

**Die physiologische Rolle des 2-P-Domänen
Kaliumkanals TWIK1 in der Niere und im Pankreas**

DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER NATURWISSENSCHAFTEN
(DR. RER. NAT.) DER NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT III
– BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG



vorgelegt von
Markus Reichold aus Regensburg
Januar 2008

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von August 2004 bis Januar 2008 unter der Anleitung von Herr Prof. Dr. med. Richard Warth am Institut für Physiologie der Universität Regensburg.

Promotionsgesuch eingereicht am: 23.01.2008

Colloquium: 14.03.2008

Die Arbeit wurde angeleitet von: Herr Prof. Dr. med. Richard Warth

Prüfungsausschuss:
Herr Prof. Dr. med. Ralph Witzgall (Vorsitzender)
Herr Prof. Dr. med. Richard Warth (1. Gutachter/Prüfer)
Herr Prof. Dr. med. Ernst Tamm (2. Gutachter/Prüfer)
Herr Prof. Dr. rer. nat. Jens Schlossmann (3. Prüfer)

Meiner Mutter

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	1
1. Einleitung	4
1.1 Klassifizierung und Funktionen von Kaliumkanälen	4
1.2 2-P-Domänen Kaliumkanäle	8
1.3 Eigenschaften und Expression von murinem TWIK1	9
1.4 Rückresorption von Glucose in der Niere	16
1.5 Mechanismen der Insulinsekretion	19
2. Zielsetzung	29
3. Material und Methoden.....	30
3.1 Material	30
3.1.1 Geräte	30
3.1.2 Verbrauchsmaterial.....	30
3.1.3 Chemikalien, Arzneistoffe, Hormone	31
3.1.4 Enzyme, Kits.....	32
3.1.5 Software.....	33
3.1.6 Oligonukleotide	33
3.1.7 Antikörper	33
3.1.8 Puffer und Lösungen	34
3.2 Methoden.....	37
3.2.1 Mäuse	37
3.2.2 Histologische Methoden.....	37
3.2.2.1 Gewebefixierung durch retrograde arterielle Perfusion	37
3.2.2.2 Einbettung in Paraffin.....	38
3.2.2.3 Anfertigung von Paraffinschnitten	38
3.2.2.4 Vorbereitung der Kryopräparate	38
3.2.2.5 Anfertigung von Kryoschnitten	39
3.2.2.6 Immunhistochemische Färbung.....	39
3.2.2.7 Mikroskopie.....	39
3.2.3 Molekularbiologische Methoden	40
3.2.3.1 Isolierung von Total-RNA aus Nieren	40
3.2.3.2 Reverse Transkription (cDNA-Synthese).....	40
3.2.3.3 Quantitative Polymerasekettenreaktion (Real-time-PCR).....	41
3.2.4 Kastration und hormonelle Behandlung von Mäusen	42

3.2.4.1 Kastrations-Experimente an männlichen Mäusen	42
3.2.4.2 Behandlung von nicht-kastrierten Mäusen mit Geschlechtshormonen	42
3.2.5 Glucoseinfusion bei TWIK1 ^{+/+} und TWIK1 ^{-/-} Mäusen	43
3.2.5.1 Durchführung der Glucoseinfusionsexperimente	43
3.2.5.2 Auswertung der Daten	44
3.2.6 Semi-Quantifizierung der TWIK1-Lokalisation	46
3.2.7 Untersuchung von Endozytosewegen im proximalen Tubulus	46
3.2.7.1 „Fluid phase“-Endocytose (Pinozytose)	47
3.2.7.2 Rezeptorvermittelte Endozytose	47
3.2.8 Messung der Aminosäureausscheidung im Urin	47
3.2.9 Primärkultur von isolierten Inselzellen des Pankreas	48
3.2.9.1 Präparation des Pankreas	48
3.2.9.2 Sammeln von Langerhans Inseln	49
3.2.9.3 Kultivierung der isolierten Inselzellen.....	49
3.2.10 Patch-Clamp Experimente an isolierten Inselzellen.....	49
3.2.10.1 Patch-Clamp Messungen im Whole-Cell-Modus	50
3.2.10.2 Patch-Clamp Messungen im “Slow-Whole-Cell-Modus”	51
3.2.11 Ca ²⁺ -Messungen an isolierten Inselzellen mit Fura-2	51
3.2.11.1 Durchführung der Messung	51
3.2.11.2 Auswertung der Daten	52
3.2.12 Mikroskopische Vermessung von Langerhans Inseln.....	52
3.2.13 Intraperitonealer Glucosetoleranztest	53
3.2.14 Stimulation der Insulinsekretion durch Fructose Diät.....	54
3.2.15 Glucose-Wirkung an isolierten Inseln	54
3.2.16 Statistik	54
4. Ergebnisse	56
4.1 TWIK1 in der Mausniere	56
4.1.1 Lokalisation von TWIK1 in der Niere.....	56
4.1.2 Geschlechtsabhängige Expression von TWIK1 im proximalen Tubulus.....	59
4.1.3 Koloalisation von TWIK1 mit SGLT1	61
4.1.4 Quantifizierung der Expression von Genen des proximalen Tubulus	65
4.1.5 Hormonelle Behandlung und Kastrationsexperimente.....	66
4.1.5.1 Hormonelle Behandlung von TWIK1 ^{+/+} Mäusen.....	66
4.1.5.2 Kastrationsexperimente an männlichen TWIK1 ^{+/+} Mäusen.....	67
4.1.6 Glucoseinfusion bei TWIK1 ^{+/+} und TWIK1 ^{-/-} Mäusen	68
4.1.7 Messung der Aminosäureausscheidung im Urin	72
4.1.8 Untersuchung von Endozytosewegen	74

4.2 TWIK1 im Pankreas der Maus.....	76
4.2.1 Lokalisation von TWIK1 im murinen Pankreas	76
4.2.2 Intraperitonealer Glucosetoleranztest	81
4.2.3 Stimulation der Insulinsekretion durch Fructose Diät.....	82
4.2.4 Mikroskopische Vermessung von Langerhans Inseln.....	84
4.2.5 Wirkung von Glucose auf isolierte Langerhans Inseln.....	85
4.2.6 Ca ²⁺ -Messungen an isolierten Inselzellen.....	87
4.2.7 Patch-clamp Messungen an isolierten Inselzellen	89
4.2.7.1 Messung des Membranpotentials	89
4.2.7.3 Beitrag von TWIK1 zur Kaliumleitfähigkeit von β -Zellen	91
4.2.8 Kolokalisation von TWIK1 mit ARF6 und Vamp8.....	95
5. Diskussion.....	97
5.1 TWIK1 im proximalen Tubulus der Mausniere.....	97
5.2 TWIK1 in den β -Zellen der Maus	105
5.3 TWIK1 im Dienste der Blutzuckerregulation	113
6. Zusammenfassung	114
7. Literaturverzeichnis.....	116
8. Abbildungsverzeichnis	137
9. Abkürzungsverzeichnis	138
10. Anhang	140
10.1 Eigene Veröffentlichungen.....	140
10.1.1 Veröffentlichte Publikationen	140
10.1.2 Publikationen in Vorbereitung	140
10.1.3 Kongressbeiträge.....	140
10.1.4 Sonstige Veröffentlichungen	141
10.2 Lebenslauf	142
10.3 Eidesstattliche Erklärung	144
11. Danksagung	145

1. Einleitung

1.1 Klassifizierung und Funktionen von Kaliumkanälen

Kaliumkanäle stellen die größte Gruppe an Ionenkanälen im menschlichen Genom dar. Derzeit existieren zwei verschiedene Klassifikationssysteme für Gene, welche für die porenformenden α -Untereinheiten von Kaliumkanälen codieren: Die Nomenklatur der „Human Genome Organisation“ (HUGO) und die der „International Union of Pharmacology“ (IUPHAR). In dieser Arbeit wurde durchgehend die Nomenklatur der HUGO verwendet, bei der die Bezeichnungen der Gene mit den Buchstaben „KCN“ beginnen. Bislang wurden 78 Gene beschrieben, welche für α -Untereinheiten von Kaliumkanälen codieren. Diesen gemeinsam ist eine typische Aminosäuresequenz, welche für die Bildung des Selektivitätsfilters für K^+ wichtig ist. Weiterhin sind bis heute 13 Gene identifiziert worden, die für akzessorische β -Untereinheiten codieren. Diese Proteine assoziieren mit bestimmten α -Untereinheiten, um einen funktionsfähigen Kanal zu bilden, oder modifizieren deren Eigenschaften. Basierend auf Übereinstimmungen in der Aminosäuresequenz und den biophysikalischen Eigenschaften lassen sich die Gene der porenformenden Untereinheiten in drei große Familien einteilen (Abb. 1):

- Kanaluntereinheiten mit 6 oder 7 Transmembrandomänen und einer porenbildenden Schleife (6/7TM-1P): Spannungsabhängige (Kv) und Ca^{2+} -aktivierte (KCa) Kaliumkanäle
- Kanaluntereinheiten mit 2 Transmembrandomänen und einer porenbildenden Schleife (2TM-1P): Einwärtsgleichrichtende Kaliumkanäle (Inwardly rectifying K^+ channels, IRK), G-Protein gekoppelte (GIRK) und ATP-sensitive (K_{ATP}) Kaliumkanäle
- Kanaluntereinheiten mit 4 Transmembrandomänen und zwei porenbildenden Schleifen (4TM-2P): 2-P-Domänen Kaliumkanäle (K2P)

Praktisch alle lebenden Zellen exprimieren Kaliumkanäle, was die enorme Bedeutung dieser Proteine für biologische Systeme deutlich macht. Sie unterscheiden sich zum Teil erheblich in Ihren biophysikalischen Eigenschaften, Pharmakologie, Regulation und Gewebeverteilung. Durch diese Vielfalt sind Kaliumkanäle an einem großen Repertoire von Vorgängen und Funktionen in der Zelle beteiligt. Generell führt die Aktivität von Kaliumkanälen zu Änderungen im Membranpotential, aber auch der Transport von K^+ als Ion oder Osmolyt kann funktionell im Vordergrund stehen. Abhängig vom speziellen zellulären Kontext dienen Kaliumkanäle folgenden Aufgaben:

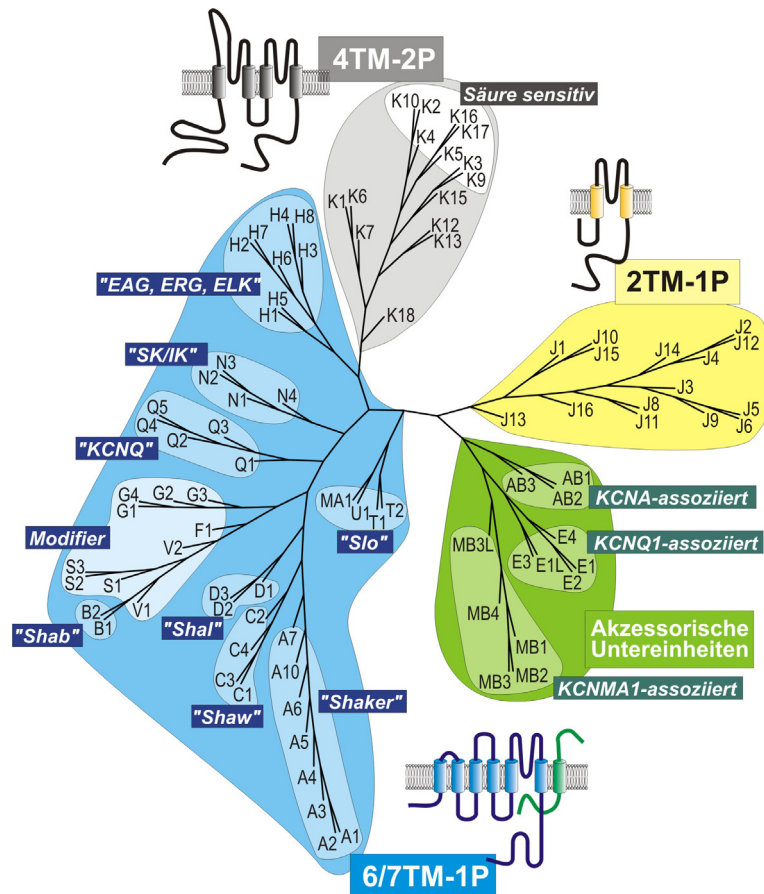


Abb. 1: Dendrogramm der bekannten Kaliumkanalfamilien

Die Abbildung zeigt eine Übersicht der bekannten Kaliumkanäle und deren Verwandtschaft untereinander. Die grobe Einteilung in drei Familien (blau, gelb, grau) erfolgt aufgrund der Membrantopologie der porenbildenden α -Untereinheiten. In grün dargestellt ist eine Auswahl an akzessorischen β -Untereinheiten, welche zusammen mit bestimmten Kaliumkanälen exprimiert werden.

a) Regulation des Membranpotentials und der elektrischen Triebkraft

In nahezu allen lebenden Zellen spielen Kaliumkanäle eine zentrale Rolle für die Entstehung und Aufrechterhaltung eines hyperpolarisierten Membranpotentials. In epithelialen Zellen trägt dieses hyperpolarisierte Membranpotential entscheidend zur Triebkraft für sekundär aktive Transportprozesse bei, bei denen Substanzen gegen einen chemischen Gradienten transportiert werden. Bei der Resorption von Glucose im proximalen Tubulus der Niere beispielsweise wird diese im Symport mit Na^+ über die luminalen Membran transportiert. Die Triebkraft für diesen Transport setzt sich zusammen aus dem chemischen Gradienten für Na^+ und dem hyperpolarisierten Membranpotential, verursacht durch die Aktivität von Kaliumkanälen. Allerdings führt der Einstrom von Na^+ zu einer Depolarisation der luminalen Membran, was wiederum die Triebkraft für den weiteren Transport mindert. In diesem Fall führt eine Aktivierung von Kaliumkanälen, und

der damit verbundene luminale Ausstrom von K^+ , zu einer Repolarisation der Membran und damit zu einer Stabilisierung der Triebkraft für den weiteren Transport.

b) Recycling von K^+ über die Zellmembran

In epithelialen Zellen wird K^+ vor allem über drei Transportproteine in den Zellen akkumuliert: die Na^+/K^+ -ATPase, die H^+/K^+ -ATPase und den $Na^+2Cl^-K^+$ -Kotransporter (NKCC1/2). Der resultierende chemische Gradient ist von entscheidender Bedeutung für die Generierung des Ruhemembranpotentials durch Kaliumkanäle. Andererseits dienen diese Transportproteine aber noch weiteren Aufgaben. NKCC2 beispielsweise vermittelt in der dicken aufsteigenden Henleschleife die Resorption von Na^+ und Cl^- aus dem filtrierten Primärharn. Die beschriebenen Transportproteine sind auf eine ausreichende extrazelluläre Konzentration an K^+ angewiesen, welche ansonsten zum limitierenden Faktor für deren Transportaktivität werden kann (Tsuchiya *et al.*, 1992; Nakamura *et al.*, 1999). In diesem Zusammenhang dienen Kaliumkanäle dem Recycling von K^+ über die Zellmembran, das dann einem erneuten Transportprozess zur Verfügung zu steht.

c) K^+ und Salzmetabolismus

Kaliumkanäle dienen in der luminalen Membran von Epithelzellen, wenn keine erneute Rückresorption stattfindet, auch der Elimination von K^+ aus dem Körper. Da die Kaliumhomöostase bei Säugetieren von enormer Bedeutung für das Überleben des Organismus ist, wird die Ausscheidung von K^+ über mehrere Mechanismen präzise reguliert. Von großer Bedeutung ist hier die Kaliumexkretion im Sammelrohr der Nieren, welche durch das Mineralokortikoid Aldosteron kontrolliert wird. Aldosteron stimuliert in den Hauptzellen des Sammelrohrs die Resorption von Na^+ , welche mit einer Ausscheidung von K^+ einhergeht. Dieser Ausstrom von K^+ aus der Zelle dient neben dessen Exkretion auch zur Erhaltung der Triebkraft für die weitere Resorption von Na^+ .

d) Regulation des Zellvolumens

Der transzelluläre Transport von Salzen und Nährstoffen und der damit verbundene osmotische Fluss von Wasser in Epithelzellen der Niere führen zu einer beständigen Bedrohung der Zellvolumen-Homöostase. Um eine Zellschädigung zu vermeiden, besitzen Zellen verschiedene Transportproteine, welche durch Zellschwellung bzw. Zellschrumpfung aktiviert werden, z.B. $Na^+2Cl^-K^+$ -Kotransporter (NKCC1), Cl^- Kanäle und auch K^+ Kanäle (Diener and Scharrer, 1995; Lang *et al.*, 1998; Haas and Forbush, III, 2000; Hoffmann, 2000; Okada *et al.*, 2006). Eine Aktivierung dieser Kanäle durch Schwellung der Zelle führt zu einem Efflux von K^+ , aber auch von äquimolaren Mengen negativ geladener Gegenionen. Die damit verbundene Erniedrigung der zytosolischen

Osmolarität resultiert in einem Ausstrom von Wasser und führt damit zu einer Schrumpfung der Zelle auf ihr normales Volumen („regulatory volume decrease“).

e) Proliferation, Differenzierung und Apoptose

Proliferation, Differenzierung und Apoptose von Zellen sind essentielle Mechanismen für mehrzellige Organismen. Änderungen im Expressionsmuster von Kaliumkanälen oder deren Aktivität kann Einfluss auf den Zellzyklus nehmen oder sogar zu Apoptose führen (Lang *et al.*, 2007). Es wurde beobachtet, dass schwere Störungen dieser Prozesse (z.B. bei bestimmten Arten von Krebs) mit einer Hoch- oder Herabregulation von Kaliumkanälen verbunden sind (Pardo *et al.*, 1999; Patel and Lazdunski, 2004; Kunzelmann, 2005; Pardo *et al.*, 2005).

f) Zellmigration und Wundheilung

Die Fähigkeit von Zellen, sich gerichtet bewegen zu können ist beispielsweise wichtig für die Reparatur von geschädigten Tubulusabschnitten der Niere. Vieles deutet darauf hin, dass Kaliumkanäle eine wichtige Rolle bei der Zellmigration (Schwab *et al.*, 1994) und der Wundheilung epithelialer Zellen spielen (Rao *et al.*, 2002; Shin *et al.*, 2002b; Lotz *et al.*, 2004; Gojova and Barakat, 2005). Kaliumkanäle und Transporter sind hier für lokale Volumenänderungen verantwortlich, welche für die Zellmigration wichtig sind. Über die genaue Bedeutung von Kaliumkanälen bei der Wundheilung herrscht jedoch noch Unklarheit.

g) Funktionen unabhängig vom Kaliumtransport

Erst kürzlich wurde eine direkte Interaktion des Kaliumkanals KCNB1 (Kv2.1) mit dem SNARE Protein Syntaxin nachgewiesen, welches an der Steuerung des intrazellulären Vesikeltransports beteiligt ist. Diese Interaktion verstärkt die Hormonausschüttung in neuroendokrinen Zellen. Interessanterweise ist dieses Phänomen auch noch nach Zerstörung der Porenregion von Kv2.1 zu beobachten und steht in keinem Zusammenhang mit Änderungen des Membranpotentials oder der intrazellulären Ca^{2+} -Aktivität. Diese Beeinflussung der Exozytose ist also nicht an die Kanalfunktion von Kv2.1 gebunden (Singer-Lahat *et al.*, 2007; Mohapatra *et al.*, 2007). Ähnliche Beobachtungen wurden für KCNK1 (TWIK1) gemacht. Hier konnte gezeigt werden, dass TWIK1 in Zellmodellen mit dem kleinen G-Protein ARF6 (ADP-ribosylation factor 6) und mit dessen Nukleotid-Austauschfaktor EFA6 interagiert (Decressac *et al.*, 2004). ARF6 ist ein wichtiger Modulator von Endozytosevorgängen der apikalen Membran (Altschuler *et al.*, 1999). Die Interaktion von überexprimiertem TWIK1 mit ARF6/EFA6 in HeLa-Zellen resultierte in einer verminderten Endozytose von Transferrin, welche selbst nach

Zerstörung der Kanalpore noch beobachtet wurde. Dies macht deutlich, dass Kaliumkanäle auch an Mechanismen der Endo- bzw. Exozytose beteiligt sein können, unabhängig von deren Funktion als Kanal.

1.2 2-P-Domänen Kaliumkanäle

TWIK1 (KCNK1) ist ein Vertreter der so genannten 2-P-Domänen Kaliumkanäle (K2P), welche eine charakteristische Topologie teilen. Proteine dieser Kaliumkanalfamilie bestehen meist aus 300-500 Aminosäuren und weisen eine bestimmte Verteilung hydrophober Aminosäuren auf, welche auf vier transmembranäre Domänen hindeutet (M1-M4) (Abb. 2). Besonders auffällig ist, dass eine α -Untereinheit (α -UE) zwei porenbildende Domänen trägt (P1 und P2) (Lesage, 2003). Diese sog. P-Domänen sind entscheidend für die Ausbildung der Kanalpore und des Selektivitätsfilters für K^+ . Weiterhin besitzen sie einen kurzen NH_2 -Terminus und einen ausgedehnten $COOH$ -Terminus, welche beide intrazellulär liegen, ferner eine lange extrazelluläre Schleife zwischen M1 und P1. Vertreter der anderen Kaliumkanalfamilien besitzen nur eine P-Domäne pro α -UE. Da diese als Tetramere einen funktionsfähigen Kanal bilden, scheinen immer jeweils vier P-Domänen an der Formierung des Selektivitätsfilters beteiligt zu sein (Yang *et al.*, 1995b; Doyle *et al.*, 1998). Aus diesem Grund wurde für K2P Kanäle eine Dimerisierung von zwei α -UE vorgeschlagen, was später bei TWIK1 auch bestätigt werden konnte (Lesage *et al.*, 1996b). Diese Dimerisierung erfolgt an der „self interacting domain“ (SID, Abb. 2) und kann sowohl zwischen zwei gleichen (Homodimere) (Lesage *et al.*, 1996b; Lopes *et al.*, 2001) als auch zwischen zwei unterschiedlichen α -UE (Heterodimere) (Czirjak and Enyedi, 2002) erfolgen. Der erste Vertreter dieser Kaliumkanalfamilie wurde bei *Saccharomyces cerevisiae* und *Caenorhabditis elegans* entdeckt (TOK1) (Ketchum *et al.*, 1995), gefolgt vom ersten Mitglied bei Säugetieren, welcher TWIK1 genannt wurde (**T**andem of P domains in a **W**eak **I**nward rectifying **K**⁺ channel) (Lesage *et al.*, 1996a). Im menschlichen Genom wurden inzwischen 15 verschiedene Gene entdeckt, welche für K2P Kanäle codieren (Buckingham *et al.*, 2005). Es wird davon ausgegangen, dass diese Kaliumkanäle in vielen Geweben die Hintergrundleitfähigkeit für K^+ vermitteln, d.h. entscheidend zur Entstehung des Ruhemembranpotentials beitragen. Aus diesem Grund werden Sie auch als „background“ K^+ -Kanäle bezeichnet. Ihre elektrischen Eigenschaften unterstreichen diese Vorstellung, da Sie einen nahezu spannungs- und zeitunabhängigen Strom erzeugen und unter symmetrischen Kaliumbedingungen eine annähernd lineare Strom-Spannungskurve aufweisen (Patel and Honore, 2001). K2P Kanäle verhalten sich also wie ein K^+ selektives Leck in der Zellmembran, weshalb Sie auch „leak channels“ genannt werden.

2-P-Domänen Kaliumkanäle werden durch eine Vielzahl chemischer und physikalischer Stimuli reguliert: KCNK1 (TWIK1) und KCNK6 (TWIK2) werden durch die Proteinkinase C aktiviert und durch intrazelluläre Ansäuerung gehemmt. KCNK2 (TREK), KCNK4 (TRAAK) und KCNK10 (TREK2) sind mechanosensitive Kanäle, welche durch Arachidonsäure stimuliert werden (Fink *et al.*, 1998). KCNK3 (TASK1) und KCNK9 (TASK3) werden über Hypoxie reguliert und außerdem durch Inhalationsanästhetika aktiviert (Bayliss *et al.*, 2003). Außerdem zeigen mehrere Mitglieder der K2P Kanalfamilie eine Aktivierung durch extrazelluläre Alkalisierung (Abb. 1) (Duprat *et al.*, 1997; Lesage and Lazdunski, 2000; Rajan *et al.*, 2000; Morton *et al.*, 2003; Morton *et al.*, 2005). Es wird davon ausgegangen, dass K2P Kanäle an einer Vielzahl physiologischer und pathophysiologischer Prozesse beteiligt sind, z.B. Bicarbonat Transport in der Niere, Anästhesie, Neuroprotektion, Depression, Schmerzwahrnehmung, Messung von Sauerstoff im Blut, Apoptose und Krebsentstehung (Patel *et al.*, 1999; Buckler *et al.*, 2000; Warth *et al.*, 2004; Patel *et al.*, 2004; Heurteaux *et al.*, 2004; Alloui *et al.*, 2006; Heurteaux *et al.*, 2006).

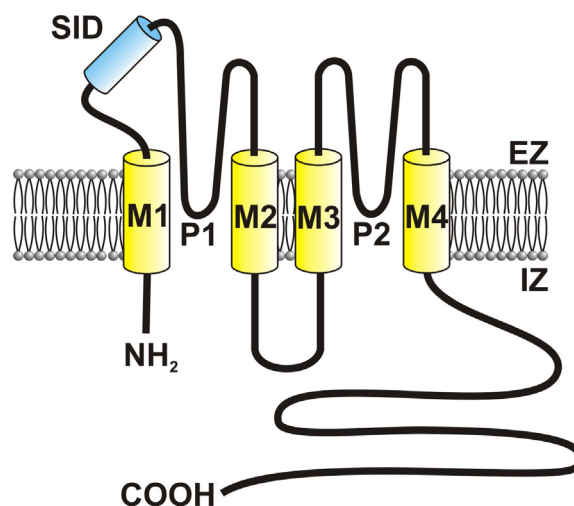


Abb. 2: Topologie von 2-P-Domänen Kaliumkanäle

Gezeigt wird die typische Membrantopologie einer α -Untereinheit von 2-P-Domänen Kaliumkanälen. Diese bestehen aus vier Transmembrandomänen (M1-M4) und besitzen im Gegensatz zu Vertretern der anderen Kaliumkanalfamilien zwei porenbildende Domänen (P1, P2). Ein funktioneller Kanal besteht vermutlich aus zwei α -Untereinheiten, welche über eine extrazelluläre Domäne („self interacting domain“, SID) zwischen M1 und P1 verbunden werden.

1.3 Eigenschaften und Expression von murinem TWIK1

1.3.1 Struktur von mTWIK1

TWIK1 (Tandem of P domains in a **W**eak **I**nward rectifying **K**⁺ channel) war der erste Vertreter der 2-P-Domänen Kaliumkanalfamilie, welcher in Säugetieren durch

Sequenzvergleich gefunden wurde (Lesage *et al.*, 1996a). Eine α -UE von TWIK1 besteht aus 336 Aminosäuren bei einem Molekulargewicht von 38 kDa und zeigt die in Abb. 2 gezeigte typische Struktur von K₂P-Kanälen. Die porenbildende Domäne P2 weist im Gegensatz zu P1 eine für Kaliumkanäle ungewöhnliche Sequenz auf (GLG statt dem üblichen GYG Motiv (Heginbotham *et al.*, 1994)). Für TWIK1 wurde eine Dimerisierung vorgeschlagen, welche zu einem funktionsfähigen Kanalprotein führt. Hierfür ist ein Cysteinrest (C69) der M1P1 Verbindungsschleife verantwortlich, durch welchen zwei α -UE über eine Disulfidbrücke kovalent miteinander verbunden werden (Lesage *et al.*, 1996b; Lesage *et al.*, 1997). Dieser Cysteinrest liegt in einer 34 AS langen Region (Arg57 bis Val90), welche eine α -helikale Struktur aufweist und ebenfalls an der Assoziierung beteiligt zu sein scheint („self interacting domain“). Weiterhin sind drei Phosphorylierungsstellen beschrieben worden, die in der N-terminalen (Ser19 für Calcium Calmodulin Kinase II) und C-terminalen (Ser303 für Caseinkinase II) zytoplasmatischen Domäne und in der M2M3 Verbindungsschleife (Thr161 für Proteinkinase C) liegen. Ferner trägt TWIK1 eine N-Glykosylierungsstelle in der extrazellulären M1P1 Verbindungsschleife (N95) (Lesage *et al.*, 1996a; Lesage *et al.*, 1997).

1.3.2 Expression von TWIK1

TWIK1 wurde in einer Reihe von Säugetieren molekular identifiziert und weist eine breite Gewebeverteilung auf. Northern-Blot Analysen an menschlichen Geweben zeigen eine starke Expression im Herz und im Gehirn, ferner in Plazenta, Lunge, Leber, Pankreas und den Nieren (Lesage *et al.*, 1996a). In einer weiteren Studie wurde ebenfalls eine starke Expression von TWIK1 in Gehirn, Niere und Herz beobachtet, Leber und Pankreas waren hier jedoch negativ (Orias *et al.*, 1997). Für die Nieren von Kaninchen konnte mit segmentspezifischer reverse-Transkriptase-PCR gezeigt werden, dass TWIK1 hier nur auf die späten Nephronsegmente beschränkt ist (Orias *et al.*, 1997). In der Niere der Ratte wurde TWIK1 ebenfalls nachgewiesen. Immunfluoreszenz Experimente zeigen hier eine starke Expression in frühen Teilen (Pars convoluta) des proximalen Tubulus, wobei TWIK1 auf die apikale Membran des Bürstensaums (BB) beschränkt ist. Im Sammelrohr ist das Signal entweder intrazellulär oder auch apikal gelegen, jedoch nur in den Schaltzellen. Ferner wurde TWIK1 noch im medullären und kortikalen Teil der dicken Henleschleife gefunden (Cluzeaud *et al.*, 1998).

In der Maus wurde ebenfalls mit Hilfe von Northern-Blots eine sehr starke Expression von TWIK1 mRNA im Gehirn nachgewiesen. Eine *in-situ*-Hybridisierung zeigt hier ein starkes Signal im Hippocampus, dem zerebralen Cortex und im Cerebellum. Weiterhin wird TWIK1 mRNA bei der Maus in moderatem Umfang in der Niere und in der Lunge und ferner gering im Skelettmuskel exprimiert. Das Herz und die Leber sind negativ (Lesage *et*

al., 1997). Eine weitere Arbeitsgruppe untersuchte die TWIK1 Expression in Geweben der Maus mit nicht-quantitativer reverse-Transkriptase-PCR und mit Hilfe eines „mouse RNA master blots“. Zusammengefasst ist TWIK1 mRNA reichlich vertreten in Gehirn, Niere, Schilddrüse, Speicheldrüsen, Nebenniere, Prostata, Nebenhoden, Uterus, Plazenta, Colon und Jejunum. TWIK1 wird weniger exprimiert in Auge, Hypophyse, Pankreas, glatte Muskelzellen, Eierstöcke und Hoden. Nahezu keine TWIK1 mRNA wird in Lunge, Aorta, Leber, Herz, Skelettmuskel, Thymus und Milz gefunden (Arrighi *et al.*, 1998). Ferner wurde TWIK1 im Innenohr von Maus und Ratte mit Hilfe von reverser-Transkriptase-PCR und histologischen Methoden nachgewiesen (Nicolas *et al.*, 2003).

Die genaue Lokalisation von TWIK1 in der Niere der Maus wurde mit Hilfe von Immunfluoreszenz-Färbungen ermittelt (Nie *et al.*, 2005). Hier zeigt sich eine breite Verteilung entlang des Nephrons. Im proximalen Tubulus ist TWIK1 im Bürstensaum (BB) und in einem subapikalen intrazellulären Kompartiment lokalisiert. Im frühproximalen Tubulus (S1) ist TWIK1 vor allem auf die Spitzen der Mikrovilli beschränkt. Entlang des S2 Segments nimmt die TWIK1 Expression im Bürstensaum ab und ist im S3 Segment nicht mehr detektierbar. Auch die subapikale Färbung ist im S1 Segment am stärksten und nimmt nach distal hin leicht ab. In den Zellen der dicken aufsteigenden Henleschleife und den distalen kortikalen Segmenten (Pars convoluta des distalen Tubulus und Verbindungsstücke) ist TWIK1 vor allem intrazellulär lokalisiert. Auch das Zytoplasma der kortikalen Sammelrohre zeigt eine TWIK1 Färbung, sowie das Zytoplasma von Zellen der afferenten Arteriolen und der Mesangialzellen.

Außerdem wurde die subzelluläre Lokalisation von TWIK1 in transfizierten Zellen immunhistochemisch untersucht (Decressac *et al.*, 2004). Dabei zeigte sich, dass TWIK1 fast ausschließlich auf das intrazelluläre endosomale Recycling Kompartiment beschränkt war. Dieses liegt bei polarisierten Zellen direkt unterhalb der apikalen Membran und dient wahrscheinlich als eine Art Zwischenlager, in welchem apikale und basolaterale Proteine sortiert und adressiert werden. Ferner kann dieses Kompartiment schnell auf Situationen reagieren, welche den sofortigen Einbau von Proteinen (z.B. Transporter oder Kanäle) in die Plasmamembran erfordern (Altschuler *et al.*, 1999; Apodaca, 2001; Hoekstra *et al.*, 2004). Interessanterweise konnte nahezu kein TWIK1 Signal in der Zellmembran beobachtet werden, was eher ungewöhnlich für einen Ionenkanal ist.

1.3.3 elektrische Eigenschaften von mTWIK1

Funktionelle Expressionsstudien von mTWIK1 in Oozyten von *Xenopus laevis* erzeugen, gemessen mit der zwei-Elektroden Voltage-Clamp Methode, einen moderaten, aber detektierbaren Strom. Der TWIK1 vermittelte Strom in Oozyten zeigt eine instantane Aktivierungskinetik mit einer sehr schnell inaktivierenden Komponente. Die Strom-

Spannungskurve ist nahezu linear bis 0 mV und zeigt dann eine Saturierung bei einer stärkeren Depolarisation der Membran. mTWIK1 induzierte Ströme sind hemmbar durch Ba^{2+} ($\text{IC}_{50} = 35,2 \mu\text{M}$) und Chinin (35% Hemmung bei 100 μM). Weniger als 5% Hemmung wurde beobachtet nach Applikation der Kaliumkanalhemmer Cs^+ (1 mM), Tetraethylammonium (1 mM), 4-Aminopyridin (100 mM), Apamin (10 nM), Dendrotoxin (100 nM), Charybdotoxin (10 nM) und Glibenclamid (10 μM). mTWIK1 spricht nicht auf die Kaliumkanalöffner Lemakalim (100 μM) und Pinacidil (100 μM) an. Die Klasse III Antiarrhythmika Amiodaron (100 μM) und Tedisamil (100 μM) zeigen ebenfalls keinen Effekt. Die Injektion von TWIK1 cRNA in Oozyten führt zu einem Membranpotential nahe dem Gleichgewichtspotential für K^+ (E_K). TWIK1 erzeugt einen selektiven Kaliumstrom und ist bei allen Membranpotentialen aktiv (spannungsunabhängig). Die Beziehung zwischen dem Umkehrpotential und der externen Kaliumkonzentration stimmt gut mit den durch die Nernst Gleichung vorhergesagten Werten überein. Patch-Clamp Messungen an Einzelkanälen zeigen, dass TWIK1 sowohl einwärts- als auch auswärtsgerichtete Ströme bei Depolarisation bzw. Hyperpolarisation der Zellmembran zulässt. Dabei führt die Anwesenheit von intrazellulärem Mg^{2+} zu einer schwachen Einwärtsgleichrichtung, welche in dessen Abwesenheit nicht zu beobachten ist. Bei 3 mM Mg^{2+} beträgt die mittlere Öffnungszeit des Kanals bei +80 mV 1,9 ms und die Gesamtleitfähigkeit 19 ± 1 pS. Bei -80 mV liegt die mittlere Öffnungszeit bei 0,3 ms und die Gesamtleitfähigkeit steigt an auf 34 ± 4 pS. Die Zunahme der Leitfähigkeit bei hyperpolarisierten Membranpotentialen, welches ein typisches Charakteristikum für einwärtsgleichrichtende Kaliumkanäle (Kir) darstellt, ist bei TWIK1 nur sehr schwach ausgeprägt. Wie für andere Kir -Kanäle gezeigt werden konnte, ist die Einwärtsgleichrichtung bei positiven Potentialen unter anderem auf einen spannungsabhängigen Mg^{2+} Block zurückzuführen (Yang *et al.*, 1995a). TWIK1 jedoch lässt im Gegensatz zu anderen Kir -Kanälen auch bei 10 mM intrazellulärem Mg^{2+} noch auswärtsgerichtete Ströme zu (Lesage *et al.*, 1996a; Lesage *et al.*, 1997).

Ungewöhnlich ist jedoch, dass bisher keine TWIK1 induzierten Ströme in transfizierten Säugerzellen oder nativen Geweben beobachtet werden konnten, was nicht zuletzt auf die vornehmlich intrazelluläre Lokalisation des Kanalproteins zurückzuführen ist. Allerdings führte die Fusion von HcRed (*Heteractis crispera* red fluorescent protein) an den N-Terminus von TWIK1 zu einer partiellen Translokation des Fusionsproteins in die Plasmamembran von MDCK-Zellen. Durch diese Modifikation konnte der typische TWIK1 Strom auch im Zellmodell nachgewiesen werden (Decressac *et al.*, 2004).

1.3.4 Regulation von TWIK1

In Patch-Clamp Experimenten an Oozyten zeigt TWIK1 eine Hemmung durch intrazelluläre Ansäuerung. Nach Exzidierung des Patches wird der Kanal jedoch insensitive

gegenüber einer Erniedrigung des pH-Wertes der Badlösung, was darauf hindeutet, dass der beobachtete pH-Effekt auf TWIK1 wahrscheinlich indirekt vermittelt wird (Lesage *et al.*, 1996a). Weiterhin wird TWIK1 auch durch extrazelluläre Ansäuerung gehemmt (Rajan *et al.*, 2005), woran vermutlich ein Histidinrest in der ersten P-Domäne (H122) beteiligt ist. Dieser ist homolog zu einem Histidin in TASK1 (Lopes *et al.*, 2000; Lopes *et al.*, 2001) und TASK3 (Rajan *et al.*, 2000) und erlaubt eine Hemmung der Kanäle durch extrazelluläre Protonen innerhalb physiologischer pH-Werte. Der Austausch von Histidin gegen Asparagin führt zu einem Verlust der Regulation von TWIK1 durch pH-Änderung, was einen direkten Effekt nahe legt.

Eine Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) führt zu einer Zunahme des TWIK1 induzierten Stroms. Da TWIK1 eine Phosphorylierungsstelle für die PKC aufweist, scheint dieser Effekt ebenfalls direkt vermittelt zu sein. Allerdings führt ein Austausch von Thr161 gegen einen Alaninrest zu einem mutierten Kanalprotein, welches weiterhin funktionell ist und durch die PKC regulierbar bleibt. Eine Aktivierung der Proteinkinase A oder eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Aktivität (Aktivierung der Ca^{2+} -Calmodulinkinase II) bleibt ohne Effekt auf TWIK1 (Lesage *et al.*, 1996a; Lesage *et al.*, 1997).

Erst kürzlich wurde von einer Arbeitsgruppe postuliert, dass die Kanalaktivität von TWIK1 über Sumoylierung reguliert wird (Rajan *et al.*, 2005). Sumoylierung ist eine kovalente Modifikation von Substratproteinen mit SUMO (small ubiquitin-related modifier proteins). Diese reversible posttranslationelle Modifikation wird vor allem bei nukleären Proteinen beobachtet und beeinflusst den Import und Export von Proteinen in oder aus dem Zellkern, die Stabilität der Zielproteine und die transkriptionelle Aktivität (Melchior, 2000; Muller *et al.*, 2001; Li and Hochstrasser, 2003; Dohmen, 2004). Der Veröffentlichung entsprechend soll TWIK1 durch das Enzym Ubc-9 an einem intrazellulären Lysinrest (L274) sumoyliert werden, was den Kanal elektrisch inaktiv macht, wohingegen Desumoylierung durch die SUMO-Protease SNEP-1 zu einer Aktivierung der Kanalpore führt. Ein Austausch des Lysinrestes gegen Glutamat führte zu einer Zunahme der Kanalaktivität, da TWIK1 offensichtlich nicht mehr sumoyliert werden konnte. Der so gemessene Strom wich von dem ab, was bisher für TWIK1 in der Literatur beschrieben wurde (Lesage *et al.*, 1996a; Lesage *et al.*, 1997; Decressac *et al.*, 2004), da eher eine Auswärts- als eine Einwärtsgleichrichtung beobachtet wurde. Diese Befunde konnten jedoch von der Arbeitsgruppe von F. Lesage in Zusammenarbeit mit uns nicht bestätigt werden (Feliciangeli *et al.*, 2007). F. Lesage beobachtete bei Überexpression der Mutante K274E in Oozyten ebenfalls eine Zunahme des TWIK1 induzierten Stroms. Ein konservativer Austausch von Lysin gegen Arginin (K274R), der nicht mit einem Ladungswechsel einhergeht, zeigte jedoch keine Veränderung gegenüber dem Wildtyp TWIK1-Protein. Dies weist darauf hin, dass die beobachteten Effekte auf den Strom eher

auf Ladungsverschiebungen im Protein als auf ein Zerstören der SUMO-Bindungsstelle zurückzuführen sind. Ferner konnte auch das von Rajan und Mitarbeitern im Western-Blot dargestellte sumoylierte TWIK1-Protein nicht reproduziert werden.

Abschließend soll noch auf die Interaktion von TWIK1 mit dem kleinen G-Protein ARF6 und dessen Nukleotid-Austauschfaktor EFA6 eingegangen werden. Da ARF6 am Recycling von Plasmamembran und Membranproteinen beteiligt ist, ist diese Interaktion vermutlich wichtig für die Adressierung von TWIK1 zur Zellmembran, bzw. dessen Rückführung. Das Signal, welches diese Translokation auslöst, ist jedoch bis heute nicht bekannt (Decressac *et al.*, 2004).

1.3.5 Das TWIK1 knockout Konstrukt

Die codierende Sequenz von mTWIK1 liegt auf Chromosom 8 und ist auf drei Exone aufgeteilt, welche sich über 30 kb hinweg erstrecken. Das erste Exon enthält die 5' „untranslated region“ (UTR), sowie die codierende Sequenz für den zytoplasmatischen N-Terminus, die erste Transmembrandomäne (TMD) (M1) und die große extrazelluläre Schleife (M1P1). Das zweite Exon codiert für die erste P-Domäne (P1), die zweite und dritte TMD (M2 und M3) und die zweite P-Domäne (P2). Das letzte Exon enthält die codierende Sequenz für die vierte TMD (M4), den zytoplasmatischen C-Terminus und die 3' UTR.

Bei der von uns verwendeten TWIK1^{-/-} Maus wurde das Exon 2 des TWIK1 Gens entfernt (Abb. 3). Diese Deletion resultiert in einem verkürzten Protein, welches nur noch den N- und C-Terminus, sowie die TMD M1 und M4 enthält (es kommt zu keinem Frameshift durch die Deletion von Exon 2). M1 und M4 sind hierbei über die große extrazelluläre Schleife inklusive SID miteinander verbunden (Nie *et al.*, 2005). Es wurde gezeigt, dass dieses verkürzte TWIK1 Protein keine Kanalaktivität mehr aufweist (Decressac *et al.*, 2004).

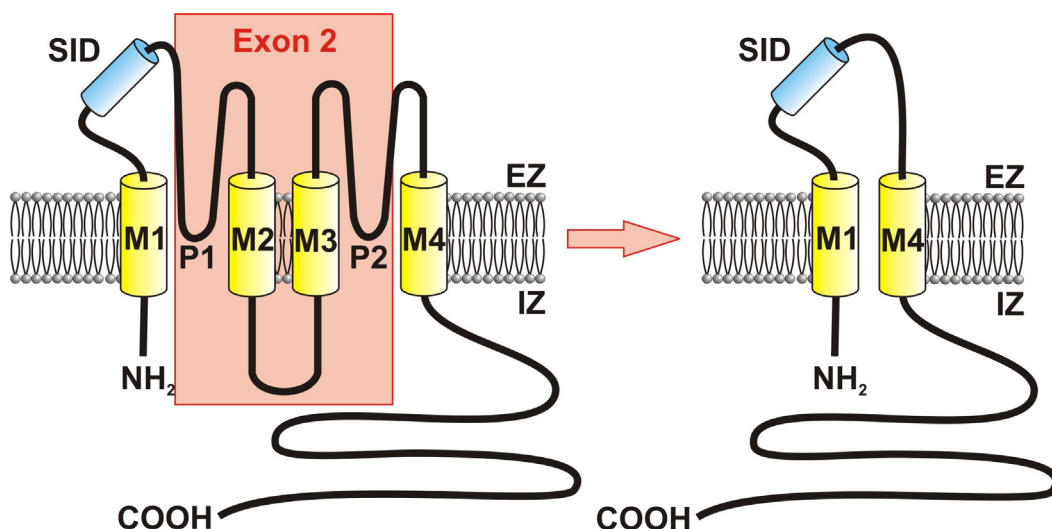
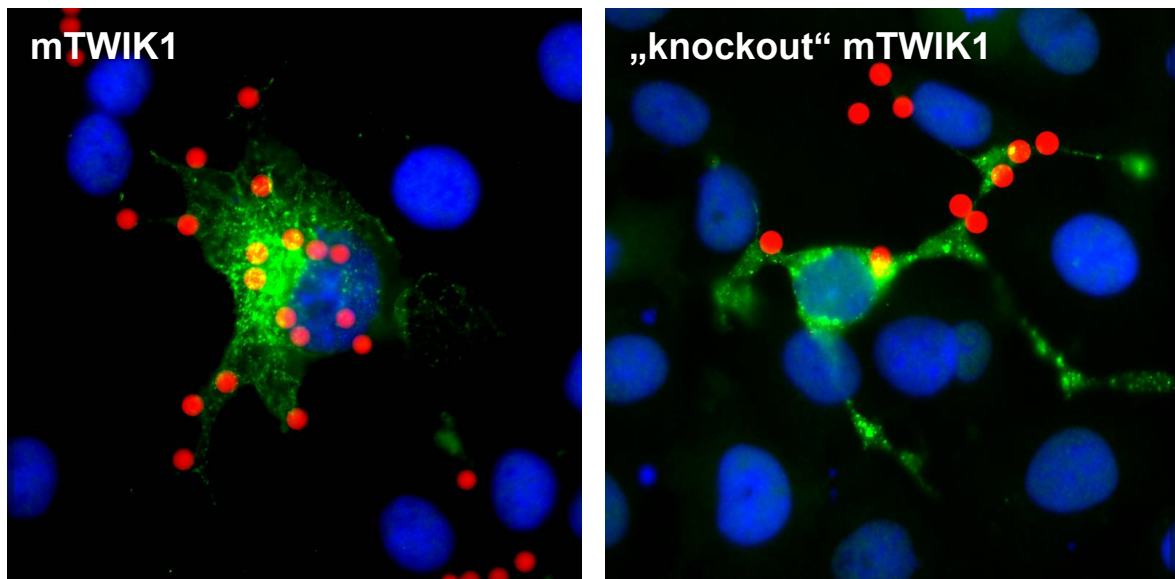


Abb. 3: Das TWIK1 knockout Konstrukt

Bei der TWIK1^{-/-} Maus wurde das Exon 2 des TWIK1 Gens entfernt. Dieses codiert für die Transmembrandomänen M2/M3 und für die porenbildenden Domänen P1/P2. Das resultierende Protein zeigt keine Kanalaktivität mehr. Der von uns verwendete anti-TWIK1 Antikörper ist gegen den zytosolischen C-Terminus gerichtet, welcher beim verkürzten Protein noch intakt ist.

Der von uns verwendete anti-TWIK1 Antikörper ist gegen den intrazellulären C-Terminus von TWIK1 gerichtet, welcher im „knockout“ Protein noch intakt ist. Dieser affinitätsgereinigte polyklonale Antikörper aus dem Kaninchen wurde bereits in einigen Publikationen beschrieben (Lesage *et al.*, 1996b; Cluzeaud *et al.*, 1998; Nicolas *et al.*, 2003; Nie *et al.*, 2005) und wurde sowohl für histologische Immunfluoreszenz-Experimente als auch für Western-Blots verwendet. Bei Zellen, welche mit TWIK1, beziehungsweise dem „knockout“ Protein transfiziert wurden, erhält man beide Male ein starkes Fluoreszenzsignal (Abb. 4), das heißt, der anti-TWIK1 Antikörper markiert ebenfalls das verkürzte Protein der TWIK1^{-/-} Maus. Dies bestätigte sich auch bei Färbungen von nativem Gewebe der Maus. Ob das trunkierte TWIK1 Protein weiterhin Dimere bilden kann, ist bislang noch nicht untersucht worden. Dies scheint jedoch wahrscheinlich, da die SID des Proteins noch erhalten ist.

**Abb. 4: Transfektion von COS-Zellen mit mTWIK1 und „knockout“ mTWIK1**

Dargestellt sind COS7-Zellen, welche mit mTWIK1 (links) und dem „knockout“ Konstrukt (rechts) transfiziert wurden. Das verkürzte TWIK1-Protein lässt sich weiterhin mit dem verwendeten anti-TWIK1 Antikörper anfärben (grün) und zeigt eine ähnliche, hauptsächlich intrazelluläre Verteilung. Als Transfektionskontrolle wurden die Zellen zusätzlich mit dem Oberflächenprotein CD8 transfiziert. In rot sind Dynabeats gekennzeichnet, welche gegen CD8 gerichtet waren. Zellkerne sind in blau dargestellt.

1.3.6 Bisher beschriebene physiologische Funktionen von TWIK1

Trotz der Tatsachen, dass TWIK1 der erste identifizierte 2-P-Domänen Kaliumkanal überhaupt ist und eine so breite Gewebeverteilung aufweist, ist über dessen physiologische Rolle nur sehr wenig bekannt. Im proximalen Tubulus der Mausniere, vor allem in den Segmenten S1-2, soll TWIK1 der Repolarisation der luminalen Membran bei der Rückresorption von Phosphat dienen. Weiterhin wird eine mögliche Rolle von TWIK1 bei der Regulation der AQP-2 Internalisierung im Sammelrohr vermutet. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind hier noch unklar, es wird aber eine direkte Beteiligung von TWIK1 an der Regulation der Vesikeltranslokation diskutiert (Nie *et al.*, 2005).

Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse deuten stark darauf hin, dass TWIK1 an der Regulation des Glucosehaushalts beteiligt ist. Zum einen scheint TWIK1 im proximalen Tubulus der Niere an der Rückresorption von filtrierter Glucose mitzuwirken, zum anderen modifiziert TWIK1 die Insulinausschüttung in den β -Zellen des Pankreas. Im Rahmen meiner Dissertation habe ich die physiologische Rolle von TWIK1 in diesen beiden unterschiedlichen Organen untersucht, weshalb die Arbeit in zwei Teile gegliedert ist. Der erste Teil beschäftigt sich mit der Funktion von TWIK1 in der Niere und der zweite Teil mit der Funktion im Pankreas. Nachfolgend sollen noch die Grundlagen der relevanten physiologischen Prozesse erläutert werden: Die Rückresorption von Glucose in der Niere und die Mechanismen der Insulinsekretion.

1.4 Rückresorption von Glucose in der Niere

1.4.1 Transportproteine für Glucose im proximalen Tubulus

Zwei wichtige Aufgaben der Nieren sind die Elimination von Stoffwechselendprodukten oder Fremdstoffen aus dem Körper (Sekretion) und die Rückgewinnung von Nährstoffen, welche in den Primärharn filtriert wurden (Resorption). Diese Vorgänge sind an ein polares Epithel gebunden, welches die Tubuli bildet und einen vektoriellen Transport von Ionen oder Molekülen aus dem Tubuluslumen in die interstitielle Flüssigkeit und umgekehrt ermöglicht. Der filtrierte Primärurin wird während der Nephronpassage durch eine Vielzahl verschiedener Transportmechanismen modifiziert, z.B. durch den Transport von Aminosäuren, kleinen Peptiden, Salzen, Wasser und Zucker. Dieser Mechanismus erlaubt die Rückgewinnung von wichtigen Nährstoffen bei gleichzeitiger Ausscheidung von Stoffwechselendprodukten oder Fremdstoffen. Einige dieser Moleküle, wie Aminosäuren und Glucose, werden vor allem im proximalen Tubulus rückresorbiert, während Salze und Wasser entlang des gesamten Nephrons transportiert werden.

Glucose ist der bedeutendste Energieträger im Organismus und dessen Plasmakonzentration wird in engen Grenzen konstant gehalten. An diesem Vorgang sind auch die Nieren beteiligt, da sie pro Tag etwa 180 g Glucose aus dem Primärharn rückresorbieren. Der Endurin ist nahezu glucosefrei ($< 0,5$ g/d), was auf die Aktivität von Glucosetransporter im proximalen Tubulus zurückzuführen ist (Wright *et al.*, 2007). Daran beteiligt sind Transporter zweier verschiedener Genfamilien: zum einen die GLUT-Uniporter aus der SLC2A Genfamilie (Mueckler, 1994; Joost and Thorens, 2001; Uldry and Thorens, 2004), zum anderen natriumgekoppelte Glucosetransporter (SGLT, „sodium coupled glucose transporter“) aus der SLC5A Genfamilie (Longo and Elsas, 1998; Wood and Trayhurn, 2003; Wright and Turk, 2004). Diese können entsprechend ihrer Transportmodi in passive (GLUT) und sekundär aktive Transporter (SGLT) eingeteilt werden (Abb. 5) (Wallner *et al.*, 2001).

4.1.2 Die natriumgekoppelten SGLT-Kotransporter

Die sekundär aktiven SGLT-Kotransporter dienen im proximalen Tubulus der apikalen Aufnahme von Glucose. Sie sind in der Lage, ihr Substrat gegen ein Konzentrationsgefälle zu transportieren und können damit Glucose in den Epithelzellen aufkonzentrieren. Als Energiequelle dient hierbei das elektrochemische Potential für Na^+ , welches durch den aktiven Transport der basolateralen Na^+/K^+ -ATPase aufrechterhalten wird (sekundär aktiver Transport). Zwei wichtige sekundär aktive Glucosetransporter sind in der apikalen Membran von proximalen Tubuluszellen identifiziert worden: SGLT1 und SGLT2 (Turner and Moran, 1982a; Turner and Moran, 1982b). SGLT2 ist vor allem im frühproximalen Tubulus lokalisiert, welcher auch als S1-Segment bezeichnet wird (früher Teil der *Pars convoluta*) und übernimmt hier die Hauptlast der Rückresorption von filtrierter Glucose (ca. 90%). Diesen Transporter zeichnen eine hohe Transportkapazität und eine niedrige Affinität zu Glucose aus, wobei das Substrat 1:1 mit Na^+ in die Zelle aufgenommen wird. Im Gegensatz zu SGLT2, welcher ausschließlich in der Niere zu finden ist (Wells *et al.*, 1992; Kanai *et al.*, 1994; You *et al.*, 1995), wird der SGLT1-Kotransporter zusätzlich im Gastrointestinaltrakt exprimiert. SGLT1 weist eine hohe Affinität zu Glucose auf und zeigt eine niedrige Transportkapazität, wobei er im proximalen Tubulus der Nieren auf den spätproximalen S3 Bereich beschränkt ist. Bei jedem Transportzyklus werden 2 Na^+ -Ionen zusammen mit einem Molekül Glucose in die Zelle aufgenommen (Parent *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1995; Mackenzie *et al.*, 1998). SGLT1 dient der Reabsorption der restlichen Glucose (ca. 10%) in den späten Abschnitten des proximalen Tubulus, welche nicht durch SGLT2 aufgenommen wurde.

4.1.3 Die GLUT-Uniporter

Die GLUTs sind in den Zellen des proximalen Tubulus für den passiven Auswärtstransport von Glucose über die basolaterale Membran zuständig, indem sie die Einstellung eines Gleichgewichts zwischen intra- und extrazellulärer Glucosekonzentration beschleunigen, bzw. erleichtern (erleichterte Diffusion). Bisher sind etwa 14 dieser Uniporter beschrieben worden (GLUT1-GLUT14) (Wood *et al.*, 2003; Sukanuma *et al.*, 2007), von welchen mehr oder minder alle in der Niere von Säugetieren gefunden wurden. Der niedrig-affine GLUT2-Uniporter scheint bei der Rückresorption von Glucose in der Niere eine besonders wichtige Rolle zu spielen, da er in der basolateralen Membran der frühproximalen Tubuluszellen exprimiert wird (Thorens *et al.*, 1990; Dominguez *et al.*, 1992).

1.4.4 Die SGLT-vermittelte Aufnahme von Glucose ist ein elektrogener Prozess

Sowohl SGLT1 als auch SGLT2 transportieren Glucose im Kotransport mit Na^+ . Da Glucose ein elektroneutrales Molekül ist, werden netto eine (SGLT2) bzw. zwei (SGLT1) positive Ladungen in die Zelle eingebracht, was bei anhaltendem Transport zu einer Depolarisation der apikalen Membran führt (elektrogener Transport). Die Triebkraft für den sekundär aktiven Transportprozess ist hierbei an den Einstrom von Na^+ gekoppelt und setzt sich aus zwei Komponenten zusammen. Die chemische Triebkraft resultiert aus der Aktivität der basolateral gelegenen Na^+/K^+ -ATPase, welche Na^+ im Austausch gegen K^+ aus der Zelle schafft und dabei einen chemischen Gradienten für Na^+ aufbaut. Die elektrische Triebkraft wird durch das Membranpotential bestimmt. Kaliumkanäle hyperpolarisieren die apikale Membran und laden so die intrazelluläre Seite negativ auf, was den Einstrom von positiven Ionen in die Zelle begünstigt. Bei einer SGLT-vermittelten Depolarisation der Zellmembran wird die elektrische Triebkraft gemindert, was auf Dauer die Transportleistung einschränken würde (Abb. 5). Um dem entgegenzuwirken, benötigt die Zelle einen repolarisierenden Ausstrom von Kationen, welcher meist von Kaliumkanälen getragen wird (Fromter, 1982; Lang *et al.*, 1986; Vallon *et al.*, 2001). Es wurde bereits gezeigt, dass TWIK1 in frühproximalen Tubulusabschnitten an der Repolarisation der apikalen Membran beteiligt ist, wenn diese durch den elektrogenen Transport von Phosphat depolarisiert wird (Nie *et al.*, 2005). Unserer Hypothese nach erfüllt TWIK1 eine ähnliche Aufgabe in späten Teilen des proximalen Tubulus (S3), wo er im Dienste der Glucoserückresorption die SGLT-vermittelte Depolarisation kompensiert.

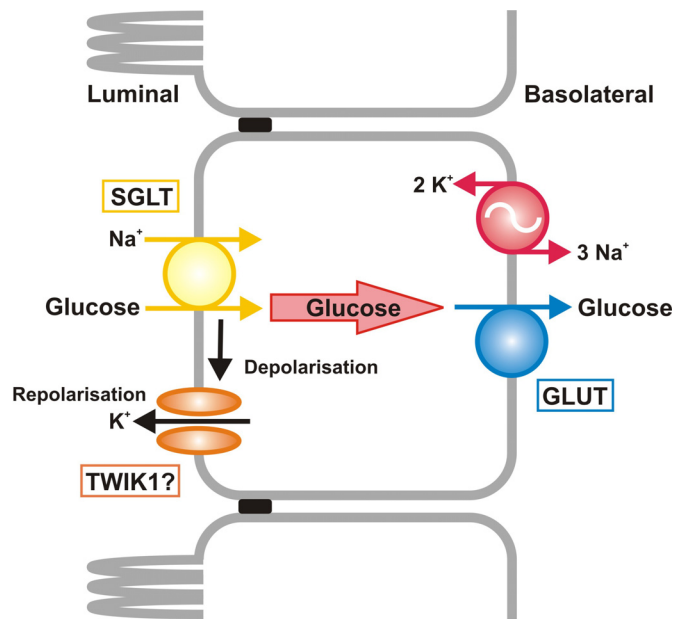


Abb. 5: Mechanismus der Rückresorption von Glucose im proximalen Tubulus

Die luminal Aufnahme von Glucose im proximalen Tubulus erfolgt über sekundär aktive Glucosetransporter der SGLT-Familie (gelb) im Kotransport mit Na^+ . Die Triebkraft für diesen Prozess wird sowohl durch die Na^+/K^+ -ATPase (rot) als auch durch ein hyperpolarisiertes Potential der apikalen Membran bereitgestellt. Der Einstrom von Na^+ in die Zelle führt zu einer Depolarisation der luminalen Membran, welche die Triebkraft für die weitere Resorption von Glucose mindert. Kaliumkanäle (orange) kompensieren diesen Verlust durch einen repolarisierenden Ausstrom von Kationen. Basolateral verlässt Glucose passiv die Zelle über GLUT-Uniporter (blau).

1.5 Mechanismen der Insulinsekretion

1.5.1 Struktur und Funktion von Insulin

Insulin wird in den β -Zellen des Pankreas synthetisiert und von dort systemisch in das Blut abgegeben. Aus dem im endoplasmatischen Retikulum gebildeten Präproinsulin wird nach Abspaltung der Signalsequenz und Ausbildung intramolekularer Disulfidbrücken das Proinsulin, das in Vesikeln zum Golgi-Apparat transportiert wird. Hier erfolgen die proteolytische Abspaltung des C-Peptids (connecting peptide) und die Speicherung in Form von Zink-Insulin-Hexameren in „reifen“ Granula. Das wirksame Insulin (6000 Da) besteht aus zwei Peptidketten, der A-Kette mit 21 und der B-Kette mit 30 Aminosäuren, welche durch zwei Disulfidbrücken miteinander verbunden sind.

Die Wirkungen von Insulin sind sehr vielfältig, dienen aber alle dem gemeinsamen Ziel, die Glucosekonzentration im Blut zu senken und Nährstoffe im Körper zu speichern. In der Leber erhöht Insulin die Glucoseaufnahme über GLUT2-Uniporter und deren Einbau in die Speicherform Glykogen. Die Glykogenolyse wird gehemmt und die Gluconeogenese aus Aminosäuren blockiert. Auch in der Muskulatur wird die Aufnahme

von Glucose durch GLUT4-Uniporter stimuliert und dessen Speicherung in Form von Muskelglykogen gefördert. Im Fettgewebe dient Insulin der Einschleusung von Fettsäuren und Glucose in die Zelle und deren Umbau zu Triglyceriden, wobei die Lipolyse von Triglyceriden drastisch gehemmt wird (lipogene Wirkung). Im Muskel stimuliert Insulin die Aufnahme von Aminosäuren und steigert die Proteinsynthese (anabole Wirkung). Gleichzeitig wirkt Insulin hier auch antikatabol, indem die Proteolyse und die Ausschleusung von Aminosäuren blockiert werden.

1.5.2 Mechanismus der Glucose-induzierten Insulinsekretion

In den β -Zellen der Langerhans Inseln wird Insulin in sekretorischen Vesikeln, auch Granula genannt, gespeichert. Eine Zelle enthält etwa 10.000 dieser Vesikel (Dean, 1973; Olofsson *et al.*, 2002), deren Inhalt durch Fusion mit der Plasmamembran (Exozytose) in das Blut abgegeben wird. Glucose ist der bedeutendste physiologische Stimulator der Insulinsekretion (Henquin and Meissner, 1984). Diese gelangt über GLUT2-Uniporter in die Zelle und wird dort zu ATP verstoffwechselt. Der resultierende Anstieg des Verhältnisses von intrazellulärem ATP zu ADP (ATP/ADP Ratio) führt in Folge zu einer Hemmung von ATP-sensitiven Kaliumkanälen (K_{ATP} -Kanäle) in der Plasmamembran. Der wichtigste Vertreter in β -Zellen ist Kir6.2 (zusammen mit seiner akzessorischen β -UE SUR1), welcher hier für die Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials verantwortlich ist. Eine Hemmung dieses Kanals führt zu einer Depolarisation der Zellmembran. Ab einer Konzentration von 7 mM Glucose im Plasma überschreitet die Positivierung der Membran einen Schwellwert, bei dem sich spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle vom L-Typ öffnen (Mears, 2004). Der Einstrom von Ca^{2+} in die β -Zelle und die daraus resultierende Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration führt schließlich durch Fusion von Vesikel- und Plasmamembran zur Exozytose der Insulinhaltigen Granula (Abb. 6) (Ashcroft and Rorsman, 1989).

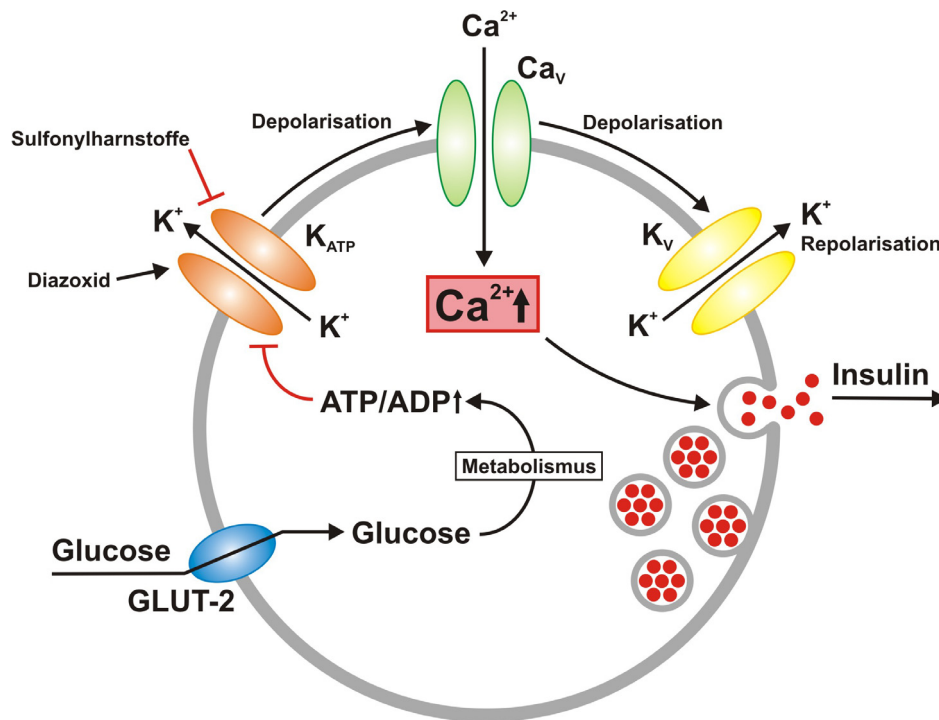


Abb. 6: Mechanismus der Glucose-induzierten Insulinsekretion

Glucose wird in den β -Zellen des Pankreas über GLUT2-Uniporter (blau) aufgenommen und verstoffwechselt. Der resultierende Anstieg der ATP/ADP-Ratio führt zu einer Hemmung von K_{ATP} -Kanälen (orange) und somit zu einer Depolarisation der Zellmembran. Ab einem gewissen Schwellwert öffnen spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle vom L-Typ (grün). Die damit verbundene Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration führt schließlich zur Fusion der insulinhaltigen Granula mit der Plasmamembran und somit zur Exozytose. Spannungsabhängige Kaliumkanäle (gelb) sorgen für eine Repolarisation der Zellmembran und beenden damit die Insulinausschüttung.

1.5.3 Rhythmische elektrische Aktivität von β -Zellen

Bei einer Glucosekonzentration unter 3 mM, bei welcher noch keine Insulinsekretion beobachtet wird, ist die β -Zelle elektrisch inaktiv und weist ein Membranpotential von etwa -70 mV auf. Übersteigt die Konzentration an Glucose einen Wert von 7 mM, erreicht die durch Kir6.2 vermittelte Depolarisation einen Schwellwert von etwa -50 mV. Ab diesem Potential zeigt sich eine rhythmische elektrische Aktivität der β -Zelle, welche auch als „Bursting“ bezeichnet wird. Jeder „Burst“ beginnt mit einer schnellen Depolarisation, gefolgt von Ca^{2+} -abhängigen Aktionspotentialen (AP). Die APs, deren Frequenz während des „Bursts“ abnimmt, erreichen maximal -20 mV und repolarisieren auf ein Plateau-Potential von etwa -40 mV. Diese aktiven, depolarisierten Phasen werden regelmäßig durch kurze hyperpolarisierte Ruhephasen unterbrochen, bis erneut der Schwellwert zur Auslösung von APs erreicht wird. Bei schrittweiser Erhöhung der Glucosekonzentration nimmt die Dauer der „Bursts“ zu und die der Ruhephasen ab, wobei es ab etwa 20 mM kontinuierlich zur Auslösung von AP kommt (Ashcroft *et al.*, 1989). Einhergehend mit der rhythmischen elektrischen Aktivität der β -Zellen zeigt auch die intrazelluläre Ca^{2+} -

Konzentration einen oszillierenden Verlauf (Valdeolmillos *et al.*, 1989; Santos *et al.*, 1991), was wiederum zu einer pulsatilen Insulinfreisetzung führt (Gilon *et al.*, 1993; Bergsten, 1995; Barbosa *et al.*, 1998).

1.5.4 Der Exozytoseapparat

Die Fusion der insulinhaltigen Granula mit der Plasmamembran ist eng an den Ca^{2+} -Einstrom gekoppelt und wird von einem komplexen Netzwerk aus Protein-Protein und Protein-Lipid Wechselwirkungen gesteuert, was bei allen Membranfusionen in ähnlicher Weise abläuft (Calakos and Scheller, 1996; Lang, 1999). Daran beteiligt sind Proteine aus der Familie der SNAREs (soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein [NSF] attachment protein [SNAP] receptors). Eine heute weit verbreitete Hypothese beschreibt ein Modell für den intrazellulären Membrantransport, bei dem die Erkennung zwischen SNAREs in Transportvesikeln (v-SNAREs) und jenen in der Zielmembran (t-SNAREs) sowohl das Andocken selbst als auch dessen Spezifität vermittelt. Wichtige Vertreter sind hierbei das v-SNARE Synaptobrevin-2 (VAMP) und die t-SNAREs Syntaxin-1A und SNAP-25 (25-kDa synaptosomal-associated protein). Diese drei Proteine bilden einen sehr stabilen „coiled-coil“ Komplex („trans“-SNARE Komplex) (Sutton *et al.*, 1998), welcher die an der Fusion beteiligten Membranen in engen Kontakt miteinander bringt. Die Energie, welche durch die Formierung dieses Komplexes frei wird, dient der Überwindung der Energiebarriere für die Neuordnung der Lipide während der Fusion (Rizo and Sudhof, 2002). Das vesikuläre Synaptotagmin scheint hierbei der Ca^{2+} -Sensor der Exozytosevorgänge zu sein (Rettig and Neher, 2002; Chapman, 2002; Sugita *et al.*, 2002; Shin *et al.*, 2002a), da es essentiell für die Ca^{2+} -abhängige Neurotransmission (Fernandez-Chacon *et al.*, 2001) und die Exozytose von insulinhaltigen Granula ist (Lang *et al.*, 1997; Gao *et al.*, 2000). Der genaue Mechanismus, über welchen Ca^{2+} die Membranfusion auslöst, wird jedoch bis heute diskutiert.

1.5.5 „Docking“ und „Priming“ der Granula

In β -Zellen führt der Einstrom von Ca^{2+} zunächst zu einer sehr schnellen Freisetzung von Insulin. Daran beteiligt sind Granula, welche sich in engem Kontakt zur Plasmamembran befinden (Olofsson *et al.*, 2002), wobei die Fixierung der Vesikel an die Membran („Docking“) durch die Proteine der SNARE-Familie vermittelt wird. Von diesen etwa 650 fixierten Granula pro β -Zelle kann ein Teil (ca. 20-100) sehr schnell freigesetzt werden, weshalb er auch als „ready releasable pool“ (RRP) bezeichnet wird (Barg *et al.*, 2001b; Bratanova-Tochkova *et al.*, 2002; Barg *et al.*, 2002a; Rorsman and Renstrom, 2003). Jedoch ist die Anzahl an kompetenten Granula sehr variabel, und die Größe des RRP kann sich innerhalb von Minuten ändern, abhängig von Änderungen des metabolischen

Zustandes der Zelle oder in Anwesenheit von inhibitorischen oder stimulatorischen Hormonen/Neurotransmittern (Renstrom *et al.*, 1996a; Eliasson *et al.*, 1997; Renstrom *et al.*, 1997; Gromada *et al.*, 1998). Das erneute Auffüllen des RRP aus dem so genannten nicht-freisetzbaren Reservepool ist ATP-, Ca^{2+} , und temperaturabhängig (Bittner and Holz, 1992; Parsons *et al.*, 1995; Renstrom *et al.*, 1996b; Eliasson *et al.*, 1997; Renstrom *et al.*, 2002) und wird als „Priming“ bezeichnet (Hay and Martin, 1992). Ein wichtiger Schritt beim Priming ist die intravesikuläre Ansäuerung durch gemeinsame Aktivität der V-Typ H^+ -ATPase zusammen mit dem Chloridkanal ClC-3 (Barg *et al.*, 2001a). Es wird vermutet, dass die vesikulären SNARE-Proteine dadurch in einen reaktiven Zustand für das Andocken der Granula an die Zellmembran gebracht werden.

1.5.6 Biphasischer Verlauf der Insulinfreisetzung

In β -Zellen kann der RRP in weniger als einer Sekunde entleert werden (Barg *et al.*, 2001b; Barg *et al.*, 2002b), wohingegen das Auffüllen bis zu einer Minute benötigt (Gromada *et al.*, 1999; Barg *et al.*, 2002b). Unter anhaltender Stimulation der Zelle wird somit das Priming von kompetenten Granula zum limitierenden Faktor der Exozytose, was den charakteristischen zweiphasigen Zeitverlauf der Insulinfreisetzung erklärt. Es wird davon ausgegangen, dass die frühe und sehr schnelle Komponente der Sekretion (1. Phase), welche etwa 5-10 min anhalten kann, auf die Freisetzung der Granula aus den RRP zurückzuführen ist. Im Anschluss wird ein Abfall der Insulinfreisetzung auf eine konstante Sekretionsrate beobachtet (2. Phase), die während der gesamten restlichen Dauer der Stimulation durch Glucose anhält. Diese Phase entsteht durch das zeitaufwendige Priming neuer kompetenter Granula und deren Translokation zum Ort der Freisetzung (Rorsman *et al.*, 2000; Barg *et al.*, 2002b). Der biphasische Verlauf der Insulinfreisetzung ist somit auf funktionell unterschiedliche Pools zurückzuführen, in welchen sich die unterschiedlich „reifen“ Granula befinden.

1.5.7 Interaktion von Ca^{2+} -Kanälen mit dem Fusionsapparat

Messungen an β -Zellen haben ergeben, dass für eine halbmaximale Exozytoserate (K_D) etwa eine intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration von 20 μM nötig ist (Takahashi *et al.*, 1997; Barg *et al.*, 2001b). Dies erscheint sehr hoch, da die mittlere zytosolische Ca^{2+} -Konzentration während Stimulation Werte von ca. 2 μM nicht überschreitet (Bokvist *et al.*, 1995; Dryselius *et al.*, 1999). Zudem weisen β -Zellen eine geringe Anzahl (<500) an spannungsabhängigen L-Typ Ca^{2+} -Kanälen auf (Barg *et al.*, 2001b), was nur etwa 5-10% der Menge entspricht, die bei anderen endokrinen Zellen gefunden wurde (Fenwick *et al.*, 1982). Trotzdem ist die β -Zelle in der Lage, schnelle Exozytoseprozesse auszuführen. Es wird angenommen, dass die Granula des RRP sich in direkter Nähe der

spannungsabhängigen Ca^{2+} Kanäle befinden, und somit schnell dem einströmenden Ca^{2+} bei Öffnung des Kanals ausgesetzt sind. Diese Granula können mit einer minimalen Latenzzeit freigesetzt werden (Barg *et al.*, 2001b; Barg *et al.*, 2002a). Die räumliche Nähe entsteht dadurch, dass Ca^{2+} -Kanäle mit dem Fusionsapparat selbst interagieren können. Sowohl N-Typ Ca^{2+} -Kanäle in Neuronen als auch L-Typ Ca^{2+} -Kanäle in endokrinen Zellen bilden einen Komplex („Excitosome complex“) mit Syntaxin, SNAP-25 und Synaptotagmin (Mochida *et al.*, 1996; Wiser *et al.*, 1997; Wiser *et al.*, 1999; Atlas, 2001). Da die Vesikel über diese SNARE-Proteine an die Membran fixiert sind, bringt dieser Komplex die intrazelluläre Porenöffnung der Ca^{2+} -Kanäle in direkten Kontakt mit den Granula. Nach einer Depolarisation der Zellmembran wird das Signal über den Ca^{2+} -Kanal zu den Proteinen des Fusionsapparats weitergeleitet, was schließlich zur Exozytose führt.

Die Interaktion von Ca^{2+} -Kanälen mit dem SNARE-Komplex bietet der β -Zelle einige Vorteile. Bei lang anhaltender Stimulation kann so der Ca^{2+} -Einstrom minimiert werden, was letztendlich Energie in Form von ATP für den erneuten Auswärtstransport spart. Des Weiteren würde ein massiver ATP-verbrauchender Auswärtstransport von Ca^{2+} die intrazelluläre ATP/ADP-Ratio beeinflussen, was bei Zellen, welche ihr Membranpotential über K_{ATP} -Kanäle regulieren, unerwünscht ist (Barg *et al.*, 2002a). Ferner konnte eine direkte Beeinflussung der Ca^{2+} -Kanalaktivität durch Interaktion mit dem SNARE-Komplex beobachtet werden. Dies verschafft den SNARE-Proteinen zusätzlich die Möglichkeit, die Menge an einströmendem Ca^{2+} zu regulieren (Wiser *et al.*, 1999; Atlas, 2001; Kang *et al.*, 2002; Ji *et al.*, 2002).

1.5.8 Interaktion von Kaliumkanälen mit dem Fusionsapparat

Forschungen der letzten Jahre haben ergeben, dass SNARE-Proteine (in β -Zellen) ebenfalls mit Kaliumkanälen interagieren können. Diese Interaktion ist wie bei den Ca^{2+} -Kanälen sowohl physischer als auch funktioneller Natur und gibt der Zelle zusätzliche Möglichkeiten, ihre Erregbarkeit fein abzustimmen.

In β -Zellen des Pankreas ist der Kaliumkanal Kv2.1 hauptverantwortlich (70%) für die Repolarisation der Zellmembran nach einem Ca^{2+} -Einstrom. Dessen Aktivität führt zum Schließen der spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle und beendet somit die weitere Exozytose (Roe *et al.*, 1996; MacDonald *et al.*, 2001; MacDonald and Wheeler, 2003), weshalb eine pharmakologische Hemmung von Kv2.1 die Glucose-induzierte Insulinsekretion in β -Zellen stimuliert (Herrington *et al.*, 2006). Syntaxin-1A und SNAP-25 kolokalisieren sowohl mit Kv2.1 als auch mit L-Typ Ca^{2+} -Kanälen ($\text{Ca}_v1.2$) in „lipid raft“ Mikrodomänen der Zellmembran, was nahe legt, dass Kv2.1 ebenfalls an der Formierung des „Excitosome Komplex“ beteiligt ist (Xia *et al.*, 2004). Die direkte Beeinflussung der Kanalaktivität, sowohl von $\text{Ca}_v1.2$ (Yang *et al.*, 1999; Kang *et al.*, 2002) als auch von

Kv2.1 (MacDonald *et al.*, 2002; Leung *et al.*, 2003; Leung *et al.*, 2005), durch Interaktion mit SNARE-Proteinen (va. Syntaxin) führt zu einem komplexen Modell, bei dem Depolarisation und Repolarisation der β -Zelle präzise reguliert werden (Leung *et al.*, 2007).

Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass Kv2.1 im Zellmodell die Exozytose von sekretorischen Granula verstärkt (Singer-Lahat *et al.*, 2007). Diese erleichterte Freisetzung war auch noch nach Zerstörung der Porenregion zu beobachten und konnte nicht über Änderungen der zytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration oder des Membranpotentials erklärt werden. Sie war somit von der Funktion von Kv2.1 als Kaliumkanal unabhängig. Diese Beobachtung war vielmehr auf eine direkte Interaktion der C-terminalen Domäne von Kv2.1 mit Syntaxin zurückzuführen, welche hauptsächlich während Stimulation der Sekretion, d.h. in Anwesenheit von Ca^{2+} , auftrat. Die Effekte der Kv2.1 Kanalpore und die der Syntaxin-Bindungsdomäne auf die Sekretionsleistung der Zelle sind überraschenderweise antagonistisch, können jedoch erklärt werden. Einzelne Aktionspotentiale erzeugen keine maximale Exozytose, da eine Hyperpolarisierung der Membran durch die Kanalaktivität von Kv2.1 indirekt den weiteren Einstrom von Ca^{2+} durch spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle entgegenwirkt. Eine Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration durch starke Stimulation und die damit einhergehenden repetitiven Aktionspotentiale werden jedoch durch die biochemische Interaktion von Kv2.1 mit Syntaxin gefördert.

Es ist zudem bekannt, dass auch K_{ATP} -Kanäle mit Syntaxin-1A interagieren können. Diese Kaliumkanäle sind für die β -Zelle sehr wichtig, da sie den Zellmetabolismus mit Änderungen des Membranpotentials verknüpfen (Ashcroft *et al.*, 1994; Ashcroft and Rorsman, 2004). In Abwesenheit von Glucose sind sie spontan aktiv und generieren so das Ruhemembranpotential der Zelle. Das durch Verstoffwechslung von Glucose entstehende ATP hemmt K_{ATP} -Kanäle, was zu einer Depolarisation der Membran und schließlich zum Auslösen der elektrischen Aktivität der β -Zelle führt. Der Effekt von Glucose auf die Kanalaktivität ist konzentrationsabhängig ($\text{EC}_{50} \approx 5 \text{ mM}$) (Gopel *et al.*, 1999), wobei während Phasen der Insulinausschüttung praktisch alle Kanäle gehemmt sind. K_{ATP} -Kanäle sind aus zwei Untereinheiten zusammengesetzt, der α -Untereinheit Kir6 (Mitglied der einwärtsgleichrichtenden K^+ -Kanäle) und dem Sulfonylurea-Rezeptor (SUR) als akzessorische β -UE. Ein funktioneller K_{ATP} -Kanal in β -Zellen des Pankreas besteht aus 4 Kir6.2 UE, welche die Kanalpore bilden, und 4 SUR1 Untereinheiten, welche die Kanalaktivität regulieren (Babenko *et al.*, 1998; Aguilar-Bryan and Bryan, 1999; Bryan *et al.*, 2004; Koster *et al.*, 2005; Nichols, 2006). ATP hemmt den K_{ATP} -Kanal durch direkte Bindung an Kir6.2. Der Sulfonylurea-Rezeptor besitzt zwei zytoplasmatische NBFs („nucleotide-binding folds“), welche wahrscheinlich an der Regulation von Kir6.2 durch

Adenin-Nukleotide (z.B. MgADP-abhängige Aktivierung), Sulfonylharnstoffe (z.B. Hemmung durch Tolbutamid), K_{ATP} -Kanalöffner (z.B. Aktivierung durch Diazoxid) und auch durch Syntaxin-1A beteiligt sind. Es konnte gezeigt werden, dass Syntaxin selbst bei niedrigen zytosolischen ATP-Konzentrationen einen hemmenden Effekt auf K_{ATP} -Kanäle ausübt (Pasyk *et al.*, 2004). Dies deutet darauf hin, dass Syntaxin die Erregbarkeit der β -Zelle durch Schließen von K_{ATP} -Kanälen zusätzlich verstärken kann.

1.5.9 Die Rolle von ARF6 bei der Insulinsekretion

ARF6 (ADP-ribosylation factor 6) ist ein kleines G-Protein der Ras-GTPase Superfamilie, welches intrazelluläre Transportvorgänge reguliert (Moss and Vaughan, 1998; Donaldson and Jackson, 2000). Vieles weist darauf hin, dass ARF6 am Vesikeltransport, der Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts und an der Sekretion von präformierten Granula beteiligt ist. Wie alle kleinen G-Proteine wechselt ARF6 zwischen einem inaktiven GDP-gebundenen Zustand und einen aktiven GTP-gebundenen Zustand hin und her. Die intrinsische GTPase Aktivität wird vor allem durch GEFs („guanine nucleotide exchange factors“) und GTPase-aktivierende Proteine reguliert. GEFs erhöhen die Dissoziationsrate des GDP von ARF Proteinen, was den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt bei der ARF Aktivierung darstellt. GTPase-aktivierende Proteine verstärken die intrinsische GTPase Aktivität von ARFs, wodurch sie wieder in ihren inaktiven GDP-gebundenen Zustand wechseln. Die wichtigsten GEFs von ARF6 sind EFA6 (spezifisch für ARF6) und ARNO (aktiviert vor allem ARF1) (Macia *et al.*, 2001). Sowohl für ARF6 als auch EFA6 konnte eine Expression in den Insulin-produzierenden Zelllinien MIN6 und HIT-T15 nachgewiesen werden (Lawrence and Birnbaum, 2003; Grodnitzky *et al.*, 2007), wobei eine Beteiligung von ARF6 bei der Freisetzung von Insulin beobachtet wurde. Beispielsweise führt eine Überexpression der ARF6T27N-Mutante, welche permanent in ihrer inaktiven GDP-gebundenen Form vorliegt, zu einer Reduktion der Glucose-induzierten Insulinausschüttung (Lawrence *et al.*, 2003). Der Mechanismus, über welchen ARF6 die Freisetzung von Insulin beeinflusst, ist noch nicht ausreichend verstanden, jedoch werden drei Hypothesen in der Literatur diskutiert. Zum einen scheint ARF6 direkt am Umbau des Aktin-Zytoskeletts beteiligt zu sein (Zhang *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1999; Radhakrishna *et al.*, 1999; Boshans *et al.*, 2000), welches den Zugang von sekretorischen Granula zur Plasmamembran behindert (Cheek and Burgoyne, 1986; Cheek and Burgoyne, 1987; Sontag *et al.*, 1988; Trifaro *et al.*, 1992; Vitale *et al.*, 1995). So führt eine Behandlung von MIN6 Zellen mit dem Aktin-depolymerisierenden Stoff Latrunculin A zu einer Zunahme der Insulinfreisetzung, wohingegen die Stabilisierung von Aktinfilamenten mit Jasplakinolid eine Hemmung bewirkt (Lawrence *et al.*, 2003). Vermutlich reguliert also ARF6 durch Umlagerung des Aktingerüsts den Zugang von insulinhaltigen Vesikeln zum

Ort der Freisetzung. Eine weitere Hypothese wird jedoch noch diskutiert, wie ARF6 die Insulinsekretion beeinflussen könnte. Es ist bekannt, dass ARF6 die Phospholipase D (PLD) aktiviert (Massenburg *et al.*, 1994). Dieses Enzym wird fast ubiquitär exprimiert und katalysiert die Hydrolyse eines der wichtigsten Membranphospholipide, das Phosphatidylcholin (Lecithin), zu Phosphatidsäure. Zwei verschiedene Formen der PLD wurden identifiziert, PLD1 und PLD2. Die PLD1 Isoform scheint generell im Golgi-Apparat und auf intrazellulären Vesikeln lokalisiert zu sein, wohingegen die PLD2 vor allem auf die Plasmamembran beschränkt ist (Liscovitch *et al.*, 1999; Exton, 2002). Dabei ist dieses Enzym an vielen zellulären Signaltransduktionskaskaden beteiligt, moduliert den intrazellulären Verkehr von Vesikeln und reguliert zudem die Organisation des Zytoskeletts (Exton, 2002). So scheint die PLD am Vesikelverkehr innerhalb des Golgi-Apparates (Ktistakis *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1997; Freyberg *et al.*, 2001) und an Endozytoseprozessen beteiligt zu sein (Shen *et al.*, 2001; Hughes and Parker, 2001; Du *et al.*, 2004). Außerdem korreliert die Aktivität der PLD mit der Sekretion von neuroendokrinen Zellen (Humeau *et al.*, 2001; Vitale *et al.*, 2001), Mastzellen (Brown *et al.*, 1998; Choi *et al.*, 2002; Cockcroft *et al.*, 2002), Adipozyten (Guilherme *et al.*, 2000), Parotiszellen (Fujita-Yoshigaki *et al.*, 1999), bronchialen Epithelzellen (Wang *et al.*, 2002) und neutrophilen Granulozyten (Kaldi *et al.*, 2002). Untersuchungen an MIN6-Zellen haben ergeben, dass die Isoform PLD1 sowohl für die schnelle als auch für die nachfolgend langsame Phase der Insulinausschüttung wichtig ist. Außerdem wurde dieses Enzym immunhistochemisch auf intrazellulären Vesikeln beobachtet, welche zum Teil mit insulinhaltigen Granula kolokal lagen (Hughes *et al.*, 2004). Es wird angenommen, dass die PLD1 hier an sehr späten Schritten des Exozytoseprozesses beteiligt ist, nachdem das Priming und Docking der Vesikel bereits stattgefunden hat. Dabei soll deren Aktivität direkt in den Fusionsprozess der insulinhaltigen Granula mit der Plasmamembran eingreifen. In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass das Produkt der PLD, die Phosphatidsäure, in der Zellmembran eine negative Krümmung begünstigt. Dieser Mechanismus führt dann wahrscheinlich zu einer erleichterten Fusion der benachbarten Membranen (Schmidt *et al.*, 1999; Kooijman *et al.*, 2003). In der Literatur wird noch ein dritter Zusammenhang zwischen ARF6 und der Insulinsekretion beschrieben (Lawrence *et al.*, 2003). ARF6 stimuliert direkt die Produktion von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) durch Aktivierung einer Typ I Phosphatidylinositol-4-phosphat-5-Kinase auf Membranen des Golgi-Apparates und in der Plasmamembran (Honda *et al.*, 1999; Godi *et al.*, 1999). Außerdem führt die Produktion von Phosphatidsäure über die Stimulation der PLD ebenfalls zu einer Aktivierung der Kinase (Ishihara *et al.*, 1996). Für PIP₂ wurde beschrieben, dass es den Polymerisierungsgrad des Aktin-Zytoskeletts reguliert und am Priming von sekretorischen Vesikeln beteiligt ist (Hay *et al.*, 1995). Somit

soll ARF6 über die Bereitstellung von PIP_2 auf die Insulinsekretion einwirken. Interessanterweise wurde beobachtet, dass die Überexpression der ARF6T27N-Mutante in MIN6 Zellen nur zu einer Verminderung der 2. Phase der Sekretion führte. Dies wurde damit erklärt, dass unter Ruhebedingungen die basale Aktivität der Phosphatidylinositol-4-phosphat-5-Kinase ausreicht, um einen Vorrat an kompetenten Granula für die 1. Phase der Sekretion aufrecht zu erhalten. Damit jedoch neue sekretorische Vesikel reifen können und schnell zum Ort der Freisetzung transportiert werden, ist die durch ARF6 stimulierte Produktion von PIP_2 notwendig.

Die geschilderten Mechanismen der Insulinausschüttung machen deutlich, wie komplex und kontrolliert dieser Vorgang abläuft, zumal noch erheblich mehr Faktoren daran beteiligt sind. Besondere Aufmerksamkeit wurde der Interaktion von Ionenkanälen mit dem Exozytoseapparat geschenkt. Hier zeigt sich, dass Ca^{2+} - und K^+ -Kanäle in engem Wechselspiel mit SNARE-Proteinen stehen und gemeinsam den Prozess der Exozytose steuern. Außerdem wird am Beispiel von Kv2.1 deutlich, dass Kaliumkanäle auch Aufgaben übernehmen können, welche nicht an ihre Funktion als Ionenleitende Pore gebunden sind. Unsere eigenen Untersuchungen haben ergeben, dass TWIK1 an der Freisetzung von Insulin beteiligt ist. Allerdings hat sich gezeigt, dass weder Änderungen der elektrischen Eigenschaften von β -Zellen noch Unterschiede in der intrazellulären Ca^{2+} -Aktivität dafür verantwortlich sein können. Dies legt die Vermutung nahe, dass TWIK1 hier Kanal-unabhängige Aufgaben erfüllt, eventuell durch Interaktion mit SNARE-Proteinen oder durch die Interaktion mit ARF6. Auch die ausschließlich intrazelluläre Lokalisation in β -Zellen lässt vermuten, dass TWIK1 hier direkt oder indirekt in den Prozess der Exozytose von insulinhaltigen Granula eingreift.

2. Zielsetzung

TWIK1 ist ein Kaliumkanal der so genannten 2-P-Domänen Kaliumkanalfamilie, welcher bei der Maus unter anderem in der Niere (Lesage *et al.*, 1997; Arrighi *et al.*, 1998; Nie *et al.*, 2005) und im Pankreas (Arrighi *et al.*, 1998) exprimiert wird. In der vorliegenden Arbeit wurde die physiologische Rolle von TWIK1 in diesen beiden Organen am Modell der TWIK1^{-/-} Maus näher untersucht.

In der Niere der Maus wurde zunächst die Lokalisation von TWIK1 bestimmt. Dabei wurde eine geschlechtsabhängige Expression in spätproximalen Tubulusabschnitten (S3) beobachtet. Kastrationsexperimente und eine Behandlung von TWIK1^{+/+} Mäusen mit Sexualhormonen wurden durchgeführt, um dieses geschlechtsspezifische Expressionsmuster näher zu charakterisieren. Weiterhin wurde im S3-Segment des proximalen Tubulus eine Kolo­kalisierung von TWIK1 mit dem natriumabhängigen Glucosetransporter SGLT1 beobachtet. Diese Kolo­kalisierung wies auf eine funktionelle Kopplung der beiden Proteine hin und sollte in einer Serie von Experimenten an TWIK1^{+/+} und TWIK1^{-/-} Mäusen *in vivo* überprüft werden. Das Ziel der Arbeit war hierbei, eine Beteiligung von TWIK1 an der Rückresorption von Glucose im spätproximalen Tubulus der Niere zu untersuchen. Ferner wurde noch eine mögliche Rolle von TWIK1 bei der Rückresorption von Aminosäuren und bei der Endozytose im proximalen Tubulus untersucht.

Im Pankreas der Maus wurde ebenfalls zunächst die Lokalisation von TWIK1 genauer bestimmt. Da TWIK1 hier fast ausschließlich in den β -Zellen beobachtet wurde, sollte in einer Reihe von Experimenten eine mögliche Beteiligung an der Insulinsekretion untersucht werden. Dabei wurde die Aktivität der β -Zellen von TWIK1^{+/+} und TWIK1^{-/-} Mäusen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* miteinander verglichen. Weil bei β -Zellen von TWIK1^{-/-} Mäusen durchgehend eine höhere Insulinausschüttung beobachtet wurde, sollte in weiteren Experimenten der Mechanismus dieser erleichterten Freisetzung untersucht werden. Hierbei wurde zunächst die zytosolische Ca²⁺-Aktivität der β -Zellen von TWIK1^{+/+} und TWIK1^{-/-} Mäusen miteinander verglichen, da diese bei der Insulinsekretion eine wichtige Rolle spielt und prinzipiell von Kaliumkanälen beeinflusst werden kann. Weiterhin wurde mit Hilfe von Patch-Clamp Messungen eine Beteiligung von TWIK1 am Membranpotential und an der Kaliumleitfähigkeit von β -Zellen untersucht. Ferner wurden noch alternative Mechanismen untersucht, wie das TWIK1 Protein unabhängig von seiner Funktion als Kaliumkanal die Insulinsekretion beeinflussen kann.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Augenschere (und weitere chirurgische Instrumente)	FST, Bad Oeynhausen, D
Autoklav	Tuttnauer 2540ELC, biomedis GmbH, Gießen, D
Brutschrank	Heraeus Instruments, Osteode, D
EPC-7-ähnlicher Patch-Clamp Verstärker	U. Fröbe und R. Busche, Institut für Physiologie, Freiburg, D
Gasmischanlage für Isofluran-Verdampfer	MFI Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim, D
Hämatokritzentrifuge	Biofuge haemo, Heraeus Instruments, Osteode, D
Invertmikroskop	Axiovert 200, Zeiss, Jena, D
Isofluran-Verdampfer	Vapor 19.3, Dragerwerk AG, Lübeck, D
Kaffeemaschine	Master 5000, Solis, CH
konfokales Mikroskop	LSM 510, Zeiss, Jena, D
Kryostat	Leica CM3050 S, Wetzlar, D
Light-Cycler System 2.0	Roche, Mannheim, D
Mikrotiterplatten-Photometer	TECAN Sunrise, Tecan Trading AG, CH
Mikrotom	Rotationsmikrotom RM2165, Leica, Wetzlar, D
Perfusor	Precidor 902681, Infors AG, Bottmingen, CH
Rollerpumpe	Ismatec SA., Zürich, CH
Silikonkautschuk Gießformen	Roth, Karlsruhe, D
Spektrorfluorimeter	Shimadzu RF-5000, Japan
Stereo-Mikroskop (OP-Platz)	Stemi SV6, Zeiss, Jena, D
Stereo-Mikroskop (Sammeln von Inseln)	Discovery V12 SteREO, Zeiss, Jena, D
UV-Meter	Genova, Jenway, Essex, E
Wärmeplatte für Operationen	Dr. J. Barhanin, Nizza, F
Wärmeplatte für Paraffinschnitte	HI 1220, Leica, Wetzlar, D
Wärmeschränk	Modell 300, Memmert, Schwabach, D
Wärmetopf	PSI, HOT POT 1.411.80/l
Wasserbad	Modell W13, Haake, Karlsruhe, D

3.1.2 Verbrauchsmaterial

Produkt	Hersteller
0,5 ml Insulin-Spritzen	BD Micro-Fine+, BD Consumer Healthcare, Heidelberg, D

Fluoreszenz-freies Glycergel mounting medium	DakoCytomation, Dakato North America Inc., Carpinteria, USA
Gewebe-Einbettkassetten	Labonord, Mönchengladbach, D
Glaskapillaren für Patchpipetten	Clark electromedical Instruments, Reading, E
heparinisierte Mikro-Hämatokrit-Kapillaren	Brand GmbH + CO KG, Wertheim, D
Latex-Handschuhe	Kimberly-Clark, Roswell, USA
Light-Cycler Kapillaren	Roche, Mannheim, D
Mikrotiterplatten	Nuclon Surface, Nunc A/S, Roskilde, DK
Nahtmaterial (Seide, Stärke 5)	Catgut GmbH, Marktneukirchen, D
Einbett-Medium	Tissue-Tek, Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude, NL
PE-Schlauch (Katheter)	Benno Kummer, Freiburg, D
Petrischalen	Nuclon Surface, Nunc A/S, Roskilde, DK
Polysin Objektträger	Kindler, Freiburg, D

3.1.3 Chemikalien, Arzneistoffe, Hormone

Produkt	Hersteller
17 β -Estradiolbenzoat	Sigma, Taufkirchen, D
2-Methylbutan	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Agarose	AppliChem, Darmstadt, D
Aqua ad injectabilia	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
ATP (Dinatriumsalz)	Sigma, Taufkirchen, D
BSA (Albumin from bovine serum)	Sigma, Taufkirchen, D
CaCl ₂	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Dextran-FITC	Sigma, Taufkirchen, D
D-Glucuronsäure Calciumsalz	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
D-Kaliumgluconat	Sigma, Taufkirchen, D
D-Mannitol	Fluka Chemie GmbH, Buchs, CH
EDTA	Sigma, Taufkirchen, D
EGTA	Sigma, Taufkirchen, D
Ethanol	J. T. Baker, Deventer, NL
FCS (Fötales Rinderserum)	Gibco Cell Culture Systems - Invitrogen, Karlsruhe, D
Fura-2, AM	Molecular Probes, Leiden, NL
Glucose	Merck, Darmstadt, D
Glycin	Merck, Darmstadt, D
Heparin-Lösung	Liquemin N 25000, 5 ml, Roche, Mannheim, D
HEPES	AppliChem, Darmstadt, D
Inulin-FITC	Sigma, Taufkirchen, D
Isofluran	Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, D
Isopropanol	Merck, Darmstadt, D
isotone Natriumchloridlösung 0,9%	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
K ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt, D
KCl	Merck, Darmstadt, D

Ketamin	Sigma, Taufkirchen, D
Kreatinin	Sigma, Taufkirchen, D
$\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	Merck, Darmstadt, D
L-Glutamin, 200 mM (100x), Flüssig	Gibco Cell Culture Systems - Invitrogen, Karlsruhe, D
MEM alpha medium	Gibco Cell Culture Systems - Invitrogen, Karlsruhe, D
Methanol	Merck, Darmstadt, D
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Merck, Darmstadt, D
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Merck, Darmstadt, D
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Merck, Darmstadt, D
NaCl	Merck, Darmstadt, D
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Merck, Darmstadt, D
Na-Pyruvat, 100 mM Lösung	Sigma, Taufkirchen, D
Natriumacetat	Merck, Darmstadt, D
Natriumcitrat-Dihydrat	Merck, Darmstadt, D
Nystatin (Mycostatin)	Sigma, Taufkirchen, D
Paraffin	Paraplast-Plus Paraffin, Sherwood, St. Louis, USA
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt, D
Penicillin-Streptomycin-Lösung, Flüssig	1000 I.E./ml Pen G, 10000 µg/ml Strep.-Sulfat, Gibco Cell Culture Systems - Invitrogen, Karlsruhe, D
Pluronic F-127	Invitrogen, Karlsruhe, D
Progesteron	Sigma, Taufkirchen, D
Prolaktin	Sigma, Taufkirchen, D
Saccharose	Merck, Darmstadt, D
SDS (Dodecylsulfat Natriumsalz)	Merck, Darmstadt, D
Sesamöl, raffiniert	Henry Lamotte GmbH, Bremen, D
Testosteronpropionat	Sigma, Taufkirchen, D
Tolbutamid	Sigma, Taufkirchen, D
Triton X-100	Sigma, Taufkirchen, D
Trypsin-EDTA-Lösung (10x), Flüssig	0,5% Trypsin, 5,3 mM EDTA, Gibco Cell Culture Systems - Invitrogen, Karlsruhe, D
Xylazin-Hydrochlorid 2%	cp-pharma, Burgdorf, D
Xylol	Merck, Darmstadt, D
Zitronensäure-Monohydrat	Sigma, Taufkirchen, D
α-Ketoglutarat	Sigma, Taufkirchen, D

3.1.4 Enzyme, Kits

Produkt	Hersteller
Collagenase Typ IV (aus Clostridium histolyticum)	Sigma, Taufkirchen, D
DNase I (RNase-Free DNase Set)	Quiagen, Hilden, D
dNTP-Mix	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega, Madison, Wisconsin, USA
M-MLV Reverse Transkriptase Puffer (5x)	Promega, Madison, Wisconsin, USA

Protease (aus <i>Streptomyces griseus</i>)	Sigma, Taufkirchen, D
Random Hexamer Primer (100 µM)	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D
RNAse Inhibitor	Peqlab Biotechnologie GMBH, Erlangen, D
RNeasy mini kit	Quiagen, Hilden, D
SYBR® Green PCR Kit	Quiagen, Hilden, D

3.1.5 Software

Produkt	Hersteller
ImageJ V1.37c	Wayne Rasband, NIH, USA
Metafluor V6.2r2	Molecular Devices Corporation, Downingtown, PA, USA
Metamorph V6.2r2	Molecular Devices Corporation, Downingtown, PA, USA
Origin V7.0	OriginLab Corporation, Northampton, USA

3.1.6 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von Invitrogen, Karlsruhe, D hergestellt.

Gen	Primer	Sequenz	Annealing-T.
KCNK1 (TWIK1)	sense	CAGGGGAAGGCTACAACC	55°C
	antisense	GTCTCCAGGACAACCAGC	
Slc5a1 (SGLT1)	sense	TAATCGTGGTACCGTTGGAG	57°C
	antisense	CTGCTCCTGTGCCTGCCA	
Slc5a2 (SGLT2)	sense	GCAACATCGGCAGCGGTC	57°C
	antisense	GGTCAGATACACTGGCACAA	
KCNK1 (TASK2)	sense	GCTTTGGGGACTTTGTGG	55°C
	antisense	AAAGAGGGACAGCCAAGC	
KCNQ1 (KVLQT1)	sense	TCATTCACCGCCAGGAGC	52°C
	antisense	CAGAGCATCTGCGTAGCTG	
Slc9a3 (NHE3)	sense	AGAAGCGGAGGAATAGC	52°C
	antisense	TCCAAATCTTTCTCCTTG	
CA2 (CAR2)	sense	GATAAAGCTGCGTCCAAGAG	54°C
	antisense	ACTGCATTGTCCTGAGAGTC	
KCNJ15 (Kir4.2)	sense	TAGCCAGGTGGGAGAAGG	55°C
	antisense	ACTGGACATGCCAAGGTG	
β-Aktin	sense	GACAGGATGCAGAAGGAGATTACTG	57°C
	antisense	CCACCGATCCACACAGAGTACTT	

3.1.7 Antikörper

Bezeichnung	Art	Verd.	Hersteller
anti-ARF6, mouse polyclonal IgG	Prim.-Ak	1:200	Dr. F. Lesage, F
anti-Cubilin, goat polyclonal IgG	Prim.-Ak	1:100	Santa Cruz, Heidelberg, D
anti-Endobrevin, goat polyclonal IgG	Prim.-Ak	1:500	Santa Cruz, Heidelberg, D
anti-Glucagon, mouse monoclonal Ab	Prim.-Ak	1:16000	Sigma, Taufkirchen, D
anti-Insulin A, goat polyclonal IgG	Prim.-Ak	1:100	Santa Cruz, Heidelberg, D
anti-SGLT1, goat polyclonal IgG	Prim.-Ak	1:100	Santa Cruz, Heidelberg, D

anti-Somatostatin, goat polyclonal IgG	Prim.-Ak	1:200	Santa Cruz, Heidelberg, D
anti-TWIK1, rabbit polyclonal IgG directed against a C-terminal epitope	Prim.-Ak	1:300	Dr. J. Barhanin, Nizza, F

Alexa Fluor® 488 donkey anti-mouse	Sek.-Ak	1:800	Invitrogen, Karlsruhe, D
Alexa Fluor® 488 donkey anti-rabbit	Sek.-Ak	1:800	Invitrogen, Karlsruhe, D
Alexa Fluor® 546 donkey anti-goat	Sek.-Ak	1:800	Invitrogen, Karlsruhe, D
Alexa Fluor® 647 donkey anti-rabbit	Sek.-Ak	1:800	Invitrogen, Karlsruhe, D
Alexa Fluor® 647 phalloidin	kein Ak	1:500	Invitrogen, Karlsruhe, D
Cy5 donkey anti-mouse	Sek.-Ak	1:800	Invitrogen, Karlsruhe, D
HOE33342 (Stockkonz.: 5×10^{-4} M)	kein Ak	1:500	Invitrogen, Karlsruhe, D

3.1.8 Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Inhaltsstoffe	Menge
Fixierlösung I, pH 7,4	EGTA	1 mM
	K ₂ HPO ₄	15 mM
	MgCl ₂	2 mM
	NaCl	90 mM
	Paraformaldehyd	3%
	Saccharose	100 mM
	Aqua dest.	
Fixierlösung II, pH 7,4	EGTA	1 mM
	K ₂ HPO ₄	15 mM
	MgCl ₂	2 mM
	NaCl	90 mM
	Paraformaldehyd	1%
	Saccharose	17%
	in Aqua dest.	
PBS-Puffer, pH 7,4	KH ₂ PO ₄	1,8 mM
	Na ₂ HPO ₄	10,3 mM
	NaCl	137 mM
	in Aqua dest.	
Citratpuffer, pH 6	Natriumcitrat-Dihydrat	2,059 g
	Zitronensäure-Monohydrat	0,317 g
	in Aqua dest.	ad 1000 ml
Block-Lösung, pH 7,4	BSA	5%
	Triton X-100	0,04%
	in PBS-Puffer	

Ak-Verdünnungslösung, pH 7,4	BSA	0,5%
	Triton X-100	0,04%
	in PBS-Puffer	

Verdau-Lösung I, pH 7,4	Ca-Gluconat	1,3 mM
	Collagenase Typ IV	0,33 mg/ml
	Glycin	2 mM
	K ₂ HPO ₄	1,6 mM
	KH ₂ PO ₄	0,4 mM
	MgSO ₄	1 mM
	Na-Acetat	10 mM
	NaCl	140 mM
	Protease	0,067 mg/ml
	α-Ketoglutarat	1 mM
	in Aqua dest.	

Verdau-Lösung II, pH 7,4	Ca-Gluconat	1,3 mM
	Collagenase Typ IV	0,5 mg/ml
	Glycin	2 mM
	K ₂ HPO ₄	1,6 mM
	KH ₂ PO ₄	0,4 mM
	MgSO ₄	1 mM
	Na-Acetat	10 mM
	NaCl	140 mM
	α-Ketoglutarat	1 mM
	in Aqua dest.	

Insel-Zellmedium	MEM alpha medium	500 ml
	FCS (heat-inactivated)	10%
	L-Glutamin	6 mM
	Na-Pyruvat	1 mM
	Penicillin G	5 I.E.
	Streptomycin	50 µg/ml

Kontroll-Lösung, pH 7,4 (Patch-Clamp, Ca²⁺ Messungen)	CaCl ₂	1,3 mM
	Glucose	5 mM
	HEPES	5 mM
	K ₂ HPO ₄	1,6 mM
	KH ₂ PO ₄	0,4 mM
	Mannitol	15 mM
	MgCl ₂	1 mM
	NaCl	135 mM
	in Aqua dest.	

Glucose-10-Lösung, pH 7,4 (Patch-Clamp, Ca²⁺ Messungen)	CaCl ₂	1,3 mM
	Glucose	10 mM
	HEPES	5 mM
	K ₂ HPO ₄	1,6 mM
	KH ₂ PO ₄	0,4 mM
	Mannitol	10 mM
	MgCl ₂	1 mM
	NaCl	135 mM
	in Aqua dest.	

Glucose-20-Lösung, pH 7,4 (Patch-Clamp, Ca²⁺ Messungen)	CaCl ₂	1,3 mM
	Glucose	20 mM
	HEPES	5 mM
	K ₂ HPO ₄	1,6 mM
	KH ₂ PO ₄	0,4 mM
	MgCl ₂	1 mM
	NaCl	135 mM
	in Aqua dest.	

Pipettenlösung, pH 7,4 (Patch-Clamp Messungen)	ATP	3 mM
	CaCl ₂	0,726 mM
	EGTA	1 mM
	Glucose	5 mM
	Kaliumgluconat	95 mM
	KCl	30 mM
	MgCl ₂	2,38 mM
	Na ₂ HPO ₄	4,8 mM
	NaH ₂ PO ₄	1,2 mM
	in Aqua dest.	

Tolbutamid-Lösung, pH 7,4 (Patch-Clamp Messungen)	Tolbutamid	100 µM
	in Kontroll-Lösung	

Fura-2-Lösung, pH7,4	Fura-2-AM	50 µM
	Pluronic F-127 (Stock-Konz: 10%)	0,25 µl
	in Kontroll-Lösung	

Glucose-Lösung, pH 7,4 (Perfusion)	Glucose	12%
	in Aqua ad injectabilia	

Verdünnungslösung, pH 7,0 (für Fluoreszenzmessung)	EDTA	5 mM
	Tris	10 mM
	in Aqua dest.	

Dextran-FITC-Lösung, pH 7,4	Dextran-FITC	1%
	in NaCl-Lösung 0,9%	
Inulin-FITC-Lösung, pH 7,4	Inulin-FITC	0,5%
	in NaCl-Lösung 0,9%	

3.2 Methoden

3.2.1 Mäuse

Die TWIK1 knockout (TWIK1^{-/-}) Maus wurde über die Methode der homologen Rekombination hergestellt (Nie *et al.*, 2005) und anschließend über zehn Generationen in den genetischen Hintergrund C57Bl/6J rückgekreuzt. Sowohl TWIK1^{-/-} als auch die entsprechenden genetisch nicht modifizierten Kontrolltiere (TWIK1^{+/+}, C57Bl/6J) wurden nach dem geltenden Tierschutzgesetz gehalten. Die Mäuse hatten einen 12 Stunden Hell-Dunkel Rhythmus und erhielten speziesspezifische Standarddiät und Leitungswasser *ad libitum*. TWIK1^{+/+} und TWIK1^{-/-} Mäuse wurden unter gleichen Bedingungen in offener Tierhaltung gehalten.

3.2.2 Histologische Methoden

3.2.2.1 Gewebefixierung durch retrograde arterielle Perfusion

Durch Fixierung des Gewebes sollen autokatalytische Vorgänge verhindert und die Zellstruktur in einem möglichst natürlichen Zustand erhalten werden. Darüber hinaus wird eine Härtung des Probenmaterials und damit eine bessere Schneidbarkeit bewirkt. Die Fixierung mit Paraformaldehyd führt zur Ausbildung von Querverbindungen zwischen den Eiweißmolekülen und damit zur Stabilisierung der Strukturen.

Die Versuchstiere wurden durch Inhalationsanästhesie mit Isofluran (2,5% Isofluran in einem Gasgemisch aus 50% Sauerstoff und 50% Stickstoff mit einem Fluss von 60 ml/min) narkotisiert. Nach Öffnen des Abdomens und Freilegen der Bauchorta wurde die Aorta unterhalb der Abgänge der Arteriae renales abgeklemmt. Distal zur Klemme wurde der Perfusionskatheter eingeführt und mit einer Klemme fixiert. Als Abfluss für das Perfusat wurde die Vena cava inferior durch einen Schnitt geöffnet. Nach Entfernen der proximalen Aortenklammer wurden über den Katheter zunächst 10 ml Spüllösung (isotone NaCl-Lösung mit 10 I.E./ml Heparin) infundiert, wobei das Blut entfernt und eine eventuelle Blutgerinnung verhindert wurde. Danach erfolgte die retrograde Perfusion mit frisch angesetzter Fixierlösung I (3% Paraformaldehyd in gepufferter Salzlösung) mit

einem konstanten Fluss von 15 ml/min über eine Rollerpumpe. Die fixierten Organe wurden anschließend entfernt und entsprechend ihrer weiteren Bestimmung (Kryo- oder Paraffinpräparate) behandelt.

3.2.2.2 Einbettung in Paraffin

Die herausgenommenen perfundierten Organe wurden bis zur Paraffineinbettung in 70% Methanol aufbewahrt. Zur Vorbereitung auf die Einbettung in Paraffin wurden die Gewebe dann in Gewebe-Einbettkassetten durch eine Methanolreihe zunehmender Konzentration (2 x 70%, 2 x 80%, 2 x 90%, 2 x 100%; jeweils mindestens 30 min) geführt und dabei schrittweise dehydriert. Anschließend wurde 3 x 30 min in 100% Isopropanol gespült, wobei das letzte Isopropanolbad 45°C hatte. Danach wurden die Präparate für 30 min in ein auf 55°C erwärmtes Isopropanol/Paraffin-Gemisch (1:1) überführt. Die Gewebe wurde dann für 48 h in 60°C warmem Paraffin inkubiert, wobei nach 24 h die Lösung gewechselt wurde, um Isopropanol Reste vollständig zu entfernen. Nachdem das Präparat völlig mit flüssigem Paraffin durchtränkt war, wurde es schließlich in Silikon-Kautschuk-Einbettformen in 60°C warmes, geschmolzenes Paraffin eingebettet. Die Abkühlung und Härtung erfolgte über Nacht bei 4°C.

3.2.2.3 Anfertigung von Paraffinschnitten

Zur Herstellung von Paraffinschnitten wurden die eingebetteten Präparate auf einen Holzblock aufgeklebt. Mit einem Rotationsmikrotom wurden 4 µm dicke Schnitte angefertigt, die in einem 40°C warmen Wasserbad gestreckt wurden. Nach dem Aufziehen auf Polysin-Objektträger wurden die Schnitte im Wärmeschrank bei 40°C mindestens 12 h getrocknet. Für die anschließenden Färbungen wurden die Schnitte durch 2 x 20 min Einbringen in 100% Xylol und nachfolgender absteigender Alkoholreihe (jeweils 20 min Ethanol 100%, 95%, 80%, 75%, PBS-Puffer) entparaffiniert und rehydriert. Zur Epitop-Demaskierung wurden die Schnitte danach in Citratpuffer pH 6 für 15 min auf 94°C im Wasserbad erhitzt und anschließend mit PBS-Puffer 5 min lang gewaschen.

3.2.2.4 Vorbereitung der Kryopräparate

Die herausgenommenen perfundierten Organe wurden über Nacht bei 4°C in einer PBS-basierten Lösung inkubiert, welche 1% Paraformaldehyd und 17% Saccharose enthielt (Fixierlösung II). Danach wurden die Gewebe schonend in -35°C kaltem 2-Methylbutan eingefroren, da bei zu raschem Abkühlen Risse entstehen können, und anschließend bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert. Vor dem Schneiden wurden die Gewebestücke mittels Einbettung in OCT-Medium auf dem Objekthalter des Kryostaten fixiert.

3.2.2.5 Anfertigung von Kryoschnitten

Mit einem Kryostaten wurden 5 µm dicke Schnitte bei einer Kammertemperatur von -27°C angefertigt. Nach dem Aufziehen auf Polysin-Objektträger wurden die Schnitte für etwa 20 min bei RT getrocknet. Für die anschließenden Färbungen wurden die Objektträger für ca. 20 min in PBS getaucht, um das wasserlösliche OCT-Medium zu entfernen. Zur Epitop-Demaskierung wurden die Schnitte danach in 0,1% SDS-Lösung (in PBS) inkubiert und anschließend 2 x mit PBS-Puffer 5 min lang gewaschen.

3.2.2.6 Immunhistochemische Färbung

Unter Immunhistochemie versteht man den Nachweis antigener Komponenten in Zellen und Gewebeschnitten durch Antikörper (Ak), die mit Fluoreszenzfarbstoffen, Enzymen, Goldpartikeln oder Isotopen gekoppelt sind. Bei der indirekten Immunfluoreszenzmarkierung bindet zunächst der primäre, unkonjugierte Antikörper (Primär-Ak) an das Antigen im Gewebeschnitt. Anschließend werden die Schnitte mit einem zweiten, fluoreszierenden Antikörper (Sekundär-Ak), der gegen den F_c-Teil des primären Antikörpers gerichtet ist, inkubiert. Dadurch wird der Antigen-Antikörper-Komplex detektierbar, wenn eine Anregung des Fluorophors mit Licht entsprechender Wellenlänge erfolgt.

Zur Abschwächung unspezifischer Bindungen wurden sowohl Kryo- als auch Paraffinschnitte für 20 min mit einer 5% BSA-Lösung (Block-Lösung) behandelt und anschließend 5 min mit PBS-Puffer gewaschen. Sowohl Primär- als auch Sekundär-Ak wurden mit einer PBS-Lösung verdünnt, welche 0,04% Triton X-100 enthielt (Ak-Verdünnungslösung). Dieses Detergens bewirkt eine Permeabilisierung der Zellmembranen im Gewebe und erleichtert die Diffusion der Ak zu intrazellulären Zielstrukturen. Die Objektträger wurden in der Primär-Ak haltigen Lösung über Nacht bei 4°C in einer feuchten, geschlossenen Kammer inkubiert. Nachdem die Schnitte 2 x 5 min in PBS gewaschen wurden, erfolgte die Inkubation der Gewebe mit dem Sekundär-Ak für 1 h bei RT unter Lichtabschluss. Nach abschließendem Waschen (2 x 5 min in PBS, kurzes Eintauchen in Aqua dest.) wurden die Objektträger mit Fluoreszenz-freiem Glycergel eingedeckelt.

3.2.2.7 Mikroskopie

Die Schnitte wurden mit einem konfokalen Mikroskop (LSM 510, Zeiss) untersucht. Als Objektiv diente ein Plan Apochromat 63x/1.4 Öl. Das Pinhole wurde auf 1 µm optische Schnittdicke eingestellt. Die Sekundär-Antikörper wurden mit monochromatischem Licht der Wellenlängen 488 nm (AlexaFluor® 488), 543 nm (AlexaFluor® 546) und 633 nm (AlexaFluor® 647) angeregt. Das emittierte Fluoreszenzlicht wurde entsprechend mit

Bandpass-Filtern von 505 nm bis 530 nm, von 560 nm bis 615 nm und mit einem Langpass-Filter >650 nm detektiert.

3.2.3 Molekularbiologische Methoden

3.2.3.1 Isolierung von Total-RNA aus Nieren

Für die Isolierung von RNA aus den Nieren wurden Mäuse im Alter von 6-8 Wochen verwendet (n=16, Männchen: 8, Weibchen: 8). Die Mäuse wurden mit Isofluran narkotisiert und anschließend die Nieren entnommen. Die Organe wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Aufarbeitung der RNA bei -80°C gelagert. Pro Maus wurde etwa ein Viertel einer Niere für die RNA-Isolierung eingesetzt. Die Zerkleinerung des Gewebes erfolgte in flüssigem Stickstoff mit Mörser und Stößel. Die RNA-Isolierung wurde mit dem RNeasy mini kit von Qiagen nach den dazugehörigen Protokollen des Herstellers durchgeführt. Hierbei werden zuerst die Zellen des Gewebes lysiert und RNAsen denaturiert. Anschließend wird das Zelllysate mit Ethanol versetzt und durch eine auf Kieselgel basierende Säule zentrifugiert, wobei RNA an das Säulenmaterial adsorbiert. Nach Waschschritten und Verdau von begleitenden DNA-Verunreinigungen mit Hilfe einer DNase I wird die RNA in Nuklease-freiem Wasser eluiert. Bei sämtlichen Vorgängen wurden zur Vermeidung von Kontaminationen mit RNAsen Latexhandschuhe getragen und RNase-freie Einmalartikel und Geräte verwendet. Alle Vorgänge wurden auf Eis durchgeführt.

Zur Konzentrations- und Qualitätsbestimmung wurde die isolierte RNA 1:50 mit Nuklease-freiem Wasser verdünnt und photometrisch vermessen. Eine A260/A280-Ratio von 1,6-2,0 wurde als qualitativ gut beurteilt. Die weitere Lagerung der RNA erfolgte bei -80°C.

3.2.3.2 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Bei der reversen Transkription wird eine RNA-abhängige DNA-Polymerase (reverse Transkriptase) verwendet. Sie synthetisiert cDNA (complementary DNA) als DNA-Kopien eines RNA-Moleküls. Die erhaltene cDNA diente als Template für die spätere quantitative PCR. Ein Reaktionsansatz ohne reverse Transkriptase wurde als Kontrolle mitgeführt. Ausgegangen wurde von 2 µg Gesamt-RNA, welche mit Nuclease-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 26 µl verdünnt wurde. Nach Zusatz von 2 µl Random Hexamer Primer (100 µM) wurde der Ansatz für 5 min auf 70°C erhitzt und anschließend sofort auf Eis gestellt. Zu dem Reaktionsgemisch wurden zusätzlich 10 µl M-MLV Reverse Transkriptase Puffer (5x), 2,5 µl dNTP-Mix (10 mM je dNTP), 2 µl RNase Inhibitor und 7,5 µl RNase freies Wasser zugegeben. 35 µl des Reaktionsansatzes (50 µl) wurden mit 1,3

μ l M-MLV Reverse Transkriptase (100 U) versetzt (+RT Ansatz), die restlichen 15 μ l wurden als Kontrolle ohne Zugabe von reverser Transkriptase unter den gleichen Bedingungen mitgeführt (-RT Ansatz). Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei RT erfolgte die cDNA-Synthese 50 min lang bei 50°C. Um das Enzym zu inaktivieren wurde der Reaktionsansatz anschließend 15 min auf 70°C erhitzt. Die erhaltene cDNA wurde bis zur Verwendung für die quantitative PCR bei -20°C gelagert.

3.2.3.3 Quantitative Polymerasekettenreaktion (Real-time-PCR)

Bei der quantitativen Polymerasekettenreaktion wird die entstandene DNA-Menge nach jedem PCR-Zyklus photometrisch vermessen. Dies ermöglicht den exponentiellen Verlauf der Reaktion in Echtzeit (real time) zu verfolgen. Die quantitative Bestimmung des amplifizierten DNA-Produkts erfolgt indirekt über die Messung des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR® Green. Dieser bindet mit hoher Affinität an doppelsträngige DNA, wobei gebundenes SYBR® Green 1000-fach stärker fluoresziert als freies und eine Signalintensität aufweist, die proportional zur entstehenden DNA-Menge ist.

Die PCR wurde mit dem SYBR® Green PCR Kit von Qiagen an einem Light-Cycler System 2.0 (Roche) durchgeführt. Der 20 μ l - Reaktionsansatz setzte sich zusammen aus 10 μ l QuantiTect™ SYBR Green PCR Mastermix, je 1 μ l sense und antisense Primer (10 μ M), 6 μ l RNase freies H₂O und 2 μ l +RT Ansatz. Die Sequenz aller verwendeten Primer mit Angabe der verwendeten Annealing-Temperaturen wird im Materialteil gelistet. Bei der Auswahl der Primer wurde darauf geachtet, dass sie nach Möglichkeit genau auf einer Intron-Exon-Grenze lagen, was eine Amplifikation von kontaminierender genomischer DNA verhinderte. Folgendes Amplifikationsprotokoll wurde verwendet: Nach anfänglicher Aktivierung der HotStarTaq™ DNA-Polymerase für 15 min bei 95°C folgten anschließend 40 Zyklen mit 15 s Denaturierungsphase bei 95°C, 20 s Annealingphase und 20 s Elongationsphase bei 72°C.

Nach Ablauf des Amplifikationsprotokolls wurde das Schmelzverhalten der synthetisierten DNA analysiert. Dazu wurde die DNA langsam (0,1°C/s) von 60°C auf 95°C erhitzt und dabei die Fluoreszenz kontinuierlich gemessen. Anhand der Schmelzkurven und durch Analyse der PCR-Produkte auf einem 3% Agarose-Gel wurde die Spezifität der Amplifikation untersucht.

Die erhaltenen Daten wurden auf die Expression von β -Aktin normalisiert. Bei diesem sog. Housekeeping-Gen wird davon ausgegangen, dass es in gleichen Organen verschiedener Tiere in konstanter Menge exprimiert wird. Durch diese Normalisierung sollen somit Schwankungen in der Konzentration der eingesetzten cDNA-Menge ausgeglichen werden, die durch unterschiedliche Effizienzen der cDNA-Synthese entstehen können.

3.2.4 Kastration und hormonelle Behandlung von Mäusen

3.2.4.1 Kastrations-Experimente an männlichen Mäusen

Für Kastrations-Experimente wurden drei männliche TWIK1^{+/+} Mäuse im Alter von vier Wochen verwendet, ein Alter, das der Pubertät der Tiere entspricht. Unter Anästhesie mit Isofluran wurden die Hoden der Tiere nach Öffnen des Skrotums entfernt und die Wunde anschließend vernäht. 18 Tage nach der Operation wurden zwei der Mäuse 17 Tage lang einmal täglich mit 17 β -Estradiolbenzoat bei einer Dosierung von 4 μ g/g KG behandelt. Das Estrogen wurde in Sesamöl in einer Konzentration von 2 mg/ml gelöst. Von der auf Körpertemperatur vorgewärmten Lösung wurden 2 μ l/g KG subkutan unter das Nackenfell injiziert. Anschließend wurden die Mäuse, wie oben beschrieben, mit Fixierlösung I perfundiert und die Nieren für histologische Untersuchungen entnommen.

3.2.4.2 Behandlung von nicht-kastrierten Mäusen mit Geschlechtshormonen

Die Konzentration der Hormone in den Injektionslösungen wurde auf ein Injektionsvolumen von 2 μ l/g KG eingestellt, und die Lösungen vor der Injektion auf 37°C vorgewärmt. Die Applikation erfolgte einmal täglich durch subkutane Injektion unter das Nackenfell. Die Kontroll-Mäuse wurden nur mit dem entsprechenden Lösungsmittel behandelt. Nach Hormongabe wurden die Mäuse fixiert und die Nieren für histologische Untersuchungen aufbereitet.

3.2.4.2.1 Behandlung von männlichen Mäusen mit weiblichen Geschlechtshormonen

17 β -Estradiolbenzoat wurde in Sesamöl gelöst und männlichen TWIK1^{+/+} Mäusen (n=4, Kontrolle: 1) zehn Tage lang injiziert (0,5 μ g/g KG) (Park *et al.*, 2004). Prolaktin wurde in isotoner NaCl-Lösung gelöst und männlichen TWIK1^{+/+} Mäusen (n=2, Kontrolle: 2) sieben Tage lang injiziert (4 μ g/g KG) (Krishnamra and Cheeveewattana, 1994). Progesteron wurde in Sesamöl gelöst und männlichen TWIK1^{+/+} Mäusen (n=2, Kontrolle: 2) fünf Tage lang injiziert (50 μ g/g KG) (Hama *et al.*, 2006).

3.2.4.2.2 Behandlung von weiblichen Mäusen mit männlichen Geschlechtshormonen

Testosteronpropionat wurde in Sesamöl gelöst und weiblichen TWIK1^{+/+} Mäusen (n=6, Kontrolle: 3) acht Tage lang injiziert (1 μ g/g KG) (Hama *et al.*, 2006).

3.2.5 Glucoseinfusion bei TWIK1^{+/+} und TWIK1^{-/-} Mäusen

3.2.5.1 Durchführung der Glucoseinfusionsexperimente

Für alle Glucoseinfusionsexperimente wurden TWIK1^{+/+} und TWIK1^{-/-} Mäuse in Alter zwischen 7 und 13 Wochen verwendet. Die narkotisierten Tiere lagen während des gesamten Experiments auf einer 37°C warmen Wärmeplatte, um ein Auskühlen zu vermeiden. Alle Operationen wurden unter einem Stereomikroskop (Stemi, Zeiss) durchgeführt. Für die Messungen benötigtes Blut (40 µl) wurde durch Abschneiden der Schwanzspitze gewonnen und in einer mit Heparin beschichteten Hämatokrit-Kapillare gesammelt. Zur Gewinnung des Plasmas wurden die Kapillaren in einer Hämatokritzentrifuge für 5 min bei 8000 upm zentrifugiert. Nach Öffnen mit einem Glasschneider wurde das Plasma abpipettiert und für die weitere Verwendung bei -20°C gelagert. Die Gewinnung des Urins erfolgte durch Punktieren der Harnblase mit einer Insulin-Spritze mit sehr feiner Nadel. Dafür wurde zu Beginn des Experiments der untere Bereich des Abdomens geöffnet und mit einem feuchten Stück Zellstoff bedeckt, um einen Flüssigkeitsverlust des Tieres über die Wunde zu vermeiden. Nach der Abnahme wurde der Urin gewogen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Es wurde darauf geachtet, die Harnblase vollständig zu entleeren, da Resturin die Clearance-Messungen verfälscht hätte.

Alle verwendeten Katheter wurden aus PE-Schläuchen durch Erhitzen über einer Flamme ausgezogen. Die Infusionen erfolgten über die linke oder rechte Vena femoralis. Um einen konstanten Fluss zu gewähren wurde ein Perfusor eingesetzt. Alle Versuchsmäuse wurden mit steriler 12 % Glucose-Lösung in Aqua ad injectabilia bei einem Fluss von 0,5 µl/min/g KG infundiert.

Zur Einlage des venösen Katheters wurde in Narkose ein Hautschnitt auf der Innenseite des Oberschenkels durchgeführt und die V. femoralis freipräpariert. Anschließend wurde um die Vene eine Ligatur aus Seidenfaden vorgelegt, jedoch noch nicht geschlossen. Das Öffnen der V. femoralis erfolgte distal zur Ligatur durch Anschneiden mit einer Augenschere. Der Katheter wurde mit einer Pinzette eingeführt und bis über die Ligaturstelle geschoben. Durch Schließen der Ligatur wurde der Katheter fixiert und Blutungen gestoppt. Während des Experiments wurde die Wunde mit Zellstoff abgedeckt und feucht gehalten. Nach dem Experiment wurden die Mäuse durch Öffnen der Bauchorta getötet.

Die Blutzucker- und Kreatinin-Messungen in Urin und Plasma wurden am IPMC, CNRS in Frankreich an einem Hitachi 902 Gerät durchgeführt.

3.2.5.1.1 Protokoll 1

TWIK1^{+/+} (n=14) und TWIK1^{-/-} (n=14) Mäuse wurden mit Ketamin (100 µg/g KG) und Xylazin (2 µg/g KG) durch intraperitoneale Injektion anästhesiert. Bei Bedarf wurde etwa ein Fünftel der Menge nachdosiert. Vor Beginn der ersten Messperiode wurde ein Katheter für die Glucose-Infusion in die linke V. femoralis eingelegt und anschließend die Harnblase vollständig entleert. Danach folgten zwei Perioden von jeweils 30 min, in denen Glucose-Lösung infundiert wurde. Urinproben wurde am Ende jeden Intervalls gesammelt, wobei Blut nur am Ende des Experiments abgenommen wurde.

3.2.5.2.2 Protokoll 2

TWIK1^{+/+} (n=14) und TWIK1^{-/-} (n=14) Mäuse wurden vor der Operation mit 2,5-3% Isofluran (in 50% Sauerstoff und 50% Stickstoff bei 60 ml/min) narkotisiert, anschließend konnte die Isoflurankonzentration auf etwa 1,5% gesenkt werden. Zusätzlich zur Messung der Kreatinin-Clearance wurde in dieser Serie die etwas genauere Bestimmung der GFR mittels Inulin durchgeführt. Dazu wurde über die rechte V. femoralis FITC-gekoppeltes Inulin (0,5% FITC-Inulin in steriler, isotoner NaCl-Lösung) infundiert. Vor Beginn des Experiments wurde die Harnblase der Maus vollständig geleert. Nach einem initialen Bolus (2 µl/g KG, 1 min) der Inulin-FITC-Lösung folgte eine konstante Infusion der Maus mit 0,2 µl/min/g KG. Während der folgenden 30 min (Äquibrierungsphase) wurde für die Infusion der Glucose-Lösung ein Katheter in die linke V. femoralis eingeführt. Am Ende der Äquibrierungsphase wurden Urin und Blut abgenommen. Im Anschluss folgten drei Intervalle von jeweils 30 min. Während der ersten Periode (Kontrollperiode) wurde nur FITC-Inulin infundiert, in den weiteren beiden Perioden zusätzlich Glucose-Lösung. Am Ende jeder Periode wurden Blutproben genommen und die Harnblase geleert.

3.2.5.2 Auswertung der Daten

3.2.5.2.1 Berechnung der Inulin-Clearance

Die Verdünnung der Proben erfolgte mit einer gepufferten Lösung bei pH 7,0 (Verdünnungslösung für Fluoreszenzmessung), da das an Inulin gebundene FITC ein pH-Wert abhängiges Fluoreszenzverhalten aufweist. Für die fluorimetrische Messung an einem Spektrofluorimeter der Firma Shimadzu mussten der Urin im Verhältnis 1:2500 und das Plasma 1:250 verdünnt werden, wobei die unterschiedlichen Verdünnungen vor der Clearanceberechnung mathematisch korrigiert wurden. Eine Ermittlung der absoluten Konzentration mit Hilfe einer Kalibriergeraden war nicht nötig, da die angezeigten Counts proportional zur Konzentration sind und für die Berechnung nur das Verhältnis Urin/Plasma benötigt wird. Plasmawerte für eine Sammelperiode wurden aus dem

Mittelwert der Counts am Anfang und am Ende eines Intervalls gebildet, was sozusagen der durchschnittlichen Inulin-„Konzentration“ entsprach. Die Inulin-Clearance wurde dann nach folgender Formel berechnet:

$$\dot{V}_{\text{Urin}} = \frac{\text{Urinvolumen pro Sammelperiode}[\mu\text{l}]}{\text{Dauer der Sammelperiode}[\text{min}]}$$

$$Cl_{\text{Inulin}} = \dot{V}_{\text{Urin}} \times \frac{\text{Counts}_{\text{Urin}}}{\text{Counts}_{\text{Plasma}}} \approx \text{GFR}[\mu\text{l} / \text{min}]$$

Die erhaltene Inulin-Clearance ist ein gutes Maß für die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) und wurde zur besseren Vergleichbarkeit der Tiere auf das Gewicht der Maus bezogen ($\mu\text{l}/\text{min}/\text{g KG}$).

3.2.5.2.2 Berechnung der Kreatinin-Clearance

Die Messung der Kreatinin-Clearance ist vergleichsweise einfacher. Da Kreatinin ein körpereigener Stoff ist, entfällt hier die Infusion mit einer Indikatorsubstanz wie bei der Bestimmung der Inulin-Clearance. Die Kreatinin-Konzentration im Plasma kann für die Dauer des Experiments als konstant vorausgesetzt werden, und somit ist eine einmalige Blutabnahme am Ende der Messung ausreichend. Zwar ist diese Methode etwas ungenauer, die Maus wird jedoch durch die entfallenden wiederholten Abnahmen von Blut nicht zusätzlich belastet. Die Kreatinin-Clearance wurde nach folgender Formel berechnet:

$$Cl_{\text{Kreatinin}} = \dot{V}_{\text{Urin}} \times \frac{[\text{Kreatinin}]_{\text{Urin}}}{[\text{Kreatinin}]_{\text{Plasma}}} \approx \text{GFR}[\mu\text{l} / \text{min}]$$

Auch hier wurde die GFR auf das Gewicht der Maus bezogen ($\mu\text{l}/\text{min}/\text{g KG}$).

3.2.5.2.3 Berechnung der fraktionellen Glucoseausscheidung

Die fraktionelle Ausscheidung („Fraction of excretion“, Fe) gibt an, wie viel Prozent einer glomerulär filtrierte Substanz in den Endurin gelangt. Bei einer fraktionellen Ausscheidung von <100% wird die Substanz während der Nephronpassage netto rückresorbiert. Bei Werten um 100% (z.B. Inulin, Kreatinin) wird die Substanz netto weder rückresorbiert noch sezerniert. Fraktionelle Ausscheidungen >100% (z.B. Paraaminohippursäure) deuten darauf hin, dass die Substanz zusätzlich zur Filtration von den Tubuluszellen des Nephrons aktiv in den Urin sezerniert wird. Die Berechnung der fraktionellen Glucoseausscheidung Fe_{Gluc} wurde für Protokoll 1 nach folgender Formel berechnet:

$$Fe_{\text{Gluc}} = \frac{[\text{Glucose}]_{\text{Urin}} \times [\text{Kreatinin}]_{\text{Plasma}}}{[\text{Glucose}]_{\text{Plasma}} \times [\text{Kreatinin}]_{\text{Urin}}} \times 100$$

Wegen der einmaligen Blutabnahme am Ende des Experiments konnte die Fe_{Gluc} nur für die letzte Sammelperiode berechnet werden.

Für die Berechnung von Fe_{Gluc} nach Protokoll 2 wurde anstelle der Kreatinin-Konzentration die Counts für Inulin in Plasma und Urin eingesetzt:

$$Fe_{Gluc} = \frac{[Glucose]_{Urin} \times Counts_{Plasma}}{[Glucose]_{Plasma} \times Counts_{Urin}} \times 100$$

3.2.6 Semi-Quantifizierung der TWIK1-Lokalisation

Ziel dieses Experiment war eine Quantifizierung der immunhistochemischen Färbung von TWIK1 entlang des proximalen Tubulus in Abhängigkeit vom Geschlecht der untersuchten Mäuse. Dabei wurde eine axiale Einteilung des Tubulussegments in S1 (frühproximaler Tubulus) und S2-3 (spätproximaler Tubulus) vorgenommen. Bei der subzellulären Lokalisation in diesen Nephronabschnitten wurde zwischen einem intrazellulären subapikalen Kompartiment und der Lokalisation in den Mikrovilli des Bürstensaums (brush border, BB) unterschieden.

Für die Analyse der Geschlechtsabhängigkeit der TWIK1-Verteilung wurden 5 µm dicke Kryoschnitte der Nieren von männlichen (n=14) und weiblichen (n=19) TWIK1^{+/+} Mäusen angefertigt. Bei der nachfolgenden Färbung von TWIK1 wurde als primärer Antikörper ein affinitätsgereinigter polyklonaler anti-TWIK1 Antikörper aus dem Kaninchen (Lesage *et al.*, 1996b; Decressac *et al.*, 2004) und als Sekundär-Ak Alexa Fluor® 488 donkey anti-rabbit verwendet. Die Auswertung erfolgte an einem Fluoreszenz-Mikroskop von Zeiss bei einer 40x Vergrößerung. Das Experiment wurde als randomisierter Blindversuch durchgeführt. Dabei wurden die Schnitte zufällig ausgewählt und von einer Person ohne Kenntnis der Identität des Schnittes analysiert. Die Semi-Quantifizierung erfolgte durch Einschätzen der Fluoreszenzintensität in jedem der vier untersuchten Gebiete. Werte auf einer Skala von 0 (keine sichtbare Fluoreszenz) bis 4 (maximale in diesem Gebiet beobachtete Fluoreszenz) wurden vergeben.

3.2.7 Untersuchung von Endozytosewegen im proximalen Tubulus

In diesem Experiment sollte eine mögliche Beteiligung von TWIK1 an Endozytosevorgängen im proximalen Tubulus der Maus durch immunhistochemische Methoden untersucht werden. Zwei Arten der Endozytose wurden untersucht, die „fluid phase“-Endozytose (Flüssigphasen-Endozytose) und die rezeptorvermittelte Endozytose.

3.2.7.1 „Fluid phase“-Endozytose (Pinozytose)

In der extrazellulären Flüssigkeit gelöste Stoffe gelangen bei dieser Art der Endozytose durch kleine Vesikel in die Zelle, welche sich von der Plasmamembran nach innen abknospen. Als Marker wurde FITC-gekoppeltes Dextran verwendet, welches über diesen Weg in die proximale Tubuluszelle aufgenommen wird und die Pinozytose-Vesikel anfärbt (Shurety *et al.*, 1998). TWIK1^{+/+} (n=3) und TWIK1^{-/-} (n=3) Mäusen wurde dazu 0,5 ml einer Dextran-FITC-Lösung (1%) während 5 min über die linke V. femoralis infundiert (zur genaueren Beschreibung der Methode siehe: 3.2.5.1). Die Anästhesie erfolgte mit Isofluran. Nach einer Wartezeit von 10 min wurden die Mäuse retrograd über die Aorta mit Fixierlösung I perfundiert. Die Nieren wurden entnommen und für die weitere Verarbeitung zu Kryoschnitten eingefroren.

3.2.7.2 Rezeptorvermittelte Endozytose

Bei der rezeptorvermittelten Endozytose im proximalen Tubulus der Niere binden filtrierte Substanzen an Rezeptoren (Cubilin, Megalin) der luminalen Membran. Anschließend lagern sich diese Rezeptoren in sog. „Clathrin-coated pits“ an der Basis der Mikrovilli zusammen und werden dann durch Abschnüren in die Zelle aufgenommen. Diese Art der Endozytose ist Liganden-spezifisch. Typische Liganden von Cubilin sind z.B. filtriertes Albumin, Transferrin, Hämoglobin oder Vit. D binding protein (Zhai *et al.*, 2000; Verroust *et al.*, 2002).

Zur Untersuchung der rezeptorvermittelten Endozytose wurden 5 µm dicke Nieren-Kryoschnitte von den mit Dextran-FITC perfundierten Mäusen angefertigt und mit anti-TWIK1 und anti-Cubilin Antikörpern gefärbt. Als Sekundär-Ak wurden AlexaFluor® 647 donkey anti-rabbit (TWIK1) und AlexaFluor® 546 donkey anti-goat (Cubilin) verwendet. Die mit Dextran-FITC gefärbten „fluid phase“-Endozytosevesikel wurden zum Vergleich bei einer Wellenlänge von 488 nm detektiert. Die Auswertung erfolgte an einem konfokalen Mikroskop von Zeiss (LSM 510) mit einem Plan-Apochromat 63x/1,4 Öl Objektiv.

3.2.8 Messung der Aminosäureausscheidung im Urin

Spontanurin von TWIK1^{+/+} (n=43) und TWIK1^{-/-} (n=42) Mäusen wurde gesammelt und die Konzentration folgender Aminosäuren bestimmt: L-Alanin, Glycin, L-Valin, L-Leucin, L-Isoleucin, L-Prolin, L-Asparagin, L-Asparaginsäure, L-Methionin, L-Glutaminsäure, L-Phenylalanin, L-Ornithin, L-Lysin, L-Histidin, L-Tyrosin, L-Threonin, L-Glutamin und L-Tryptophan.

Die Messungen wurden vom Institut für Funktionelle Genomik im Biopark Regensburg nach dem Verfahren der Gaschromatographie mit anschließender Massenspektrometrie (GC-MS) durchgeführt. Dabei dient der Gas-Chromatograph zur Auftrennung des zu untersuchenden Stoffgemisches und das Massenspektrometer zur Identifizierung und gegebenenfalls auch Quantifizierung der einzelnen Komponenten. Für die Analysen wurden 20 µl Mausurin eingesetzt. Nach Derivatisierung der Aminosäuren erfolgte die Messung nach einem modifizierten Protokoll des Faast kit von Phenomenex (Phenomenex Inc, Torrence, CA, USA). Die Konzentrationen wurden anhand des internen Standards Norvalin ermittelt.

Um Schwankungen in der Konzentration des Urins auszugleichen, wurden die Aminosäurekonzentrationen im Urin ($[AS_{\text{Urin}}]$) auf die jeweiligen Kreatininkonzentrationen im Urin ($[Kera_{\text{Urin}}]$) normalisiert ($[AS_{\text{Urin}}]/[Kera_{\text{Urin}}]$). Da die Konzentration von Kreatinin im Plasma praktisch konstant ist und die Substanz weder tubulär resorbiert noch relevant sezerniert wird, kann $[Krea_{\text{Urin}}]$ als Maß für die Konzentrierung des Urins herangezogen werden. $[Kera_{\text{Urin}}]$ wurde mit Hilfe der Jaffé-Methode gemessen. Hierbei bildet Kreatinin in alkalischer Lösung mit Pikrat einen gelb-roten Komplex, dessen Farbe photometrisch bestimmt wird. Die Messung erfolgte auf einer Mikrotiterplatte mit einem Mikrotiterplatten-Photometer von Tecan. Pro Maus wurden jeweils 4,8 µl Urin eingesetzt. Die absolute Konzentration wurde anhand einer Kalibriergerade mit Kreatininlösungen bekannter Konzentration ermittelt.

3.2.9 Primärkultur von isolierten Inselzellen des Pankreas

3.2.9.1 Präparation des Pankreas

Mit Isofluran anästhesierte TWIK1^{+/+} und TWIK1^{-/-} Mäuse wurden retrograd über die Bauchorta mit 10 ml einer heparinisierten (10 I.E./ml) isotonen Kochsalzlösung von Blut befreit. Im Anschluss erfolgte die Perfusion mit 15 ml Verdau-Lösung I (enthält 0,33 mg/ml Collagenase Typ IV und 0,067 mg/ml Protease). Das Pankreas wurde entfernt und mit einer Schere in kleine Stücke geschnitten. Darauf folgte eine Inkubation von 4-5 min in 1 ml Verdau-Lösung II (enthält 0,5 mg/ml Collagenase) bei 37°C. Das nun optisch weitgehend zerfallene Pankreas wurde durch Zentrifugation (500 upm, 2 min) pelletiert, der Überstand abpipettiert und in 1 ml Insel-Zellmedium resuspendiert. Dieser Schritt wurde noch einmal wiederholt, um die Präparation vollständig von Collagenase zu befreien. Durch Auf- und Abpipettieren in einer 1000 ml Pipette wurde das Gewebe weiter zerkleinert bis das exokrine Pankreas überwiegend in kleine Zellhaufen zerfallen war.

3.2.9.2 Sammeln von Langerhans Inseln

Unter diesen Bedingungen blieben die Zellen der Langerhans Inseln weitgehend im Verbund und konnten mikroskopisch als runde bis ovale Zellhaufen identifiziert werden. Die Inseln wurden unter einem Stereo-Mikroskop gesammelt, wobei die Zellen während dieser Zeit auf 4°C gekühlt wurden. Die Inseln wurden mit einer 10 µl Pipette in 1 ml Insel-Zellmedium überführt. Pro Pankreas wurden ca. 30-40 Langerhans Inseln gesammelt. Nach dem Sammeln wurden die Inseln durch Zentrifugieren (500 upm, 2 min) vom Medium befreit und in 60 µl Trypsin-EDTA-Lösung für 15 min bei 37°C inkubiert. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren in einer 10 µl Pipette konnten schließlich die Inseln weitgehend zu Einzelzellen und kleinen Zellhaufen aufgelöst werden.

3.2.9.3 Kultivierung der isolierten Inselzellen

Die Zellsuspension wurde auf vier vorgewärmte Petrischalen mit Insel-Zellmedium verteilt und auf Glasplättchen ausgesät. Die Zellen wurden über Nacht im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂-Atmosphäre inkubiert. Am folgenden Tag waren der größte Teil der Insel-Zellen an den Glasplättchen adhärent geworden und konnten nun für Patch-Clamp Experimente oder Ca²⁺-Messungen eingesetzt werden.

Um das Kontaminationsrisiko mit Bakterien und Pilzen so gering wie möglich zu halten, wurden bei allen Arbeiten Latex-Handschuhe getragen und die Arbeitsfläche desinfiziert. Alle Lösungen wurden unter sterilen Bedingungen hergestellt und die nötigen Arbeitsgeräte vor dem Gebrauch autoklaviert.

3.2.10 Patch-Clamp Experimente an isolierten Inselzellen

Mit Hilfe der Patch-Clamp Technik können elektrische Vorgänge an Zellen gemessen werden, welche überwiegend aus der Aktivität von Ionenkanälen resultieren. Im Whole-Cell-Modus wird die Patchpipette auf die Zelle aufgesetzt und anschließend durch Anlegen eines Unterdrucks die Zellmembran unter der Pipettenöffnung eingerissen. Dadurch entsteht über die Pipette ein elektrischer Zugang zum Zellinneren, was das Klemmen der Zellmembran auf verschiedene elektrische Potentiale ermöglicht. Die Messung des dabei über die Zellmembran fließenden Stroms ermöglicht Rückschlüsse auf das Vorhandensein bestimmter Ionenkanäle und deren Aktivität. Im „Slow-Whole-Cell-Modus“ wird die Membran nicht eingerissen, sondern durch Substanzen (z.B. Nystatin) in der Pipettenlösung permeabilisiert. Dies hat den Nachteil, dass durch den hohen Widerstand zum Zellinneren ein Ableiten von Stromänderungen nicht oder nur eingeschränkt möglich ist. Der Vorteil liegt aber darin, dass zytosolische Substanzen (z.B.

ATP, Glucose) nicht aus der Zelle in die Pipette diffundieren können, da die gebildeten Poren für deren Durchtritt zu klein sind.

Alle Experimente wurden an Einzelzellen oder kleinen Zellhaufen primärkultivierter Inselzellen 10-24 h nach dem Aussähen gemacht. Als Verstärker kam ein EPC-7-ähnliches Gerät zum Einsatz. Alle Arbeiten wurden bei 37°C Badtemperatur durchgeführt, wobei zulaufende Lösungen vorgewärmt wurden. Als Kontroll-Lösung diente eine Ringer ähnliche Lösung mit 5 mM Glucose (Kontroll-Lösung). Das Bad wurde permanent gespült, um eine Zellschädigung durch austretendes K^+ aus der Referenzelektrode („fließende KCl-Elektrode“) zu vermeiden. Die verwendeten Patchpipetten wurden aus Glaskapillaren auf einen Widerstand von etwa 10 M Ω ausgezogen.

3.2.10.1 Patch-Clamp Messungen im Whole-Cell-Modus

Während der Whole-Cell-Experimente wurde darauf geachtet, dass der serielle Widerstand (R_S) Werte größer als 200 M Ω nicht überstieg. Konnte dieser durch erneuten vorsichtigen Unterdruck nicht erniedrigt werden, so wurde das Experiment abgebrochen. Auf eine Kompensation von R_S wurde verzichtet. Isolierte Inselzellen von TWIK1^{+/+} und TWIK1^{-/-} Mäusen wurden für jeweils zwei Sekunden in 20 mV Schritten von -95 mV bis +25 mV im Voltage-Clamp-Modus (VC) geklemmt. Im Anschluss folgte ein weiterer Klemmschritt für 5 sec auf -55 mV. Vermessen wurden Einzelzellen oder kleine Zellhaufen. Pro Pankreas-Präparation wurden mehrere Experimente gemacht (n=12 für Zellen von TWIK1^{+/+} Mäusen und n=12 für Zellen von TWIK1^{-/-} Mäusen). Die dabei auftretenden Ströme wurden auf die Zellkapazität normalisiert (pA/pF), welche als Maß für die Zelloberfläche diente. Da der Strom eine leicht inaktivierende Charakteristik zeigte, wurde bei den IV-Diagrammen zwischen $I_{initial}$ (Ströme zu Beginn eines jeden Klemmschrittes) und I_{final} (Ströme am Ende eines Klemmschrittes) unterschieden. Der mittlere Strom während eines Klemmschrittes wurde nicht berücksichtigt. Zwischen jeder Spannungstreppe wurde für 16 s in den Current-Clamp-Modus (CC) gewechselt. Bei dem von uns verwendeten CC-zero-Modus (CC-zero) fließt hierbei kein Strom mehr über die Zellmembran, die aufgezeichnete Spannung entspricht also dem momentanen Gleichgewichtspotential der Zelle. Nach erfolgreichem Einreißen der Zellmembran wurde gewartet, bis die gemessenen Ströme unter Kontrollbedingungen ein konstantes Niveau erreichten. Anschließend wurden die Zellen mit einer Tolbutamid-haltigen Lösung (100 μ M) superfundiert. Dieser Arzneistoff aus der Gruppe der Sulfonylharnstoffe hemmt den K_{ATP} -Kanal Kir6.2, welcher besonders reichlich in β -Zellen des Pankreas exprimiert wird, und führt dadurch zu einer Depolarisation der Zellmembran. Nachdem auch hier gewartet wurde, bis Strom und Membranpotential konstant blieben, wurde im Anschluss wieder Kontroll-Lösung zugegeben, um die Reversibilität der Wirkung zu prüfen.

3.2.10.2 Patch-Clamp Messungen im „Slow-Whole-Cell-Modus“

Messungen des Membranpotentials unter Hoch-Glucose wurden im „Slow-Whole-Cell-Modus“ vorgenommen. Dazu wurde der Pipettenlösung 100 mg/l Nystatin zugesetzt. Im Whole-Cell-Modus tritt normalerweise das Phänomen der Dialyse auf: Da Zytosol und Pipette direkt verbunden sind, findet eine Diffusion vor allem von kleinen, beweglichen Molekülen statt. Der intrazelluläre ATP-Gehalt der β -Zelle würde sich somit, besonders bei langen Experimenten, dem ATP-Gehalt der Pipettenlösung anpassen. Der Kaliumkanal Kir6.2, welcher die Kaliumleitfähigkeit in β -Zellen dominiert, wird durch ATP reguliert. Ein Klemmen des zytosolischen ATPs auf Konzentrationen der Pipettenlösung würde somit zu einer verfälschten Messung des Membranpotentials führen.

Gepatcht wurden Einzelzellen oder kleine Zellhaufen. Pro Pankreas-Präparation wurden mehrere Experimente gemacht (n=15 für Zellen von TWIK1^{+/+} Mäusen und n=16 für Zellen von TWIK1^{-/-} Mäusen). Nach Aufsetzen der Patchpipette auf die Zelle wurde gewartet, bis sich ein stabiles Membranpotential eingestellt hatte. Anschließend wurden die Zellen mit einer Hoch-Glucose Lösung (10 mM, Glucose-10-Lösung) behandelt. Nach Stabilisierung des Potentials wurde wieder Kontroll-Lösung zugegeben.

3.2.11 Ca²⁺-Messungen an isolierten Inselzellen mit Fura-2

Fura-2 ist ein selektiver Ca²⁺-Chelator, mit dessen Hilfe absolute oder relative Änderungen der intrazellulären freien Ca²⁺-Konzentration gemessen werden können. Die Substanz diffundiert als unpolare Ester in die Zelle und wird dort durch unspezifische Esterasen zur polaren Säure gespalten, welche nur langsam die Zelle verlassen kann. Das Prinzip der Messung beruht darauf, dass Fura-2 in Abhängigkeit von gebundenem Ca²⁺ seine Fluoreszenz-Eigenschaften ändert. Im Komplex mit Ca²⁺ zeigt Fura-2 ein Anregungsmaximum bei 340 nm, in Abwesenheit von Ca²⁺ liegt es bei 380 nm. Beladene Zellen werden kurz hintereinander mit UV-Licht der Wellenlängen 340 nm und 380 nm belichtet und das emittierte Licht jeweils bei 510 nm detektiert. Das Verhältnis der Fluoreszenz-Intensitäten des emittierten Lichts (Ratio 340/380) ist (weitgehend) unabhängig von Farbstoffkonzentration und Zellform und ist somit ein relatives Maß für die Menge an freiem Ca²⁺ in der Zelle. Durch Erstellen einer Kalibriergeraden mit Lösungen bekannter Ca²⁺-Konzentration (nach Permeabilisieren der Zellen) kann dieser relative Wert in eine absolute Konzentration umgerechnet werden.

3.2.11.1 Durchführung der Messung

Bei unseren Messungen wurde auf die Bestimmung der absoluten zytosolischen Ca²⁺-Konzentration verzichtet und stattdessen nur die relative Änderung im Verlauf des

Experiments verfolgt. Die Messungen erfolgten an einem Filtrerrad-basierten Imaging System an einem inversen Mikroskop (Zeiss Axiovert 200, 40x Fluar Objektiv). Als Farbstoff diente Fura-2 AM von Molecular Probes (Excitation bei 340 nm und 380 nm, Emission zwischen 490 nm und 530 nm). Um das schwerlösliche Fura-2 AM in der wässrigen Kontroll-Lösung zu lösen, wurde der Lösungsvermittler DMSO verwendet, und zur besseren Aufnahme in die Zellen wurde das Detergens Pluronic F-127 hinzu gegeben. Anschließend wurde der Ansatz für 10 min in ein Ultraschallbad gestellt. Primärkultivierte Inselzellen von TWIK1^{+/+} und TWIK1^{-/-} Mäusen wurden vor der Messung für 30 min mit 50 µl der Fura-2-Lösung (50 µM, siehe Material) bei 37°C beladen. Vermessen wurden Einzelzellen oder kleine Zellhaufen. Pro Pankreas-Präparation wurden mehrere Experimente gemacht (n=15 für Zellen von TWIK1^{+/+} Mäusen und n=12 für Zellen von TWIK1^{-/-} Mäusen). Während der Experimente wurde auf eine konstante Badtemperatur von 37°C geachtet, zugeführte Lösungen wurden vorgewärmt. Das Bad wurde permanent bei konstantem Fluss gespült. Nach Auswaschen von nicht aufgenommenem Fura-2-AM wurde gewartet, bis sich ein stabiler Wert für die Ratio 340/380 einstellte. Es folgte eine Periode von etwa 10 min mit Kontroll-Lösung (Glucose 5 mM). Danach wurde die Glucose-Konzentration im Bad für 10 min auf 10 mM angehoben (Glucose-10-Lösung) und anschließend wieder für 15 min auf Kontroll-Niveau abgesenkt. Dieser Zyklus wurde noch einmal mit einer 20 mM Glucose-Lösung (Glucose-20-Lösung) wiederholt. Während des gesamten Experiments wurde alle 5 s eine Fluoreszenz-Messung auf beiden Wellenlängen durchgeführt.

3.2.11.2 Auswertung der Daten

Die Ratio 340/380 wurde von der verwendeten Software Metafluor berechnet. Der erhaltene Zeitverlauf wurde mit der Software Origin analysiert, mit welcher die Integrale der einzelnen Perioden berechnet wurden. Division der Integrale durch die Länge der einzelnen Perioden ergab die mittlere Ratio 340/380, welche als Maß für die Ca²⁺-Aktivität während eines Intervalls diente.

3.2.12 Mikroskopische Vermessung von Langerhans Inseln

In diesem Experiment wurde die Fläche der Langerhans Inseln von TWIK1^{+/+} (n=4) und TWIK1^{-/-} (n=4) Mäusen als ungefähres Maß für deren Größe untersucht. Die Größe der Schnittfläche einer Insel ist sowohl von der Größe der Insel, als auch von der Schnittführung abhängig. Es ist jedoch davon auszugehen, dass bei Analyse einer ausreichenden Anzahl von Inseln und Schnitten bei Tieren mit größeren Inseln statistisch mehr Anschnitte mit großer Fläche angetroffen werden. Zusätzlich wurde der prozentuale

Anteil an Glucagon-produzierenden α -Zellen und den Somatostatin-produzierenden δ -Zellen ermittelt. Hierzu wurden 4 μm dicke Paraffinschnitte der fixierten Organe angefertigt. Die Inseln von jeweils drei Schnitten eines Pankreas wurden ausgewertet. Für die Bestimmung der Gesamtfläche einer Insel wurde ein Durchlichtbild angefertigt. Zur Berechnung des prozentualen Anteils an α -Zellen und δ -Zellen wurden die Schnitte zusätzlich mit anti-Glucagon und anti-Somatostatin Antikörpern gefärbt. Als Sekundär-Ak wurden AlexaFluor® 546 donkey anti-goat und Cy5 donkey anti-mouse verwendet. Die Bilder für die Auswertung wurden an einem konfokalen Mikroskop (LSM 510, Zeiss) in 8-Bit Farbtiefe gemacht, wobei ein C-Apochomat 40x/1,2 Wasser Objektiv verwendet wurde. Das Pinhole wurde auf 1 μm optische Schnittdicke eingestellt. Jeder Schnitt wurde sequentiell abgerastert, um möglichst alle Inseln zu erfassen. Die Auswertung erfolgte mit der kostenlosen Software ImageJ V1.37c mit LSM-Toolbox Plugin. Die Gesamtfläche der Insel wurde anhand des Durchlichtbildes ermittelt. Da das Programm die verwendete Vergrößerung automatisch auslesen kann, musste hier lediglich eine ROI per Hand um die Insel gezeichnet werden, welche sich optisch gut vom exokrinen Gewebe abhebt. Die Software berechnete daraufhin automatisch die Größe in μm^2 . Für die Bestimmung der Gesamtfläche an α -Zellen und δ -Zellen wurden die jeweiligen Fluoreszenzbilder ausgewertet. Dazu wurde ein Schwellenwert gesetzt, bei dem nur spezifische Signale erfasst wurden (50-255 Counts). Die so ermittelten Flächen wurden von der Software in μm^2 umgerechnet oder als prozentualer Anteil der Gesamt-Inselfläche (ROI) ausgegeben. Flächen kleiner 2 μm^2 wurden nicht in der Auswertung berücksichtigt, da diese meist auf unspezifische positive Pixel zurückzuführen waren.

3.2.13 Intraperitonealer Glucosetoleranztest

Das folgende Experiment wurde am IPMC, CNRS, Valbonne Sophia Antipolis und Université de Nice Sophia Antipolis in Frankreich unter der Leitung von Dr. J. Barhanin durchgeführt. Als Versuchstiere für den Glucosetoleranztest wurden TWIK1^{+/+} (n=6) und TWIK1^{-/-} (n=6) Mäusen verwendet, welche zuvor 24 h ohne Futter waren. Zu Beginn des Experiments (t=0 min) wurde den Mäusen durch Abtrennen der äußersten Schwanzspitze venöses Blut abgenommen. Danach folgte die intraperitoneale Injektion einer Glucoselösung (2 mg/g KG). Weiterhin wurde bei den Versuchstieren 25 min, 50 min und 75 min nach Applikation Blut entnommen. In dem gewonnenen Plasma wurde die Glucosekonzentration bestimmt. Für die Zeitpunkte t=0 min und t=25 min wurde zusätzlich die Insulinkonzentration gemessen.

3.2.14 Stimulation der Insulinsekretion durch Fructose Diät

Das folgende Experiment wurde am IPMC, CNRS, Valbonne Sophia Antipolis und Université de Nice Sophia Antipolis in Frankreich unter der Leitung von Dr. J. Barhanin durchgeführt. TWIK1^{+/+} (n=10) und TWIK1^{-/-} Mäuse (n=10) wurden 24 Tage lang mit Fructose (10%) im Trinkwasser behandelt. Zu Beginn des Experiments wurden den Mäusen durch Abtrennen der äußersten Schwanzspitze Blut entnommen (Kontrolle), weiterhin nach 11 und 24 Tagen. In dem gewonnenen Plasma wurde die Glucosekonzentration bestimmt. Nach 24 Tagen wurde zusätzlich die Konzentration an Insulin und C-Peptid im Plasma gemessen.

3.2.15 Glucose-Wirkung an isolierten Inseln

Das folgende Experiment wurde am IPMC, CNRS, Valbonne Sophia Antipolis und Université de Nice Sophia Antipolis in Frankreich unter der Leitung von Dr. J. Barhanin durchgeführt. Die Langerhans Inseln wurden isoliert wie unter 3.2.9.1 beschrieben. Anschließend wurden ca. 60 Inseln in die Mitte einer „mini Quick Spin Column“ (Roche) gegeben und vorsichtig mit 300 µl Kontroll-Lösung (mit 2,8 mM Glucose) überschichtet, welche aufgeschwemmtes Sephadex G50 (Amersham Biosciences) enthielt. Durch die Überschichtung mit dieser Lösung wurden die Langerhans Inseln in die Matrix aus Sephadex gewissermaßen eingebettet und dadurch mechanisch stabilisiert. Außerdem wurde durch dieses Verfahren gewährleistet, dass die Inseln in Phasen des Lösungswechsels mechanisch stabilisiert blieben und nicht austrocknen konnten. Über einen Polyethylenkatheter, der am Oberrand der Sephadex-Matrix endete, wurde 37°C warme Lösung mit einer Flussrate von 0,5 ml/min zugeführt. Die Flüssigkeit, welche durch die Quick Spin Column mit den Langerhans Inseln geflossen war, wurde gesammelt und der Insulinbestimmung zugeführt. Zur Testung der Glucosewirkung wurde die Glucosekonzentration in der Lösung von 2,8 auf 10 und dann auf 16,7 mM erhöht. Zur Normalisierung wurden am Ende der Experimente die Langerhans Inseln lysiert und der Insulinrestgehalt der Inseln bestimmt.

3.2.16 Statistik

Sämtliche Ergebnisse wurden als Mittelwerte inklusive Standardabweichung des Mittelwerts (SEM) dargestellt. Signifikanzberechnungen zwischen den einzelnen Gruppen wurden mit Hilfe des Student's unpaired t-test durchgeführt. Ein p-Wert von <0,05 wurde als statistisch signifikant betrachtet und in den jeweiligen Graphen mit einem Stern (*)

gekennzeichnet. Bei multipler Testung wurde die Korrektur nach Bonferroni angewandt, um eine Alphafehler-Kumulierung zu vermeiden.

4. Ergebnisse

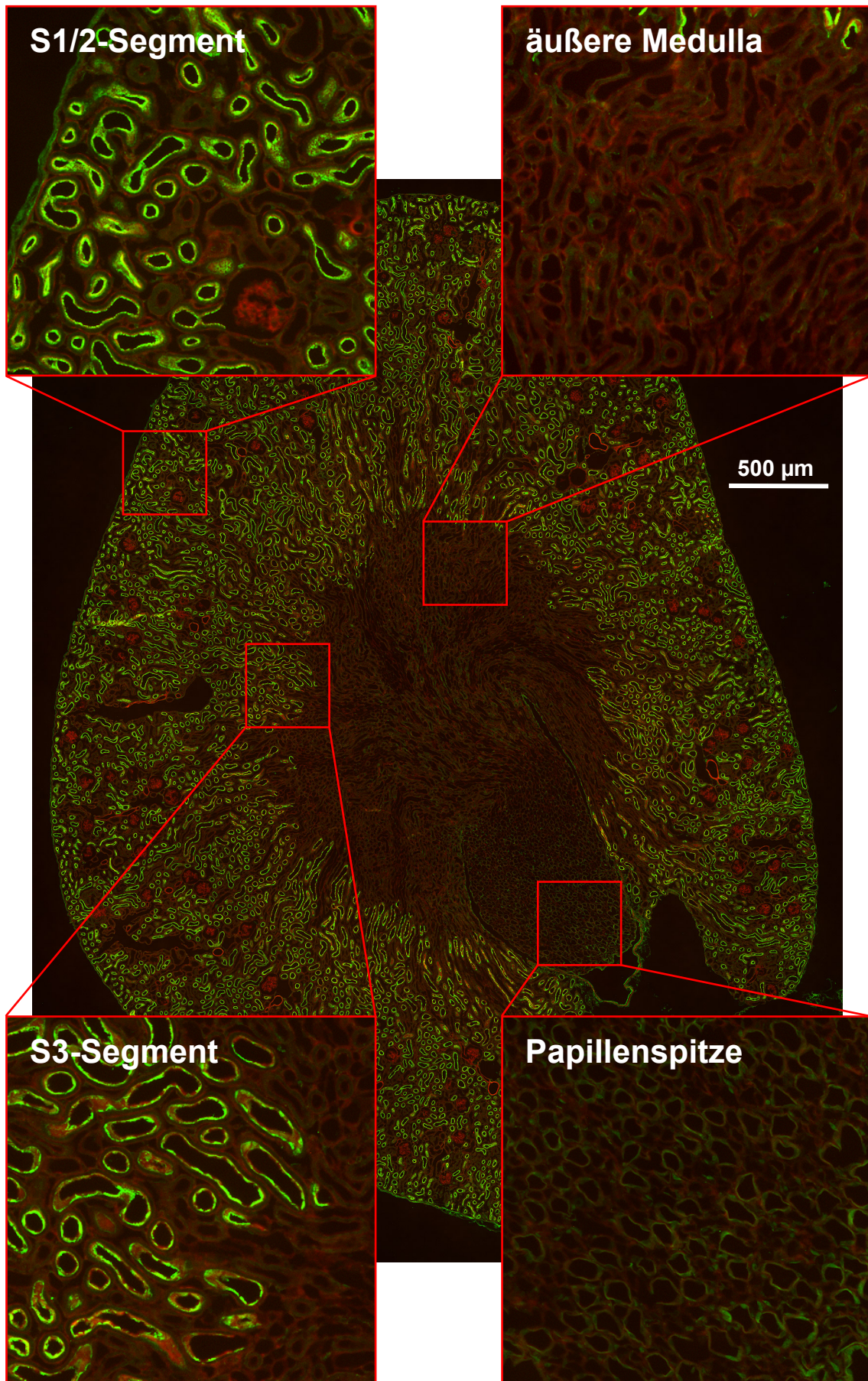
4.1 TWIK1 in der Mausniere

4.1.1 Lokalisation von TWIK1 in der Niere

Das erste Ziel dieser Arbeit bestand in einer Überprüfung der bisher veröffentlichten Lokalisation von TWIK1 in der Niere der Maus (Nie *et al.*, 2005). Zu diesem Zweck wurden Kryoschnitte von TWIK1^{+/+} Mäusen angefertigt und mit einem anti-TWIK1 Ak angefärbt, welcher gegen den intrazellulären Carboxy-Terminus von humanem oder murinem TWIK1-Protein gerichtet ist (Lesage *et al.*, 1996b; Cluzeaud *et al.*, 1998). Wie in der Übersichtsaufnahme (Abb. 7A) der Niere zu sehen ist, konzentrierte sich der stärkste Teil der Färbung auf die proximalen Tubuli nahe dem Mark. Dieser Teil des spätproximalen Tubulus, auch S3-Segment genannt, beinhaltet die gesamte Pars recta. In der Vergrößerung (Abb. 9B) kann man erkennen, dass TWIK1 hier entlang der Mikrovilli des Bürstensaums lokalisiert ist. Weiterhin konnte eine, wenn auch etwas schwächere Färbung, im frühproximalen Tubulus (S1-Segment) nahe der Nierenkapsel gefunden werden. Die subzelluläre Lokalisation beschränkte sich hier auf die Spitzen der Mikrovilli und auf einen intrazellulären Bereich unterhalb des Bürstensaums (subapikales Kompartiment) (Abb. 9A). Im Markbereich (Medulla) und in der Papille war nur ein sehr schwaches Signal vorhanden, welches kaum stärker als die Hintergrundfärbung war.

Dieses Verteilungsmuster zeichnete sich aber nur bei etwa der Hälfte der untersuchten Mäuse ab. Bei der anderen Hälfte fehlte die starke Färbung im Bürstensaum des S3-Segmentes (Abb. 7B). Das schwache Signal beschränkte sich hier nur auf das subapikale Kompartiment, welches sich als dünner Ring unterhalb des Bürstensaums abzeichnete (Abb. 9C) und war auch nur bei einem Teil der spätproximalen Tubuli sichtbar. Die Färbung in anderen Gebieten (S1/2-Segment, Mark, Papille) zeigte hingegen keine relevanten Unterschiede.

A:



B:

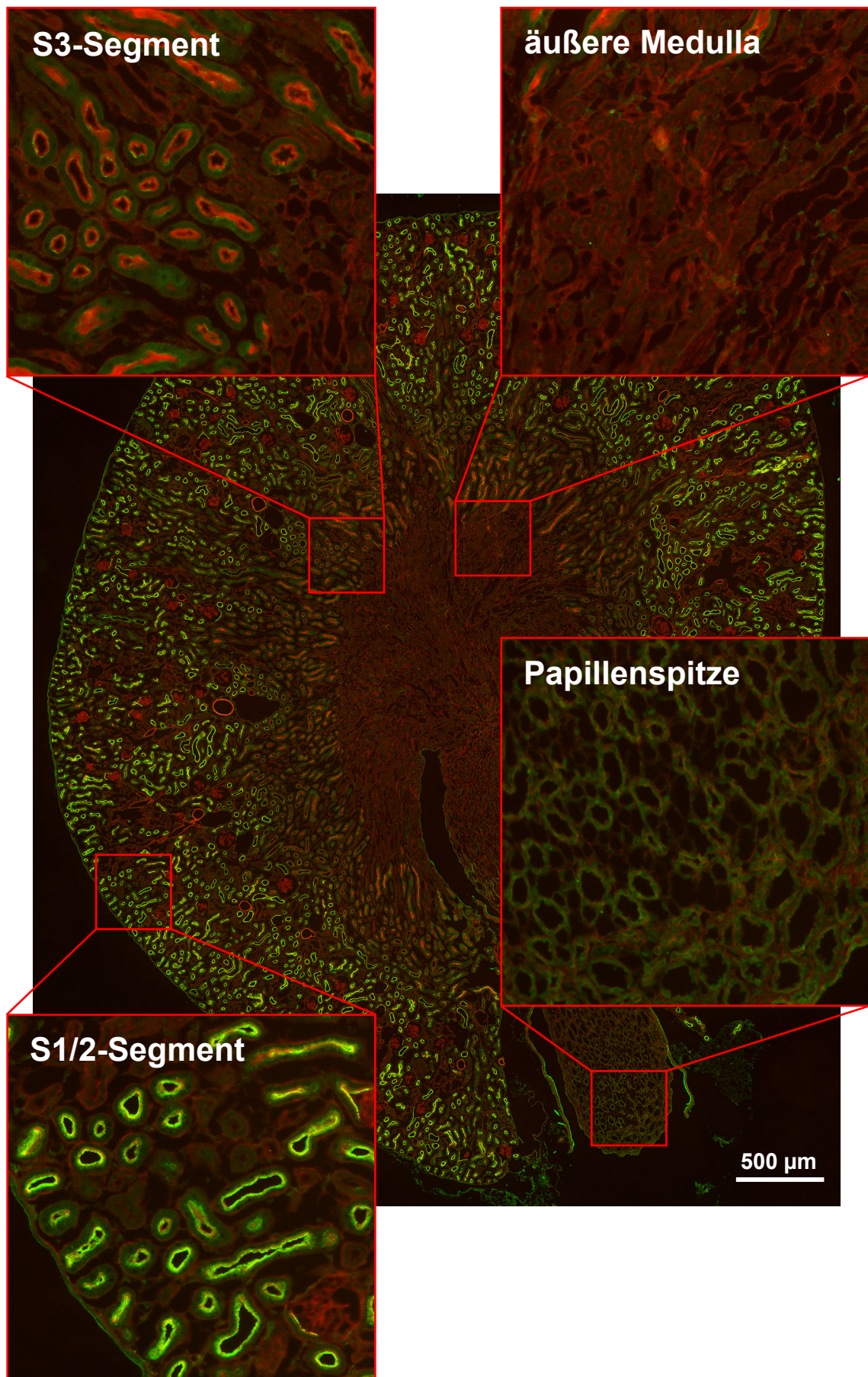


Abb. 7: Lokalisation von TWIK1 in der Niere der Maus

Dargestellt sind Übersichtsaufnahmen der Nieren von zwei TWIK1^{+/+} Mäusen. Die 5 µm dicken Kryoschnitte wurden gegen TWIK1 (grün) und β-Aktin (rot) gefärbt. β-Aktin diente hier der Hervorhebung von Strukturen in der Niere und speziell des Bürstensaums im proximalen Tubulus. Jeweils vier Bereiche werden vergrößert gezeigt: Das S1/2-, sowie das S3-Segment des proximalen Tubulus, die äußere Markzone und die Papillenspitze. Die Nieren zeigen ein unterschiedliches Verteilungsmuster von TWIK1 in spätdistalen Bereichen des proximalen Tubulus (S3). In A weist dieses Segment eine starke TWIK1 Färbung auf, welche in den Mikrovilli des Bürstensaums lokalisiert ist. In B ist hier nur ein sehr schwaches Signal zu beobachten, welches auf einen schmalen Bereich unterhalb des Bürstensaums beschränkt ist. Weiterhin ist TWIK1 stark im frühproximalen Tubulus (S1/2) exprimiert, Papille und Mark zeigen dagegen kaum eine Färbung.

4.1.2 Geschlechtsabhängige Expression von TWIK1 im proximalen Tubulus

Die beiden beschriebenen Verteilungsmuster von TWIK1 im spätproximalen Tubulus deuten auf eine regulierte Lokalisation des Kanals aufgrund bestimmter Stimuli hin. In einer Serie von Experimenten wurde versucht, Bedingungen zu finden, welche eine Translokation von TWIK1 aus dem subapikalen, intrazellulären Kompartiment in den Bürstensaum bewirken oder umgekehrt. TWIK1^{+/+} Mäuse wurden dazu mit Hormonen oder Rezeptor-Agonisten behandelt, welche nachweislich in die Nierenfunktion eingreifen. Folgende Substanzen wurden verwendet: Insulin/Glucose, Adrenalin, Propranolol /Prazosin und Dexamethason (Daten nicht gezeigt). Keine dieser Behandlungen führte jedoch konsistent zu einem der beschriebenen Verteilungsmuster. Allerdings fiel dabei auf, dass dieses Verhalten von TWIK1 wahrscheinlich vom Geschlecht der untersuchten Mäuse abhängig war.

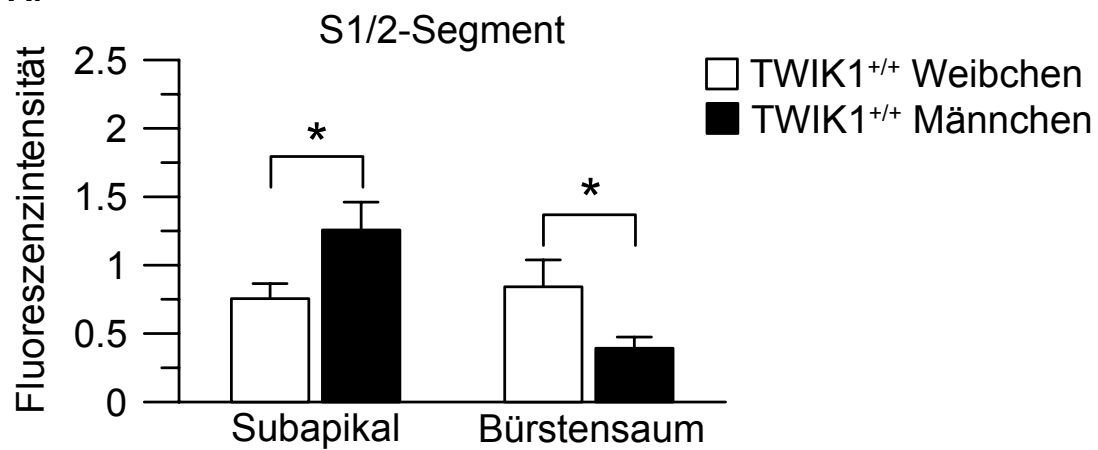
Zu diesem Zweck wurde eine Semi-Quantifizierung von TWIK1 entlang des proximalen Tubulus in Form einer Blindstudie durchgeführt und die erhaltenen Daten anschließend nach dem Geschlecht der Mäuse getrennt. Hier wurde deutlich, dass sowohl die Lokalisation als auch die Intensität der Färbung von TWIK1 in beiden der untersuchten Segmente des proximalen Tubulus geschlechtsabhängig war.

Im S1/2 Segment zeigten männliche Mäuse ein stärkeres TWIK1 Signal im subapikalen Kompartiment und eine schwächere Färbung im Bürstensaum im Vergleich zu weiblichen Mäusen (Abb. 8A). Der auffälligste Unterschied wurde jedoch im spätproximalen Tubulus beobachtet. Obwohl hier die Intensität der Färbung im subapikalen Kompartiment nicht verschieden war, zeigten weibliche Mäuse ein mehr als zehnfach stärkeres Signal im Bürstensaum im Vergleich zu männlichen Mäusen (Abb. 8B). Diese Ergebnisse lieferten starke Hinweise dafür, dass die Lokalisation von TWIK1 vor allem im S3 Segment, aber auch weniger ausgeprägt in S1/2, in einer geschlechtsabhängigen Weise reguliert wird: In männlichen Mäusen ist TWIK1 hauptsächlich auf das subapikale Kompartiment

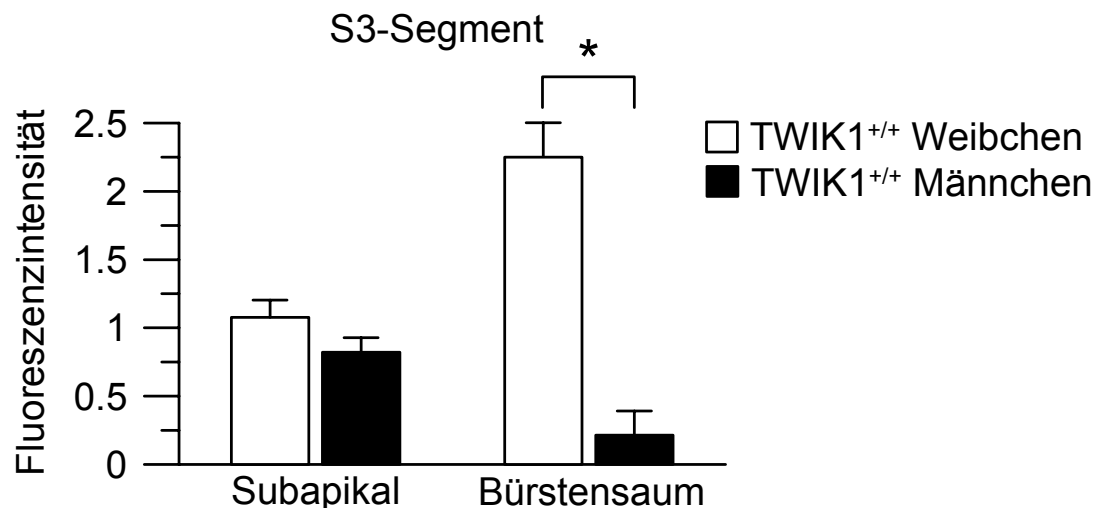
beschränkt, wohingegen TWIK1 bei weiblichen Mäusen zusätzlich entlang der Mikrovilli des Bürstensaums auftritt.

Im nächsten Schritt wurde die ermittelte Fluoreszenzintensität aller vier untersuchten Bereiche (S1/2 subapikal, S1/2 BB, S3 subapikal, S3 BB) einer Maus zusammengezählt und die erhaltenen Summen für ein Geschlecht gemittelt (Abb. 8C). Hieraus wurde ersichtlich, dass nicht nur die Lokalisation von TWIK1 geschlechtsspezifisch war. Auch die Summe der Fluoreszenzintensität war bei den Weibchen um etwa den Faktor 1,8 größer, was auf eine stärkere Expression von TWIK1 bei weiblichen Mäusen hindeutete.

A:



B:



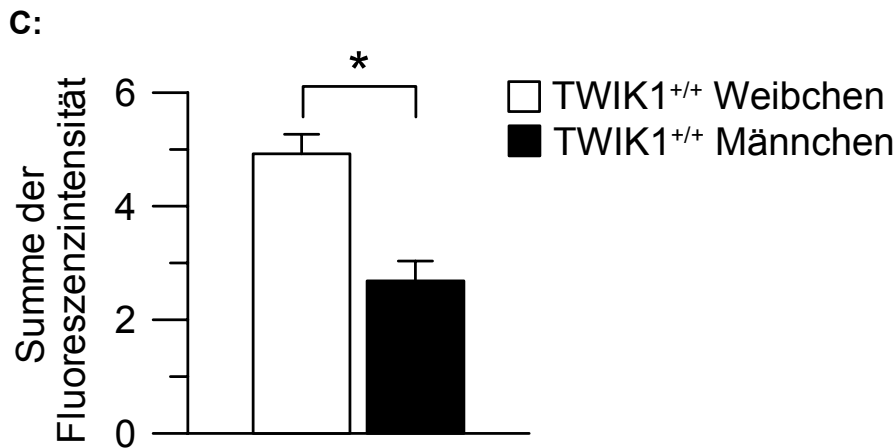


Abb. 8: Geschlechtsabhängige Expression von TWIK1 im proximalen Tubulus

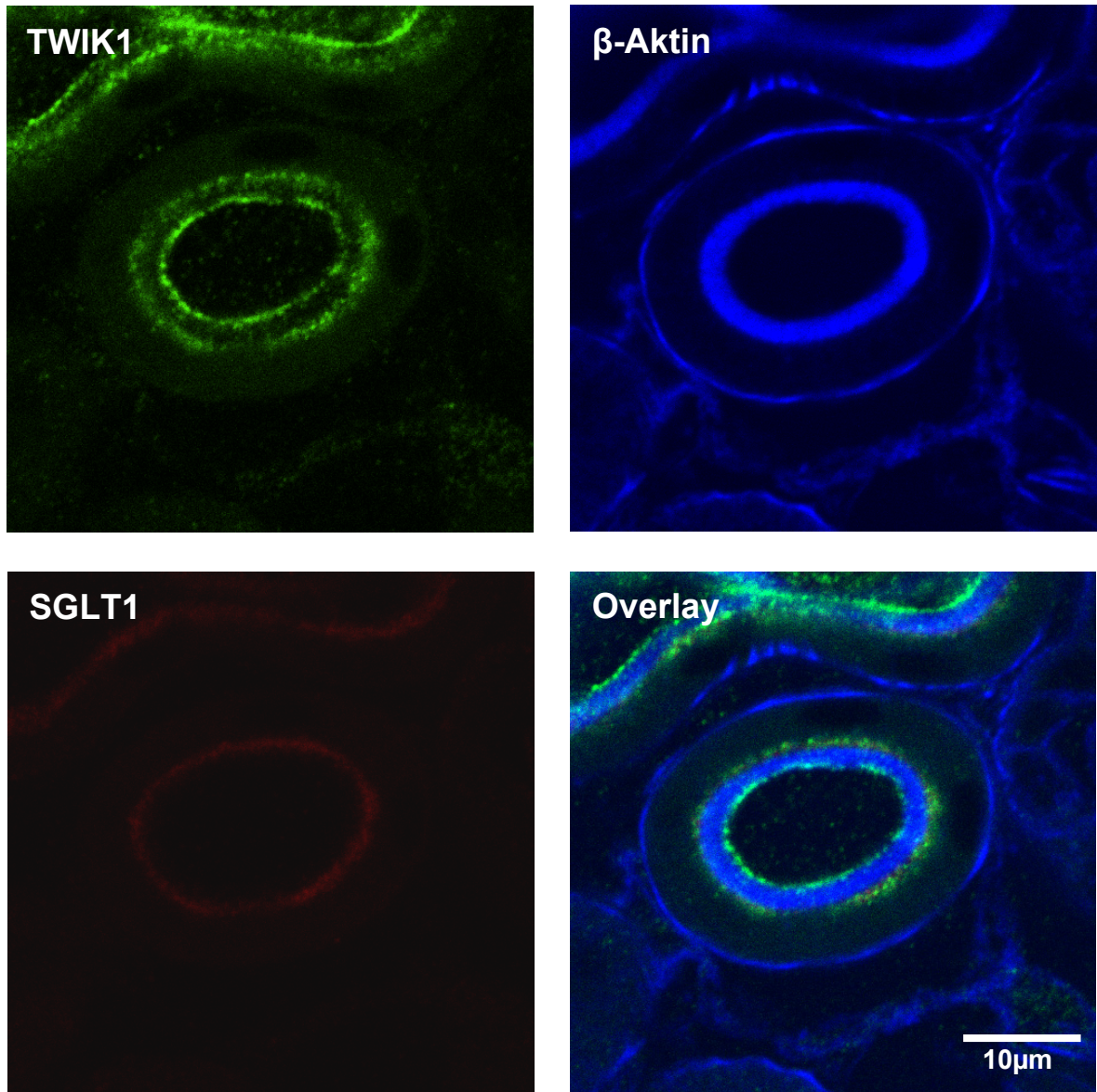
Bestimmung der Fluoreszenzintensität bei männlichen (n=14) und weiblichen (n=19) TWIK1^{+/+} Mäusen. Sowohl der früh- als auch der spätproximale Tubulus wies eine geschlechtsabhängige Expression von TWIK1 auf. A: Im S1 Segment wurde bei Männchen subapikal ein stärkeres Signal beobachtet, wohingegen die Bürstensaumfärbung schwächer war. B: Der auffälligste Unterschied zeigte sich im Bürstensaum des spätproximalen Tubulus. Hier war TWIK1 bei Weibchen sehr stark exprimiert und fast ausschließlich in den Mikrovilli des Bürstensaums lokalisiert, wohingegen bei den Männchen nur ein sehr schwaches subapikales Signal beobachtet wurde. C: Die Summe der Fluoreszenzintensität aller vier untersuchten Gebiete deutet auf eine stärkere TWIK1 Expression bei weiblichen Mäusen hin.

4.1.3 Kolokalisation von TWIK1 mit SGLT1

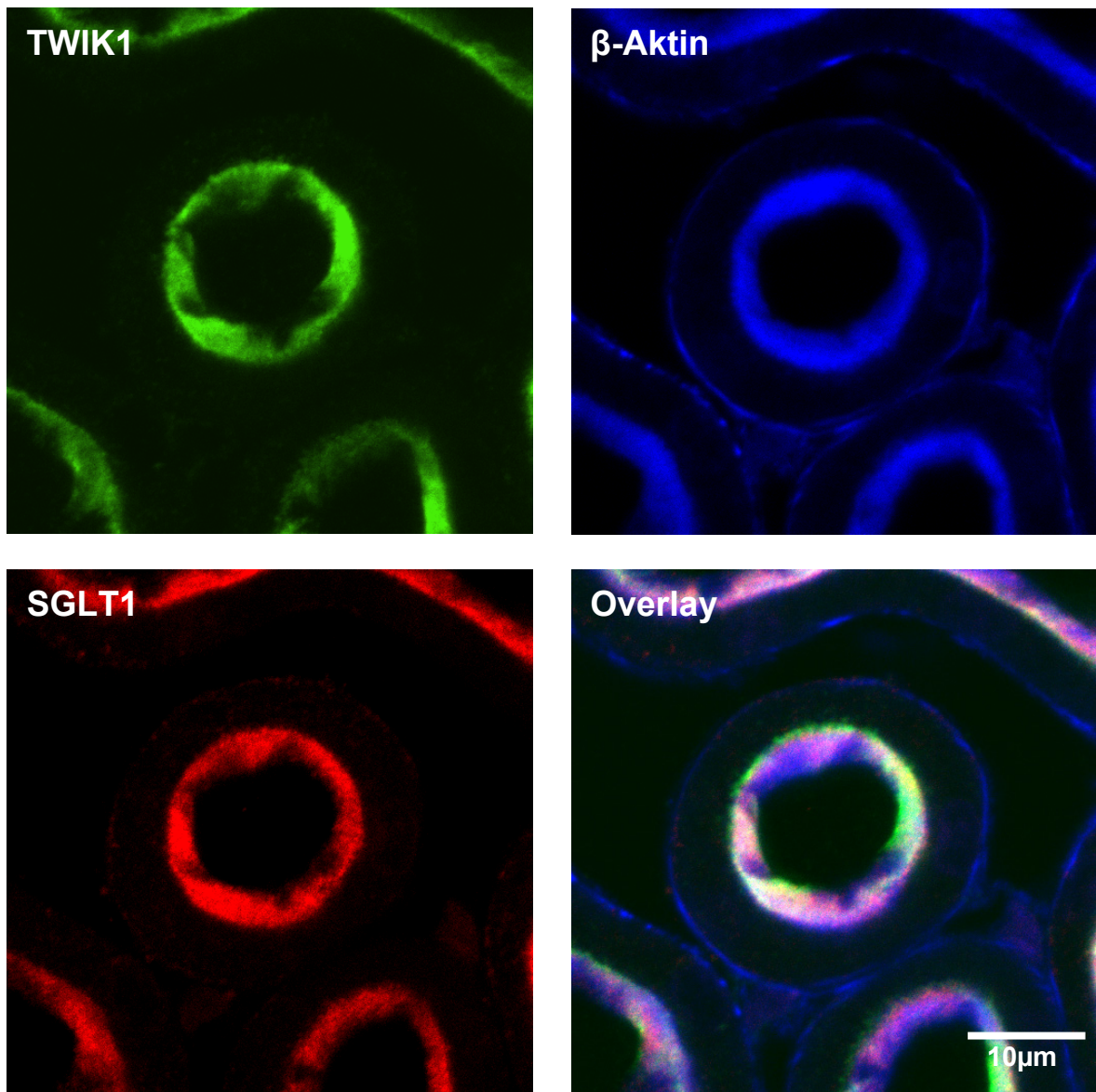
In Immunfluoreszenz-Experimenten konnte im S3 Segment des proximalen Tubulus eine Kolokalisation von TWIK1 mit dem Natrium-abhängigen Glucosetransporter SGLT1 beobachtet werden. Dieser elektrogene Transporter wird vor allem im spätproximalen Tubulus exprimiert (Wallner *et al.*, 2001), was in unseren Experimenten bestätigt werden konnte. Im S1/2 Segment wurde nur ein sehr schwaches SGLT1 Signal beobachtet, welches sich als diffuser Ring unterhalb des Bürstensaums abzeichnete (Abb. 9A).

Im spätproximalen Tubulus zeigte SGLT1 ein sehr ähnliches Verteilungsmuster und interessanterweise auch die gleiche geschlechtsabhängige Lokalisation wie TWIK1. In den Nieren weiblicher Mäuse (Abb. 9B) wurde im S3 Segment eine sehr starke Färbung für SGLT1 beobachtet, welche sich über die Mikrovilli des Bürstensaums erstreckte. In männlichen Mäusen hingegen (Abb. 9C) war das SGLT1 Signal, analog zu TWIK1, sehr schwach und beschränkte sich auf ein subapikales Kompartiment unterhalb des Bürstensaums. Hier wurden auch Tubuli beobachtet, welche für SGLT1 positiv waren, jedoch keine TWIK1 Färbung zeigten und umgekehrt.

A:



B:



C:

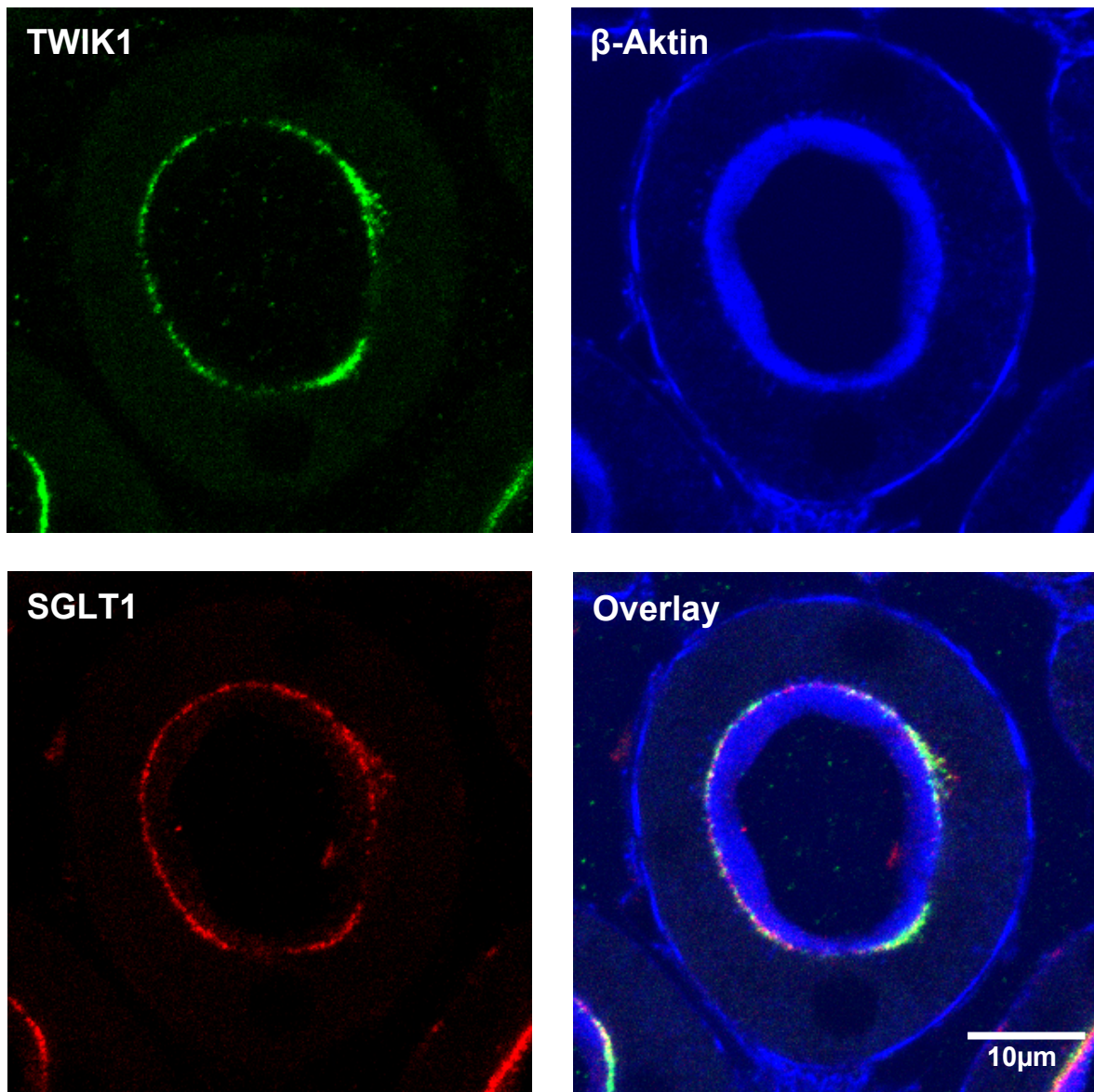


Abb. 9: Kolokalisation von TWIK1 mit SGLT1

Dargestellt ist die subzelluläre Lokalisation von TWIK1 (grün) und SGLT1 (rot) im proximalen Tubulus von TWIK1^{+/+} Mäusen. Die Kryoschnitte wurden zusätzlich gegen β -Aktin gefärbt (blau), um die Bürstensaummembran sichtbar zu machen. A: Im S1/2 Segment des proximalen Tubulus beider Geschlechter war TWIK1 vor allem in den Spitzen der Mikrovilli und in einem subapikalen Kompartiment lokalisiert. Für SGLT1 wurde hier nur ein sehr schwaches Signal beobachtet. B: In spätproximalen Tubuli (S3) von weiblichen Mäusen zeigten beide Proteine eine starke Expression entlang der gesamten Bürstensaummembran. C: Im S3 Segment von männlichen Mäusen waren sowohl TWIK1 als auch SGLT1 auf ein subapikales intrazelluläres Kompartiment an der Basis der Mikrovilli beschränkt. Sowohl bei männlichen als auch bei weiblichen Mäusen wurde in den spätproximalen Tubulusabschnitten eine weitgehende Kolokalisation von TWIK1 mit SGLT1 beobachtet.

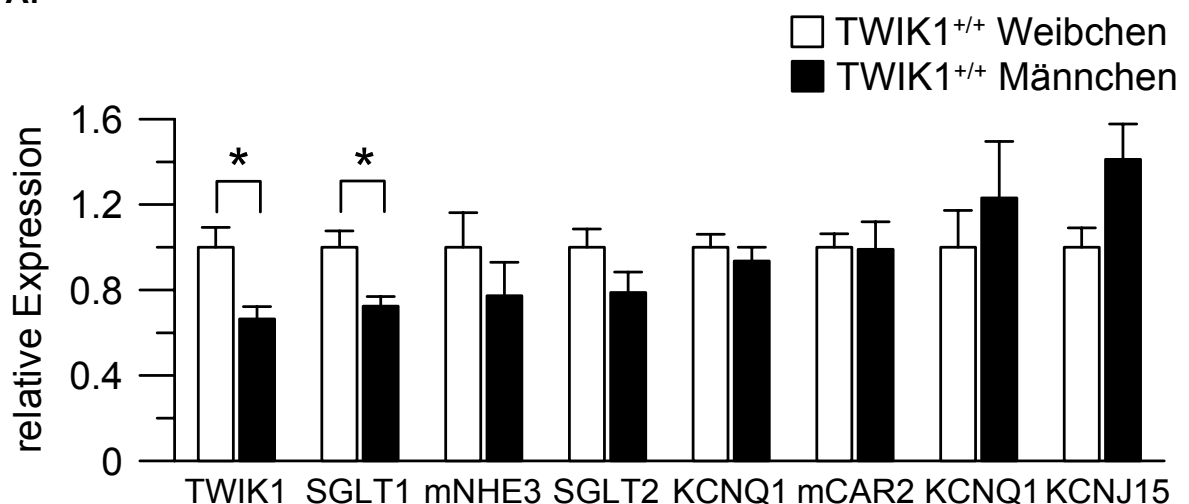
4.1.4 Quantifizierung der Expression von Genen des proximalen Tubulus

Um zu überprüfen, ob die geschlechtsabhängige Expression von TWIK1 und SGLT1 auch auf mRNA Ebene beobachtet werden kann, wurde eine Serie von Real-time PCR Messungen durchgeführt. Neben TWIK1 und SGLT1 wurden noch weitere wichtige Proteine des proximalen Tubulus untersucht: der Natrium-abhängige Glucosetransporter SGLT2, der Natrium/Protonen Austauscher NHE3, die Carboanhydratase CAR2 und die Kaliumkanäle KCNQ1, KCNJ15 und TASK2, welcher ebenfalls zur Gruppe der 2-P-Domänen Kaliumkanäle gehört. Zum besseren Vergleich wurden die gemessenen Werte zuerst auf die Expression von β -Aktin und anschließend auf die Expression der weiblichen Mäuse normalisiert (Abb. 10A).

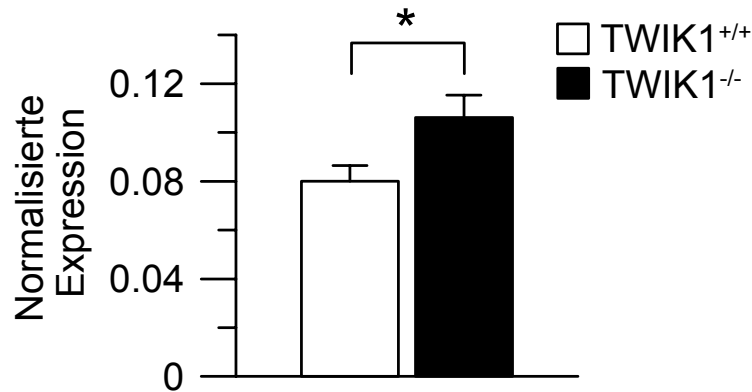
In Übereinstimmung mit den Daten der Semi-Quantifizierung für TWIK1 auf Proteinebene zeigten weibliche Mäuse eine erhöhte TWIK1 mRNA Expression im Vergleich zu männlichen Mäusen. In gleicher Weise war auch die Gen Expression von SGLT1 geschlechtsabhängig reguliert, ein Befund, welcher erst kürzlich für die Nieren von Ratten beschrieben wurde (Sabolic *et al.*, 2005). Für die weiteren untersuchten Proteine konnten keine Unterschiede in der mRNA Expression bezüglich des Geschlechts beobachtet werden.

In einer weiteren Real-time PCR Messung wurde die SGLT2 Expression von TWIK1^{+/+} und TWIK1^{-/-} Mäusen miteinander verglichen (Abb. 10B). Die Idee dahinter war folgende: Sollte ein funktioneller Zusammenhang zwischen TWIK1 und SGLT1 bestehen, so würde sich eine gestörte TWIK1 Funktion wahrscheinlich auch in einer gestörten SGLT1 Transportkapazität äußern. Diese könnte aber zum Teil dadurch kompensiert werden, dass die Expression von SGLT2 hochreguliert wird. Tatsächlich wurde bei TWIK1^{-/-} Mäusen eine verstärkte Expression von SGLT2 mRNA beobachtet.

A:



B:

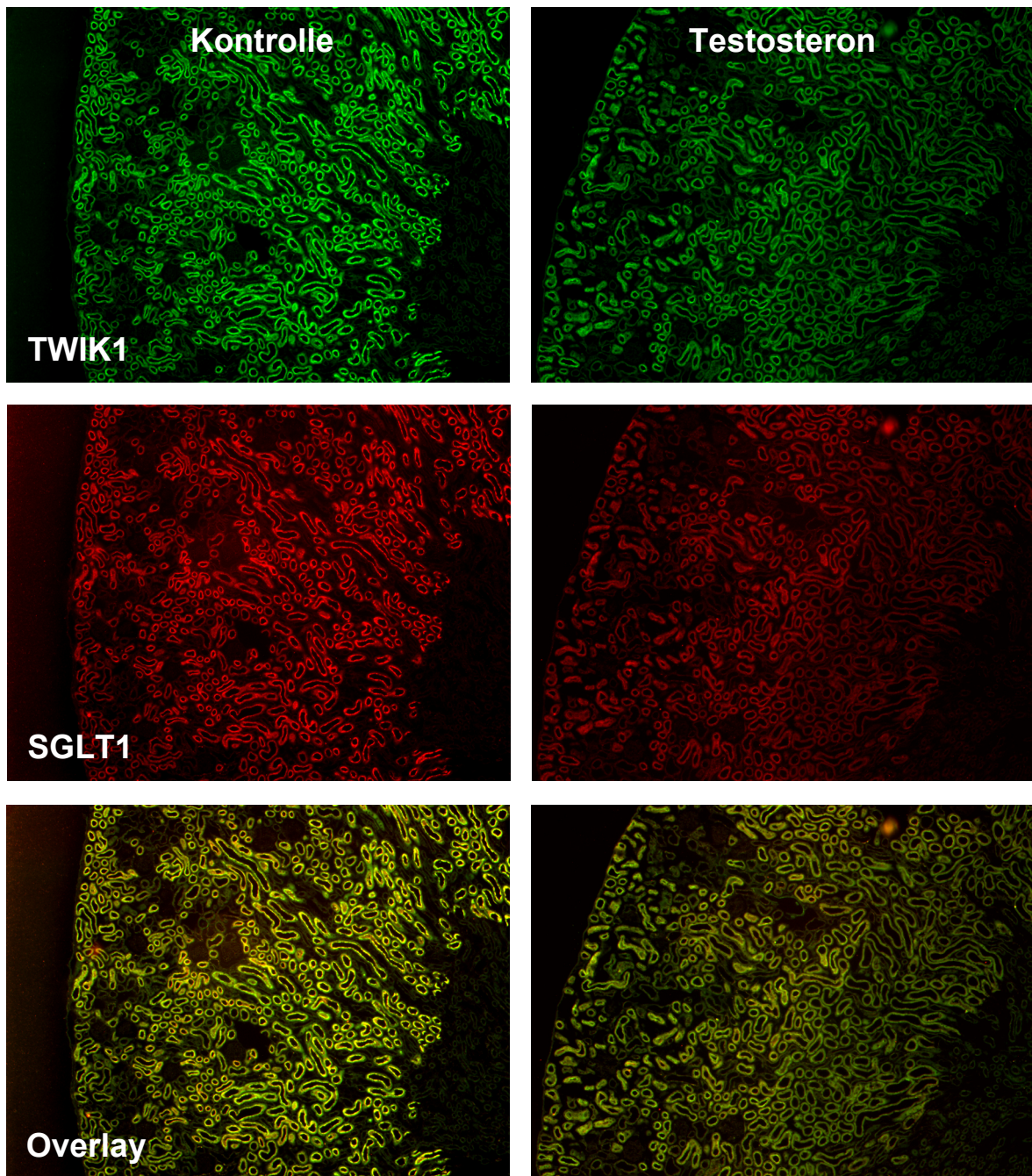
**Abb. 10: Real-time PCR Messungen**

Real-time PCR auf isolierte cDNA der Nieren von TWIK1^{+/+} und TWIK1^{-/-} Mäusen. A: Vergleich der relativen Expression von TWIK1, SGLT1 und weiterer Proteine des proximalen Tubulus in der Niere von männlichen (n=8) und weiblichen (n=8) TWIK1^{+/+} Mäusen. Sowohl TWIK1 als auch SGLT1 mRNA war signifikant höher bei den weiblichen Mäusen. Die gezeigten Daten wurden auf die Expression von β -Aktin und die Expression der Weibchen normalisiert. B: Vergleich der relativen Expression von SGLT2 in den Nieren von männlichen und weiblichen TWIK1^{+/+} (n=16) und TWIK1^{-/-} (n=15) Mäusen. Ein defektes TWIK1 Protein führte zu einer verstärkten Expression von SGLT2 mRNA. Die gezeigten Daten wurden auf die Expression von β -Aktin normalisiert.

4.1.5 Hormonelle Behandlung und Kastrationsexperimente**4.1.5.1 Hormonelle Behandlung von TWIK1^{+/+} Mäusen**

In einem nächsten Schritt wurde geprüft, inwieweit Sexualhormone für die beobachtete geschlechtsabhängige Verteilung von TWIK1 in den distalen Segmenten des proximalen Tubulus verantwortlich waren. Hierfür wurden erwachsene weibliche Mäuse mit Testosteron und erwachsene männliche Mäuse mit Estradiol, Prolaktin und Progesteron behandelt. Die Lokalisation wurde dann anhand von Kryoschnitten der Nieren durch immunhistochemische Methoden bestimmt.

Bei den untersuchten Männchen hatte keines der weiblichen Sexualhormone einen Einfluss auf Expression und Lokalisation von TWIK1 (Daten nicht gezeigt). Die Behandlung von weiblichen Mäusen mit Androgenen führte jedoch zu einem Verteilungsmuster von TWIK1, welches dem von männlichen Mäusen entsprach. Das Fluoreszenzsignal war stark vermindert und auf subapikale Bereiche beschränkt (Abb. 11). Interessanterweise wurde für das SGLT1-Protein genau das gleiche Verhalten beobachtet, welches ebenfalls eine starke Herabregulierung unter Androgenbehandlung zeigte und von weiblichen Sexualhormonen unbeeinflusst blieb.

**Abb. 11: Behandlung von weiblichen Mäusen mit Testosteron**

Weibliche TWIK1^{+/+} Mäuse wurden 8 d mit Testosteron (1 µg/g KG) behandelt (rechte Bildreihe). Einer Kontrollgruppe wurde nur das Lösungsmittel Sesamöl appliziert (linke Bildreihe). Kryoschnitte der Nieren wurden gegen TWIK1 (grün) und SGLT1 (rot) gefärbt. Im Gegensatz zur Kontrollgruppe führte die Behandlung von weiblichen Mäusen mit Androgenen zu einem männlichen Verteilungsmuster von TWIK1 und SGLT1 im spätproximalen Tubulus der Niere.

4.1.5.2 Kastrationsexperimente an männlichen TWIK1^{+/+} Mäusen

Für dieses Experiment wurden männlichen Mäusen etwa zu Beginn der Pubertät die Hoden entfernt. Nach einer angemessenen Erholungsphase wurde ein Teil der Mäuse mit Estradiol behandelt, um zu prüfen, ob weibliche Geschlechtshormone in Abwesenheit von

Testosteron zu einer Änderung der Lokalisation von TWIK1 oder SGLT1 führen. Eine Maus wurde nicht behandelt, um zu testen, ob nur der Verlust an Androgenen für eine Translokation von TWIK1/SGLT1 in den Bürstensaum ausreichend ist. Jedoch führte das Experiment weder bei den mit Estradiol behandelten Mäusen, noch bei der unbehandelten Maus zu einem weiblichen Verteilungsmuster von TWIK1/SGLT1 im spätproximalen Tubulus. Beide Proteine waren nach wie vor in subapikalen, intrazellulären Bereichen lokalisiert. Die für SGLT1 gewonnenen Ergebnisse stehen zudem im Widerspruch mit Ergebnissen bei Ratten, wo allein die Kastration von männlichen Tieren bereits zu einer starken Zunahme der Expression von SGLT1 im spätproximalen Tubulus führte (Sabolic *et al.*, 2005).

4.1.6 Glucoseinfusion bei TWIK1^{+/+} und TWIK1^{-/-} Mäusen

Unserer Hypothese nach dient TWIK1 im spätproximalen Tubulus (S2-3) der Repolarisation der apikalen Membran, wenn diese durch den elektrogenen Transportprozess von SGLT1 depolarisiert wird. Ein Funktionsverlust von TWIK1 sollte daher mit einer verminderten Fähigkeit einhergehen, Glucose rückzuresorbieren, da ein Teil der Triebkraft für den Transport durch das negative Membranpotential aufgebracht wird. TWIK1^{-/-} Mäuse sollten somit, vor allem unter Glucosebelastung, eine höhere Glucosekonzentration im Urin ([Gluc_{Urin}]) und damit einhergehend eine erhöhte fraktionelle Glucoseausscheidung (Fe_{Gluc}) aufweisen.

Um dies zu prüfen wurden TWIK1^{+/+} und TWIK1^{-/-} Mäuse über 2x 30 min mit einer 12% Glucose-Lösung perfundiert (Protokoll 1). Blut- und Urinproben wurden abgenommen, um [Gluc_{Urin}], Fe_{Gluc}, Blutzucker, Urinvolumen und die GFR zu bestimmen.

Wie erwartet zeigten TWIK1^{-/-} Mäuse unter Glucosebelastung eine höhere Glucoseausscheidung im Vergleich zu TWIK1^{+/+} Mäusen (Abb. 12). Interessanterweise zeigte sich aber kein Unterschied im Kontrollurin, also vor Beginn der Infusion. Dies kann dadurch erklärt werden, dass unter normalen Bedingungen der frühproximale Glucosetransporter SGLT2 in der Lage ist, nahezu die gesamte filtrierte Glucose rückzuresorbieren. Erst wenn die Transportkapazität von SGLT2 ausgelastet ist, macht sich eine verminderte Funktion des spätproximal gelegenen Glucosetransporters SGLT1 bemerkbar. Für eine bessere Vergleichbarkeit der Werte wurde in dieser Darstellung [Gluc_{Urin}] (in mM) auf die Kreatinin-Konzentration im Urin ([Krea_{Urin}]) (in mM) normalisiert ([Gluc_{Urin}]/ [Krea_{Urin}]).

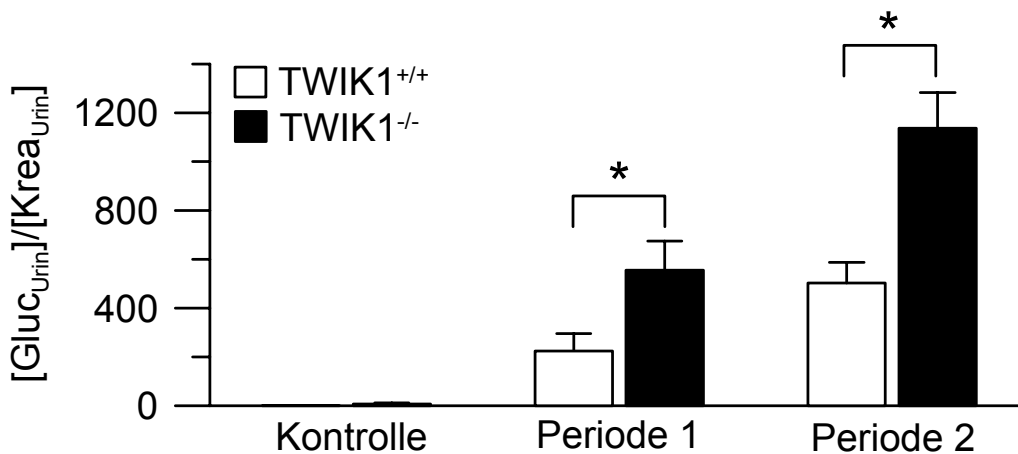
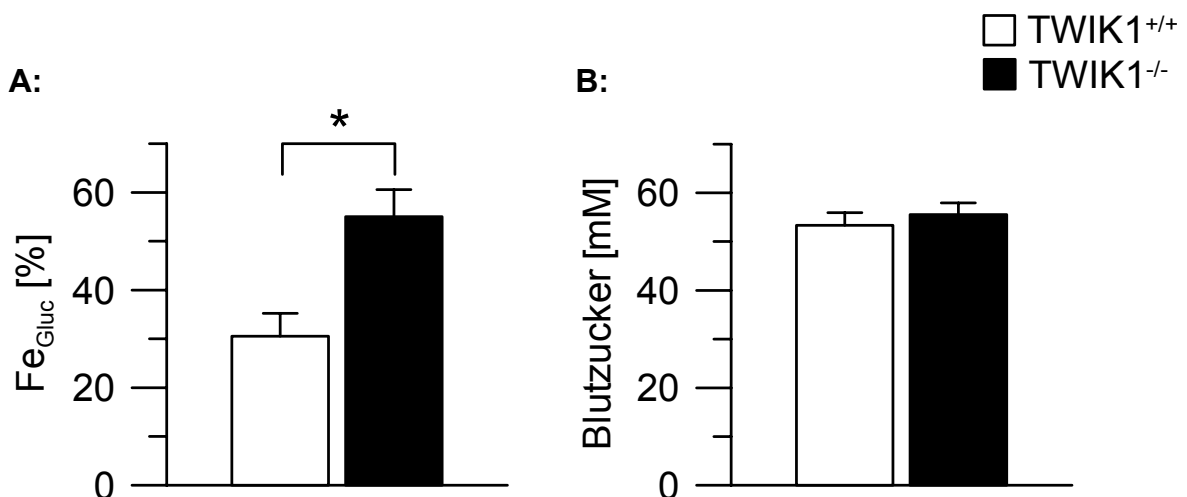


Abb. 12: Normalisierte Glucoseausscheidung bei TWIK1^{+/+} und TWIK1^{-/-} Mäusen

TWIK1^{+/+} (n=14) und TWIK1^{-/-} (n=14) Mäusen wurde 2x 30 min (Periode 1 und 2) eine 12% Glucoselösung intravenös infundiert und anschließend Glucosekonzentration im Urin ermittelt (Protokoll 1). Um eine unterschiedliche Konzentrierung des Urins auszugleichen, wurden die dargestellten Werte auf die Kreatinin-Konzentration im Urin normalisiert ($[\text{Gluc}_{\text{Urin}}]/[\text{Krea}_{\text{Urin}}]$). Vor Beginn der Infusion (Kontrolle) schieden sowohl TWIK1^{+/+} als auch TWIK1^{-/-} Mäuse nahezu keine Glucose aus. Unter Glucosebelastung allerdings zeigten TWIK1^{-/-} Mäuse eine verminderte Fähigkeit zur Rückresorption von Glucose was sich in einer vermehrten Ausscheidung im Urin äußerte.

Betrachtet man die fraktionelle Glucoseausscheidung für die letzte Periode, so zeigt sich auch hier eine signifikante Erhöhung bei TWIK1^{-/-} Mäusen im Vergleich zu TWIK1^{+/+} Mäusen (TWIK1^{+/+}: $30,55 \pm 4,7$ %, TWIK1^{-/-}: $55,03 \pm 5,6$ %) (Abb. 13A), trotz ähnlicher Blutzuckerwerte von etwa 54 mM (TWIK1^{+/+}: $53,36 \pm 2,6$ mM, TWIK1^{-/-}: $55,57 \pm 2,4$ mM) (Abb. 13B) und vergleichbarer GFR, gemessen als Kreatinin-Clearance (TWIK1^{+/+}: $9,05 \pm 0,34$ $\mu\text{l/g/min}$, TWIK1^{-/-}: $9,35 \pm 0,23$ $\mu\text{l/g/min}$) (Abb. 13C). Das höhere Urinvolumen der TWIK1^{-/-} Mäuse (TWIK1^{+/+}: $309 \pm 50,8$ μl , TWIK1^{-/-}: $548 \pm 90,3$ μl) (Abb. 13D) war wahrscheinlich durch die erhöhte Glucoseausscheidung bedingt, da Glucose in der Lage ist, osmotisch Wasser im Tubulolumen zu binden (vergleichbar mit der Polyurie bei Diabetikern). Da bei diesem Experiment lediglich am Ende Blut abgenommen wurde, konnte Fe_{Gluc} nur für die letzte Sammelperiode berechnet werden.



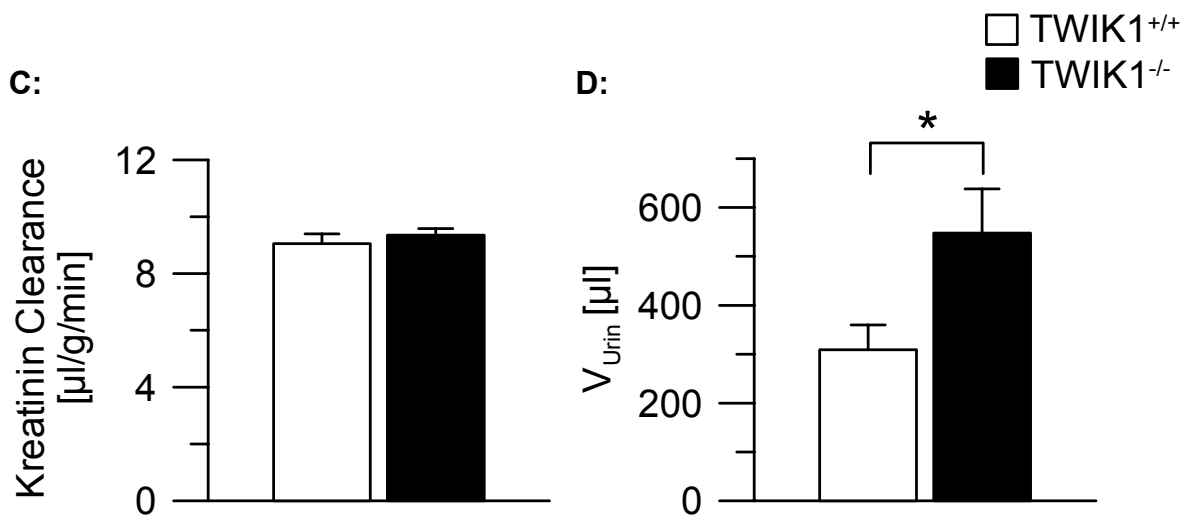


Abb. 13: Blutzucker, Fe_{Gluc} , V_{Urin} und GFR unter Glucosebelastung

Für die letzte Periode von Protokoll 1 wurden zusätzlich die fraktionelle Glucoseausscheidung (A), die Blutzuckerwerte (B), die GFR (C) und das Urinvolumen (D) bestimmt. Dabei zeigte sich, dass die fraktionelle Glucoseausscheidung trotz gleicher Blutzuckerwerte und gleicher GFR bei TWIK1^{-/-} Mäusen signifikant höher lag als bei TWIK1^{+/+} Mäusen. Die vermehrte Urinausscheidung bei TWIK1^{-/-} Mäusen war wahrscheinlich durch die osmotische Wirkung der Glucose im Tubuluslumen bedingt.

Ein weiteres Experiment wurde unternommen, bei dem Fe_{Gluc} für die jeweiligen Sammelperioden (30 min Kontrollperiode, 2x 30 min Glucoseinfusion) berechnet werden sollte (Protokoll 2). Dazu musste nach jeder Periode Blut gesammelt werden. Im Gegensatz zu Protokoll 1 war hier jedoch die Glucoseausscheidung ($[Gluc_{Urin}] / [Krea_{Urin}]$) bei TWIK1^{-/-} Mäusen nicht signifikant höher als bei TWIK1^{+/+} Mäusen. Bei dieser Serie zeigte sich ebenfalls kein Unterschied bei der fraktionellen Glucoseausscheidung zwischen den beiden Gruppen. In der Kontrollperiode war Fe_{Gluc} annähernd gleich (TWIK1^{+/+}: $0,19 \pm 0,01$ %, TWIK1^{-/-}: $0,18 \pm 0,01$ %). Obwohl sich in den Phasen der Glucoseinfusion eine Tendenz zu höheren fraktionellen Glucoseausscheidungen bei den TWIK1^{-/-} Mäusen abzeichnete, waren die Ergebnisse dennoch nicht signifikant unterschiedlich (Periode I: TWIK1^{+/+}: $1,22 \pm 0,48$ %, TWIK1^{-/-}: $1,36 \pm 0,35$ %; Periode II: TWIK1^{+/+}: $6,05 \pm 1,53$ %, TWIK1^{-/-}: $7,17 \pm 1,33$ %).

Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Befunde der beiden Versuchsserien könnte sein, dass bei Protokoll II Isofluran anstelle von Ketamin/Xylazin als Anästhetikum verwendet wurde. Trotz derselben Menge an intravenös applizierter Glucose erreichten die Mäuse nach einer Stunde Infusion nur einen durchschnittlichen Blutzucker von etwa 35 mM im Vergleich zu Protokoll I, wo der Durchschnitt bei etwa 54 mM lag. Zwar führen beide Arten der Anästhesie zu einem Anstieg des Blutzuckers bei Mäusen, die Verwendung von Xylazin jedoch wesentlich mehr als die Verwendung von Isofluran (Pomplun *et al.*, 2004). Für Xylazin ist bekannt, dass es durch agonistische Wirkung an

α_2 -Adrenozeptoren von β -Zellen der Langerhans Inseln die Insulinfreisetzung hemmt, wodurch die Konzentration an Glucose in Blut ansteigt (Ullrich and Wollheim, 1985; Sharp, 1996; Peterhoff *et al.*, 2003). Es ist sehr unwahrscheinlich, dass die Infusion von Inulin einen Einfluss auf das Experiment, bzw. auf die fraktionelle Ausscheidung von Glucose hatte. Für diese Substanz existieren im gesamten Körper keine Transporter und Abbauege, was sie sozusagen inert macht. Außerdem wird Inulin frei filtriert, weswegen es hervorragend für die Bestimmung der GFR geeignet ist.

Daraus kann gefolgert werden, dass eine Störung der Glucoserückresorption bei TWIK1^{-/-} Mäusen erst bei sehr hohen Blutzuckerwerten größer als 35 mM in Erscheinung tritt. Um dies zu untersuchen, wurden die fraktionellen Glucoseausscheidungen beider Experimente zusammengefasst und nicht nach Perioden, sondern nach Höhe des Blutzuckers gruppiert (Abb. 14). Das erste Intervall wurde von 0-20 mM gewählt, da in diesem Bereich nahezu keine Ausscheidung von Glucose stattfand. Dies stimmt gut mit der Literatur überein, wo die Nierenschwelle bei der Maus mit 22 mM angegeben wird (Noonan and Banks, 2000). Im Intervall zwischen 20-30 mM Blutzucker beginnen sowohl TWIK1^{+/+} als auch TWIK1^{-/-} Mäuse Glucose auszuscheiden. Die hier nur als Tendenz vorhandene höhere fraktionelle Ausscheidung wird schließlich bei Blutglucosewerten >35 mM signifikant unterschiedlich.

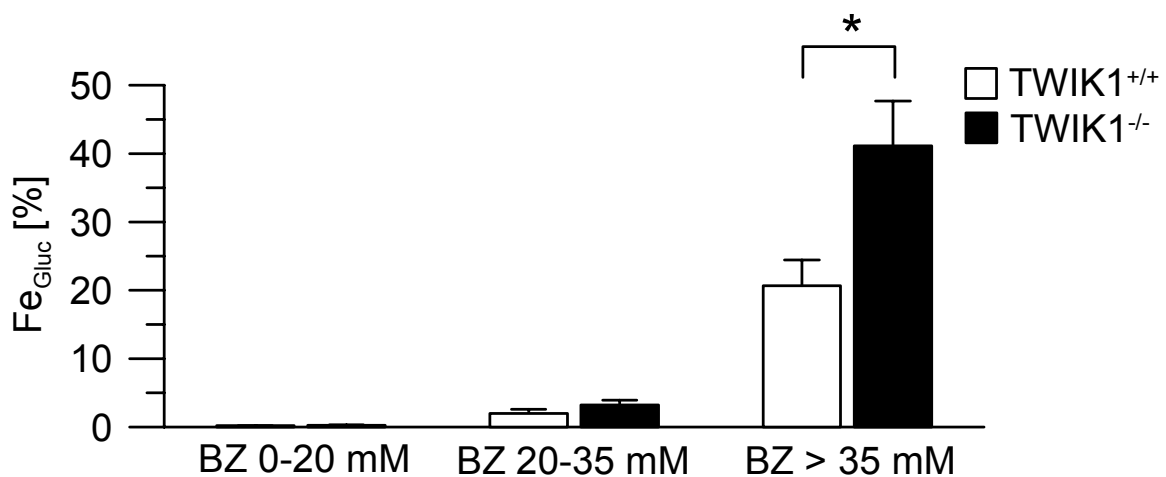


Abb. 14: Fraktionelle Glucoseausscheidung in Abhängigkeit vom Blutzucker

Zusammenfassung der Experimente aus Protokoll 1 und Protokoll 2. Die fraktionellen Glucoseausscheidungen von TWIK1^{+/+} (n=28) und TWIK1^{-/-} (n=28) Mäusen wurden nach Höhe des Blutzuckers gruppiert. Bis zur Nierenschwelle von etwa 20 mM war keine Ausscheidung von Glucose zu beobachten. Bei Blutzuckerwerten zwischen 20 mM und 35 mM zeichnete sich eine Tendenz bei TWIK1^{-/-} Mäusen zu höheren fraktionellen Ausscheidungen ab. Ab 35 mM Glucose im Plasma wurde schließlich eine deutlich höhere Fe_{Gluc} bei TWIK1^{-/-} Mäusen beobachtet.

4.1.7 Messung der Aminosäureausscheidung im Urin

In diesem Experiment sollte geprüft werden, ob TWIK1 auch den elektrogenen Transport anderer Substrate im proximalen Tubulus beeinflusst. Dazu wurde die Aminosäureausscheidung im Spontanurin von TWIK1^{+/+} und TWIK1^{-/-} Mäusen untersucht. Die Rückresorption vieler Aminosäuren (AS) im proximalen Tubulus ist an Natrium gekoppelt und elektrogen. Vor allem neutrale AS werden elektrogen über Aminosäuretransporter des B⁰ Systems über die apikale Membran transportiert. Dazu gehört der Transporter B⁰AT1 (Slc6a19) und wahrscheinlich noch weitere, bisher noch nicht charakterisierte, verwandte Genprodukte (z.B. Slc6a18, auch bekannt als XT2) (Kanai *et al.*, 2000; Broer *et al.*, 2004; Verrey *et al.*, 2005). Um einer resultierenden Depolarisation der luminalen Membran entgegenzuwirken, ist ein Ausstrom von Kationen aus der Zelle notwendig. Da für diese repolarisierenden Ströme vermutlich luminale Kaliumkanäle verantwortlich sind, könnte auch TWIK1 an der Rückresorption von AS beteiligt sein.

In unseren Experimenten konnte jedoch kein Unterschied in der Aminosäureausscheidung zwischen TWIK1^{+/+} und TWIK1^{-/-} Mäusen beobachtet werden (Abb. 15A). Zum besseren Vergleich der Daten wurden die gemessenen Aminosäurekonzentrationen (in μM) auf die jeweiligen Kreatinin-Konzentrationen (in mM) normalisiert ($[\text{AS}_{\text{Urin}}]/[\text{Krea}_{\text{Urin}}]$). Auch bei einer Trennung nach dem Geschlecht der untersuchten Mäuse (TWIK1^{+/+} Männchen gegen TWIK1^{-/-} Männchen, TWIK1^{+/+} Weibchen gegen TWIK1^{-/-} Weibchen) wurden keine signifikanten Unterschiede deutlich (Daten nicht gezeigt). Interessanterweise wurden starke Abweichungen bei der Aminosäureausscheidung zwischen den Geschlechtern beobachtet (Abb. 15B). Bei einem Vergleich zwischen TWIK1^{+/+} Männchen und TWIK1^{+/+} Weibchen war die Ausscheidung von 10 der 18 getesteten AS bei den Weibchen erhöht.

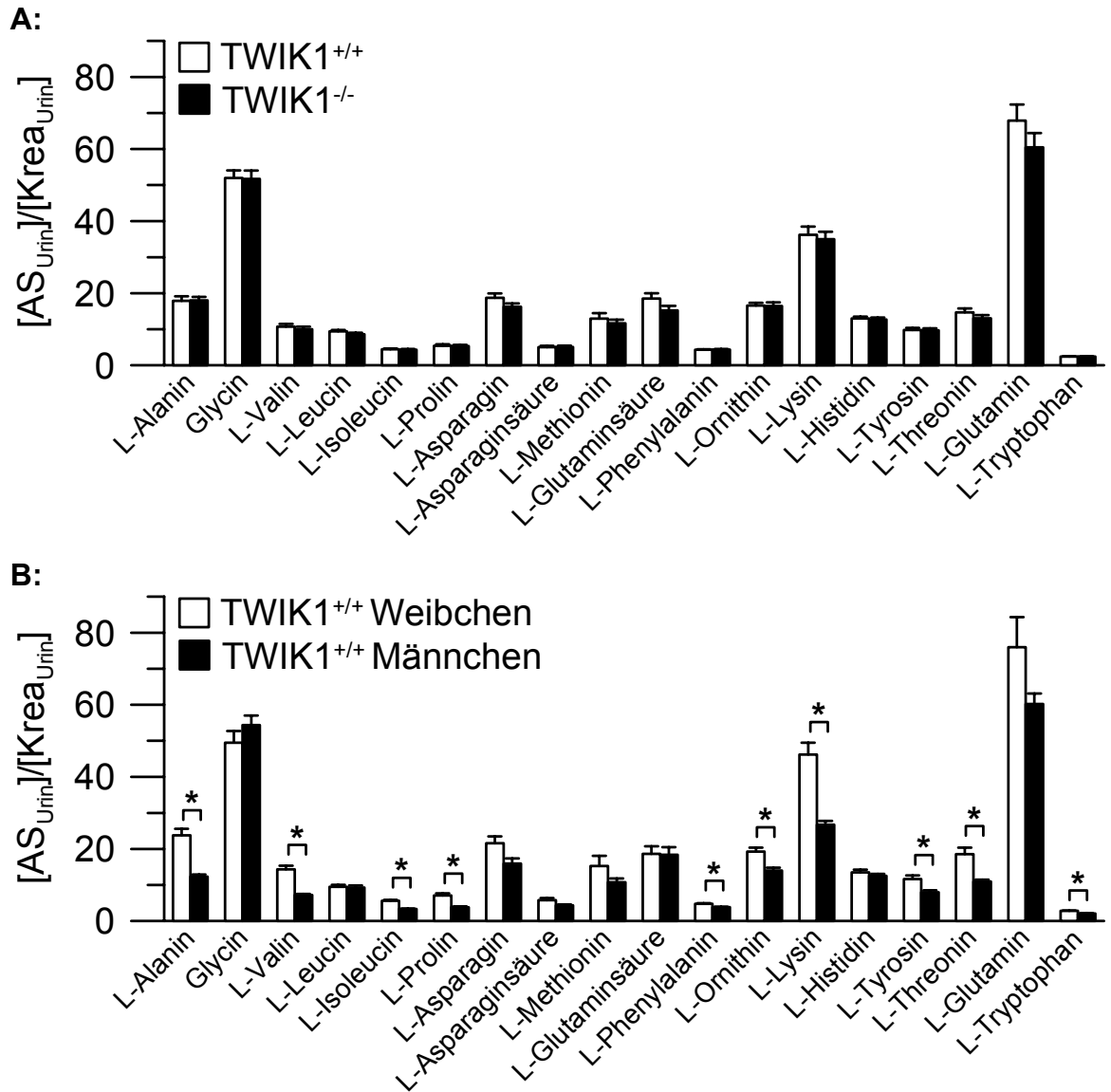


Abb. 15: Genotyp- und geschlechtsabhängige Aminosäureausscheidung

Die Bestimmung der Aminosäurekonzentration erfolgte im Spontanurin von TWIK1^{+/+} und TWIK1^{-/-} Mäusen mit Hilfe einer GC-MS Apparatur. Um eine unterschiedliche Konzentrierung des Urins auszugleichen, wurden die dargestellten Werte auf die Kreatinin-Konzentration im Urin normalisiert ($[AS_{Urin}]/[Krea_{Urin}]$). A: Ein Vergleich der renalen Aminosäureausscheidung bei TWIK1^{+/+} (n=43) und TWIK1^{-/-} (n=42) Mäusen zeigte keine Unterschiede. B: Bei einem Vergleich zwischen TWIK1^{+/+} Männchen (n=22) und TWIK1^{+/+} Weibchen (n=21) wurde beobachtet, dass die Ausscheidung von 10 der 18 getesteten Aminosäuren bei weiblichen Mäusen signifikant erhöht war.

4.1.8 Untersuchung von Endozytosewegen

Einige bisher veröffentlichte Befunde weisen darauf hin, dass TWIK1 möglicherweise eine Rolle bei Endozytoseprozessen im proximalen Tubulus der Nieren spielt (Decressac *et al.*, 2004; Nie *et al.*, 2005). Zu diesem Zweck wurden histologisch zwei verschiedene Endozytosewege untersucht, nämlich die rezeptorvermittelte Endozytose (RME) und die „Fluid-phase“ Endozytose (FPE). Zur Darstellung der FPE wurde TWIK1^{+/+} Mäusen eine Dextran-FITC Lösung intravenös injiziert, welche nach glomerulärer Filtration über diesen Weg vom proximalen Tubulus endozytiert wird. Die Vesikel können dann durch Fluoreszenzlicht entsprechender Wellenlänge sichtbar gemacht werden. Weiterhin erfolgte eine Kofärbung der Schnitte mit Cubilin, einem Rezeptorprotein der RME (Abb. 16). Zur Darstellung des Bürstensaums wurde zusätzlich ein DIC-Hellfeldbild angefertigt und mit den Fluoreszenzbildern überlagert. Gezeigt wird hier ein Ausschnitt aus dem frühproximalen Tubulus (S1), da hier die hauptsächliche Resorptions- bzw. Endozytoseleistung erbracht wird. Neben der charakteristischen Lokalisation an der Spitze des Bürstensaums war TWIK1 (grün) hier auch in den Mikrovilli und subapikal zu finden. Cubilin (rot) war ebenfalls auf diese Bereiche beschränkt und zeigte eine partielle Kollokalisierung mit TWIK1. Im Gegensatz dazu wurde keine Übereinstimmung mit den Endozytosevesikeln der FPE (blau) beobachtet, welche mehr im Inneren der Zelle lagen. Diese Befunde weisen darauf hin, dass TWIK1 wahrscheinlich nicht an der Fluid-phase Endozytose beteiligt ist. Eine mögliche Interaktion mit Mechanismen der rezeptorvermittelten Endozytose kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

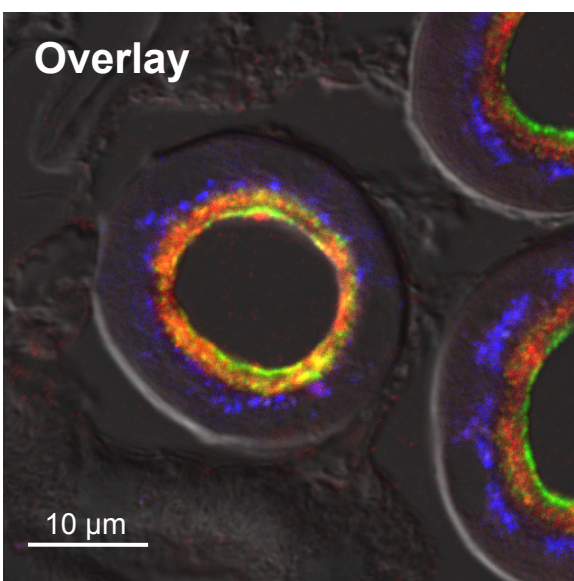
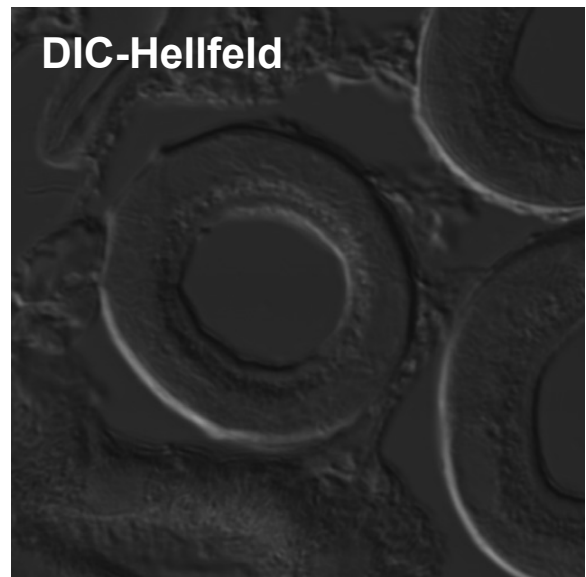
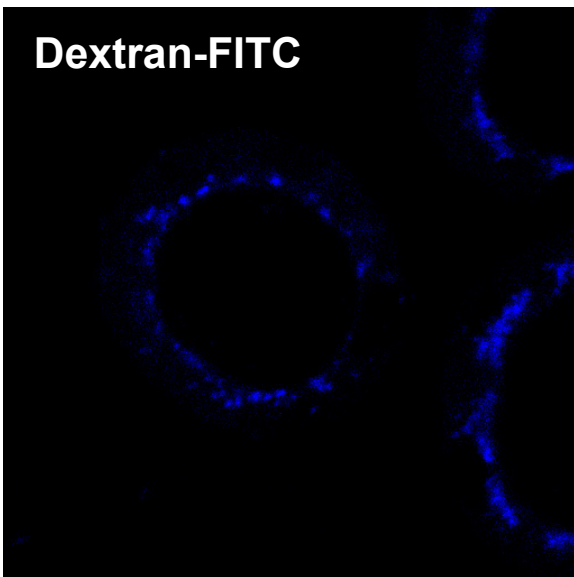
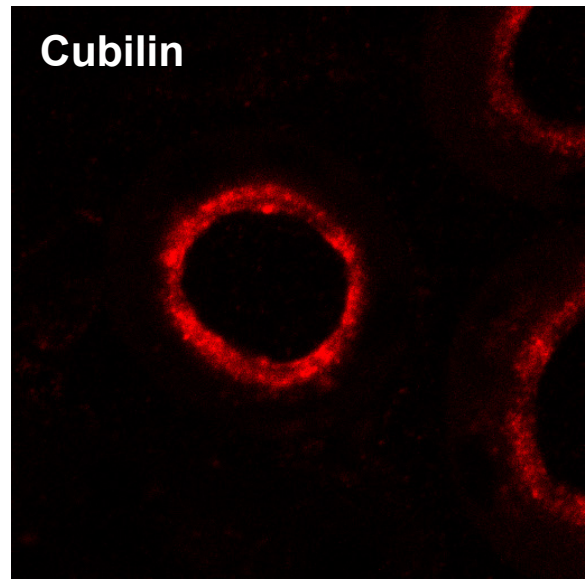
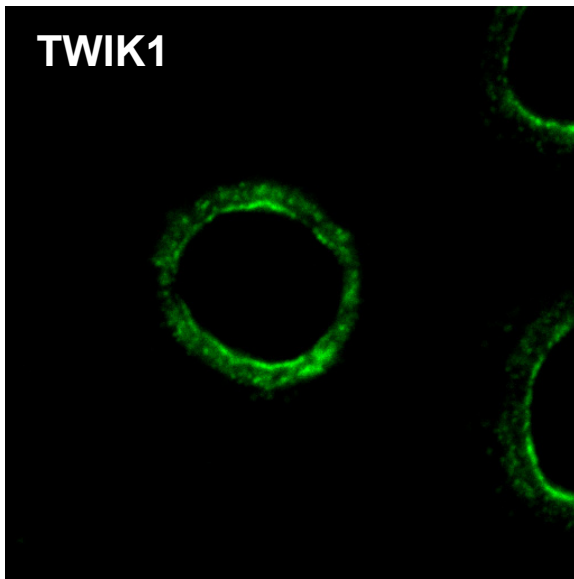


Abb. 16: TWIK1 und Endozytose im proximalen Tubulus

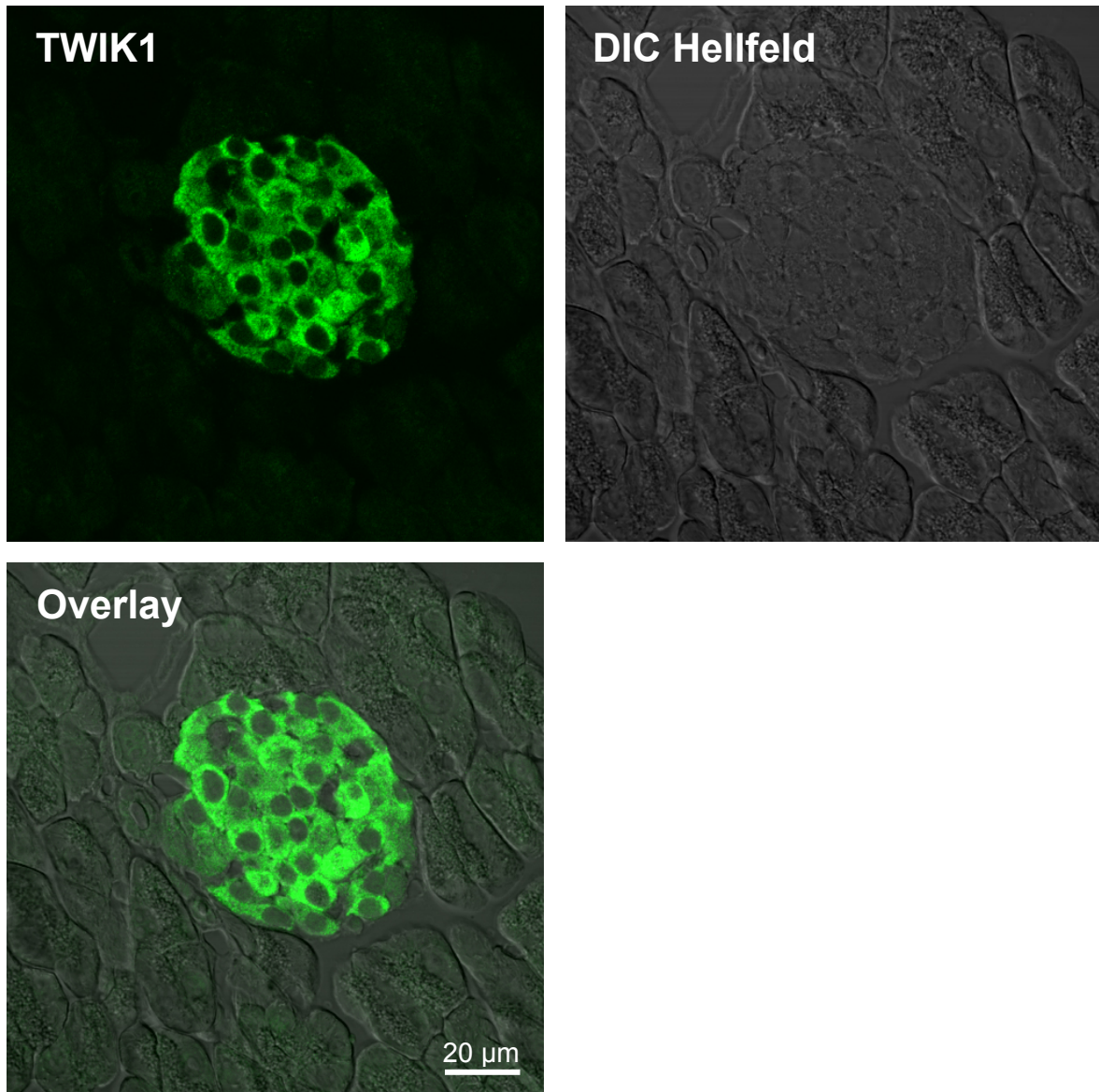
Dargestellt sind Tubuli aus dem S1 Segment des proximalen Tubulus einer TWIK1^{+/+} Maus. Als Marker für Vesikel der „Fluid-phase“ Endozytose (blau) wurde den Versuchsmäuse 10 min vor Fixierung intravenös eine Dextran-FITC Lösung (1%, 500 µl) appliziert. Die Kryoschnitte wurden weiterhin gegen TWIK1 (grün) und Cubilin, ein Rezeptorprotein der rezeptorvermittelten Endozytose (rot), gefärbt. Zusätzlich wurde ein DIC-Hellfeldbild zur Kennzeichnung des Bürstensaums angefertigt. Die subzelluläre Lokalisation wies keine Übereinstimmung mit Vesikeln der FPE auf. Allerdings wurde eine partielle Kolokalisation von TWIK1 mit Cubilin beobachtet.

4.2 TWIK1 im Pankreas der Maus

4.2.1 Lokalisation von TWIK1 im murinen Pankreas

Die Bauchspeicheldrüse (Pankreas) gliedert sich anatomisch und funktionell in das endokrine und das exokrine Pankreas. Das exokrine Pankreas ist eine rein seröse Drüse und die wichtigste Verdauungsdrüse des Menschen. Der Verdauungssaft (Pankreassaft) gelangt über den Wirsung-Gang (Ductus pancreaticus) in den Zwölffingerdarm und enthält unter anderem Peptidasen (Trypsinogen, Chymotrypsinogen, Carboxypeptidase, Proelastase), das zuckerspaltende Enzym α -Amylase, Ribo- und Desoxyribonucleasen und zur Fettspaltung benötigte Lipasen. Im endokrinen Drüsenanteil des Pankreas werden Hormone synthetisiert und systemisch in das Blut abgegeben. Der endokrine Teil macht etwa 2% des Gesamtorgans aus und ist inselförmig über das gesamte Pankreas verteilt (Langerhans Inseln). Die Inseln bestehen aus einer heterogenen Zellpopulation, wobei in den α -Zellen Glucagon, in den β -Zellen Insulin, in den δ -Zellen Somatostatin und in den PP-Zellen das Pankreas Poly Peptid synthetisiert wird. In Langerhans Inseln von Nagetieren gruppieren sich die β -Zellen, welche rund 70% der Langerhanszellen ausmachen, in der Mitte der Insel, während die α - (20%), δ - (10%) und PP-Zellen (5%) vornehmlich an deren Rand zu finden sind (Cabrera *et al.*, 2006).

Für die folgenden Lokalisationsstudien wurden 4 µm dicke Paraffinschnitte des Pankreas von TWIK1^{+/+} Mäusen angefertigt und mit dem beschriebenen anti-TWIK1 Ak gefärbt. Wie in Abb. 17 zu sehen ist, beschränkte sich die Lokalisation von TWIK1 (grün) fast ausschließlich auf die Langerhans Inseln des endokrinen Pankreas. Zur besseren Darstellung der Histologie wurde zusätzlich ein Hellfeldbild (DIC Hellfeld) angefertigt und mit dem Fluoreszenzbild überlagert (Overlay). In den stark granulierten Zellen des exokrinen Pankreas, welche sich optisch gut von den Inselzellen abheben, war nur ein sehr schwaches TWIK1 Signal zu beobachten.

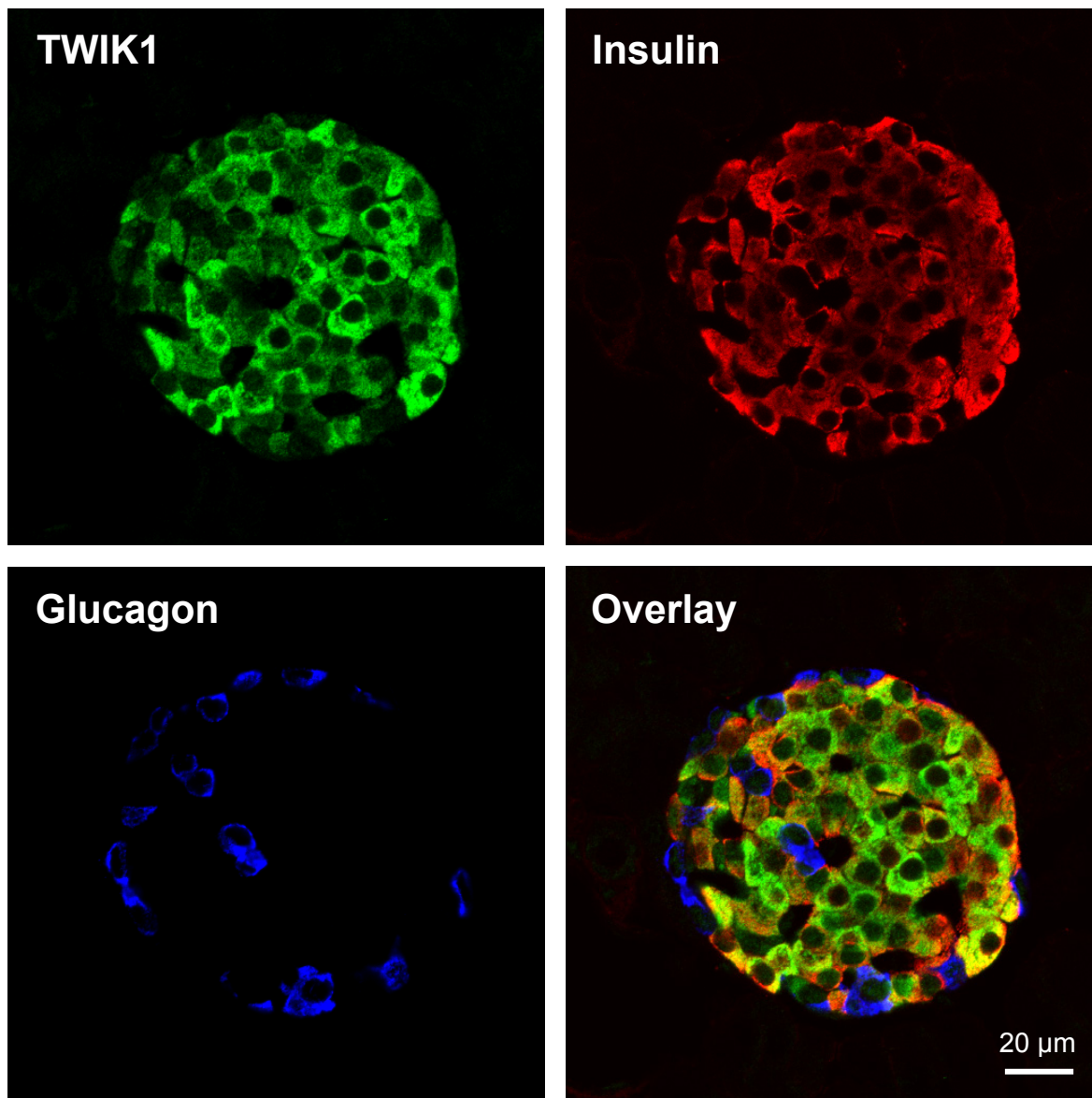
**Abb. 17: Lokalisation von TWIK1 im Pankreas der Maus**

Der dargestellte Paraffinschnitt zeigt einen Ausschnitt aus dem Pankreas einer TWIK1^{+/+} Maus. Im DIC-Hellfeldbild sieht man eine Langerhans Insel, umgeben von exokrinem Pankreasgewebe. Eine Überlagerung mit der Fluoreszenzaufnahme von TWIK1 (grün) zeigt deutlich, dass die TWIK1 Färbung ausschließlich auf die Zellen des endokrinen Pankreas beschränkt war.

Da die Langerhans Inseln aus vier verschiedenen Zellarten zusammengesetzt sind, wurde in einem nächsten Schritt geprüft, ob die Lokalisation von TWIK1 nur auf bestimmte Zelltypen beschränkt war. Dazu wurden Paraffinschnitte des Pankreas mit anti-TWIK1 Ak, anti-Glucagon Ak (α -Zellen), anti-Insulin Ak (β -Zellen) und anti-Somatostatin Ak (δ -Zellen) gefärbt. Auf eine Überprüfung von PP-Zellen wurde verzichtet. Wie in Abb. 18A zu sehen ist, konzentrierte sich das TWIK1 Signal (grün) überwiegend auf die Insulin produzierenden β -Zellen (rot). In den Glucagon produzierenden α -Zellen (blau) war die TWIK1 Färbung sehr schwach oder nicht detektierbar. Auch in den Somatostatin

produzierenden δ -Zellen (Abb. 18B, rot) wurde nur sehr wenig TWIK1 beobachtet, wenngleich mehr als in α -Zellen.

A:



B:

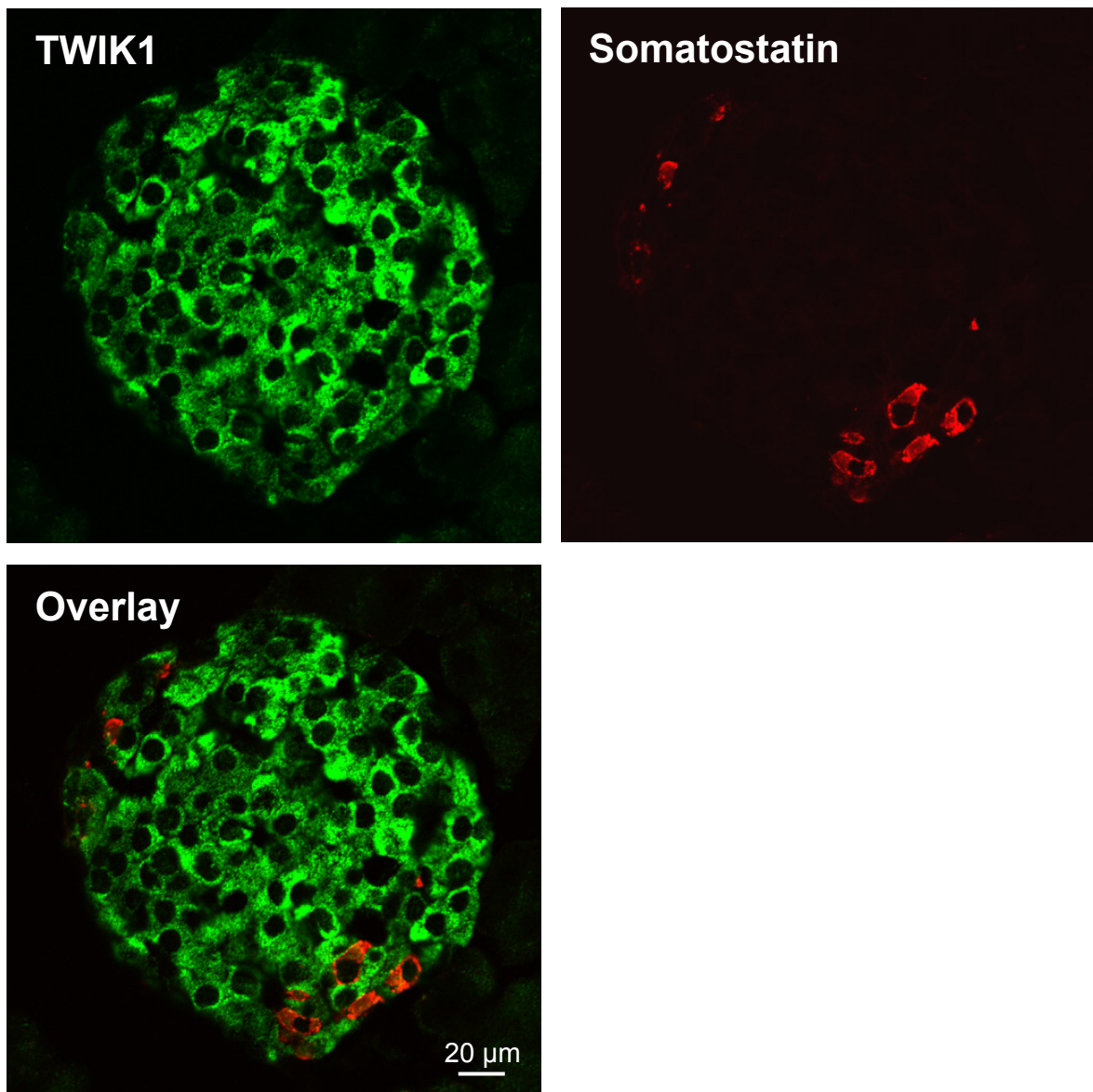


Abb. 18: Lokalisation von TWIK1 in den Langerhans Inseln

Um die Lokalisation von TWIK1 in den Langerhans Inseln weiter einzuschränken, wurden Paraffinschnitte zusätzlich gegen Insulin (rot), Glucagon (grün) (Abb. A) und Somatostatin (rot) (Abb. B) gefärbt. TWIK1 (grün) wurde nahezu ausschließlich in den Insulin produzierenden β -Zellen exprimiert. In den Glucagon produzierenden α -Zellen oder den Somatostatin produzierenden δ -Zellen war die TWIK1 Färbung sehr gering oder abwesend. Auffallend war die vornehmlich intrazelluläre Lokalisation von TWIK1.

Bei näherer Betrachtung der subzellulären Lokalisation fiel auf, dass TWIK1 relativ homogen über das Zytosol verteilt war. Dies ist ungewöhnlich für einen Kanal, welcher normalerweise hauptsächlich auf die Membran beschränkt ist. Eine konfokale Analyse (Abb. 19) ergab zudem, dass ein Teil des TWIK1 Signals kolokal zu insulinhaltigen Granula war. Im linken Bild sieht man einige Inselzellen, die mit anti-TWIK1 Ak (grün) und

anti-Insulin Ak (rot) gefärbt wurden. Weiße Bereiche markieren Gebiete, in denen beide Fluoreszenzsignale unter den gewählten Bedingungen kolokal liegen. Der grüne Rahmen gibt die Fläche an, für den der Scatter-Plot (rechtes Bild) erstellt wurde. Hier wird die Helligkeitsverteilung für jeden Pixel beider Kanäle graphisch dargestellt, wobei ChS1-T3 dem grünen Kanal (TWIK1) und Ch3-T2 dem roten Kanal (Insulin) entspricht. Bei einem Bild in 12-Bit Farbtiefe reicht die Helligkeit eines Pixels (Count) von 0 (schwarz) bis 4096 (max. Intensität). Die Häufigkeit, mit der ein Pixel gegebener Helligkeit vorkommt, wird durch eine Farbskala am unteren Rand dargestellt. Das dargestellte Kreuz kann beliebig gewählt werden und unterteilt den Scatter-Plot in vier Flächen. Die Fläche unten links wird nicht in die Auswertung einbezogen und sollte so gesetzt werden, dass alle schwachen, unspezifischen Signale ausgeschlossen werden. Für diese Analyse wurde ein sehr konservativer Schwellenwert von 750 Counts verwendet. Fläche 1 und 2 markieren Bereiche ohne Kolokalität für den jeweiligen Kanal (Fläche 1 für Insulin, Fläche 2 für TWIK1). Fläche 3 beinhaltet Pixel der jeweiligen Kanäle, welche bei vorgegebenem Schwellenwert kolokal lagen und wurden im Fluoreszenzbild links in Weiß dargestellt. Die Auswertung erfolgte durch die LSM 510 Software von Zeiss.

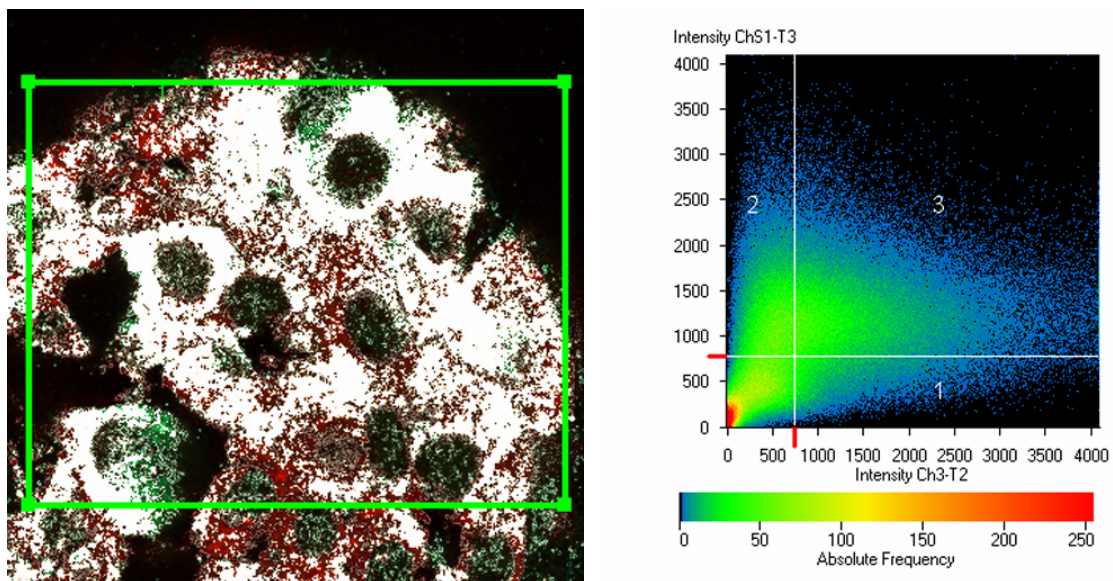


Abb. 19: Partielle Kolokalisation von TWIK1 mit insulinhaltigen Granula

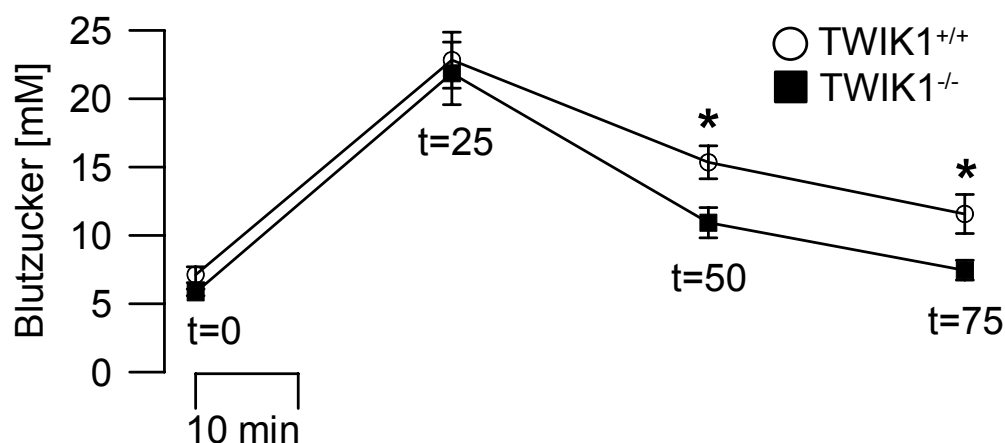
Konfokaler Ausschnitt aus einer Langerhansinsel des Pankreas einer TWIK1^{+/+} Maus (linkes Bild). Der Paraffinschnitt wurde gegen TWIK1 (grün) und Insulin (rot) gefärbt. Weiße Flächen markieren Bereiche, in denen TWIK1 und insulinhaltige Granula kolokal lagen. Der grüne Rahmen gibt den Bereich an, für welchen der Scatter-Plot (rechtes Bild) erstellt wurde. Fläche 3 des Scatter-Plots enthält alle Pixel, welche bei einem gesetzten Schwellenwert von 750 Counts für jeden Kanal noch kolokal lagen. Diese wurden dann im Fluoreszenzbild links in Weiß dargestellt. Man kann erkennen, dass die intrazelluläre Lokalisation von TWIK1 in weiten Teilen der β -Zelle mit der der insulinhaltigen Vesikeln übereinstimmte.

4.2.2 Intraperitonealer Glucosetoleranztest

Um einen Einblick in die physiologische Rolle von TWIK1 in den β -Zellen der Langerhans Inseln zu bekommen, wurde zunächst ein intraperitonealer Glucosetoleranztest (GTT) an TWIK1^{+/+} und TWIK1^{-/-} Mäusen durchgeführt. Den Versuchsmäusen, welche zuvor 24 h ohne Futter waren, wurde intraperitoneal (i.p.) eine Glucoselösung (2 mg/g KG) injiziert. Vor der Applikation (t = 0 min) wurde Blut abgenommen, ebenso 25 min, 50 min und 75 min nach Injektion. In dem gewonnenen Plasma wurde der Blutzucker bestimmt und für die Zeitpunkte t = 0 min, 25 min ebenfalls die Insulinkonzentration gemessen.

Abb. 20A zeigt den zeitlichen Verlauf des Blutzuckers während des Experiments. Sowohl unter Kontrollbedingungen als auch 25 min nach der Injektion, als die Glucose im Blut etwa ihren Spitzenwert erreichte, wurden keine Unterschiede zwischen TWIK1^{+/+} und TWIK1^{-/-} Mäusen beobachtet. Allerdings zeigten TWIK1^{+/+} Mäuse 50 min bzw. 75 min nach Applikation der Glucoselösung signifikant erhöhte Blutzuckerwerte im Vergleich zu TWIK1^{-/-} Mäusen. Um zu testen, ob die beobachteten Unterschiede im Blutzucker auf eine unterschiedliche Insulinfreisetzung zurückzuführen war, wurde zu den Zeitpunkten t = 0 min, 25 min zusätzlich die Insulinkonzentration im Plasma gemessen (Abb. 20B). Hier zeigte sich, dass der bereits unter basalen Bedingungen (t = 0 min) tendenziell höhere Insulinspiegel bei TWIK1^{-/-} Mäusen nach Glucosebelastung (t = 25 min) auf mehr als den doppelten Wert von TWIK1^{+/+} Mäusen anstieg. Somit konnte der beobachtete, schnellere Abfall des Blutzuckers bei TWIK1^{-/-} Mäusen mit einer verstärkten Insulinfreisetzung erklärt werden.

A:



B:

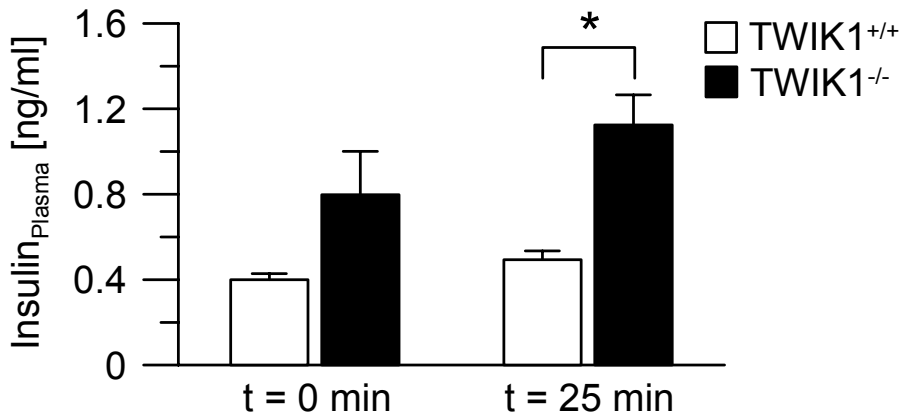


Abb. 20: Intraperitonealer Glucosetoleranztest

Ein intraperitonealer Glucosetoleranztest wurde an TWIK1^{+/+} (n=6) und TWIK1^{-/-} (n=6) Mäusen durchgeführt. Zu den Zeitpunkten t= 0, 25, 50 und 75 min wurde den Versuchstieren Blut abgenommen. A: Verlauf des Blutzuckers während des Experiments. Unter basalen Blutzuckerwerten (t=0 min) und bei maximaler Plasmakonzentration (t=25 min) wurde kein Unterschied zwischen TWIK1^{+/+} und TWIK1^{-/-} Mäusen beobachtet. Beim Abfallen des Blutzuckers (t= 50, 75 min) zeigten TWIK1^{-/-} Mäuse jedoch signifikant niedrigere Glucosewerte im Plasma. B: Insulinkonzentration im Plasma bei t=0 min und t=25 min. Der basal schon erhöhte Insulinspiegel bei TWIK1^{-/-} Mäusen wird unter Stimulation der Insulinsekretion signifikant unterschiedlich.

4.2.3 Stimulation der Insulinsekretion durch Fructose Diät

In einem weiteren *in vivo* Experiment wurde die Insulinsekretion bei TWIK1^{+/+} und TWIK1^{-/-} Mäusen durch eine Fructose Diät stimuliert. Es ist bekannt, dass die Gabe von hohen Dosen Fructose über einen längeren Zeitraum hinweg bei Nagetieren oder Menschen zu einer Insulinresistenz führt. Diese geht einher mit erhöhten Insulinwerten (Hyperinsulinämie) und erhöhten Blutzuckerwerten (Hyperglycämie) (Hwang *et al.*, 1987; Kasim-Karakas *et al.*, 1996; Higashiura *et al.*, 2000; Basciano *et al.*, 2005). Den Versuchstieren wurde 24 Tage lang Fructose über das Trinkwasser verabreicht (10%). Zu Beginn des Experiments wurde den Mäusen Blut abgenommen, weiterhin nach 11 und 24 Tagen.

Abb. 21A zeigt den Verlauf des Blutzuckers während der Diät. Zu Anfang des Experiments wurde kein Unterschied zwischen TWIK1^{+/+} und TWIK1^{-/-} Mäusen beobachtet. Nach 11 bzw. 24 Tagen Fructose Diät jedoch zeigten TWIK1^{-/-} Mäuse signifikant erniedrigte Blutglucosewerte im Vergleich zu TWIK1^{+/+} Mäusen.

Nach 24 Tagen Diät wurde die Konzentration an Insulin (Abb. 21B) und C-Peptid (Abb. 21C) im Plasma bestimmt. Das C-Peptid ist ein Teil des Proinsulins und verbindet die A- und B-Kette des Insulins. Nach Spaltung in den β -Zellen der Langerhans Inseln wird dieses in äquimolaren Mengen zusammen mit Insulin ausgeschüttet, weswegen zirkulierendes C-Peptid als Maß für die sekretorische Aktivität von β -Zellen herangezogen

werden kann. Die Messung des C-Peptids wird oft der von Insulin vorgezogen, da es in wesentlich geringerem Umfang von der Leber abgebaut wird. Weiterhin zeigt es eine geringere metabolische Ausscheidungsrate und wird auch nicht von Insulin-Antikörpern erkannt (Hoekstra *et al.*, 1982; Bonser and Garcia-Webb, 1984). In Übereinstimmung mit dem vorhergehenden Experiment lagen sowohl die Insulin als auch die C-Peptid Werte bei den TWIK1^{-/-} Mäusen höher als bei TWIK1^{+/+} Mäusen. Daraus konnte geschlossen werden, dass ein defektes TWIK1 Protein direkt oder indirekt zu einer höheren Insulinsekretion führte, was sich wiederum in einem niedrigeren Blutzucker bei TWIK1^{-/-} Mäusen zeigte. Dieser Phänotyp wurde aber erst bei einer forcierten Stimulation der Insulinsekretion sichtbar.

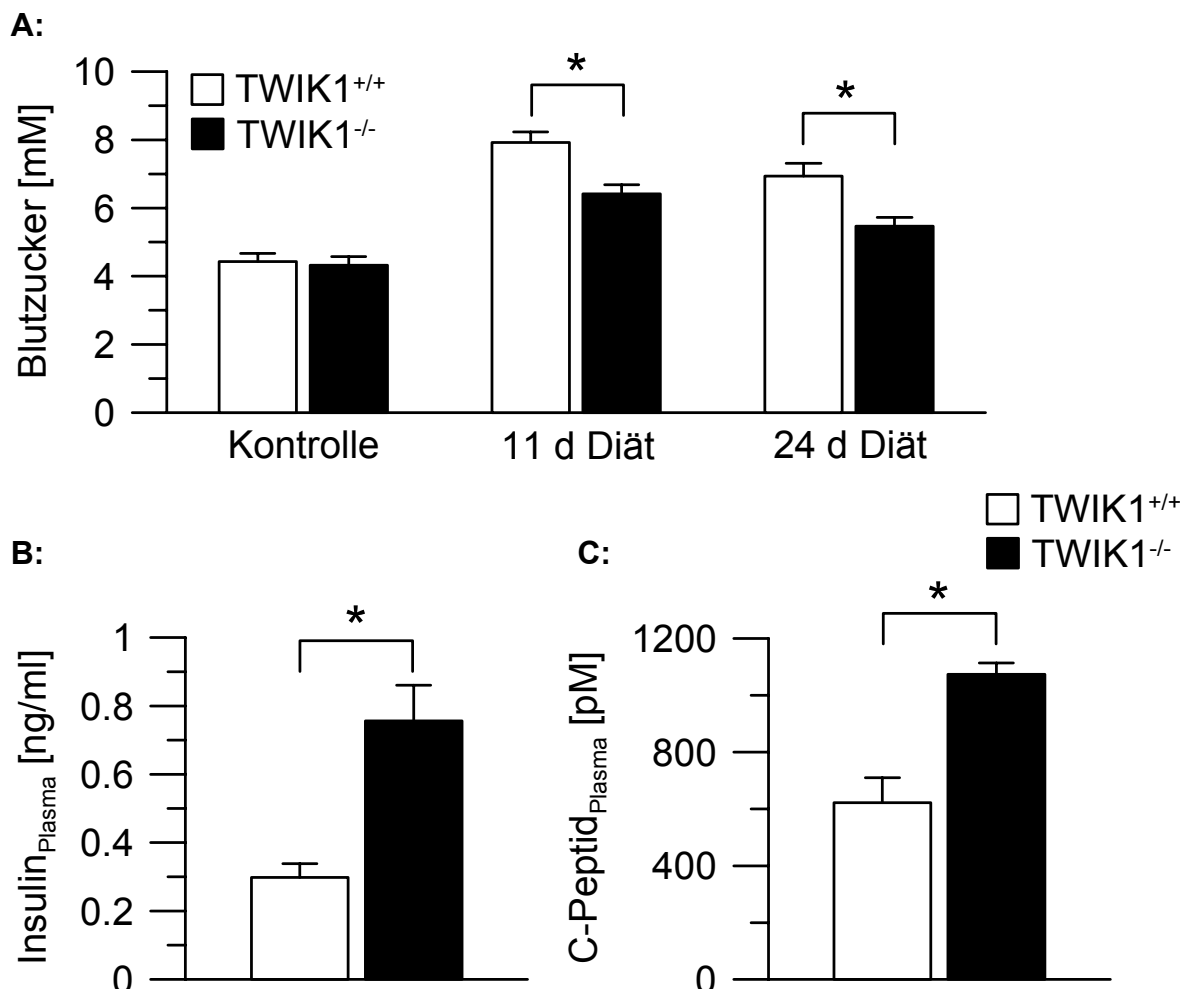


Abb. 21: Stimulation der Insulinsekretion durch Fructose Diät

TWIK1^{+/+} (n=10) und TWIK1^{-/-} (n=10) Mäuse wurden 24 d mit Fructose im Trinkwasser (10%) behandelt. Dies führte bei den Versuchstieren sowohl zu einer Hyperglycämie als auch zu einer Hyperinsulinämie. Zu den Zeitpunkten t = 0, 11 und 24 d wurde Blut abgenommen. A: Verlauf des Blutzuckers während des Experimentes. Zu Beginn des Experimentes war kein Unterschied zwischen TWIK1^{+/+} und TWIK1^{-/-} Mäusen zu beobachten. Nach 11 bzw. 24 d Fructose Diät zeigten TWIK1^{-/-} Mäuse jedoch signifikant erniedrigte Blutzuckerwerte. B: Insulin und C-Peptid im Plasma waren am Ende des Experimentes (t = 24 d) bei TWIK1^{-/-} Mäusen signifikant höher als bei TWIK1^{+/+} Mäusen.

4.2.4 Mikroskopische Vermessung von Langerhans Inseln

Im nächsten Experiment sollte bestimmt werden, ob morphologische Veränderungen an den Langerhans Inseln von TWIK1^{-/-} Mäusen zu der beobachteten verstärkten Insulinfreisetzung führten. In diesem Fall wurde histologisch an Paraffinschnitten des Pankreas untersucht, ob Unterschiede in der Inselgröße bei TWIK1^{+/+} und TWIK1^{-/-} Mäusen bestanden. Zusätzlich wurde der prozentuale Anteil an α - und δ -Zellen in den Inseln ermittelt, welcher unter Vernachlässigung der PP-Zellen auch als indirektes Maß für den prozentualen Anteil an β -Zellen herangezogen werden konnte. Auf eine aufwendige Bestimmung der Gesamtzahl an Langerhans Inseln pro Pankreas wurde verzichtet. Abb. 22A zeigt die statistische Auswertung der Gesamtfläche. Interessanterweise zeigte sich hier eine verminderte Inselfläche bei TWIK1^{-/-} Mäusen im Vergleich zu TWIK1^{+/+} Mäusen. Der prozentuale Anteil an α - und δ -Zellen war nicht verschieden (Abb. 22B), was unter Annahme einer vergleichbaren Anzahl an Inseln pro Pankreas auf eine höhere β -Zellmasse bei TWIK1^{+/+} Mäusen schließen ließ. Dieser Befund zeigte, dass die erhöhte Insulinfreisetzung bei TWIK1^{-/-} Mäusen nicht mit einem höheren Anteil an β -Zellen erklärt werden konnte. Vielmehr hatte es den Anschein, dass die β -Zellmasse bei TWIK1^{-/-} Mäusen kompensatorisch herabreguliert wurde, um einer Insulinüberproduktion entgegenzuwirken.

Die gezeigten prozentualen Flächen an α - und δ -Zellen waren kleiner als die in der Literatur angegebenen Werte (Cabrera *et al.*, 2006). Dies war durch die Art der Messung, nämlich über Fluoreszenzanalyse durch Anfärben von Glucagon und Somatostatin, erklärbar. Dabei wurde nur das Zytosol erfasst, da der Zellkern, welcher einen erheblichen Anteil an der Gesamtfläche der Zelle hat, frei von Fluoreszenz war. Auch Randbereiche von Zellen, an denen das Signal nur sehr schwach war, wurden durch Setzen eines Schwellenwerts ausgeschlossen. Da aber die Zellkerngröße augenscheinlich nicht verschieden war und immer ein gleicher Schwellenwert verwendet wurde, waren die erhaltenen Ergebnisse trotzdem vergleichbar.

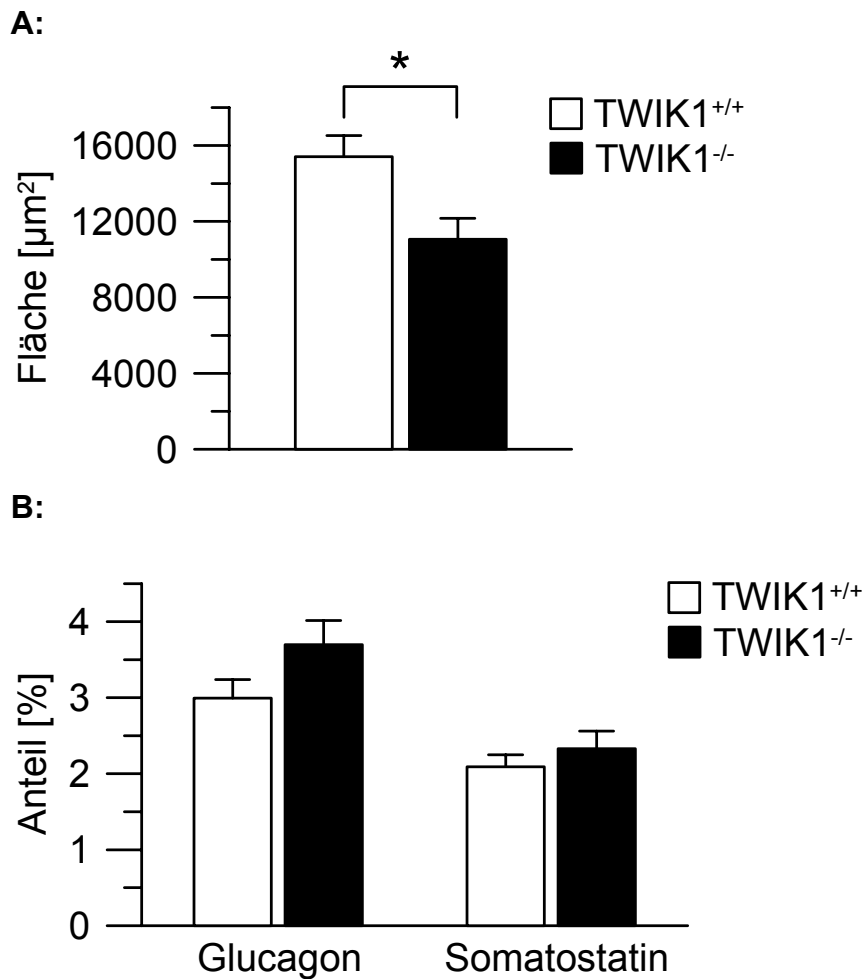


Abb. 22: Mikroskopische Vermessung von Langerhans Inseln

A: Bestimmung der Gesamtfläche von Langerhans Inseln von TWIK1^{+/+} (n=4) und TWIK1^{-/-} (n=4) Mäusen. Insgesamt wurden bei TWIK1^{+/+} Mäusen 87 und bei TWIK1^{-/-} Mäusen 93 verschiedene Inseln ausgewertet. Dabei zeigte sich, dass Langerhans Inseln von TWIK1^{-/-} Mäusen im Mittel kleiner waren als die von TWIK1^{+/+} Mäusen. B: Durch Anfärben der Paraffinschnitte gegen Glucagon und Somatostatin wurde der prozentuale Anteil an α - und δ -Zellen ermittelt. Hier wurde kein Unterschied zwischen TWIK1^{+/+} und TWIK1^{-/-} Mäusen beobachtet.

4.2.5 Wirkung von Glucose auf isolierte Langerhans Inseln

In diesem *in vitro* Experiment sollte geprüft werden, ob die beobachtete verstärkte Insulinfreisetzung bei TWIK1^{-/-} Mäusen direkt auf ein defektes TWIK1 Protein in den Langerhans Inseln zurückzuführen war. Als alternative Hypothese wäre denkbar gewesen, dass durch den TWIK1 knockout extrapankreatische, die Insulinsekretion regulierende Faktoren modifiziert werden, das heißt, der beobachtete Effekt nicht durch einen TWIK1-Defekt in den Langerhans Zellen verursacht wurde. Um beide Hypothesen zu testen, wurden Langerhans Inseln von TWIK1^{+/+} und TWIK1^{-/-} Mäusen isoliert und mit Glucoselösungen verschiedener Konzentration behandelt (Kontroll-Lösung: 2,8 mM, weiterhin Lösungen mit 10 mM und 16,7 mM Glucose). Dabei wurden die Zellen

permanent während 95 min bei einem konstanten Fluss von 0,5 ml/min gespült und das anfallende Perfusat in Intervallen von einer Minute gesammelt. Im Anschluss wurde in den jeweiligen Fraktionen die Konzentration an sezerniertem Insulin bestimmt. Wie in Abb. 23 zu sehen ist, schieden unter Kontrollbedingungen Inseln von TWIK1^{+/+} und TWIK1^{-/-} Mäusen etwa die gleiche Menge Insulin aus. Nach Superfusion der Zellen mit Hoch-Glucose-Lösungen allerdings zeigte sich eine verstärkte Insulinausschüttung bei Langerhans Inseln von TWIK1^{-/-} Mäusen. Diese betraf sowohl die schnelle Phase, als auch die nachfolgend langsame Phase der Insulinsekretion. Ebenfalls auffallend war, dass Inseln von TWIK1^{-/-} Mäusen nach Beendigung der Stimulation längere Zeit benötigten, um auf die basale Insulinausschüttung zurückzukehren. Die Resultate dieses Experiments wiesen somit darauf hin, dass die verstärkte Aktivität der β -Zellen von TWIK1^{-/-} Mäusen direkt durch ein defektes TWIK1 Protein in Langerhans Inseln verursacht wurde, da sekundäre Faktoren der Insulinfreisetzung durch Isolation der Inseln nicht wirksam werden konnten.

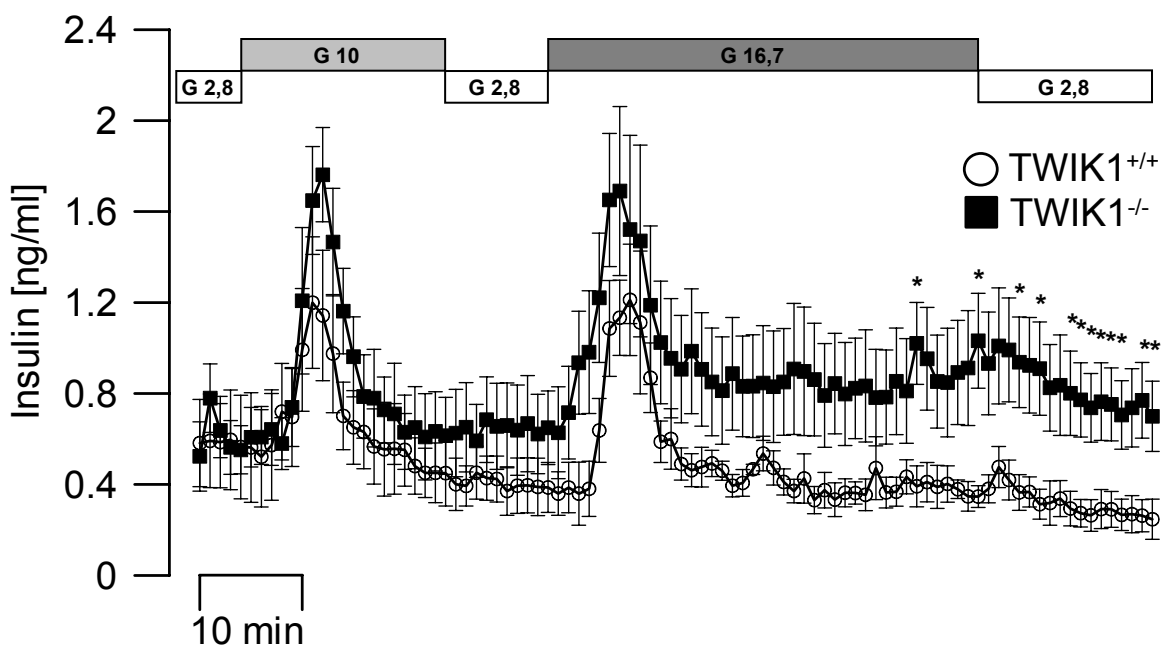


Abb. 23: Wirkung von Glucose auf isolierte Langerhans Inseln *in vitro*

Isolierte Langerhans Inseln von TWIK1^{+/+} (n=6) und TWIK1^{-/-} (n=6) Mäusen wurden mit Glucoselösungen verschiedener Konzentration superfundiert (Kontrolle: 2,8 mM, weiterhin Lösungen mit 10 mM und 16,7 mM Glucose) und dabei die Menge an sezerniertem Insulin pro Minute gemessen. Inselzellen von TWIK1^{-/-} Mäusen zeigten dabei eine höhere Insulinsekretion, sowohl in der initialen schnellen Phase als auch in der nachfolgenden langsamen Phase der Insulinausschüttung.

4.2.6 Ca²⁺-Messungen an isolierten Inselzellen

Die allgemeine Lehrmeinung besagt, dass die Exozytose insulinhaltiger Granula in den β -Zellen des Pankreas durch eine Erhöhung des zytosolischen Ca²⁺ ausgelöst wird. Die verstärkte Insulinfreisetzung bei TWIK1^{-/-} Mäusen könnte daher durch eine höhere intrazelluläre Ca²⁺-Aktivität bedingt sein. Um dies zu überprüfen wurden Ca²⁺-Messungen an isolierten Inselzellen von TWIK1^{+/+} und TWIK1^{-/-} Mäusen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 durchgeführt. Dabei wurde die Insulinfreisetzung mit Glucose stimuliert (Kontrolle: 5 mM, Stimulationslösungen mit 10 mM und 20 mM Glucose) und die relative Änderung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration gemessen. Abb. 24A zeigt ein repräsentatives Experiment an Inselzellen einer TWIK1^{+/+} Maus. Eine Erhöhung der Glucose im Bad, sowohl von 5 mM auf 10 mM als auch von 5 mM auf 20 mM, führte beide Male initial zu einem leichten Absinken der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration. Dies war sehr wahrscheinlich dadurch bedingt, dass durch Metabolisierung der vermehrt angebotenen Glucose mehr intrazelluläres ATP vorhanden war. Dies führte so zu einem gesteigerten Auswärtstransport von Ca²⁺ durch membranständige oder sarkoplasmatische Ca²⁺-ATPasen aus dem Zytosol. Nach dieser anfänglichen Erniedrigung folgte etwa 2 min nach Erhöhung der Badglucose ein rapides Ansteigen der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration. Der Wechsel von 5 mM auf 10 mM Glucose bewirkte meist einen nur kurz anhaltenden Ca²⁺-Peak, welcher rasch wieder auf basale Werte zurückging. Diesem folgte in einigen Experimenten kurz danach ein weiterer Peak von geringerer Höhe (nicht dargestellt). Beim Wechsel von 5 mM auf 20 mM Glucose kam es ebenfalls initial zu einem Peak etwa gleicher Höhe. Dieser fiel aber nicht sofort wieder auf Basiswerte ab, sondern mündete in eine Plateauphase variabler Länge, welche meist von einer oszillierenden Ca²⁺-Freisetzung begleitet wurde. Nach Zugabe von Kontroll-Lösung reagierten die meisten Zellen mit einem erneuten schwachen Anstieg des Ca²⁺, die Ursachen hierfür sind allerdings unklar.

Im Vergleich dazu wurde in Abb. 24B der Verlauf eines Experiments von Inselzellen einer TWIK1^{-/-} Maus dargestellt. Da auf den ersten Blick kein Unterschied zu Zellen von TWIK1^{+/+} Mäusen zu sehen war, wurde eine detaillierte Analyse der Daten durchgeführt (Abb. 24C). Dabei wurde die mittlere Ratio 340/380 einer jeweiligen Periode (a-e) als Maß für die durchschnittliche Ca²⁺-Aktivität und die Höhe der Peaks als Maß für die maximale zytosolische Ca²⁺-Konzentration ermittelt (P10, P20). Interessanterweise führte aber ein defektes TWIK1 Protein nicht, wie erwartet, zu einer verstärkten Ca²⁺-Freisetzung in β -Zellen von TWIK1^{-/-} Mäusen. Vielmehr zeigte sich eine eher leicht verminderte Ca²⁺-Antwort, vor allem in der Höhe der Peaks (P10, P20) und während Behandlung mit 20 mM Glucose (d). Die gewonnenen Daten weisen also darauf hin, dass die verstärkte

Insulinfreisetzung der Inselzellen von $TWIK1^{-/-}$ Mäusen nicht auf eine höhere intrazelluläre Ca^{2+} Freisetzung zurückgeführt werden kann.

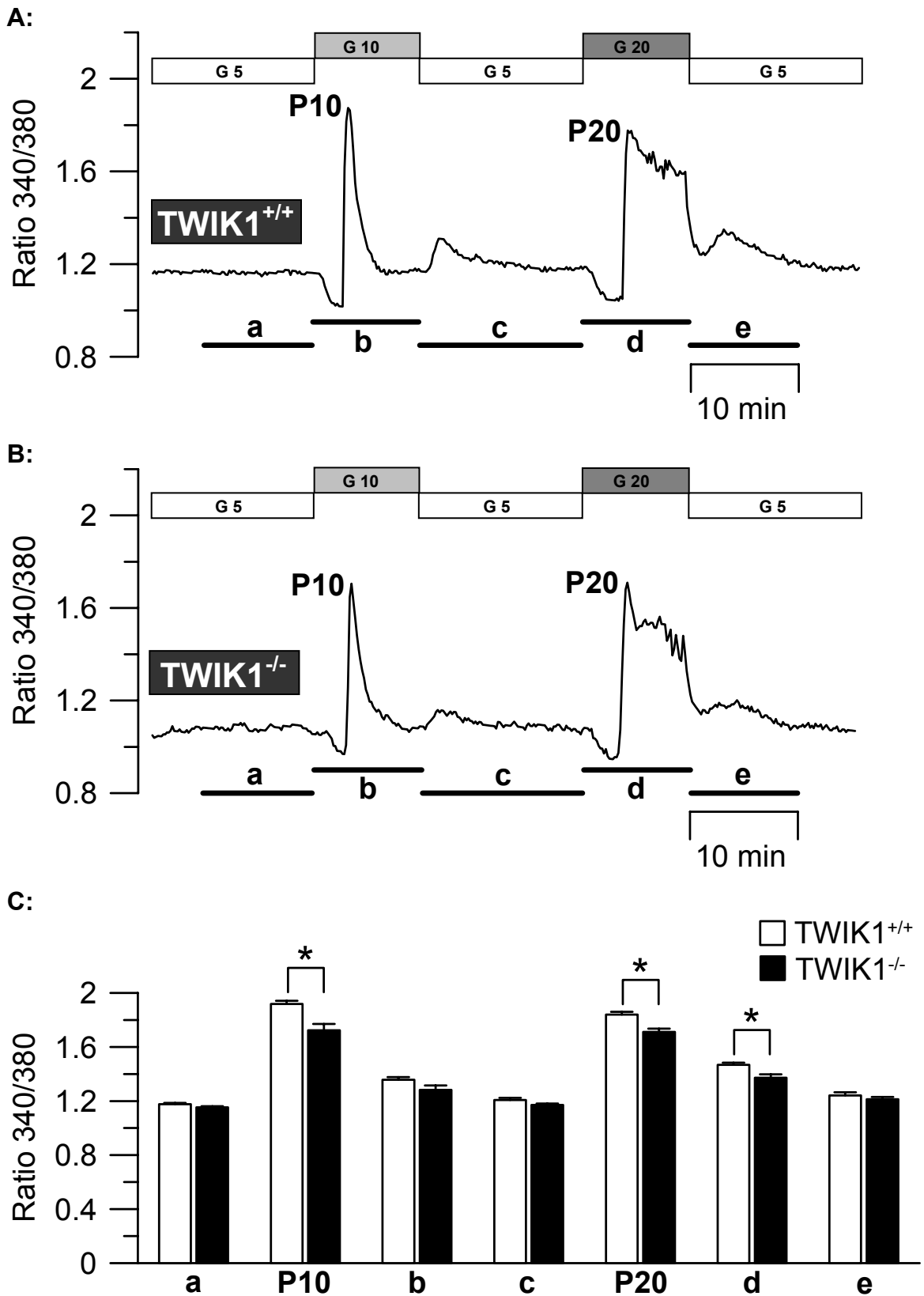


Abb. 24: Ca²⁺-Messungen an isolierten Inselzellen

Dargestellt sind zwei repräsentative Experimente an isolierten Inselzellen jeweils einer TWIK1^{+/+} (A) und einer TWIK1^{-/-} Maus (B). Die Abbildungen zeigen den zeitlichen Verlauf der relativen intrazellulären Ca²⁺-Aktivität unter Kontrollbedingungen (5 mM Glucose) und während Stimulation der Insulinsekretion mit Glucoselösungen hoher Konzentration (10 mM und 20 mM). Die Messung erfolgte mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2. Die dargestellten Kurven weichen kaum voneinander ab. C: Statistische Auswertung der Ca²⁺-Messungen an isolierten Inselzellen von TWIK1^{+/+} (n=15) und TWIK1^{-/-} (n=12) Mäusen. Die Säulen a-e entsprechen der mittleren Ratio 340/380 während der eingezeichneten Intervalle (a, c, e: Glucose 5 mM; b: Glucose 10 mM; d: Glucose 20 mM). Die als P10 und P20 gekennzeichneten Säulen entsprechen der mittleren maximalen Peakhöhe unter Behandlung mit 10 mM bzw. 20 mM Glucose. Isolierte Inselzellen von TWIK1^{-/-} Mäusen zeigten dabei eine leicht abgeschwächte Ca²⁺-Antwort im Vergleich zu Inselzellen von TWIK1^{+/+} Mäusen.

4.2.7 Patch-clamp Messungen an isolierten Inselzellen**4.2.7.1 Messung des Membranpotentials**

In den Insulin produzierenden β -Zellen des Pankreas wird die Kaliumleitfähigkeit, und damit das Ruhepotential, durch den Kaliumkanal Kir6.2 bestimmt. Wird dieser durch einen Anstieg des intrazellulären ATP-Gehalts gehemmt, führt die resultierende Depolarisation der Zellmembran zu einer Aktivierung spannungsabhängiger Ca²⁺-Kanäle. Das einströmende Ca²⁺ bewirkt schließlich die Ausschüttung von Insulin. Um den Beitrag von TWIK1 am Membranpotential von β -Zellen zu untersuchen, wurden Patch-Clamp Messungen an isolierten Inselzellen von TWIK1^{+/+} und TWIK1^{-/-} Mäusen durchgeführt. Diese erfolgten im Slow-Whole-Cell-Modus (perforierter Patch), um eine Dialyse von ATP oder Glucose zwischen Zytosol und Pipettenlösung zu vermeiden. Das Membranpotential wurde unter Kontrollbedingungen (5 mM Glucose) und nach Zugabe einer 10 mM Glucoselösung kontinuierlich gemessen. Regelmäßige Unterbrechungen durch Klemmen der Membran auf definierte Spannungen dienten der Kontrolle des elektrischen Zugangs zur Zelle. Abb. 25 zeigt einen repräsentativen Ausschnitt aus einem Experiment an Inselzellen einer TWIK1^{+/+} Maus. Dargestellt ist der Effekt von Glucose auf das Membranpotential, welches unter Kontrollbedingungen im Mittel etwa bei -75 mV lag. Der Wechsel von 5 mM auf 10 mM Glucose im Bad führte zu einer Depolarisation der Zellmembran. Bei einem Schwellenwert von etwa -55 mV wurden bei den meisten Zellen Aktionspotentiale beobachtet, deren Frequenz und Häufigkeit unter anhaltender Behandlung mit 10 mM Glucose abnahmen (nicht gezeigt).

Abb. 26 zeigt die statistische Auswertung des Membranpotentials unter Kontrollbedingungen und nach Erhöhung der Badglucose auf 10 mM. Bei Auftreten von Aktionspotentialen wurde der Schwellenwert für deren Auslösung in der Wertung berücksichtigt. Interessanterweise zeigte sich jedoch, dass TWIK1 offensichtlich keinen Beitrag zum Membranpotential von β -Zellen leistet. Erwartungsgemäß führt der Defekt eines Kaliumkanals zu einer depolarisierteren Zellmembran, doch weder unter

Kontrollbedingungen noch unter Behandlung mit 10 mM Glucose wurden Unterschiede im Membranpotential zwischen Inselzellen von TWIK1^{+/+} und TWIK1^{-/-} Mäusen festgestellt.

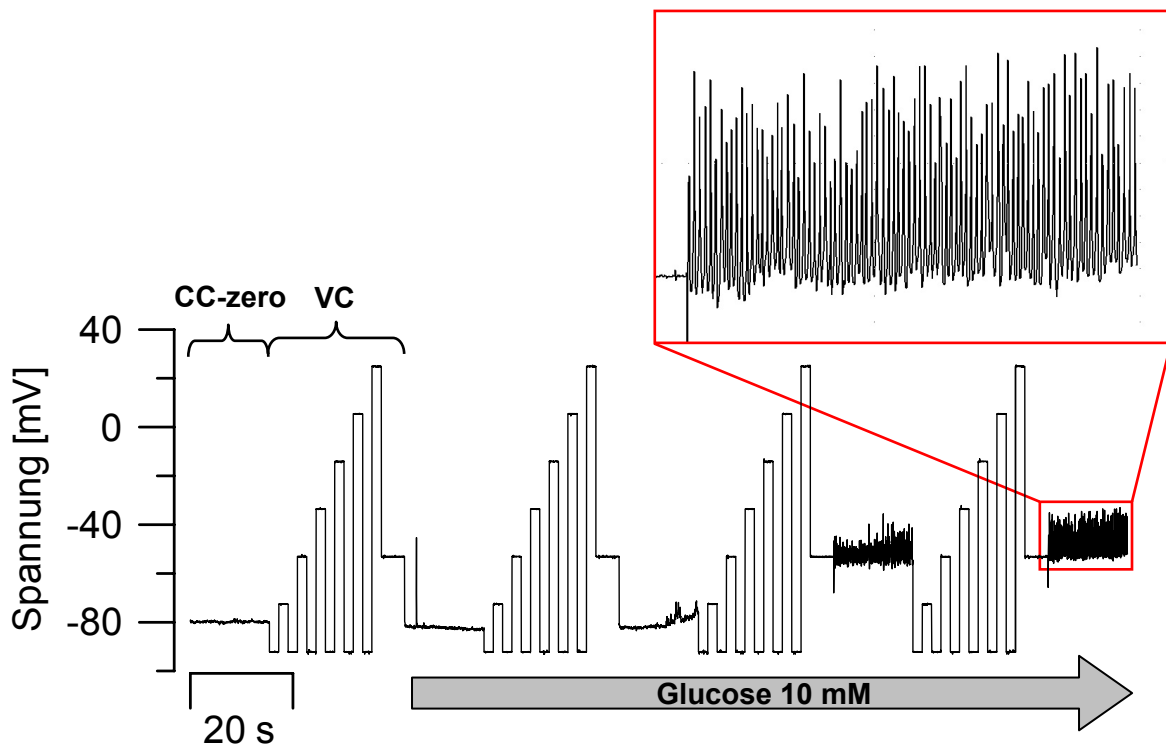


Abb. 25: Verlauf des Membranpotentials unter Stimulation von β -Zellen mit Glucose

Die Abbildung zeigt den zeitlichen Verlauf eines repräsentativen Experiments an einer primärkultivierten β -Zelle einer TWIK1^{+/+} Maus. Dargestellt ist der Effekt auf das Membranpotential (CC-zero Modus) der Zelle beim Wechsel von 5 mM auf 10 mM Glucose im Bad. Die Messungen erfolgten im Slow-Whole-Cell-Modus durch Zugabe von Nystatin zur Pipettenlösung. Zur Kontrolle des elektrischen Zugangs zur Zelle wurde die Zellmembran in regelmäßigen Abständen auf definierte Spannungen geklemmt (VC Modus). Die Stimulation der Insulinsekretion durch Glucose führte initial zu einer Depolarisation, gefolgt von Aktionspotentialen (vergrößerter Bildausschnitt).

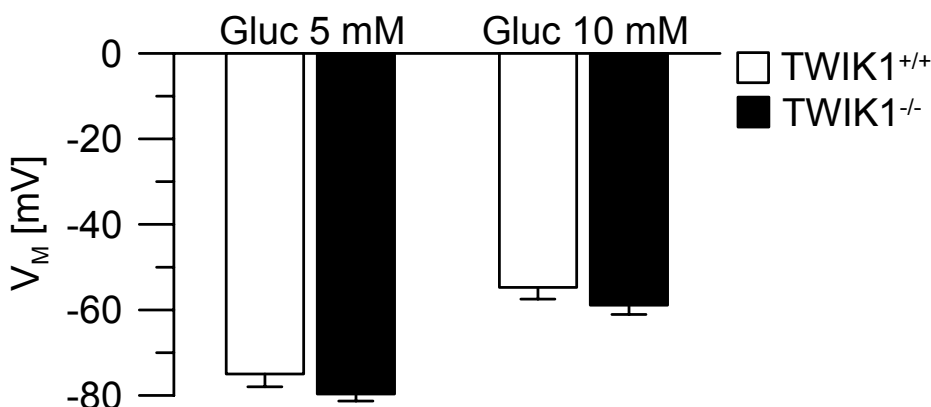


Abb. 26: Statistische Auswertung des Membranpotentials

Statistische Auswertung des Membranpotentials von isolierten β -Zellen von TWIK1^{+/+} (n=12) und TWIK1^{-/-} (n=12) Mäusen jeweils unter Kontrollbedingungen (5 mM Glucose) und nach Behandlung mit 10 mM Glucose. Hier zeigte sich, dass TWIK1 in β -Zellen des Pankreas keinen Beitrag zum Membranpotential leistete. Vielmehr führte ein defektes TWIK1 Protein in der Tendenz eher zu hyperpolarisierteren Werten.

4.2.7.3 Beitrag von TWIK1 zur Kaliumleitfähigkeit von β -Zellen

In einer weiteren Patch-Clamp Versuchsserie wurde der Ganzzellstrom isolierter β -Zellen von TWIK1^{+/+} und TWIK1^{-/-} Mäusen miteinander verglichen. Die Messungen erfolgten im Whole-Cell-Modus durch Klemmen der Zellmembran auf verschiedene Spannungen (-95 mV bis +25 mV in 20 mV Schritten für jeweils 2 s). Die daraus resultierenden Ströme wurden unter Kontrollbedingungen (5 mM Glucose) und unter Behandlung mit Tolbutamid (100 μ M in Kontroll-Lösung) gemessen. Tolbutamid ist ein Arzneistoff aus der Gruppe der Sulfonylharnstoffe und wird als orales Antidiabetikum bei Diabetes Typ 2 eingesetzt. Diese Substanz führt, analog zur Wirkung von ATP, durch Hemmung des K_{ATP} -Kanals Kir6.2 in β -Zellen des Pankreas zu einer Insulinausschüttung. In diesem Experiment konnte also geprüft werden, wie groß der Beitrag von TWIK1 zur Kaliumleitfähigkeit der Zelle war, sowohl unter Ruhebedingungen als auch während Phasen der Insulinfreisetzung.

Abb. 27A zeigt einen Ausschnitt aus dem Verlauf eines repräsentativen Experiments an Inselzellen einer TWIK1^{+/+} Maus. Dargestellt ist der Effekt von Tolbutamid. Betrachtet man zunächst den Verlauf der Spannung (Abb. 27A oben), so erkennt man, dass zwischen den Klemmschritten in regelmäßigen Abständen für etwa 16 s in den CC-zero Modus gewechselt wurde. In diesen Phasen konnte die Änderung des Membranpotentials der Zelle verfolgt werden. Ganz analog zur Behandlung mit 10 mM Glucose führte die Gabe von Tolbutamid zunächst zu einer Depolarisation der Zellmembran, gefolgt von Aktionspotentialen. Diese waren wegen des besseren elektrischen Zugangs zur Zelle regelmäßiger und ausgeprägter als bei den Experimenten in Slow-Whole-Cell-Modus.

Im unteren Graphen von Abb. 27A ist die Stromantwort der Zelle auf die jeweiligen Klemmschritte dargestellt. Man erkennt hier, dass die schrittweise Erhöhung der Klemmspannung zu einem zunehmenden positiven Strom führte. Der beobachtete Strom war also im Wesentlichen ein Kaliumstrom, da a) per Definition der Ausstrom von Kationen aus der Zelle (bzw. der Einstrom von Anionen) einen zellpositiven Strom erzeugt und b) eine Anhebung der Klemmspannung die Triebkraft für K^+ -Ionen erhöht, die die Zelle verlassen. Nach Zugabe von Tolbutamid wurde dieser Strom kleiner, was auf eine verminderte Kaliumleitfähigkeit der Zelle aufgrund der Hemmung von Kir6.2 zurückzuführen war. Vor allem bei sehr negativen Klemmspannungen konnten die ausgelösten Aktionspotentiale auch in der Stromantwort beobachtet werden. Diese negativen Peaks resultierten aus dem schnellen Einstrom von Ca^{2+} in die Zelle, dessen Triebkraft mit zunehmender Positivierung der Zellmembran abnahm.

Zur besseren Darstellung wurden in Abb. 28A die Ströme der jeweiligen Klemmspannungen überlagert (Superpositionen). Der linke Graph zeigt hierbei den Strom einer Spannungstreppe während der Kontrollphase und der rechte nach Zugabe von

Tolbutamid. Schön zu erkennen ist nun die Hemmung des Kaliumstroms durch Tolbutamid und die Aktionspotentiale. Im Vergleich dazu wurden in Abb. 28B die Superpositionen der β -Zelle einer TWIK1^{-/-} Maus dargestellt. Da die Größe des Stroms von der Membranfläche und damit der Zellgröße abhängig ist, wurden die erhaltenen Werte auf 1 normalisiert. Diese Modifikation erlaubt eine bessere Vergleichbarkeit verschiedener Zellen bezüglich Form und Kinetik des Stroms. Jedoch wurden keine offensichtlichen Unterschiede zwischen β -Zellen von TWIK1^{+/+} und TWIK1^{-/-} Mäusen beobachtet. Beide zeigten sowohl unter Kontrollbedingungen, als auch unter Behandlung mit Tolbutamid, einen Strom mit leicht inaktivierendem Charakter bei Spannungen größer -35 mV. Die Höhe des Stroms bei den jeweiligen Klemmspannungen war sehr ähnlich und auch der durch Tolbutamid hemmbare Anteil zeigte bei Durchsicht der Einzelexperimente keine Unterschiede.

Die statistische Auswertung erfolgte durch Erstellen der I-V-Diagramme (Abb. 29). Zur besseren Vergleichbarkeit erfolgte hier eine Normalisierung der Ströme nach der zu Beginn des Experiments gemessenen Zellkapazität (in pF) als Maß für die Zelloberfläche. Aufgrund der inaktivierenden Charakteristik wurde der Strom zu Beginn (I_{initial}) und am Ende (I_{final}) eines Klemmschrittes getrennt ausgewertet. Auch hier zeigten sich kaum Unterschiede zwischen β -Zellen von TWIK1^{+/+} und TWIK1^{-/-} Mäusen. Unter Kontrollbedingungen waren die I-V-Kurven sowohl von I_{initial} als auch von I_{final} gleich. Bei Inselzellen von TWIK1^{-/-} Mäusen war eher eine leichte Tendenz zu höheren Strömen bei positiven Klemmspannungen zu beobachten. Unter Behandlung mit Tolbutamid zeigte sich ein ähnliches Bild, jedoch war hier I_{final} bei den Klemmschritten -15 mV, 5 mV und 25 mV signifikant höher bei Inselzellen von TWIK1^{-/-} Mäusen.

Die Auswertung dieser Experimente zeigte, dass TWIK1 keinen Beitrag zur Kaliumleitfähigkeit von β -Zellen leistete. Überraschenderweise führte der Defekt der Kanalpore eher zu einer in der Tendenz höheren Leitfähigkeit für Kalium, vor allem unter Behandlung der Zellen mit Tolbutamid.

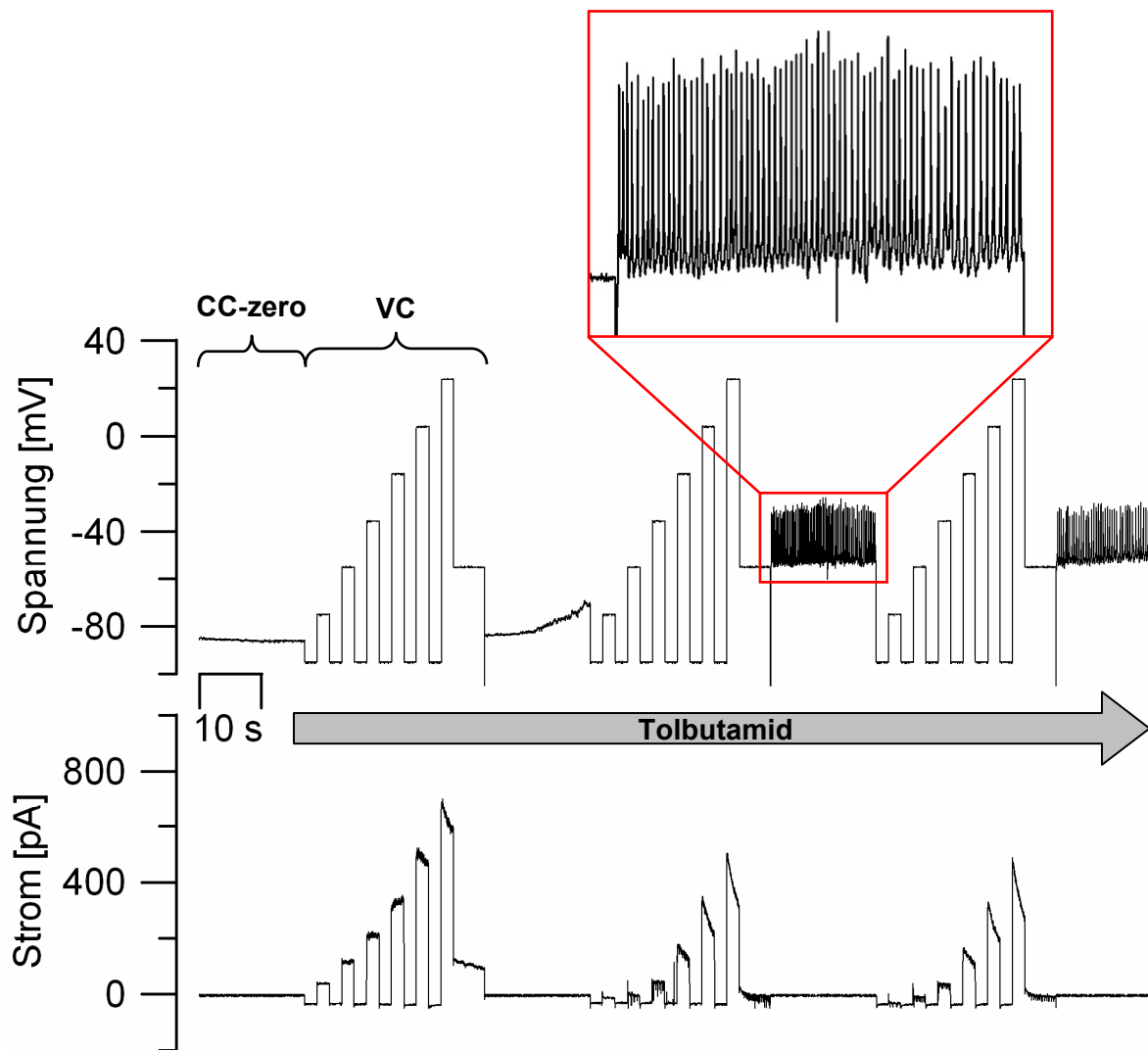


Abb. 27: Effekte von Tolbutamid auf den Kaliumstrom von β -Zellen

Ausschnitt aus einem repräsentativen Experiment an einer primärkultivierten β -Zelle einer $TWIK1^{+/+}$ Maus. Gezeigt wird der Effekt von Tolbutamid (100 μ M) auf das Membranpotential und den Kaliumstrom der Zelle. Die Messung erfolgte im Whole-Cell-Modus durch Klemmen der Zellmembran auf definierte Potentiale (-95 mV bis +25 mV in 20 mV Schritten, VC Modus). Im oberen Diagramm wird die Spannung in mV gezeigt. Die Spannungstreppen werden in regelmäßigen Abständen durch Messungen des Membranpotentials unterbrochen (CC-zero Modus). Die Behandlung der Zellen mit Tolbutamid führte, analog zu Glucose, zu einer initialen Depolarisation mit nachfolgenden APs (vergrößerter Ausschnitt). Im unteren Diagramm wird die Stromantwort der Zelle auf die jeweiligen Klemmspannungen gezeigt. Tolbutamid führte hier erwartungsgemäß zu einer Abnahme des Kaliumstroms durch Hemmung des Kaliumkanals Kir6.2.

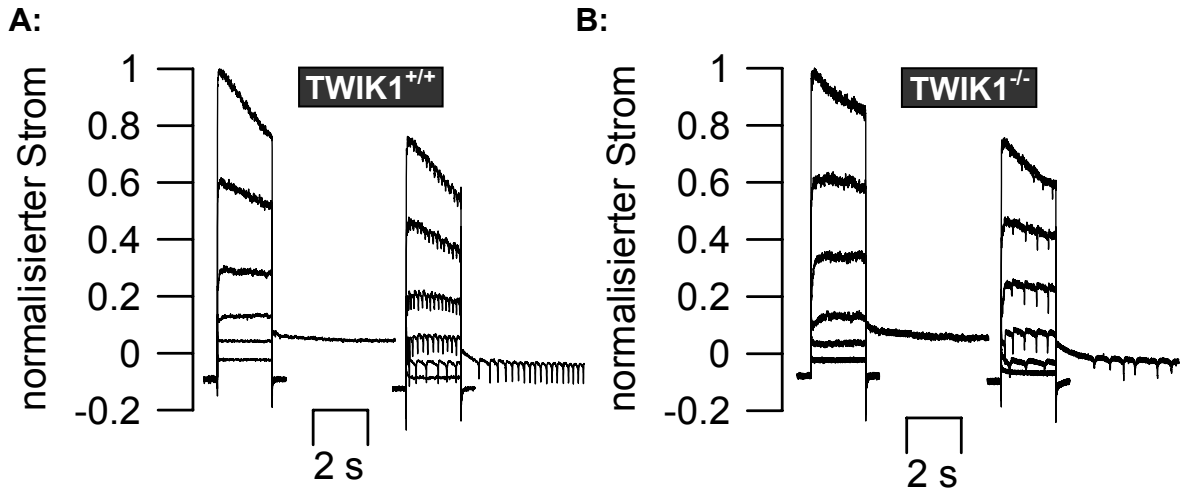


Abb. 28: Superpositionen der Ströme von primärkultivierten β -Zellen

In den gezeigten Graphen wurden die Ströme auf die jeweiligen Klemmspannungen überlagert dargestellt. A zeigt ein repräsentatives Experiment an einer primärkultivierten β -Zelle einer $TWIK1^{+/+}$ Maus und B das einer $TWIK1^{-/-}$ Maus. Die jeweils linke Superposition zeigt die Stromantwort der Zelle unter Kontrollbedingungen, die Rechte nach Zugabe von Tolbutamid. Um Form und Kinetik der Ströme besser vergleichen zu können, wurden diese auf 1 normalisiert. Deutlich zu sehen ist die Hemmung des Stroms durch Tolbutamid und die daraus resultierenden APs. Die Superpositionen von $TWIK1^{+/+}$ und $TWIK1^{-/-}$ Mäusen zeigten keine Unterschiede.

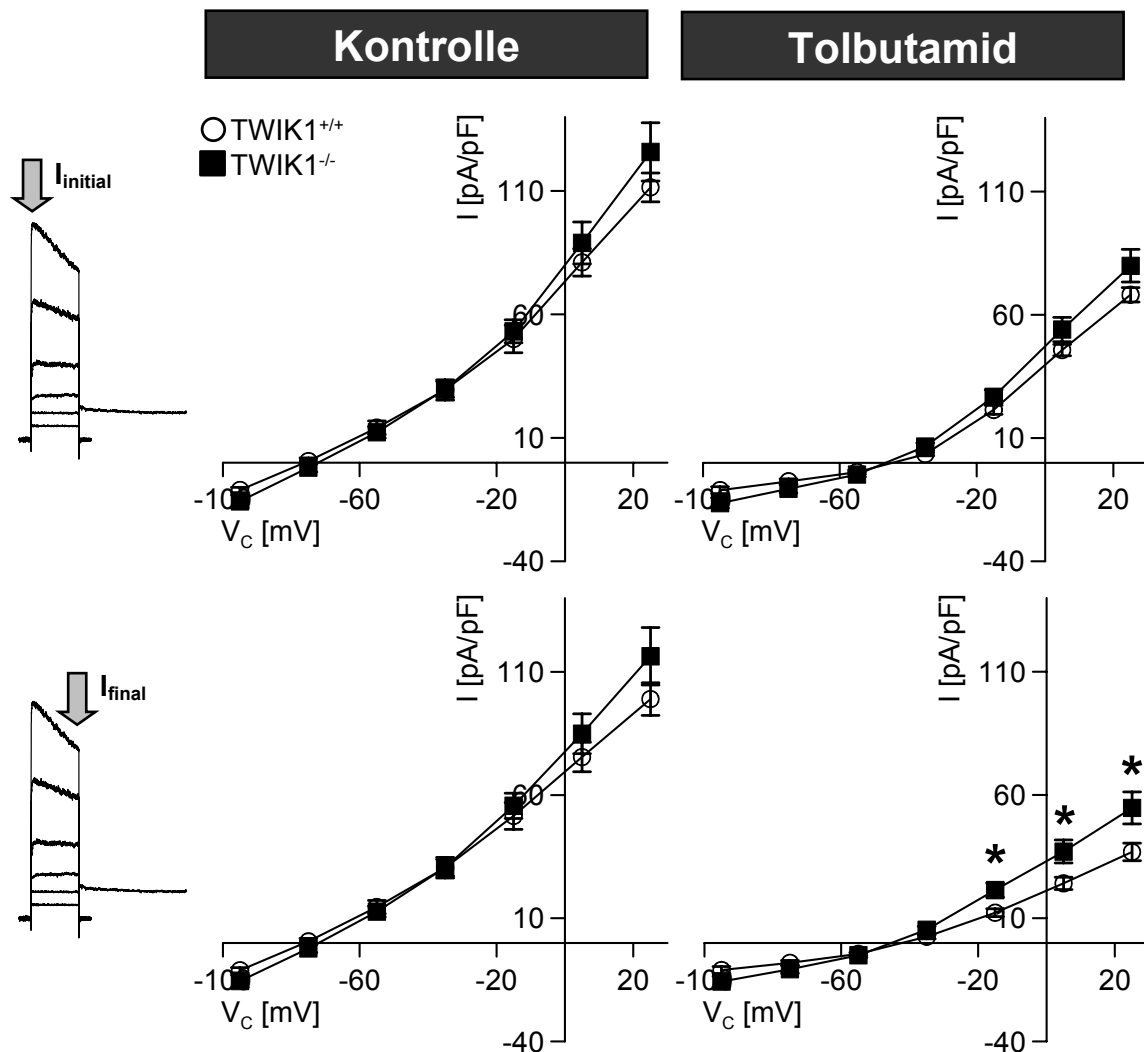


Abb. 29: I-V-Diagramme der Whole-Cell-Experimente

Dargestellt ist die statistische Auswertung der Whole-Cell-Experimente in Form von I-V-Diagrammen (jeweils $n=12$ für β -Zellen von TWIK1^{+/+} und TWIK1^{-/-} Mäusen). Da der Strom einen leicht inaktivierenden Charakter zeigte, wurde zwischen I_{initial} und I_{final} unterschieden (horizontale Einteilung). Die I-V-Diagramme wurden jeweils unter Kontrollbedingungen und nach Zugabe von Tolbutamid erstellt (vertikale Einteilung). Ein Defekt an der Kanalpore von TWIK1 führte jedoch in der Tendenz eher zu einer Zunahme des Kaliumstroms, vor allem unter Behandlung der Zellen mit Tolbutamid.

4.2.8 Kolokalisation von TWIK1 mit ARF6 und Vamp8

Die durchgeführten Experimente wiesen alle darauf hin, dass eine gesteigerte Insulinfreisetzung bei β -Zellen von TWIK1^{-/-} Mäusen nicht durch die Eigenschaften von TWIK1 als membranständiger Kaliumkanal erklärt werden konnte. Auch die vornehmlich intrazelluläre Lokalisation legte den Schluss nahe, dass TWIK1 hier möglicherweise am Transport oder der Freisetzung von insulinhaltigen Granula beteiligt sein könnte. Diese kanalunabhängigen Funktionen von TWIK1 sind bereits in der Literatur diskutiert worden. Dabei konnte unter anderem eine Interaktion von TWIK1 mit dem kleinen G-Protein ARF6 (ADP-ribosylation factor 6) gezeigt werden, welches an intrazellulären Transportvorgängen beteiligt ist. Weiterhin wurde eine Kolokalisation von TWIK1 mit Vamp8 beobachtet, ein Protein aus der Familie der v-SNAREs, welches wichtig für das kontrollierte Andocken und die Fusion von Vesikeln ist (Decressac *et al.*, 2004). Da diese Beobachtungen am Zellmodell stattfanden, wurde von uns mit Hilfe immunhistochemischer Methoden untersucht, ob auch in nativem Gewebe eine solche Kolokalisation von TWIK1 mit ARF6 und Vamp8 vorhanden war. Die Untersuchungen wurden an Paraffinschnitten des Pankreas von TWIK1^{+/+} Mäusen durchgeführt, welche neben dem anti-TWIK1 Ak (grün) zusätzlich mit anti-Vamp8 Ak (rot) und anti-ARF6 Ak (blau) gefärbt wurden (Abb. 30). Der Schnitt der dargestellten Langerhansinsel wurde so getroffen, dass nur ein kleiner Teil der Inselzellen aus β -Zellen bestand, sichtbar durch die TWIK1 Färbung. Hier konnte eine partielle Kolokalisation mit Vamp8 beobachtet werden, welches ebenfalls hauptsächlich auf die Insulin produzierenden Zellen beschränkt war und eine ähnliche intrazelluläre Verteilung zeigte. ARF6 war ebenfalls in β -Zellen lokalisiert, aber auch weniger stark in den anderen Zellen der Langerhansinsel sowie im exokrinen Pankreas. Auch hier wurde eine partielle Kolokalisation mit TWIK1 beobachtet.

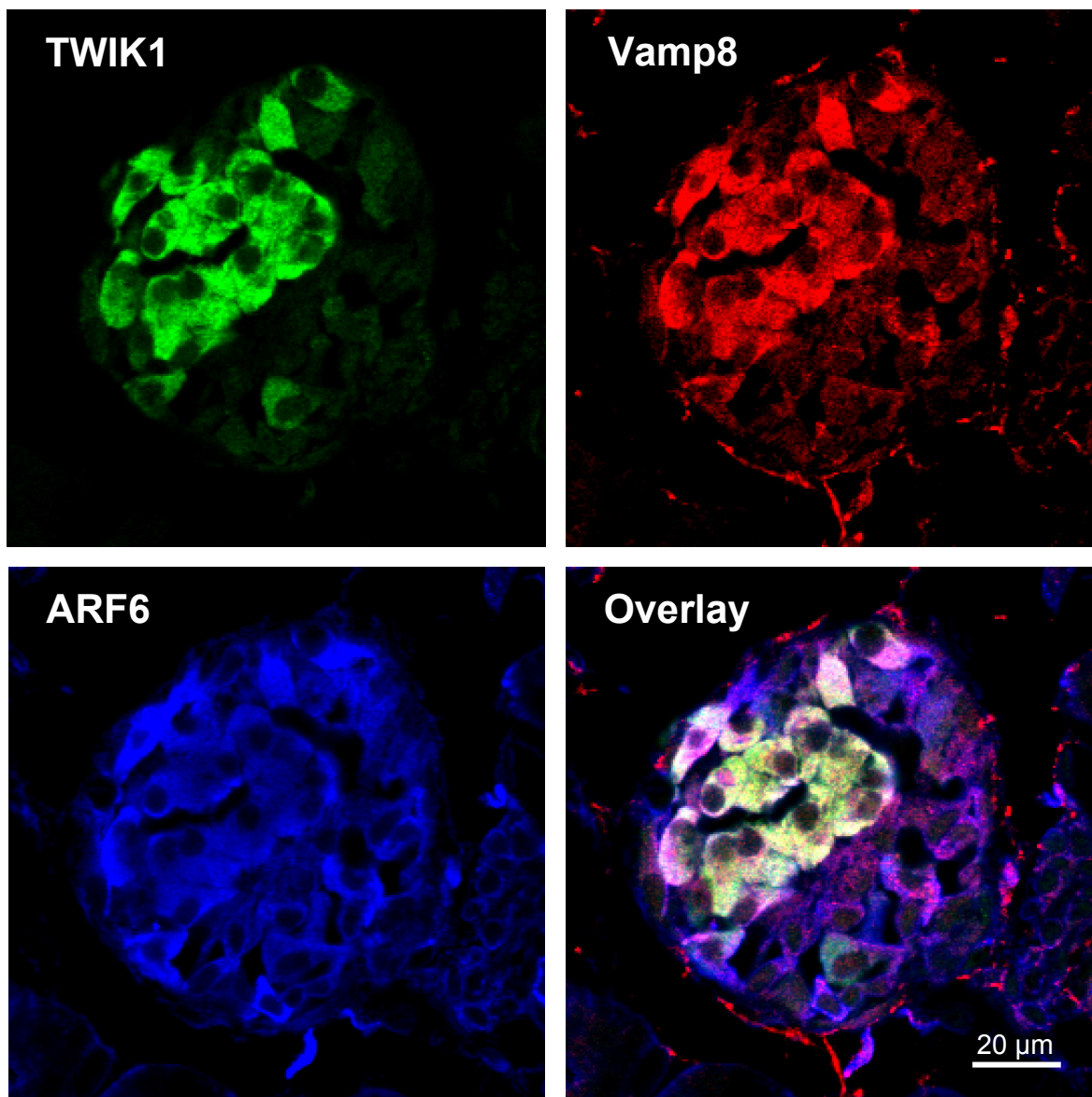


Abb. 30: Kolokalisation von TWIK1 mit ARF6 und Vamp8

Die Abbildung zeigt die Langerhans Insel einer TWIK1^{+/+} Maus. Der Paraffinschnitt wurde gegen TWIK1 (grün), Vamp8 (rot) und ARF6 (blau) gefärbt. TWIK1 zeigt in den Insulin produzierenden β -Zellen eine weitgehende Kolokalisation sowohl zu Vamp8 als auch zu ARF6.

5. Diskussion

5.1 TWIK1 im proximalen Tubulus der Mausniere

5.1.1 Lokalisation und geschlechtsabhängige Expression von TWIK1

Kaliumkanäle sind in der Niere an einer Vielzahl physiologischer Prozesse beteiligt und für die Transportfunktion der Epithelzellen von essentieller Bedeutung. Der 2-P-Domänen Kaliumkanal TWIK1 zeigt eine starke Expression in der Niere von Säugetieren, allerdings ist über dessen Funktion in diesem Organ noch sehr wenig bekannt. Der erste Teil meiner Arbeit konzentrierte sich auf die physiologische Rolle von TWIK1 in der Niere der Maus, wobei zunächst dessen Lokalisation immunhistochemisch untersucht wurde. Die bislang beschriebene Expression von TWIK1 in den Nieren von Mäusen zeigte eine breite Verteilung entlang des Nephrons (Nie *et al.*, 2005). In unseren Immunfluoreszenz-Experimenten wurde TWIK1 jedoch fast ausschließlich im proximalen Tubulus gefunden (Abb. 7), trotz Verwendung des gleichen Primär-Antikörpers. Der Grund für diese Diskrepanz ist unklar, kann aber eventuell durch die Verwendung von verschiedenen Färbeprotokollen erklärt werden. Übereinstimmend jedoch war die Expression in frühen Teilen des proximalen Tubulus (S1/2). Hier war TWIK1 vor allem in den äußersten Spitzen der Mikrovilli zu finden und in den meisten Tubuli zusätzlich in einem subapikalen intrazellulären Kompartiment (Abb. 9A). Interessanterweise wurde von uns in späten Abschnitten des proximalen Tubulus (S3) eine geschlechtsabhängige Expression von TWIK1 beobachtet. Männliche Mäuse zeigten hier nur ein sehr schwaches Signal, welches auf das subapikale Kompartiment unterhalb des BB beschränkt war (Abb. 9C). Bei den Weibchen hingegen wurde in S3 eine sehr kräftige Färbung entlang der gesamten Mikrovilli des Bürstensaums (BB) beobachtet (Abb. 9B). Diese Lokalisation steht ebenfalls im Widerspruch zu den bereits veröffentlichten Daten, wo das TWIK1 Signal im BB des S2 Segments schnell an Intensität abnahm und in S3 schließlich nicht mehr detektiert werden konnte (Nie *et al.*, 2005). Dies kann jedoch damit zusammenhängen, dass bei diesen Experimenten nur männliche Mäuse untersucht wurden, welche bei uns zu ähnlichen Resultaten führten. Leider wird im Methodenteil der besagten Publikation nicht angegeben, welches Geschlecht für die histologischen Untersuchungen verwendet wurde.

Eine Semi-Quantifizierung der Fluoreszenz-Färbung bestätigte die geschlechtsabhängige Expression von TWIK1 im spätproximalen Tubulus (Abb. 8B). Weibliche Mäuse zeigten hier ein etwa zehnfach stärkeres TWIK1-Signal in der Bürstensaummembran im Vergleich zu den Männchen. Die Summe der ermittelten Fluoreszenz-Intensitäten in den

untersuchten Bereichen des proximalen Tubulus gab zusätzlich Hinweise darauf, dass nicht nur die Lokalisation, sondern auch die Menge an exprimiertem TWIK1 Protein in den Nieren von männlichen und weiblichen Mäusen verschieden war (Abb. 9C). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen wurde auch mittels Real-time PCR eine vermehrte Expression von TWIK1 mRNA in den Nieren von weiblichen Mäusen nachgewiesen (Abb. 10A).

Die intrazelluläre Lokalisation von TWIK1 ist entlang des gesamten proximalen Tubulus zu beobachten und wurde schon mehrfach in der Literatur beschrieben (Decressac *et al.*, 2004; Nie *et al.*, 2005). Im Zellmodell an polarisierten MDCK-Zellen wurde dieses Kompartiment dem so genannten endosomalen Recycling Kompartiment zugeordnet, welches unterhalb der apikalen Zellmembran lokalisiert ist. Es wird vermutet, dass das TWIK1 Protein hier zwischengespeichert wird, bis es auf einen noch unbekanntem Stimulus hin in die Membran des BB eingebaut wird. Hier erfüllt TWIK1 dann seine Rolle als Kaliumkanal, bis er erneut internalisiert wird. Diese Internalisierung wird vermutlich durch die Interaktion von TWIK1 mit dem kleinen G-Protein ARF6 und dessen Nukleotid-Austauschfaktor EFA6 vermittelt (Decressac *et al.*, 2004). Auch hier ist noch nicht bekannt, welcher Reiz zu dieser Rückführung in das endosomale Recycling Kompartiment führt.

Die von uns beobachtete Lokalisation von TWIK1 im spätproximalen Tubulus war eindeutig abhängig vom Geschlecht der Mäuse. Dies legt den Schluss nahe, dass Sexualhormon-abhängige Mechanismen die subzelluläre Verteilung von TWIK1 regulieren. Zahlreiche Studien konnten inzwischen belegen, dass Geschlechtshormone bestimmte Funktionen in den Nieren von Säugetieren beeinflussen können, renale Transportprozesse mit eingeschlossen. Rezeptoren für Sexualhormone wurden sowohl in tubulären als auch in nicht-tubulären Strukturen gefunden, sowie in Zelllinien, welche von der Niere abstammen (Takeda *et al.*, 1990; Bhat *et al.*, 1993; Enmark *et al.*, 1997; Ouar *et al.*, 1998; Han *et al.*, 1999; Taylor and Al Azzawi, 2000; Bumke-Vogt *et al.*, 2002; Nagao *et al.*, 2005; Boulkroun *et al.*, 2005; Rogers *et al.*, 2007). Für einige Proteine in der Niere von Ratten und Mäusen wurde eine starke Androgen- bzw. Estrogen vermittelte Regulation gefunden. Davon betroffen sind hauptsächlich Transporter für organische Anionen (OAT) oder Kationen (OCT), darunter OAT1 und OAT3 in der Rattenniere (Ljubojevic *et al.*, 2004), OATP1 in der Niere von Ratten und Mäusen (Lu *et al.*, 1996; Isern *et al.*, 2001) und OCT2 in der Rattenniere (Urakami *et al.*, 1999; Urakami *et al.*, 2000). Aber auch der natriumabhängige Glucosetransporter SGLT1 zeigt eine geschlechtsabhängige Regulation in der Niere von Ratten (Sabolic *et al.*, 2005), ferner noch die mitochondriale Ornithin-Aminotransferase in der Mausnieren (Levillain *et al.*, 2005; Levillain *et al.*, 2007) und die zytosolische Carboanhydratase in der Rattenniere

(Suzuki *et al.*, 1996). Die vornehmliche Präsenz dieser Proteine in distalen Teilen des proximalen Tubulus legt die Vermutung nahe, dass besonders dieses Segment unter der Kontrolle von Sexualhormonen steht (Sabolic *et al.*, 2007). Obwohl wir auch eine geringe geschlechtsabhängige Regulation von TWIK1 in frühen Teilen des proximalen Tubulus finden konnten, war der beobachtete Unterschied im S3-Segment besonders ausgeprägt. Um die vermutete Beteiligung von Sexualhormonen an der Regulation von TWIK1 näher zu untersuchen, wurden männliche erwachsene Mäuse mit Estrogen, Progesteron und Prolaktin und weibliche erwachsene Mäuse mit Testosteron behandelt. Die histologischen Untersuchungen ergaben, dass keines der weiblichen Geschlechtshormone bei den Männchen einen Effekt zeigte. Die Behandlung von weiblichen Mäusen mit Testosteron führte jedoch im spätproximalen Tubulus zu einem typischen männlichen Verteilungsmuster (Abb. 11). Daraus kann gefolgert werden, dass an der Translokation von TWIK1 aus den Mikrovilli des BB in das subapikale Kompartiment vermutlich Androgenrezeptor-vermittelte Effekte beteiligt sind. Zusätzlich ist Testosteron in der Lage, die Expression von TWIK1 in den distalen Teilen des proximalen Tubulus zu inhibieren, was sich in einer deutlich reduzierten Fluoreszenzintensität bei den Männchen bemerkbar macht. Da Estrogen, Progesteron und Prolaktin bei männlichen Mäusen keine Wirkung zeigte, scheint eine Beteiligung von weiblichen Sexualhormonen an Regulation von TWIK1 eher unwahrscheinlich. In einem weiteren Experiment wurden männliche Mäuse kastriert und ein Teil davon mit Estradiol behandelt. Entgegen den Erwartungen zeigten jedoch sowohl die behandelten als auch die unbehandelten Mäuse weiterhin ein männliches Verteilungsmuster. Es war nicht überraschend, dass Estrogene hier keinen Effekt aufwiesen, jedoch hätte allein die Abwesenheit von Testosteron die Androgenvermittelte Herabregulation von TWIK1 aufheben sollen. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass die in der Nebenniere gebildeten Androgene ausreichend waren, um eine Translokation von TWIK1 in die Bürstensaummembran zu verhindern. Ferner wurden die untersuchten Mäuse erst beim Einsetzen der Pubertät kastriert. Es ist deshalb vorstellbar, dass (irreversible) Testosteron-vermittelte Vorgänge bereits zu einem männlichen TWIK1 Verteilungsmuster geführt haben. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass weder die Abwesenheit von Testosteron allein, noch weibliche Sexualhormone eine Translokation von TWIK1 in die Mikrovilli des BB bewirken. Dafür müssen noch nicht identifizierte Faktoren verantwortlich sein, welche eventuell durch Androgene gehemmt werden.

Um eine direkte Beeinflussung der TWIK1 Expression durch Testosteron zu untersuchen, wurde über Sequenzvergleich nach „androgen response elements“ (ARE) im TWIK1 Gen gesucht. Testosteron vermittelt seine Wirkung durch Bindung an den intrazellulären Androgen-Rezeptor. Dieser Ligand-Rezeptor-Komplex wird in den Zellkern aufgenommen

und bindet dort an AREs der Zielgene, wodurch deren Expression verstärkt oder gemindert wird (McEwan, 2004). Ferner wurden auch nicht-genomische Effekte von Androgenen beschrieben (Heinlein and Chang, 2002). Es konnte gezeigt werden, dass AREs Übereinstimmungen in der Basenfolge aufweisen, welche durch folgende gemeinsame Sequenz beschrieben werden kann: 5'-GGA/TACAnnnTGTTCT-3' (Roche *et al.*, 1992). Im TWIK1 Gen konnten zwei mutmaßliche AREs identifiziert werden. Das erste liegt auf dem Antisense-Strang im Intron 1 (5'-GTTACAcgaTGTTCT-3') und ein weiteres auf dem Sense-Strang in Intron 2 (5'-CTAACAcgaTGTTCT-3'). Beide zeigen eine hohe Übereinstimmung mit der gemeinsamen ARE-Sequenz. Da bislang noch kein Promotor für TWIK1 bekannt ist, wurde zusätzlich in einem Bereich von 10 kB aufwärts der Initiationsstelle der Transkription gesucht. Hier konnte jedoch kein ARE identifiziert werden. Die Anwesenheit von AREs im TWIK1 Gen könnte eine Erklärung für die Testosteron-vermittelte Erniedrigung der TWIK1 Expression im spätproximalen Tubulus von männlichen Mäusen liefern, allerdings bleibt die Änderung der Lokalisation dadurch weiter unbeantwortet.

5.1.2 Kolokalisation und gemeinsame Regulation von TWIK1 und SGLT1

In Immunfluoreszenz-Experimenten wurde im spätproximalen Tubulus eine weitgehende Kolokalisation von TWIK1 mit dem natriumabhängigen Glucosetransporter SGLT1 beobachtet. Interessanterweise zeigte auch SGLT1 eine geschlechtsabhängige Verteilung im S3-Segment, wobei dieser analog zu TWIK1 bei männlichen Mäusen subapikal lag (Abb. 9C) und bei den Weibchen reichlich in der Bürstensaummembran exprimiert wurde (Abb. 9B). Darüber hinaus konnte in den Nieren von Männchen mit quantitativer PCR ebenfalls eine geringere Expression von SGLT1-mRNA nachgewiesen werden (Abb. 10A). Eine Behandlung von weiblichen Mäusen mit Testosteron führte auch hier zu einem starken Rückgang des Fluoreszenzsignals für SGLT1 (Abb. 11), welches nunmehr auf das subapikale Kompartiment beschränkt war. Hingegen hatte die Behandlung von männlichen Mäusen mit weiblichen Geschlechtshormonen keinen Effekt auf SGLT1, ebenso die Kastration. TWIK1 und SGLT1 scheinen also in ähnlicher Weise reguliert zu werden, sowohl was die subzelluläre Lokalisation angeht als auch bezüglich der Expressionsstärke. Übereinstimmend mit unseren Ergebnissen, konnte erst kürzlich eine ähnliche Regulation für SGLT1 bei der Ratte beobachtet werden (Sabolic *et al.*, 2005). Auch hier zeigte sich eine geschlechtsabhängige Expression im spätproximalen Tubulus, welche analog zur Maus bei den weiblichen Ratten höher lag. Im Gegensatz zu unseren Experimenten führte jedoch eine Kastration von männlichen Mäusen immunhistochemisch zu einer Zunahme des SGLT1 Signals in der Bürstensaummembran, obwohl auch hier die Kastration erst nach Einsetzen der Pubertät erfolgte. Zudem wurde keine Translokation in

ein subapikales Kompartiment beobachtet, d.h. die geschlechtsabhängige Expression von SGLT1 im spätproximalen Tubulus der Ratte unterschied sich nur in der Intensität der Bürstensaumfärbung. Allerdings führte auch hier die Behandlung der Kastraten mit Testosteron zu einer massiven Abnahme der SGLT1 Expression, wohingegen weibliche Geschlechtshormone keinen Einfluss hatten. Es zeigen sich also große Parallelen bei der geschlechtsabhängigen Regulation von SGLT1 in der Ratte und in der Maus, wobei die Diskrepanzen wahrscheinlich auf artspezifische Unterschiede zurückzuführen sind.

5.1.3 Funktionelle Kopplung von TWIK1 und SGLT1

Sowohl die Kolo-kalisation als auch die gemeinsame Regulation von TWIK1 und SGLT1 im S3-Segment des proximalen Tubulus legen eine funktionelle Kopplung dieser beiden Proteine nahe. Unserer Arbeitshypothese nach dient TWIK1 hier der Repolarisation der apikalen Membran, wenn diese durch den elektrogenen Transport von Glucose depolarisiert wird (Abb. 5). Dabei wird angenommen, dass TWIK1 in der luminalen Membran der Epithelzellen die Hintergrundleitfähigkeit für K^+ entscheidend mitbestimmt. Als so genannter „leak“ oder „background“ Kaliumkanal erzeugt er einen nahezu zeit- und spannungsunabhängigen Strom (Lesage *et al.*, 1996a; Lesage *et al.*, 1997; Patel *et al.*, 2001; Decressac *et al.*, 2004). Aufgrund dieser Eigenschaften ist TWIK1 in der Lage, bei allen Membranpotentialen einen konstanten repolarisierenden Kaliumausstrom zu gewährleisten. Eine vergleichbare Funktion wurde auch im frühproximalen Tubulus beschrieben, wo TWIK1 möglicherweise an der Stabilisierung des Membranpotentials bei der elektrogenen Resorption von Phosphat beteiligt ist (Nie *et al.*, 2005). Da bei der TWIK1^{-/-} Maus die Kanalfunktion von TWIK1 zerstört wurde, sollten diese Tiere folglich eine erhöhte Glucoseausscheidung aufweisen, da die Triebkraft für die apikale Aufnahme von Glucose durch SGLT1 vermindert ist. Zwei Experimente wurden durchgeführt, bei denen TWIK1^{+/+} und TWIK1^{-/-} Mäuse eine 12%ige Glucoselösung intravenös appliziert wurde. Bei einer der beiden Serien zeigte sich wie erwartet eine höhere (fraktionelle) Glucoseausscheidung bei TWIK1^{-/-} Mäusen (Abb. 12, Abb. 13A). Der Blutzuckerspiegel (Abb. 13B) und die glomeruläre Filtrationsrate (Abb. 13C) waren bei den TWIK1^{-/-} Mäusen nicht verändert gegenüber den Wildtyptieren, was darauf schließen lässt, dass tatsächlich die maximale Glucosetransportrate vermindert war. Ferner wurde eine Zunahme des Urinvolumens bei TWIK1^{-/-} Mäusen im Vergleich zu TWIK1^{+/+} Mäusen beobachtet, welche auf die vermehrte Ausscheidung von Glucose (im Sinne einer osmotischen Diurese) zurückzuführen war (Abb. 13D). In der zweiten Serie mit demselben Glucose-Infusionsprotokoll zeigten sich überraschenderweise keine Unterschiede in der Glucoseausscheidung. Allerdings wurde in dieser Serie anstatt Ketamin/Xylazin Isofluran als Anästhetikum verwendet, was zur Folge hatte, dass die Blutzuckerspiegel niedriger

waren als in der ersten Serie. Die Unterschiede in den Blutzuckerwerten waren dadurch bedingt, dass Xylazin über seine agonistische Wirkung an sympathischen α_2 -Rezeptoren der β -Zellen zu einer Hemmung der Insulinfreisetzung und somit zu einem stärkeren Anstieg des Blutzuckers in der ersten Serie von Experimenten führte (Ullrich *et al.*, 1985; Sharp, 1996; Peterhoff *et al.*, 2003; Pomplun *et al.*, 2004). Der Blutzucker lag unter Isoflurananästhesie nach Glucoseinfusion bei 35 mM, unter ansonsten identischen Bedingungen bei Ketamin/Xylazin anästhesierten Mäusen hingegen bei 54 mM. Daraus kann gefolgert werden, dass sich der Phänotyp der TWIK1^{-/-} Maus erst bei unphysiologischen Blutzuckerwerten ab etwa 35 mM bemerkbar macht. Allerdings zeichnen sich Mäuse im Vergleich zum Menschen durch eine deutlich höhere Transportkapazität für Glucose aus: Der Schwellenwert des Blutzuckers, ab dem eine Glucoseausscheidung mit dem Urin auftritt, liegt bei der Maus bei über 20 mM, hingegen bei Menschen ca. bei 10 mM (Noonan *et al.*, 2000). In unseren Experimenten zeigten TWIK1^{-/-} Mäuse bei Blutzuckerwerten nahe dem Schwellenwert (20 bis 35 mM) eine leichte Tendenz zu einer höheren fraktionellen Ausscheidung, welche bei Blutzuckerwerten größer 35 mM signifikant wurde (Abb. 14). Diese Beobachtung ist jedoch nicht ungewöhnlich, wenn man bedenkt, dass der Glucosetransporter SGLT2 in frühen Abschnitten des proximalen Tubulus die Hauptlast (ca. 90%) der Resorption übernimmt. Dadurch erreicht bei normaler bis mäßiger Glucosebelastung kaum Glucose das späte S3-Segment, in welchem SGLT1 seine Aufgabe verrichtet. So zeigen sich signifikante Unterschiede in der Glucoseausscheidung erst ab Blutzuckerwerten, bei denen die Transportkapazität von SGLT2 bereits überschritten wurde. Es sind noch weitere Möglichkeiten vorstellbar, welche den eher milden Phänotyp der TWIK1^{-/-} Maus bezüglich der renalen Ausscheidung von Glucose erklären könnten. So kann es in der Niere von TWIK1^{-/-} Mäusen kompensatorische Mechanismen geben, welche einer gestörten Funktion von SGLT1 entgegenwirken. Tatsächlich konnten wir über quantitative PCR eine verstärkte Expression von SGLT2 mRNA in den Nieren von TWIK1^{-/-} Mäusen nachweisen (Abb. 10B). Wenn dies mit einer verstärkten Expression des SGLT2-Proteins einhergeht, dann wären diese Tiere in der Lage, kompensatorisch mehr Glucose in den frühen Abschnitten des proximalen Tubulus rückzuresorbieren. Leider stand uns kein spezifischer anti-SGLT2 Antikörper zur Verfügung, um diese Beobachtung auch auf Proteinebene zu verifizieren. Ferner ist vorstellbar, dass andere Kaliumkanäle mit ähnlicher Funktion zumindest teilweise die Aufgabe des defekten TWIK1 Proteins kompensieren. Ein möglicher Kandidat dafür ist KCNQ1, welcher zusammen mit der β -Untereinheit KCNE1 in der luminalen Membran des spätproximalen Tubulus identifiziert wurde. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Kaliumkanal ebenfalls an der Stabilisierung des apikalen Membranpotentials bei der elektrogenen Rückresorption von Glucose und

Aminosäuren beteiligt ist (Vallon *et al.*, 2001). Wenn KCNQ1 und TWIK1 tatsächlich ähnliche Aufgaben übernehmen, so würde dies ebenfalls erklären, warum der Verlust von TWIK1 zu einem so schwachen Phänotyp führt. Es ist denkbar, dass unter normaler bis mäßiger Glucosebelastung der repolarisierende Strom von KCNQ1/KCNE1 für eine adäquate Rückresorption ausreicht. Wenn jedoch sehr viel Glucose anfällt, benötigen die Tubuluszellen infolge der starken Depolarisation beide Kaliumkanäle.

In einem weiteren Experiment sollte geprüft werden, ob TWIK1 auch den elektrogenen Transportprozess anderer Substrate im proximalen Tubulus unterstützt. Dabei wurde der Spontanurin von TWIK1^{+/+} und TWIK1^{-/-} Mäusen auf mögliche Unterschiede in der Aminosäureausscheidung hin untersucht. Vor allem neutrale Aminosäuren werden über Transporter des B⁰ Systems natriumabhängig und elektrogen über die luminale Membran transportiert (Kanai *et al.*, 2000; Broer *et al.*, 2004; Verrey *et al.*, 2005) und führen so zu einer apikalen Depolarisation (Fromter, 1982; Messner *et al.*, 1985; Lang *et al.*, 1986; Rehwald *et al.*, 1986; Vallon *et al.*, 2001). Es konnten keine Unterschiede zwischen TWIK1^{+/+} und TWIK1^{-/-} Mäusen beobachtet werden (Abb. 15A), was aber eine mögliche Beteiligung von TWIK1 an der Rückresorption von Aminosäuren im proximalen Tubulus nicht ausschließt. Die verwendeten Versuchstiere wurden keiner besonderen Diät ausgesetzt. Weder bei der Glucose- noch bei der Phosphatausscheidung (Nie *et al.*, 2005) wurden unter Kontrollbedingungen Unterschiede zwischen TWIK1^{+/+} und TWIK1^{-/-} Mäusen beobachtet. Es ist also denkbar, dass auch hier ein Phänotyp erst unter hoher Aminosäurebelastung in Erscheinung tritt. Interessanterweise zeigten sich jedoch deutliche Unterschiede bezüglich der Aminosäureausscheidung zwischen männlichen und weiblichen Mäusen (Abb. 15B). Diese könnten z.B. durch unterschiedliche metabolische Anforderungen der beiden Geschlechter bedingt sein. Ferner ist vorstellbar, dass auch Aminosäuretransporter in einer geschlechtsabhängigen Weise reguliert werden, was allerdings bislang noch nicht in der Literatur beschrieben wurde.

5.1.4 TWIK1 und Endozytose im proximalen Tubulus

TWIK1 konnte in nahezu allen Abschnitten des proximalen Tubulus in einem intrazellulären Kompartiment gefunden werden, welches direkt an der Basis der aktinreichen Mikrovilli lag. Die Arbeitsgruppe um Dr. Lesage konnte zeigen, dass dieses Kompartiment in MDCK-Zellen dem bereits beschriebenen endosomalen Recycling Kompartiment entspricht (Decressac *et al.*, 2004). Weiterhin wurde beobachtet, dass TWIK1 über EFA6 mit ARF6 interagiert. Dieses kleine G-Protein ist ein wichtiger Modulator von Endozytoseprozessen in MDCK-Zellen (Altschuler *et al.*, 1999) und außerdem im Endozytoseapparat des proximalen Tubulus lokalisiert (Maranda *et al.*, 2001). ARF6 zirkuliert zwischen der Plasmamembran und den Recycling Endosomen und

kontrolliert dabei postendozytotische Prozesse (Prigent *et al.*, 2003). Weiterhin wurde beobachtet, dass die Überexpression von TWIK1 in HeLa-Zellen zu einer verminderten Endozytoserate von Transferrin führte, unabhängig von einer intakten Kanalfunktion des TWIK1 Proteins (Decressac *et al.*, 2004). Ferner wurde im Sammelrohr eine Beteiligung von TWIK1 an der AQP-2 Internalisierung diskutiert (Nie *et al.*, 2005). All diese Befunde weisen darauf hin, dass TWIK1 im proximalen Tubulus der Nieren möglicherweise eine Rolle bei Endozytoseprozessen spielt. Durch die Interaktion mit ARF6/EFA6 beeinflusst TWIK1 dabei eventuell die Translokation von Membranproteinen von der Bürstensaummembran in das endosomale Recycling Kompartiment (Decressac *et al.*, 2004). In Immunfluoreszenz-Experimenten beobachteten wir keine überlappende Färbung zwischen TWIK1 und den Vesikeln der „Fluid-phase“ Endozytose. Allerdings zeigte sich im Bürstensaum des proximalen Tubulus eine partielle Kolokalisation mit Cubilin, einem Schlüsselprotein der rezeptorvermittelten Endozytose (Zhai *et al.*, 2000; Christensen and Birn, 2001; Verroust *et al.*, 2002). Diese Kolokalisation war auch an der Basis der Mikrovilli zu erkennen, von wo aus sich die Vesikel der rezeptorvermittelten Endozytose abschnüren (Abb. 16). Interessanterweise wurde hier auch eine überlappende Färbung von TWIK1 mit Clathrin beobachtet, welches entscheidend an der Hüllbildung der Endozytosevesikel beteiligt ist (Nie *et al.*, 2005).

Die Erkenntnisse, welche in den letzten Jahren über TWIK1 gewonnen wurden, deuten immer mehr darauf hin, dass dieses Protein vermutlich mehr als nur ein Kaliumkanal ist. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass der beobachtete Effekt auf die renale Glucoseausscheidung auch auf eine solche kanalunabhängige Funktion zurückgeführt werden kann. Im Zusammenhang mit der Rückresorption von Phosphat wurde beobachtet, dass TWIK1^{-/-} Mäuse weniger Phosphattransporter in der Bürstensaummembran exprimierten, was ebenfalls als Grund für die erhöhte fraktionelle Phosphatausscheidung gegenüber TWIK1^{+/+} Mäusen diskutiert wurde (Nie *et al.*, 2005). Wir konnten allerdings anhand von Immunfluoreszenzfärbungen keine Unterschiede in der Expressionsstärke von SGLT1 zwischen TWIK1^{+/+} und TWIK1^{-/-} Mäusen beobachten (Daten nicht gezeigt), was eher für die Funktion von TWIK1 als repolarisierender luminaler Kaliumkanal spricht.

5.2 TWIK1 in den β -Zellen der Maus

5.2.1 Lokalisation von TWIK1 im Pankreas der Maus

In Immunfluoreszenz-Experimenten wurde eine starke Expression von TWIK1 in den Langerhans Inseln des Pankreas beobachtet, wohingegen das exokrine Drüsengewebe kein Signal zeigte (Abb. 17). Kofärbungen ergaben, dass TWIK1 fast ausschließlich in den Insulin-produzierenden β -Zellen lokalisiert war. Die Glucagon-produzierenden α -Zellen und die Somatostatin-produzierenden δ -Zellen des endokrinen Pankreas hingegen zeigten kaum eine Färbung (Abb. 18). Die Expression von TWIK1 in den PP-Zellen wurde nicht untersucht, da diese nur etwa 5% der gesamten Zellen einer Insel ausmachen (Cabrera *et al.*, 2006). Eine Analyse der subzellulären Lokalisation in β -Zellen ergab, dass TWIK1 nur in granulären Strukturen im Zytosol anzutreffen war. Außerdem wurde eine partielle Kolokalisation von TWIK1 mit insulinhaltigen Granula beobachtet (Abb. 19). Die bisher in der Literatur beschriebene Lokalisation von TWIK1 in nicht-polarisierten Zellen beschränkt sich ebenfalls auf ein intrazelluläres Kompartiment, welches analog zu den polarisierten Zellen als endosomales Recycling Kompartiment identifiziert werden konnte. Dieses liegt jedoch nicht am apikalen Pol der Zelle, sondern gruppiert sich in einem weiten Bereich um den Zellkern herum (pericentriolar recycling endosomes) (Decressac *et al.*, 2004). Es ist vorstellbar, dass TWIK1 hier zwischengespeichert wird, bis ein bestimmter Stimulus den Einbau in die Zellmembran veranlasst. Allerdings konnte in Gewebeschnitten des Pankreas keine eindeutige Membranfärbung beobachtet werden. Dabei wurden sowohl nüchterne Mäuse untersucht als auch Mäuse, deren Insulinsekretion kurz vor dem Fixieren durch eine intraperitoneale Glucoseinjektion stimuliert wurde (Daten nicht gezeigt). TWIK1 scheint also in den β -Zellen der Maus eine intrazelluläre Rolle zu spielen. Die partielle Kolokalisation mit insulinhaltigen Vesikeln legt die Vermutung nahe, dass TWIK1 eher an der Reifung oder Freisetzung der Granula beteiligt ist, statt in der Zellmembran als Kaliumkanal zu fungieren. Allerdings wurde TWIK1 auch ohne Kolokalisation mit Insulingranula beobachtet. Es ist denkbar, dass die zytosolischen Areale, in denen nur TWIK1 lokalisiert ist, auf die beschriebene Lokalisation im endosomalen Recycling Kompartiment zurückgeführt werden kann. Andererseits wurden auch insulinhaltigen Vesikel beobachtet, welche keine TWIK1 Färbung zeigten. Hier kann gemutmaßt werden, dass TWIK1 nur mit Granula interagiert, welche sich in einem bestimmten Reifestadium befinden.

5.2.2 $TWIK1^{-/-}$ Mäuse zeigen eine verstärkte Insulinsekretion

Um die physiologische Relevanz der TWIK1 Expression im Pankreas zu untersuchen, wurden *in vivo* Experimente an $TWIK1^{+/+}$ und $TWIK1^{-/-}$ Mäusen durchgeführt. Dabei wurde

die Insulinsekretion bei den Versuchstieren durch intraperitoneale Injektion von Glucose (Intraperitonealer Glucosetoleranztest, IPGTT) (Abb. 20) oder durch Fructosediät (Abb. 21) stimuliert. Verglichen mit TWIK1^{+/+} Mäusen führte dies bei TWIK1^{-/-} Mäusen zu einer verstärkten Insulinfreisetzung und in Folge dessen zu niedrigeren Glucosekonzentrationen im Plasma. Diese Befunde liefern starke Hinweise für eine mögliche Beteiligung von TWIK1 bei der Insulinsekretion. Allerdings wäre es ebenso denkbar, dass TWIK1^{-/-} Mäuse eine größere β -Zellmasse aufweisen, sei es durch eine vermehrte Anzahl von Inseln pro Pankreas oder durch eine größere Inselfläche. Mikroskopische Vermessung der Langerhans Inseln bei TWIK1^{+/+} und TWIK1^{-/-} Mäusen führten aber zu einem gegenteiligen Ergebnis. So zeigten TWIK1^{-/-} Mäuse eher eine reduzierte Inselfläche (Abb. 22A) bei einem vergleichbaren prozentualen Anteil an α - und δ -Zellen (Abb. 22B). Dies würde auf eine reduzierte β -Zellmasse bei TWIK1^{-/-} Mäusen hindeuten, vorausgesetzt die Anzahl an Inseln pro Pankreas wäre bei TWIK1^{+/+} und TWIK1^{-/-} Mäusen in etwa gleich gewesen. Allerdings sind diese Ergebnisse mit großer Vorsicht zu interpretieren, da die Gesamtfläche einer Langerhansinsel durch ihre runde bis ovale Form stark von der getroffenen Schnittebene abhängig ist. Zudem wurde keine aufwendige Bestimmung der Gesamtanzahl an Langerhans Inseln pro Pankreas vorgenommen. Wir gehen aber nicht davon aus, dass morphologische Veränderungen als Grund für die verstärkte Insulinsekretion bei TWIK1^{-/-} Mäusen in Frage kommt. Vielmehr weisen die *in vitro* Daten darauf hin, dass TWIK1 in den β -Zellen der Maus eine direkte Rolle bei der Insulinsekretion spielt. Experimente wurden durchgeführt, bei denen isolierte Langerhans Inseln von TWIK1^{+/+} und TWIK1^{-/-} Mäusen mit Glucose zur Insulinsekretion stimuliert wurden (Abb. 23). In Übereinstimmung mit den *in vivo* Experimenten zeigten auch hier Inselzellen von TWIK1^{-/-} Mäusen eine gesteigerte Insulinsekretion im Vergleich zu Inselzellen von TWIK1^{+/+} Mäusen. Durch diese Methode konnte weitgehend ausgeschlossen werden, dass TWIK1 beispielsweise über Modulation weiterer physiologischer Stimulatoren/Inhibitoren der Insulinfreisetzung indirekt an der Sekretion beteiligt war.

Sowohl in den *in vivo* als auch in den *in vitro* Experimenten wurden keine Unterschiede bei der Insulinfreisetzung von TWIK1^{+/+} und TWIK1^{-/-} Mäusen unter Kontrollbedingungen beobachtet. Dies liefert Hinweise darauf, dass TWIK1 auf die basale Insulinausschüttung keinen Einfluss hat, sondern erst bei einer stimulierten Sekretion seine Aufgabe erfüllt. Betrachtet man den Verlauf der Insulinsekretion beim *in vitro* Versuch (Abb. 23), so erkennt man, dass TWIK1 sowohl an der 1. Phase als auch an der 2. Phase der Freisetzung beteiligt sein muss. Zum einen erreichten Inseln von TWIK1^{-/-} Mäusen deutlich höhere Spitzenwerte bei der initialen schnellen Sekretion, welche in Übereinstimmung mit der Literatur in unseren Experimenten etwa 5-10 min anhielt (Barg

et al., 2002a). Außerdem wurde bei anhaltender Stimulation auch eine vermehrte Freisetzung bei der nachfolgend langsamen Phase der Insulinsekretion beobachtet. Zudem benötigten Inseln von TWIK1^{-/-} Mäusen längere Zeit um wieder auf die basale Insulinfreisetzung zurückzukehren. Dies deutet darauf hin, dass hier vielleicht Mechanismen gestört sind, welche eine adäquate Beendigung der Insulinsekretion bewirken. Ferner war auffällig, dass Langerhans Inseln von TWIK1^{-/-} Mäusen eine höhere statistische Streuung bei der Menge an sezerniertem Insulin aufwiesen, was eventuell mit einer beeinträchtigten Regulation der Insulinsekretion oder mit einer mehr oder minder ausgeprägten Kompensation der gestörten TWIK1 Funktion erklärt werden kann.

5.2.3 TWIK1 arbeitet in β -Zellen nicht als Kaliumkanal in der Plasmamembran

Die beobachteten Phänomene legen nahe, dass TWIK1, entsprechend seiner Funktion als Kaliumkanal, eine Rolle bei der Repolarisation der Zellmembran von β -Zellen spielt. Es wurde zunächst vermutet, dass TWIK1 zusammen mit Kv2.1 einen repolarisierenden Kaliumstrom liefert, welcher für eine Beendigung der Glucose-induzierten, Ca²⁺-abhängigen Aktionspotentiale sorgt. Somit hätte ein Verlust der TWIK1 Funktion zu einer gesteigerten zytosolischen Ca²⁺ Aktivität und folglich zu der beobachteten verstärkten Insulinfreisetzung bei TWIK1^{-/-} Mäusen führen müssen. Für diese Fragestellung wurden fluoreszenzoptische Ca²⁺-Messungen mit Fura-2 an isolierten Langerhans Inseln von TWIK1^{+/+} und TWIK1^{-/-} Mäusen durchgeführt (Abb. 24). Überraschenderweise zeigten jedoch Inseln von TWIK1^{-/-} Mäusen eher eine verringerte Ca²⁺-Antwort auf eine Glucose-induzierte Depolarisation. Diese lag im Vergleich zu TWIK1^{+/+} Mäusen während der Stimulation mit 20 mM Glucose signifikant niedriger und auch die maximale Ca²⁺-Aktivität (Peakhöhen bei 10 mM und 20mM Glucose) war verringert. Eine Erklärung für dieses Phänomen kann mit dem momentanen Kenntnisstand nicht geliefert werden. Allerdings kann daraus gefolgert werden, dass die vermehrte Insulinsekretion bei TWIK1^{-/-} Mäusen nicht über eine gesteigerte zytosolische Ca²⁺-Aktivität erfolgt. Zudem sprechen zwei weitere Fakten gegen eine Beteiligung von TWIK1 bei der Repolarisation der Ca²⁺-abhängigen Aktionspotentiale. Zum einen konnte TWIK1 in der Zellmembran von β -Zellen immunhistochemisch nicht nachgewiesen werden, zum anderen regulieren normalerweise spannungsabhängige Kaliumkanäle wie Kv2.1 Repolarisationsvorgänge von Aktionspotentialen. Eine Beteiligung von 2-P-Domänen Kaliumkanälen an solchen Prozessen scheint unwahrscheinlich, da diese aufgrund ihrer biophysikalischen Eigenschaften als so genannte „background“ Kaliumkanäle eher für die Aufrechterhaltung und Einstellung des Ruhemembranpotentials verantwortlich sind.

Um eine Beteiligung von TWIK1 am Membranpotential von β -Zellen zu untersuchen, wurden Patch-Clamp Messungen an isolierten Inselzellen von TWIK1^{+/+} und TWIK1^{-/-}

Mäusen durchgeführt. Für diese Experimente wurde der so genannte Slow-Whole-Cell-Modus gewählt, da hierbei kein Austausch von ATP und Glucose zwischen Zelle und Pipette stattfinden kann. Da das Membranpotential von β -Zellen hauptsächlich durch die Aktivität des ATP-sensitiven Kaliumkanals Kir6.2 dominiert wird, würde somit eine Dialyse dieser Stoffe zu verfälschten Potentialmessungen führen. Die Ergebnisse zeigten jedoch klar, dass TWIK1 nicht an der Generierung des Ruhemembranpotentials beteiligt ist (Abb. 26). Unter Kontrollbedingungen wiesen Inselzellen von TWIK1^{+/+} und TWIK1^{-/-} Mäusen keine Unterschiede im Membranpotential auf. Ferner wurde auch der Schwellenwert für die Öffnung von spannungsabhängigen Ca²⁺-Kanälen durch den TWIK1 knockout nicht beeinflusst. Bei einer Depolarisation der Zelle mit 10 mM Glucose lag dieser etwa bei -55 mV, was in guter Übereinstimmung mit dem in der Literatur beschriebenen Wert von -50 mV ist (Ashcroft *et al.*, 1989). Ferner wurden auch bei der Frequenz und der Höhe der Aktionspotentiale keine Unterschiede beobachtet (Daten nicht gezeigt), was wiederum eine Rolle von TWIK1 bei der Repolarisation der Ca²⁺-abhängigen APs unwahrscheinlich macht.

Um den Beitrag von TWIK1 an der Kaliumleitfähigkeit von β -Zellen zu untersuchen wurden weitere Patch-Clamp Experimente im Whole-Cell-Modus an isolierten Inselzellen von TWIK1^{+/+} und TWIK1^{-/-} Mäusen durchgeführt. Ein direkter Vergleich der Stromantworten auf definierte Klemmspannungen ergab jedoch, dass diese sich weder in der Form, noch in der Kinetik unterschieden. Die Stromkurven von Inselzellen aus TWIK1^{+/+} und aus TWIK1^{-/-} Mäusen zeigten in identischer Weise einen Kaliumstrom mit leicht inaktivierender Kinetik bei positiven Klemmspannungen (Abb. 28). TWIK1 scheint also keinen Beitrag zum Kaliumstrom der β -Zellen zu leisten. Um eine mögliche Beteiligung während Phasen der Insulinsekretion zu untersuchen, wurden die Zellen mit Tolbutamid stimuliert. Diese Behandlung führte analog zur Behandlung mit Glucose (Abb. 25) zunächst zu einer Depolarisation der β -Zellen, verursacht durch die Hemmung von Kir6.2, gefolgt von Ca²⁺ abhängigen Aktionspotentialen (Abb. 27). Jedoch waren auch hier keine offensichtlichen Unterschiede bezüglich Form und Kinetik des Kaliumstroms zu beobachten. Auch der durch Tolbutamid hemmbare Anteil des Kaliumstroms war zwischen Inselzellen von TWIK1^{+/+} und TWIK1^{-/-} Mäusen nicht verschieden (Abb. 28). Eine Analyse der I-V-Diagramme bestätigte diese Befunde (Abb. 29). Weder der initial gemessene Strom (I_{initial}), noch der nicht-inaktivierende Anteil (I_{final}) waren unter Kontrollbedingungen zwischen den Versuchsgruppen verschieden. Interessanterweise wurde jedoch nach Behandlung mit Tolbutamid beobachtet, dass I_{final} bei Inselzellen von TWIK1^{-/-} Mäusen bei Klemmspannungen positiver als -20 mV höher lag. Dieser Unterschied wurde in der Tendenz ebenso bei allen anderen I-V-Diagrammen beobachtet. Dies würde bedeuten, dass die Kaliumleitfähigkeit von β -Zellen trotz der Inaktivierung der

Kanalfunktion von TWIK1 eher zunimmt. Diese Beobachtung ist umso erstaunlicher, wenn man bedenkt, dass TWIK1^{-/-} Mäuse eine höhere Insulinausscheidung aufweisen. So würde man erwarten, dass ein Anstieg der Kaliumleitfähigkeit durch Hyperpolarisation der Zellmembran eine Sekretion von Insulin eher hemmt als fördert. Eine befriedigende Erklärung für diese Beobachtung kann im Rahmen der bisherigen Ergebnisse nicht geliefert werden. Allerdings kann mit Sicherheit gesagt werden, dass unter den gewählten experimentellen Bedingungen TWIK1 keinen Beitrag zum Membranpotential oder zur Kaliumleitfähigkeit in β -Zellen der Maus leistet. Wenn überhaupt, dann führt der TWIK1 knockout in der Tendenz eher zu einer Zunahme des Kaliumstroms.

5.2.4 Kanal-unabhängige Funktionen von TWIK1 in β -Zellen der Maus

Unserer Vorstellung nach übt TWIK1 in den β -Zellen der Maus keine Funktion als membranständiger Kaliumkanal aus. Dafür sprechen zwei experimentelle Befunde: 1) TWIK1 wurde in Immunfluoreszenz-Experimenten nicht in der Zellmembran beobachtet, sondern zeigte eine relativ homogene und granuläre Verteilung über das Zytosol. 2) TWIK1 trägt offensichtlich nicht zum Membranpotential und zur Kaliumleitfähigkeit der Insulin produzierenden Zellen bei. Trotzdem zeigen β -Zellen von TWIK1^{-/-} Mäusen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* eine gesteigerte Insulinproduktion. Über mögliche Ursachen kann mit dem jetzigen Kenntnisstand nur spekuliert werden. Wir glauben, dass diese Beobachtungen aus der Interaktion von TWIK1 mit ARF6 resultieren. In Immunfluoreszenz-Experimenten wurde eine Expression von ARF6 in Gewebeschnitten des Pankreas beobachtet (Abb. 30). Diese war bislang nur für die Insulin-produzierenden Zelllinien MIN6 und HIT-T15 beschrieben, wo ARF6 mit Hilfe von Western-Blots identifiziert werden konnte (Lawrence *et al.*, 2003; Grodnitzky *et al.*, 2007). Dabei wurde ARF6 nicht nur in den β -Zellen beobachtet, sondern in nahezu allen Zellen der Langerhans Inseln und ferner in geringerem Maße auch im exokrinen Pankreas. ARF6 war in den β -Zellen ebenfalls überwiegend intrazellulär lokalisiert. Allerdings waren auch Zellen vorhanden, bei denen sich das G-Protein in einem schmalen Bereich unterhalb der Plasmamembran konzentrierte. So ist beschrieben worden, dass sich ARF6 zwischen Plasmamembran und den Recycling Endosomen hin und her bewegt (Prigent *et al.*, 2003). Obwohl eine partielle Kolokalisation von TWIK1 mit ARF6 beobachtet werden konnte, war TWIK1 doch überwiegend homogen über das Zytosol verteilt (Abb. 30). Wie bereits in der Einleitung beschrieben wurde, ist ARF6 an der Insulinsekretion beteiligt. Ferner wurde eine Interaktion von TWIK1 mit dem ARF6/EFA6 Komplex beschrieben, welcher in nicht-polarisierten Zellen vermutlich für die Internalisierung von TWIK1 verantwortlich ist (Decressac *et al.*, 2004). Jedoch wurde auch gezeigt, dass eine Überexpression von TWIK1 in Zellmodellen zu einer Verlangsamung der Endozytoserate

von Transferrin führte. Interessanterweise war dieses Phänomen auch bei Überexpression einer TWIK1-Mutante zu beobachten, deren Kanalfunktion durch eine Punktmutation zerstört wurde (TWIK1C69S). Da der Cysteinrest in Position 69 wahrscheinlich für die Dimerisierung des Kanals verantwortlich ist, führt ein Austausch dieser Aminosäure zu einem funktionsunfähigen Kanalprotein. Allerdings bleibt dadurch die Bindungsstelle für EFA6/ARF6 unbeeinflusst, welche sich am intrazellulären C-Terminus befindet (Decressac *et al.*, 2004). Die Überexpression einer TWIK1 Mutante, bei der dieser Teil des Carboxy-Terminus entfernt wurde, hatte keinen Effekt mehr auf die Endozytose. Es wurde unter anderem diskutiert, dass TWIK1 bei Recycling-Prozessen von Membranproteinen eine Rolle spielen könnte. Möglicherweise werden Translokationsprozesse von ARF6 zwischen Plasmamembran zu den Recycling-Endosomen durch Bindung an TWIK1 verlangsamt. Dies führt dann in Folge zu einer veränderten Oberflächenexpression anderer Membranproteine, wie beispielsweise dem Transferrinrezeptor. Dieses Modell könnte im Falle der β -Zellen wichtige Hinweise liefern. So wäre es denkbar, dass das veränderte TWIK1 Protein von TWIK1^{-/-} Mäusen nicht mehr in der Lage ist, ARF6 zu binden. Somit stünde der Zelle mehr ARF6 zur Verfügung, welches für die Insulinsekretion eine wichtige Rolle spielt. Es ist somit denkbar, dass z.B. eine gesteigerte Aktivierung der Phospholipase D (PLD) stattfindet, welche ihrerseits einen fördernden Einfluss auf die Sekretionsleistung der Zelle ausübt. Dieser Mechanismus könnte erklären, warum es bei TWIK1^{-/-} Mäusen zu einer verstärkten Insulinfreisetzung kommt, zumal die Aktivität der PLD auf beide Phasen der Insulinsekretion Einfluss nimmt (Hughes *et al.*, 2004). Allerdings gibt es mehrere Argumente, welche gegen diese Hypothese sprechen: 1) In MIN6 Zellen hatte die Überexpression von ARF6 keinen Einfluss auf die Insulinfreisetzung. Nur die Expression der inaktiven ARF6T27N-Mutante führte zu einer verminderten Sekretionsrate, wobei aber nur die 1. Phase der Insulinausschüttung betroffen war (Lawrence *et al.*, 2003). 2) Es gibt bislang keine Untersuchungen, inwieweit das TWIK1-knockout-Protein zu Interaktionen mit ARF6 fähig ist. Da das C-Terminale Ende des Proteins noch intakt ist, welches die Bindungsstelle für EFA6/ARF6 enthält, ist eine erhaltene Interaktion nicht ausgeschlossen. 3) Es konnte nicht überprüft werden, ob in β -Zellen von TWIK1^{-/-} Mäusen ARF6 eine andere Lokalisation aufweist als bei TWIK1^{+/+} Mäusen, da die unfreundlicherweise zur Verfügung gestellte Menge an anti-ARF6 Antikörper dafür nicht ausreichend war. So wäre es von großem Nutzen gewesen, die subzelluläre Lokalisation von ARF6 genauer zu untersuchen, sowohl bei nüchternen Mäusen als auch bei Mäusen, deren Insulinsekretion stimuliert wurde.

Im Zusammenhang mit ARF6 sind noch weitere Modelle vorstellbar. Es kann spekuliert werden, dass TWIK1 direkt an der Aktivierung der PLD über ARF6 beteiligt ist.

Interessanterweise wurde bei der PLD eine partielle Kolo­kalisierung mit insulinhaltigen Granula in MIN6-Zellen beobachtet (Hughes *et al.*, 2004). Allerdings konnten wir aus Mangel an einem anti-PLD Antikörper bislang nicht bestätigen, dass diese Vesikel mit jenen übereinstimmen, welche auch eine TWIK1 Färbung aufweisen. Es ist somit möglich, dass das TWIK1 knockout Protein zu einer verstärkten ARF6-vermittelten Aktivierung der PLD führt, ohne dass sich die intrazelluläre ARF6 Konzentration bzw. Lokalisation ändert. Dieses Modell würde sehr gut zu der Beobachtung passen, dass beide Phasen der Insulinfreisetzung vom TWIK1 knockout beeinflusst wurden. Ferner wäre denkbar, dass das TWIK1 knockout Protein eine gesteigerte Affinität zu ARF6 aufweist und dessen intrazelluläre Konzentration dadurch erniedrigt wird. Dies könnte einen destabilisierenden Einfluss auf das Zytoskelett haben, wodurch die Exozytose insulinhaltiger Granula bei β -Zellen von TWIK1^{-/-} Mäusen erleichtert wird.

Bei Kofärbungen von TWIK1 mit Vamp8 (Endobrevin) wurde von uns in Gewebeschnitten des Pankreas eine Kolo­kalisierung der beiden Proteine beobachtet (Abb. 30). Vamp8 ist ein Mitglied der v-SNARE Familie und ist in MDCK-Zellen auf das endosomale Recycling Kompartiment beschränkt. In den polaren Epithelzellen ist Vamp8 nur im apikalen Pol der Zelle lokalisiert und dient hier wahrscheinlich dem endosomalen Verkehr (Steegmaier *et al.*, 2000). Die bereits erwähnte Lokalisation von TWIK1 im endosomalen Recycling Kompartiment wurde unter anderem aus einer Koexpression von TWIK1 mit Vamp8 abgeleitet (Decressac *et al.*, 2004). In den Insulin produzierenden MIN6-Zellen wurde Vamp8 jedoch in den frühen Endosomen gefunden, wobei aber eine zusätzliche Lokalisation in Recycling Endosomen nicht ausgeschlossen wurde (Nagamatsu *et al.*, 2001). Immunfluoreszenz-Experimente zeigten hier eine granuläre Verteilung von Vamp8 über das gesamte Zytosol, vergleichbar mit unseren TWIK1 Färbungen in nativen β -Zellen. Interessanterweise führte eine Überexpression von Vamp8 in MIN6- und INS1-Zellen, aber auch in isolierten β -Zellen von Ratten, zu einer verminderten Glucose-induzierten Insulinausschüttung. Da Vamp8 sowohl mit Syntaxin 1A (Nagamatsu *et al.*, 2001) als auch mit α -SNAP (Wong *et al.*, 1998) interagiert, wird angenommen, dass dieses Protein eine wichtige Rolle beim „Docking“ oder der Fusion von endozytotischen Vesikeln mit den Endosomen spielt. Der genaue Mechanismus, über welchen Vamp8 die Insulinsekretion beeinträchtigt, ist unklar. Es wird aber vermutet, dass dieses SNARE Protein am Recyclingprozess von insulinhaltigen Granula beteiligt ist, d.h. bei der Rückführung von vesikulären Proteinen und Membranbestandteilen nach Verschmelzung der Granula mit der Plasmamembran. Nachdem diese Proteine durch Endozytose internalisiert werden, erfolgt ein Transport zum trans-Golgi Netzwerk (TGN) oder zu den frühen Endosomen (Patzak and Winkler, 1986; Hurtley, 1993; Partoens *et al.*, 1998).

Allerdings findet in den frühen Endosomen vermutlich kein Recycling der vesikulären Proteine statt, sondern eine Vorbereitung für den Abbau in Lysosomen. Es wurde postuliert, dass die Überexpression von Vamp8 zu einer verstärkten Degradation der vesikulären Proteine über den endosomalen Weg führt, da eine Fusion der Granula mit den Endosomen begünstigt wird. Dadurch stehen diese Komponenten in geringerem Umfang für die Wiederverwertung im TGN zur Verfügung. Dies führt dann wahrscheinlich zu einer verminderten Produktion von insulinhaltigen Granula im TGN und in Folge zu einer geringeren Sekretionsleistung der β -Zelle. Interessanterweise wurde erst kürzlich entdeckt, dass Vamp8 ebenfalls auf insulinhaltigen Granula lokalisiert ist (Brunner *et al.*, 2007). Eigene Untersuchungen haben ergeben, dass Endobrevin stark in β -Zellen der Maus exprimiert wird und eine gute Kolo-kalisation mit TWIK1 zeigt. Diese Befunde liefern wichtige Hinweise darauf, dass TWIK1 nicht nur im endosomalen Recycling Kompartiment lokalisiert ist, sondern vermutlich auch in frühen Endosomen oder auf insulinhaltigen Granula. Dies würde zumindest die breite intrazelluläre Verteilung erklären. Ferner ist auch vorstellbar, dass TWIK1 in einem dieser Kompartimente mit Vamp8 interagiert. In der Einleitung wurde bereits ausführlich auf bisher beschriebene Wechselwirkungen von Ionenkanälen mit SNARE-Proteinen hingewiesen. Möglicherweise ist die Funktion von Vamp8 an die Interaktion mit TWIK1 gebunden. Es wäre vorstellbar, dass das TWIK1-knockout-Protein die Aktivität von VAMP8 vermindert und folglich mehr insulinhaltige Granula über das TGN wiederverwertet werden. Ein vermehrtes Angebot an vesikulären Membranproteinen könnte somit zu einem beschleunigten Recycling von Granula führen und letztendlich die höhere Insulinsekretion bei β -Zellen von TWIK1^{-/-} Mäusen erklären. Allerdings ist es mehr als fraglich, ob die Neusynthese von Granula einen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt bei der Insulinsekretion darstellt. Solch ein Phänomen würde sich vermutlich erst bei sehr lang anhaltender Stimulation bemerkbar machen. Dagegen haben unsere Experimente gezeigt, dass β -Zellen von TWIK1^{-/-} Mäusen bereits bei der initialen 1. Phase der Insulinfreisetzung eine verminderte Sekretionsrate aufwiesen. Trotz allem kann eine relevante Interaktion von TWIK1 mit Vamp8 nicht ausgeschlossen werden. So ist das vorgestellte Modell (Nagamatsu *et al.*, 2001), wie die Überexpression von Vamp8 die Insulinfreisetzung beeinflussen soll, nicht ganz schlüssig. Eine β -Zelle enthält ungefähr 10.000 insulinhaltige Granula. Bei der 1. Phase der Sekretion werden innerhalb von 5-10 min etwa 50-100 Granula freigesetzt. Bei der 2. Phase verringert sich Sekretionsrate auf 5-40 Vesikel pro Minute (Eliasson *et al.*, 1997; Rorsman *et al.*, 2000). Unter der Voraussetzung, dass keine neuen Vesikel produziert werden, wäre somit nach etwa 4 h Dauerstimulation der Vorrat an insulinhaltigen Granula einer Zelle aufgebraucht. In dem beschriebenen Experiment wurde jedoch schon über den Zeitraum einer Stunde ein Effekt der Vamp8-

Überexpression auf die Menge an freigesetztem Insulin beobachtet. Es ist also fraglich, ob eine verlangsamte Wiederverwertung von Granula der einzige Grund für die verringerte Sekretionsleistung der Zellen war.

5.3 TWIK1 im Dienste der Blutzuckerregulation

Unsere Experimente weisen darauf hin, dass TWIK1 in zwei verschiedenen Organen an der Homöostase des Blutzuckers beteiligt ist. In den Nieren dient TWIK1 der Rückresorption von filtrierter Glucose und verhindert vor allem bei hoher Blutglucose einen Glucoseverlust über den Urin. Im Pankreas führt das TWIK1-knockout-Protein zu einer erleichterten Insulinfreisetzung. Somit kann vermutet werden, dass TWIK1 in den β -Zellen der Maus normalerweise eine hemmende Wirkung auf die Insulinsekretion ausübt. Dies kann allerdings nicht mit Sicherheit behauptet werden. Zwar besitzt das TWIK1-knockout-Protein keine Leitfähigkeit für K^+ mehr, aber die Ergebnisse unserer Untersuchungen haben ergeben, dass TWIK1 in den β -Zellen der Maus wahrscheinlich keine Funktion als membranständiger Kaliumkanal ausübt. Es ist vorstellbar, dass das TWIK1-knockout-Protein durch eine modifizierte Interaktion mit Regulatoren der Insulinsekretion (z.B. ARF6) zu einer verstärkten Freisetzung führt. Dies muss aber nicht zwangsläufig bedeuten, dass die normale Funktion von TWIK1 in einer Hemmung der Insulinsekretion besteht. Es ist ebenso vorstellbar, dass TWIK1 die Insulinfreisetzung unterstützt, das TWIK1-knockout-Protein diese Aufgabe jedoch noch effektiver verrichten kann („gain of function“). Eine andere Möglichkeit wäre, dass TWIK1 normalerweise tatsächlich die Sekretion von Insulin unterdrückt, und dass das knockout-Protein dazu nicht mehr in der Lage ist („loss of function“). Letzteres Modell würde bedeuten, dass TWIK1 in zwei verschiedenen Organen eine synergistische Wirkung auf den Blutzucker ausübt. In der Niere führt die Aktivität von TWIK1 zu einer Erhöhung der Glucosekonzentration im Plasma durch Rückresorption von filtrierter Glucose. In den β -Zellen des Pankreas würde TWIK1 eine Hemmung der Insulinsekretion bewirken, was ebenfalls zu einem höheren Blutzucker führen würde.

6. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der physiologischen Rolle des 2-P-Domänen Kaliumkanals TWIK1 in der Niere und im Pankreas der Maus.

In der Niere zeigte TWIK1 immunhistochemisch eine Verteilung entlang des gesamten proximalen Tubulus. Die Lokalisation im spätproximalen Tubulus (S3-Segment) war eindeutig vom Geschlecht der untersuchten Maus abhängig. Weibliche Mäuse zeigten eine kräftige Färbung entlang der Mikrovilli des Bürstensaums, wohingegen bei männlichen Mäusen nur ein sehr schwaches Signal beobachtet wurde, welches auf ein intrazelluläres, subapikales Kompartiment beschränkt war. Eine Behandlung von weiblichen TWIK1^{+/+} Mäusen mit Testosteron führte zu einem männlichen Verteilungsmuster im spätproximalen Tubulus, was auf eine Beteiligung von Androgenen bei der Regulation von TWIK1 hindeutet. Weibliche Sexualhormone oder eine Kastration von männlichen Mäusen hingegen zeigten keine Effekte auf die Lokalisation oder die Expressionsstärke von TWIK1.

Weiterhin konnte in diesem S3-Segment eine weitgehende Kolo-kalisation von TWIK1 mit dem natriumabhängigen Glucosetransporter SGLT1 beobachtet werden. Dieser zeigte in gleicher Weise wie TWIK1 eine geschlechtsabhängige Regulation bezüglich Lokalisation und Expression. Diese gemeinsame Regulation deutet auf eine funktionelle Kopplung der beiden Proteine hin. Unserer Hypothese nach dient TWIK1 im spätproximalen Tubulus der Repolarisation der apikalen Membran, wenn diese durch den elektrogenen Transport von Glucose depolarisiert wird. Eine gestörte Kanalfunktion von TWIK1 sollte daher mit einer verminderten renalen Glucoserückresorption bei TWIK1^{-/-} Mäusen einhergehen. Tatsächlich wurde bei TWIK1^{-/-} Mäusen unter Glucosebelastung eine höhere Glucoseausscheidung mit dem Urin beobachtet. Dieser Unterschied trat jedoch erst ab sehr hohen Blutzuckerwerten größer als 35 mM auf. Da SGLT2 in frühen Abschnitten des proximalen Tubulus bereits die Hauptlast (~ 90%) der filtrierten Glucose rückresorbiert, scheint sich ein Defekt in späten Abschnitten also erst nach Überschreiten der Transportkapazität von SGLT2 bemerkbar zu machen.

Im Pankreas der Maus war TWIK1 überwiegend in den Insulin produzierenden β -Zellen lokalisiert. Immunfluoreszenz-Experimente zeigten hier eine intrazelluläre, granuläre Verteilung von TWIK1 und eine partielle Kolo-kalisation mit insulinhaltigen Vesikeln.

Um eine mögliche Beteiligung von TWIK1 an der Insulinsekretion zu überprüfen, wurden *in vivo* und *in vitro* Experimente an TWIK1^{+/+} und TWIK1^{-/-} Mäusen durchgeführt. Bei einer

in vivo Stimulation der Insulinsekretion durch einen intraperitonealen Glucosetoleranztest oder durch eine Fructosediät wurde bei TWIK1^{-/-} Mäusen übereinstimmend ein niedrigerer Blutzucker gemessen, welcher aus einer verstärkten Insulinsekretion resultierte. Um einen indirekten Effekt auszuschließen, wurde darüber hinaus die Insulinsekretion *in vitro* an isolierten Langerhans Inseln untersucht. Auch hier wurde eine verstärkte Freisetzung von Insulin bei Inseln von TWIK1^{-/-} Mäusen im Vergleich zu Inseln von TWIK1^{+/+} Mäusen beobachtet.

Eine Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺ Konzentration gilt als Auslöser der Exozytose insulinhaltiger Granula. Da Kaliumkanäle die Aktivität von spannungsabhängigen Ca²⁺ Kanälen beeinflussen, wurde an isolierten β -Zellen untersucht, ob TWIK1 an der Regulation der intrazellulären Ca²⁺ Aktivität beteiligt ist. Bei fluoreszenzoptischen Messungen mit dem Farbstoff FURA-2 zeigten Inselzellen von TWIK1^{-/-} Mäusen jedoch keine gesteigerte Ca²⁺ Aktivität im Vergleich zu Inselzellen von TWIK1^{+/+} Mäusen. Weiterhin wurde mit Hilfe von Patch-Clamp Messungen gezeigt, dass TWIK1 keinen Beitrag zum Membranpotential von isolierten β -Zellen leistet und auch nicht messbar zur Kaliumleitfähigkeit beiträgt. Die Befunde der Ca²⁺-Messungen und der Patch-Clamp Experimente deuten darauf hin, dass TWIK1 in den β -Zellen der Maus wahrscheinlich keine Funktion als membranständiger Kaliumkanal ausübt. Auch die ausschließlich intrazelluläre Lokalisation von TWIK1 unterstreicht diese These.

Bislang ist noch unklar, wie genau TWIK1 die Insulinsekretion beeinflusst. Allerdings wird vermutet, dass dabei die Interaktion von TWIK1 mit dem kleinen G-Protein ARF6 eine zentrale Rolle einnimmt. Frühere Arbeiten an Zellmodellen konnten zeigen, dass diese Interaktion Einfluss auf endozytotische Vorgänge nimmt, selbst nach einer Zerstörung der Kanalfunktion von TWIK1. Außerdem wurde beschrieben, dass ARF6 eine wichtige Rolle bei der Insulinsekretion spielt. In Immunfluoreszenz-Experimenten wurde von uns eine weitgehende Kolo-kalisation von TWIK1 mit ARF6 in β -Zellen des Pankreas beobachtet. Es ist also möglich, dass eine veränderte Interaktion zwischen dem TWIK1 knockout Protein und ARF6 zu der beobachteten verstärkten Insulinfreisetzung bei TWIK1^{-/-} Mäusen führt.

Zusammenfassend kann man sagen, dass TWIK1 in zwei verschiedenen Organen der Aufrechterhaltung der Glucosehomöostase dient. Zum einen unterstützt das TWIK1 Protein in der Niere proximal-tubuläre Transportprozesse von Glucose. Zum anderen fungiert es in β -Zellen des Pankreas als intrazellulärer Modulator der Insulinsekretion und nicht als Kanal in der Plasmamembran. TWIK1 scheint also neben seiner klassischen Funktion als Kaliumkanal noch weitere Aufgaben zu übernehmen, welche nicht an seine Eigenschaft als ionenleitende Pore gebunden sind.

7. Literaturverzeichnis

1. Aguilar-Bryan L and Bryan J (1999) Molecular biology of adenosine triphosphate-sensitive potassium channels. *Endocr Rev*, **20**, 101-135.
2. Alloui A, Zimmermann K, Mamet J, Duprat F, Noel J, Chemin J, Guy N, Blondeau N, Voilley N, Rubat-Coudert C, Borsotto M, Romey G, Heurteaux C, Reeh P, Eschalier A, and Lazdunski M (2006) TREK-1, a K⁺ channel involved in polymodal pain perception. *EMBO J*, **25**, 2368-2376.
3. Altschuler Y, Liu S, Katz L, Tang K, Hardy S, Brodsky F, Apodaca G, and Mostov K (1999) ADP-ribosylation factor 6 and endocytosis at the apical surface of Madin-Darby canine kidney cells. *J Cell Biol*, **147**, 7-12.
4. Apodaca G (2001) Endocytic traffic in polarized epithelial cells: role of the actin and microtubule cytoskeleton. *Traffic*, **2**, 149-159.
5. Arrighi I, Lesage F, Scimeca JC, Carle GF, and Barhanin J (1998) Structure, chromosome localization, and tissue distribution of the mouse *twik* K⁺ channel gene. *FEBS Lett*, **425**, 310-316.
6. Ashcroft F and Rorsman P (2004) Type 2 diabetes mellitus: not quite exciting enough? *Hum Mol Genet*, **13 Spec No 1**, R21-R31.
7. Ashcroft FM, Proks P, Smith PA, Ammala C, Bokvist K, and Rorsman P (1994) Stimulus-secretion coupling in pancreatic beta cells. *J Cell Biochem*, **55 Suppl**, 54-65.
8. Ashcroft FM and Rorsman P (1989) Electrophysiology of the pancreatic beta-cell. *Prog Biophys Mol Biol*, **54**, 87-143.
9. Atlas D (2001) Functional and physical coupling of voltage-sensitive calcium channels with exocytotic proteins: ramifications for the secretion mechanism. *J Neurochem*, **77**, 972-985.
10. Babenko AP, Aguilar-Bryan L, and Bryan J (1998) A view of *sur/KIR6.X*, KATP channels. *Annu Rev Physiol*, **60**, 667-687.
11. Barbosa RM, Silva AM, Tome AR, Stamford JA, Santos RM, and Rosario LM (1998) Control of pulsatile 5-HT/insulin secretion from single mouse pancreatic islets by intracellular calcium dynamics. *J Physiol*, **510 (Pt 1)**, 135-143.

12. Barg S, Eliasson L, Renstrom E, and Rorsman P (2002a) A subset of 50 secretory granules in close contact with L-type Ca^{2+} channels accounts for first-phase insulin secretion in mouse beta-cells. *Diabetes*, **51 Suppl 1**, S74-S82.
13. Barg S, Huang P, Eliasson L, Nelson DJ, Obermuller S, Rorsman P, Thevenod F, and Renstrom E (2001a) Priming of insulin granules for exocytosis by granular Cl^- uptake and acidification. *J Cell Sci*, **114**, 2145-2154.
14. Barg S, Ma X, Eliasson L, Galvanovskis J, Gopel SO, Obermuller S, Platzer J, Renstrom E, Trus M, Atlas D, Striessnig J, and Rorsman P (2001b) Fast exocytosis with few Ca^{2+} channels in insulin-secreting mouse pancreatic B cells. *Biophys J*, **81**, 3308-3323.
15. Barg S, Olofsson CS, Schriever-Abeln J, Wendt A, Gebre-Medhin S, Renstrom E, and Rorsman P (2002b) Delay between fusion pore opening and peptide release from large dense-core vesicles in neuroendocrine cells. *Neuron*, **33**, 287-299.
16. Basciano H, Federico L, and Adeli K (2005) Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia. *Nutr Metab (Lond)*, **2**, 5.
17. Bayliss DA, Sirois JE, and Talley EM (2003) The TASK family: two-pore domain background K^+ channels. *Mol Interv*, **3**, 205-219.
18. Bergsten P (1995) Slow and fast oscillations of cytoplasmic Ca^{2+} in pancreatic islets correspond to pulsatile insulin release. *Am J Physiol*, **268**, E282-E287.
19. Bhat HK, Hacker HJ, Bannasch P, Thompson EA, and Liehr JG (1993) Localization of estrogen receptors in interstitial cells of hamster kidney and in estradiol-induced renal tumors as evidence of the mesenchymal origin of this neoplasm. *Cancer Res*, **53**, 5447-5451.
20. Bittner MA and Holz RW (1992) A temperature-sensitive step in exocytosis. *J Biol Chem*, **267**, 16226-16229.
21. Bokvist K, Eliasson L, Ammala C, Renstrom E, and Rorsman P (1995) Co-localization of L-type Ca^{2+} channels and insulin-containing secretory granules and its significance for the initiation of exocytosis in mouse pancreatic B-cells. *EMBO J*, **14**, 50-57.
22. Bonser AM and Garcia-Webb P (1984) C-peptide measurement: methods and clinical utility. *Crit Rev Clin Lab Sci*, **19**, 297-352.
23. Boshans RL, Szanto S, van Aelst L, and D'Souza-Schorey C (2000) ADP-ribosylation factor 6 regulates actin cytoskeleton remodeling in coordination with Rac1 and RhoA. *Mol Cell Biol*, **20**, 3685-3694.

-
24. Boulkroun S, Le Moellic C, Blot-Chabaud M, Farman N, and Courtois-Coutry N (2005) Expression of androgen receptor and androgen regulation of NDRG2 in the rat renal collecting duct. *Pflugers Arch*, **451**, 388-394.
 25. Bratanova-Tochkova TK, Cheng H, Daniel S, Gunawardana S, Liu YJ, Mulvaney-Musa J, Schermerhorn T, Straub SG, Yajima H, and Sharp GW (2002) Triggering and augmentation mechanisms, granule pools, and biphasic insulin secretion. *Diabetes*, **51 Suppl 1**, S83-S90.
 26. Broer A, Klingel K, Kowalczyk S, Rasko JE, Cavanaugh J, and Broer S (2004) Molecular cloning of mouse amino acid transport system B⁰, a neutral amino acid transporter related to Hartnup disorder. *J Biol Chem*, **279**, 24467-24476.
 27. Brown FD, Thompson N, Saqib KM, Clark JM, Powner D, Thompson NT, Solari R, and Wakelam MJ (1998) Phospholipase D1 localises to secretory granules and lysosomes and is plasma-membrane translocated on cellular stimulation. *Curr Biol*, **8**, 835-838.
 28. Brunner Y, Coute Y, Iezzi M, Foti M, Fukuda M, Hochstrasser DF, Wollheim CB, and Sanchez JC (2007) Proteomics analysis of insulin secretory granules. *Mol Cell Proteomics*, **6**, 1007-1017.
 29. Bryan J, Vila-Carriles WH, Zhao G, Babenko AP, and Aguilar-Bryan L (2004) Toward linking structure with function in ATP-sensitive K⁺ channels. *Diabetes*, **53 Suppl 3**, S104-S112.
 30. Buckingham SD, Kidd JF, Law RJ, Franks CJ, and Sattelle DB (2005) Structure and function of two-pore-domain K⁺ channels: contributions from genetic model organisms. *Trends Pharmacol Sci*.
 31. Buckler KJ, Williams BA, and Honore E (2000) An oxygen-, acid- and anaesthetic-sensitive TASK-like background potassium channel in rat arterial chemoreceptor cells. *J Physiol*, **525 Pt 1**, 135-142.
 32. Bumke-Vogt C, Bahr V, Diederich S, Herrmann SM, Anagnostopoulos I, Oelkers W, and Quinkler M (2002) Expression of the progesterone receptor and progesterone-metabolising enzymes in the female and male human kidney. *J Endocrinol*, **175**, 349-364.
 33. Cabrera O, Berman DM, Kenyon NS, Ricordi C, Berggren PO, and Caicedo A (2006) The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 2334-2339.
 34. Calakos N and Scheller RH (1996) Synaptic vesicle biogenesis, docking, and fusion: a molecular description. *Physiol Rev*, **76**, 1-29.

35. Chapman ER (2002) Synaptotagmin: a Ca²⁺ sensor that triggers exocytosis? *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**, 498-508.
36. Cheek TR and Burgoyne RD (1986) Nicotine-evoked disassembly of cortical actin filaments in adrenal chromaffin cells. *FEBS Lett*, **207**, 110-114.
37. Cheek TR and Burgoyne RD (1987) Cyclic AMP inhibits both nicotine-induced actin disassembly and catecholamine secretion from bovine adrenal chromaffin cells. *J Biol Chem*, **262**, 11663-11666.
38. Chen XZ, Coady MJ, Jackson F, Berteloot A, and Lapointe JY (1995) Thermodynamic determination of the Na⁺: glucose coupling ratio for the human SGLT1 cotransporter. *Biophys J*, **69**, 2405-2414.
39. Chen YG, Siddhanta A, Austin CD, Hammond SM, Sung TC, Frohman MA, Morris AJ, and Shields D (1997) Phospholipase D stimulates release of nascent secretory vesicles from the trans-Golgi network. *J Cell Biol*, **138**, 495-504.
40. Choi WS, Kim YM, Combs C, Frohman MA, and Beaven MA (2002) Phospholipases D1 and D2 regulate different phases of exocytosis in mast cells. *J Immunol*, **168**, 5682-5689.
41. Christensen EI and Birn H (2001) Megalin and cubilin: synergistic endocytic receptors in renal proximal tubule. *Am J Physiol Renal Physiol*, **280**, F562-F573.
42. Cluzeaud F, Reyes R, Escoubet B, Fay M, Lazdunski M, Bonvalet JP, Lesage F, and Farman N (1998) Expression of TWIK-1, a novel weakly inward rectifying potassium channel in rat kidney. *Am J Physiol*, **275**, C1602-C1609.
43. Cockcroft S, Way G, O'Luanagh N, Pardo R, Sarri E, and Fensome A (2002) Signalling role for ARF and phospholipase D in mast cell exocytosis stimulated by crosslinking of the high affinity FcepsilonR1 receptor. *Mol Immunol*, **38**, 1277-1282.
44. Czirjak G and Enyedi P (2002) Formation of functional heterodimers between the TASK-1 and TASK-3 two-pore domain potassium channel subunits. *J Biol Chem*, **277**, 5426-5432.
45. Dean PM (1973) Ultrastructural morphometry of the pancreatic β -cell. *Diabetologia*, **9**, 115-119.
46. Decressac S, Franco M, Bendahhou S, Warth R, Knauer S, Barhanin J, Lazdunski M, and Lesage F (2004) ARF6-dependent interaction of the TWIK1 K⁺ channel with EFA6, a GDP/GTP exchange factor for ARF6. *EMBO Rep*.
47. Diener M and Scharrer E (1995) Swelling-activated conductances for chloride, potassium and amino acids in the rat colon: a whole-cell study. *Exp Physiol*, **80**, 411-428.

48. Dohmen RJ (2004) SUMO protein modification. *Biochim Biophys Acta*, **1695**, 113-131.
49. Dominguez JH, Camp K, Maianu L, and Garvey WT (1992) Glucose transporters of rat proximal tubule: differential expression and subcellular distribution. *Am J Physiol*, **262**, F807-F812.
50. Donaldson JG and Jackson CL (2000) Regulators and effectors of the ARF GTPases. *Curr Opin Cell Biol*, **12**, 475-482.
51. Doyle DA, Morais CJ, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, and MacKinnon R (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science*, **280**, 69-77.
52. Dryselius S, Grapengiesser E, Hellman B, and Gylfe E (1999) Voltage-dependent entry and generation of slow Ca²⁺ oscillations in glucose-stimulated pancreatic beta-cells. *Am J Physiol*, **276**, E512-E518.
53. Du G, Huang P, Liang BT, and Frohman MA (2004) Phospholipase D2 localizes to the plasma membrane and regulates angiotensin II receptor endocytosis. *Mol Biol Cell*, **15**, 1024-1030.
54. Duprat F, Lesage F, Fink M, Reyes R, Heurteaux C, and Lazdunski M (1997) TASK, a human background K⁺ channel to sense external pH variations near physiological pH. *EMBO J*, **16**, 5464-5471.
55. Eliasson L, Renstrom E, Ding WG, Proks P, and Rorsman P (1997) Rapid ATP-dependent priming of secretory granules precedes Ca²⁺-induced exocytosis in mouse pancreatic B-cells. *J Physiol*, **503 (Pt 2)**, 399-412.
56. Enmark E, Pelto-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G, Nordenskjold M, and Gustafsson JA (1997) Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab*, **82**, 4258-4265.
57. Exton JH (2002) Phospholipase D - structure, regulation and function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, **144**, 1-94.
58. Feliciangeli S, Bendahhou S, Sandoz G, Gounon P, Reichold M, Warth R, Lazdunski M, Barhanin J, and Lesage F (2007) Does sumoylation control K2P1/TWIK1 background K⁺ channels? *Cell*, **130**, 563-569.
59. Fenwick EM, Marty A, and Neher E (1982) Sodium and calcium channels in bovine chromaffin cells. *J Physiol*, **331**, 599-635.

60. Fernandez-Chacon R, Konigstorfer A, Gerber SH, Garcia J, Matos MF, Stevens CF, Brose N, Rizo J, Rosenmund C, and Sudhof TC (2001) Synaptotagmin I functions as a calcium regulator of release probability. *Nature*, **410**, 41-49.
61. Fink M, Lesage F, Duprat F, Heurteaux C, Reyes R, Fosset M, and Lazdunski M (1998) A neuronal two P domain K⁺ channel stimulated by arachidonic acid and polyunsaturated fatty acids. *EMBO J*, **17**, 3297-3308.
62. Freyberg Z, Sweeney D, Siddhanta A, Bourgoin S, Frohman M, and Shields D (2001) Intracellular localization of phospholipase D1 in mammalian cells. *Mol Biol Cell*, **12**, 943-955.
63. Fromter E (1982) Electrophysiological analysis of rat renal sugar and amino acid transport. I. Basic phenomena. *Pflugers Arch*, **393**, 179-189.
64. Fujita-Yoshigaki J, Dohke Y, Hara-Yokoyama M, Furuyama S, and Sugiyama H (1999) Presence of a complex containing vesicle-associated membrane protein 2 in rat parotid acinar cells and its disassembly upon activation of cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem*, **274**, 23642-23646.
65. Gao Z, Reavey-Cantwell J, Young RA, Jegier P, and Wolf BA (2000) Synaptotagmin III/VII isoforms mediate Ca²⁺-induced insulin secretion in pancreatic islet beta-cells. *J Biol Chem*, **275**, 36079-36085.
66. Gilon P, Shepherd RM, and Henquin JC (1993) Oscillations of secretion driven by oscillations of cytoplasmic Ca²⁺ as evidences in single pancreatic islets. *J Biol Chem*, **268**, 22265-22268.
67. Godi A, Pertile P, Meyers R, Marra P, Di Tullio G, Iurisci C, Luini A, Corda D, and De Matteis MA (1999) ARF mediates recruitment of PtdIns-4-OH kinase-beta and stimulates synthesis of PtdIns(4,5)P2 on the Golgi complex. *Nat Cell Biol*, **1**, 280-287.
68. Gojova A and Barakat AI (2005) Vascular endothelial wound closure under shear stress: role of membrane fluidity and flow-sensitive ion channels. *J Appl Physiol*, **98**, 2355-2362.
69. Gopel S, Kanno T, Barg S, Galvanovskis J, and Rorsman P (1999) Voltage-gated and resting membrane currents recorded from B-cells in intact mouse pancreatic islets. *J Physiol*, **521 Pt 3**, 717-728.
70. Grodnitzky JA, Syed N, Kimber MJ, Day TA, Donaldson JG, and Hsu WH (2007) Somatostatin receptors signal through EFA6A-ARF6 to activate phospholipase D in clonal beta-cells. *J Biol Chem*, **282**, 13410-13418.

71. Gromada J, Holst JJ, and Rorsman P (1998) Cellular regulation of islet hormone secretion by the incretin hormone glucagon-like peptide 1. *Pflugers Arch*, **435**, 583-594.
72. Gromada J, Hoy M, Renstrom E, Bokvist K, Eliasson L, Gopel S, and Rorsman P (1999) CaM kinase II-dependent mobilization of secretory granules underlies acetylcholine-induced stimulation of exocytosis in mouse pancreatic B-cells. *J Physiol*, **518 (Pt 3)**, 745-759.
73. Guilherme A, Emoto M, Buxton JM, Bose S, Sabini R, Theurkauf WE, Leszyk J, and Czech MP (2000) Perinuclear localization and insulin responsiveness of GLUT4 requires cytoskeletal integrity in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem*, **275**, 38151-38159.
74. Haas M and Forbush B, III (2000) The Na-K-Cl cotransporter of secretory epithelia. *Annu Rev Physiol*, **62**, 515-534.
75. Hama K, Aoki J, Bandoh K, Inoue A, Endo T, Amano T, Suzuki H, and Arai H (2006) Lysophosphatidic receptor, LPA(3), is positively and negatively regulated by progesterone and estrogen in the mouse uterus. *Life Sci*.
76. Han HJ, Jung JC, and Taub M (1999) Response of primary rabbit kidney proximal tubule cells to estrogens. *J Cell Physiol*, **178**, 35-43.
77. Hay JC, Fiset PL, Jenkins GH, Fukami K, Takenawa T, Anderson RA, and Martin TF (1995) ATP-dependent inositide phosphorylation required for Ca²⁺-activated secretion. *Nature*, **374**, 173-177.
78. Hay JC and Martin TF (1992) Resolution of regulated secretion into sequential MgATP-dependent and calcium-dependent stages mediated by distinct cytosolic proteins. *J Cell Biol*, **119**, 139-151.
79. Heginbotham L, Lu Z, Abramson T, and MacKinnon R (1994) Mutations in the K⁺ channel signature sequence. *Biophys J*, **66**, 1061-1067.
80. Heinlein CA and Chang C (2002) The roles of androgen receptors and androgen-binding proteins in nongenomic androgen actions. *Mol Endocrinol*, **16**, 2181-2187.
81. Henquin JC and Meissner HP (1984) Significance of ionic fluxes and changes in membrane potential for stimulus-secretion coupling in pancreatic B-cells. *Experientia*, **40**, 1043-1052.
82. Herrington J, Zhou YP, Bugianesi RM, Dulski PM, Feng Y, Warren VA, Smith MM, Kohler MG, Garsky VM, Sanchez M, Wagner M, Raphaelli K, Banerjee P, Ahaghotu C, Wunderler D, Priest BT, Mehl JT, Garcia ML, McManus OB, Kaczorowski GJ, and Slaughter RS

- (2006) Blockers of the delayed-rectifier potassium current in pancreatic beta-cells enhance glucose-dependent insulin secretion. *Diabetes*, **55**, 1034-1042.
83. Heurteaux C, Guy N, Laigle C, Blondeau N, Duprat F, Mazzuca M, Lang-Lazdunski L, Widmann C, Zanzouri M, Romey G, and Lazdunski M (2004) TREK-1, a K⁺ channel involved in neuroprotection and general anesthesia. *EMBO J*, **23**, 2684-2695.
84. Heurteaux C, Lucas G, Guy N, El Yacoubi M, Thummler S, Peng XD, Noble F, Blondeau N, Widmann C, Borsotto M, Gobbi G, Vaugeois JM, Debonnel G, and Lazdunski M (2006) Deletion of the background potassium channel TREK-1 results in a depression-resistant phenotype. *Nat Neurosci*, **9**, 1134-1141.
85. Higashiura K, Ura N, Takada T, Li Y, Torii T, Togashi N, Takada M, Takizawa H, and Shimamoto K (2000) The effects of an angiotensin-converting enzyme inhibitor and an angiotensin II receptor antagonist on insulin resistance in fructose-fed rats. *Am J Hypertens*, **13**, 290-297.
86. Hoekstra D, Tyteca D, and van IJzendoorn SC (2004) The subapical compartment: a traffic center in membrane polarity development. *J Cell Sci*, **117**, 2183-2192.
87. Hoekstra JB, van Rijn HJ, Erkelens DW, and Thijssen JH (1982) C-peptide. *Diabetes Care*, **5**, 438-446.
88. Hoffmann EK (2000) Intracellular signalling involved in volume regulatory decrease. *Cell Physiol Biochem*, **10**, 273-288.
89. Honda A, Nogami M, Yokozeki T, Yamazaki M, Nakamura H, Watanabe H, Kawamoto K, Nakayama K, Morris AJ, Frohman MA, and Kanaho Y (1999) Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase alpha is a downstream effector of the small G protein ARF6 in membrane ruffle formation. *Cell*, **99**, 521-532.
90. Hughes WE, Elgundi Z, Huang P, Frohman MA, and Biden TJ (2004) Phospholipase D1 regulates secretagogue-stimulated insulin release in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem*, **279**, 27534-27541.
91. Hughes WE and Parker PJ (2001) Endosomal localization of phospholipase D 1a and 1b is defined by the C-termini of the proteins, and is independent of activity. *Biochem J*, **356**, 727-736.
92. Humeau Y, Vitale N, Chasserot-Golaz S, Dupont JL, Du G, Frohman MA, Bader MF, and Poulain B (2001) A role for phospholipase D1 in neurotransmitter release. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 15300-15305.

-
93. Hurlley SM (1993) Recycling of a secretory granule membrane protein after stimulated secretion. *J Cell Sci*, **106 (Pt 2)**, 649-655.
 94. Hwang IS, Ho H, Hoffman BB, and Reaven GM (1987) Fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats. *Hypertension*, **10**, 512-516.
 95. Isern J, Hagenbuch B, Stieger B, Meier PJ, and Meseguer A (2001) Functional analysis and androgen-regulated expression of mouse organic anion transporting polypeptide 1 (Oatp1) in the kidney. *Biochim Biophys Acta*, **1518**, 73-78.
 96. Ishihara H, Shibasaki Y, Kizuki N, Katagiri H, Yazaki Y, Asano T, and Oka Y (1996) Cloning of cDNAs encoding two isoforms of 68-kDa type I phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase. *J Biol Chem*, **271**, 23611-23614.
 97. Ji J, Yang SN, Huang X, Li X, Sheu L, Diamant N, Berggren PO, and Gaisano HY (2002) Modulation of L-type Ca²⁺ channels by distinct domains within SNAP-25. *Diabetes*, **51**, 1425-1436.
 98. Joost HG and Thorens B (2001) The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members (review). *Mol Membr Biol*, **18**, 247-256.
 99. Kaldi K, Szeberenyi J, Rada BK, Kovacs P, Geiszt M, Mocsai A, and Ligeti E (2002) Contribution of phospholipase D and a brefeldin A-sensitive ARF to chemoattractant-induced superoxide production and secretion of human neutrophils. *J Leukoc Biol*, **71**, 695-700.
 100. Kanai Y, Lee WS, You G, Brown D, and Hediger MA (1994) The human kidney low affinity Na⁺/glucose cotransporter SGLT2. Delineation of the major renal reabsorptive mechanism for D-glucose. *J Clin Invest*, **93**, 397-404.
 101. Kanai Y, Segawa H, Chairoungdua A, Kim JY, Kim DK, Matsuo H, Cha SH, and Endou H (2000) Amino acid transporters: molecular structure and physiological roles. *Nephrol Dial Transplant*, **15 Suppl 6**, 9-10.
 102. Kang Y, Huang X, Pasyk EA, Ji J, Holz GG, Wheeler MB, Tsushima RG, and Gaisano HY (2002) Syntaxin-3 and syntaxin-1A inhibit L-type calcium channel activity, insulin biosynthesis and exocytosis in beta-cell lines. *Diabetologia*, **45**, 231-241.
 103. Kasim-Karakas SE, Vriend H, Almario R, Chow LC, and Goodman MN (1996) Effects of dietary carbohydrates on glucose and lipid metabolism in golden Syrian hamsters. *J Lab Clin Med*, **128**, 208-213.

104. Ketchum KA, Joiner WJ, Sellers AJ, Kaczmarek LK, and Goldstein SA (1995) A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem. *Nature*, **376**, 690-695.
105. Kooijman EE, Chupin V, de Kruijff B, and Burger KN (2003) Modulation of membrane curvature by phosphatidic acid and lysophosphatidic acid. *Traffic*, **4**, 162-174.
106. Koster JC, Permutt MA, and Nichols CG (2005) Diabetes and insulin secretion: the ATP-sensitive K⁺ channel (K_{ATP}) connection. *Diabetes*, **54**, 3065-3072.
107. Krishnamra N and Cheeveewattana V (1994) Studies of acute effect of prolactin on distribution of absorbed calcium and long-term effect on calcium balance in weaned, young, and sexually mature rats. *Can J Physiol Pharmacol*, **72**, 1521-1527.
108. Ktistakis NT, Brown HA, Sternweis PC, and Roth MG (1995) Phospholipase D is present on Golgi-enriched membranes and its activation by ADP ribosylation factor is sensitive to brefeldin A. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 4952-4956.
109. Kunzelmann K (2005) Ion channels and cancer. *J Membr Biol*, **205**, 159-173.
110. Lang F, Busch GL, Ritter M, Volkl H, Waldegger S, Gulbins E, and Haussinger D (1998) Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiol Rev*, **78**, 247-306.
111. Lang F, Foller M, Lang K, Lang P, Ritter M, Vereninov A, Szabo I, Huber SM, and Gulbins E (2007) Cell volume regulatory ion channels in cell proliferation and cell death. *Methods Enzymol*, **428**, 209-225.
112. Lang F, Messner G, and Rehwald W (1986) Electrophysiology of sodium-coupled transport in proximal renal tubules. *Am J Physiol*, **250**, F953-F962.
113. Lang J (1999) Molecular mechanisms and regulation of insulin exocytosis as a paradigm of endocrine secretion. *Eur J Biochem*, **259**, 3-17.
114. Lang J, Fukuda M, Zhang H, Mikoshiba K, and Wollheim CB (1997) The first C2 domain of synaptotagmin is required for exocytosis of insulin from pancreatic beta-cells: action of synaptotagmin at low micromolar calcium. *EMBO J*, **16**, 5837-5846.
115. Lawrence JT and Birnbaum MJ (2003) ADP-ribosylation factor 6 regulates insulin secretion through plasma membrane phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 13320-13325.
116. Lee WS, Kanai Y, Wells RG, and Hediger MA (1994) The high affinity Na⁺/glucose cotransporter. Re-evaluation of function and distribution of expression. *J Biol Chem*, **269**, 12032-12039.

117. Lesage F (2003) Pharmacology of neuronal background potassium channels. *Neuropharmacology*, **44**, 1-7.
118. Lesage F, Guillemare E, Fink M, Duprat F, Lazdunski M, Romey G, and Barhanin J (1996a) TWIK-1, a ubiquitous human weakly inward rectifying K⁺ channel with a novel structure. *EMBO J*, **15**, 1004-1011.
119. Lesage F, Lauritzen I, Duprat F, Reyes R, Fink M, Heurteaux C, and Lazdunski M (1997) The structure, function and distribution of the mouse TWIK-1 K⁺ channel. *FEBS Lett*, **402**, 28-32.
120. Lesage F and Lazdunski M (2000) Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels. *Am J Physiol Renal Physiol*, **279**, F793-F801.
121. Lesage F, Reyes R, Fink M, Duprat F, Guillemare E, and Lazdunski M (1996b) Dimerization of TWIK-1 K⁺ channel subunits via a disulfide bridge. *EMBO J*, **15**, 6400-6407.
122. Leung YM, Kang Y, Gao X, Xia F, Xie H, Sheu L, Tsuk S, Lotan I, Tsushima RG, and Gaisano HY (2003) Syntaxin 1A binds to the cytoplasmic C terminus of Kv2.1 to regulate channel gating and trafficking. *J Biol Chem*, **278**, 17532-17538.
123. Leung YM, Kang Y, Xia F, Sheu L, Gao X, Xie H, Tsushima RG, and Gaisano HY (2005) Open form of syntaxin-1A is a more potent inhibitor than wild-type syntaxin-1A of Kv2.1 channels. *Biochem J*, **387**, 195-202.
124. Leung YM, Kwan EP, Ng B, Kang Y, and Gaisano HY (2007) SNAREing voltage-gated K⁺ and ATP-sensitive K⁺ channels: tuning beta-cell excitability with syntaxin-1A and other exocytotic proteins. *Endocr Rev*, **28**, 653-663.
125. Levillain O, Diaz JJ, Blanchard O, and Dechaud H (2005) Testosterone down-regulates ornithine aminotransferase gene and up-regulates arginase II and ornithine decarboxylase genes for polyamines synthesis in the murine kidney. *Endocrinology*, **146**, 950-959.
126. Levillain O, Ventura G, Dechaud H, Hobeika M, Meseguer A, Moinard C, and Cynober L (2007) Sex-differential expression of ornithine aminotransferase in the mouse kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*, **292**, F1016-F1027.
127. Li SJ and Hochstrasser M (2003) The Ulp1 SUMO isopeptidase: distinct domains required for viability, nuclear envelope localization, and substrate specificity. *J Cell Biol*, **160**, 1069-1081.
128. Liscovitch M, Czarny M, Fiucci G, Lavie Y, and Tang X (1999) Localization and possible functions of phospholipase D isozymes. *Biochim Biophys Acta*, **1439**, 245-263.

-
129. Ljubojevic M, Herak-Kramberger CM, Hagos Y, Bahn A, Endou H, Burckhardt G, and Sabolic I (2004) Rat renal cortical OAT1 and OAT3 exhibit gender differences determined by both androgen stimulation and estrogen inhibition. *Am J Physiol Renal Physiol*, **287**, F124-F138.
130. Longo N and Elsas LJ (1998) Human glucose transporters. *Adv Pediatr*, **45**, 293-313.
131. Lopes CM, Gallagher PG, Buck ME, Butler MH, and Goldstein SA (2000) Proton block and voltage gating are potassium-dependent in the cardiac leak channel Kcnk3. *J Biol Chem*, **275**, 16969-16978.
132. Lopes CM, Zilberberg N, and Goldstein SA (2001) Block of Kcnk3 by protons. Evidence that 2-P-domain potassium channel subunits function as homodimers. *J Biol Chem*, **276**, 24449-24452.
133. Lotz MM, Wang H, Song JC, Pories SE, and Matthews JB (2004) K⁺ channel inhibition accelerates intestinal epithelial cell wound healing. *Wound Repair Regen*, **12**, 565-574.
134. Lu R, Kanai N, Bao Y, Wolkoff AW, and Schuster VL (1996) Regulation of renal oatp mRNA expression by testosterone. *Am J Physiol*, **270**, F332-F337.
135. MacDonald PE, Ha XF, Wang J, Smukler SR, Sun AM, Gaisano HY, Salapatek AM, Backx PH, and Wheeler MB (2001) Members of the Kv1 and Kv2 voltage-dependent K⁺ channel families regulate insulin secretion. *Mol Endocrinol*, **15**, 1423-1435.
136. MacDonald PE, Wang G, Tsuk S, Dodo C, Kang Y, Tang L, Wheeler MB, Cattral MS, Lakey JR, Salapatek AM, Lotan I, and Gaisano HY (2002) Synaptosome-associated protein of 25 kilodaltons modulates Kv2.1 voltage-dependent K⁺ channels in neuroendocrine islet beta-cells through an interaction with the channel N terminus. *Mol Endocrinol*, **16**, 2452-2461.
137. MacDonald PE and Wheeler MB (2003) Voltage-dependent K⁺ channels in pancreatic beta cells: role, regulation and potential as therapeutic targets. *Diabetologia*, **46**, 1046-1062.
138. Macia E, Chabre M, and Franco M (2001) Specificities for the small G proteins ARF1 and ARF6 of the guanine nucleotide exchange factors ARNO and EFA6. *J Biol Chem*, **276**, 24925-24930.
139. Mackenzie B, Loo DD, and Wright EM (1998) Relationships between Na⁺/glucose cotransporter (SGLT1) currents and fluxes. *J Membr Biol*, **162**, 101-106.
140. Maranda B, Brown D, Bourgoin S, Casanova JE, Vinay P, Ausiello DA, and Marshansky V (2001) Intra-endosomal pH-sensitive recruitment of the Arf-nucleotide exchange factor

- ARNO and Arf6 from cytoplasm to proximal tubule endosomes. *J Biol Chem*, **276**, 18540-18550.
141. Massenburg D, Han JS, Liyanage M, Patton WA, Rhee SG, Moss J, and Vaughan M (1994) Activation of rat brain phospholipase D by ADP-ribosylation factors 1, 5, and 6: separation of ADP-ribosylation factor-dependent and oleate-dependent enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 11718-11722.
142. McEwan IJ (2004) Molecular mechanisms of androgen receptor-mediated gene regulation: structure-function analysis of the AF-1 domain. *Endocr Relat Cancer*, **11**, 281-293.
143. Mears D (2004) Regulation of insulin secretion in islets of Langerhans by Ca^{2+} channels. *J Membr Biol*, **200**, 57-66.
144. Melchior F (2000) SUMO - nonclassical ubiquitin. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **16**, 591-626.
145. Messner G, Oberleithner H, and Lang F (1985) The effect of phenylalanine on the electrical properties of proximal tubule cells in the frog kidney. *Pflugers Arch*, **404**, 138-144.
146. Mochida S, Sheng ZH, Baker C, Kobayashi H, and Catterall WA (1996) Inhibition of neurotransmission by peptides containing the synaptic protein interaction site of N-type Ca^{2+} channels. *Neuron*, **17**, 781-788.
147. Mohapatra DP, Vacher H, and Trimmer JS (2007) The surprising catch of a voltage-gated potassium channel in a neuronal SNARE. *Sci STKE*, **2007**, e37.
148. Morton MJ, Abohamed A, Sivaprasadarao A, and Hunter M (2005) pH sensing in the two-pore domain K^+ channel, TASK2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 16102-16106.
149. Morton MJ, O'Connell AD, Sivaprasadarao A, and Hunter M (2003) Determinants of pH sensing in the two-pore domain K^+ channels TASK-1 and -2. *Pflugers Arch*, **445**, 577-583.
150. Moss J and Vaughan M (1998) Molecules in the ARF orbit. *J Biol Chem*, **273**, 21431-21434.
151. Mueckler M (1994) Facilitative glucose transporters. *Eur J Biochem*, **219**, 713-725.
152. Muller S, Hoegel C, Pyrowolakis G, and Jentsch S (2001) SUMO, ubiquitin's mysterious cousin. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 202-210.
153. Nagamatsu S, Nakamichi Y, Watanabe T, Matsushima S, Yamaguchi S, Ni J, Itagaki E, and Ishida H (2001) Localization of cellubrevin-related peptide, endobrevin, in the early endosome in pancreatic beta cells and its physiological function in exo-endocytosis of secretory granules. *J Cell Sci*, **114**, 219-227.

-
154. Nagao S, Kusaka M, Nishii K, Marunouchi T, Kurahashi H, Takahashi H, and Grantham J (2005) Androgen receptor pathway in rats with autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*, **16**, 2052-2062.
 155. Nakamura N, Suzuki Y, Sakuta H, Ookata K, Kawahara K, and Hirose S (1999) Inwardly rectifying K⁺ channel Kir7.1 is highly expressed in thyroid follicular cells, intestinal epithelial cells and choroid plexus epithelial cells: implication for a functional coupling with Na⁺,K⁺-ATPase. *Biochem J*, **342 (Pt 2)**, 329-336.
 156. Nichols CG (2006) K_{ATP} channels as molecular sensors of cellular metabolism. *Nature*, **440**, 470-476.
 157. Nicolas MT, Barhanin J, Reyes R, and Dememes D (2003) Cellular localization of TWIK-1, a two-pore-domain potassium channel in the rodent inner ear. *Hear Res*, **181**, 20-26.
 158. Nie X, Arrighi I, Kaissling B, Pfaff I, Mann J, Barhanin J, and Vallon V (2005) Expression and insights on function of potassium channel TWIK-1 in mouse kidney. *Pflugers Arch*, **451**, 479-488.
 159. Noonan WT and Banks RO (2000) Renal function and glucose transport in male and female mice with diet-induced type II diabetes mellitus. *Proc Soc Exp Biol Med*, **225**, 221-230.
 160. Okada Y, Shimizu T, Maeno E, Tanabe S, Wang X, and Takahashi N (2006) Volume-sensitive chloride channels involved in apoptotic volume decrease and cell death. *J Membr Biol*, **209**, 21-29.
 161. Olofsson CS, Gopel SO, Barg S, Galvanovskis J, Ma X, Salehi A, Rorsman P, and Eliasson L (2002) Fast insulin secretion reflects exocytosis of docked granules in mouse pancreatic B-cells. *Pflugers Arch*, **444**, 43-51.
 162. Orias M, Velazquez H, Tung F, Lee G, and Desir GV (1997) Cloning and localization of a double-pore K channel, KCNK1: exclusive expression in distal nephron segments. *Am J Physiol*, **273**, F663-F666.
 163. Ouar Z, Sole E, Bens M, Rafestin-Oblin ME, Meseguer A, and Vandewalle A (1998) Pleiotropic effects of dihydrotestosterone in immortalized mouse proximal tubule cells. Technical note. *Kidney Int*, **53**, 59-66.
 164. Pardo LA, Contreras-Jurado C, Zientkowska M, Alves F, and Stuhmer W (2005) Role of voltage-gated potassium channels in cancer. *J Membr Biol*, **205**, 115-124.
 165. Pardo LA, del Camino D, Sanchez A, Alves F, Bruggemann A, Beckh S, and Stuhmer W (1999) Oncogenic potential of EAG K⁺ channels. *EMBO J*, **18**, 5540-5547.

166. Parent L, Supplisson S, Loo DD, and Wright EM (1992) Electrogenic properties of the cloned Na⁺/glucose cotransporter: II. A transport model under nonrapid equilibrium conditions. *J Membr Biol*, **125**, 63-79.
167. Park KM, Kim JI, Ahn Y, Bonventre AJ, and Bonventre JV (2004) Testosterone is responsible for enhanced susceptibility of males to ischemic renal injury. *J Biol Chem*, **279**, 52282-52292.
168. Parsons TD, Coorsen JR, Horstmann H, and Almers W (1995) Docked granules, the exocytic burst, and the need for ATP hydrolysis in endocrine cells. *Neuron*, **15**, 1085-1096.
169. Partoens P, Slembrouck D, Quatacker J, Baudhuin P, Courtoy PJ, and De Potter WP (1998) Retrieved constituents of large dense-cored vesicles and synaptic vesicles intermix in stimulation-induced early endosomes of noradrenergic neurons. *J Cell Sci*, **111 (Pt 6)**, 681-689.
170. Pasyk EA, Kang Y, Huang X, Cui N, Sheu L, and Gaisano HY (2004) Syntaxin-1A binds the nucleotide-binding folds of sulphonylurea receptor 1 to regulate the K_{ATP} channel. *J Biol Chem*, **279**, 4234-4240.
171. Patel AJ and Honore E (2001) Properties and modulation of mammalian 2P domain K⁺ channels. *Trends Neurosci*, **24**, 339-346.
172. Patel AJ, Honore E, Lesage F, Fink M, Romey G, and Lazdunski M (1999) Inhalational anesthetics activate two-pore-domain background K⁺ channels. *Nat Neurosci*, **2**, 422-426.
173. Patel AJ and Lazdunski M (2004) The 2P-domain K⁺ channels: role in apoptosis and tumorigenesis. *Pflugers Arch*, **448**, 261-273.
174. Patzak A and Winkler H (1986) Exocytotic exposure and recycling of membrane antigens of chromaffin granules: ultrastructural evaluation after immunolabeling. *J Cell Biol*, **102**, 510-515.
175. Peterhoff M, Sieg A, Brede M, Chao CM, Hein L, and Ullrich S (2003) Inhibition of insulin secretion via distinct signaling pathways in alpha2-adrenoceptor knockout mice. *Eur J Endocrinol*, **149**, 343-350.
176. Pomplun D, Mohlig M, Spranger J, Pfeiffer AF, and Ristow M (2004) Elevation of blood glucose following anaesthetic treatment in C57BL/6 mice. *Horm Metab Res*, **36**, 67-69.
177. Prigent M, Dubois T, Raposo G, Derrien V, Tenza D, Rosse C, Camonis J, and Chavrier P (2003) ARF6 controls post-endocytic recycling through its downstream exocyst complex effector. *J Cell Biol*, **163**, 1111-1121.

178. Radhakrishna H, Al Awar O, Khachikian Z, and Donaldson JG (1999) ARF6 requirement for Rac ruffling suggests a role for membrane trafficking in cortical actin rearrangements. *J Cell Sci*, **112 (Pt 6)**, 855-866.
179. Rajan S, Plant LD, Rabin ML, Butler MH, and Goldstein SA (2005) Sumoylation silences the plasma membrane leak K⁺ channel K2P1. *Cell*, **121**, 37-47.
180. Rajan S, Wischmeyer E, Xin LG, Preisig-Muller R, Daut J, Karschin A, and Derst C (2000) TASK-3, a novel tandem pore domain acid-sensitive K⁺ channel. An extracellular histidine as pH sensor. *J Biol Chem*, **275**, 16650-16657.
181. Rao JN, Platoshyn O, Li L, Guo X, Golovina VA, Yuan JX, and Wang JY (2002) Activation of K⁺ channels and increased migration of differentiated intestinal epithelial cells after wounding. *Am J Physiol Cell Physiol*, **282**, C885-C898.
182. Rehwald W, Messner G, and Lang F (1986) Influence of barium on the effects of phenylalanine in proximal tubules. *Pflugers Arch*, **406**, 574-577.
183. Renstrom E, Barg S, Thevenod F, and Rorsman P (2002) Sulfonylurea-mediated stimulation of insulin exocytosis via an ATP-sensitive K⁺ channel-independent action. *Diabetes*, **51 Suppl 1**, S33-S36.
184. Renstrom E, Ding WG, Bokvist K, and Rorsman P (1996a) Neurotransmitter-induced inhibition of exocytosis in insulin-secreting beta cells by activation of calcineurin. *Neuron*, **17**, 513-522.
185. Renstrom E, Eliasson L, Bokvist K, and Rorsman P (1996b) Cooling inhibits exocytosis in single mouse pancreatic B-cells by suppression of granule mobilization. *J Physiol*, **494 (Pt 1)**, 41-52.
186. Renstrom E, Eliasson L, and Rorsman P (1997) Protein kinase A-dependent and - independent stimulation of exocytosis by cAMP in mouse pancreatic B-cells. *J Physiol*, **502 (Pt 1)**, 105-118.
187. Rettig J and Neher E (2002) Emerging roles of presynaptic proteins in Ca²⁺-triggered exocytosis. *Science*, **298**, 781-785.
188. Rizo J and Sudhof TC (2002) Snares and Munc18 in synaptic vesicle fusion. *Nat Rev Neurosci*, **3**, 641-653.
189. Roche PJ, Hoare SA, and Parker MG (1992) A consensus DNA-binding site for the androgen receptor. *Mol Endocrinol*, **6**, 2229-2235.

-
190. Roe MW, Worley JF, III, Mittal AA, Kuznetsov A, DasGupta S, Mertz RJ, Witherspoon SM, III, Blair N, Lancaster ME, McIntyre MS, Shehee WR, Dukes ID, and Philipson LH (1996) Expression and function of pancreatic beta-cell delayed rectifier K⁺ channels. Role in stimulus-secretion coupling. *J Biol Chem*, **271**, 32241-32246.
 191. Rogers JL, Mitchell AR, Maric C, Sandberg K, Myers A, and Mulroney SE (2007) Effect of sex hormones on renal estrogen and angiotensin type 1 receptors in female and male rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **292**, R794-R799.
 192. Rorsman P, Eliasson L, Renstrom E, Gromada J, Barg S, and Gopel S (2000) The cell physiology of biphasic insulin secretion. *News Physiol Sci*, **15**, 72-77.
 193. Rorsman P and Renstrom E (2003) Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells. *Diabetologia*, **46**, 1029-1045.
 194. Sabolic I, Asif AR, Budach WE, Wanke C, Bahn A, and Burckhardt G (2007) Gender differences in kidney function. *Pflugers Arch*.
 195. Sabolic I, Skarica M, Gorboulev V, Ljubojevic M, Balen D, Herak-Kramberger CM, and Koepsell H (2005) Rat renal glucose transporter SGLT1 exhibits zonal distribution and androgen-dependent gender differences. *Am J Physiol Renal Physiol*.
 196. Santos RM, Rosario LM, Nadal A, Garcia-Sancho J, Soria B, and Valdeolmillos M (1991) Widespread synchronous [Ca²⁺]_i oscillations due to bursting electrical activity in single pancreatic islets. *Pflugers Arch*, **418**, 417-422.
 197. Schmidt A, Wolde M, Thiele C, Fest W, Kratzin H, Podtelejnikov AV, Witke W, Huttner WB, and Soling HD (1999) Endophilin I mediates synaptic vesicle formation by transfer of arachidonate to lysophosphatidic acid. *Nature*, **401**, 133-141.
 198. Schwab A, Wojnowski L, Gabriel K, and Oberleithner H (1994) Oscillating activity of a Ca²⁺-sensitive K⁺ channel. A prerequisite for migration of transformed Madin-Darby canine kidney focus cells. *J Clin Invest*, **93**, 1631-1636.
 199. Sharp GW (1996) Mechanisms of inhibition of insulin release. *Am J Physiol*, **271**, C1781-C1799.
 200. Shen Y, Xu L, and Foster DA (2001) Role for phospholipase D in receptor-mediated endocytosis. *Mol Cell Biol*, **21**, 595-602.
 201. Shin OH, Rizo J, and Sudhof TC (2002a) Synaptotagmin function in dense core vesicle exocytosis studied in cracked PC12 cells. *Nat Neurosci*, **5**, 649-656.

202. Shin VY, Liu ES, Koo MW, Luo JC, So WH, and Cho CH (2002b) Nicotine suppresses gastric wound repair via the inhibition of polyamine and K⁺ channel expression. *Eur J Pharmacol*, **444**, 115-121.
203. Shurety W, Stewart NL, and Stow JL (1998) Fluid-phase markers in the basolateral endocytic pathway accumulate in response to the actin assembly-promoting drug Jasplakinolide. *Mol Biol Cell*, **9**, 957-975.
204. Singer-Lahat D, Sheinin A, Chikvashvili D, Tsuk S, Greitzer D, Friedrich R, Feinshreiber L, Ashery U, Benveniste M, Levitan ES, and Lotan I (2007) K⁺ channel facilitation of exocytosis by dynamic interaction with syntaxin. *J Neurosci*, **27**, 1651-1658.
205. Sontag JM, Aunis D, and Bader MF (1988) Peripheral actin filaments control calcium-mediated catecholamine release from streptolysin-O-permeabilized chromaffin cells. *Eur J Cell Biol*, **46**, 316-326.
206. Steegmaier M, Lee KC, Prekeris R, and Scheller RH (2000) SNARE protein trafficking in polarized MDCK cells. *Traffic*, **1**, 553-560.
207. Suganuma N, Segade F, Matsuzu K, and Bowden DW (2007) Differential expression of facilitative glucose transporters in normal and tumour kidney tissues. *BJU Int*, **99**, 1143-1149.
208. Sugita S, Shin OH, Han W, Lao Y, and Sudhof TC (2002) Synaptotagmins form a hierarchy of exocytotic Ca²⁺ sensors with distinct Ca²⁺ affinities. *EMBO J*, **21**, 270-280.
209. Sutton RB, Fasshauer D, Jahn R, and Brunger AT (1998) Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature*, **395**, 347-353.
210. Suzuki S, Yoshida J, and Takahashi T (1996) Effect of testosterone on carbonic anhydrase and Mg²⁺-dependent HCO₃⁻-stimulated ATPase activities in rat kidney: comparison with estradiol effect. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol*, **114**, 105-112.
211. Takahashi N, Kadowaki T, Yazaki Y, Miyashita Y, and Kasai H (1997) Multiple exocytotic pathways in pancreatic beta cells. *J Cell Biol*, **138**, 55-64.
212. Takeda H, Chodak G, Mutchnik S, Nakamoto T, and Chang C (1990) Immunohistochemical localization of androgen receptors with mono- and polyclonal antibodies to androgen receptor. *J Endocrinol*, **126**, 17-25.
213. Taylor AH and Al Azzawi F (2000) Immunolocalisation of oestrogen receptor beta in human tissues. *J Mol Endocrinol*, **24**, 145-155.

214. Thorens B, Lodish HF, and Brown D (1990) Differential localization of two glucose transporter isoforms in rat kidney. *Am J Physiol*, **259**, C286-C294.
215. Trifaro JM, Rodriguez dC, and Vitale ML (1992) Dynamic changes in chromaffin cell cytoskeleton as prelude to exocytosis. *Mol Neurobiol*, **6**, 339-358.
216. Tsuchiya K, Wang W, Giebisch G, and Welling PA (1992) ATP is a coupling modulator of parallel Na,K-ATPase-K-channel activity in the renal proximal tubule. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 6418-6422.
217. Turner RJ and Moran A (1982a) Further studies of proximal tubular brush border membrane D-glucose transport heterogeneity. *J Membr Biol*, **70**, 37-45.
218. Turner RJ and Moran A (1982b) Heterogeneity of sodium-dependent D-glucose transport sites along the proximal tubule: evidence from vesicle studies. *Am J Physiol*, **242**, F406-F414.
219. Uldry M and Thorens B (2004) The SLC2 family of facilitated hexose and polyol transporters. *Pflugers Arch*, **447**, 480-489.
220. Ullrich S and Wollheim CB (1985) Expression of both alpha 1- and alpha 2-adrenoceptors in an insulin-secreting cell line. Parallel studies of cytosolic free Ca²⁺ and insulin release. *Mol Pharmacol*, **28**, 100-106.
221. Urakami Y, Nakamura N, Takahashi K, Okuda M, Saito H, Hashimoto Y, and Inui K (1999) Gender differences in expression of organic cation transporter OCT2 in rat kidney. *FEBS Lett*, **461**, 339-342.
222. Urakami Y, Okuda M, Saito H, and Inui K (2000) Hormonal regulation of organic cation transporter OCT2 expression in rat kidney. *FEBS Lett*, **473**, 173-176.
223. Valdeolmillos M, Santos RM, Contreras D, Soria B, and Rosario LM (1989) Glucose-induced oscillations of intracellular Ca²⁺ concentration resembling bursting electrical activity in single mouse islets of Langerhans. *FEBS Lett*, **259**, 19-23.
224. Vallon V, Grahammer F, Richter K, Bleich M, Lang F, Barhanin J, Volkl H, and Warth R (2001) Role of KCNE1-dependent K⁺ fluxes in mouse proximal tubule. *J Am Soc Nephrol*, **12**, 2003-2011.
225. Verrey F, Ristic Z, Romeo E, Ramadan T, Makrides V, Dave MH, Wagner CA, and Camargo SM (2005) Novel renal amino acid transporters. *Annu Rev Physiol*, **67**, 557-572.

226. Verroust PJ, Birn H, Nielsen R, Kozyraki R, and Christensen EI (2002) The tandem endocytic receptors megalin and cubilin are important proteins in renal pathology. *Kidney Int*, **62**, 745-756.
227. Vitale ML, Seward EP, and Trifaro JM (1995) Chromaffin cell cortical actin network dynamics control the size of the release-ready vesicle pool and the initial rate of exocytosis. *Neuron*, **14**, 353-363.
228. Vitale N, Caumont AS, Chasserot-Golaz S, Du G, Wu S, Sciorra VA, Morris AJ, Frohman MA, and Bader MF (2001) Phospholipase D1: a key factor for the exocytotic machinery in neuroendocrine cells. *EMBO J*, **20**, 2424-2434.
229. Wallner EI, Wada J, Tramonti G, Lin S, and Kanwar YS (2001) Status of glucose transporters in the mammalian kidney and renal development. *Ren Fail*, **23**, 301-310.
230. Wang L, Cummings R, Usatyuk P, Morris A, Irani K, and Natarajan V (2002) Involvement of phospholipases D1 and D2 in sphingosine 1-phosphate-induced ERK (extracellular-signal-regulated kinase) activation and interleukin-8 secretion in human bronchial epithelial cells. *Biochem J*, **367**, 751-760.
231. Warth R, Barriere H, Meneton P, Bloch M, Thomas J, Tauc M, Heitzmann D, Romeo E, Verrey F, Mengual R, Guy N, Bendahhou S, Lesage F, Poujeol P, and Barhanin J (2004) Proximal renal tubular acidosis in TASK2 K⁺ channel-deficient mice reveals a mechanism for stabilizing bicarbonate transport. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 8215-8220.
232. Wells RG, Pajor AM, Kanai Y, Turk E, Wright EM, and Hediger MA (1992) Cloning of a human kidney cDNA with similarity to the sodium-glucose cotransporter. *Am J Physiol*, **263**, F459-F465.
233. Wiser O, Tobi D, Trus M, and Atlas D (1997) Synaptotagmin restores kinetic properties of a syntaxin-associated N-type voltage sensitive calcium channel. *FEBS Lett*, **404**, 203-207.
234. Wiser O, Trus M, Hernandez A, Renstrom E, Barg S, Rorsman P, and Atlas D (1999) The voltage sensitive Lc-type Ca²⁺ channel is functionally coupled to the exocytotic machinery. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 248-253.
235. Wong SH, Zhang T, Xu Y, Subramaniam VN, Griffiths G, and Hong W (1998) Endobrevin, a novel synaptobrevin/VAMP-like protein preferentially associated with the early endosome. *Mol Biol Cell*, **9**, 1549-1563.
236. Wood IS and Trayhurn P (2003) Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *Br J Nutr*, **89**, 3-9.

237. Wright EM, Hirayama BA, and Loo DF (2007) Active sugar transport in health and disease. *J Intern Med*, **261**, 32-43.
238. Wright EM and Turk E (2004) The sodium/glucose cotransport family SLC5. *Pflugers Arch*, **447**, 510-518.
239. Xia F, Gao X, Kwan E, Lam PP, Chan L, Sy K, Sheu L, Wheeler MB, Gaisano HY, and Tsushima RG (2004) Disruption of pancreatic beta-cell lipid rafts modifies Kv2.1 channel gating and insulin exocytosis. *J Biol Chem*, **279**, 24685-24691.
240. Yang J, Jan YN, and Jan LY (1995a) Control of rectification and permeation by residues in two distinct domains in an inward rectifier K⁺ channel. *Neuron*, **14**, 1047-1054.
241. Yang J, Jan YN, and Jan LY (1995b) Determination of the subunit stoichiometry of an inwardly rectifying potassium channel. *Neuron*, **15**, 1441-1447.
242. Yang SN, Larsson O, Branstrom R, Bertorello AM, Leibiger B, Leibiger IB, Moede T, Kohler M, Meister B, and Berggren PO (1999) Syntaxin 1 interacts with the L(D) subtype of voltage-gated Ca²⁺ channels in pancreatic beta cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 10164-10169.
243. You G, Lee WS, Barros EJ, Kanai Y, Huo TL, Khawaja S, Wells RG, Nigam SK, and Hediger MA (1995) Molecular characteristics of Na⁺-coupled glucose transporters in adult and embryonic rat kidney. *J Biol Chem*, **270**, 29365-29371.
244. Zhai XY, Nielsen R, Birn H, Drumm K, Mildenerger S, Freudinger R, Moestrup SK, Verroust PJ, Christensen EI, and Gekle M (2000) Cubilin- and megalin-mediated uptake of albumin in cultured proximal tubule cells of opossum kidney. *Kidney Int*, **58**, 1523-1533.
245. Zhang Q, Calafat J, Janssen H, and Greenberg S (1999) ARF6 is required for growth factor- and rac-mediated membrane ruffling in macrophages at a stage distal to rac membrane targeting. *Mol Cell Biol*, **19**, 8158-8168.
246. Zhang Q, Cox D, Tseng CC, Donaldson JG, and Greenberg S (1998) A requirement for ARF6 in Fcγ receptor-mediated phagocytosis in macrophages. *J Biol Chem*, **273**, 19977-19981.

8. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Dendrogramm der bekannten Kaliumkanalfamilien	5
Abb. 2: Topologie von 2-P-Domänen Kaliumkanäle.....	9
Abb. 3: Das TWIK1 knockout Konstrukt	15
Abb. 4: Transfektion von COS-Zellen mit mTWIK1 und „knockout“ mTWIK1	15
Abb. 5: Mechanismus der Rückresorption von Glucose im proximalen Tubulus.....	19
Abb. 6: Mechanismus der Glucose-induzierten Insulinsekretion	21
Abb. 7: Lokalisation von TWIK1 in der Niere der Maus	59
Abb. 8: Geschlechtsabhängige Expression von TWIK1 im proximalen Tubulus	61
Abb. 9: Kolokalisation von TWIK1 mit SGLT1	64
Abb. 10: Real-time PCR Messungen.....	66
Abb. 11: Behandlung von weiblichen Mäusen mit Testosteron	67
Abb. 12: Normalisierte Glucoseausscheidung bei TWIK1 ^{+/-} und TWIK1 ^{-/-} Mäusen.....	69
Abb. 13: Blutzucker, $F_{e\text{Gluc}}$, V_{Urin} und GFR unter Glucosebelastung.....	70
Abb. 14: Fraktionelle Glucoseausscheidung in Abhängigkeit vom Blutzucker	71
Abb. 15: Genotyp- und geschlechtsabhängige Aminosäureausscheidung	73
Abb. 16: TWIK1 und Endozytose im proximalen Tubulus	76
Abb. 17: Lokalisation von TWIK1 im Pankreas der Maus.....	77
Abb. 18: Lokalisation von TWIK1 in den Langerhans Inseln	79
Abb. 19: Partielle Kolokalisation von TWIK1 mit insulinhaltigen Granula	80
Abb. 20: Intraperitonealer Glucosetoleranztest	82
Abb. 21: Stimulation der Insulinsekretion durch Fructose Diät	83
Abb. 22: Mikroskopische Vermessung von Langerhans Inseln	85
Abb. 23: Wirkung von Glucose auf isolierte Langerhans Inseln <i>in vitro</i>	86
Abb. 24: Ca^{2+} -Messungen an isolierten Inselzellen	89
Abb. 25: Verlauf des Membranpotentials unter Stimulation von β -Zellen mit Glucose	90
Abb. 26: Statistische Auswertung des Membranpotentials.....	90
Abb. 27: Effekte von Tolbutamid auf den Kaliumstrom von β -Zellen.....	93
Abb. 28: Superpositionen der Ströme von primärkultivierten β -Zellen	94
Abb. 29: I-V-Diagramme der Whole-Cell-Experimente	95
Abb. 30: Kolokalisation von TWIK1 mit ARF6 und Vamp8	96

9. Abkürzungsverzeichnis

Ak	Antikörper
AP	Aktionspotential
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ARE	androgen response element
ARF6	ADP-ribosylation factor 6
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BB	brushborder (Bürstensaummembran)
BSA	Bovines Serum Albumin
CC	Current-Clamp-Modus
CC-zero	Current-Clamp-Zero-Modus
cDNA	complementary DNA
Cl	Clearance
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DIC	Differential Interferenz Kontrast
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EFA6	ARF6 guanine nucleotide exchange factor
EGTA	Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid
FCS	fetal calf serum (fetales Kälberserum)
Fe _{Gluc}	Fraktionale Glucoseausscheidung
FITC	Fluorescein-5-Isothiocyanat
FPE	fluid-phase endocytosis („Flüssigphasen“ Endozytose)
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	guanine nucleotide exchange factor
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
IPGTT	Intraperitonealer Glucosetoleranztest
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
I.E.	Internationale Einheit
i.p.	intraperitoneal
K2P Kanäle	2-P-Domänen Kaliumkanäle
KG	Körpergewicht

mRNA	messenger RNA
NBF	nucleotide-binding fold
OAT	organic anion transporter
OCT	organic cation transporter
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PE	Polyethylen
PFA	Paraformaldehyd
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLD	Phospholipase D
RME	receptor-mediated endocytosis (rezeptorvermittelte Endozytose)
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	region of interest
RRP	ready releasable pool
R _s	serieller Widerstand
RT	Raumtemperatur
s.c.	subkutan
SDS	sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SID	self interacting domain
SNAP	synaptosome-associated protein
SNARE	soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor
TGN	trans-Golgi Netzwerk
TMD	Transmembrandomäne
TWIK1	tandem of P domains in a weak inwardly rectifying K ⁺ channel
U	enzymatische Einheit (Unit)
UE	Untereinheit
ÜN	über Nacht
upm	Umdrehungen pro Minute
UTR	untranslated region
V.	Vena
VC	voltage-clamp-Modus
V _c	Klemmspannung
VDCC	voltage-dependent Ca ²⁺ -channels
V _M	Membranpotential

10. Anhang

10.1 Eigene Veröffentlichungen

10.1.1 Veröffentlichte Publikationen

Heitzmann D, Derand R, Jungbauer S, Bandulik S, Sterner C, Schweda F, Elwakil AE, Lalli E, Guy N, Mengual R, **Reichold M**, Tegtmeier I, Bendahhou S, Gomez-Sanchez CE, Isabel AM, Wisden W, Weber A, Lesage F, Warth R, and Barhanin J

Invalidation of TASK1 potassium channels disrupts adrenal gland zonation and mineralocorticoid homeostasis

EMBO J., 27(1):179-87 (2008)

Feliciangeli S, Bendahhou S, Sandoz G, Gounon P, **Reichold M**, Warth R, Lazdunski M, Barhanin J, and Lesage F

Does sumoylation control K2P1/TWIK1 background K⁺ channels?

Cell, 130, 563-569 (2007)

Heitzmann D, Koren V, Wagner M, Sterner C, **Reichold M**, Tegtmeier I, Volk T, and Warth R

KCNE beta subunits determine pH sensitivity of KCNQ1 potassium channels

Cell Physiol Biochem, 19, 21-32 (2007)

10.1.2 Publikationen in Vorbereitung

Reichold M, Arrighi I, Bandulik S, Heitzmann D, Kaspar H, Tegtmeier I, Mengual R, Barhanin J, and Warth R

Gender-dependent expression and physiological role of TWIK1 potassium channels in distal proximal tubule of mouse kidney

Reichold M, Derand R, Warth R, and Barhanin J

Inactivation of TWIK1 potassium channel function facilitates insulin secretion

10.1.3 Kongressbeiträge

Reichold M, Derand R, Heitzmann D, Tegtmeier I, Barhanin J, and Warth R

TWIK1 potassium channels in pancreatic beta-cells

Kongress der Deutschen Physiologischen Gesellschaft 2007 in Hannover – Vortrag

Reichold M, Heitzmann D, Sterner C, Tegtmeier I, Mengual R, Barhanin J, and Warth R
Gender-dependent expression of TWIK1 potassium channels in mouse kidney
Kongress der Deutschen Physiologischen Gesellschaft 2006 in München – Poster

Reichold M, Decressac S, Koren V, Franco M, Bendahhou S, Barhanin J, Lazdunski M,
Heitzmann D, Lesage F, and Warth R
Regulation of membrane targeting of TWIK1 potassium channels
Kongress der Deutschen Physiologischen Gesellschaft 2005 in Göttingen – Poster

Reichold M, Heitzmann D, Sterner C, Tegtmeier I, Mengual R, Barhanin J, and Warth R
Gender-dependent expression of TWIK1 potassium channels in mouse kidney
Kongress der Gesellschaft für Nephrologie 2006 in Essen – Poster

10.1.4 Sonstige Veröffentlichungen

Goppel M, Brem T, Hermann R, **Reichold M**, und Franz G
Arzneibuchnachweise optimieren
Pharmazeutische Zeitung, Ausgabe 30, 2004

10.2 Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name: Reichold
Vorname: Markus
Geburtsdatum: 23.07.1977
Geburtsort: Marktredwitz
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Wohnsitz: Greflingerstraße 13
93055 Regensburg
Familienstand: Ledig
Konfession: röm.-katholisch

SCHULBILDUNG

1984-1988: Grundschule Waldershof
1988-1995: Otto-Hahn-Gymnasium Marktredwitz
1995-1997: Luisenburg-Gymnasium Wunsiedel
27.06.1997: Ende der Schulausbildung, allg. Abitur

ZIVILDIENTST

1997-1998: Zivildienst im Katharinenspital in Regensburg als Altenpfleger

STUDIUM

1998-2003: Studium der Pharmazie an der Universität Regensburg
25.08.2000: Bestehen des Ersten Abschnitts der pharmazeutischen Prüfung
31.03.2003: Bestehen des Zweiten Abschnitts der pharmazeutischen Prüfung

PHARMAZIEPRAKTIKUM

- 01.05.03 - 31.10.03:** Pharmaziepraktikant in der Arcaden Apotheke in Regensburg
- 01.11.03 – 30.04.04:** Pharmaziepraktikant am Lehrstuhl Pharmazeutische Biologie bei Prof. Dr. Franz an der Universität Regensburg
- 01.07.2004:** Bestehen des Dritten Abschnitts der pharmazeutischen Prüfung

PROMOTION

- 01.08.2004:** Beginn des Promotionsstudiums am Institut für Physiologie bei Professor Dr. Warth an der Universität Regensburg, NWF III/VKL

10.3 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

Die im Methodenteil und in der Danksagung aufgeführten Personen haben mir in der jeweils beschriebenen Weise unentgeltlich geholfen.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe eines Promotionsberaters oder anderer Personen in Anspruch genommen. Niemand hat von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Diese Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

.....

Markus Reichold

Regensburg, 18.03.2008

11. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen herzlich bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Insbesondere danke ich Herrn Prof. Dr. Warth für die Überlassung des Themas, die umfassende wissenschaftliche Betreuung sowie die Bereitstellung der Mittel zur Durchführung der Arbeit. Seine Kreativität und sein unerschütterlicher Optimismus waren stets ein Ansporn. Herzlich bedanken möchte ich mich auch für die vielen fruchtbaren (nicht nur wissenschaftlichen) Gespräche und Diskussionen, die immer auf ein offenes Ohr getroffen sind.

Weiterhin möchte ich mich bei Dr. Jaques Barhanin vom IPMC, CNRS, Valbonne Sophia Antipolis und Université de Nice Sophia Antipolis in Frankreich herzlich bedanken. Zum einen für die Durchführung der *in vivo* und *in vitro* Experimente an isolierten Langerhans Inseln, zum anderen für den stets regen wissenschaftlichen Austausch.

Ein Dankeschön auch an Herrn Prof. Dr. Oefner, Frau Dr. Dettmer und Frau Kaspar vom Institut für Funktionelle Genomik in Regensburg für die unentgeltliche Vermessung von Aminosäuren in Mausurin.

Außerdem will ich mich noch bei Herrn Prof. Dr. Göpferich vom Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie in Regensburg für die Bereitstellung des konfokalen Mikroskops bedanken. Ferner noch bei Frau Dr. Breunig für ihren gelungenen Mikroskopierkurs.

Ein besonderes Dankeschön auch an meine Laborkollegen Diego, Sascha, Christina, Ines und Viktoria, welche mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen. Herzlichen Dank auch für die harmonische und unkomplizierte Laboratmosphäre, zu der jeder seinen Beitrag geleistet hat.

Zudem möchte ich allen anderen nicht genannten Personen danken, die in der einen oder anderen Form zur Vollendung dieser Arbeit beigetragen haben.

Zuletzt will ich mich noch herzlich bei meiner Mutter bedanken, ohne die diese Arbeit niemals zustande gekommen wäre. Ihr ist es zu verdanken, dass ich bereits im Kindesalter ein wissenschaftliches Interesse entwickelt habe, welches Sie beharrlich gefördert hat. Sie hat es mir entgegen widriger Umstände ermöglicht, das Gymnasium zu besuchen und hat so den Grundstein für meine weitere Ausbildung gelegt. Ihre weisen Worte und Taten haben mich stets auf meinen Wegen begleitet und waren mit Geld nicht aufzuwiegen.