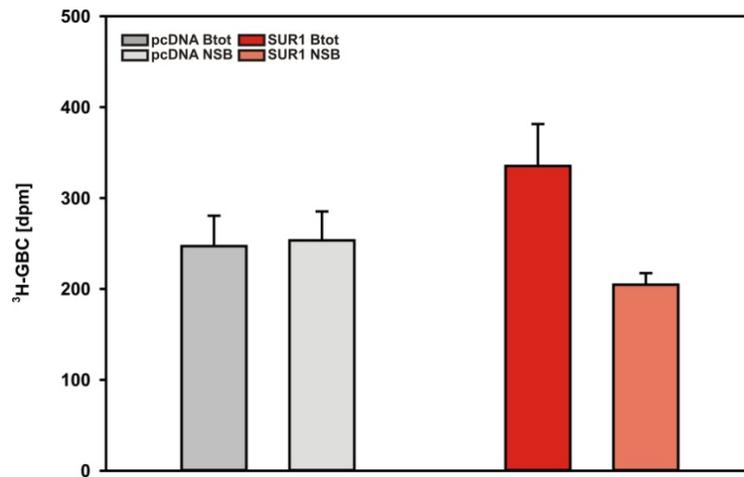


Abb. 14.: Nachweis der Expression von SUR1 in MCF7-Zellen nach stabiler Transfektion über die Ermittlung der spezifischen Bindung von $^3\text{H-GBC}$. Bestimmung der totalen (Btot) und der nicht-spezifischen Bindung (NSB) an Membranen von pcDNA-Kontrollzellen (grau) und SUR1 exprimierenden MCF7-Zellen (rot) über Tritium-markiertes Glibenclamid. NSB ist hier farblich heller als Btot dargestellt. Es gilt jeweils n=5.

Da bekannt ist, dass Glibenclamid an den Sulfonylharnstoffrezeptor 1 bindet, wurde über Tritium markiertes Glibenclamid die totale und die nicht-spezifische Bindung an Membranfraktionen von stabil transfizierten MCF7-Zellen bestimmt (Abb.14). Wurden die MCF7-Zellen zuvor mit dem leeren pcDNA3.1-Vektor transfiziert, entsprach die totale Bindung der nicht-spezifischen Bindung. Dagegen zeigen sich an Membranfraktionen von Zellen, die zuvor mit dem Vektor pcDNA3.1 mit einer Insertion für das Gen des SUR1 stabil transfiziert wurden, tendenziell einen Unterschied zwischen der totalen und der nicht-spezifischen Bindung. Dieser Unterschied entspricht der spezifischen Bindung von Glibenclamid an SUR1 und kann als Nachweis einer erfolgreichen stabilen Transfektion der MCF7-Zellen mit SUR1 angesehen werden. Es muss an dieser Stelle angemerkt werden, dass der Unterschied im Ausmaß der Bindung nach der Transfektion der MCF7-Zellen mit SUR1 nicht signifikant ist und auch viel geringer ausfällt als bei entsprechenden Versuchen die entsprechend an HEK293 Zellen durchgeführt wurden. Darum kann dieser Versuch alleine nicht als endgültiger Nachweis für eine stabile Transfektion angesehen werden.

Eine weitere Nachweismethode ist die RT-PCR. Dabei wird zunächst RNA aus Zellen isoliert und in cDNA umgeschrieben. Über eine PCR wurden die entsprechenden DNA-Abschnitte amplifiziert und dann mittels Gelelektrophorese getrennt. DNA-interkalierende Fluoreszenzfarbstoffe (in diesem Fall Ethidiumbromid) lagern sich an entstandene DNA-Doppelstrangfragmente an, so können die PCR-Produkte bestimmt und die Menge über die Intensität der Fluoreszenz quantifiziert werden.

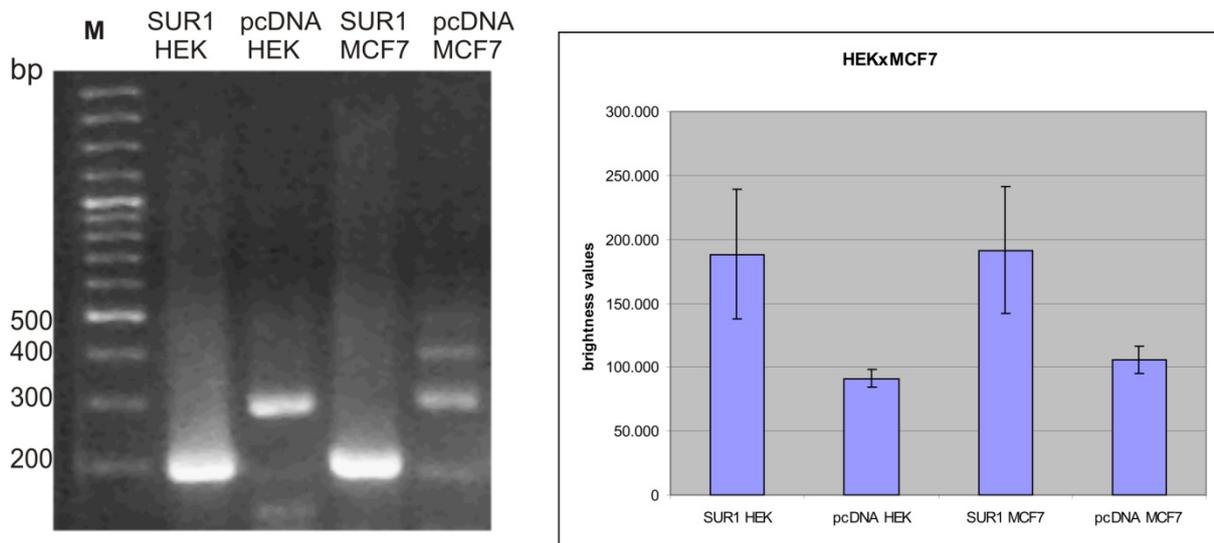


Abb. 15.: Nachweis der Expression von SUR1 in MCF7-Zellen nach stabiler Transfektion über RT-PCR. Die Zellen wurden von mir, wie in Kapitel 4.1.3 beschrieben, transfiziert, die anschließende RT-PCR wurde von Frau Dr. Claudia Franz durchgeführt [Die Umschreibung der RNA in cDNA erfolgte mit Hilfe des Quiagen QuantiTec Rev. Transcription Kit nach Anleitung des Herstellers]. In der Abbildung Teil A ist eine Aufnahme des Gels mit den PCR-Produkten nach erfolgter Gelelektrophorese abgebildet. Die Bande für SUR1 hat eine Größe von 201bp. Als DNA-interkalierender Fluoreszenzfarbstoff wurde Ethidiumbromid verwendet. In Teil B sind die Werte für die Intensität der Fluoreszenz nach Quantifizierung des Geles dargestellt.

Mithilfe dieser Methode konnte eine erfolgreiche stabile Transfektion sowohl von MCF7-Zellen als auch von HEK293-Zellen mit dem SUR1 nachgewiesen werden (Abb.15).

Nachdem die Zellen von mir transfiziert wurden, wurden die RT-PCR und deren Analyse freundlicherweise von meiner Kollegin Frau Dr. Claudia Bernardo de Oliveira Franz durchgeführt. Die Bande von SUR1 hat eine Größe von 201 bp und ist in Abb.15, Teil A sowohl in HEK293-Zellen als auch in MCF7-Zellen deutlich zu erkennen. Die schwachen Banden auf der Höhe von 200 bp in den pcDNA-Kontrollzellen können ein Hinweis auf eventuelle andere endogene ABCC Proteine der Zellen sein, während die starken Banden auf der Höhe von 300 bp wahrscheinlich unspezifische PCR-Produkte darstellen. Unspezifische PCR-Produkte können entstehen wenn kein spezifischer DNA- Abschnitt zur Amplifikation vorhanden ist und/oder wenn zuviel Primer eingesetzt wurde.

Die stabile Transfektion von MCF7-Zellen mit dem SUR1 konnte mit dieser Methode nachgewiesen werden, daher wurde der Erfolg einer entsprechenden Transfektion mit SUR1(R1379C) angenommen, ohne jedoch einzeln überprüft zu werden.

Anschließend erfolgte die Analyse des Ausmaßes der Zellablösung in SUR1 exprimierenden MCF7-Zellen nach Behandlung mit E2, entsprechend der zuvor an HEK293-Zellen durchgeführten Versuche.

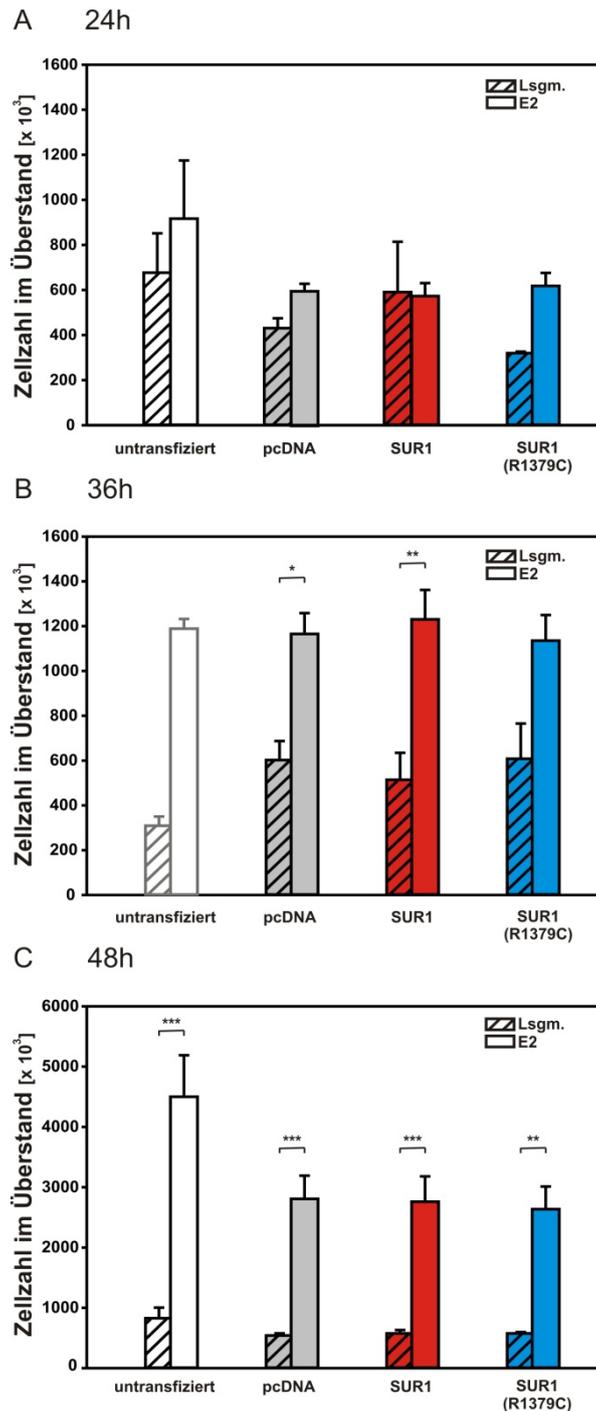


Abb. 16: Zellablösung nach Behandlung mit 100 µM E2 in stabil transfizierten MCF-Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Dargestellt ist der Anteil an MCF7-Zellen im Überstand (untransfiziert = weiß, pcDNA-Kontrollzellen = grau, Zellen, die SUR1 exprimieren = rot und Zellen, welche die SUR1-Mutation R1379C exprimieren = blau). Es wurde jeweils eine Oneway ANOVA mit anschließendem Tukey's Multiple Comparison Test durchgeführt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). A: Nach 24h zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen und Behandlungen (untransfiziert $n=14$, pcDNA $n=9$, SUR1 $n=9$, SUR1(R1379C) $n=3$). B: Nach 36h Inkubation wurde beim Vergleich von Zellen die pcDNA-, SUR1-, und SUR1(R1379C) exprimieren, folgendes Ergebnis erzielt. Keine signifikanten Unterschiede zwischen den Lsgm.-Proben und keine signifikanten Unterschiede zwischen den E2-Proben (untransfizierte Zellen $n=1$, Rest jeweils $n=4$). Die untransfizierten Zellen sind aufgrund der geringen n -Zahl nicht in die Auswertung eingegangen und darum heller in der Grafik abgebildet. C: Nach 48h konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den untransfizierten-Proben sowie den pcDNA-, SUR1- und SUR1(R1379C) E2-Proben festgestellt werden. Die jeweilige Lsgm.-Probe zeigt im Vergleich zur entsprechenden E2-Probe $p=***$, für SUR1(R1379C) $p=**$. Im Vergleich zu der untransfizierten E2-Probe zeigen alle anderen E2-Proben $p=*$ (untransfiziert $n=4$, pcDNA $n=6$, SUR1 $n=6$, SUR1(R1379C) $n=5$).

Nach einer Behandlung mit 100µM E2 für 24h zeigen MCF7-Zellen, welche einen endogenen Estradiol-Rezeptor besitzen, keinen Unterschied in Bezug auf die Apoptoserate betrachtet man den Parameter der Zellablösung. Mit der Zeit (36h, 48h) steigt der Anteil an apoptotischen Zellen in E2 behandelten Zellen im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle. Einen Unterschied zwischen den SUR1-exprimierenden Zellen und den (SUR1(R1379C)-exprimierenden Zellen bzw. den pcDNA-Kontrollzellen ist jedoch bei dieser Konzentration nicht erkennbar. Desweiteren zeigt sich eine ungewöhnlich starke Zellablösungsrate bei untransfizierten Zellen nach Behandlung mit E2, welche nach 48h sogar über den Zellablösungsraten der transfizierten Zellen liegt.

5.2.2 Bestimmung der Rate der Zellablösung in SUR1 exprimierenden INS1-E-Zellen nach Behandlung mit E2

In INS1-E-Zellen, welche durch die Gruppe um C.B. Wollheim aus einem Ratten-Insulinoma generiert wurden und für die beschrieben ist, dass sie sich wie native β -Zellen verhalten, konnte ein Unterschied zwischen Lösungsmittelkontrolle und E2-Behandlung gezeigt werden (Abb. 17). Diese Zellen besitzen endogen sowohl Estrogen-Rezeptoren (klassische und nicht-klassische siehe 1.4.3), als wahrscheinlich auch den SUR1 Rezeptor (Asfari, 1992).

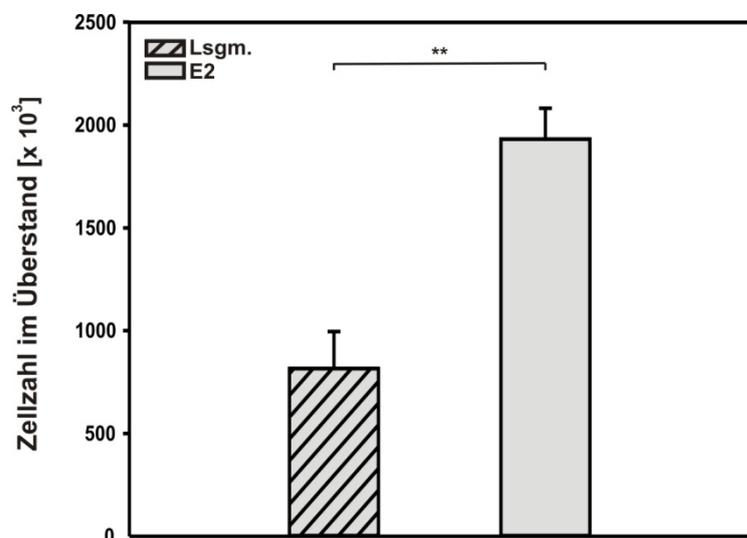


Abb. 17: Die E2-Behandlung führt zu einem signifikanten Anstieg der Zellablösung in INS1-E-Zellen. Es gilt jeweils $n=4$, E2 100 µM für 24h, analysiert über den Student-T-Test zweiseitig, gepaart: (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$).

Somit konnte ein gesteigerter Verlust der Zelladhärenz in rekombinanten HEK293-Zellen (Abb.8) und untransfizierten INS1-E-Zellen (Abb.17) nach Behandlung mit 100 µM E2 für 24h festgestellt werden. In MCF7-Zellen (Abb.16) konnte nach einer Behandlung mit 100 µM E2 für 36h und 48h, nicht aber nach 24h, ein gesteigerter Verlust der Zelladhärenz gemessen werden.

5.2.3 Untersuchung der Sensitivität verschiedener Zellen gegenüber einer Behandlung mit E2

Die Sensitivität gegenüber E2 wurde zunächst an den in vielen Eigenschaften den nativen β -Zellen ähnlichen, INS1-E-Zellen getestet. Dazu wurden die INS1-E-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an E2 behandelt, und nach 24h Inkubationszeit mittels des Casy-Zellzählgerätes die Zellzahl im Überstand bestimmt (Abb. 18).

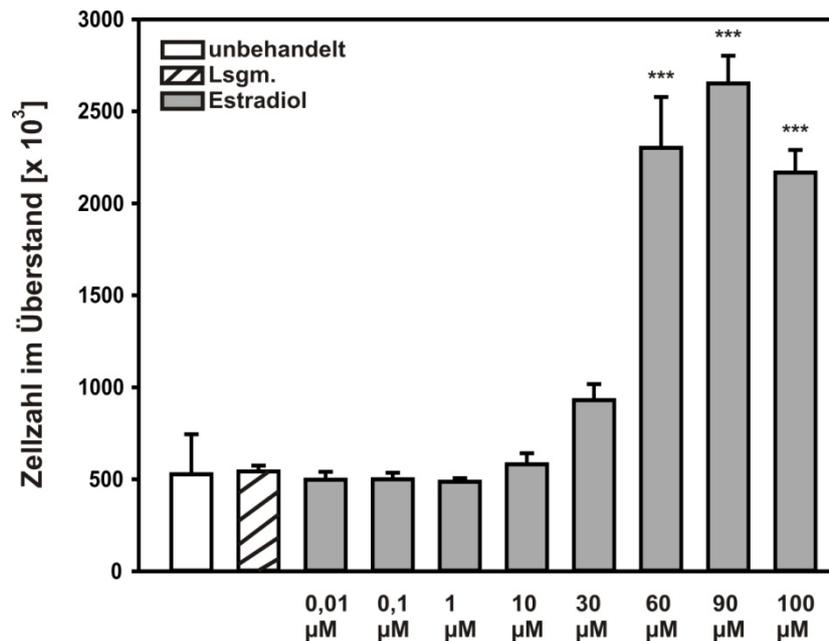


Abb. 18: Gesteigerter Adhärenzverlust von INS1-E-Zellen nach Behandlung mit zunehmenden Konzentrationen an E2 für 24h. Es gibt dabei keinen signifikanten Unterschied zwischen Lösungsmittel behandelten Zellen und solchen, die unbehandelt, bzw. mit 0,01 μM – 30 μM E2 behandelt wurden. 60, 90 und 100 μM sind untereinander nicht signifikant verschieden, aber signifikant erhöht im Vergleich zu Lsgm. behandelten Zellen. Nach ANOVA mit anschließendem Tukey's Multiple Comparison Test ergab sich $p < 0,05$. Dargestellt ist das Ausmaß der Zellablösung als Mittelwerte \pm Standardfehler, dabei gilt unbehandelt $n=2$, Lsgm. $n=7$ und für die mit E2 behandelten Zellen $n=3-4$.

Diese Zellen zeigen keine signifikante Erhöhung der Zellablösung in einem Konzentrationsbereich von 0,01 – 30 μM E2, wobei eine Tendenz zur vermehrten Ablösung bei 30 μM erkennbar war. Bei den Konzentrationen höher 30 μM , war ein sprunghafter Anstieg der Zellablösung zu beobachten. Zellen, die mit 60, 90 oder 100 μM E2 behandelt wurden, zeigten eine signifikant gesteigerte Rate der Zellablösung im Vergleich zu den Lösungsmittelkontrollen.

Um zu überprüfen, ob die erhöhten Apoptoseraten nach Behandlung mit E2 in den untersuchten SUR1 Mutanten (SUR1(K719R), SUR1(K1384M), SUR1(R1379C) und SUR1(R1379L)) (Abb.8, 10 und 12) auf eine erhöhte Sensibilität gegenüber E2 zurückzuführen ist, wurden verschiedene Konzentrationen auf ihre Apoptose induzierende Wirkung untersucht (Abb. 19). Dazu wurden stabil transfizierte HEK293-Zellen verwendet. Diese wurden für 4 Tage mit unterschiedlichen E2 Konzentrationen behandelt, anschließend

fixiert und mit dem Farbstoff HOECHST 33258 gefärbt. Als apoptotischer Parameter wurde die veränderte Kernmorphologie zu Hilfe gezogen (siehe 4.3.2.2). Die apoptotischen Nuklei wurden mikroskopisch erfasst und ausgezählt.

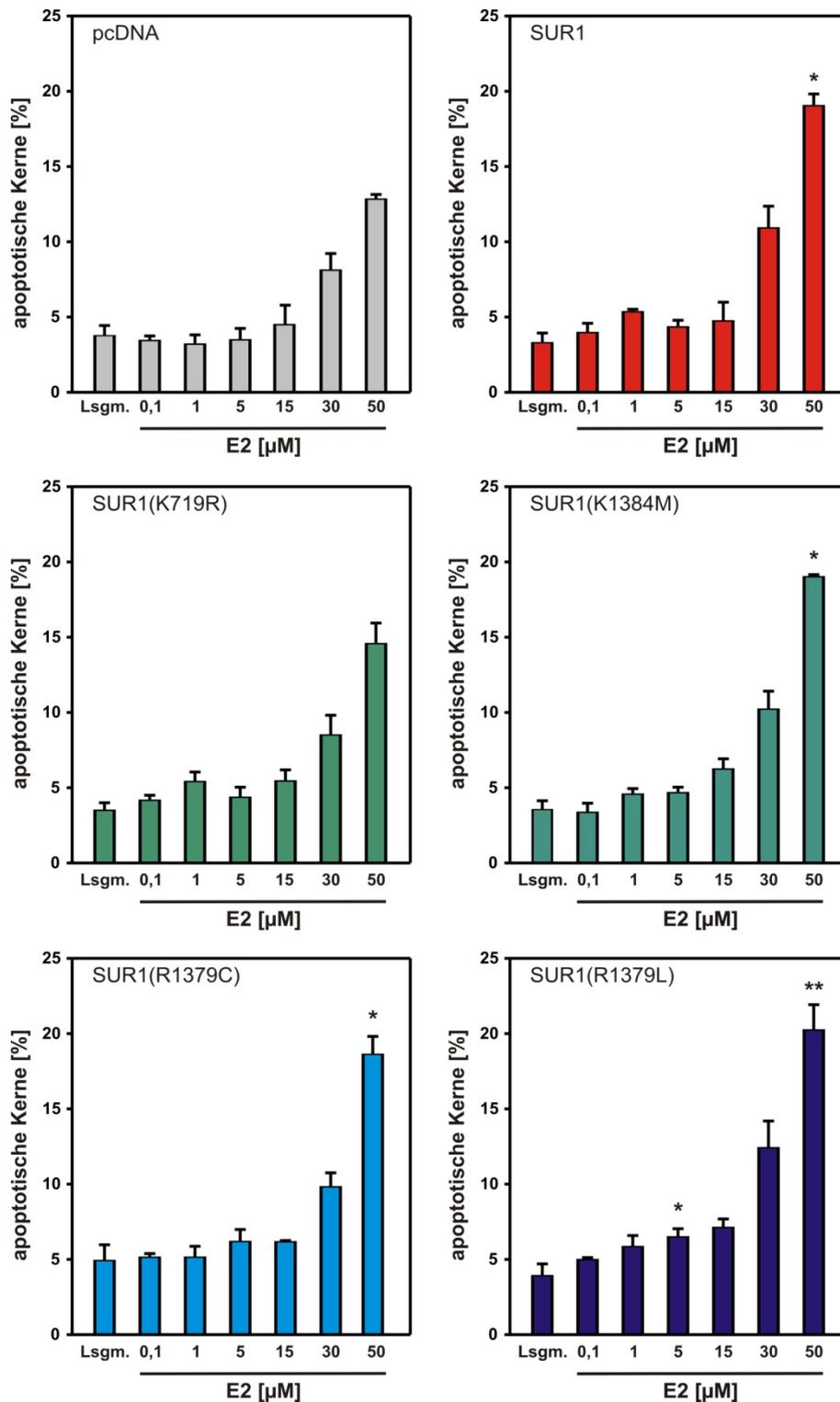


Abb. 19: Die Anzahl der apoptotischen Nuklei ist in HEK293-Zellen die SUR1 oder SUR1(K719R), SUR1(K1384M), SUR1(R1379C) oder SUR1(R1379L) exprimieren, abhängig von der eingesetzten Konzentration an E2. In der Abbildung ist der prozentuale Anteil apoptotisch veränderter Nuklei nach Behandlung mit unterschiedlichen E2-Konzentrationen für 4 Tage graphisch gezeigt. Die angegebenen Signifikanzen beziehen sich auf den Unterschied zwischen SUR1 oder den SUR1-Mutanten und den pcDNA-Kontrollzellen. Es wurde eine Oneway ANOVA mit anschließendem Tukey's Multiple Comparison Test und $p < 0,05$ durchgeführt. Es gilt für jede Konzentrationsreihe $n=3$.

Dabei unterscheiden sich SUR1 exprimierende Zellen ab einer Konzentration von 50 μM signifikant von den pcDNA-Kontrollzellen. Dies trifft ebenfalls auf die untersuchten SUR1-Mutationen SUR1(K1384M), SUR1(R1379C) und SUR1(R1379L) zu. In den Zellen die SUR1(R1379L) exprimieren ist ein Unterschied zu den Kontrollzellen zusätzlich bei einer Konzentration von 5 μM E2 zu erkennen. Keinen Unterschied zur Kontrolle ist in dem getesteten Konzentrationsbereich bei SUR1(K719R) erkennbar. Keine der SUR1-Mutationen zeigt bei den getesteten Konzentrationen in diesem Ansatz einen Unterschied zu dem nativen SUR1.

5.3 Ermittlung der Auswirkung von ER-Modulatoren auf die Zellvitalität von SUR1 exprimierende Zellen

SUR1 exprimierende HEK293-Zellen wurden mit verschiedenen Substanzen, die bisher als Selektive Estrogenrezeptor-Modulatoren (SERMs) oder Selektive Estrogenrezeptor Down-Regulatoren (SERDs) bekannt sind, behandelt, um den Einfluss der eventuell vorhandenen Estradiol-Rezeptoren (ER α oder ER β) abschätzen zu können.

5.3.1 Auswirkung der Behandlung von rekombinanten HEK293-Zellen und isolierten Langerhansinseln mit Tamoxifen auf die Zelladhäsion und Kernmorphologie

Tamoxifen (TAM) ist ein selektiver Estrogenrezeptormodulator (SERM), der zur Behandlung von Estrogen-abhängigen Mammakarzinomen eingesetzt wird (Fisher, 1998; Katzenellenbogen, 2000). Tamoxifen ist ein Prodrug, welches enzymatisch durch CYP2D6 in die aktive Form Hydroxytamoxifen umgesetzt wird und eine kompetitive Hemmung der Estrogenrezeptoren (ER α und ER β) bewirkt. CYP2D6, welches zur P450 Familie gehört, ist auch in HEK293 Zellen exprimiert (Hasler, 1999) (siehe auch 5.6.3). Anfänglich wurde der Effekt unterschiedlicher Tamoxifenkonzentrationen auf die Zelladhärenz von SUR1 exprimierende HEK293-Zellen untersucht (Abb.20). Als möglicher Maß verminderter Vitalität wurde hier das Ablösen der Zellen vom Schalenboden betrachtet. Die Messung erfolgte über ein Casy- Zellzählgerät, mit dessen Hilfe die Zellzahl im Überstand gemessen wurde.

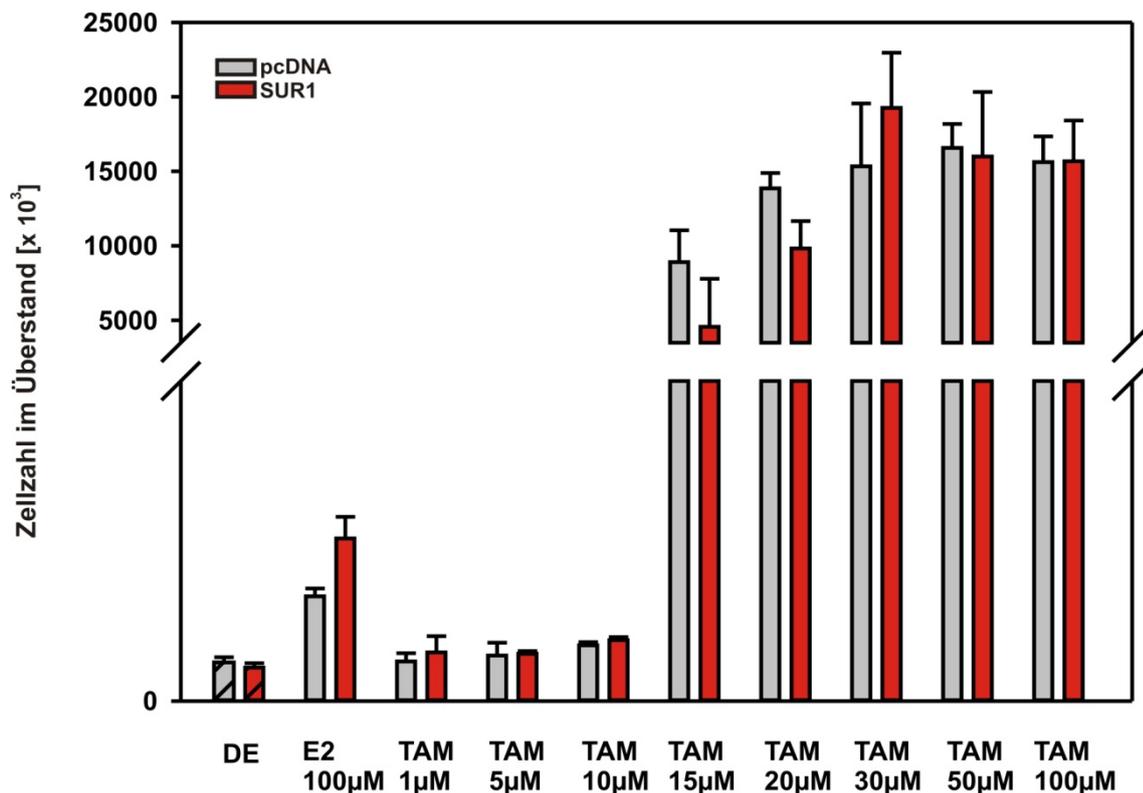


Abb. 20: Untersuchung des Effektes verschiedener Konzentrationen Tamoxifen auf die Zelladhärenz von rekombinanten HEK293-Zellen. Dargestellt ist das Ausmaß der Zellablösung als Mittelwerte \pm Standardfehler. Nach einer Oneway ANOVA mit anschließendem Tukey's Multiple Comparison Test (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) gibt es keine signifikanten Unterschiede im Konzentrationsbereich, ausgehend von der Lösungsmittelkontrolle, bis 10 μM . Alle eingesetzten Tamoxifen-Konzentrationen ab 15 μM zeigen im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle eine signifikant erhöhte Zellzahl im Überstand. Die Inkubationszeit betrug jeweils 24h, $n=5$.

Als Vergleich zu den mit Tamoxifen behandelten SUR1 exprimierenden HEK293-Zellen wurden pcDNA-Kontrollzellen, sowie Zellen die SUR1 exprimieren und mit Estradiol behandelt wurden, mitgeführt. Bei einer Behandlung der Zellen mit Konzentrationen im Bereich von 1 μM , 5 μM und 10 μM Tamoxifen konnte kein signifikanter Unterschied im Vergleich zu Zellen, die mit Lösungsmittel behandelt wurden, festgestellt werden. In diesem Konzentrationsbereich lag die Anzahl an Zellen im Überstand deutlich unter der von Zellen nach einer Behandlung mit E2. Alle eingesetzten Tamoxifen-Konzentrationen über 15 μM zeigten im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle eine signifikant erhöhte Zellzahl im Überstand auf. Allerdings sind ab einer Konzentration von 15 μM Tamoxifen nach 24h alle Zellen einer Schale abgetötet. Unterschiede im Konzentrationsbereich 15 μM , 20 μM , 30 μM , 50 μM und 100 μM Tamoxifen könnten dabei eventuell auf unterschiedliche Zellmengen zu Versuchsbeginn zurückgeführt werden.

Ergänzend wurde die Wirkung von Tamoxifen in Kombination mit Estradiol auf die SUR1 und SUR1-Mutationen exprimierenden HEK293-Zellen untersucht und mit der Wirkung von E2 oder TAM alleine verglichen (Abb.21). Dazu wurde die Konzentration von 10 μM Tamoxifen verwendet, da bei dieser Konzentration gerade kein Effekt von TAM alleine zu beobachten ist (Abb.11) und diese Konzentration auch aus der Literatur, unter anderem von

Untersuchungen zur mitochondrialen Apoptoseinduktion (Nazarewicz et al., 2007) und Effekten der Biologisch aktiven Metabolite von TAM (Reddel, 1983), bekannt ist.

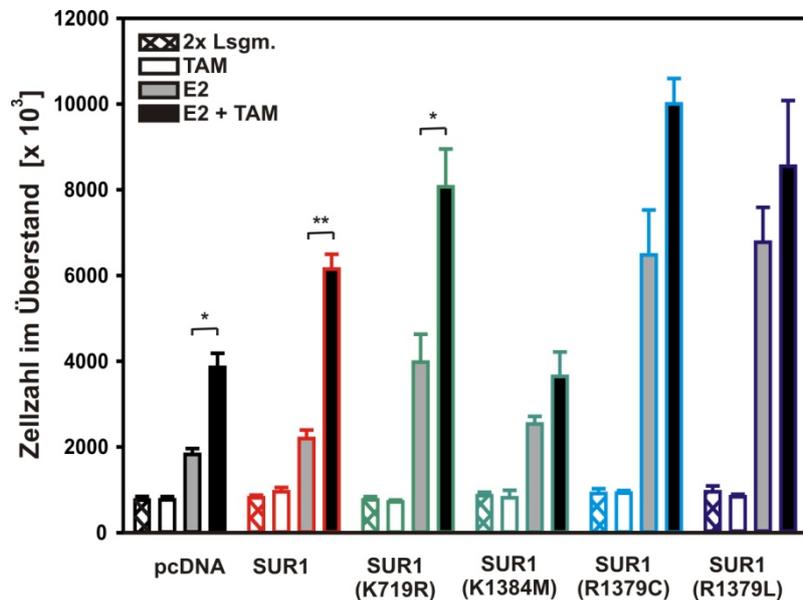


Abb. 21: Tamoxifen in Kombination mit E2 verstärkt die Wirkung von E2 auf HEK293-Zellen, welche SUR1 oder bestimmte SUR1-Mutanten exprimieren. Dargestellt ist das Ausmaß der Zellablösung mit Mittelwert \pm Standardfehler. Es gibt nach durchgeführter Oneway ANOVA mit anschließendem Tukey's Multiple Comparison Test keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zellen nach Lösungsmittelbehandlung. Ebenfalls sind keine Unterschiede zwischen Zellen, die mit Tamoxifen behandelt wurden, detektierbar. Zwischen der Behandlung mit Lösungsmittel und Tamoxifen innerhalb einer einzelnen Zelllinie wurden nach Student-T-Test zweiseitig, gepaart (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) keine signifikanten Unterschiede festgestellt. Signifikante Unterschiede in allen Gruppen ergaben sich beim Vergleich der Lösungsmittelkontrolle sowohl bei den E2-behandelten Zellen, als auch bei den in Kombination E2+TAM –behandelten Zellen. Es gilt jeweils $n=4$, E2 100 μ M, TAM 10 μ M und eine Inkubationsdauer von 24h.

Tamoxifen alleine zeigt auch in diesen Versuchen in den HEK293-Zellen bei einer Konzentration von 10 μ M keine Wirkung auf die Zelladhärenz. Wie bereits in vorausgegangenen Versuchen ist nach 24h eine signifikant erhöhte Zellzahl im Überstand nach einer Behandlung mit 100 μ M E2 in Bezug auf die Lösungsmittel-Kontrolle zu messen. Ebenfalls ist im Vergleich zu den für 24h mit E2 behandelten pcDNA-Kontrollzellen erkennbar, dass bei allen Zellen, die mit einer Kombination von E2 und Tamoxifen behandelt wurden, die Rate an abgelösten Zellen nochmals signifikant gesteigert wurde. Dieser deutliche Anstieg des Adhärenzverlustes im Vergleich zu E2 behandelten Zellen konnte in allen untersuchten Zelltypen, welche pcDNA, SUR1, SUR1(K719R), SUR1(K1384M), SUR1(R1379C) oder SUR1(R1379L) exprimieren, festgestellt werden.

Die Wirkung von Tamoxifen wurde darüber hinaus an isolierten pankreatischen Langerhansinseln untersucht (Abb.22). Dazu wurden isolierte murine Langerhansinseln wie in Kapitel 4.3.2.3 beschrieben nach der Inkubation mit den entsprechenden Substanzen fixiert und mit dem Kern-Farbstoff HOECHST 33258 gefärbt. Nach entsprechender Anregung der Fluoreszenz, konnte über ein Mikroskop der Anteil der apoptotisch veränderten Nuklei bestimmt werden (siehe 4.3.2).

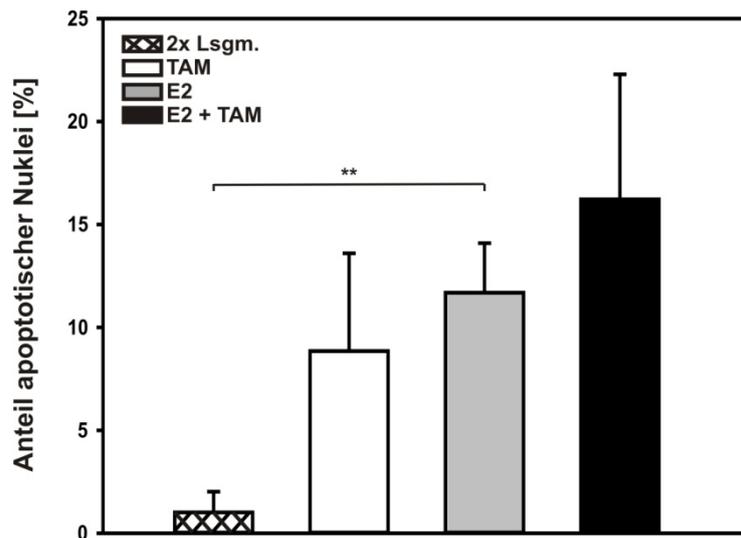


Abb. 22: Veränderte Kernmorphologie von isolierten Langerhansinseln nach Behandlung mit TAM und E2 alleine und in Kombination. Bei isolierten Langerhansinseln zeigt sich eine apoptotische Veränderung in der Kernmorphologie nach Behandlung mit TAM (weiß), E2 (grau) oder der kombinierten Behandlung E2+TAM (schwarz). Eingesetzt wurden isolierte Langerhansinseln von männlichen Mäusen im Alter von ca. 20 Wochen. Es gilt jeweils Mäuse n=3, Langerhansinseln n= 8-17, E2 100µM, TAM 5 µM, Inkubationszeit 72h und Student-T-Test zweiseitig, gepaart (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001). Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardfehler.

Betrachtet man den prozentualen Anteil an apoptotischen Nuklei in isolierten Langerhansinseln nach 72h Inkubation, sieht man eine signifikante Erhöhung der Apoptoserate nach Behandlung mit 100 µM E2. Tendenziell ist auch ein erhöhter Effekt nach der Behandlung mit 5 µM Tamoxifen erkennbar, auch wenn dieser Effekt statistisch nicht signifikant ist. Die größte apoptotische Wirkung zeigt hier, entsprechend der Versuche in rekombinanten Zellsystemen (Abb.21), eine kombinierte Behandlung von E2 und Tamoxifen. Auffallend ist, dass in den isolierten Langerhansinseln 5 µM Tamoxifen eine deutlich stärkere Wirkung zeigt als in den HEK293-Zellen nach Behandlung mit 10 µM Tamoxifen, besonders in Bezug auf die Wirkung von 100 µM E2.

5.3.2 Auswirkung der Behandlung von rekombinanten HEK293-Zellen mit Fulvestrant auf die Zelladhäsion

Ein bekannter strikter ER Antagonist ist Fulvestrant (ICI 182,780). Fulvestrant (Fv) wird als Selektiver Estrogenrezeptor Down-Regulator (SERD) beschrieben (Wakeling, 1991; Wardell et al., 2011). In Versuchen mit rekombinanten HEK293-Zellen, welche für 24h, entsprechend der Tamoxifen-Versuche, mit Fv und E2 inkubiert wurden, zeigt sich eine Reduktion der Zellablösungsrate (Abb.23).

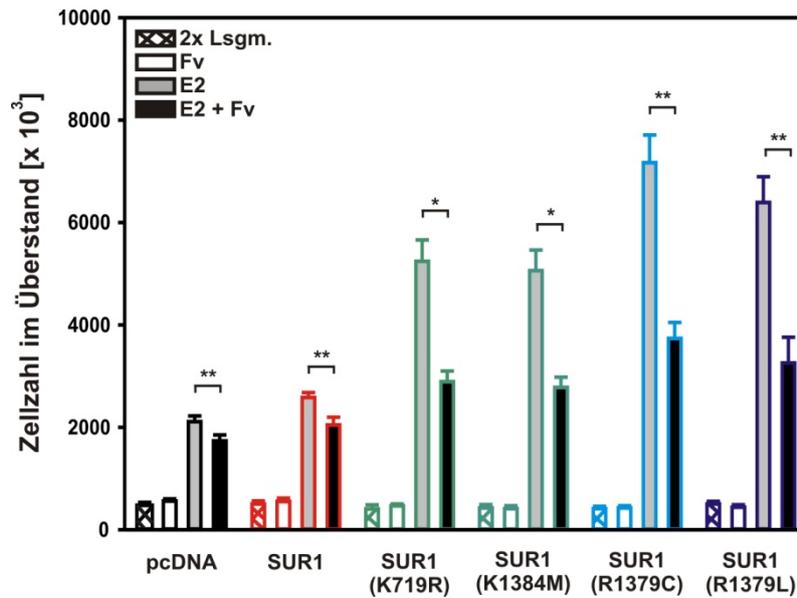


Abb. 23: Fulvestrant in Kombination mit E2 senkt die Wirkung von E2 auf HEK293-Zellen, welche SUR1 und SUR1-Mutanten exprimieren. Abgebildet sind, in Bezug auf die Rahmenfarbe, pcDNA-Kontrollzellen in schwarz, SUR1 exprimierende Zellen in rot, Zellen, die eine SUR1-Mutation mit ATP-Hydrolyserate senkendem Effekt exprimieren, in hell- und dunkel-grün und Zellen, die eine SUR1-Mutation mit ATP-Hydrolyserate steigerndem Effekt exprimieren, in hell- und dunkel-blau. Dargestellt ist das Ausmaß der Zellablösung mit Mittelwert \pm Standardfehler. Nach durchgeführter ANOVA mit anschließendem Tukey's Multiple Comparison Test ergeben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zellen nach Lösungsmittelbehandlung, und auch keine Unterschiede zwischen Zellen, die mit Fulvestrant behandelt wurden. Zwischen den Gruppen ergibt sich nach dem Student-T-Test zweiseitig, gepaart: (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) weiterhin folgendes Ergebnis: Im Vergleich zu den Lösungsmittelkontrollen sind alle entsprechenden E2 Behandlung und entsprechenden E2+Fv Behandlungen signifikant erhöht. Kein Unterschied zur Behandlung mit Lösungsmittel zeigen die Zellen nach Behandlung mit Fv. Es gilt pcDNA und SUR1 $n=9$, Zellen mit SUR1-Mutation $n=4-6$, Fv $10 \mu\text{M}$, und E2 $100 \mu\text{M}$.

In diesen Versuchen ist deutlich erkennbar, dass Fv, obwohl alleine keine Wirkung sichtbar ist, in Kombination mit Estradiol den Effekt auf die Zellablösung von E2 senkt. Dies ist in allen unterschiedlich transfizierten Zellen deutlich zu erkennen, auch wenn der Effekt in den einzelnen Versuchsansätzen unterschiedlich stark ausgeprägt ist. Die größte Reduktion des E2-Effektes zeigen Zellen welche die Mutationen SUR1(K719R), SUR1(K1384M), SUR1(R1379C) oder SUR1(R1379L) exprimieren, also die Zelllinien bei welchen die Zellablösung nach Behandlung mit E2 am deutlichsten verstärkt ist (siehe Tab.11). Die Wirkung der eingesetzten Konzentration an Fulvestrant alleine liegt auf der Höhe der eingesetzten, zweifachen Lösungsmittelkontrolle.

Tabelle 11: Darstellung des prozentualen Anteils des Adhärenzverlustes von rekombinanten HEK293-Zellen nach Behandlung mit E2 und Fv in Kombination bezogen auf entsprechende, mit E2 behandelten, Zellen.

| Behandlung | Ausmaß des Adhärenzverlustes in % | | | | | |
|----------------|-----------------------------------|------|-------------|--------------|--------------|--------------|
| | pcDNA | SUR1 | SUR1(K719R) | SUR1(K1384M) | SUR1(R1379C) | SUR1(R1379L) |
| E2 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| E2 + Fv | 83,8 | 79,4 | 57,7 | 58 | 49,6 | 53,3 |

Im Vergleich zu den mit E2 behandelten Zellen sinkt die Apoptoserate bei der kombinierten Behandlung mit E2 und Fv bei pcDNA-Kontrollzellen um 16%, bei SUR1 transfizierten Zellen um 21%, bei den Zellen, die die SUR1 Mutationen SUR1(K719R) und SUR1(K1384M) exprimieren jeweils um 42%, bei den Mutationen für SUR1(R1379C) um 50% und für SUR1(R1379L) um 47% (Tabelle 11).

5.4 Auswirkung der Behandlung mit Estradiol, Tamoxifen und Fulvestrant auf die Zellvitalität von MCF7-Zellen

Die Behandlung erfolgte in Gewebekulturschalen und die Messung wurde mit dem Casy-Zellzählgerät durchgeführt. Dabei wurde die Zellablösung der adhärent wachsenden Zellen als Maß der Zellvitalität und damit als Indikator für möglicherweise apoptotische Prozesse genutzt (Abb. 23). Bei dieser Methode wirkt die intakte Plasmamembran der Zelle als Isolator und es wird durch das Gerät automatisch das Integral über mehrere Messungen gebildet (siehe 4.3.1). Über den elektrischen Widerstand der Zellen in einer Mehrfachbestimmung können Rückschlüsse auf die Zellvitalität gezogen werden. Der prozentuale Anteil an vitalen Zellen an der Gesamtzellzahl wird dabei als Vitalität bezeichnet. Nachfolgend sind die Ergebnisse der Behandlungen von MCF7-Zellen mit E2, Fv und TAM und die Auswirkung auf die Vitalität der Zellen nach 24h dargestellt (Abb. 24).

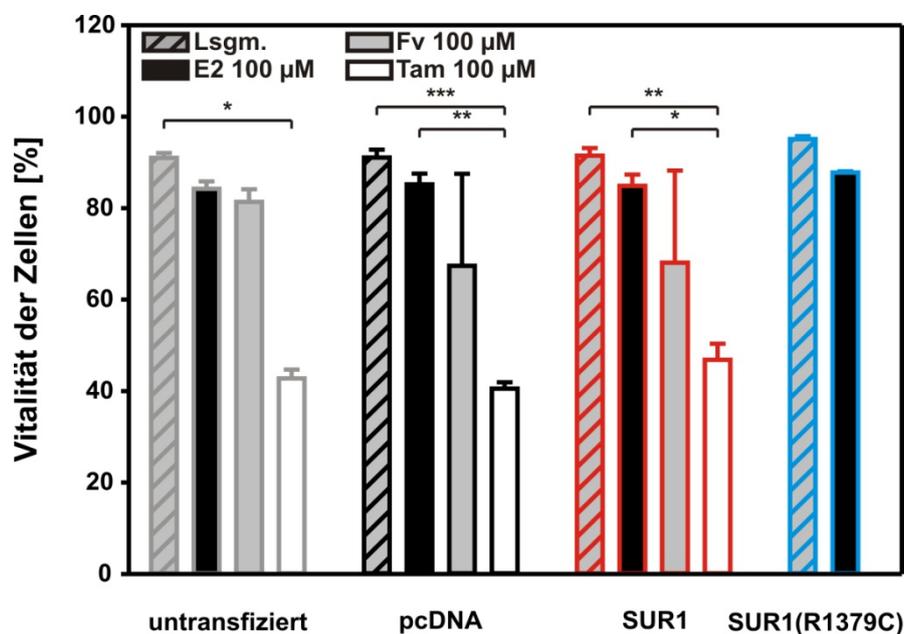


Abb. 24: Tamoxifen vermindert die Zellvitalität von MCF7-Zellen im Vergleich zur Behandlung mit E2 oder Fv. Die Bestimmung der Zellvitalität mittels Zellcounter erfolgte nach Behandlung mit E2 bzw. ER-Modulatoren. Abgebildet sind, in Bezug auf die Rahmenfarbe, untransfizierte Zellen in grau, pcDNA-Kontrollzellen in schwarz, SUR1 exprimierende Zellen in rot und Zellen, die eine SUR1-Punktmutation exprimieren, in hell blau (Es wird angemerkt, dass für die Expression von SUR1(R1379C) keine Überprüfung stattgefunden hat, siehe auch 5.2.1). Dargestellt ist die Vitalität der stabil transfizierten MCF7-Zellen als Mittelwerte \pm Standardfehler. Ergebnisse nach ANOVA mit anschließendem Tukey's Multiple Comparison Test. Zum Zeitpunkt der Untersuchung mit Fv und TAM standen leider keine SUR1(R1379C) exprimierenden MCF-Zellen mehr zur Verfügung. Es gilt Inkubationszeit 24h, untransfizierte Zellen und SUR1(R1379C) $n=3$, pcDNA und SUR1 behandelt mit Lsgm. und E2 $n=7$, behandelt mit Fv und TAM $n=4$.

Unter Kontrollbedingungen beträgt der Anteil vitaler Zellen 91-95%. Es gibt keine signifikanten Unterschiede zwischen den mit Lösungsmittel behandelten Zellen untereinander. Ebenso wenig unterscheiden sich die Zelllinien welche SUR1, beziehungsweise SUR1(R1379C) exprimieren oder die pcDNA-Kontrollzellen von den untransfizierten MCF7-Zellen nach E2, Fv oder TAM-Behandlung mit einer Konzentration von jeweils 100 μM . Die Behandlung mit E2 führt zu einem leichten Rückgang an vitalen Zellen auf 84-87%. Tendenziell senkt auch eine Behandlung mit Fulvestrant die Vitalität der Zellen. Signifikant unterschiedlich sind jedoch die Lösungsmittelkontrollen (DE), bzw. die E2 behandelten Zellen einer Gruppe, im Vergleich zu den mit Tamoxifen behandelten Zellen. Nach einer Behandlung mit Tamoxifen liegt die Zellvitalität nur noch bei 41-47%. Damit zeigt der Estrogenrezeptormodulator Tamoxifen eine um ca. 50% stärkere Wirkung als Estradiol selbst, bei einer eingesetzten Konzentration von jeweils 100 μM .

5.5 Radioligandenbindungsstudien zur Untersuchung einer möglichen Interaktion von Tamoxifen mit dem SUR1

Um zu untersuchen, ob und in welchem Ausmaß Tamoxifen direkt mit dem SUR1 interagiert, wurden Radioligandenbindungsstudien in Form von heterologen Wettbewerbsversuchen durchgeführt (siehe Kapitel 4.4). Als Radioligand wurde dabei Tritium (^3H) markiertes Glibenclamid eingesetzt.

Vorrausgehend wurde in unserer Arbeitsgruppe eine homologe Verdrängung mit dem Sulfonylharnstoffanalogon Glibenclamid (GBC) durchgeführt um den K_D -Wert zur Auswertung der heterologen Wettbewerbsversuche zu bestimmen (4.4.5).

Für die homologen Wettbewerbsversuche wurde Tritium markiertes Glibenclamid eingesetzt, welches mit zunehmenden Konzentrationen an unmarkiertem Glibenclamid von der Bindungsstelle am SUR1 verdrängt wurde. Die Versuche wurden an Membranfraktionen (siehe 4.1.5) von HEK293-Zellen durchgeführt, die den SUR1 überexprimieren.

Für diese Versuche wurde zur Verdrängung von ^3H -GBC, Glibenclamid in einem Konzentrationsbereich von 10^{-11} bis $10^{-3,25}$ M eingesetzt. Es erfolgt eine komplette Verdrängung bei den höchsten Konzentrationen. Aus den Mittelwerten der Einzelversuche wurde über das Programm SigmaPlot die bestmögliche Näherungskurve nach Vorgabe der Gleichung 20 (siehe 4.4.5) ermittelt. Unter der Annahme einer monophasischen Bindung ergab sich ein K_D -Wert von 3,1 nM (Hambrock, 2004).

In dieser Arbeit wurden vergleichend zu den homologen Verdrängungen mit GBC heterologe Wettbewerbsversuche durchgeführt. Dazu wurde Tritium markiertes Glibenclamid eingesetzt, welches mit zunehmenden Konzentrationen an unmarkiertem Verdränger (Tamoxifen) von der Bindungsstelle am SUR1 verdrängt wurde. Alle Versuche wurden in Anwesenheit von

MgATP durchgeführt, da dies die GBC-Affinität zu SUR1 reduziert (Hambrock, 2002) und nur unter diesen Bedingungen eine Verdrängung durch geringer-affine Substanzen wie E2 möglich ist (Ackermann et al., 2009).

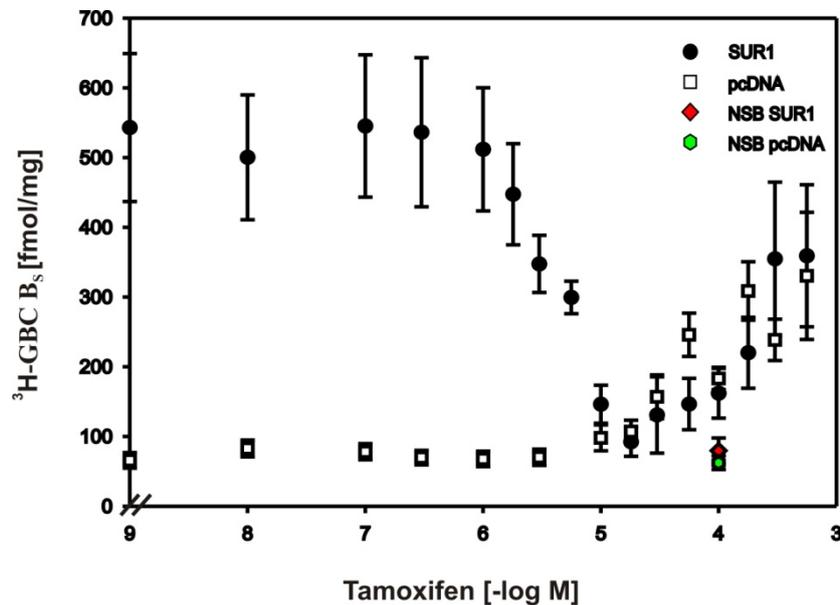


Abb. 25: Heterologe Wettbewerbsversuche mit ^3H -Glibenclamid als Radioligand und Tamoxifen als Inhibitor. Dargestellt ist die spezifische Bindung B_s und die Nicht-spezifische Bindung NSB von ^3H -GBC in fmol bezogen auf die eingesetzte Proteinmenge. Für Membrane von pcDNA-Zellen sind die Werte der totalen Bindung als weitere Kontrolle eingetragen, da diese auf der Höhe der nicht-spezifischen Bindung (NSB) von pcDNA-Zellmembranen liegen. Für SUR1 sind die Werte der spezifischen Bindung dargestellt. Die eingesetzten Tamoxifen Konzentrationen sind 1 nM-1 mM. Es gilt für jeden Datenpunkt von SUR1 $n=6-7$ und für pcDNA $n=3$.

Deutlich zu sehen ist der Unterschied zwischen den Messungen an Membranen von pcDNA-Kontrollzellen und SUR1 exprimierenden Zellen. Die maximale erreichte spezifische Bindung an Membranen von SUR1 exprimierenden Zellen betrug in den durchgeführten Experimenten 543 ± 106 [fmol/mg] und ist damit achtmal so hoch wie die entsprechenden Werte der pcDNA-Kontrollzellen mit 66 ± 11 [fmol/mg]. Das Ausmaß der gemessenen Bindung an Membranen der Kontrollzellen entspricht der nichtspezifischen Bindung der Kontrollzellen. Im Gegensatz zu den SUR1 exprimierenden Zellen kommt es somit mit steigender Tamoxifenkonzentration an den Membranen der Kontrollzellen wie erwartet zu keiner Verdrängung von Tritium-markiertem Glibenclamid durch Tamoxifen. Ab einer Konzentration von $30 \mu\text{M}$ TAM in der Probe sieht man einen Anstieg der Bindung sowohl bei den Kontrollzellen als auch bei SUR1-exprimierenden Zellen. In den folgenden Auswertungen wurden die höheren Konzentrationen daher nicht berücksichtigt.

Um einzelne Versuche nach Ermittlung der spezifischen Bindung durch Tamoxifen besser miteinander vergleichen zu können, wurden die einzelnen Messpunkte normiert, indem die B_s -Werte [fmol/mg] in % angegeben werden. Hier entspricht B_{tot} dem Wert bei 100 %.

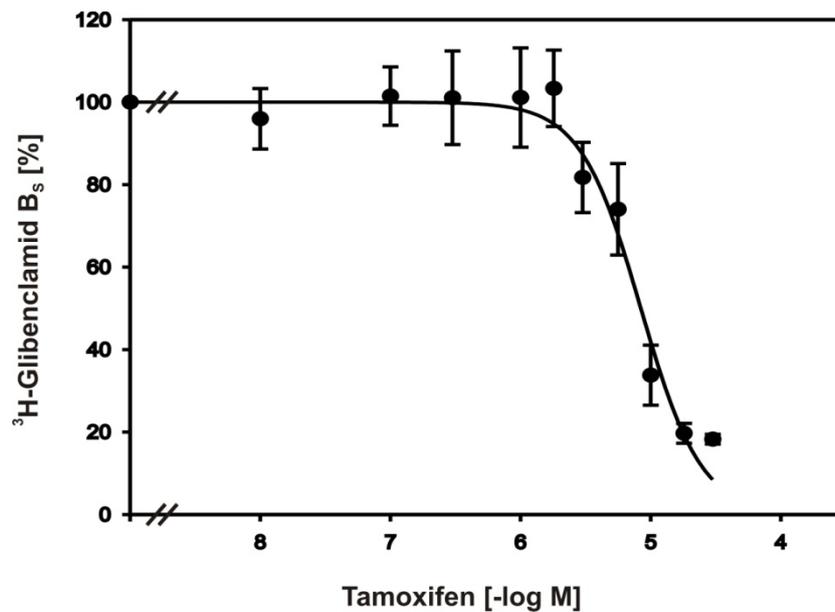


Abb. 26: Heterologe Wettbewerbsversuche mit Tamoxifen an SUR1. Dargestellt ist die spezifische Bindung B_s in %. Die eingesetzten Konzentrationen von Tamoxifen sind 1 nM-30 μ M. Als tatsächlich eingesetzte Konzentration an 3 H-GBC wurde aus den Einzelversuchen ein Mittelwert mit SEM von $0,65 \pm 0,02$ nM ermittelt. Es gilt für jeden Datenpunkt $n=6-7$, ein Hill-Koeffizient von 1,9 wurde ermittelt mit SigmaPlot unter Vorgabe der Gleichung 20 (siehe 4.4.5).

In den heterologen Wettbewerbsversuchen mit Tamoxifen wurde eine Konzentrationsreihe von 1 nM-30 μ M als Inhibitor eingesetzt (Abb. 26). Die berechnete Amplitude der Verdrängung der spezifischen Bindung von 3 H-Glibenclamid beträgt $83,0 \pm 1,6$ %. Auch mit darüber hinaus gehenden Konzentrationen an Tamoxifen konnte keine weitere Verdrängung erreicht werden (siehe Abb.25). Über das Programm SigmaPlot wurde eine bestmögliche Näherungskurve unter Vorgabe der Gleichung 20 (siehe 4.4.5) ermittelt, dabei ergaben sich ein Hill-Koeffizient von $1,9 \pm 0,3$ und ein IC_{50} -Wert von $7,4 \pm 1,1$ μ M.

In den sieben Einzelversuchen kam es teilweise zu erheblichen Schwankungen bei den Hillkoeffizienten ($1,9 \pm 0,33$) dabei lag der Hillkoeffizient überwiegend bei $1,2 \pm 0,02$. Für nachfolgende Auswertungen wurde darum eine monophasische Bindung angenommen.

Setzt man nun den K_D -Wert aus der homologen Verdrängung 3 H-Glibenclamid/Glibenclamid (K_D -Wert 3,1 nM (Hambrock, 2004)) ein um die K_i -Werte zu berechnen, erhält man unter Berücksichtigung der Cheng-Prusoff-Korrektur (siehe 4.4.5) einen K_i -Wert von $6,1 \pm 0,9$ μ M für Tamoxifen.

5.6 Analyse der Genexpression nach Behandlung mit E2 in HEK293-Zellen die pcDNA, SUR1 oder SUR1(R1379C) exprimieren

Um zu überprüfen, ob der SUR1-vermittelte apoptotische Effekt, ausgelöst durch E2, über eine spezifische Veränderung auf der Ebene der Genregulation hervorgerufen wird, wurde eine Genexpressionsanalyse durchgeführt. Dazu wurden HEK293-Zellen, transfiziert mit

dem Vektor pcDNA (pcDNA-Kontrollzellen) alleine, oder dem Vektor mit einer Insertion für SUR1 oder SUR1(R1379C) verwendet. Es erfolgte einer Inkubation der Zellen mit 100 μ M E2 oder dem Lösungsmittel (DMSO/EtOH) als Kontrolle für 8h. Die Inkubationszeit von 8h wurde in Vorversuchen als der Zeitpunkt ermittelt, bei welchem die ersten mikroskopisch sichtbaren Veränderungen der behandelten Zellen auftraten. Danach wurden die Zellen (jeweils n=3 [Replikatenset A, B, und C]), nach Aufarbeitung in unserem Labor (siehe 4.1.4) anhand eines *Agilent Whole Genome Oligo Microarray* der Firma Miltenyi Biotec analysiert. Nach einer Pre-Prozessierung und Normalisierung der Daten auf die logarithmischen Intensitäten (log₂) erfolgte eine diskriminatorische Gen Analyse (DGA) durch die Firma Miltenyi Biotec. Um eventuelle biologisch bedeutungsvolle Expressionsveränderungen beschreiben zu können, wurde dabei eine Kombination aus Signifikanz und dem Maßstab der x-fachen Vergrößerung bzw. Verkleinerung (*fold-change*) verwendet. Als Basislinie wurden die Werte der pcDNA-Kontrollzellen behandelt mit Lösungsmittelkontrolle verwendet. Aus dem Verhältnis der log₂- Intensitäten wurde ein zweifarbiges Diagramm zur Visualisierung der Veränderungen angefertigt (Abb. 27).

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------|------|------|-----|-----|-----|----|----|----|------|----|------|---|---|---|----|----|----|-----|-----|
| fold-change | -256 | -128 | -64 | -32 | -16 | -8 | -4 | -2 | -1,5 | ±1 | 1,5 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | 64 | 128 | 256 |
| log ₂ | -8 | -7 | -6 | -5 | -4 | -3 | -2 | -1 | -0,6 | 0 | 0,58 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |

Abb. 27: Schema der Äquivalenz von x-facher Veränderung (fold-change) und dem Verhältnis der log₂-Intensitäten der Daten. Aus den auf den Hintergrund korrigierten Intensitäten der einzelnen Reporter wurden die p-Werte errechnet, welche indizieren, wie stabil eine Intensität eines bestimmten Reporters über dem Hintergrund detektiert werden kann. Dabei wurden Werte mit p>0,01 als nicht ausreichend unterschiedlich zum Hintergrund bewertet. Um Unterschiede zwischen den einzelnen Arrays zu kompensieren, wurden die logarithmischen Intensitäten einer quantilen Normalisierung unterzogen (log₂). Zur vereinfachten Visualisierung der Änderungen in der Genexpression einzelner Reporter wurde das Verhältnis der Intensitäten der behandelten Proben zu den entsprechenden Kontrollen (pcDNA behandelt mit Lösungsmittel) gebildet. In dem zweifarbigen Diagramm ist ein positives Verhältnis (die Expression des Reportergens liegt über der der entsprechenden Kontrollen) in rot dargestellt, ein negatives Verhältnis (die Expression des Reportergens liegt unter der der entsprechenden Kontrollen) ist in grün dargestellt. Diese Berechnungen und Darstellung wurden im Rahmen einer diskriminatorischen Genanalyse von der Firma Miltenyi Biotec durchgeführt.

5.6.1 Veränderungen in der Expression bestimmter Gene nach Behandlung mit E2

Zunächst wurde in allen drei Zelltypen (HEK293-Zellen die pcDNA, SUR1 oder SUR1(R1379C) exprimieren) untersucht, welche Gene durch Behandlung mit E2 reguliert werden. Bezogen wurde die Regulation jeweils auf die entsprechende Probe, welche mit Lösungsmittel inkubiert wurde. Dazu wurden die normalisierten Intensitäten (log 2) einmal einem Signifikanztest innerhalb der Gruppe unterzogen und ergänzend ein Test zu den mittleren Expressionsunterschieden zwischen den zwei Gruppen (Behandlung mit E2 oder Lsgm.) durchgeführt. Beispielhaft ist nachfolgend ein Auszug aus der Ergebnistabelle für die Kontrollzellen dargestellt (Abb. 28).

| Annotation | | centered intensities | | | | | | | | | | | | | | | | | | Statistics | | |
|--------------|--------------|----------------------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----------------|----------|--------|
| Seqcode | SeqName | pc DE | | | pc EST | | | S DE | | | S EST | | | M DE | | | M EST | | | DE vs EST (Pc) | | |
| | | A | B | C | A | B | C | A | B | C | A | B | C | A | B | C | A | B | C | p-val | B/H | log FC |
| A_24_P200420 | SLC7A11 | 0.12 | 0.00 | -0.94 | 3.58 | 2.71 | 2.91 | -0.23 | 0.33 | 0.17 | 2.78 | 3.19 | 3.16 | -0.34 | -0.21 | -1.49 | 3.50 | 3.43 | 2.92 | 9.81E-03 | 2.04E-01 | 3.336 |
| A_32_P42684 | SLC7A11 | -0.02 | 0.06 | 0.00 | 3.35 | 2.71 | 3.20 | 0.47 | -0.14 | -0.07 | 3.26 | 3.21 | 3.17 | 0.16 | 0.01 | -0.05 | 3.55 | 3.19 | 3.02 | 5.03E-03 | 1.99E-01 | 3.070 |
| A_32_P165477 | SLC7A11 | -0.46 | 0.10 | 0.00 | 2.62 | 2.65 | 3.05 | -0.19 | -0.31 | 0.16 | 2.58 | 3.08 | 3.28 | -0.60 | -0.15 | -0.03 | 2.78 | 3.12 | 2.78 | 3.44E-03 | 1.94E-01 | 2.894 |
| A_23_P415611 | NHEDC1 | 0.04 | 0.00 | -0.37 | 2.57 | 2.57 | 2.83 | 1.03 | 0.30 | 0.69 | 2.73 | 3.23 | 3.08 | -0.14 | -0.52 | -0.54 | 2.33 | 2.49 | 2.38 | 6.09E-03 | 2.01E-01 | 2.768 |
| A_23_P255672 | ABLIM2 | 0.00 | -0.07 | 0.12 | 2.79 | 2.38 | 2.81 | -0.08 | -0.50 | 0.64 | 2.77 | 2.51 | 2.41 | -0.17 | 1.14 | 1.95 | 2.34 | 2.18 | 2.51 | 1.44E-03 | 1.92E-01 | 2.639 |
| A_23_P101564 | FGF21 | -0.01 | 0.35 | 0.00 | 2.81 | 2.54 | 2.66 | 0.31 | -0.27 | 0.71 | 2.78 | 2.74 | 2.69 | 0.63 | -0.38 | -0.06 | 2.95 | 2.83 | 2.96 | 5.51E-03 | 2.00E-01 | 2.553 |
| A_24_P618247 | CR616551 | -0.04 | 0.00 | 0.00 | 2.50 | 2.20 | 2.88 | -0.05 | -0.01 | 0.02 | 2.20 | 3.00 | 2.06 | -0.04 | 0.06 | 0.06 | 3.33 | 3.15 | 3.40 | 5.89E-03 | 2.00E-01 | 2.538 |
| A_23_P126103 | CTH | 0.04 | -0.33 | 0.00 | 2.73 | 1.81 | 2.61 | 0.11 | -0.34 | -0.07 | 2.99 | 2.60 | 3.09 | 0.18 | -0.29 | -0.24 | 3.27 | 3.09 | 3.02 | 4.74E-03 | 1.95E-01 | 2.482 |
| A_24_P912439 | AKNA | -0.06 | 0.00 | 0.07 | 2.47 | 2.05 | 2.80 | 0.86 | 0.91 | 0.05 | 3.28 | 3.05 | 2.58 | -0.05 | 0.02 | -0.04 | 2.02 | 2.62 | 2.08 | 6.90E-03 | 2.03E-01 | 2.436 |
| A_23_P14863 | CHAC1 | 0.00 | 0.17 | 0.00 | 2.79 | 2.32 | 2.31 | -0.12 | -0.05 | 0.00 | 2.88 | 2.70 | 2.53 | -0.02 | 0.30 | 0.21 | 3.07 | 2.97 | 2.78 | 6.10E-03 | 2.01E-01 | 2.418 |
| A_32_P50670 | BM807051 | -0.14 | 0.04 | 0.00 | 2.45 | 2.05 | 2.56 | -0.08 | -0.45 | -0.06 | 2.53 | 2.62 | 2.84 | -0.27 | -0.25 | -0.30 | 2.65 | 2.85 | 2.71 | 6.06E-03 | 2.01E-01 | 2.388 |
| A_23_P151307 | RAPGEF3 | 0.11 | -0.22 | 0.00 | 2.46 | 1.96 | 2.60 | -0.77 | 1.49 | -0.38 | 2.78 | 2.88 | 2.65 | -0.61 | -0.55 | -0.72 | 3.04 | 3.34 | 3.29 | 2.69E-03 | 1.94E-01 | 2.375 |
| A_23_P420236 | PCDH9 | 0.00 | 0.72 | -0.17 | 2.71 | 2.71 | 2.22 | 0.89 | 0.55 | -0.29 | 2.40 | 2.71 | 2.11 | 0.55 | -0.05 | -0.27 | 2.12 | 3.02 | 2.50 | 7.80E-03 | 2.00E-01 | 2.361 |
| A_32_P306678 | AB051467 | 0.00 | -0.09 | 0.07 | 1.98 | 2.46 | 2.22 | 0.66 | -0.06 | -0.03 | -0.07 | 2.25 | 2.48 | 1.44 | 0.34 | 0.26 | 2.76 | 2.70 | 2.59 | 5.53E-03 | 2.00E-01 | 2.226 |
| A_23_P414343 | MT1H | -0.32 | 0.00 | 0.17 | 2.24 | 2.04 | 2.19 | -0.22 | 0.03 | 0.55 | 2.19 | 2.27 | 2.93 | -0.66 | -0.37 | 0.03 | 1.75 | 1.85 | 2.16 | 6.37E-03 | 2.01E-01 | 2.203 |
| A_32_P303242 | MT1X | -0.13 | 0.00 | 0.18 | 2.24 | 2.04 | 2.28 | -0.23 | 0.03 | 0.55 | 2.25 | 2.33 | 2.97 | -0.68 | -0.36 | 0.09 | 1.77 | 1.84 | 2.22 | 2.22E-03 | 1.94E-01 | 2.169 |
| A_24_P125096 | MT1X | -0.12 | 0.00 | 0.16 | 2.34 | 1.99 | 2.16 | -0.14 | -0.02 | 0.50 | 2.27 | 2.11 | 2.92 | -0.68 | -0.33 | 0.07 | 1.69 | 1.76 | 2.02 | 5.26E-03 | 2.00E-01 | 2.149 |
| A_23_P427703 | MT1L | -0.28 | 0.00 | 0.23 | 2.15 | 1.91 | 2.08 | -0.15 | 0.08 | 0.56 | 2.21 | 2.16 | 2.79 | -0.51 | -0.15 | 0.10 | 1.72 | 1.81 | 1.92 | 7.90E-03 | 2.03E-01 | 2.062 |
| A_23_P411296 | CEBPB | 0.10 | 0.00 | -0.17 | 2.37 | 1.72 | 2.00 | 0.08 | -0.42 | -0.49 | 2.54 | 2.08 | 2.02 | -0.10 | -0.22 | -0.47 | 2.66 | 2.34 | 2.27 | 6.74E-03 | 2.03E-01 | 2.054 |
| A_24_P170747 | AK096849 | -0.05 | 0.00 | 0.04 | 1.81 | 1.97 | 2.29 | -0.07 | 0.00 | 0.03 | 0.36 | 2.04 | 1.94 | 0.24 | 0.07 | 0.19 | 0.35 | 1.76 | 1.52 | 3.33E-03 | 1.94E-01 | 2.032 |
| A_23_P206707 | MT1G | -0.56 | 0.00 | 0.23 | 1.62 | 2.06 | 2.07 | -0.67 | 0.08 | 0.53 | 1.66 | 2.28 | 2.82 | -0.83 | -0.18 | 0.15 | 1.20 | 1.89 | 1.91 | 2.33E-03 | 1.94E-01 | 2.031 |
| A_23_P60933 | MT1G | -0.17 | 0.00 | 0.21 | 2.21 | 1.85 | 2.02 | -0.09 | 0.07 | 0.57 | 2.24 | 2.11 | 2.81 | -0.40 | -0.17 | 0.17 | 1.79 | 1.76 | 2.10 | 7.99E-03 | 2.03E-01 | 2.012 |
| A_23_P252413 | MT2A | 0.00 | -0.14 | 0.04 | 2.38 | 1.60 | 1.87 | 0.05 | -0.11 | 0.37 | 2.43 | 1.74 | 2.74 | -0.15 | -0.29 | 0.15 | 1.98 | 1.58 | 1.98 | 9.91E-03 | 2.04E-01 | 1.983 |
| A_24_P783122 | AK123722 | -0.34 | 0.05 | 0.00 | -1.75 | -1.47 | -1.08 | 0.05 | -0.31 | 0.02 | -2.26 | -1.38 | -0.50 | -1.06 | 2.41 | -0.40 | -0.88 | -0.87 | -1.94 | 9.59E-03 | 2.04E-01 | -1.335 |
| A_32_P407245 | DNAJC22 | 0.09 | 0.00 | -0.08 | -1.20 | -1.27 | -1.54 | 0.07 | -0.20 | -0.16 | -1.25 | -1.67 | -1.71 | -0.38 | -0.18 | -0.07 | -1.69 | -1.65 | -1.68 | 2.04E-03 | 1.94E-01 | -1.346 |
| A_32_P500936 | FOXA2 | 0.15 | 0.00 | -0.36 | -1.21 | -1.44 | -1.63 | -0.09 | -0.39 | -0.49 | -1.27 | -1.80 | -1.78 | -0.59 | -0.49 | -0.40 | -1.67 | -1.99 | -1.63 | 1.16E-03 | 1.92E-01 | -1.355 |
| A_23_P385690 | WNT3A | 0.00 | -0.04 | 0.00 | -1.18 | -1.42 | -1.51 | -0.26 | -0.46 | -0.45 | -1.55 | -1.98 | -2.03 | -0.67 | -0.35 | -0.74 | -2.01 | -2.34 | -1.81 | 4.67E-03 | 1.95E-01 | -1.360 |
| A_32_P38436 | AW856073 | 0.23 | 0.00 | -0.09 | -0.96 | -1.30 | -1.71 | 0.15 | 0.42 | 0.01 | -0.10 | -2.41 | -2.46 | -0.37 | -0.51 | -0.42 | -2.84 | -2.70 | -2.54 | 8.61E-03 | 2.03E-01 | -1.366 |
| A_32_P54746 | BC021184 | -1.15 | 1.17 | 0.00 | -2.45 | -0.20 | -1.46 | -0.53 | -0.45 | -0.36 | -1.35 | -0.29 | -1.24 | -0.34 | 0.05 | -0.08 | -1.61 | 0.17 | -1.12 | 1.20E-03 | 1.92E-01 | -1.376 |
| A_24_P365515 | FOXA2 | 0.36 | 0.00 | -0.21 | -1.10 | -1.41 | -1.69 | 0.17 | -0.27 | -0.16 | -1.38 | -1.69 | -1.63 | -0.21 | -0.42 | -0.46 | -1.53 | -1.82 | -1.66 | 2.37E-04 | 1.92E-01 | -1.449 |
| A_23_P133739 | HUS1B | 0.00 | 0.06 | -0.13 | -1.30 | -1.45 | -1.70 | -0.33 | -0.20 | -0.02 | -1.69 | -1.76 | -1.44 | -0.38 | -0.14 | 0.12 | -1.28 | -1.81 | -1.62 | 3.12E-03 | 1.94E-01 | -1.460 |
| A_24_P192301 | SEMA3A | 0.36 | -1.22 | 0.00 | -0.87 | -2.66 | -1.72 | 0.44 | 0.06 | 0.25 | -2.71 | -1.97 | -0.29 | -0.13 | 0.52 | 0.83 | -0.90 | -0.77 | -0.76 | 9.52E-03 | 2.04E-01 | -1.463 |
| A_23_P253661 | DNAJC22 | -0.20 | 0.00 | 0.02 | -1.64 | -1.41 | -1.54 | -0.15 | -0.24 | -0.02 | -2.16 | -1.85 | -1.77 | -0.49 | -0.36 | -0.25 | -2.21 | -1.86 | -2.26 | 8.95E-04 | 1.92E-01 | -1.470 |
| A_23_P339818 | ARRDC4 | -0.05 | 0.00 | 0.46 | -1.45 | -1.42 | -1.17 | 0.09 | 0.08 | 0.09 | -1.33 | -1.51 | -1.13 | 0.13 | 0.09 | 0.40 | -1.36 | -1.04 | -0.87 | 2.30E-03 | 1.94E-01 | -1.480 |
| A_32_P111394 | THC2643957 | 0.07 | 0.00 | -1.00 | -1.49 | -1.54 | -2.35 | 0.22 | -0.19 | -0.66 | -0.76 | -1.84 | -2.52 | -0.20 | -0.61 | -0.70 | -1.96 | -2.21 | -2.69 | 1.87E-03 | 1.94E-01 | -1.484 |
| A_23_P28927 | A_23_P28927 | 0.32 | 0.00 | -0.24 | -1.23 | -1.48 | -1.68 | 0.05 | -0.28 | -0.25 | -1.36 | -1.56 | -1.81 | -0.20 | -0.35 | -0.74 | -1.71 | -1.96 | -1.67 | 5.67E-04 | 1.92E-01 | -1.489 |
| A_23_P37727 | CX3CL1 | 0.29 | -0.08 | 0.00 | -1.17 | -1.54 | -1.68 | -0.15 | -0.49 | -0.32 | -1.24 | -2.34 | -1.78 | -0.37 | -0.31 | -0.43 | -1.49 | -2.08 | -1.26 | 2.25E-03 | 1.94E-01 | -1.536 |
| A_23_P138655 | CYP26A1 | 0.10 | -0.12 | 0.00 | -1.38 | -1.76 | -1.71 | 0.11 | -0.05 | 0.14 | -1.79 | -2.07 | -1.72 | 0.30 | 0.29 | 0.41 | -1.75 | -1.78 | -1.64 | 1.83E-03 | 1.94E-01 | -1.610 |
| A_32_P173955 | A_32_P173955 | -0.16 | 0.00 | 0.01 | -1.54 | -1.75 | -1.73 | 0.01 | 0.12 | 0.01 | -1.22 | -1.77 | -1.98 | 0.09 | -0.04 | 0.05 | -1.88 | -1.86 | -1.84 | 5.74E-03 | 2.00E-01 | -1.623 |
| A_24_P199251 | RASSF9 | 0.24 | 0.00 | -0.53 | -1.72 | -2.41 | -2.33 | 0.70 | -0.05 | 0.16 | -2.45 | -2.32 | -2.40 | 0.88 | 0.90 | 0.78 | -1.80 | -2.35 | -2.04 | 7.72E-03 | 2.03E-01 | -2.060 |
| A_23_P97700 | TXNIP | 0.00 | 0.20 | -0.17 | -3.25 | -2.59 | -2.86 | -0.03 | -0.27 | -0.11 | -3.06 | -2.88 | -2.55 | -0.21 | -0.23 | -0.57 | -3.57 | -3.33 | -3.17 | 3.58E-03 | 1.95E-01 | -2.905 |

Abb. 28. Auszug aus den auf E2 ansprechenden Genen in Kontrollzellen (pcDNA, Lösungsmittelkontrolle). In der Abbildung sind lediglich die oberste und die unterste Sektion der Ergebnistabelle, erstellt durch die Firma Miltenyi Biotec, aufgezeigt. Die von der Firma verwendeten Abkürzungen stellen sich wie folgt dar: pc = pcDNA-Kontrollzellen, S = SUR1, M = Mutante (SUR1(R1379C)), DE = Lösungsmittelkontrolle DMSO/EtOH und EST = E2.

Bei einer Analyse zur Genexpression mit einem Ansatz von 40.000 Reportergenen würde man auch in der Abwesenheit einer spezifischen Regulation, das Erreichen von $p < 0,01$ von 400 Genen erwarten. Dass eine Regulation durch E2 erfolgt, zeigt auch die Anzahl der in der Expression veränderten Gene. Hier zeigen alle drei untersuchten Zelltypen sehr ähnliche Ergebnisse in der Anzahl der regulierten Gene (pcDNA-Kontrollzellen $n = 2007$, SUR1 = 2527 und SUR1(R1379C) = 2564) und der durch E2 induzierten Expressionsveränderung. Das Gen, welches nach Behandlung mit E2, in allen Ansätzen, am stärksten hochreguliert wurde, ist das des Cystein/Glutamat Transporters SLC7A11. Unter den am stärksten induzierten Reportern befinden sich einige, die mit den Metallothioneinen Genen assoziiert sind (u.a. MT1H, 1X, 1L, 1G, MT2A). Die stärkste Senkung in der Regulation zeigt sich für das mit Thioredoxin interagierende Protein TXNIP.

Obwohl diese Gene nach Behandlung mit E2 in allen untersuchten Zelltypen konsequent hoch- bzw. herunter-reguliert wurden, erreicht keiner der Werte eine gute statistische Signifikanz. Laut der bioinformatischen Analyse der Firma Miltenyi Biotec liegt dies jedoch an der geringen Anzahl an Replikaten mit $n=3$ pro Gruppe. Um dies zu verifizieren, wurden die unterschiedlichen Zelltypen (pcDNA, SUR1 und SUR1(R1379C) nach Behandlung mit E2

beziehungsweise Lösungsmittel zusammengefasst und erneut eine DGA durchgeführt. Dabei konnte das zuvor beschriebene Ergebnis mit signifikanten Werten festgestellt werden.

5.6.2 Unterschiede bezüglich der Expression bestimmter Gene zwischen den Zelltypen vor und nach Behandlung mit E2

In einem weiteren Ansatz wurden DGAs durchgeführt, um Gene zu ermitteln, die in den unterschiedlichen Zelltypen (pcDNA, SUR1 und SUR1(R1379C)) bei gleicher Behandlung unterschiedlich exprimiert werden. Für alle nachfolgenden DGAs konnten nach einer Korrektur der Intensitäten auf den Hintergrund (Beschreibung siehe 5.6) keine Reportergene ermittelt werden die eine statistisch signifikante Veränderung in ihrer Aktivität aufweisen. Jedoch zeigen einige Reportergene eine deutliche Regulation über den Schwellenwert (p -value < 0,01) hinaus. Diese veränderten Gene sind nachfolgend zusammengestellt.

Tabelle 12: DGA unterschiedlicher Zelltypen bei gleicher Behandlung.

| Vergleich | Behandlung | hoch(↑) bzw. herunter (↓) reguliert | Genregulation |
|------------------------|------------|--|---|
| pcDNA vs. SUR1 | E2 | in SUR1 ↑ in SUR1 ↓ | CRB1, ABCC8, FGB, TEK, MYOK Keine herab-regulation der Gene |
| pcDNA vs. SUR1(R1379C) | E2 | in SUR1(R1379C) ↑ in SUR1(R1379C) ↓ | ABCC8, CTPS2, C1ORF67, PRKCB, SYT4 PRPS2, AGBL2, CXCL12 |
| SUR1 vs. SUR1(R1379C) | E2 | in SUR1 ↑ in SUR1(R1379C) ↑ in SUR1 ↓ in SUR1(R1379C) ↓ | CRB1, DKFZP547L112, FGB, TEK, C1ORF67, CTPS2, RASGEF1B, PRKCB, C6ORF59 A_24P297307, CCDC89 PRPS2, A_32_P228254 |
| pcDNA vs. SUR1 | Lsgm. | in SUR1 ↑ in SUR1 ↓ | CRB1, ABCC8, FGB, TEK, MYOK, OAS3 Keine herab-regulation der Gene |
| pcDNA vs. SUR1(R1379C) | Lsgm. | in SUR1(R1379C) ↑ in SUR1(R1379C) ↓ | ABCC8, CTPS2, C1ORF67, PRKCB, SYT4, TBX4 PRPS2, AGBL2, CXCL12, PTN, LINGO2 |
| SUR1 vs. SUR1(R1379C) | Lsgm. | in SUR1 ↑ in SUR1(R1379C) ↑ | CRB1, DKFZP547L112, FGB, TEK, C1ORF67, CTPS2, RASGEF1B, PRKCB, C6ORF59, C1ORF87, TBX4 PRPS2, ZNF826, LINGO2 |

in SUR1(R1379C) ↓

Auffallend ist, dass nur eine kleine Anzahl an Genen eine konsistente Veränderung in ihrer Expression durch SUR1 Überexpression zeigt. Lediglich das Gen *ABCC8*, welches den SUR1 codiert, und der Reporter *A_23_P85932* mit unbekannter Funktion scheinen sowohl in SUR1 als auch in SUR1(R1379C) exprimierenden Zellen induziert zu sein. Die anderen Gene, die jeweils in den stark-regulierten Bereichen der Ergebnistabellen liegen, scheinen spezifisch für die Überexpression von SUR1 oder SUR1(R1379C) zu sein. Die Überexpression von SUR1 in den HEK293-Zellen führt zum Beispiel zu einer verstärkten Genexpression von MYOK (Myocilin, trabecular meshwork inducible glucocorticoid response) und OAS3 (2'-5'-oligoadenylate synthetase 3), während eine Überexpression von SUR1(R1379C) mit einer verstärkten Expression von PRKCB (Protein kinase C beta) einher geht. Keinen erkennbaren Effekt zeigt jedoch die unterschiedliche Behandlung mit E2 oder der Lösungsmittelkontrolle D/E.

Demnach treten verschiedene Änderungen durch die Überexpression von SUR1 und die von SUR1(R1379C) auf, welche sich auch von den Expressionsmustern der entsprechenden pcDNA-Kontrollzellen unterscheiden.

5.6.3 Untersuchung der Genexpressions-Analysen auf endogen vorkommende Estrogenrezeptoren, ABC-Proteine und wichtige Enzyme

Für verschiedene Versuchsansätze dieser Arbeit spielen unterschiedliche, in den HEK293-Zellen möglicherweise endogen vorkommende, Proteine eine besondere Rolle. Mit Hilfe des *Agilent Whole Genome Oligo Microarray* konnten die eingesetzten HEK293-Zellen auf vorhandene Gene für Estrogenrezeptoren, ABC-Proteine und für die Umsetzung der SERMs erforderlichen Cytochrom P450-Enzyme untersucht werden.

Tabelle 13: Für diese Arbeit wichtige, möglicherweise endogen vorhandene Gene in den untersuchten HEK293-Zellen.

| Estrogenrezeptoren | ABC-Proteine | Cytochrom P450-Proteine |
|--|---|--|
| ER α (<i>NR3A1</i>), nicht vorhanden ER β (<i>NR3A1</i>), nicht vorhanden GPER (<i>GPER</i>), vorhanden | Verschiedene Vertreter aus den <i>ABCA</i> , <i>ABCB</i> , <i>ABCC</i> , <i>ABCD</i> , <i>ABCE</i> , <i>ABCF</i> , <i>ABCG</i> Subfamilien vorhanden* | <i>CYP2D6</i> , vorhanden <i>CYP3A4</i> , vorhanden |

* *ABCA*2,5,10,12; *ABCB*1,4,5,7,8,9,10,11; *ABCC*3,4,5,9,13; *ABCD*1,2,3,4; *ABCE*1; *ABCF*1,2,3; *ABCG*1,2,4,5,8

In der durchgeführten DGA zeigen sich Hinweise auf eine herunter-Regulierung des GPER um den Faktor 1,5 - 2 nach der Behandlung mit E2 in allen untersuchten Zelltypen. Aus allen Subfamilien der ABC-Proteine (A-G) sind Gene in den HEK293-Zellen vorhanden. Von besonderem Interesse sind hierbei die Vertreter der ABCB-Familie, welche das *Multidrug-Resistance* Protein kodieren, oder die Vertreter aus der ABCC-Familie, zu welcher auch der SUR1 zählt (Dean, 2013). Dabei sind besonders *ABCC6* (CFTR) und *ABCC9* (SUR2A δ) zu nennen. Hinweise auf eine Regulierung der Gene der ABC-Proteine nach Behandlung mit E2 konnte in keinem der untersuchten Zelltypen, pcDNA, SUR1 und SUR1(R1379C), festgestellt werden. Von den Cytochrom P450-Enzymen, welche den in dieser Arbeit untersuchten SERM Tamoxifen in die metabolisch aktivere Form Hydroxytamoxifen umwandeln können (Fernandez-Santander et al., 2013; Hasler, 1999), sind in den verwendeten HEK293-Zellen *CYP2D6* und *CYP3A4* vorhanden. Hier zeigt sich in der durchgeführten DGA allgemein eine leichte hoch-Regulierung für *CYP2D6* nach Behandlung mit E2. Für *CYP3A4* ist keine Regulation zu erkennen.

6 Diskussion

Es sind verschiedene Regulations- und Modulationswege für die Insulinsekretion aus pankreatischen β -Zellen bekannt. In den β -Zellen der Langerhans-Inseln des Pankreas ist der K_{ATP} -Kanal an der Insulinausschüttung maßgeblich beteiligt (Aguilar-Bryan, 1995; Hinke, 2009; Proks et al., 2006). Die Insulinsekretion wird, außer über die Kanalaktivität, zudem moduliert und verstärkt durch K_{ATP} -Kanal unabhängige Wege z.B. über Inkretinhormone (Aizawa, 1998; Straub S. G.; Cosgrove, 2001). Zusätzlich wird die totale Menge an sezerniertem Insulin durch adaptive Veränderungen der β -Zellmasse reguliert. Dies geschieht über β -Zell Neogenese, Proliferation und Apoptose (Butler, 2003; Butler et al., 2007). Pathologische Veränderungen, wie ein längerfristig erhöhter Glukosespiegel oder hohe Konzentrationen an Lipiden können zum Zelltod der β -Zellen führen (Donath and Halban, 2004; Maedler et al., 2002). Auch insulinotrope Medikamente, wie die Sulfonylharnstoffe Glibenclamid und Tolbutamid, können eine gesteigerte Apoptoserate der pankreatischen β -Zellen hervorrufen (Donath and Halban, 2004; Efanova, 1998; Iwakura et al., 2000). Die einzelnen Mechanismen sind dabei jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt.

In vorausgehenden Arbeiten der Arbeitsgruppe (Hambrock et al., 2007; Hambrock et al., 2006) konnte nachgewiesen werden, dass sowohl der Naturstoff *trans*-Resveratrol als auch der Sulfonylharnstoff Glibenclamid an der Modulation von Apoptose, in rekombinanten SUR1-exprimierenden Zellen und auch in nativen β -Zellen aus isolierten Langerhans-Inseln, beteiligt ist. In einer weiteren Arbeit aus der Arbeitsgruppe (Ackermann et al., 2009) konnte nachgewiesen werden, dass das endogen vorkommende 17β -Estradiol, Apoptose spezifisch unter Beteiligung des Sulfonylharnstoffrezeptors 1 (SUR1) induzieren kann. Diese Apoptose-Induktion ist, sowohl in rekombinanten SUR1 exprimierenden Zellen als auch in nativen β -Zellen der Langerhans-Inseln, deutlich stärker als der Effekt von Glibenclamid oder Resveratrol. In rekombinanten Zellsystemen konnte gezeigt werden, dass diese Apoptose-Induktion durch verschiedene Mutationen mit pathophysiologischer Bedeutung beeinflusst werden kann.

6.1 Bestimmte Mutationen in den Nukleotidbindungsfalten des SUR1 können die Apoptose-Induktion durch E2 beeinflussen

Um die Rolle der regulatorischen Untereinheit SUR1 des pankreatischen K_{ATP} -Kanals, bei der Induktion von Apoptose nach 17β -Estradiolbehandlung näher zu untersuchen, wurden verschiedene apoptotische Parameter analysiert. Dabei wurde bei rekombinanten HEK293-Zellen die Zellvitalität zum einen über die Zellablösung vom Schalenboden (4.3.1) zum anderen die apoptotische Veränderung der Nukleus-Morphologie (4.3.2) sowie die Aktivität

verschiedener Caspasen (4.3.3) bestimmt. Die Auswertung dieser unterschiedlichen Parameter zeigte eine direkte Korrelation zwischen der gesteigerten Apoptoserate und der Expression der regulatorischen SUR1-Untereinheit. Dies wurde auch bereits in vorausgehenden Arbeiten der Arbeitsgruppe bestimmt und gezeigt (Ackermann et al., 2009) und kann mit meiner Arbeit bestätigt werden. In der vorliegenden Arbeit lag dabei der Schwerpunkt auf der Untersuchung, welche direkten Auswirkungen unterschiedliche SUR1-Punktmutationen auf die Apoptoserate in rekombinanten Zellsystemen, ausgelöst durch 17 β -Estradiol (E2), haben. Hierfür wurden einzelne in der Literatur beschriebene Mutationen ausgewählt, die in Patienten mit transientem neonatalem Diabetes mellitus (Patch et al., 2007) nachgewiesen wurden und für welche eine Steigerung der ATP-Hydrolyserate beschrieben wurde [SUR1(R1379C) und SUR1(R1379L)]. Erste Versuche dazu wurden bereits vorausgehend in der Arbeitsgruppe durchgeführt (Ackermann et al., 2009). Diese wurden von mir mit Mutationen verglichen, für welche eine Senkung der ATP-Hydrolyserate beschrieben wurde [SUR1(K719R) und SUR1(K1384M)] (de Wet et al., 2007a; de Wet et al., 2007b). Alle untersuchten Mutationen liegen in hochkonservierten Bereichen, den Nukleotid-Bindungsfalten (NBFs), des SUR1.

Die für die Versuche eingesetzten Zellen enthielten entweder cDNA, welche für SUR1 oder entsprechende SUR1-Mutationen (SUR1(K719R), SUR1(K1384M), SUR1(R1379C), SUR1(R1379L)) codierte und in den Expressionsvektor pcDNA3.1(+) inseriert war oder nur den leeren Transfektionsvektor pcDNA. Im folgenden Text werden entsprechende Zellen, welche nur den pcDNA-Vektor enthalten, als pcDNA-Kontrollzellen bezeichnet. Den Versuchen zum Verlust der Zellvitalität und der veränderten Kernmorphologie zufolge, ist im Vergleich zu den pcDNA-Kontrollzellen die Apoptoserate in SUR1 exprimierenden Zellen signifikant erhöht. Eine weitere Steigerung des Effektes ist in Zellen die SUR1(K719R), SUR1(K1384M), SUR1(R1379C) oder SUR1(R1379L) exprimieren sichtbar.

Um erste Hinweise auf beteiligte Signalwege bei der Apoptoseinduktion durch 17 β -Estradiol in rekombinanten HEK293-Zellen zu erhalten, wurde die Aktivität verschiedener Caspase-Isoenzyme analysiert (siehe 4.3.3). Dieser Arbeit vorausgehend konnte bereits gezeigt werden, dass besonders die Aktivität von Caspase 3 und Caspase 9 in SUR1-exprimierenden Zellen nach Behandlung mit 17 β -Estradiol erhöht ist, im Vergleich zu den pcDNA-Kontrollzellen (Ackermann et al., 2009). Nun wurden im Rahmen dieser Arbeit weitere Untersuchungen zu SUR1 und den Mutanten SUR1(R1379C), SUR1(R1379L), SUR1(K719R) und SUR1(K1384M) durchgeführt. Zunächst wurden die Aktivitäten verschiedener Caspasen nach Behandlung mit 17 β -Estradiol in SUR1- und, exemplarisch für die NBF-Mutanten, in SUR1(R1379C) exprimierenden HEK293-Zellen bestimmt. Einen signifikanten Anstieg kann man bei der Aktivität von Caspase 3 (Abb.4A), welche als Effektor-Caspase eine Rolle als zentrales Schlüsselenzym in Apoptoseprozessen einnimmt,

nach Behandlung mit 100µM E2 für 24 h erkennen. Dies gilt sowohl beim Vergleich der E2 behandelten Zellen zu den Lösungsmittel-Kontrollen als auch beim Vergleich von SUR1 zu SUR1(R1379C). Die Caspase 3 kann über die Initiator-Caspasen 8, 9 und 12 aktiviert werden. Einen deutlichen E2-induzierten Effekt zeigt die Caspase 9 in ihrer Aktivität, vor allem in Zellen welche SUR1(R1379C) exprimieren (Abb.11C). Caspase 9 wird über die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien aktiviert. Die untersuchten Caspasen 8 und 12 zeigen in SUR1 oder SUR1(R1379C) exprimierenden Zellen keine Veränderung in ihrer Aktivität nach Behandlung mit E2. Da bei diesem Vergleich Caspase 3 und Caspase 9 die prominentesten Veränderungen ihrer Aktivität zeigten, wurden diese Caspasen in Zellen welche Mutationen in den NBFs an den Positionen SUR1(K719R), SUR1(K1384M), SUR1(R1379C) oder SUR1(R1379L) aufweisen, vergleichend zu SUR1 exprimierenden Zellen näher untersucht (Abb.12). Es zeigt sich, dass alle untersuchten Mutanten eine signifikante Steigerung der Caspase 3 Aktivität nach Behandlung mit E2 im Vergleich zu SUR1 exprimierenden Zellen aufweisen. In allen NBF-Mutanten kam es zu einer signifikanten, E2-induzierten Steigerung der Caspase 9-Aktivität im Vergleich zu SUR1 exprimierenden Zellen.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass in rekombinanten HEK293-Zellen nicht nur über die Parameter der Zellablösung und der veränderten Kernmorphologie, sondern auch über eine gesteigerte Aktivität der Caspasen 3 und 9 eine deutliche Steigerung der Apoptoserate in Zellen, die eine NBF-Mutation exprimieren (SUR1(K719R), SUR1(K1384M), SUR1(R1379C) und SUR1(R1379L)) im Vergleich zu SUR1 exprimierenden Zellen aufgezeigt werden kann. Dabei wird in den untersuchten Zellen das ausführende Enzym der Apoptose, die Caspase 3, vermutlich über den mitochondrialen Apoptosepfad (Caspase 9) aktiviert. Dies passt zu Ergebnissen aus der Arbeit von Frau Dr. Ackermann (Ackermann et al., 2009).

Die NBFs stellen offensichtlich wesentliche strukturelle Elemente für die SUR1-vermittelte Apoptose dar. Die Frage, wieso die Apoptoserate in diesen Fällen erhöht ist, bleibt an dieser Stelle offen. Die untersuchten Mutationen liegen in den Walkerregionen der NBFs, welche charakteristisch für die NBFs von ABC-Proteinen sind und hochkonservierte Aminosäure-Sequenzbereiche, Motiv A und Motiv B, enthalten (Walker, 1982). Diese Motive spielen eine Rolle bei der Positionierung der Nukleotide, so interagiert das Lysin aus dem Motiv A mit dem $\beta\gamma$ -Phosphat des ATP, während Motiv B den Adeninring des ATP bindet (Saraste M, 1990; Walker, 1982). Die Bindung von MgATP beziehungsweise ATP an NBF1 und MgADP an NBF2 hat eine aktivierende Wirkung auf den Kanal (Matsuo et al., 2000; Ueda, 1999a). Die untersuchten Mutationen an Position 1379 liegen in dem Motiv A von NBF2. Wie von Ashcroft und deWet beschrieben führt diese Mutation zu einer Erhöhung der ATP-Hydrolyserate an NBF2, was einer Erhöhung der Wahrscheinlichkeit des Kanals in der

offenen Position und der damit einhergehenden Konformation entspricht (de Wet et al., 2007b). Die von uns untersuchte Mutationen SUR1(K719R) liegt in Motiv A in NBF1 und SUR1(K1384M) korrespondierend in NBF2, für beide wurde eine Senkung der ATP-Hydrolyserate und damit eine Erhöhung der Wahrscheinlichkeit des Kanals in geschlossener Position beschrieben (de Wet et al., 2007a). Anhand der Isoform SUR2B konnte gezeigt werden, dass wenn das konservierte Lysin aus dem Walker A Motiv gegen Arginin ausgetauscht wird, fast alle MgATP-Effekte auf die Bindung von Kanalblocker GBC und Kanalöffner P1075 aufgehoben werden. Diese Mutation verhindert die Nukleotid-induzierte Aktivierung (1.2.1) des Kanals indem der K_{ATP} -Kanal im prehydrolysierten Zustand gehalten wird (Amann et al., 2010). Erst kürzlich konnte anhand von ATP-Analoga nachgewiesen werden, dass bei SUR1 die Konformationsänderung durch die Dimerisierung der NBFs wahrscheinlich eine größere Rolle bei der K_{ATP} -Kanal-Aktivierung spielt als die enzymatische Aktivität (Ortiz et al., 2013). Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse deuten darauf hin, dass der erhöhte Verlust der Zellvitalität nach E2 Behandlung in den untersuchten SUR1-Mutanten nicht über die Hydrolyserate beeinflusst wird. Eventuell stellen Konformationsänderungen, ausgelöst durch die untersuchten Mutationen an den Positionen SUR1(K719R), SUR1(K1384M), SUR1(R1379C) und SUR1(R1379L) den eigentlichen Auslöser dar. Dazu passen die Ergebnisse von Chang et al., die zeigen dass SNARE-Proteine in direktem Kontakt zu den NBFs des SUR1 stehen (Chang et al., 2011). Besonders Mutationen die das Lysin in den Walker A Regionen betreffen, nämlich SUR1(K719M) in NBF1 und SUR1(K1385M) in NBF2, führten zu einem Verlust der Bindung von SUR1 zu dem SNARE-Protein Syntaxin-1A (Chang et al., 2011). Syntaxin-1A bindet und inhibiert unter anderem K_{ATP} -Kanäle und spielt so eine Rolle in der Vermittlung der exozytotischen Fusion der Insulinvesikel (Cui et al., 2004; Pasyk et al., 2004). Es ist möglich dass die von mir untersuchten Mutationen in den Walkerregionen zu Konformationsänderungen in den NBFs führen, welche zu einem Verlust des Kontaktes zu Syntaxin-1A führt. Unter physiologischen Bedingungen wäre die Inhibition des K_{ATP} -Kanals damit von dem SNARE-Protein Syntaxin-1A und somit der Insulinvesikel-Exocytose entkoppelt. Es ist denkbar dass diese Entkopplung ein, noch unbekanntes, internes Signal für den Zelltod der betroffenen Zelle darstellt, welches direkt oder indirekt zur Ausschüttung von Cytochrom c an den Mitochondrien und damit zur Aktivierung von Caspase 9 führt. Ein mögliches Zell-internes Signal stellt Ca^{2+} dar, von dem bekannt ist, dass es von pankreatische β -Zellen als Reaktion auf einen Stimulus durch E2 in physiologischen Konzentrationen freigesetzt wird. Einer Hypothese nach, erfolgt die Vermittlung dieser E2-induzierten Reaktion dabei über einen nicht-klassischen membranständigen Estrogenrezeptor mit bisher ungeklärter physiologischer Rolle (Nadal et al., 2004).

6.1.1 Untersuchungen zum Einfluss von endogenen Estradiolrezeptoren (ER) auf die E2 induzierten, SUR1 vermittelten Apoptose

E2 zeigt bereits bei Konzentrationen von 0,1 – 1,0 nM einen schnellen insulinotropen Effekt indem pankreatische K_{ATP} -Kanäle geblockt werden (Nadal, 1998). Ob E2 dabei direkt mit dem pankreatischen K_{ATP} -Kanal beziehungsweise seinen Untereinheiten interagiert oder mit einem bisher nicht näher charakterisierten nicht-klassischen Estrogenrezeptor, der über intrazelluläre Signalwege mit dem K_{ATP} -Kanal assoziiert ist, ist noch ungeklärt (Al-Majed, 2005; Nadal, 1998; Ripoll et al., 2008; Ropero et al., 2006; Soria, 2004). Bindungsexperimente an Membranen von rekombinanten HEK293-Zellen aus unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass E2 mit niedriger Affinität direkt mit dem SUR1 interagieren kann (Ackermann et al., 2009). In HEK293-Zellen sind die klassischen Rezeptoren ER α oder ER β nicht, oder in einem kaum detektierbaren Maße nachgewiesen (Albanito et al., 2008; Gonzalez-Arenas et al., 2006; Kahlert et al., 2000; Tang et al., 2006). In der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Mikrochip-Genanalyse konnten keine Gene für ER α und ER β , wohl aber für den nichtklassischen Estrogenrezeptor GPER in den verwendeten HEK293-Zellen nachgewiesen werden (siehe 5.6.3). Weiterhin konnte in einer Studie von Thomas et al. gezeigt werden, dass der nicht-Klassische ER GPR30 in HEK293-Zellen nicht vorkommt (Thomas et al., 2005). Eine mögliche Beteiligung der eventuell in HEK293-Zellen exprimierten endogenen ERs, kann über die entsprechenden Kontrollzellen erfasst werden. Da die in dieser Arbeit dargelegten Ergebnisse zeigen, dass in pcDNA-Kontrollzellen im Vergleich zu einer Behandlung mit Lösungsmittel eine Erhöhung der Apoptoserate nach Estradiolbehandlung erkennbar ist (Abb.: 8 und 10), wurden einzelne Versuche in einer anderen Zelllinien wiederholt, für welche eine messbare Expression von Estradiolrezeptoren nachgewiesen ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurden dafür MCF7-Zellen ausgewählt. Dies sind immortalisierte, ursprünglich epitheliale Zellen der Brustdrüse, welche Estrogenrezeptoren exprimieren (Brooks S.C.; Locke, 1973). Bei den Estrogenrezeptoren in den MCF7-Zellen handelt es sich um ER α und ER β , wobei ER α in den Zellen in einer 450fachen Menge zu ER β vorliegt (Effenberger, 2004; Maggiolini, 2001).

Als möglicher apoptotischer Indikator wurde der Verlust der Vitalität über die Zellablösung von adhärent wachsenden, ER positiven MCF7-Zellen nach Behandlung mit E2 betrachtet. Dazu wurde die Zellzahl im Überstand mittels Casy-Zellzählgerät nach unterschiedlichen Inkubationszeiten ermittelt. In den Versuchen wurden stabil transfizierte MCF7-Zellen eingesetzt. Transfiziert wurden die Zellen mit dem Vektor pcDNA3.1 alleine (pcDNA-Kontrollzellen) oder entsprechend mit dem Vektor pcDNA3.1 mit einer Insertion der cDNA für SUR1 oder der Mutante SUR1(R1379C).

Nach einer Behandlung mit 100 μ M E2 für 24h zeigen MCF7-Zellen, welche einen endogenen Estradiol-Rezeptor besitzen, keinen Unterschied in Bezug auf die Zellablösung.

Mit der Zeit (36h, 48h) steigt der Anteil an apoptotischen Zellen in E2 behandelten Zellen im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (siehe 5.2.1). Einen Unterschied zwischen den SUR1-exprimierenden Zellen und den SUR1(R1379C)-exprimierenden MCF7-Zellen bzw. den pcDNA-Kontrollzellen ist jedoch bei dieser Konzentration nicht erkennbar. Dies würde nicht für einen SUR1 vermittelten Effekt nach Behandlung mit E2 in MCF7-Zellen sprechen. Kritisch anzumerken ist bei diesen Versuchen, dass eine Überprüfung der erfolgreichen Transfektion von MCF7-Zellen lediglich für die Transfektion mit dem Vektor pcDNA3.1 mit einer Insertion der cDNA für SUR1, nicht aber für die Mutante durchgeführt wurde. Zur Überprüfung der Transfektion wurden einmal Bindungsstudien an MCF7-Zellen durchgeführt um die spezifische Bindung an SUR1 zu ermitteln. Diese Versuche zeigen lediglich eine schwache Expression von SUR1 in MCF7-Zellen. Des Weiteren wurde eine RT-PCR-Analyse durchgeführt, welche den SUR1 in MCF7 Zellen deutlicher anzeigt, aber auch unspezifische Banden erkennen lässt (siehe 5.2.1). Daher können diese Versuchsreihen lediglich als erste Testversuche angesehen werden.

Ergänzend wurden Zellen untersucht, welche die typischen Charakteristika einer nativen β -Zelle zeigen (siehe 4.1.3.3.2), die INS1-E-Zellen. Da die Insulinausschüttung in diesen Zellen durch Diazoxid gehemmt werden konnte, geht man davon aus, dass der pankreatische K_{ATP} -Kanal bei der Freisetzung der Insulinvesikel beteiligt ist (Asfari, 1992). Entsprechend der β -Zellen, weisen die INS1-E-Zellen sowohl die zytoplasmatischen Estrogenrezeptoren ER α und ER β als auch den membranständigen Estrogenrezeptor GPER auf (Tiano and Mauvais-Jarvis, 2012). In INS-E-Zellen, welche aus einem Ratten-Insulinoma generiert wurden, konnte ebenfalls ein Unterschied in Bezug auf den Verlust der Zelladhärenz zwischen Lösungsmittelkontrolle und E2-Behandlung gezeigt werden (Abb. 17).

Ein gesteigerter Verlust der Zelladhärenz konnte in rekombinanten HEK293-Zellen (Abb.8), rekombinanten MCF7-Zellen (Abb.16) und untransfizierten INS1-E-Zellen (Abb.17) nach Behandlung mit 100 μ M E2 festgestellt werden. Diese Ergebnisse lassen nicht ausschließen, dass HEK293-Zellen eine schwache Expression von Estrogenrezeptoren aufweisen, oder dass es zu intrazellulären Interaktionen zwischen dem SUR1 und klassischen beziehungsweise nicht-klassischen ER's kommt. Dies wird auch in der Literatur diskutiert (Nadal, 1998; Ropero et al., 2006; Soria, 2004). Dennoch ist zu beachten, dass auch der SUR1, wenn auch mit geringer Affinität, mit E2 direkt interagieren kann (Ackermann et al., 2009) und so eventuell selbst als nicht-klassischer Estrogenrezeptor betrachtet werden könnte. Eine weitere Erklärung für die in dieser Arbeit dargelegten Ergebnisse, welche eine leichte Erhöhung der Apoptoserate auch in pcDNA-Kontrollzellen nach Estradiolbehandlung im Vergleich zu einer Behandlung mit Lösungsmittel zeigen (Abb.: 8 und 10), ist möglicherweise das Vorkommen endogener ABC-Proteine. In der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Mikrochip-Genanalyse konnte gezeigt werden, dass aus allen Subfamilien

der ABC-Proteine (A-G) Gene in den verwendeten HEK293-Zellen vorhanden sind. Besonders zu Berücksichtigen sind hierbei die Vertreter der ABCB-Familie, welche das *Multidrug-Resistance* Protein kodieren, oder die Vertreter aus der ABCC-Familie, zu welcher auch der SUR1 zählt (Dean, 2013).

6.1.2 Untersuchung der E2-Sensitivität von Zellen, welche die analysierten SUR1-Mutanten exprimieren

Den Experimenten mit Zellen welche die SUR1-Mutanten exprimieren vorausgehend, wurde die Sensitivität gegenüber E2 zunächst an den, in vielen Eigenschaften, den nativen β -Zellen ähnlichen (siehe 4.1.3.3.2), INS1-E-Zellen getestet. Dazu wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an E2 behandelt, und nach 24h Inkubationszeit die Zellzahl im Überstand bestimmt (Abb. 9). Diese Zellen zeigen keine signifikante Erhöhung der Zellablösung in einem Konzentrationsbereich von 0,01 – 30 μM E2, wobei eine Tendenz zur vermehrten Ablösung bei 30 μM erkennbar ist. Bei den Konzentrationen höher 30 μM , ist ein sprunghafter Anstieg der Zellablösung zu beobachten. Zellen, die mit 60, 90 oder 100 μM E2 behandelt wurden zeigen eine signifikant gesteigerte Rate der Zellablösung im Vergleich zu den Lösungsmittelkontrollen. Diese Zellen, welche sowohl den pankreatischen K_{ATP} -Kanal, bestehend aus SUR1 und Kir6.2, als auch endogene Estrogenrezeptoren enthalten (Asfari, 1992; Tiano and Mauvais-Jarvis, 2012), zeigen im Vergleich zu HEK293-Zellen eine viel höhere Sensitivität. Ob dies jedoch über die endogenen ERs der INS1-E-Zellen vermittelt wird oder möglicherweise über den endogenen SUR1 bleibt an dieser Stelle offen. Es ist zu beachten, dass die Inkubationszeit eine wesentliche Rolle spielt. In rekombinanten HEK293-Zellen konnte bei einer Inkubationszeit von 4d bereits ein signifikanter Effekt nach einer Behandlung mit 1 μM E2 in SUR1 exprimierenden Zellen vergleichend zu pcDNA-Kontrollzellen gezeigt werden. Während isolierte Langerhans-Inseln behandelt mit 0,01 μM E2 bereits deutliche apoptotische Effekte nach 72h zeigen (Ackermann et al., 2009). Dies verdeutlicht die Unterschiede bezüglich der Sensitivität zwischen β -Zellen im nativen Zustand, welche noch im physiologischen Zellverband sind, und immortalisierten bzw. rekombinanten Zellsystemen die nicht mehr in einem 3 Dimensionalen Zellverband vorliegen. Weiterhin kann nicht ausgeschlossen werden, dass die höhere Sensitivität von INS1-E-Zellen gegenüber E2 im direkten Vergleich zu rekombinanten HEK293-Zellen nicht über interne vollständige K_{ATP} -Kanäle, bestehend aus SUR1 und Kir6.2, vermittelt wird. Auch könnte die Überexpression des SUR1 in den HEK293-Zellen zu der verminderten Sensitivität in HEK293-Zellen führen.

Im Anschluss wurde die Konzentrationsabhängigkeit der Apoptoseinduktion nach Behandlung mit E2 durch die Expression der SUR1 Mutanten SUR1(K719R), SUR1(K1384M), SUR1(R1379C) und SUR1(R1379L) in stabil transfizierten HEK293-Zellen

analysiert (Abb. 19). Als apoptotischer Parameter wurde in diesen Experimenten die veränderte Kernmorphologie zu untersucht.

Dabei unterscheiden sich SUR1 exprimierende Zellen ab einer Konzentration von 50 μM signifikant von den pcDNA-Kontrollzellen. Dies trifft ebenfalls auf die untersuchten SUR1-Mutanten SUR1(K1384M), SUR1(R1379C) und SUR1(R1379L) zu. In den Zellen die SUR1(R1379L) exprimieren ist ein signifikanter Unterschied zu den Kontrollzellen zusätzlich bei einer Konzentration von 5 μM E2 zu erkennen. Kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle ist in dem getesteten Konzentrationsbereich von 0,1-50 μM bei SUR1(K719R) erkennbar. Keine der SUR1-Mutanten zeigt in dieser Untersuchung einen deutlichen Unterschied zu dem nativen SUR1.

Zusammenfassend zeigen sowohl INS1-E-Zellen, als auch für SUR1 oder die untersuchten SUR1-Mutanten rekombinanten HEK293-Zellen, einen gesteigerten apoptotischen Effekt nach Behandlung mit 30 μM E2. Die signifikante Erhöhung im rekombinanten Zellsystem bei 50 μM E2-Behandlung im Vergleich zu den pcDNA-Kontrollzellen zeigen Zellen, die SUR1 exprimieren im selben Ausmaß wie Zellen, welche die Mutationen SUR1(K719R), SUR1(K1384M), SUR1(R1379C) und SUR1(R1379L) exprimieren. Das bedeutet, dass die erhöhte Sensitivität der HEK293-Zellen welche eine der untersuchten NBF-Mutanten exprimieren (Abb. 1, 3 und 5) gegenüber E2 erst bei höheren Konzentrationen (>50 μM) erkennbar wird.

6.2 Untersuchungen zum Einfluss von Estrogenrezeptor-Modulatoren auf die SUR1 vermittelten Verluste der Zellvitalität nach Behandlung mit E2

SUR1 sowie SUR1(K719R), SUR1(K1384M), SUR1(R1379C) und SUR1(R1379L) exprimierende HEK293-Zellen wurden mit verschiedenen Substanzen, die bisher als Selektive Estrogenrezeptor-Modulatoren (SERMs) oder Selektiver Estrogenrezeptor Down-Regulatoren (SERDs) bekannt sind (Cuzick et al., 2013; Wardell et al., 2011), behandelt, um den Effekt der SERDs auf die Zellvitalität mit dem Effekt von E2 vergleichen zu können. Da bei der Untersuchung des Parameters der Zellablösung kein Unterschied festgestellt werden konnte, wurde an dieser Stelle die Zellvitalität der bereits im Überstand befindlichen Zellen näher analysiert.

6.2.1 Analyse der Wirkung einer kombinierten Behandlung von Tamoxifen und E2 auf rekombinante HEK293-Zellen und isolierte Langerhans-Inseln

Zunächst wurde der Effekt unterschiedlicher Tamoxifenkonzentrationen auf die Zelladhärenz, von SUR1 exprimierende HEK293-Zellen untersucht (Abb.20). Als Vergleich wurden

pcDNA-Kontrollzellen, sowie Zellen die SUR1 exprimieren und mit E2 behandelt wurden, analysiert. Bei eingesetzten Tamoxifen-Konzentrationen von 1 μM , 5 μM und 10 μM konnte kein signifikanter Unterschied im Vergleich zu den entsprechenden Zellen, die mit Lösungsmittel inkubiert wurden, festgestellt werden. In diesem Konzentrationsbereich lag die Anzahl an Zellen im Überstand deutlich unter der von Zellen nach einer Behandlung mit E2. Alle eingesetzten Konzentrationen über 15 μM zeigen im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle eine signifikant erhöhte Zellzahl im Überstand auf. Allerdings sind ab einer Konzentration von 15 μM Tamoxifen nach 24h alle Zellen einer Schale abgetötet. Ergänzend wurde die Wirkung von Tamoxifen in Kombination mit E2 auf die SUR1 und SUR1-Mutationen exprimierenden HEK293-Zellen untersucht (Abb.21). Dazu wurde die vielfach auch in anderen Studien eingesetzte Konzentration von 10 μM Tamoxifen verwendet. So zum Beispiel bei der Untersuchung zu Tamoxifen induziertem oxidativen Stress und mitochondrialer Apoptose (Nazarewicz et al., 2007) oder bei der Analyse des Effektes biologisch aktiver Metabolite von Tamoxifen (Reddel, 1983). Tamoxifen alleine zeigt in den HEK293-Zellen bei einer Konzentration von 10 μM keine Wirkung auf die Zelladhärenz. Wie bereits in vorausgegangenen Versuchen dieser Arbeit, ist nach 24h eine signifikant erhöhte Zellzahl im Überstand nach einer Behandlung mit 100 μM E2 in Bezug auf die Lösungsmittel-Kontrolle zu messen. Weiterhin ist im Vergleich zu den für 24h mit E2 behandelten pcDNA-Kontrollzellen erkennbar, dass bei allen Zellen, die mit einer Kombination von E2 und Tamoxifen behandelt wurden, die Rate an abgelösten Zellen nochmals signifikant gesteigert werden konnte. Dieser deutliche Anstieg des Adhärenzverlustes nach der kombinierten Behandlung im Vergleich zu E2 behandelten Zellen konnte in allen untersuchten Zelltypen, welche pcDNA, SUR1, SUR1(K719R), SUR1(K1384M), SUR1(R1379C) oder SUR1(R1379L) exprimieren, festgestellt werden.

Demnach ist davon auszugehen, dass Tamoxifen in diesem Fall nicht als Antagonist, sondern als Agonist wirkt. Eine gewebeabhängige unterschiedliche Wirkungsweise von Tamoxifen ist durchaus bekannt (Fisher, 1998). Aus diesem Grund müssen bei einer Therapie mit Tamoxifen von Mammakarzinomen aufgrund der agonistischen Wirkung auf das Endometrium hier regelmäßige Kontrollen durchgeführt werden (Fisher, 1998; Schmidt, 2006). Eine agonistische Wirkung von Tamoxifen ist bekannt in Geweben, in welchen vor allem ER α exprimiert wird, während eine antagonistische Wirkung von Tamoxifen über ER β vermittelt wird (Katzenellenbogen, 2000; Tremblay, 1997).

Die Wirkung von Tamoxifen wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit zusätzlich an isolierten pankreatischen Langerhans-Inseln untersucht (Abb.22). Betrachtet man den prozentualen Anteil an apoptotischen Nuklei in isolierten Langerhans-Inseln nach 72h Inkubation, sieht man eine signifikante Erhöhung der Apoptoserate nach Behandlung mit 100 μM E2 im Vergleich zu Lösungsmittel behandelten Langerhans-Inseln. Tendenziell ist

auch ein erhöhter Effekt im Vergleich zu Lösungsmittel behandelten Langerhans-Inseln nach der Behandlung mit 5 μM TAM erkennbar, auch wenn dieser Effekt statistisch nicht signifikant ist. Die größte apoptotische Wirkung zeigt hier, wie in den Versuchen in rekombinanten Zellsystemen (Abb.21), eine kombinierte Behandlung von E2 und TAM. Auffallend ist, dass in den isolierten Langerhans-Inseln 5 μM TAM eine deutlich stärkere Wirkung zeigt als in den HEK293-Zellen nach Behandlung mit 10 μM Tam, besonders in Bezug auf die Wirkung von 100 μM E2. Diese erhöhte Sensitivität des physiologischen Zellverbandes der Langerhans-Inseln gegenüber der rekombinanten HEK293-Zellen nach Behandlung mit Tamoxifen kann eventuell auf die endogenen ERs der Langerhans-Inseln zurückgeführt werden. In Langerhans-Inseln sind ER α , ER β und GPR30 nachgewiesen (Tiano and Mauvais-Jarvis, 2012), in HEK293-Zellen nicht (siehe 6.1.1). Es wurde bereits gezeigt, dass zweidimensionale Zellkulturen anders auf E2 Behandlung reagieren als physiologische bzw. dreidimensionale Zellverbände und die Interaktion mit der Extrazellulären Matrix eine Rolle spielt (Zhang et al., 2009). Es wäre also auch möglich, dass die erhöhte Sensitivität der Langerhans-Inseln auf die dreidimensionale Struktur der Inseln und dadurch bedingte Zell-Zell Interaktionen zurückzuführen ist. Es ist weiterhin zu beachten, dass in den isolierten Langerhans-Inseln der komplette K_{ATP}-Kanal vorliegt (Weir and Bonner-Weir, 2013) während in den untersuchten HEK293-Zellen lediglich die regulatorische Untereinheit des Kanals, der SUR1, überexprimiert wird. Dadurch wäre es auch denkbar, dass in den Langerhans-Inseln eine komplette Signalkaskade über die Kanalaktivität selbst ausgelöst wird, und nicht nur die mögliche TAM induzierte Konformationsänderung des SUR1 zu dem beobachteten Effekt beiträgt.

Im Vergleich zu dem apoptotischen Effekt von E2 zeigt Tamoxifen, in unseren Versuchen mit rekombinanten HEK293-Zellen die SUR1, SUR1(K719R), SUR1(K1384M), SUR1(R1379C) oder SUR1(R1379L) exprimieren, erst dann einen gesteigerten Verlust der Zellvitalität wenn die Substanz in einer Konzentration von 10 μM in Kombination mit E2 gegeben wird. Dabei zeigen die Zellen welche SUR1(K719R), SUR1(K1384M), SUR1(R1379C) oder SUR1(R1379L) exprimieren, entsprechend der Versuche mit E2, einen stärkeren Verlust der Zelladhärenz im Vergleich zu SUR1 exprimierenden Zellen. Eventuell führen die Mutationen in SUR1 zu einer Konformationsänderung welche die Bindung von E2 und Tam am SUR1 oder interagierenden Proteinen beeinflussen und zu diesem Effekt führen. Wie in der Arbeitsgruppe bereits vorausgehend gezeigt, kann E2 mit geringer Affinität an den SUR1 binden (Ackermann et al., 2009), die genaue Bindestelle ist jedoch noch nicht bekannt. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass die Bindestelle für E2 in der TMD2 des SUR1 im Bereich der Blocker- und Öffner- Bindestellen liegen könnte. So kann GBC durch E2 von der Bindestelle am SUR1 verdrängt werden, die Mutation SUR1(M1289T) im Bereich der Öffner-Bindestelle beeinflusst jedoch ebenfalls die erreichte Verdrängung von GBC (Ackermann et

al., 2009). Aus Untersuchungen mit dem phyto-Estrogens Resveratrol ergeben sich Hinweise darauf, das sich die Bindestelle von Resveratrol am SUR1 zumindest teilweise mit der Bindestelle von Glibenclamid überschneidet (Hambrock et al., 2007). Es ist darum auch denkbar, das E2 und Tam an unterschiedlichen Stellen in der TMD2 des SUR1 binden, und damit eine Konformation stabilisieren, welche zur Einleitung der Apoptose führen kann. Eventuell begünstigen die Mutationen in den NBFs diese Situation. In dieser Arbeit wurde unter 6.1.1 diskutiert, dass der Einfluss von endogenen Estrogenrezeptoren nicht ausgeschlossen werden kann und GPER in den verwendeten HEK293-Zellen nachgewiesen werden konnte. Es ist nicht auszuschließen, dass dieser Estrogenrezeptor selbst auch ein Effekt ausübt. Ein Indiz hierfür kann die gemessene Tamoxifenwirkung in den pcDNA-Kontrollzellen sein, welche dem Effekt von Tamoxifen auf SUR1-exprimierenden Zellen entspricht. Dass die untersuchten Mutanten zu einem Verlust der Interaktion des SUR1 mit den membranständigen SNARE Proteinen führen können, wurde bereits unter 6.1 diskutiert. Weiterhin wurde an Untersuchungen in β -Zellen nachgewiesen, dass es durch diesen Verlust der Interaktion zu einer gestörten Exocytose von Insulinvesikeln kommen kann (Zhu et al., 2013). Die Glukose induzierte Insulinausschüttung kann über K_{ATP} -Kanal abhängige und unabhängige Wege erfolgen. Einer Hypothese nach sind daran, besonders zur Verstärkung des Ca^{2+} -Signals, weitere, bisher nicht näher charakterisierte, Kanäle/Strukturen beteiligt (Henquin, 2011).

6.2.2 Untersuchung des Effektes von Fulvestrant in Kombination mit E2 auf rekombinanten HEK293-Zellen

Ein bekannter strikter ER Antagonist ist Fulvestrant (ICI 182,780). Fulvestrant (Fv) wird als Selektiver Estrogenrezeptor Down-Regulator (SERD) beschrieben, kann jedoch auch an der Degradation von ER's beteiligt sein (Wakeling, 1991; Wardell et al., 2011). Fv galt bislang als reiner Östrogenrezeptorantagonist, in jüngster Zeit konnte jedoch eine agonistische Wirkung von Fv über nicht-klassische Rezeptoren nachgewiesen werden (Filardo and Thomas, 2005; Wehling et al., 2006). In Versuchen mit rekombinanten HEK293-Zellen, welche für 24h, mit Fv und E2 in Kombination inkubiert wurden, zeigt sich eine Reduktion der Zellablösungsrate (Abb.23). In diesen Versuchen ist deutlich erkennbar, dass Fv, obwohl bei einer Konzentration 10 μ M keine Wirkung sichtbar ist, in Kombination mit Estradiol den Effekt auf die Zellablösung von E2 senkt. Dies ist bei allen untersuchten Mutanten deutlich zu erkennen, auch wenn der Effekt in den einzelnen Versuchsansätzen unterschiedlich stark ausgeprägt ist. Die Wirkung der eingesetzten Konzentration von 10 μ M an Fulvestrant alleine liegt auf der Höhe der eingesetzten, zweifachen Lösungsmittelkontrolle. Im Vergleich zu den mit 100 μ M E2 behandelten Zellen sinkt die Apoptoserate bei der kombinierten Behandlung mit E2 und Fv bei pcDNA-Kontrollzellen um 16%, bei SUR1 transfizierten Zellen um 21%, bei

den Zellen, die die ATP-Hydrolyserate senkenden SUR1 Mutationen exprimieren (SUR1(K719R), SUR1(K1384M)) jeweils um 42%, bei den ATP-Hydrolyserate steigernden Mutationen für SUR1(R1379C) um 50% und für SUR1(R1379L) um 47% (Tabelle 11). Zusammenfassend kann davon ausgegangen werden, dass Fulvestrant, auf die von uns untersuchten rekombinanten HEK293-Zellen, einen schützenden Effekt in Bezug auf den E2 induzierten Vitalitätsverlust ausübt. Demnach zeigt Fulvestrant, in den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen, eine antagonistische Wirkung auf die E2-induzierten Effekt und steht damit der gezeigten agonistischen Wirkung von Tamoxifen gegenüber. Ein schützender Effekt von Fv kann auch in Abwesenheit von SUR1 beobachtet werden, wie die Wirkung auf pcDNA-Kontrollzellen zeigt, kann durch die Anwesenheit von SUR1 oder eine der untersuchten SUR1-Mutanten aber offenbar verstärkt werden.

6.2.3 Untersuchungen eines Effektes der Behandlung mit Estradiol, Tamoxifen oder Fulvestrant auf die Zellvitalität von MCF7-Zellen

Bei den Untersuchungen zum Ausmaß der Zellablösungsrate konnte nach 24h Behandlung mit E2 kein SUR1-spezifischer Effekt im Vergleich zur Lösungsmittel-Kontrolle in stabil transfizierten MCF7-Zellen nachgewiesen werden (siehe dazu 6.1.1). Darum wurde in weiteren Versuchen die Vitalität der vom Schalenboden abgelösten MCF7-Zellen näher untersucht (Abb. 24). In allen vorangegangenen Untersuchungen an HEK293-Zellen wurden 100 µM E2 eingesetzt, da vorhergehende Untersuchungen der Arbeitsgruppe gezeigt haben, dass immortalisierte Zellen weniger sensitiv auf E2 reagieren als physiologische Zellverbände (Ackermann et al., 2009). Weiterhin um die Vergleichbarkeit mit Literaturangaben und vorausgegangenen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe mit Resveratrol und Glibenclamid zu erhalten, aber auch um eine kürzere Inkubationszeit für die angesetzten Versuchsreihen zu erreichen. Bei diesen Versuchen in MCF7-Zellen wurde E2 vergleichend mit Fv und TAM analysiert. Unter Kontrollbedingungen beträgt der Anteil vitaler Zellen 91-95%. Es gibt keine signifikanten Unterschiede zwischen den mit Lösungsmittel behandelten Zellen untereinander. Ebenso wenig unterscheiden sich die Gruppen untereinander signifikant nach E2, Fv oder TAM-Behandlung mit jeweils 100 µM. Die Behandlung mit E2 führt zu einem leichten Rückgang an vitalen Zellen auf 84-87%. Tendenziell senkt auch eine Behandlung mit Fulvestrant die Vitalität der Zellen. Signifikant unterschiedlich sind jedoch die Lösungsmittelkontrollen (DE), bzw. die E2 behandelten Zellen einer Gruppe, im Vergleich zu den mit Tamoxifen behandelten Zellen. Nach einer Behandlung mit Tamoxifen liegt die Zellvitalität noch bei 41-47%. Damit zeigt der Estrogenrezeptormodulator Tamoxifen eine um ca. 50% stärkere Wirkung auf den Parameter der Zellvitalität als Estradiol selbst, bei einer eingesetzten Konzentration von jeweils 100 µM.

Da sich abgelöste MCF7-Zellen welche SUR1 exprimieren, pcDNA-Kontrollzellen und untransfizierte MCF7-Zellen in Ihrer Zellvitalität nicht unterscheiden, könnte angenommen werden, dass der Effekt von TAM in diesen Zellen nicht über den SUR1 vermittelt wird. Dabei gilt es unbedingt zu beachten, dass die Überprüfung der erfolgreichen Transfektion der MCF7-Zellen mit SUR1 nur bedingt aussagekräftig ist (siehe 5.2.1 und 6.1.1). Ob die verminderte Zellvitalität der MCF7-Zellen nach Behandlung mit Tamoxifen über endogen vorkommenden ERs oder andere Proteine vermittelt wird, bleibt offen.

6.3 Untersuchungen zur möglichen Interaktion von Tamoxifen mit SUR1

Um eine mögliche direkte Interaktion des ER-Modulators Tamoxifen mit der SUR1 Untereinheit zu untersuchen, wurden Radioligandenbindungsstudien in Form von heterologen Kompetitionsversuchen durchgeführt (siehe Kapitel 4.4). Als Radioligand wurde dabei Tritium (^3H) markiertes Glibenclamid eingesetzt, welches in Anwesenheit von MgATP (siehe 4.4.3) mit zunehmenden Konzentrationen an unmarkiertem Inhibitor (Tamoxifen) von der spezifischen Bindungsstelle am SUR1 verdrängt wurde.

Deutlich zu sehen ist der Unterschied in der erreichten spezifischen Bindung von ^3H -GBC zwischen untersuchten Membranen von pcDNA-Kontrollzellen und von SUR1 exprimierenden Zellen. Das Ausmaß der gemessenen spezifischen Bindung an Membranen der Kontrollzellen entspricht der ermittelten nichtspezifischen Bindung (siehe 5.5 Abb.25). Da die pcDNA-Kontrollzellen kein SUR1 enthalten, wurde an diesen Membranen auch keine spezifische Bindung von GBC an SUR1 und Verdrängung durch Tamoxifen erwartet. Dennoch konnte bei eingesetzten Konzentrationen ab 30 μM TAM ein Anstieg der spezifischen Bindung von ^3H -GBC sowohl bei den Kontrollzellen als auch bei SUR1-exprimierenden Zellen gemessen werden. Dieser Effekt, einer ansteigenden spezifischen Bindung von ^3H -GBC ab einer bestimmten Konzentration des Verdrängers, ist aus den Untersuchungen zur Bindung des Kanalöffners Diazoxid, bei höheren Konzentrationen, an den SUR1 bekannt (Hambrock, 2004). Es ist möglich, dass endogen vorkommende Proteinstrukturen existieren, bei welchen durch die hohe Konzentration an Tamoxifen (> 30 μM) eine Bindung des radioaktiv markierten Liganden induziert werden kann. Diese Bindung bei Tamoxifenkonzentrationen höher als 30 μM ist nicht spezifisch für SUR1, da dieses Phänomen auch in pcDNA-Kontrollzellen aufgetreten ist. Welche Proteine oder Proteinkomplexe an dieser, durch hohe Konzentrationen des Inhibitors, induzierten Bindung beteiligt sein könnten, bleibt hier offen. In den folgenden Auswertungen wurden die höheren Konzentrationen nicht berücksichtigt.

Um die Einzelversuche einer Meßreihe aber auch verschiedene Meßreihen untereinander besser miteinander vergleichen zu können, wurden die einzelnen Messpunkte normiert,

indem die B_S -Werte in % angegeben werden. Hier entspricht B_{tot} dem Wert bei 100 %. In den heterologen Wettbewerbsversuchen mit Tamoxifen wurde eine Konzentrationsreihe von 1 nM-30 μ M als Verdränger eingesetzt. Es konnte eine Verdrängung um $83,0 \pm 1,6$ % erreicht werden (siehe Abb. 25 und 26). Auch mit darüber hinaus gehenden Konzentrationen an Tamoxifen konnte keine weitere Verdrängung erreicht werden (siehe Abb.25). Über das Programm SigmaPlot wurde eine bestmögliche Näherungskurve unter Vorgabe der Gleichung 20 (siehe 4.4.5) ermittelt, dabei ergaben sich ein Hill-Koeffizient von $1,9 \pm 0,3$ und ein IC_{50} -Wert von $7,4 \pm 1,6$ μ M. Ein Hill-Koeffizient von 1,9 würde für eine positive Kooperativität in der Molekül-Bindung sprechen, da jedoch von den 7 Einzelversuchen die meisten der ermittelten Hillkoeffizienten bei $1,2 \pm 0,02$ lagen, wurde in der weiteren Auswertung der Berechnungen ein monophasisches Bindeverhalten zugrunde gelegt.

Legt man einen K_D -Wert von 3,1 nM, welcher in früheren Untersuchungen im Rahmen einer homologen Verdrängung der Bindung von 3 H-GBC durch GBC an SUR1 ermittelt wurde (Hambrock, 2004), für die Berechnung des K_i -Wertes von Tamoxifen zugrunde, erhält man einen K_i -Wert von 6,1 μ M. Diese Ergebnisse liefern Hinweise darauf, dass Tamoxifen unter Annahme einer monophasischen Bindung, direkt mit dem SUR1 interagieren kann. Im Vergleich dazu ist die in früheren Untersuchungen der Arbeitsgruppe ermittelte Affinität von SUR1 zu E2 und die Amplitude der Verdrängung (E2 K_i -Wert = $81,4 \pm 26,3$ μ M, $A = 55,1 \pm 11,2$ % (Ackermann et al., 2009)) geringer. In verschiedenen Publikationen wurde diskutiert ob E2 direkt mit dem K_{ATP} -Kanal interagiert (Al-Majed, 2005), oder über einen bisher unidentifizierten nicht-klassischen Estrogenrezeptor wirkt, welcher mit dem K_{ATP} -Kanal direkt oder indirekt interagiert (Nadal, 1998; Ropero et al., 2006; Soria, 2004). Die Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe, dass der SUR1 direkt mit E2 interagieren kann (Ackermann et al., 2009) und auch, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, der Estrogenrezeptor-Modulator Tamoxifen mit SUR1 direkt interagieren kann, können als Hinweise betrachtet werden, dass der SUR1 eventuell als Kandidat für ein nicht-klassischen Estrogenrezeptor, mit allerdings sehr geringer Affinität für E2, wirkt und neben der Insulinausschüttung weitere Effekte in der Zelle auslösen kann. Weiterhin muss diskutiert werden ob die Bindung der Selektiven-Estrogen-Rezeptor-Modulatoren (SERMs), wie beispielsweise Tamoxifen, an die Estrogenrezeptoren tatsächlich so spezifisch ist wie bisher angenommen.

6.4 Untersuchung zur Beeinflussung der Expression bestimmter Gene in HEK293-Zellen durch die Expression von SUR1 oder SUR1(R1379C)

Um zu überprüfen, ob der apoptotische Effekt, ausgelöst durch E2, über eine Veränderung auf der Ebene der Genregulation hervorgerufen wird, wurden die Proben nach 8h Inkubation aufgearbeitet und anschließend Genexpressionsanalysen anhand eines *Agilent Whole*

Genome Oligo Microarray der Firma Miltenyi Biotec durchgeführt. Die Inkubationszeit wurde in Vorversuchen ermittelt und entspricht dem Zeitraum, nach welchem erste Veränderungen der Zellen, wie das Abrunden der adhärennten Zellen und erste Zellen im Überstand, mikroskopisch erfasst wurden. Das bedeutet Änderungen auf der Ebene der Genregulation sollten bereits stattgefunden haben, da Anzeichen apoptotischer Parameter in mit E2 behandelten Zellen festgestellt werden konnte, nicht jedoch in den Lösungsmittelkontrollen. Durch die Firma Miltenyi Biotec erfolgte nach einer Pre-Prozessierung und Normalisierung der Daten auf die logarithmischen Intensitäten (\log_2) eine diskriminatorische Gen Analyse (DGA). Um eventuelle biologisch bedeutungsvolle Expressionsveränderungen beschreiben zu können, wurde dabei eine Kombination aus Signifikanz und dem Maßstab der x-fachen Vergrößerung bzw. Verkleinerung (*fold-change*) verwendet. Als Basiswerte wurden die Werte der pcDNA-Kontrollzellen, behandelt mit dem entsprechenden Lösungsmittel, verwendet.

6.4.1 Analyse der E2 induzierten Expressionsveränderungen in den untersuchten Zellen

Zunächst wurde in allen drei untersuchten Zelllinien (HEK293-Zellen die pcDNA, SUR1 oder SUR1(R1379C) exprimieren) untersucht, welche Gene durch Behandlung mit E2 reguliert werden. Bezogen wurde die Regulation jeweils auf die entsprechende Probe inkubiert mit Lösungsmittel. Dazu wurden die normalisierten Intensitäten einmal einem Signifikanztest innerhalb der Gruppe unterzogen, und ergänzend ein Test zu den mittleren Expressionsunterschieden zwischen den zwei Gruppen (Behandlung mit E2 oder Lsgm.) durchgeführt.

Allein die Anzahl der in der Expression veränderten Gene lässt darauf schließen, dass eine Regulation durch E2 erfolgt. Hier zeigen alle drei untersuchten Zelltypen sehr ähnliche Ergebnisse in der Anzahl der regulierten Gene (pcDNA-Kontrollzellen $n = 2007$, SUR1 = 2527 und SUR1(R1379C) = 2564) und der durch E2 induzierten Expressionsveränderung. Das Gen, welches nach Behandlung mit E2 am stärksten hochreguliert wurde, ist das des Cystein/Glutamat Transporters SLC7A11. Unter den am stärksten induzierten Reportern befinden sich einige, die mit den Metallothioneinen Genen assoziiert sind (u.a. MT1H, 1X, 1L, 1G, MT2A). Diese Proteine spielen eine Rolle bei der Regulierung der ROS in Zellen (Takahashi, 2012). Die stärkste Senkung in der Regulation zeigt sich für das mit Thioredoxin interagierende Protein TXNIP.

Obwohl diese Gene nach Behandlung mit E2 in allen untersuchten Zelltypen konsequent hoch bzw. runter reguliert wurden, erreicht keiner der Werte eine gute statistische Signifikanz. Laut der bioinformatischen Analyse der Firma Miltenyi Biotec liegt dies jedoch an der geringen Anzahl an Replikaten mit $n=3$ pro Gruppe. Um dies zu verifizieren, wurden die

unterschiedlichen Gruppen (pcDNA, SUR1, SUR1(R1379C)) entsprechend ihrer Behandlung zusammengefasst und erneut eine DGA durchgeführt. Dabei konnte das zuvor beschriebene Ergebnis mit signifikant über den Basiswerten liegenden Werten festgestellt werden. Metallothioneine wurden 1957 erstmals von Margoshes und Vallee beschrieben und sind niedermolekulare Proteine mit einer Cystein-reichen Region (Cherian et al., 2003). Metallothioneine können sowohl essentielle Metalle wie Zink, als auch toxische Metalle wie Cadmium sehr gut binden (Bremner, 1990; Hamer, 1986). Sie sind in der Literatur auch als negativ-Regulatoren der Apoptose beschrieben (Takahashi, 2012; Tsangaris and Tzortzatos-Stathopoulou, 1998). Sowohl die Steigerung der Genexpression der Metallothioneine als auch die Senkung der Genexpression des Thio-reduktasehemmers TXNIP als Reaktion auf die Behandlung mit E2, könnten mit einer Induktion einer anti-apoptotischen und pro-survival Kaskade auf der Ebene der Genexpression in Verbindung stehen. Das E2 sowohl eine anti-apoptotische Wirkung (Contreras et al., 2002; Eckhoff et al., 2004; Le May et al., 2006), als auch eine apoptotische Wirkung (Ackermann et al., 2009; Luo et al., 2008; Song, 2001) haben kann, ist bekannt und wird von Santen und Allred 2007 als das sogenannte „*Estrogen Paradox*“ beschrieben (Santen and Allred, 2007).

6.4.2 Analyse des Einflusses der Expression von SUR1 und SUR1(R1379C) auf die spezifische Aktivierung bestimmter Gene

In einem weiteren Ansatz wurden DGAs durchgeführt, um Gene zu ermitteln, die in den unterschiedlichen Zelltypen (pcDNA, SUR1 und SUR1(R1379C)) bei gleicher Behandlung unterschiedlich exprimiert werden, um Rückschlüsse über die Auswirkung der Expression von SUR1 beziehungsweise SUR1(R1379C) zu erhalten. Für alle dazu durchgeführten DGAs konnten nach einer Korrektur der Daten (Beschreibung siehe 5.6) keine Reportergene ermittelt werden die eine statistisch signifikante Veränderung aufweisen. Jedoch zeigen einige Reportergene eine deutliche Regulation über den Schwellenwert ($p\text{-value} < 0,01$) hinaus. Diese veränderten Gene sind in den Resultaten Tabelle 13 zusammengestellt.

Auffallend ist, dass nur eine kleine Anzahl an Genen eine konsistente Veränderung in ihrer Expression durch SUR1 Überexpression zeigt. Lediglich das Gen *ABCC8*, welches den SUR1 codiert, und der nicht näher charakterisierte Reporter *A_23_P85932* scheinen sowohl in SUR1 als auch in SUR1(R1379C) exprimierenden Zellen induziert zu sein. Die anderen Gene, die jeweils in den stark-regulierten Bereichen der Ergebnistabellen liegen, scheinen spezifisch für die Überexpression von SUR1 oder SUR1(R1379C) zu sein. So kommt es durch ein Überexpression von SUR1 zu einer verstärkten Expression von *MYOK*. Wird *MYOK* abgelesen kommt es zur Bildung des Protein Myosin K, welches eine Rolle in der Spannung des Cytoskelettes und der Phagozytose von Zellen spielt (Schwarz, 2000). Zudem wird *OAS3*, die Oligoadenylat Synthetase 3, verstärkt abgelesen was zu einer Inhibition der

Proteinsynthese führt (www.genecards.org). Eine Überexpression von SUR1(R1379C) führt spezifisch zu einer erhöhten Expression von PRKCB, der Proteinkinase C β , welche als Serin-Threonin spezifische Proteinkinase direkt an der Induktion von Apoptose beteiligt ist. Während bei einer Überexpression von SUR1 keine Gene spezifisch herunter reguliert werden, werden durch SUR1(R1379C) die Phosphoribosyl Pyrophosphatase Synthetase 2 (PRPS2), die eine wichtige Rolle bei der Purin und Pyrimidinsynthese spielt, und der Wachstumsfaktor Pleitrophin (PTN) spezifisch herunter geregelt (alle Beschreibungen der Gene von www.genecards.org). Keinen erkennbaren Effekt zeigt jedoch die unterschiedliche Behandlung mit E2 oder der Lösungsmittelkontrolle D/E.

Demnach treten verschiedene Änderungen in der Genexpression durch die Überexpression von SUR1 und die von SUR1(R1379C) auf, welche sich auch von den Expressionsmustern der entsprechenden pcDNA-Kontrollzellen unterscheiden. Dies ist jedoch unabhängig von der An- beziehungsweise Abwesenheit von E2.

7 Zusammenfassung und Ausblick

Der Sulfonylharnstoffrezeptor 1 (SUR1) ist die regulatorische Untereinheit pankreatischer K_{ATP} -Kanäle, welche eine wichtige Funktion in der kontrollierten Insulinsekretion aus β -Zellen einnehmen (Seino and Miki, 2003). Die Insulinsekretion kann neben der Induktion über K_{ATP} -Kanäle auch über K_{ATP} -Kanal unabhängige Wege moduliert werden (Henquin, 2000). Weiterhin spielt die Adaption der β -Zellmasse an den Insulinbedarf über Neogenese, Proliferation und Apoptose eine entscheidende Rolle (Butler, 2003). Mutationen, welche die Funktion des pankreatischen K_{ATP} -Kanals betreffen, können verschiedene Krankheitsausprägungen wie neonataler Hyperinsulinismus (Nichols, 1996) und zu unterschiedlichen Typen von Diabetes mellitus führen (Gloyn et al., 2005; Proks, 2013).

In vorausgegangenen Arbeiten der Arbeitsgruppe wurde bereits gezeigt, dass der als K_{ATP} -Kanal-Blocker bekannte Sulfonylharnstoff Glibenclamid (Hambrock et al., 2006), der Naturstoff Resveratrol (Hambrock et al., 2007) und in besonderem Maße das Hormon 17β -Estradiol (E2) apoptotische Prozesse, SUR1-spezifisch, verstärken können (Ackermann et al., 2009). Weiterhin wurde nachgewiesen, dass E2, wie auch Resveratrol, eine direkte Interaktion mit dem SUR1 eingehen kann (Ackermann et al., 2009). Damit gibt es Hinweise auf eine, zur Regulation des K_{ATP} -Kanals, zusätzliche Funktion des SUR1 in der Modulation der pankreatischen β -Zellmasse, in welcher der SUR1 als nicht-klassischer Estrogenrezeptor mit relativ geringer E2-Affinität fungieren könnte.

Bei den Untersuchungen zur E2-induzierten Apoptose-Modulation in der vorliegenden Arbeit lag der Schwerpunkt auf der Analyse des Einflusses von Mutationen in den Nukleotidbindungsfalten (NBF's) des SUR1. Diese sind von besonderem Interesse, da die untersuchten Mutationen in den Walkerregionen der NBF's liegen. Diese Regionen sind hochkonservierte Aminosäuresequenzbereiche und charakteristisch für alle NBF's von ABC-Proteinen. Die Walkerregionen spielen eine wichtige Rolle bei der Bindung, Positionierung und Hydrolyse von ATP und über die einhergehende Konformationsänderung in der Kanal offen/geschlossen-Regulierung. In diesem Bereich sind zahlreiche Mutationen bekannt, welche in Patienten mit neonatalem Diabetes mellitus nachgewiesen wurden (Patch et al., 2007; Proks, 2013). Die in dieser Arbeit näher untersuchten Mutationen an Position 1379 ([R1379C], [R1379L]) liegen in der Walker A Region der NBF2 von SUR1. Wie von Ashcroft und deWet beschrieben (de Wet et al., 2007b), führen diese Mutationen zu einer Erhöhung der ATP-Hydrolyserate und somit zu einer Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit des Kanals. Beide Mutationen konnten bei Patienten mit neonatalem Diabetes gefunden werden (Patch et al., 2007). Vergleichend dazu wurden in dieser Arbeit 2 weitere Mutationen des SUR1 untersucht, die sich in der Walker A Region von NBF1, beziehungsweise an korrespondierender Stelle in NBF2, befinden. Für diese beiden Mutationen ([K719R];

[K1384M]) wurde eine ATP-Hydrolyserate senkende Wirkung beschrieben (de Wet et al., 2007a). Diese entspricht einer Erhöhung der Geschlossenwahrscheinlichkeit des Kanals.

Über eine Quantifizierung der Parameter Zellablösung, apoptotische Veränderung der Nukleusmorphologie und verschiedener Caspase-Aktivitäten konnte im rekombinanten Zellsystem mit HEK293-Zellen eine deutliche Steigerung der Apoptoserate in Zellen, die eine NBF-Mutation exprimieren (SUR1(K719R), SUR1(K1384M), SUR1(R1379C) und SUR1(R1379L)) im Vergleich zu SUR1 exprimierenden Zellen aufgezeigt werden. Dabei wird in den untersuchten Zellen das ausführende Enzym der Apoptose, die Caspase 3, vermutlich über den mitochondrialen Apoptosepfad (Caspase 9) aktiviert. Dies passt zu früheren Ergebnissen aus der Arbeitsgruppe (Ackermann et al., 2009).

Die NBFs stellen offensichtlich wesentliche strukturelle Elemente für die SUR1-vermittelte Apoptose dar. Die Frage, wieso die Apoptoserate in diesen Fällen erhöht ist, bleibt an dieser Stelle offen. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse deuten darauf hin, dass der erhöhte Verlust der Zellvitalität nach E2 Behandlung in den untersuchten SUR1-Mutanten nicht über die Hydrolyserate beeinflusst wird, da sowohl die untersuchten Hydrolyserate steigernden, als auch die Hydrolyserate senkenden Mutationen des SUR1 einheitlich einen erhöhten Verlust der Zellvitalität zeigen. Eventuell stellen Konformationsänderungen, ausgelöst durch die untersuchten Mutationen an den Positionen SUR1(K719R), SUR1(K1384M), SUR1(R1379C) und SUR1(R1379L) den eigentlichen Auslöser dar. Dazu passen die Ergebnisse von Chang et al., die zeigen, dass SNARE-Proteine in direktem Kontakt zu den NBFs des SUR1 stehen (Chang et al., 2011). Besonders Mutationen die das Lysin in den Walker A Regionen betreffen, nämlich SUR1(K719M) in NBF1 und SUR1(K1385M) in NBF2, führten zu einem Verlust der Bindung von SUR1 an das SNARE-Protein Syntaxin-1A (Chang et al., 2011). Syntaxin-1A bindet und inhibiert unter anderem K_{ATP} -Kanäle und spielt so eine Rolle in der Vermittlung der exozytotischen Fusion der Insulinvesikel (Cui et al., 2004; Pasyk et al., 2004). Es ist möglich, dass die von mir untersuchten Mutationen in den Walkerregionen zu Konformationsänderungen in den NBFs führen, welche zu einem Verlust des Kontaktes zu Syntaxin-1A führt.

Ein gesteigerter Verlust der Zelladhärenz konnte nicht nur in rekombinanten HEK293-Zellen, für welche keine eindeutige Expression von endogenen Estrogenrezeptoren (ER) nachgewiesen ist, sondern auch in ER positiven rekombinanten MCF7-Zellen und untransfizierten, den β -Zellen ähnlichen, INS1-E-Zellen nach Behandlung mit 100 μ M E2 festgestellt werden. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass HEK293-Zellen eine schwache Expression von Estrogenrezeptoren aufweisen, oder dass es zu intrazellulären Interaktionen zwischen dem SUR1 und klassischen beziehungsweise nicht-klassischen ER's kommt. Dies wird auch in der Literatur diskutiert (Nadal, 1998; Ropero et al., 2006; Soria, 2004). Bei Untersuchungen zur E2-Sensitivität zeigen sowohl INS1-E-Zellen, als auch die für

den SUR1 oder die untersuchten Mutationen rekombinanten HEK293-Zellen, einen gesteigerten apoptotischen Effekt nach Behandlung mit 30 μM E2 oder höheren Konzentrationen. Die signifikante Erhöhung im rekombinanten Zellsystem bei 50 μM E2-Behandlung im Vergleich zu den pcDNA-Kontrollzellen zeigen Zellen, die SUR1 exprimieren im selben Ausmaß wie Zellen, welche die Mutationen SUR1(K719R), SUR1(K1384M), SUR1(R1379C) und SUR1(R1379L) exprimieren. Das bedeutet, dass die erhöhte Sensitivität der HEK293-Zellen, welche eine der untersuchten NBF-Mutanten exprimieren, gegenüber E2 erst bei höheren Konzentrationen (>50 μM) erkennbar wird.

Da der SUR1, wie zuvor beschrieben, mit geringer Affinität direkt mit E2 interagieren kann und daher möglicherweise als nicht-klassischer ER angesehen werden kann, war für diese Arbeit von Interesse ob auch selektive Estrogenrezeptor-Modulatoren (SERMS) eine SUR1-vermittelte Auswirkung auf die Zellvitalität zeigen. Dazu wurde die Auswirkung der SERMs Tamoxifen und Fulvestrant auf die Zelladhäsion in rekombinanten HEK293-Zellen untersucht.

Im Vergleich zu dem apoptotischen Effekt von E2 zeigt Tamoxifen, in unseren Versuchen mit rekombinanten HEK293-Zellen die SUR1, SUR1(K719R), SUR1(K1384M), SUR1(R1379C) oder SUR1(R1379L) exprimieren, einheitlich einen gesteigerten Verlust der Zellvitalität wenn die Substanz in Kombination mit E2 gegeben wird, ohne das die eingesetzte Konzentration von 10 μM an Tamoxifen alleine einen Effekt zeigt. Auch bei der Analyse der veränderten Nukleusmorphologie in isolierten Langerhans-Inseln nach Behandlung mit Tamoxifen zeigt sich der stärkste apoptotische Effekt nach einer kombinierten Behandlung von E2 und Tamoxifen. Eventuell führen die Mutationen in SUR1 zu einer Konformationsänderung, welche die Bindung von E2 und Tam am SUR1 oder interagierenden Proteinen beeinflussen und zu diesem Effekt führen. Dass die untersuchten Mutanten zu einem Verlust der Interaktion des SUR1 mit den membranständigen SNARE Proteinen führen können, ist bekannt (Chang et al., 2011). Weiterhin wurde an Untersuchungen in β -Zellen nachgewiesen, dass es durch diesen Verlust der Interaktion zu einer gestörten Exocytose von Insulinvesikeln kommen kann (Zhu et al., 2013). Im Gegenzug dazu zeigt die Behandlung mit Fulvestrant im rekombinanten Zellsystem einen schützenden Effekt.

Im Vergleich zu den mit E2 behandelten Zellen sinkt die Apoptoserate bei der kombinierten Behandlung mit E2 und Fv bei pcDNA-Kontrollzellen um 16%, bei SUR1 transfizierten Zellen um 21%, bei den Zellen, die die ATP-Hydrolyserate senkenden SUR1 Mutationen exprimieren (SUR1(K719R), SUR1(K1384M)) jeweils um 42%, bei den ATP-Hydrolyserate steigernden Mutationen für SUR1(R1379C) um 50% und für SUR1(R1379L) um 47%. Es kann davon ausgegangen werden, das Fulvestrant, auf die von uns untersuchten rekombinanten HEK293-Zellen, einen schützenden Effekt in Bezug auf den E2 induzierten Vitalitätsverlust ausübt. Demnach zeigt Fulvestrant, in den in dieser Arbeit durchgeführten

Versuchen, eine antagonistische Wirkung auf die E2-induzierten Effekt und steht damit der gezeigten agonistischen Wirkung von Tamoxifen gegenüber.

Um eine mögliche direkte Interaktion des SERMs Tamoxifen mit der SUR1 Untereinheit zu untersuchen, wurden Radioligandenbindungsstudien in Form von heterologen Wettbewerbsversuchen durchgeführt. Als Radioligand wurde dabei Tritium (^3H) markiertes Glibenclamid eingesetzt, welches in Anwesenheit von MgATP mit zunehmenden Konzentrationen an unmarkiertem Inhibitor (Tamoxifen) von der spezifischen Bindungsstelle am SUR1 verdrängt wurde (Amplitude $83,0 \pm 1,6 \%$). Dabei konnte eine direkte Interaktion von Tamoxifen mit dem SUR1 nachgewiesen werden (K_i -Wert $6,1 \pm 0,9 \mu\text{M}$). Damit zeigt Tamoxifen eine höhere Affinität zu SUR1 als E2 (K_i -Wert $81 \pm 26 \mu\text{M}$) (Ackermann et al., 2009). Diese Ergebnisse könnten auch eine Diskussion über die tatsächliche Selektivität des SERMs Tamoxifen eröffnen.

Um zu überprüfen, ob der apoptotische Effekt, ausgelöst durch E2, über eine Veränderung auf der Ebene der Genregulation hervorgerufen wird, wurden Genexpressionsanalysen anhand eines *Agilent Whole Genome Oligo Microarray* der Firma Miltenyi Biotec durchgeführt. Untersucht wurden dabei HEK293-Zellen, welche SUR1 oder, exemplarisch für die NBF-Mutanten, SUR1(R1379C) exprimieren. Als Kontrolle wurden HEK293-Zellen verwendet, welche den „leeren“ Expressionsvektor pcDNA exprimieren. Allein die Anzahl der in der Expression veränderten Gene lässt den Schluss zu, dass eine Regulation durch E2 erfolgt. Obwohl zahlreiche Gene nach Behandlung mit E2 in allen untersuchten Zelltypen konsequent hoch bzw. runter reguliert wurden, erreicht keiner der Werte eine gute statistische Signifikanz. Laut der bioinformatischen Analyse der Firma Miltenyi Biotec liegt dies jedoch an der geringen Anzahl an Replikaten mit $n=3$ pro Gruppe. Dennoch können Hinweise auf spezifische Unterschiede gefunden werden, so treten verschiedene Änderungen in der Genexpression durch die Überexpression von SUR1 und die von SUR1(R1379C) auf, welche sich auch von den Expressionsmustern der entsprechenden pcDNA-Kontrollzellen unterscheiden. Dies ist jedoch unabhängig von der Anwesenheit von E2. Möglicherweise zeigt sich bereits in der durch die Mutation ausgelösten Expression unterschiedlicher Gene beim Vergleich zwischen SUR1 und SUR1(R1379C) ein Grund für die erhöhte E2-Sensitivität der in dieser Arbeit untersuchten Mutanten. Offenbar spielt weniger eine E2 induzierte Änderung der Genexpression, sondern vielmehr eine unterschiedliche, eventuell schnellere Antwort, auf Enzymebene der untersuchten SUR1-Mutanten, auf die Behandlung mit E2 eine Rolle. Interessanterweise kann durch die durchgeführte Mikrochip-Genanalyse die Expression von ER α und ER β in den verwendeten HEK293-Zellen ausgeschlossen werden, das Vorkommen des nichtklassischen ER GPER sowie zahlreicher endogener ABC-Proteine jedoch bestätigt werden.

Von zukünftigem Interesse wird die genauere Aufklärung der Signalwege in der Zelle sein. Dazu zählen auch mögliche beteiligte Interaktionspartner in der Zelle zu bestimmen, welche über direkte oder indirekte Interaktion auf die E2-induzierten Konformationsänderungen des SUR1 reagieren. Ausserdem sollten weitere Studien zur Interaktion von Tamoxifen, Fulvestrant und weiteren SERMs mit dem SUR1 durchgeführt werden. Darüber Hinaus sollte der Einfluß der Mutationen SUR1(K719R), SUR1(K1384M), SUR1(R1379C) oder SUR1(R1379L) auf eine Interaktion mit den entsprechenden SERMs durchgeführt werden, um weitere Hinweise auf das Bindevverhalten und die mögliche Binderegion am SUR1 zu erhalten. Auch die Rolle der klassischen ERs in der SUR1-spezifischen E2 vermittelten Apoptose sollte näher analysiert werden.

8 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------------|--|
| ABC-Protein | ABC- bindendes Kassettenprotein |
| AFC | 7-Amino-4-Trifluoromethyl-Coumarin |
| Aq. bidest. | bidestilliertes Wasser |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BSA | Rinder-Serum-Albumin |
| °C | Grad Celcius |
| C | Cystein |
| Ca | Calcium |
| CASY | Cell Analysing System |
| CO ₂ | Kohlendioxid |
| CSP | Caspase |
| DGA | Diskriminatorische Gen Analyse |
| 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 | 17 β -Estradiol |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| ER | Estrogenrezeptor |
| EtOH | Ethanol |
| FCS | Fötales Kälberserum |

| | |
|------------|---|
| Fv | Fulvestrant (ICI 182,780) |
| g | Gramm |
| g | Gravitation |
| GBC | Glibenclamid |
| h | Stunde |
| HBSS | Hanks' Balanced Salt Solution |
| HCl | Salzsäure |
| HEK | Human Embryonic Kidney |
| HEPES | N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure |
| INS | Insulin-sezernierend |
| K | Lysin |
| KATP-Kanal | ATP-sensitiver Kaliumkanal |
| Kir | K ⁺ inwardly rectifying |
| L | Leucin |
| Lsgm. | Lösungsmittel |
| M | Methionin |
| M | Molar |
| MCF | Michigan Cancer Foundation |
| MEM | Minimum Essential Medium |
| µg | Mikrogramm |
| mg | Milligramm |
| Mg | Magnesium |
| min | Minute |
| µl | Mikroliter |
| ml | Milliliter |
| mm | Millimeter |
| µM | Mikromolar |
| mM | Millimolar |
| MRP | Multidrug Resistance-Related Protein |
| n | Versuchszahl, Anzahl Versuchstiere |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NaOH | Natronlauge |
| NBF | Nucleotide Binding Fold (Nukleotidbindungsfolde) |
| ng | Nanogramm |
| p | Signifikanzniveau |

| | |
|------|---|
| PBS | Phosphate-Buffered Saline |
| PKC | Proteinkinase C |
| R | Arginin |
| rpm | round per minute (Umdrehung pro Minute) |
| RPMI | Roswell Park Memorial Institute |
| S | Serin |
| SEM | Standardfehler |
| SERD | Selektiver Estrogen Rezeptor Down- Regulator |
| SERM | Selektiver Estrogen Rezeptor Modulator |
| SUR | Sulfonylharnstoffrezeptor |
| T | Threonin |
| TAM | Tamoxifen |
| TM | Transmembranhelix |
| TMD | Transmembrandomäne |
| Y | Tyrosin |

Die chemischen Elemente wurden mit den üblichen Symbolen abgekürzt.

Bei einigen Fachbegriffen, für die es im Deutschen keine oder nur eine unzureichende Entsprechung gibt, wurden die englischen beziehungsweise lateinischen Fachtermini verwendet.

9 Literaturverzeichnis

Abraham, G.E.O., W.D.; Swerdloff, R.S.; Hopper, K. (1972). Simultaneous Radioimmunoassay of Plasma FSH, LH, Progesterone, 17-Hydroxyprogesterone, and Estradiol-17/3 During the Menstrual Cycle. *J Clin Endocr* 34, 312-318.

Ackermann, S., Hiller, S., Osswald, H., Loesle, M., Grenz, A., and Hambrock, A. (2009). 17beta-Estradiol modulates apoptosis in pancreatic beta-cells by specific involvement of the sulfonylurea receptor (SUR) isoform SUR1. *The Journal of biological chemistry* 284, 4905-4913.

Aguilar-Bryan, L., and Bryan, J. (1999). Molecular Biology of Adenosine Triphosphate-Sensitive Potassium Channels. *Endocrine Reviews* 20, 101–135

Aguilar-Bryan, L.N., C.G.; Wechsler, S.W.; Clement IV, J.P.; Boyd III, A.E.; Gonzales, G.; Herrera-Sosa, H.; Nguy, K.; Bryan, J.; Nelson, D.A. (1995). Cloning of the β Cell High-Affinity Sulfonylurea Receptor: A Regulator of Insulin Secretion. *Science* 268, 423-426.

Aittoniemi, J., Fotinou, C., Craig, T.J., de Wet, H., Proks, P., and Ashcroft, F.M. (2009). Review. SUR1: a unique ATP-binding cassette protein that functions as an ion channel regulator. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 364, 257-267.

Aizawa, T.K., M.; Asanuma, N.; Sato, Y.; Sharp, G.W.G. (1998). Glucose action 'beyond ionic events' in the pancreatic β cell. *Trends in pharmacological sciences* 19, 496-499.

Al-Majed, H.T.S., P.E.; Persaud, S.J.; Huang, G-C.C.; Amiel, S.; Whitehouse, B.J.; Jones, P.M. (2005). Effect of 17b-Estradiol on Insulin Secretion and Cytosolic Calcium in Min6 Mouse Insulinoma Cells and Human Islets of Langerhans. *Pancreas* 30 Number 4, 307-313.

Albanito, L., Sisci, D., Aquila, S., Brunelli, E., Vivacqua, A., Madeo, A., Lappano, R., Pandey, D.P., Picard, D., Mauro, L., *et al.* (2008). Epidermal growth factor induces G protein-coupled receptor 30 expression in estrogen receptor-negative breast cancer cells. *Endocrinology* 149, 3799-3808.

Amann, T., Schell, S., Kuhner, P., Winkler, M., Schwanstecher, M., Russ, U., and Quast, U. (2010). Substitution of the Walker A lysine by arginine in the nucleotide-binding domains of sulphonylurea receptor SUR2B: effects on ligand binding and channel activity. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 381, 507-516.

Asfari, M.J., D.; Meda, P.; Li, G.; Halban, P.A.; Wollheim, C.B. (1992). Establishment of 2-Mercaptoethanol-Dependent Differentiated Insulin-Secreting Cell Lines. *Endocrinology* 130 No. 1, 167-178.

Ashcroft, F.M., and Kakei, M. (1989). ATP-sensitive K^+ channels in rat pancreatic β -cells: modulation by ATP and Mg^{2+} ions

Journal of Physiology 416, 349-367.

Ashcroft, F.M.G., F.M. (1998). Correlating structure and function in ATP-sensitive K⁺ channels. Trends Neurosci 21, 288–294.

Ashcroft, S.J.H.A., F. M. (1990). The sulfonylurea receptor. Elsevier Acta 1175, 49-59.

Ashfield, R.G., F.M.; Ashcroft, S.J.H.; Ashcroft, F.M. (1999). Identification of the High-Affinity Tolbutamide Site on the SUR1 Subunit of the KATP Channel. Diabetes 48, 1-7.

Babenko A.P.; Aguilar-Bryan, L.B., J. (1998). A view of SUR/Kir6.x KATP channels. Annual review of physiology 60, 667-687.

Babenko A.P.; Gonzales, G.B., J. (2000). Pharmacology of Sulfonylurea Receptors. The Journal of Biological Chemistry 275, 717–720.

Back, S.H., Kang, S.W., Han, J., and Chung, H.T. (2012). Endoplasmic reticulum stress in the beta-cell pathogenesis of type 2 diabetes. Experimental diabetes research 2012, 618396.

Barrett-Conner, E.M., L.; Collins, P.; Geiger, M.J.; Grady, D.; Kornitzer, M.; McNabb, M.A.; Wenger, N.K. (2006). Effects of Raloxifene on Cardiovascular Events and Breast Cancer in Postmenopausal Women. The new england journal of medicine 355 No.2, 125-137.

Bienengraeber, M.A., A.E.; Abraham, M.R.; Carrasco, A.J.; Moreau, C.; Vivaudou, M.; Dzeja, P.P.; Terzic, A. (2000). ATPase activity of the sulfonylurea receptor: a catalytic function for the KATP channel complex. FASEB 14, 1943-1952.

Borst, P., and Elferink, R.O. (2002). Mammalian ABC transporters in health and disease. Annual review of biochemistry 71, 537-592.

Bradford, M.M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Analytical Biochemistry 72, 248-254.

Bremner, I.B., J.H. (1990). Metallothionein and the trace minerals Annu Rev Nutr 10, 63-83.

Brooks S.C.; Locke, E.R.S., H.D. (1973). Estrogen Receptor in a Human Cell Line (MCF-7) from Breast Carcinoma. The Journal of Biological Chemistry 248 No. 17, 6251-6253.

Bryan, J., Munoz, A., Zhang, X., Dufer, M., Drews, G., Krippeit-Drews, P., and Aguilar-Bryan, L. (2007). ABCC8 and ABCC9: ABC transporters that regulate K⁺ channels. Pflugers Archiv : European journal of physiology 453, 703-718.

Buchanan, T.A., Xiang, A., Kjos, S.L., and Watanabe, R. (2007). What is gestational diabetes? Diabetes care 30 Suppl 2, S105-111.

Burke, M.A., Mutharasan, R.K., and Ardehali, H. (2008). The sulfonylurea receptor, an atypical ATP-binding cassette protein, and its regulation of the KATP channel. Circulation research 102, 164-176.

Butler, A.E.J., J.; Bonner-Weir, S.; Ritzel, R.; Rizza, R.A.; Butler, P.C. (2003). β -Cell Deficit and Increased β -Cell Apoptosis in Humans With Type 2 Diabetes. *Diabetes* 52, 102–110.

Butler, P.C., Meier, J.J., Butler, A.E., and Bhushan, A. (2007). The replication of beta cells in normal physiology, in disease and for therapy. *Nature clinical practice Endocrinology & metabolism* 3, 758-768.

Chang, D.W.X., Z.; Pan, Y.; Algeciras-Schimmich, A.; Barnhart, B.C.; Yaish-Ohad, S.; Peter, M.E.; Yang, X. (2002). c-FLIP_L is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95-mediated apoptosis. *The EMBO Journal* 21 No.14, 3704-3714.

Chang, N., Liang, T., Lin, X., Kang, Y., Xie, H., Feng, Z.P., and Gaisano, H.Y. (2011). Syntaxin-1A interacts with distinct domains within nucleotide-binding folds of sulfonylurea receptor 1 to inhibit beta-cell ATP-sensitive potassium channels. *The Journal of biological chemistry* 286, 23308-23318.

Cheng, Y.-C.a.P., W.H. (1973). Relationship between the inhibition constant (K₁) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochemical pharmacology* 22, 3099-3108.

Cherian, M.G., Jayasurya, A., and Bay, B.H. (2003). Metallothioneins in human tumors and potential roles in carcinogenesis. *Mutat Res-Fund Mol M* 533, 201-209.

Clement, J.P.t., 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.

Cohen, G.M. (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 326, 1-16.

Contreras, J.L., Smyth, C.A., Bilbao, G., Young, C.J., Thompson, J.A., and Eckhoff, D.E. (2002). 17beta-Estradiol protects isolated human pancreatic islets against proinflammatory cytokine-induced cell death: molecular mechanisms and islet functionality. *Transplantation* 74, 1252-1259.

Cui, N., Kang, Y., He, Y., Leung, Y.M., Xie, H., Pasyk, E.A., Gao, X., Sheu, L., Hansen, J.B., Wahl, P., *et al.* (2004). H3 domain of syntaxin 1A inhibits KATP channels by its actions on the sulfonylurea receptor 1 nucleotide-binding folds-1 and -2. *The Journal of biological chemistry* 279, 53259-53265.

Cuzick, J., Sestak, I., Bonanni, B., Costantino, J.P., Cummings, S., DeCensi, A., Dowsett, M., Forbes, J.F., Ford, L., LaCroix, A.Z., *et al.* (2013). Selective oestrogen receptor modulators in prevention of breast cancer: an updated meta-analysis of individual participant data. *The Lancet* 381, 1827-1834.

Dahlman-Wright, K., Cavailles, V., Fuqua, S.A., Jordan, V.C., Katzenellenbogen, J.A., Korach, K.S., Maggi, A., Muramatsu, M., Parker, M.G., and Gustafsson, J.A. (2006). International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen receptors. *Pharmacological reviews* 58, 773-781.

Davies, C., Pan, H., Godwin, J., Gray, R., Arriagada, R., Raina, V., Abraham, M., Alencar, V.H.M., Badran, A., Bonfill, X., *et al.* (2013). Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years after diagnosis of oestrogen receptor-positive breast cancer: ATLAS, a randomised trial. *The Lancet* 381, 805-816.

de Wet, H., Mikhailov, M.V., Fotinou, C., Dreger, M., Craig, T.J., Venien-Bryan, C., and Ashcroft, F.M. (2007a). Studies of the ATPase activity of the ABC protein SUR1. *The FEBS journal* 274, 3532-3544.

de Wet, H., Rees, M.G., Shimomura, K., Aittoniemi, J., Patch, A.M., Flanagan, S.E., Ellard, S., Hattersley, A.T., Sansom, M.S., and Ashcroft, F.M. (2007b). Increased ATPase activity produced by mutations at arginine-1380 in nucleotide-binding domain 2 of ABCC8 causes neonatal diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 18988-18992.

Dean, M.H., Y.; Chimini, G. (2013). The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Journal of Lipid Research* 42, 1007-1017.

Degterev, A., Huang, Z., Boyce, M., Li, Y., Jagtap, P., Mizushima, N., Cuny, G.D., Mitchison, T.J., Moskowitz, M.A., and Yuan, J. (2005). Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nature chemical biology* 1, 112-119.

deHertogh, R.T., K.; Bietlot, Y.; Vanderheyden, I.; Ferin, J. (1975). Plasma Levels of Unconjugated Estrone, Estradiol and Estriol and of HCS Throughout Pregnancy in Normal Women. *JCE & M* 40, 93-101.

Devlieger, R., Casteels, K., and Van Assche, F.A. (2008). Reduced adaptation of the pancreatic B cells during pregnancy is the major causal factor for gestational diabetes: current knowledge and metabolic effects on the offspring. *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica* 87, 1266-1270.

Donath, M.Y., and Halban, P.A. (2004). Decreased beta-cell mass in diabetes: significance, mechanisms and therapeutic implications. *Diabetologia* 47, 581-589.

Eckhoff, D.E., Eckstein, C., Smyth, C.A., Vilatoba, M., Bilbao, G., Rahemtulla, F.G., Young, C.J., Anthony Thompson, J., Chaudry, I.H., and Contreras, J.L. (2004). Enhanced isolated pancreatic islet recovery and functionality in rats by 17beta-estradiol treatment of brain death donors. *Surgery* 136, 336-345.

Efanova, I.B.Z.S.V.Z., B.; Köhler, M.; Efendic, S.; Orrenius, S.; Berggren, P-O. (1998). Glucose and Tolbutamide Induce Apoptosis in Pancreatic β -Cells. *The Journal of biological chemistry* 273 No.50, 33501-33507.

Effenberger, K. (2004). Der Einfluss von Phytoestrogenen auf Estrogenrezeptor gesteuerte Expressionsmuster in unterschiedlichen Zellpopulationen – Untersuchung potentieller pflanzlicher Alternativen zur Hormonersatztherapie in der Menopause. Dissertation, Universität Hamburg.

Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *NIH Public Access Toxicol Pathol* 35(4), 495–516.

Ernst, S., Demirci, C., Valle, S., Velazquez-Garcia, S., and Garcia-Ocana, A. (2011). Mechanisms in the adaptation of maternal beta-cells during pregnancy. *Diabetes management 1*, 239-248.

Esposti, M.D. (2002). The roles of Bid. *Apoptosis 7*, 433-440.

Fernandez-Santander, A., Gaibar, M., Novillo, A., Romero-Lorca, A., Rubio, M., Chicharro, L.M., Tejerina, A., and Bandres, F. (2013). Relationship between Genotypes Sult1a2 and Cyp2d6 and Tamoxifen Metabolism in Breast Cancer Patients. *PloS one 8*, e70183.

Filardo, E.J., and Thomas, P. (2005). GPR30: a seven-transmembrane-spanning estrogen receptor that triggers EGF release. *Trends Endocrin Met 16*, 362-367.

Fisher, B.C., J.P.; Wickerham, D.L.; Redmond, C.K.; Kavanah, M.; Cronin, W.M.; Vogel, V.; Robidoux, A.; Dimitrov, N.; Atkins, J.; Daly, M.; Wieand, S.; Tan-Chiu, E.; Ford, L.; Wolmark, N.; and others (1998). Tamoxifen for Prevention of Breast Cancer: Report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study. *Journal of the National Cancer Institute 90 No. 18*, 1371-1388.

Geburtshilfe, D.G.f.G.u. (2006). Diagnostik und Therapie des Gestationsdiabetes (GDM).

Gier, B., Krippeit-Drews, P., Sheiko, T., Aguilar-Bryan, L., Bryan, J., Dufer, M., and Drews, G. (2009). Suppression of KATP channel activity protects murine pancreatic beta cells against oxidative stress. *The Journal of clinical investigation 119*, 3246-3256.

Gloyn, A.L., Reimann, F., Girard, C., Edghill, E.L., Proks, P., Pearson, E.R., Temple, I.K., Mackay, D.J., Shield, J.P., Freedenberg, D., *et al.* (2005). Relapsing diabetes can result from moderately activating mutations in KCNJ11. *Human molecular genetics 14*, 925-934.

Gonzalez-Arenas, A., Aguilar-Maldonado, B., Avendano-Vazquez, S.E., and Garcia-Sainz, J.A. (2006). Estrogens cross-talk to alpha1b-adrenergic receptors. *Molecular pharmacology 70*, 154-162.

Graham, F.L.S., J.; Russel, W.C.; Nairin, R. (1977). Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5
J gen Virol 36, 59-72.

Hambrock, A., de Oliveira Franz, C.B., Hiller, S., Grenz, A., Ackermann, S., Schulze, D.U., Drews, G., and Osswald, H. (2007). Resveratrol binds to the sulfonylurea receptor (SUR) and induces apoptosis in a SUR subtype-specific manner. *The Journal of biological chemistry 282*, 3347-3356.

Hambrock, A., de Oliveira Franz, C.B., Hiller, S., and Osswald, H. (2006). Glibenclamide-induced apoptosis is specifically enhanced by expression of the sulfonylurea receptor isoform SUR1 but not by expression of SUR2B or the mutant SUR1(M1289T). *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics 316*, 1031-1037.

Hambrock, A.K., T.; Stumpp, D.; Osswald, H. (2004). Effect of Two Amino Acids in TM17 of Sulfonylurea Receptor SUR1 on the Binding of ATP-Sensitive K⁺ Channel Modulators. *Diabetes 53*, 128-134.

- Hambrock, A.L.-W., C.; Kurachi, Y.; Quast, U. (1998). Mg²⁺ and ATP dependence of KATP channel modulator binding to the recombinant sulfonylurea receptor, SUR2B. *British Journal of Pharmacology* 125.
- Hambrock, A.L.-W., C.; Quast, U. (2002). Glibenclamide binding to sulfonylurea receptor subtypes: dependence on adenine nucleotides. *British Journal of Pharmacology* 136, 995-1004.
- Hambrock, A.L.-W., C.; Russ, U.; Lange, U.; Quast, U. (2001). Characterization of a Mutant Sulfonylurea Receptor SUR2B with High Affinity for Sulfonylureas and Openers: Differences in the Coupling to Kir6.x Subtypes. *Molecular pharmacology* 60, 190-199.
- Hamer, D.H. (1986). Metallothionein 1,2 *Ann Rev Biochem* 913-951.
- Harman, S.M., Naftolin, F., Brinton, E.A., and Judelson, D.R. (2005). Is the estrogen controversy over? Deconstructing the Women's Health Initiative study: a critical evaluation of the evidence. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1052, 43-56.
- Hasbi, A., O'Dowd, B.F., and George, S.R. (2005). A G protein-coupled receptor for estrogen: the end of the search? *Molecular interventions* 5, 158-161.
- Hasler, J.A.E., R.; Murray, M.; Pikuleva, I.; Waterman, M.; Capdevila, J.; Holla, V.; Helvig, C.; Falck, J.R.; Farrell, G.; Kaminsky, L.S.; Spivack, S.D.; Boitier, E.; Beaune, P. (1999). Human cytochromes P450. Pergamon: *Molecular Aspects of Medicine* 20, 1-137.
- Heldring, N.P., A.; Andersson, S.; Matthews, J.; Cheng, G.; Hartman, J.; Tujague, M.; Ström, A.; Treuter, E.; Warner, M.; Gustafsson, J-A. (2007). Estrogen Receptors: How Do They Signal and What Are Their Targets. *Physiol Rev* 87, 905–931.
- Henquin, J.-C. (2000). Triggering and Amplifying Pathways of Regulation of Insulin Secretion by Glucose. *Diabetes* 49, 1752-1760.
- Henquin, J.C. (2011). The dual control of insulin secretion by glucose involves triggering and amplifying pathways in beta-cells. *Diabetes research and clinical practice* 93 *Suppl* 1, S27-31.
- Hiller, S. (2005). Untersuchungen zum Einfluss der Mutation T1254M in TM17 des Sulfonylharnstoffrezeptors SUR2B auf die MgATP-Abhängigkeit der Bindung von KATP - Kanal - Öffnern. Diplomarbeit.
- Hinke, S.A. (2009). Epac2: a molecular target for sulfonylurea-induced insulin release. *Science signaling* 2, pe54.
- Hirst, J.A., Farmer, A.J., Dyar, A., Lung, T.W., and Stevens, R.J. (2013). Estimating the effect of sulfonylurea on HbA1c in diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Diabetologia* 56, 973-984.

Hosy, E., Derand, R., Revilloud, J., and Vivaudou, M. (2007). Remodelling of the SUR-Kir6.2 interface of the KATP channel upon ATP binding revealed by the conformational blocker rhodamine 123. *The Journal of physiology* 582, 27-39.

Inagaki, N.G., T.; Clement IV, J.P., Wang, C-Z.; Aguilar-Bryan, L.; Bryan, J.; Seino, S. (1996). A Family of Sulfonylurea Receptors Determines the Pharmacological Properties of ATP-Sensitive K⁺ Channels. *Neuron* 16, 1011–1017.

Inagaki, N.T., Y.; Namba, N.; Masuda, K.; Gono, T.; Horie, M.; Seino, Y.; Mizuta, M.; Seino, S. (1995). Cloning and Functional Characterization of a Novel ATP-sensitive Potassium Channel Ubiquitously Expressed in Rat Tissues, including Pancreatic Islets, Pituitary, Skeletal Muscle and Heart*. *The Journal of biological chemistry* 270, No. 11, 5691-5694.

Iwakura, T., Fujimoto, S., Kagimoto, S., Inada, A., Kubota, A., Someya, Y., Ihara, Y., Yamada, Y., and Seino, Y. (2000). Sustained enhancement of Ca²⁺ influx by glibenclamide induces apoptosis in RINm5F cells. *Biochemical and biophysical research communications* 271, 422-428.

Kahlert, S., Nuedling, S., van Eickels, M., Vetter, H., Meyer, R., and Grohe, C. (2000). Estrogen receptor alpha rapidly activates the IGF-1 receptor pathway. *The Journal of biological chemistry* 275, 18447-18453.

Kataoka, T.S., M.; Hahne, M.; Schneider, P.; Irmeler, M.; Thome, M.; Froelich, C.J.; Tschopp J. (1998).

FLIP Prevents Apoptosis Induced by Death Receptors But Not by Perforin/Granzyme B, Chemotherapeutic Drugs, and Gamma Irradiation
The Journal of Immunology 161, 3936-3942.

Katzenellenbogen, B.S.K.J.A. (2000). Estrogen receptor transcription and transactivation
Estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta: regulation
by selective estrogen receptor modulators and importance in
breast cancer. *breast Cancer Res* 2, 335–344.

Kelly, M.J., Ronnekleiv, O.K., and Eskay, R.L. (1984). Identification of estrogen-responsive LHRH neurons in the guinea pig hypothalamus. *Brain research bulletin* 12, 399-407.

Kerr, J.F.R.W., A.H.; Currie, A.R. (1972). Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-257.

Kischkel, F.H., S.; Behrmann, I.; Germer, M.; Pawlita, M.; Krammer, P.; Peter, M.E. (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *The EMBO Journal* 14, No.22, 5579-5588.

Kuiper, G.E., E.; Peltto-Huikko, M.; Nilsson, S.; Gustafsson J-A. (1996). Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Biochemistry* 93, 5925-5930.

- Le May, C., Chu, K., Hu, M., Ortega, C.S., Simpson, E.R., Korach, K.S., Tsai, M.J., and Mauvais-Jarvis, F. (2006). Estrogens protect pancreatic beta-cells from apoptosis and prevent insulin-deficient diabetes mellitus in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 9232-9237.
- Lefer, D.N., C.; Coetzee, W. (2009). Sulfonylurea Receptor 1 Subunits of ATP-Sensitive Potassium Channels and Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury. *Elsevier Inc TCM* 19, No. 2, 61-67.
- Li, L., Hisamoto, K., Kim, K.H., Haynes, M.P., Bauer, P.M., Sanjay, A., Collinge, M., Baron, R., Sessa, W.C., and Bender, J.R. (2007). Variant estrogen receptor-c-Src molecular interdependence and c-Src structural requirements for endothelial NO synthase activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 16468-16473.
- Locksley, R.M.K., N.; Lenardo, M.J. (2001). The TNF and TNF Receptor Superfamilies: Integrating Mammalian Biology. *Cell* 104, 487-501.
- Luo, Y., Waladali, W., Li, S., Zheng, X., Hu, L., Zheng, H., Hu, W., and Chen, C. (2008). 17beta-estradiol affects proliferation and apoptosis of rat prostatic smooth muscle cells by modulating cell cycle transition and related proteins. *Cell biology international* 32, 899-905.
- Maedler, K., Sergeev, P., Ris, F., Oberholzer, J., Joller-Jemelka, H.I., Spinas, G.A., Kaiser, N., Halban, P.A., and Donath, M.Y. (2002). Glucose-induced β cell production of IL-1 β contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. *Journal of Clinical Investigation* 110, 851-860.
- Maggiolini, M.B., D.; Marsico, S.; Panno, M.L.; Cenni, B.; Picard, D.; Ando, S. (2001). Estrogen Receptor α Mediates the Proliferative but Not the Cytotoxic Dose-Dependent Effects of Two Major Phytoestrogens on Human Breast Cancer Cells. *Molecular pharmacology* 60 No. 3, 595-602.
- Mandelkar, S.K., A.-N.T. (2001). Mechanisms of tamoxifen-induced apoptosis. *Apoptosis* 6, 469-477.
- Matsuo, M., Tanabe, K., Kioka, N., Amachi, T., and Ueda, K. (2000). Different binding properties and affinities for ATP and ADP among sulfonylurea receptor subtypes, SUR1, SUR2A, and SUR2B. *The Journal of biological chemistry* 275, 28757-28763.
- Mikhailov, M.V.M., E.A.; Ashcroft, S.J.H. (2001). Molecular structure of the glibenclamide binding site of the β -cell K_{ATP} -channel. *FEBS* 499, 154-160.
- Miller, V.M., and Duckles, S.P. (2008). Vascular actions of estrogens: functional implications. *Pharmacological reviews* 60, 210-241.
- Mohr, K. (2004). [The pharmacology of estrogens]. *Pharmazie in unserer Zeit* 33, 360-364.
- Moreau, C., Prost, A.L., Derand, R., and Vivaudou, M. (2005). SUR, ABC proteins targeted by KATP channel openers. *Journal of molecular and cellular cardiology* 38, 951-963.

- Moriarty, K., Kim, K.H., and Bender, J.R. (2006). Minireview: estrogen receptor-mediated rapid signaling. *Endocrinology* 147, 5557-5563.
- Nadal, A., Ropero, A.B., 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.R., J.M.; Laribi, O.; Leon-Quinto, T.; Andreu, E.; Ripoll, C.; Soria, B. (1998). Rapid insulinotropic effect of 17 β -estradiol via a plasma membrane receptor. *The FASEB Journal* 12, 1341-1348.
- Nakagawa, T.Z., H.; Morishima, N.; Li, E.; Xu, J.; Yankner, B.A.; Yuan, J. (2000). caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid- β . *Nature* 403, 98-103.
- Nazarewicz, R.R., Zenebe, W.J., Parihar, A., Larson, S.K., Alidema, E., Choi, J., and Ghafourifar, P. (2007). Tamoxifen induces oxidative stress and mitochondrial apoptosis via stimulating mitochondrial nitric oxide synthase. *Cancer research* 67, 1282-1290.
- Nelson, K. (2008). Untersuchungen zum Einfluss von Estradiol, Tamoxifen und ICI 182,780 auf Adhäsionsmoleküle von drei oralen Plattenepithelkarzinomzelllinien in vitro. Habilitationsschrift.
- Nichols, C.G. (2006). KATP channels as molecular sensors of cellular metabolism. *Nature* 440, 470-476.
- Nichols, C.G.S., S.-L.; Nestorowicz, A.; Glaser, B.; Clement IV, J.P.; Gonzales, G.; Aguilar-Bryan, L.; Permutt, A.; Bryan, J. (1996). Adenosine Diphosphate as an Intracellular Regulator of Insulin Secretion. *Science* 272, 1785-1787.
- Ohmichi, M.T., K.; Kurachi, H.; Murata, Y. (2005). Molecular Mechanism of Action of Selective Estrogen Receptor Modulator in Target Tissues. *Endocrine Journal* 52 (2), 161–167.
- Ortiz, D., Gossack, L., Quast, U., and Bryan, J. (2013). Reinterpreting the action of ATP analogs on KATP channels. *The Journal of biological chemistry*.
- Pasyk, E.A., Kang, Y., Huang, X., Cui, N., Sheu, L., and Gaisano, H.Y. (2004). Syntaxin-1A binds the nucleotide-binding folds of sulphonylurea receptor 1 to regulate the KATP channel. *The Journal of biological chemistry* 279, 4234-4240.
- Patch, A.M., Flanagan, S.E., Boustred, C., Hattersley, A.T., and Ellard, S. (2007). Mutations in the ABCC8 gene encoding the SUR1 subunit of the KATP channel cause transient neonatal diabetes, permanent neonatal diabetes or permanent diabetes diagnosed outside the neonatal period. *Diabetes, obesity & metabolism* 9 Suppl 2, 28-39.
- Poitout, V.R., P.R. (2002). Minireview: Secondary β -Cell Failure in Type 2 Diabetes—A Convergence of Glucotoxicity and Lipotoxicity. *Endocrinology* 143(2), 339–342.

Ponce-Balbuena, D., Moreno-Galindo, E.G., López-Izquierdo, A., Ferrer, T., and Sánchez-Chapula, J.A. (2010). Tamoxifen Inhibits Cardiac ATP-Sensitive and Acetylcholine-Activated K⁺ Currents in Part by Interfering With Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate–Channel Interaction. *Journal of Pharmacological Sciences* 113, 66-75.

Proks, P. (2013). Neonatal diabetes caused by activating mutations in the sulphonylurea receptor. *Diabetes & metabolism journal* 37, 157-164.

Proks, P., Arnold, A.L., Bruining, J., Girard, C., Flanagan, S.E., Larkin, B., Colclough, K., Hattersley, A.T., Ashcroft, F.M., and Ellard, S. (2006). A heterozygous activating mutation in the sulphonylurea receptor SUR1 (ABCC8) causes neonatal diabetes. *Human molecular genetics* 15, 1793-1800.

Proks, P.A., F.M. (1997). Phentolamine block of KATP channels is mediated by Kir6.2. *Physiology, Proc Natl Acad Sci* 94, 11716–11720.

Prossnitz, E.R., and Barton, M. (2011). The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease. *Nature reviews Endocrinology* 7, 715-726.

Rai, N.K., Tripathi, K., Sharma, D., and Shukla, V.K. (2005). Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing. *The international journal of lower extremity wounds* 4, 138-144.

Reddel, R.R.M., L.C.; Sutherland, R.L. (1983). Proliferation Kinetics of MCF-7 Human Breast Cancer Cells in Effects of Biologically Active Metabolites of Tamoxifen on the Vitro. *Cancer research* 43, 4618-4624.

Revankar, C.M.C., D.F.; Sklar, L.A.; Arterburn, J.A.; Prossnitz, E.R. (2005). A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science* 307, 1625-1630.

Riggs, B.L.a.H., L.C. (2003). Selective Estrogen-Receptor Modulators — Mechanisms of Action and Application to Clinical Practice. *The New England journal of medicine* 348, 618-629.

Ripoll, C., Ropero, A.B., Alonso-Magdalena, P., Quesada, I., Fuentes, E., and Nadal, A. (2008). Rapid regulation of pancreatic alpha- and beta- cell signalling systems by estrogens. *Infectious disorders drug targets* 8, 61-64.

Robertson, R.P. (2004). Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. *The Journal of biological chemistry* 279, 42351-42354.

Roepke, T.A.R., O.K.; Kelly, M.J. (2011). Physiological consequences of membrane-initiated estrogen signaling in the brain. *NIH Public Access Front Biosci* 16, 1560–1573.

Ropero, A.B., Alonso-Magdalena, P., Ripoll, C., Fuentes, E., and Nadal, A. (2006). Rapid endocrine disruption: environmental estrogen actions triggered outside the nucleus. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 102, 163-169.

Rubinstein, A.D., and Kimchi, A. (2012). Life in the balance - a mechanistic view of the crosstalk between autophagy and apoptosis. *J Cell Sci* 125, 5259-5268.

Russ, U., Lange, U., Löffler-Walz, C., Hambrock, A., and Quast, U. (2003). Binding and effect of K ATP channel openers in the absence of Mg²⁺. *British journal of pharmacology* 139, 368-380.

Saelens, X., Festjens, N., Vande Walle, L., van Gorp, M., van Loo, G., and Vandenabeele, P. (2004). Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 23, 2861-2874.

Santen, R.J., and Allred, D.C. (2007). The estrogen paradox. *Nature clinical practice Endocrinology & metabolism* 3, 496-497.

Saraste M, S.P., Wittinghofer A (1990). The P-loop—a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends Biochem Sci* 15(11):430-4.

Schmidt, D. (2006). [Changes in the endometrium after tamoxifen therapy]. *Der Pathologe* 27, 27-32.

Schwanstecher, M.S., C.; Dörschner, H.; Gross, I.; Aguilar-Bryan, L.; Schwanstecher, C.; Bryan, J. (1998). Potassium channel openers require ATP to bind to and act through sulfonylurea receptors. *The EMBO Journal* 17 No. 19, 5529–5535.

Schwappach, B.Z., N.; Jan, Y.N.; Jan L.Y. (2000). Molecular Basis for KATP Assembly: Transmembrane Interactions Mediate Association of a K⁺ Channel with an ABC Transporter. *Neuron* 26, 155–167.

Schwarz, E.C.N., E.M.; Kistler, C.; Henkel, A.W.; Soldati, T. (2000). Dictyostelium myosin IK is involved in the maintenance of cortical tension and affects motility and phagocytosis. *Journal of Cell Science* 113, 621-633.

Seino, S., and Miki, T. (2003). Physiological and pathophysiological roles of ATP-sensitive K⁺ channels. *Progress in Biophysics & Molecular Biology* 81 133–176.

Simpson, E.R., and Davies, S.R. (2001). Minireview: Aromatase and the Regulation of Estrogen Biosynthesis—Some New Perspectives. *Endocrinology* 142(11), 4589–4594.

Slee, E.A., Adrain, C., and Martin, S.J. (2001). Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 276, 7320-7326.

Song, R.X.-D.M., G.; Naftolin, F.; McPherson, R.A.; Song, J.; Zhang, Z.; Yue, W.; Wang, J.; Santen, R.J. (2001). Effect of Long-Term Estrogen Deprivation on Apoptotic Responses of Breast Cancer Cells to 17 β -Estradiol. *Journal of the National Cancer Institute* 92 No. 22, 1714-1723.

Soria, B.Q., I.; Ropero, A.B.; Pertusa, J.A.; Martin, F.; Nadal, A. (2004). Novel Players in Pancreatic Islet Signaling From Membrane Receptors to Nuclear Channels. *Diabetes* 53, 86-91.

Steil G.M.; Trivedi, N.J., J-C.; Hasenkamp, W.M.; Sharma, A.; Bonner-Weir, S.; Weir, G.C. (2001). Adaptation of β -cell mass to substrate oversupply: enhanced function with normal gene expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280, E788-E796.

Stephan, D., Stauss, E., Lange, U., Felsch, H., Loffler-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. *British journal of pharmacology* 144, 1078-1088.

Straub S. G.; Cosgrove, K.Ä., C.; Shepherd, M.N.; O'Brien R.E.; Barnes, P.D.; Kuchinski, N.; Chapman, J.C.; Schaeppi, M.; Glaser, B.; Lindley, K.J.; Sharp, G.W.G.; Aynsley-Green, A.; Dunne, M.J. (2001). Hyperinsulinism of Infancy: The Regulated Release of Insulin by KATP Channel-Independent Pathways. *Diabetes* 50, 329-339.

Szego, C.M.D., J.S. (1967). Adenosine 3',5'-Monophosphate in rat uterus: Acute elevation by estrogen* *Biochemistry* 58, 1711-1718.

Takahashi, S. (2012). Molecular functions of metallothionein and its role in hematological malignancies. *Journal of hematology & oncology* 5, 41.

Tang, W., Eggertsen, G., Chiang, J.Y., and Norlin, M. (2006). Estrogen-mediated regulation of CYP7B1: a possible role for controlling DHEA levels in human tissues. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 100, 42-51.

Thomas, P., Pang, Y., Filardo, E.J., and Dong, J. (2005). Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology* 146, 624-632.

Tiano, J.P., and Mauvais-Jarvis, F. (2012). Molecular mechanisms of estrogen receptors' suppression of lipogenesis in pancreatic beta-cells. *Endocrinology* 153, 2997-3005.

Tremblay, G.B.T., A.; Copeland, N.G.; Gilbert, D.J.; Jenkins, N.A.; Labrie, F.; Giguere, V. (1997). Cloning, Chromosomal Localization, and Functional Analysis of the Murine Estrogen Receptor β . *Molecular endocrinology* 11 No. 3, 343-365.

Tsangaris, G.T., and Tzortzatou-Stathopoulou, F. (1998). Metallothionein expression prevents apoptosis: A study with antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides in a human T cell line. *Anticancer Res* 18, 2423-2433.

Ueda, K.K., J.; Matsuo, M.; Seino, S.; Amachi, T. (1999a). Cooperative binding of ATP and MgADP in the sulfonylurea receptor is modulated by glibenclamide. *PNAS* 96, 1268-1272.

Ueda, K.M., M.; Tanabe, K.; Morita, K.; Kioka, N.; Amachi, T. (1999b). Comparative aspects of the function and mechanism of SUR1 and MDR1 proteins. *Elsevier Inc TCM Biochemica and Biophysica Acta* 1461, 305-313.

Van Assche, F.A.G., W.; Aerts, L. (1980). Immunocytochemical Study of the Endocrine Pancreas in the Rat during Normal Pregnancy and during Experimental Diabetic Pregnancy. *Diabetologia* 18, 487-491.

Wajant, H. (2002). The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science* 296, 1635-1636.

Wakeling, A.E.D., M.; Bowler, J. (1991). A Potent Specific Pure Antiestrogen with Clinical Potential. *Cancer research* 51, 3867-3873.

Walker, J.E.S., M.; Runswick, M.J.; Gay, N.J. (1982). Distantly related sequences in the α - and β -subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO* 1, 945-951.

Wardell, S.E., Marks, J.R., and McDonnell, D.P. (2011). The turnover of estrogen receptor alpha by the selective estrogen receptor degrader (SERD) fulvestrant is a saturable process that is not required for antagonist efficacy. *Biochemical pharmacology* 82, 122-130.

Wehling, M., Schultz, A., and Losel, R. (2006). Nongenomic actions of estrogens: exciting opportunities for pharmacology. *Maturitas* 54, 321-326.

Weir, G.C., and Bonner-Weir, S. (2013). Islet beta cell mass in diabetes and how it relates to function, birth, and death. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1281, 92-105.

Williams, J.K., Adams, M.R., Herrington, D.M., and Clarkson, T.B. (1992). Short-term administration of estrogen and vascular responses of atherosclerotic coronary arteries. *Journal of the American College of Cardiology* 20, 452-457.

Winkler, M., Stephan, D., Bieger, S., Kuhner, P., Wolff, F., and Quast, U. (2007). Testing the bipartite model of the sulfonylurea receptor binding site: binding of A-, B-, and A + B-site ligands. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 322, 701-708.

Yamada, M., Ishii, M., Hibino, H., and Kurachi, Y. (2004). Mutation in nucleotide-binding domains of sulfonylurea receptor 2 evokes Na-ATP-dependent activation of ATP-sensitive K⁺ channels: implication for dimerization of nucleotide-binding domains to induce channel opening. *Molecular pharmacology* 66, 807-816.

Yamada, M., and Kurachi, Y. (2004). The Nucleotide-Binding Domains of Sulfonylurea Receptor 2A and 2B Play Different Functional Roles in Nicorandil-Induced Activation of ATP-Sensitive K⁺ Channels *Molecular pharmacology* 65, 1198–1207.

Zeiss, C.J. (2003). The Apoptosis-Necrosis Continuum: Insights from Genetically Altered Mice. *Veterinary Pathology* 40, 481-495.

Zhang, Y., Zhao, H., Asztalos, S., Chisamore, M., Sitabkhan, Y., and Tonetti, D.A. (2009). Estradiol-induced regression in T47D:A18/PKCalpha tumors requires the estrogen receptor and interaction with the extracellular matrix. *Molecular cancer research : MCR* 7, 498-510.

Zhu, D., Koo, E., Kwan, E., Kang, Y., Park, S., Xie, H., Sugita, S., and Gaisano, H.Y. (2013). Syntaxin-3 regulates newcomer insulin granule exocytosis and compound fusion in pancreatic beta cells. *Diabetologia* 56, 359-369.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Professor Dr. Dr. Bernd Nürnberg dafür, dass er mir ermöglicht hat meine Dissertation, auch über das Bestehen meiner Arbeitsgruppe hinaus, am Institut für Pharmakologie und Toxikologie anfertigen zu können.

Bei Frau PD Dr. Annette Hambrock möchte ich mich ganz herzlich für die Betreuung und die Möglichkeit meine Dissertation auf diesem Thema durchführen zu können bedanken.

Herrn Professor Dr. Mallot danke ich für die kurzfristige Übernahme meiner Arbeit als Gutachter.

Insbesondere möchte ich mich bei Claudia Müller, Dr. Claudia Bernardo de Oliveira Franz, Professor Dr. Kloor und Dr. Veronika Leiss bedanken, die immer ein offenes Ohr für meine Fragen hatten.

Weiterhin danke ich Claudia Müller, Dr. Stefanie Ackermann und Sabrina Hiller für die Einführung in die unterschiedlichen Methoden und die vielen guten Ratschläge während meiner Dissertation.

Prajwal, Zaher Kalo und Dr. Chihab Klose danke ich für all die gemeinsam verbrachten unterhaltsamen Mittagspausen.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern, meiner Schwester, meinen Großeltern und meinen Freunden für Ihr Verständnis und ihre Unterstützung auf jede nur erdenkliche Weise.

VIELEN DANK!

Publikationen

Teilweise wurden Ergebnisse dieser Dissertation bereits in anderer Form veröffentlicht:

Artikel in wissenschaftlichen Zeitschriften:

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.* Vol 284, No. 8, pp 4905-4913, February 20, 2009

Kongressbeiträge:

Lösle M, Hiller S, Ackermann S, Hambrock A (2009). Influence of the mutation R1379C in NBF2 of sulfonylurea receptor (SUR) 1 on the interaction of SUR with 17 β -Estradiol. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 379:33 (143)

Lösle M, Hiller S, Ackermann S, Hambrock A (2010). Different mutations in the *ABCC8* gene can either enhance or reduce sulfonylurea receptor 1 mediated apoptosis. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 107 (Suppl. 1): 428-429 (1723)

Eidesstattliche Erklärung

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

Tübingen, im Oktober 2013

Martina Lösle