

**Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie Tübingen  
Abteilung Molekularpharmakologie  
Abteilungsleiter: Professor Dr. U. Quast**

**Charakterisierung des Bindungsverhaltens verschiedener  
Modulatoren der ATP-abhängigen  $K^+$ -Kanäle ( $K_{ATP}$ ) an den  
nativen vaskulären  $K_{ATP}$ -Kanal und seine rekombinant  
exprimierte Untereinheit SUR2B**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Jutta Zibold  
aus  
Ludwigsburg  
2002**

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. U. Quast

2. Berichterstatter: Professor Dr. H.-U. Häring

Wo absolute Überlegenheit nicht erreichbar ist, muss man eine relative Überlegenheit am entscheidenden Punkt schaffen, indem man geschickt das ausnutzt, was man hat.

Karl von Clausewitz



Gewidmet meinen Eltern  
In Liebe und Dankbarkeit  
Für ihre Unterstützung



Die Ergebnisse dieser Arbeit führten bisher zu folgenden Veröffentlichungen:

YAGUPOLSKII, L. M., ANTEPOHL, W., ARTUNC, F., HANDROCK, R., KLEBANOV, B. M.,  
MALETINA, I. I., MARXEN, B., PETKO, K. I., QUAST, U., VOGT, A., WEISS, C.,  
ZIBOLD, J. UND HERZIG, S. (1999): Vasorelaxation by new hybrid compounds  
containing dihydropyridine and pinacidil-like moieties. *J Med Chem* **42**, 5266-71

Diese Arbeit wurde gefördert durch ein Stipendium des BMBF (Fö. 01 KS 9602) und  
des Interdisziplinären Zentrums für Klinische Forschung (IZKF) der Universität  
Tübingen zur Förderung medizinischer Doktoranden.





# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Ionenkanäle.....	1
1.2	Kaliumkanäle.....	2
1.3	ATP-abhängige Kaliumkanäle.....	5
1.4	Funktionelle Relevanz von $K_{ATP}$ -Kanälen am Beispiel einiger Gewebe .....	8
1.5	Struktur und Regulation von $K_{ATP}$ -Kanälen.....	9
1.5.1	Die Untereinheiten der $K_{ATP}$ -Kanäle .....	11
1.5.2	Physiologische Eigenschaften von $K_{ATP}$ -Kanälen .....	18
1.6	Pharmakologische Modulation von $K_{ATP}$ -Kanälen .....	26
1.6.1	Kaliumkanalöffner.....	26
1.6.2	Kaliumkanalblocker.....	29
1.7	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit.....	33
1.8	Strukturformeln .....	36
1.8.1	$K_{ATP}$ -Kanalöffner.....	36
1.8.2	$K_{ATP}$ -Kanalschliesser .....	36
1.8.3	Testsubstanzen.....	37
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>41</b>
2.1	Chemikalien.....	41
2.2	Puffer und Medien.....	44
2.3	Proteinbestimmung.....	50
2.4	Kultivierung von A10-Zellen.....	52
2.4.1	Einfrieren von A10-Zellen.....	52
2.4.2	Auftauen von A10-Zellen.....	53
2.4.3	Herstellung einer mikrosomalen Membranfraktion aus A10-Zellen .....	53
2.4.4	Präparation von ganzen A10-Zellen .....	54
2.5	Kultivierung von HEK293-Zellen .....	55
2.5.1	Transfektion.....	55
2.5.2	Einfrieren von HEK293-Zellen .....	56
2.5.3	Auftauen von HEK293-Zellen.....	57
2.5.4	Herstellung einer mikrosomalen Membranfraktion aus HEK293-Zellen.....	58
2.5.5	Präparation von ganzen HEK293-Zellen .....	58
2.6	Radioligandenbindungsexperimente.....	59
2.6.1	Filtrationsbindungsexperimente .....	60
2.6.2	Radioligandenstudien .....	61
2.7	Modell der Rezeptorbindungsstudien .....	62
2.7.1	Sättigungsexperiment .....	63
2.7.2	Kompetitionsexperiment .....	63
2.7.3	Aktivierungsexperiment .....	65
2.7.4	Verallgemeinerung der Bindungsisotherme nach Hill.....	66
2.7.5	Kinetik .....	67

2.8	Datenauswertung .....	68
2.8.1	Kompetitionsexperimente mit $^3\text{H}$ -P1075 .....	68
2.8.2	Kompetitionsexperimente mit $^3\text{H}$ -GBC .....	69
2.8.3	Kinetik der $^3\text{H}$ -P1075-Bindung .....	69
2.8.4	Aktivierungsexperimente mit $^3\text{H}$ -P1075 .....	70
2.9	Statistik .....	70

### **3 Ergebnisse ..... 73**

3.1	Membranherstellung .....	73
3.2	$^3\text{H}$ -P1075-Bindungsexperimente an A10-Zellmembranen .....	74
3.2.1	ATP-Abhängigkeit der $^3\text{H}$ -P1075-Bindung an A10-Zellmembranen .....	74
3.2.2	Temperaturabhängigkeit der $^3\text{H}$ -P1075-Bindung an A10-Zellmembranen .....	75
3.2.3	$\text{Mg}^{2+}$ -Abhängigkeit der $^3\text{H}$ -P1075-Bindung an A10-Zellmembranen .....	76
3.2.4	Kinetik der $^3\text{H}$ -P1075-Bindung an A10-Zellmembranen .....	77
3.2.5	Kompetition der $^3\text{H}$ -P1075-Bindung an A10-Zellmembranen .....	80
3.3	$^3\text{H}$ -GBC-Bindungsexperimente an A10-Zellmembranen .....	85
3.3.1	Kompetition der $^3\text{H}$ -GBC-Bindung durch GBC .....	85
3.3.2	Kompetition der $^3\text{H}$ -GBC-Bindung durch P1075 .....	88
3.4	$^3\text{H}$ -P1075-Bindungsexperimente an ganzen A10-Zellen .....	88
3.5	$^3\text{H}$ -P1075-Bindungsexperimente an SUR2B-transfizierten HEK293-Zellmembranen: Untersuchung von $\text{P}_2$ -Rezeptorantagonisten .....	90
3.5.1	Kompetition der $^3\text{H}$ -P1075-Bindung an HEK293-Zellmembranen (SUR2B) .....	90
3.5.2	Aktivierung der $^3\text{H}$ -P1075-Bindung an HEK293-Zellmembranen (SUR2B) .....	97
3.5.3	Aktivierung der $^3\text{H}$ -P1075-Bindung an SUR2B durch DIDS .....	106
3.5.4	Kinetik der $^3\text{H}$ -P1075-Bindung an HEK293-Zellmembranen (SUR2B) .....	108
3.6	$^3\text{H}$ -P1075-Bindungsexperimente an ganzen HEK293-Zellen (SUR2B) .....	118

### **4 Diskussion..... 119**

4.1	Diskussion der $^3\text{H}$ -P1075-Bindungsexperimente an A10-Zellmembranen .....	119
4.1.1	Allgemeine Eigenschaften der $^3\text{H}$ -P1075-Bindung .....	119
4.1.2	Kompetition der $^3\text{H}$ -P1075-Bindung an A10-Zellmembranen .....	120
4.2	Diskussion der $^3\text{H}$ -GBC-Bindungsexperimente an A10-Zellmembranen .....	135
4.2.1	Allgemeine Eigenschaften der $^3\text{H}$ -GBC-Bindung .....	135
4.2.2	Kompetition der $^3\text{H}$ -GBC-Bindung .....	139
4.3	Diskussion der Bindungsexperimente an ganzen A10-Zellen .....	142
4.4	Diskussion der $^3\text{H}$ -P1075-Bindungsexperimente an SUR2B-transfizierten HEK293-Zellmembranen .....	143
4.4.1	Allgemeine Eigenschaften der $^3\text{H}$ -P1075-Bindung an HEK293-Zellmembranen .....	143
4.4.2	Kompetition der $^3\text{H}$ -P1075-Bindung an HEK293-Zellmembranen .....	143
4.4.3	Aktivierung der $^3\text{H}$ -P1075-Bindung an HEK293-Zellmembranen .....	148
4.4.4	Kinetik der $^3\text{H}$ -P1075-Bindung an HEK293-Zellmembranen .....	153
4.5	Diskussion der $^3\text{H}$ -P1075-Bindungsexperimente an ganzen HEK293-Zellen .....	155

<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>157</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>161</b>
<b>7</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>173</b>
7.1	Anhang A: Charakterisierung des Bindungsverhaltens neuartiger Hybridsubstanzen mittels <sup>3</sup> H-P1075-Bindungsstudien an Rattenherzmembranen .....	173
7.1.1	Einleitung .....	173
7.1.2	Material und Methoden .....	176
7.1.3	Ergebnisse .....	179
7.1.4	Diskussion .....	181
7.1.5	Verwendete Literatur .....	182
7.2	Anhang B: Bindung von <sup>3</sup> H-QNB und Atropin an Rattenherzmembranen .....	183
7.2.1	Einleitung .....	183
7.2.2	Methoden .....	185
7.2.3	Ergebnisse .....	186
7.2.4	Diskussion .....	190
7.2.5	Verwendete Literatur .....	190

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1: Optimale Bedingungen zur Durchführung von.....	76
$^3\text{H}$ -P1075-Bindungsexperimenten im Gleichgewicht	
Tabelle 3.2: Hemmung der $^3\text{H}$ -P1075-Bindung an A10-Zellmembranen.....	83
durch $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanalmodulatoren	
Tabelle 3.3: Hemmung der $^3\text{H}$ -GBC-Bindung an A10-Zellmembranen durch GBC.....	86
Tabelle 3.4: Screening-Experimente zur Hemmung der.....	91
$^3\text{H}$ -P1075-Bindung an SUR2B durch $\text{P}_2$ -Rezeptormodulatoren	
Tabelle 3.5: Hemmung der $^3\text{H}$ -P1075-Bindung an SUR2B.....	95
durch $\text{P}_2$ -Rezeptormodulatoren	
Tabelle 3.6: Aktivierung der $^3\text{H}$ -P1075-Bindung an SUR2B durch ATP.....	106
in Gegenwart verschiedener $\text{P}_2$ -Rezeptormodulatoren	
Tabelle 3.7: Kinetik der $^3\text{H}$ -P1075-Bindung an HEK293-Zellmembranen (SUR2B) .....	113
Tabelle 3.8: Hemmung der $^3\text{H}$ -P1075-Bindung an ganzen.....	118
HEK293-Zellen (SUR2B) durch verschiedene $\text{P}_2$ -Rezeptormodulatoren	
Tabelle 4.1: Hemmung der $^3\text{H}$ -P1075-Bindung in verschiedenen Geweben .....	124
durch $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanalmodulatoren	
Tabelle 4.2: Vergleich der $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanalmodulatoren in verschiedenen Geweben .....	125
Tabelle 4.3: Hemmung der $^3\text{H}$ -GBC-Bindung in verschiedenen Geweben durch GBC.....	141
Tabelle 7.1: Ergebnisse der Konkurrenzexperimente der einzelnen Substanzen mit $^3\text{H}$ -P1075 .....	179
als Radioligand	

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Molekulare Strukturen von Kaliumkanälen.....	4
Schematische Darstellung der $\alpha$ -Untereinheiten	
Abbildung 1.2: Aufbau des ATP-abhängigen $K^+$ -Kanals ( $K_{ATP}$ ).....	7
Abbildung 1.3: Zusammensetzung der Hybridsubstanz GBC .....	29
Abbildung 1.4: Modell der Bindungsstellen an SUR1 und SUR2A .....	31
(nach Ashfield et al., 1999)	
Abbildung 2.1: Eichkurve für die Proteinbestimmung nach Lowry .....	51
Abbildung 2.2: Lichtmikroskopische Darstellung von A10-Zellen.....	54
Abbildung 2.3: Lichtmikroskopische Darstellung von HEK293-Zellen.....	57
Abbildung 3.1: Assoziation und Dissoziation der $^3H$ -P1075-Bindung .....	79
an A10-Zellmembranen bei 37 °C	
Abbildung 3.2: Hemmung der $^3H$ -P1075-Bindung an A10-Zellmembranen.....	84
durch $K_{ATP}$ -Kanalmodulatoren	
Abbildung 3.3: Hemmung der $^3H$ -GBC-Bindung an A10-Zellmembranen durch GBC .....	87
Abbildung 3.4: Hemmung der $^3H$ -P1075-Bindung an SUR2B.....	96
durch verschiedene $P_2$ -Rezeptormodulatoren	
Abbildung 3.5: Abhängigkeit der spezifischen $^3H$ -P1075-Bindung an SUR2B .....	98
von der ATP-Konzentration $\pm$ Phloxin B (500 nM)	
Abbildung 3.6: Abhängigkeit der spezifischen $^3H$ -P1075-Bindung an SUR2B .....	101
von der ATP-Konzentration in Gegenwart von Suramin (5 $\mu$ M)	
Abbildung 3.7: Abhängigkeit der spezifischen $^3H$ -P1075-Bindung an SUR2B .....	103
von der ATP-Konzentration in Gegenwart von Evans Blue (5 $\mu$ M)	
Abbildung 3.8: Abhängigkeit der spezifischen $^3H$ -P1075-Bindung an SUR2B .....	105
von der ATP-Konzentration in Gegenwart von DIDS (5 $\mu$ M)	
Abbildung 3.9: Aktivierung der $^3H$ -P1075-Bindung an .....	107
HEK293-Zellmembranen (SUR2B) durch DIDS	
Abbildung 3.10: Kinetik der $^3H$ -P1075-Bindung an HEK293-Zellmembranen (SUR2B) .....	114
Abbildung 3.11: Auftragung der $k_{off}$ -Werte gegen die eingesetzte Konzentration .....	115
der jeweiligen Substanz	
Abbildung 3.12: Auftragung der $k_{off}$ -Werte gegen den Quotienten aus der.....	116
eingesetzten Substanzkonzentration und der Gleichgewichts- dissoziationskonstanten $K_i$	
Abbildung 4.1: Vergleich der $pIC_{50}$ -Werte in A10-Zellmembranen mit jenen aus .....	126
SUR2B-transfizierten HEK293-Zellmembranen	
Abbildung 4.2: Korrelation unter Weglassung der Werte für GBC.....	127

Abbildung 4.3: Hemmung der $^3\text{H}$ -GBC-Bindung an A10-Zellmembranen durch GBC .....	137
mit festgesetzter Amplitude der ersten Bindungsstelle auf 20 % der spezifischen Bindung	
Abbildung 7.1: Strukturformeln der eingesetzten Substanzen.....	174
Abbildung 7.2: Konkurrenz der $^3\text{H}$ -P1075-Bindung durch PF5, Pinacidil, UK3 und UK4.....	180
Abbildung 7.3: Strukturformeln der eingesetzten m-Cholinoantagonisten.....	184
Abbildung 7.4: Sättigung der $^3\text{H}$ -QNB-Bindung an Rattenherzmembranen .....	187
Abbildung 7.5: Typisches Einzelexperiment einer heterologen .....	189
Verdrängung der $^3\text{H}$ -QNB-Bindung durch Atropin	

## Abkürzungen

a.demin.	demineralisiertes Wasser
a.b.	aqua bidestillata
ABC-Protein	<u>A</u> TP- <u>b</u> inding- <u>c</u> assette-Protein
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
AP	Aktionspotential
AP <sub>2</sub> A	P <sup>1</sup> ,P <sup>2</sup> -Di(Adenosin-5′)-Diphosphat
AP <sub>3</sub> A	P <sup>1</sup> ,P <sup>3</sup> -Di(Adenosin-5′)-Triphosphat
AP <sub>4</sub> A	P <sup>1</sup> ,P <sup>4</sup> -Di(Adenosin-5′)-Tetraphosphat
AP <sub>5</sub> A	P <sup>1</sup> ,P <sup>5</sup> -Di(Adenosin-5′)-Pentaphosphat
AS	Aminosäure
ATCC	<u>A</u> merican <u>T</u> ype <u>C</u> ulture <u>C</u> ollection
ATP	Adenosintriphosphat
AZ-DF 265	4-[[N- $\alpha$ -phenyl-2-piperidino-benzyl)carbamoyl]methyl]benzoesäure
BIR	$\beta$ -cell inward rectifier
BSA	Rinderserumalbumin ( <u>B</u> ovine <u>S</u> erum <u>A</u> lbumine)
B <sub>TOT</sub>	totale Bindung
B <sub>NS</sub>	unspezifische Bindung
B <sub>S</sub>	spezifische Bindung
°C	Grad Celsius
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CFTR	<u>c</u> ystic <u>f</u> ibrosis <u>t</u> ransconductance <u>r</u> egulator
CK	<u>C</u> reatinphospho <u>k</u> inase
Cl	Chlorid
CP	<u>C</u> reatinphosphat
cpm	Zerfälle pro Minute ( <u>c</u> ounts <u>p</u> er <u>m</u> inute)
DAG	Diacylglycerin
DIDS	4-4′-Diisothiocyano-stilben-2,2′-disulfonsäure
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dpm	Zerfälle pro Minute ( <u>d</u> ecays <u>p</u> er <u>m</u> inute)
EC <sub>50</sub>	halbmaximale Aktivierungskonzentration
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykol-bis( $\beta$ -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat
FCS	fötales Kälberserum
fmol	femtomol (10 <sup>-15</sup> )
GBC	Glibenclamid
GIP	g <u>a</u> stric <u>i</u> nhibitory peptide; Synonym: Enterogastron
G <sub>i</sub> -Protein	<u>i</u> nhibitorisches G-Protein
Glc	Glucose
Gln	Glutamin

G <sub>s</sub> -Protein	stimulatorisches G-Protein
<sup>3</sup> H	Tritium (Isotop des Wasserstoffes)
HEK293-Zellen	Menschliche embryonale Nierenzelllinie ( <u>H</u> uman <u>E</u> mbryonal <u>K</u> idney)
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
IC <sub>50</sub>	halbmaximale Hemmkonzentration
I <sub>Ks</sub> -Kanal	langsam ( <u>s</u> lowly) aktivierender <u>K</u> <sup>+</sup> -Kanal
IP <sub>3</sub>	Inositoltriphosphat
I <sub>sK</sub> -Protein	I <sub>slowK</sub> alium; Synonym: minK-Protein, <u>min</u> imales <u>K</u> aliumkanalprotein
K <sup>+</sup>	Kalium
K <sub>ATP</sub> -Kanal	ATP-empfindlicher Kaliumkanal
kb	Kilobase
KCO	<u>K</u> <sup>+</sup> <u>c</u> hannel <u>o</u> pener, Kaliumkanalöffner
kDa	Kilodalton
K <sub>IR</sub> -Kanal	einwärtsgerichteter K <sup>+</sup> -Kanal ( <u>i</u> nward <u>r</u> ectifying)
K <sub>NDP</sub> -Kanal	nukleotiddiphosphatgesteuerter K <sup>+</sup> -Kanal
K <sub>v</sub> -Kanal	spannungsabhängiger, auswärts gerichteter K <sup>+</sup> -Kanal ( <u>v</u> oltage dependent)
l	Liter
LCRK	Levcromakalim (BRL 38227)
M	Molar (mol/l)
MDR-Protein	<u>m</u> ulti <u>d</u> rug <u>r</u> esistance -Protein
MEM	Minimal Essential Medium
Mg <sup>2+</sup>	Magnesium
mg	Milligramm
MgADP	ADP in magnesiumgebundener Form
MgATP	ATP in magnesiumgebundener Form
MgNDP	Nukleotiddiphosphat in magnesiumgebundener Form
Min.	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
Mn <sup>2+</sup>	Mangan
MOPS	
mV	Millivolt
MWG	Massenwirkungsgesetz
MxS	Minoxidilsulfat
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
Na <sup>+</sup>	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NBF	<u>n</u> ucleotid <u>b</u> inding <u>f</u> old, Nukleotidbindungsstelle
NDP	<u>N</u> ukleotid <u>d</u> iphosphat
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
OD <sub>770</sub>	Optische Dichte (Extinktion) bei einer Wellenlänge von 770 nm



P1075	N-Cyano-N'-(1,1-dimethylpropyl)-N''-3-pyridylguanidin
P <sub>2</sub> -Rezeptor	Purin-/Pyrimidinrezeptor
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (Phosphate Buffered Saline)
PF5	p-Difluoromethoxy-Pinacidil
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidyl-inositol-4,5-bisphosphat
PKA	<u>P</u> rotei <u>k</u> inase <u>A</u>
PKC	<u>P</u> rotei <u>k</u> inase <u>C</u>
PKG	<u>P</u> rotei <u>k</u> inase <u>G</u>
PLC	<u>P</u> hospholipase <u>C</u>
PPADS	Pyridoxalphosphat-6-azophenyl-2',4'-disulfonsäure
pM	Pikomolar
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
QNB	
RMP	Ruhemembranpotential
ROMK2	renal outer medulla <u>K</u> <sup>+</sup> channel; Synonym; K <sub>IR</sub> 1.1b
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RR2	Reactive Red 2
RT	Raumtemperatur (22°C)
s	Sekunde
SA	Spezifische Aktivität
SEM	<u>s</u> tandard <u>e</u> rror of the <u>m</u> ean; Standardabweichung
Std.	Stunde
STI	Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor
SU	Sulfonylharnstoff; <u>s</u> ulphonyl <u>u</u> rea
SUR	Sulfonylharnstoffrezeptor ( <u>s</u> ulphonyl <u>u</u> rea <u>r</u> eceptor)
TMD	<u>T</u> rans <u>m</u> embran <u>d</u> omäne
TMS	<u>T</u> rans <u>m</u> embran <u>s</u> egment
TNP-ATP	Trinitrophenyl-ATP
TOK-Kanal	<u>T</u> wo-P-region-containing outwardly rectifying <u>K</u> <sup>+</sup> channel
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TWIK-1-Kanal	<u>T</u> andem of P domains in a <u>w</u> eak <u>i</u> nward rectifying <u>K</u> <sup>+</sup> channel
UK1,3,4	Ukraine 1, 3, 4
W <sub>A</sub>	Walker A-Motiv
W <sub>B</sub>	Walker B-Motiv
x g	mal Gravitationsbeschleunigung (9,81 m/sec. <sup>2</sup> )



---

# 1 Einleitung

## 1.1 Ionenkanäle

Ionenkanäle sind hydrophobe Poren in der Lipiddoppelschicht der Zellmembran. Sie transportieren anorganische Ionen wie  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  oder  $\text{Cl}^-$  passiv mittels schneller Diffusion entlang des elektro-chemischen Gradienten zwischen Zytoplasma und Extrazellulärraum. Die meisten Ionenkanäle besitzen eine Ionenselektivität, die nur bestimmten Ionen den Durchtritt erlaubt, so z.B. den  $\text{K}^+$ -Ionen im Falle der Kalium-Kanäle. Es wird angenommen, dass die Poren stellenweise eng genug sind, um einen direkten Kontakt zwischen passierendem Ion und dem Kanalprotein zu bewirken, so dass nur Ionen passender Grösse und Ladung durchgelassen werden. Die Hydrathülle der Ionen geht dabei vermutlich verloren (Hille, 1992; Doyle et al., 1998). Diese Selektivität sowie die Tatsache, dass Ionenkanäle sich nicht ständig in geöffnetem Zustand befinden, unterscheidet sie von einfachen, wassergefüllten Poren in der Zellmembran. Die Öffnung von Ionenkanälen wird über verschiedene Reize geregelt. Diese sind bei spannungsabhängigen Ionenkanälen Änderungen des Membranpotentials, bei mechanisch kontrollierten Ionenkanälen die mechanische Belastung und bei ligandengekoppelten Ionenkanälen die Bindung eines Signalmoleküls. Zusätzlich kann die Aktivität von Ionenkanälen durch Protein-(De)-Phosphorylierung geregelt sein (Süssbrich und Busch, 1998).

Da die Plasmamembranen der meisten Zellen im Ruhezustand eine höhere Permeabilität für  $\text{K}^+$  als für  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  oder  $\text{Cl}^-$  besitzen, spielen Kalium-Kanäle eine Schlüsselrolle für bestimmte zelluläre Parameter wie das Ruhemembranpotential, die Erregbarkeit der Zelle oder das Zellvolumen (Hille, 1992).

## 1. Einleitung

---

### 1.2 Kaliumkanäle

Kaliumkanäle kommen ubiquitär in Zellen von erregbaren wie unerregbaren Geweben vor. Das Ruhemembranpotential (RMP) der Zellen wird hauptsächlich durch  $K^+$  bestimmt, dessen Nernst'sches Gleichgewichtspotential  $E_K^+$  bei  $\approx -90$  mV liegt. Durch geringe  $Na^+$ -Einwärtsströme entfernt sich das RMP vom  $E_K^+$  und bewegt sich gewebeabhängig zwischen -80 und -60 mV (Hille, 1992).

Durch Schliessung von  $K^+$ -Kanälen bleibt  $K^+$  vermehrt in der Zelle, das RMP wird depolarisiert (-60 bis -40 mV) und ermöglicht in erregbaren Geweben (Neuronen, Herzmuskelzellen) die Aktivierung spannungsabhängiger  $Na^{2+}$ - oder  $Ca^{2+}$ -Kanäle, die ein Aktionspotential (AP) auslösen. In Muskeln ist der  $Ca^{2+}$ -Einstrom mit einer Kontraktion assoziiert.

Eine Öffnung des Kalium-Kanals bewirkt durch  $K^+$ -Ausstrom eine Hyperpolarisation des Membranpotentials in Richtung des Kalium-Gleichgewichtspotentials von ca. -90 mV, wodurch die Auslösung von Aktionspotentialen erschwert wird, da die Zelle sich von der Aktivierungsschwelle der spannungsabhängigen Ionenkanäle wegbewegt, weniger erregbar wird und Energie einsparen kann.

Kaliumkanäle bestehen aus  $\alpha$ -Untereinheiten, welche die Pore des Kanals formen und zumeist in Form eines Tetramers angeordnet sind (Hille, 1992). Diese Grundeinheit des Kalium-Kanals wird häufig ergänzt durch sog.  $\beta$ -Untereinheiten, welche für die Regulation der Kanalaktivität eine wichtige Rolle spielen.

Aufgrund ihres Öffnungsmechanismus und ihrer molekularen Struktur werden Kaliumkanäle in 3 verschiedene Klassen eingeteilt,  $K_V$ -,  $K_{IR}$ - und Tandem-Kanäle. Unter den Kaliumkanälen bilden die spannungsabhängigen  $K^+$ -Kanäle die grösste Gruppe.

Zunächst einmal sind die übergeordneten Klassen der spannungsabhängigen auswärts gleichrichtenden ( $K_V$ -Kanäle, voltage dependent) und der einwärts gleichrichtenden  $K^+$ -Kanäle ( $K_{IR}$ -Kanäle, inward rectifying) zu unterscheiden. Über die Zugehörigkeit zu einer der beiden Klassen entscheidet die Anzahl der  $\alpha$ -helikalen Transmembran-

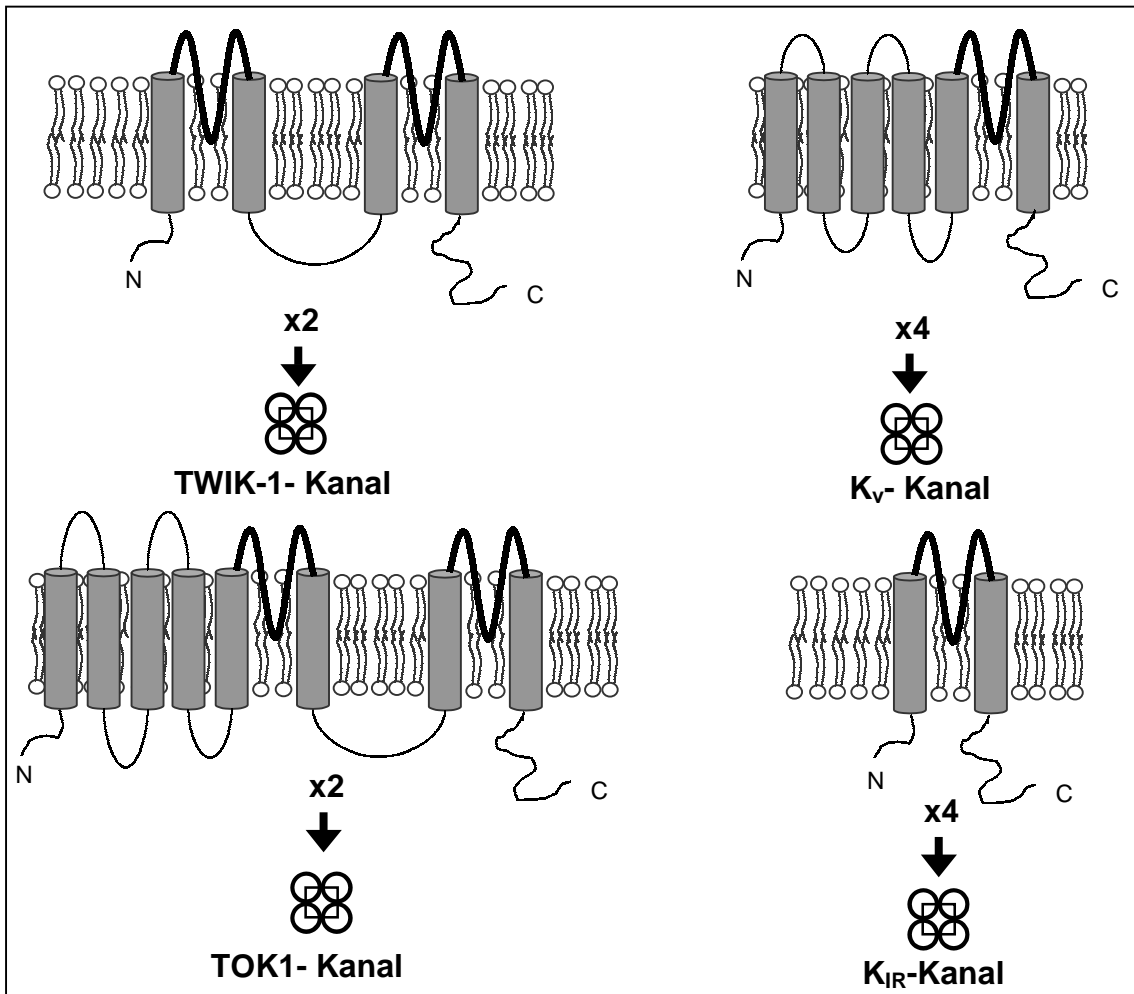
segmente der  $\alpha$ -Untereinheit. Die  $\alpha$ -Untereinheiten der  $K_{IR}$ -Kanäle enthalten zwei Transmembransegmente (M 1 und M 2, s.u.), die der  $K_V$ -Kanäle dagegen sechs.

Neben diesen beiden zuerst entdeckten Klassen von  $K^+$ -Kanälen wurde inzwischen eine weitere Klasse gefunden, die Tandem-(2 P-) Kanäle, TOK1- bzw. TWIK-1-Kanäle. Die Besonderheit des TOK1- bzw. TWIK-1-Kanals besteht darin, dass in einer Untereinheit zwei Porenregionen hintereinander angeordnet sind. Geht man davon aus, dass zur Bildung eines funktionellen Kanalproteins vier Porenregionen notwendig sind, so werden diese bei  $K_{IR}$ -Kanälen bzw.  $K_V$ -Kanälen aus 4 Untereinheiten, bei TOK1- bzw. TWIK-1-Kanälen dagegen nur aus zwei Untereinheiten gebildet. So erklärt sich auch die Namensgebung dieser neuentdeckten Kanäle entsprechend ihrer Struktur. TOK1 steht für Two P-region-containing outwardly rectifying K<sup>+</sup>-channel und TWIK-1 für Tandem of P domains in a weak inward rectifying K<sup>+</sup> channel (Abb. 1.1).

Zur Familie der  $K_V$ -Kanäle gehört beispielsweise der langsam aktivierende  $I_{K_s}$ -Kanal, dessen Quartärstruktur bis heute unbekannt ist. Es wurde gezeigt, dass dieser Kanal aus KvLQT1- ( $\alpha$ -Untereinheit) und  $I_{sK}$ -Protein (für  $I_{slow\ K}$ alium, wegen seiner geringen Grösse auch minK-Protein für minimales Kaliumkanalprotein genannt;  $\beta$ -Untereinheit) zusammengesetzt ist. Mutationen im Gen, das für das KvLQT1-Protein kodiert, gelten als eine der Ursachen für das vererbte QT-1-Syndrom (Wang et al., 1996).

Ein wichtiges Mitglied der Klasse der  $K_{IR}$ -Kanäle ist der ATP-gesteuerte  $K^+$ -Kanal ( $K_{ATP}$ -Kanal).

## 1. Einleitung



**Abb. 1.1: Molekulare Strukturen von Kaliumkanälen. Schematische Darstellung der  $\alpha$ -Untereinheiten.**

N und C bezeichnen die N- und C-Termini der Proteine.

Die grauen Zylinder stellen die in der Lipiddoppelschicht der Zellmembrane gelegenen Transmembranhelices dar, welche zur Ausbildung der Kanalpore(n) durch eine intramembranär gelegene Schleife verbunden werden.

K<sub>v</sub>- bzw. K<sub>IR</sub>-Kanäle: Es liegt jeweils eine Porenregion pro  $\alpha$ -Untereinheit vor, gebildet aus zwei Transmembranhelices, welche durch eine intramembranär gelegene Schleife verbunden sind, die zur Ausbildung der Kanalpore beiträgt; jeweils vier  $\alpha$ -Untereinheiten bilden das funktionelle Kanalprotein.

TOK- bzw. TWIK-Kanäle: Es sind jeweils zwei Porenregionen pro  $\alpha$ -Untereinheit hintereinander angeordnet, jeweils zwei  $\alpha$ -Untereinheiten bilden das funktionelle Kanalprotein.

Darstellung in Anlehnung an Süßbrich und Busch, 1998.

### 1.3 ATP-abhängige Kaliumkanäle

$K^+$ -Kanäle, welche durch das intrazelluläre Energiesubstrat ATP in ihrer Aktivität gehemmt werden können, werden als ATP-abhängige  $K^+$ -Kanäle ( $K_{ATP}$ -Kanäle) bezeichnet.

Sie gehören zur Gruppe der nicht spannungsabhängigen, einwärts gleichrichtenden  $K^+$ -Kanäle ( $K_{IR}$ -Kanäle, s.o.) und zeigen eine Asymmetrie in ihrer  $K^+$ -Leitfähigkeit: Bei negativeren Potentialen als dem Kalium-Gleichgewichtspotential von ca.  $-90$  mV kommt es zu Einwärtsströmen, während bei positiveren Potentialen die Auswärtsströme relativ gering sind. Bei  $K_{IR}$ -Kanälen nimmt also die  $K^+$ -Leitfähigkeit bei Hyperpolarisation zu und bei Depolarisation ab. Diese Eigenschaften machen die Kanäle wichtig für die Determinierung des Ruhemembranpotentials.

Ursache für die Einwärtsrektifizierung ist die spannungsabhängige Blockade der Kanalpore durch intrazelluläre Magnesiumionen (Vandenberg, 1987) und positiv geladene Polyamine wie Spermin und Spermidin (Ficker et al., 1994; Lopatin, 1994). Strukturell ist der Grad der Einwärtsrektifizierung abhängig von der Aminosäurengruppierung der M2-Region, der zweiten transmembranären Helix des Kanalproteins (Abb. 1.2). Mutation von Asparagin in Asparaginsäure in Position 160 kann aus  $K_{IR}6.2$  einen starken Einwärtsgleichrichter machen (Aguilar-Bryan et al., 1998).

Erstmals beschrieben wurden die  $K_{ATP}$ -Kanäle in Herzmuskelzellen (Noma, 1983; Trube und Hescheler, 1984). Sie finden sich nicht nur in erregbaren Geweben wie Herz-, Skelett- und glatten Muskelzellen, Nervenzellen,  $\beta$ -Zellen des Pankreas u. a. (Übersicht: Ashcroft und Ashcroft, 1990), sondern auch in nicht erregbaren Geweben wie z. B. Endothelzellen und Nierenepithel (Quast et al., 1996a). Weiterhin sind intrazelluläre  $K_{ATP}$ -Kanäle in der Membran von Mitochondrien beschrieben (Inoue et al., 1991; Paucek et al., 1992).

Die physiologische Regulation der  $K_{ATP}$ -Kanäle erfolgt über das Verhältnis von ATP zu MgNDP (z.B. dem ATP-Abbauprodukt ADP). Damit wird eine Verbindung zwischen dem metabolischen Zustand der Zelle und ihrer Erregbarkeit hergestellt. Bindung von

## 1. Einleitung

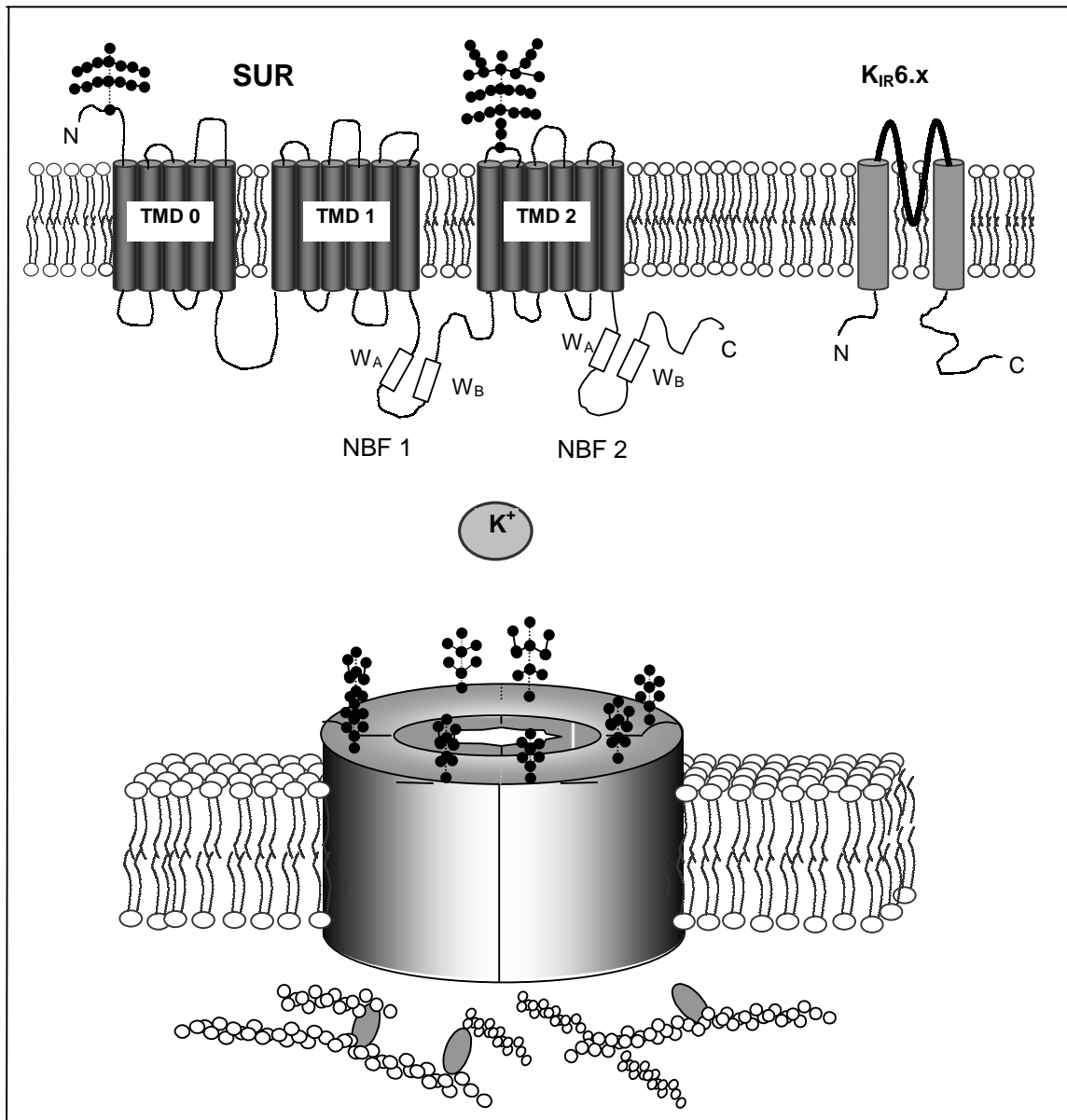
---

intrazellulärem ATP an den Kanal führt zur Schliessung des Kanals. Seine Öffnung hingegen erfolgt durch Bindung von Nukleotiddiphosphaten in  $Mg^{2+}$ -gebundener Form (MgNDP) und anschliessender Abdissoziation von ATP (Cook und Hales, 1984).

Die aus der Kanalöffnung resultierende Hyperpolarisation (s.o.) der Zelle verhindert in erregbaren Geweben die Öffnung spannungsabhängiger  $Ca^{2+}$ -Kanäle und damit den Einstrom von  $Ca^{2+}$ .

Nicht erregbare Gewebe besitzen keine spannungsabhängigen  $Ca^{2+}$ -Kanäle und ein  $Ca^{2+}$ -Einstrom erfolgt auch im hyperpolarisierten Zustand. Die Öffnung von  $K_{ATP}$ -Kanälen hat in diesen Geweben einen vermehrten  $Ca^{2+}$ -Eintritt zur Folge, da die elektro-chemische Triebkraft, die das  $Ca^{2+}$  in die Zelle treibt, durch die Hyperpolarisation verstärkt wird (Choquet und Korn, 1988).





**Abb. 1.2: Aufbau des ATP-abhängigen  $K^+$ -Kanals ( $K_{ATP}$ )**

*Oben:* Schematische Illustration der anzunehmenden Topologie von SUR und  $K_{IR6.x}$ . Dargestellt ist das von Tusnady et al. (1997) für SUR vorgeschlagene Modell mit 17 Transmembranhelices, die sich in 3 Domänen gruppieren (TMD 0-2). NBF 1 und 2 repräsentieren die zwei Nukleotidbindungsstellen mit Walker A und B-Motiven ( $W_A$  bzw.  $W_B$ ); N und C bezeichnen die N und C-Termini der Proteine. Für SUR1 sind zwei Glykosylierungsstellen bekannt, im Schema durch die beiden baumartigen Strukturen angedeutet.  $K_{IR6.x}$  besitzt zwei Transmembranhelices; beide verbindet eine intramembranär gelegene Schleife, die zur Ausbildung der Kanalpore beiträgt. *Unten:* Versuch der Darstellung eines vollständigen  $K_{ATP}$ -Kanals, der sich aus 4 SUR und 4  $K_{IR}$ -Untereinheiten zusammensetzt (Clement et al., 1997). Angedeutet ist die Kopplung an das Aktinzytoskelett. Die Zeichnung erhebt keinen Anspruch auf eine spezifische Konformation des Kanals; die dargestellten Größenverhältnisse sind relativ.

## 1. Einleitung

---

### 1.4 Funktionelle Relevanz von $K_{ATP}$ -Kanälen am Beispiel einiger Gewebe

Die physiologische Rolle der  $K_{ATP}$ -Kanäle ist gewebeabhängig.

In den  $\beta$ -Zellen des Pankreas steuern die  $K_{ATP}$ -Kanäle die Insulinausschüttung in Abhängigkeit vom Plasmaglucoosespiegel. Das Membranpotential der  $\beta$ -Zellen wird durch die Aktivität der Kaliumkanäle bestimmt. Ein Anstieg des Plasmaglucoosespiegels verschiebt das Verhältnis ATP/ADP zugunsten von ATP, schliesst hierdurch den Kanal, depolarisiert die Zelle und führt zum Einstrom von  $Ca^{2+}$ , welcher die Exozytose von Insulinvesikeln zur Folge hat (Übersichtsartikel Ashcroft und Ashcroft, 1990). Ein ähnlicher Mechanismus spielt in anderen neurosekretorischen Zellen eine Rolle (Bernardi et al., 1993; Mangel et al., 1994).

Genau umgekehrt verhält es sich in den juxtaglomerulären Zellen des Vas afferens der Niere. Hier wird durch Hyperpolarisation (infolge Kanalöffnung) die Reninsekretion gesteigert, denn diese verhält sich invers zum  $Ca^{2+}$ -Spiegel der Zelle (Hackenthal et al., 1990; Quast, 1996a; Osswald und Quast, 1995).

Weiterhin spielen die  $K_{ATP}$ -Kanäle der Niere eine wichtige Rolle für die Elektrolythomöostase, da sie im Tubulusepithel an die  $Na^+/K^+$ -ATPase gekoppelt sind und somit Einfluss auf die Ionenrückresorption haben (Quast, 1996). Der hier vertretene  $K_{ATP}$ -Kanal wird allerdings nicht aus den Untereinheiten  $K_{IR}$  und SUR zusammengesetzt, sondern aus ROMK2 und CFTR (s.u.).

In Herzmuskelzellen, in denen  $K_{ATP}$ -Kanäle unter physiologischen Bedingungen durch die hohe intrazelluläre ATP Konzentration geschlossen sind (Yokoshiki et al., 1998), sowie in Skelett- und glatten Muskelzellen werden  $K_{ATP}$ -Kanäle geöffnet, wenn das Gewebe metabolisch unter Stress gerät (z.B. durch Ischämie oder Hypoxie), das heisst, wenn MgADP ansteigt sowie der pH-Wert fällt. Die Öffnung des Kanals mit nachfolgendem Kaliumausstrom hält die Zelle im Ruhezustand, Aktionspotentiale werden verkürzt oder fallen ganz aus, die Zelle kann refraktär werden (Carmeliet et al., 1990; Babenko et al., 1992; Faivre et al., 1990; Übersichtsartikel Babenko et al., 1998). Hierdurch wird der  $Ca^{2+}$ -Einstrom vermindert, die Kontraktionskraft geschwächt, somit

der ATP-Verbrauch gesenkt und Energie gespart, was der Zelle hilft, zu überleben (Escande und Cavero, 1992). In der glatten Gefäßmuskulatur sind die  $K_{ATP}$ -Kanäle somit wichtige Determinanten des Gefäßtonus. Ihre Öffnung führt zur Vasorelaxation. In Neuronen haben die  $K_{ATP}$ -Kanäle ebenfalls eine zytoprotektive Wirkung, indem sie die Frequenz der Aktionspotentiale senken.

Aufgrund dieser grossen physiologischen Relevanz stellen  $K_{ATP}$ -Kanäle therapeutische Angriffsziele von Pharmaka dar, welche zur Therapie von Diabetes mellitus Typ II und Hypertonie eingesetzt werden. Dabei fördert die Inhibition des Kanals durch orale Antidiabetika wie die Sulfonylharnstoffe (SU, sulphonylurea) die Insulinsekretion aus pankreatischen  $\beta$ -Zellen. Die Öffnung von  $K_{ATP}$ -Kanälen der glatten Gefäßmuskeln bewirkt eine starke Vasorelaxation, was den Einsatz von sogenannten  $K^+$ -Kanalöffnern als Antihypertensiva erklärt. Die Tatsache, dass die sog. Kaliumkanalöffner (KCOs, K<sup>+</sup> channel opener) genau auf diejenigen  $K_{ATP}$ -Kanäle einwirken, welche auch unter ischämischen und hypoxischen Bedingungen öffnen (Übersicht in Quast, 1996b) erklärt den therapeutischen Nutzen, den diese Substanzen in Tierversuchen im Hinblick auf Kardioprotektion (Escande und Cavero, 1992) sowie auf Claudicatio intermittens (Cook et al., 1993; Forth et al., 1996) zeigten.

## 1.5 Struktur und Regulation von $K_{ATP}$ -Kanälen

$K_{ATP}$ -Kanäle sind Heteromultimere, die sich aus zwei verschiedenen Untereinheiten zusammensetzen, der einwärts gleichrichtenden, die Pore formenden  $\alpha$ -Untereinheit, genannt  $K_{IR6.x}$  (Inagaki et al., 1995a; Übersichtsartikel Babenko et al., 1998), sowie der  $\beta$ -Untereinheit SUR (sulphonylurea receptor). Dieses 140 kDa-Protein gehört zur Familie der ABC-Proteine (ATP-binding cassette (transporter) proteins) und spielt eine wichtige Rolle für die Regulation der Kanalaktivität (Tucker et al., 1997).

Zur Ausbildung eines funktionellen  $K_{ATP}$ -Kanals sind beide Untereinheiten erforderlich (Inagaki et al., 1995a; Sakura et al., 1995; Aguilar-Bryan et al., 1995; Clement et al., 1997).

## 1. Einleitung

---

Die beiden Untereinheiten des  $K_{ATP}$ -Kanals koppeln obligat in einer 4:4-Stöchiometrie und formen so einen oktameren Kanalkomplex,  $(SUR/K_{IR6.x})_4$ , (Abb. 1.2; Clement et al., 1997; Inagaki et al., 1997; Shyng und Nichols, 1997).

Die Assoziation der beiden Untereinheiten konnte in Experimenten mit  $K_{IR6.2}$ -spezifischen Antikörpern (Lorenz et al., 1998) und dem Photoradioliganden  $^{125}I$ -Azido-GBC (Clement et al., 1997) nachgewiesen werden.

Die Masse des  $(SUR/K_{IR6.2})_4$ -Multimers konnte mittels Sucrose-Dichtegradientenzentrifugation auf rund 950 kDa geschätzt werden. (Übersichtsartikel Aguilar-Bryan et al., 1998).

Bis heute sind drei Isoformen von SUR kloniert und identifiziert worden: SUR1, SUR2A und SUR2B (Aguilar-Bryan et al., 1995; Chutkow et al., 1996; Isomoto et al., 1996). Diese koppeln mit  $K_{IR6.1}$  und  $K_{IR6.2}$  zu unterschiedlichen Kanalkonstrukten und bilden die Grundlage der Gewebediversität der  $K_{ATP}$ -Kanäle. Durch Koexpression der verschiedenen klonierten Untereinheiten und Vergleich der Eigenschaften dieser klonierten mit nativen  $K_{ATP}$ -Kanälen kommt man zu dem Schluss, dass der  $K_{ATP}$ -Kanal in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas sowie in Neuronen aus  $K_{IR6.2}$  und SUR1 (Übersichtsartikel Babenko et al., 1998) und in den Kardiomyozyten aus  $K_{IR6.2}$  und SUR2A (Okuyama et al., 1998) zusammengesetzt ist. In glatter Muskulatur scheinen zwei Typen zu existieren: SUR2B/ $K_{IR6.1}$  und SUR2B/ $K_{IR6.2}$  (Zhang und Bolton, 1995; Isomoto et al., 1996; Koh et al., 1998). SUR2B/ $K_{IR6.1}$  ist der öffenerempfindliche  $K_{ATP}$ -Kanal im Gefäss.

### 1.5.1 Die Untereinheiten der $K_{ATP}$ -Kanäle

#### 1.5.1.1 Die $\alpha$ -Untereinheit $K_{IR6.x}$

##### 1.5.1.1.1 Die Gene der $\alpha$ -Untereinheit

Die  $K_{ATP}$ -Kanal-Untereinheit  $K_{IR6.x}$  ( $\approx 45$  kDa) existiert in Form zweier verschiedener Subtypen,  $K_{IR6.1}$  und  $K_{IR6.2}$ . Ihre kodierenden Gene stimmen bezüglich der Aminosäuresequenz zu ca. 70 % überein (Inagaki et al., 1997; Sakura et al., 1995).

Das menschliche Gen für  $K_{IR6.1}$  (KCNJ8) ist  $\approx 9,7$  kb lang und besitzt drei Exone. Das daraus entstehende Protein umfasst 424 Aminosäuren und zeigt eine 98%ige Homologie zu murinem  $K_{IR6.1}$ . Das Gen konnte mittels Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisation auf Chromosom 12, Position 12p11.23 lokalisiert werden, nahe dem Gen für SUR2, (s.u.).

Der Subtyp  $K_{IR6.1}$  ist in verschiedenen Geweben anzutreffen und kann mit SUR1 (Ämmälä et al., 1996; Clement et al., 1997) und SUR2B, jedoch nicht mit SUR2A funktionelle  $K_{ATP}$ -Kanäle ausbilden (Aguilar-Bryan et al., 1998). Seine Leitfähigkeit (*unitary conductance*;  $\approx 25$  pS in symmetrisch hohem  $K^+$ ) ist im Vergleich zu  $K_{IR6.2}$  geringer (Babenko et al., 1998).

Der native Partner von  $K_{IR6.1}$  konnte bisher noch nicht identifiziert werden. Yamada et al. (1997) brachten die Hypothese hervor, dass der von Beech et al. (1993) in glatter Gefäßmuskulatur beschriebene ADP-gesteuerte  $K_{ATP}$ -Kanal ( $K_{NDP}$ ) aus SUR2B und  $K_{IR6.1}$  bestehe. Bindungsstudien am rekombinanten System unterstützen diese These (Hambrock et al., 1999; Russ et al., 1999). Zudem würde eine Lokalisation im Gefäß die ubiquitäre Verteilung von  $K_{IR6.1}$  erklären. Spekulativ ist das Vorkommen von  $K_{IR6.1}$  in den von Garlid et al. 1996 beschriebenen mitochondrialen  $K_{ATP}$ -Kanälen (Aguilar-Bryan et al., 1998).

Interessanterweise ist dieser rekombinante Kanal aus SUR2B und  $K_{IR6.1}$  relativ ATP-unempfindlich ( $IC_{50} \approx 2 - 3$  mM; Yamada et al., 1997), während für den  $K_{ATP}$ -Kanal aus SUR2B und  $K_{IR6.2}$  eine ATP-Empfindlichkeit von 30 - 300  $\mu$ M beschrieben ist (Isomoto et al., 1996). Dies zeigt, dass das Vorhandensein von  $K_{IR6.1}$  ein von  $K_{IR6.2}$  unterschiedliches ATP-Verhalten prägt.

## 1. Einleitung

---

$K_{IR}6.2$  (Synonym BIR) ist ein 390 Aminosäuren langes Protein, dessen Gen auf dem kurzen Arm von Chromosom 11 liegt. Seine Leitfähigkeit beträgt unter symmetrisch hohem  $K^+$  ca. 80 pS. Die Organisation der Gene für SUR1 (Position 11p15.1; Thomas et al., 1995b) und  $K_{IR}6.2$  in direkter Nachbarschaft auf Chromosom 11 lässt vermuten, dass die beiden Untereinheiten zu einem früheren Zeitpunkt während der Evolution von nur einem gemeinsamen Gen kodiert wurden (Aguilar-Bryan und Bryan, 1996; Übersichtsartikel Aguilar-Bryan et al., 1998).  $K_{IR}6.2$  kann mit allen drei Isoformen von SUR  $K_{ATP}$ -Kanäle ausbilden (Inagaki et al., 1996; Isomoto et al., 1996). Dabei ist der pankreatische  $K_{ATP}$ -Kanal als eine Kombination aus SUR1 und  $K_{IR}6.2$  identifiziert worden (Sakura et al., 1995). SUR2B/ $K_{IR}6.1$  ist der öffenerempfindliche  $K_{ATP}$ -Kanal im Gefäß (s.o.) sowie im Urogenitaltrakt, SUR2B/ $K_{IR}6.2$  im Intestinum sowie im Urogenitaltrakt Mutationen im  $K_{IR}6.2$ -Gen können die Ursache für PHHI (persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy, s.u.) sein (Nestorowicz et al., 1996; Thomas et al., 1996).

### 1.5.1.1.2 Die molekulare Struktur der $\alpha$ -Untereinheit

Der  $K_{IR}$ -Kanal ist ein Tetramer aus  $\alpha$ -Untereinheiten. Er enthält zwei Transmembran-segmente (TMS 1 und TMS 2), verbunden durch eine extrazelluläre Schleife (H 5). Diese bildet durch Zurückfaltung in die Membran den grössten Teil der Kanalpore (Abb. 1.2). N- und C-Terminus liegen intrazellulär. Mutationen im Bereich der M 2-Schleife (N160D) lieferten Hinweise, dass diese Region für die Einwärtsrektifizierung verantwortlich ist (Clement et al., 1997). Weiterhin ist die  $K_{IR}$ -Untereinheit für die Kaliumselektivität sowie die Leitfähigkeit (*unitary conductance*) entscheidend.

Obwohl der SUR als ABC-Protein zwei Nukleotidbindungsstellen (NBFs) besitzt, scheint die inhibitorische ATP-Bindungsstelle auf der  $\alpha$ -Untereinheit ( $K_{IR}6.2$ ) gelegen zu sein (Tucker et al., 1997; Gribble et al., 1997). Studien mit  $K_{IR}6.2\Delta C36$ , das aus  $K_{IR}6.2$  nach Entfernung von 36 C-terminalen Aminosäuren hervorgeht und im Gegensatz zu diesem (Sakura et al., 1995) einen eigenständigen  $K^+$ -Kanal ausbilden kann, zeigten, dass die ATP-Inhibition über Bindung an die  $K_{IR}6.2$ -Untereinheit

## 1.5 Struktur und Regulation von $K_{ATP}$ -Kanälen

---

vermittelt wird; ADP besitzt für diese Bindungsstelle eine geringere Affinität (Tucker et al., 1997), dabei ist seine Wirkung inhibitorisch und  $Mg^{2+}$ -unabhängig. Seine stimulatorische Wirkung hingegen erfordert die Gegenwart von  $Mg^{2+}$  und erfolgt über die Bindung am SUR.

Weiterhin wird durch diese Studien deutlich, dass der C-Terminus die Expression des  $K_{IR}$  als alleine funktionstüchtigen  $K^+$ -Kanal verhindert. Der  $K_{IR6.2\Delta C36}$ -Kanal ist weder SU- noch KCO-empfindlich und nicht durch MgATP aktivierbar. Daraus lässt sich schließen, dass  $K_{IR6.2}$  zwar die Kanalpore bilden und somit die Leitfähigkeit für Kalium stellen kann, jedoch keine regulatorischen Eigenschaften besitzt.

Neben der Hemmung durch ATP bzw. ADP werden möglicherweise auch die Kanalinaktivierung (der sog. run-down, s.u.) und die nachfolgende Reaktivierung durch MgATP über die  $K_{IR}$ -Untereinheit vermittelt (Tucker et al., 1997).

Mit niedrigerer Affinität können auch SU an  $K_{IR6.2}$  binden (Gribble et al., 1997).

### 1.5.1.2 Die $\beta$ -Untereinheit SUR

#### 1.5.1.2.1 Die Gene der $\beta$ -Untereinheit

Die  $\beta$ -Untereinheit des Kaliumkanals, SUR (sulfonylurea receptor), wurde erstmals aus der  $\beta$ -Zelle des Pankreas kloniert (Aguilar-Bryan et al., 1995). Sie gehört zur Familie der ATP-bindenden Proteine, zu welcher auch die CFTR- (cystic fibrosis transconductance regulator) und die MDR-Proteine (multi-drug resistance proteins) gezählt werden.

Zwei verwandte Gene kodieren für die beiden entdeckten SUR-Subtypen, SUR1 und SUR2 (Aguilar-Bryan et al., 1995; Inagaki et al., 1996; Isomoto et al., 1996; Übersichtsartikel Ashcroft und Gribble, 1998). Sie liegen auf Chromosom 11 (p15.1) bzw. auf Chromosom 12 (p11.23; Chutkow et al., 1996). Für SUR1 (1581 bzw. 1582 Aminosäuren) kodieren 39 Exone, für SUR2 (1549 Aminosäuren) dagegen 38 Exone (Übersichtsartikel Aguilar-Bryan et al., 1998).

Ein typisches Merkmal von SUR1 im Gegensatz zu SUR2 ist seine hochaffine Bindungsstelle für Sulfonylharnstoffe (Babenko et al., 1998). Andererseits ist der von

## 1. Einleitung

---

SUR2/ $K_{IR}6.x$  gebildete vaskuläre Kanal sehr öffenerempfindlich und durch die Kaliumkanalöffner (KCO,  $K^+$  channel opener) Pinacidil und Cromakalim aktivierbar - im Gegensatz zu dem von SUR1/ $K_{IR}6.x$  gebildeten pankreatischen Kanal.

Vom SUR2-Rezeptor sind die beiden Isoformen SUR2A (Inagaki et al., 1996) und SUR2B (Isomoto et al., 1996) bekannt, welche unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber dem KCO Diazoxid aufweisen (Babenko et al., 1998). Sie entstehen dadurch, dass nach der Transkription des SUR2-Gens durch differentielles Spleissen zwei mRNA-Moleküle gebildet werden, die sich im letzten Exon unterscheiden (Exon 38A oder 38B). Der strukturelle Unterschied zwischen SUR2A und SUR2B beschränkt sich somit auf die endständigen 45 Aminosäuren des C-Terminus der beiden Proteine, ihre Homologie beträgt 97 % (Übersichtsartikel Babenko et al., 1998). Dabei ist der C-Terminus von SUR2B demjenigen von SUR1 ähnlicher als der von SUR2A (Homologie insgesamt 67 %), woraus geschlossen wurde, dass er für die Aktivierung des Kanals durch Diazoxid erforderlich ist (Isomoto et al., 1996; Übersichtsartikel Yokoshiki et al., 1998). Neuere Untersuchungen von D'Hahan et al. (1999) sowie von Dörschner et al. (1999) widersprechen dieser Vorstellung jedoch (s.u.).

Hingegen führen die verschiedenen C-Termini von SUR2A und SUR2B zu Unterschieden in der MgADP-Abhängigkeit, der Thermodynamik sowie der Affinitäten von Öffnern und Schliessern (Hambrock et al., 1999).

Der SUR spielt eine wichtige Rolle für die Regulation der Kanalaktivität. Wie oben erwähnt besitzt die  $K_{IR}$ -Untereinheit einzeln exprimiert keine regulatorischen Eigenschaften, sie wird erst durch direkte Assoziation mit SUR funktionsfähig (Lorenz et al., 1998; D'Hahan et al., 1999): Koexpression mit SUR1 verleiht dem Kanal zusätzlich zur  $K_{IR}$ -induzierten ATP-Empfindlichkeit noch KCO- (Diazoxid-) und SU- (Tolbutamid-) Empfindlichkeit und verschiebt die halbmaximale Hemmkonzentration ( $IC_{50}$ ) für ATP von  $\approx 100 \mu M$  auf  $\approx 10-25 \mu M$  (Übersichtsartikel Yokoshiki et al., 1998).

SUR1 vermag also dem von  $K_{IR}6.2$  formierten Kanal regulatorische Eigenschaften zu verleihen, doch ist er auch umgekehrt auf die Assoziation mit diesem angewiesen, da auch SUR alleine exprimiert keinen funktionsfähigen Kanal - sondern lediglich eine



## 1.5 Struktur und Regulation von $K_{ATP}$ -Kanälen

---

hochaffine SU-Bindungsstelle - stellen kann (Aguilar-Bryan et al., 1995; Übersichtsartikel Babenko et al., 1998): Für SUR1 existieren zwei Glykosylierungsstellen an den Positionen Asn-10 und Asn-1050 (Aguilar-Bryan et al., 1998), die in Abb. 1.2 als baumartige Strukturen dargestellt sind. SUR1 weist nach Core-Glykosylierung im Endoplasmatischen Reticulum (ER) eine relative Molekülmasse von 140 kDa auf. Bei Koexpression mit der  $\alpha$ -Untereinheit  $K_{IR}6.2$  erhöht sich der Glykosylierungsgrad von SUR1: er besitzt nunmehr eine Masse von 150-170 kDa und erscheint in dieser Form in der Plasmamembran. Interessant ist die Tatsache, dass bei alleiniger Expression SUR1 nur core-glykosyliert bleibt und nicht in die Plasmamembran weitertransportiert wird; er verharrt vielmehr in intrazellulären Membranen (Ozanne et al., 1995). Für die Weiterleitung von SUR1 vom ER in den Golgi-Apparat, wo die terminale Glykosylierung stattfindet, und von dort in die Plasmamembran ist also die Koexpression mit  $K_{IR}6.2$  notwendig, beide Untereinheiten assoziieren im ER (Clement et al., 1997; Zerangue et al., 1999).

### 1.5.1.2.2 Die molekulare Struktur der $\beta$ -Untereinheit

Die genaue Topologie des SUR konnte bisher noch nicht entschlüsselt werden. Tusnady et al. (1997) nehmen an, dass der SUR 17 Transmembransegmente (TMS) besitzt, welche in drei Gruppen von je 5, 6 und nochmals 6 TMS angeordnet sind, wodurch die Transmembrandomänen TMD 0, 1, 2 gebildet werden. Als Mitglied der ABC-Familie besitzt der SUR weiterhin zwei Nukleotidbindungsstellen (NBF, nucleotid binding folds), eine in der intrazellulären Schleife zwischen den Transmembrandomänen, die andere am intrazellulären Carboxylende (Abb. 1.2).

Damit befinden sich 11 TMS zwischen dem extrazellulär gelegenen  $NH_2$ -Terminus und der ersten Nukleotidbindungsstelle und weitere 6 vor der zweiten NBF, auf welche der intrazellulär gelegene C-Terminus folgt. Klassischerweise besitzen ABC-Proteine 12 TMS mit 2 NBFs, der SUR besitzt also 5 TMS am  $NH_2$ -Ende mehr, welche die TMD 0 bilden.

## 1. Einleitung

---

Zum charakteristischen Aufbau der NBFs gehören die sog. Walker A- und B-Motive (Walker A-Motiv: -GlyXXGlyXGlyLysSer/Thr-, wobei X eine beliebige Aminosäure darstellt; Walker B-Motiv: -YYYYAsp-, wobei Y eine hydrophobe Aminosäure darstellt; Abb. 1.2; Walker et al., 1982) und eine verbindende (*linker*) Region (Higgins, 1992; Aguilar-Bryan et al., 1998; Schwanstecher et al., 1998), welche das sog. *consensus motif*, -leu-ser-gly-gly-gln-, enthält. Die Lysinreste des Walker A-Motives interagieren mit den  $\beta$ - und  $\gamma$ -Phosphaten des ATP (Saraste et al., 1990; Higgins, 1992; Schwanstecher et al., 1998), die Aspartat-Reste des Walker B-Motives mit  $Mg^{2+}$ .

Das Walker A-Motiv ist Teil der Nukleotidbindungstasche und i.A. zur Bindung von MgATP und MgADP befähigt, jedoch wird die inhibitorische Wirkung von ATP über die  $\alpha$ -Untereinheit vermittelt (s.o.).

Bei Mutationen im Bereich der Lysin-Reste der NBFs verliert der Kanal sowohl seine KCO-Empfindlichkeit als auch seine Aktivierungsfähigkeit durch MgADP, die Hemmung durch ATP hingegen bleibt erhalten (Gribble et al., 1997; Nichols et al., 1996). Somit ist die Öffnung nativer  $K_{ATP}$ -Kanäle durch MgADP (wahrscheinlich MgNDPs) wohl über die NBFs vermittelt.

Diese Wirkung ist pathophysiologisch von grosser Bedeutung, da die Folge des Verlustes der Kanalöffnung durch Mutationen in diesem Bereich der NBFs des SUR1 der sog. familiäre Hyperinsulinismus (PHHI, persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy) ist. Bei dieser Erkrankung liegt das Ruhepotential der Zellen ständig bei ca.  $-35$  mV, was einer dauernden Depolarisation entspricht. Die hierdurch gesteigerte L-Typ- $Ca^{2+}$ -Kanalaktivität treibt die Insulinsekretion hoch (Aguilar-Bryan und Bryan, 1996). Auch Mutationen an  $K_{IR6.2}$  können die persistierende hyperinsulinämische Hypoglykämie auslösen (s.o.). Bisher besteht die Therapie dieser Erkrankung in der subtotalen Pankreatomie (Cook und Bryan, 1998).

Krankheiten mit Beteiligung des SUR2-Gens sind bislang nicht bekannt.

ABC-Proteine verfügen charakteristischerweise über ATPase-Fähigkeit (Higgins, 1992; Ko und Pedersen, 1995; Koronakis et al., 1995; Travis et al., 1993; Übersichtsartikel Ashcroft und Gribble, 1998), welche durch Mutationen im Bereich dieser Lysinreste vermindert bzw. aufgehoben wird (z.B. P-Glykoprotein). Für den SUR jedoch ist die

## 1.5 Struktur und Regulation von $K_{ATP}$ -Kanälen

---

Rolle der ATP-Hydrolyse noch unklar und bisher nicht experimentell demonstriert worden. Die Ergebnisse von Gribble et al. (1997) sowie von Nichols et al. (1996) weisen allerdings darauf hin, dass auch am SUR die Hydrolyse von ATP eine wichtige Rolle für die Kanalaktivität spielt. Diese Annahme wird gestützt durch die Tatsache, dass die Bindung und Wirkung der KCOs hydrolysierbare Nukleotide erfordert (s.u.). Vermutlich bewirkt die Hydrolyse von ATP ein Umklappen, eine Konformationsänderung des SUR, wodurch die Bindung des Öffners erst möglich wird (Ames et al., 1992; Schwanstecher et al., 1998).

In die aus der ATP-Hydrolyse resultierenden Konformationsänderungen des SUR-Moleküls scheint die Verbindungsschleife (*linker region*) mit dem *consensus motif* verwickelt zu sein (Schwanstecher et al., 1998).

Ueda et al. (1999) fanden heraus, dass MgADP die Bindung des Photoradioliganden  $^{32}\text{P}$ -Azido-ATP an SUR1 stabilisieren konnte. Mutation der NBF 2 von SUR1 reduzierte nicht die Bindung von  $^{32}\text{P}$ -Azido-ATP, jedoch deren Stabilisierung durch MgADP. Mit diesen Ergebnissen konnte gefolgert werden, dass  $^{32}\text{P}$ -Azido-ATP vornehmlich an der NBF 1 bindet, wohingegen die Bindung von MgADP an NBF 2 erfolgt; beide NBFs zeigten positive Kooperativität. Spekulativ bleibt, wie die Aktion der Nukleotide an den NBFs die Kanalaktivität regulieren; sicher scheint jedoch, dass beide NBFs für die Kanalaktivierung notwendig sind (Ashcroft und Gribble, 1998; Schwanstecher et al., 1998). Ueda et al. (1999) nahmen an, dass die gleichzeitige Besetzung von NBF 1 durch ATP und von NBF 2 durch MgADP eine Kanalöffnung bewirkt. Die genaue Steuerung des  $K_{ATP}$ -Kanals durch die Nukleotide ist weiterhin Gegenstand intensiver Forschung

Im Nierenepithel, genauer gesagt in den Hauptzellen des Sammelrohres, ist der  $K_{ATP}$ -Kanal nicht aus den bisher beschriebenen Untereinheiten,  $K_{IR}$  ( $\alpha$ -Untereinheit) und SUR ( $\beta$ -Untereinheit), zusammengesetzt. Die  $\alpha$ -Untereinheit wird hier vom ROMK2-Kanal gestellt (Renal Outer Medulla K<sup>+</sup> channel;  $K_{IR1.1b}$ ), die Funktion des SUR wird vom CFTR (Cystis Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator; McNichols et al., 1996) übernommen. Der ROMK2-Kanal (Zhou et al., 1994) ist eine Spleiss-Variante von ROMK1, dem ersten klonierten einwärts rektifizierenden  $K^+$ -Kanal (Ho et al.,

## 1. Einleitung

---

1993). SUR wird in der Niere nicht exprimiert (Aguilar-Bryan et al., 1995), wohingegen CFTR, ein bekanntes Mitglied der Familie der ABC-Proteine, dort exprimiert wird (Riordan, 1993). In Gegenwart aktivierter Proteinkinase A und MgATP agiert CFTR als Cl<sup>-</sup>-Kanal: seine Aktivität wird sowohl von Glibenclamid als auch von K<sub>ATP</sub>-Kanal-Öffnern mit K<sub>I</sub>-Werten im  $\mu\text{M}$  Bereich gehemmt (Sheppard und Welsh, 1992). Koexpression von ROMK2 und CFTR in *Xenopus*-Oozyten erzeugt einen K<sup>+</sup>-Kanal, der durch intrazelluläres ATP und Glibenclamid gehemmt wird (McNicholas et al., 1996).

### 1.5.2 Physiologische Eigenschaften von K<sub>ATP</sub>-Kanälen

Die Einzelkanalleitfähigkeit der K<sub>ATP</sub>-Kanäle beträgt in Kardiomyozyten  $\approx 80$  pS (Noma et al., 1983; Trube und Hescheler, 1984; Tung und Kurachi, 1991; Yokoshiki et al., 1997) und in  $\beta$ -Zellen des Pankreas  $\approx 56$ -65 pS (Misler et al., 1986; Rorsman und Trube, 1985; Trube et al., 1986) unter symmetrischen Bedingungen mit 140-150 mM K<sup>+</sup>. In glatten Gefäßmuskeln ist die Einzelkanalleitfähigkeit gering bis mittelgross (22 pS) in einem K<sup>+</sup>-Gradienten von 60 zu 130 mM (Zhang und Bolton, 1995; 1996).

#### 1.5.2.1 Steuerung des K<sub>ATP</sub>-Kanals durch ATP, (Mg)ADP und PIP<sub>2</sub>

Die Effekte von ATP und (Mg)ADP auf die K<sub>ATP</sub>-Kanäle lassen sich in mindestens drei Kategorien einteilen: neben der für die K<sub>ATP</sub>-Kanäle charakteristischen Hemmung, bewirkt ATP ihre Reaktivierung (*refreshment*) und MgADP ihre Stimulation. PIP<sub>2</sub> bewirkt durch Verschiebung der ATP-Empfindlichkeit die Feineinstellung des Kanals.

##### 1.5.2.1.1 Hemmung des K<sub>ATP</sub>-Kanals durch ATP

Intrazellulär zugegeben hemmt ATP ( $\pm \text{Mg}^{2+}$ ) die K<sub>IR6.2</sub>-enthaltenden K<sub>ATP</sub>-Kanäle dabei liegt die halbmaximale Hemmkonstante mit 15-40  $\mu\text{M}$  (Ohno-Shosaku et

## 1.5 Struktur und Regulation von $K_{ATP}$ -Kanälen

---

al., 1987; Ashcroft und Kakei, 1989) relativ niedrig; hieraus würde eine totale Hemmung bei einem zytosolischen ATP-Spiegel von ca. 3-5 mM in z.B.  $\beta$ -Zellen (Übersichtsartikel Yokoshiki et al., 1998) resultieren. In Experimenten in der *perforated patch*-Konfiguration konnte jedoch gezeigt werden, dass einige  $K_{ATP}$ -Kanäle aktiviert werden und in Abwesenheit von Glucose die Hintergrundleitfähigkeit (*major background conductance*) erhalten konnten (Ashcroft und Ashcroft, 1990; Smith et al., 1990; Übersichtsartikel Yokoshiki et al., 1998). Aus diesem Grunde wurde angenommen, dass ausser ATP noch andere Regulatoren für die  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität in Betracht gezogen werden müssen:

So hat auch ADP eine gewisse Affinität zur inhibitorischen ATP-Bindungsstelle, jedoch eine niedrigere Potenz. Für gewöhnlich wird dieser hemmende Effekt von ADP am  $K_{IR}$  durch seine stimulatorische Komponente am SUR überlagert (s.u.).

Als weiterer Regulator kommt das Membranphospholipid  $PIP_2$  (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat) in Betracht. Für dieses konnten nämlich Baukrowitz et al. (1998) sowie Shyng und Nichols (1998) zeigen, dass es einen aussergewöhnlichen Einfluss auf die ATP-Empfindlichkeit des Kanals hat (s.u.).

### 1.5.2.1.2 Run-down und Reaktivierung des $K_{ATP}$ -Kanals durch ATP

In ATP-freier Lösung öffnen  $K_{ATP}$ -Kanäle, dann jedoch kommt es zum Aktivitätsverlust, kurz run-down genannt (Trube und Hescheler, 1984; Übersichten: Ashcroft und Ashcroft, 1990; Babenko et al., 1998; Okuyama et al., 1998). Diese charakteristischen Eigenschaften erklären sich durch einen zweifachen ATP-Effekt: im intakten Zellmilieu wirkt endogenes ATP im mikromolaren Bereich inhibierend, mit Abfallen der ATP-Konzentration resultiert eine Aktivierung, die jedoch nach und nach verschwindet; somit scheinen geringe ATP-Mengen zur Erhaltung der Kanalfunktion notwendig zu sein (Babenko et al., 1998). Eine Inaktivierung des Kanals lässt sich auch durch Applikation von hohen  $Ca^{2+}$  Konzentrationen ( $>10 \mu M$ ) herbeiführen (Furukawa et al., 1996).

## 1. Einleitung

---

Die Inaktivierung kann allerdings durch kurze Applikation millimolarer MgATP-Konzentrationen teilweise wieder rückgängig gemacht werden (*refreshment*). Da die Wiederherstellung der Aktivität  $Mg^{2+}$  bzw.  $Mn^{2+}$  erfordert und nicht-hydrolysierbare Nukleotide unwirksam sind, ist anzunehmen, dass MgATP die Kanalaktivität durch einen hydrolyseabhängigen Prozess (Furukawa et al., 1994; Ohno-Shosaku et al., 1987) unterhält. Der Kanal wird somit wohl von einem nicht-aktivierbaren (*nonoperational*) in einen aktivierbaren Zustand gebracht. Um die Aktivität des Kanals wieder vollständig herzustellen, ist zudem die Zugabe von F-Actin nötig (Furukawa et al., 1996). Hierdurch wird ein Zusammenhang zwischen der Intaktheit des Zytoskeletts bzw. der Aktinfilamente und der Aktivierbarkeit (Verhinderung des run-downs) des Kanals deutlich. Umgekehrt bewirkt die Depolymerisation von Aktinfilamenten, d.h. die Entkopplung des Kanals vom Aktin-Zytoskelett den run-down des Kanals (Furukawa et al., 1996).

Weitere mögliche Erklärungen für den Übergang vom aktivierbaren in den inaktivierbaren Zustand sind einmal Phosphorylierung-Dephosphorylierung (Olesen und Bundgaard, 1993; andererseits: Furukawa et al., 1994; 1996) und schliesslich die Hydrolyse anionischer Phospholipide, von denen angenommen wird, dass sie den Kanal in seinem aktivierbaren Zustand stabilisieren (Hilgemann und Ball, 1996; Fan und Makielski, 1997). Welcher Mechanismus nun tatsächlich verantwortlich ist oder ob es gar mehrere sind, ist Gegenstand der Diskussion. Möglicherweise wirkt der  $Mg^{2+}$ -erfordernde Effekt von ATP direkt auf die Kanaluntereinheiten oder auf die Stabilität der Aktinfilamente ein.

### 1.5.2.1.3 Stimulation des $K_{ATP}$ -Kanals durch MgADP

In Abwesenheit von  $Mg^{2+}$  hemmen hohe Konzentrationen (1-4 mM) von ADP und vieler weiterer NDPs den Kanal, die Bindung erfolgt hierbei am  $K_{IR}$ . MgADP-Bindung am SUR hingegen stimuliert die Aktivität des  $K_{ATP}$ -Kanals und kann von ATP vorgehemmte Kanäle aktivieren (Übersichtsartikel Yokoshiki et al., 1998).

## 1.5 Struktur und Regulation von $K_{ATP}$ -Kanälen

---

Andererseits können NDPs auch in Abwesenheit von ATP den Kanal stimulieren (Dunne et al., 1986a; 1986b; Tung und Kurachi, 1991). Tung und Kurachi haben 1991 festgestellt, dass NDPs die Kanalaktivität nach dem sog. run-down (s.o.) wiederherstellen können, und haben daher das Vorhandensein einer spezifischen NDP-Bindungsstelle (N site; stimulatorisch) postuliert, welche den Kanal in einem aktivierbaren Zustand erhält; möglicherweise handelt es sich hierbei um die NBF 2 des SUR.

Insgesamt lässt sich als einfachstes Modell für die Regulation des Kanals aus SUR/ $K_{IR6.x}$  durch ATP bzw. ADP folgendes annehmen: ATP hemmt die Aktivität des Kanals und erhält diesen in einem aktivierbaren Zustand, Fluktuationen im ADP-Spiegel dagegen sind entscheidend für die physiologische Regulation.

### 1.5.2.1.4 Feineinstellung durch $PIP_2$

Die ATP-Empfindlichkeit des  $K_{ATP}$ -Kanals wird durch den endogenen  $PIP_2$ -Spiegel in der Zellmembran beeinflusst (Baukowitz et al, 1998; Shyng und Nichols, 1998). Isolierte Membranstückchen zeigten steigende ATP-Empfindlichkeit, entsprechend einem graduellen Verlust an  $PIP_2$  (vermutlich durch Lipidphosphatasen). Applikation mikromolarer  $PIP_2$ -Konzentrationen auf die zytoplasmatische Seite des Membranpatches hingegen reduzierte die halbmaximale Hemmkonzentration für ATP nach einer gewissen Zeit, welche vermutlich für den Einbau von  $PIP_2$  in die Membran benötigt wurde, von  $\approx 10 \mu\text{M}$  auf  $\approx 3 \text{ mM}$ . Anders ausgedrückt konnte  $PIP_2$  die ATP-Empfindlichkeit des Kanals verschieben, genauer gesagt reduzieren. Dies erklärt die Beobachtung, dass in intakten  $\beta$ -Zellen des Pankreas Kaliumkanalaktivität beobachtet werden konnte, obwohl die hier vorliegenden zytoplasmatischen ATP-Spiegel von ca. 3-5 mM den Kanal in isolierten Membranstückchen vollständig hemmen ( $IC_{50}$  ca.  $10 \mu\text{M}$ ) (Ashcroft, 1998).

Da die Aktivität manch anderer  $K_{IR}$ -Kanäle durch  $PIP_2$  geregelt wird (Huang et al., 1998), ist es nicht überraschend, dass  $PIP_2$  mit der  $K_{IR6.2}$ -Untereinheit des  $K_{ATP}$ -Kanals

## 1. Einleitung

---

interagiert (Baukrowitz et al., 1998). Möglicherweise wird diese Regulation von der Anwesenheit von SUR beeinflusst, in welcher Weise allerdings, ist noch unklar.

Ebenso ist der Mechanismus, über welchen  $\text{PIP}_2$  die ATP-Empfindlichkeit reduziert, nicht bekannt. Zwei mögliche Erklärungen sind denkbar, erstens eine Veränderung der ATP-Bindung durch  $\text{PIP}_2$  (Kompetition um die gleiche oder eine überlappende Bindungsstelle auf  $\text{K}_{\text{IR}}6.2$  oder negativ allosterische Kopplung der Bindungsstellen), und zweitens eine Erhöhung der negativen Ladungen an der Oberfläche der Membran, welche mittels elektrostatischer Effekte die Konzentration des negativ geladenen ATP-Moleküls reduziert (Ashcroft, 1998).

Die Stabilisierung des  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanals in seinem aktivierbaren Zustand wird wesentlich durch die Intaktheit des Aktinzytoskeletts bestimmt (s.o., Furukawa et al., 1996).  $\text{PIP}_2$  hemmt nahezu alle Aktin-bindenden Proteine, die Aktinfilamente begrenzen und trennen (Furukawa et al., 1996) und es konnte gezeigt werden, dass  $\text{PIP}_2$  den run-down des Kanals hemmt. Auf welche Weise diese Hemmung durch  $\text{PIP}_2$  stattfindet, ist allerdings noch ungeklärt: Die Hydrolyse von  $\text{PIP}_2$  resultiert in der Produktion von Inositoltriphosphat ( $\text{IP}_3$ ) und Diacylglycerol (DAG), welche wiederum Proteinkinase C (PKC) aktivieren bzw.  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  erhöhen. Eine Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  erleichtert jedoch eher den run-down und auch PKC bewirkt keine Reaktivierung des Kanals (Furukawa et al., 1996).

Die Bildung der intrazellulären Botenstoffe Diacylglycerin (DAG) und Inositoltriphosphat ( $\text{IP}_3$ ) wird durch die Phospholipase C (PLC) nach Stimulation von G-Proteinen der  $\text{G}_q$ -Familie katalysiert (Forth et al., 1996). Wahrscheinlich kann die Stimulation eines metabotropen Rezeptors, der an die PLC gekoppelt ist, über Variationen des  $\text{PIP}_2$ -Gehalts der Plasmamembran  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Aktivität modulieren (Baukrowitz et al., 1998). Neben Glucose können gastrointestinale Hormone wie Gastrin, GIP oder Cholezystokinin (CCK) die Insulinsekretion fördern (Deetjen und Speckmann, 1994). Letzteres entfaltet seine Wirkung über eine Aktivierung der PLC (Silbernagl und Lang, 1998). Hinsichtlich der Förderung der Insulinsekretion aus pankreatischen  $\beta$ -Zellen ist denkbar, dass einerseits der resultierende Abfall der  $\text{PIP}_2$ -Konzentration die ATP-Empfindlichkeit des  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanals erhöht andererseits mit dem durch  $\text{IP}_3$  vermittelten Anstieg der intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel steigt.



## 1.5 Struktur und Regulation von $K_{ATP}$ -Kanälen

---

### 1.5.2.2 Steuerung durch G-Proteine, pH, Phosphorylierung und $\alpha$ -Endosulfon

Die Regulation der Aktivität der  $K_{ATP}$ -Kanäle wird neben dem Verhältnis ATP/ADP durch einige weitere Faktoren beeinflusst. So können  $K_{ATP}$ -Kanäle z.B. durch G-Proteine stimuliert werden. Beispielsweise wurde in Herz- und Skelettmuskel sowie in  $\beta$ -Zellen des Pankreas und Koronararterien eine Kanalöffnung durch inhibitorische G-Proteine beobachtet, insbesondere unter ischämischen Bedingungen (Kirsch et al., 1990; Terzic et al., 1994b; Nelson und Quayle, 1995; Übersicht in Quast, 1996a). Die Applikation aktiver Formen exogener G-Protein-Untereinheiten auf die innere Oberfläche der Plasmamembran aktiviert  $K_{ATP}$ -Kanäle, die zuvor durch ATP gehemmt worden waren. (Terzic et al., 1994).

In einigen Gefässbetten werden die  $K_{ATP}$ -Kanäle durch gefässerweiternde Neurotransmitter und Hormone vermutlich über eine Aktivierung von  $G_S$ -Proteinen mit nachfolgendem cAMP-Anstieg und Proteinkinase A-Aktivierung indirekt geöffnet (Übersichtsartikel Nelson und Quayle, 1995). Diesem Mechanismus unterliegen sowohl die Relaxation der Koronargefäße durch Adenosin (Daut et al., 1990; Dart und Standen, 1993), Prostazyklin als auch sein Analogon Iloprost (Jackson et al., 1993; Übersicht in Quast, 1996a).

Weiterhin kann der  $K_{ATP}$ -Kanal über den pH-Wert gesteuert werden (Lederer und Nichols, 1989; Cuevas et al., 1991; Proks et al., 1994). Eine Absenkung des intrazellulären pH-Wertes unter 6,7 in Abwesenheit von ATP führte zu einer Senkung der Offen-Wahrscheinlichkeit und der Einzelkanalleitfähigkeit von  $K^+$ -Kanälen im Herzen (Cuevas et al., 1991), im Pankreas (Proks et al., 1994) sowie im Nierenepithel. In der Niere wird über diesen Regulationsmechanismus die  $K^+$ -Sekretion gebremst, was andererseits die energieabhängige Reabsorption von Elektrolyten und anderen gelösten Stoffen hemmt und damit Energie gespart.

Im Skelettmuskel hingegen erleichtert die Azidose die Kanalöffnung. Dies passt zu der angenommenen Funktion des Kanals, in Zeiten der Ischämie zu öffnen und die Energiereserven der Zelle durch gesenkte Erregbarkeit zu schützen.

## 1. Einleitung

---

Phosphorylierung mittels Proteinkinase A (PKA), Proteinkinase G (PKG) oder Proteinkinase C (PKC) stellen einen weiteren Regulationsmechanismus für  $K_{ATP}$ -Kanäle dar (Hu et al., 1996; Light et al., 1996; Liu et al., 1996; Nelson und Quayle, 1995). Vaskuläre  $K_{ATP}$ -Kanäle werden über Phosphorylierung durch PKA bzw. PKG stimuliert, wohingegen sie - wie auch die  $K_{ATP}$ -Kanäle des Nierenepithels - durch PKC-Aktivierung gehemmt werden (Nelson und Quayle, 1995; Quast, 1996a). Kardiale  $K_{ATP}$ -Kanäle hingegen werden durch PKC stimuliert, was eine bedeutende Rolle in bezug auf den kardioprotektiven Effekt der Kaliumkanalöffnung spielen mag: *preconditioning* (Liu et al., 1996; Hu et al., 1995).

Heron et al. (1998) berichteten über die Klonierung eines endogenen Peptids mit einer Masse von  $\approx 13$  kDa und einer Länge von 121 Aminosäuren, das in Geweben mit beschriebener  $K_{ATP}$ -Aktivität gefunden wurde und ein weiterer Regulator des  $K_{ATP}$ -Kanals sein könnte.  $\alpha$ -Endosulfin, so der Name des Peptids, konnte Ströme des rekombinanten  $K_{ATP}$ -Kanals bestehend aus SUR1/ $K_{IR}6.2$  hemmen, konzentrationsabhängig die Insulinsekretion aus einer  $\beta$ -Zelllinie steigern und in Wettbewerbsexperimenten die  $^3\text{H}$ -GBC-Bindung an diesen Zellen mit einer  $IC_{50}$  von  $\approx 1 \mu\text{M}$  verdrängen. Letzteres weist  $\alpha$ -Endosulfin als einen Liganden am  $K_{ATP}$ -Kanal aus; unklar ist noch, auf welcher Untereinheit seine Bindungsstelle liegt. Weiterhin kann die endogene Aktivität möglicherweise durch das Vorhandensein einer PKA-abhängigen Phosphorylierungsstelle noch verändert werden (Heron et al., 1998). Weitere Studien werden notwendig sein, um die genaue Stellung dieses Peptids in der Regulation von nativen  $K_{ATP}$ -Kanälen zu erleuchten.

### 1.5.2.3 Molekulare Interaktion zwischen SUR und $K_{IR}$ und die Rolle des Zytoskeletts

Wie für viele Ionenkanäle ist auch für den ATP-abhängigen  $K^+$ -Kanal die Einbindung in ein intaktes Aktin-Zytoskelett Voraussetzung für eine regelrechte Kanalfunktion (s.o.). Die Aufrechterhaltung eines intakten Aktin-Zytoskeletts ist ein energieabhängiger Prozess, der die laufende Neubildung von Aktinpolymeren (F-Aktin) aus dem monomeren G-Aktin beinhaltet (Stryer, 1991); bei ATP-Mangel kommt es zu einer

## 1.5 Struktur und Regulation von $K_{ATP}$ -Kanälen

---

zunehmenden Depolymerisation und damit zu einer Zerstörung der Aktinfilamente. Dies hat auf  $K_{ATP}$ -Kanäle zwei unterschiedliche, zeitabhängige Auswirkungen (Furukawa et al., 1996): einer Aktivierung für einige Minuten folgt die zunehmende Inaktivierung (run-down), die in einem irreversiblen Funktionsverlust resultiert und durch eine Zugabe von MgATP nicht umgekehrt werden kann. Diesem Verhalten liegt höchstwahrscheinlich eine zunehmende Abnahme des Polymersiationsgrades der Aktinfilamente zugrunde. Experimentelle Depolymerisation durch die Zugabe des Pilzgiftes Cytochalasin D konnte kardiale  $K_{ATP}$ -Kanäle kurzfristig aktivieren (Terzic und Kurachi, 1996); langfristig wurde jedoch die Kanalinaktivierung initiiert (Furukawa et al., 1996); Substanzen, die die Aktinfilamente stabilisieren und vor einem Abbau schützen, konnten den run-down verhindern. Die Reaktivierung von Kanalaktivität durch MgATP, die höchstens  $\approx 60\%$  der Ausgangsaktivität wiederherstellen konnte (Terzic und Kurachi, 1996), beruht auf der Bereitstellung von Energie, die für eine Repolymerisation von Aktinfilamenten nötig ist (Furukawa et al., 1996). Irreversible Inaktivierung, bei der MgATP ohne Effekt bleibt, tritt dann ein, wenn zur Wiederherstellung von F-Aktin kein monomeres G-Aktin mehr zur Verfügung steht. Zugabe von Cytochalasin D konnte in kardialen  $K_{ATP}$ -Kanäle die hemmende ATP-Wirkung abschwächen, was sich in einer Rechtsverschiebung der ATP-Inhibitionskurve zeigte (Terzic und Kurachi, 1996). Dies erklärt die kurzfristige Aktivierung von  $K_{ATP}$ -Kanälen bei Zerstörung des Aktinzytoskeletts. Die Wirkung von Sulfonharnstoffen wurde in Gegenwart von Cytochalasin D ebenfalls geschwächt (Yokoshiki et al., 1997a). An Rattenaorta wird die  $^3\text{H}$ -GBC-Bindung (im Gegensatz zur  $^3\text{H}$ -P1075-Bindung) nach Zerstörung des Zytoskeletts durch Cytochalasin D bzw. Latrunculin B ebenfalls vermindert (Löffler-Walz und Quast, 1997).

## 1. Einleitung

---

### 1.6 Pharmakologische Modulation von $K_{ATP}$ -Kanälen

#### 1.6.1 Kaliumkanalöffner

Die  $K_{ATP}$ -Kanalöffner (KCO,  $K^+$  channel opener) umfassen eine strukturell heterogene Stoffgruppe mit einem breiten therapeutischen Einsatzbereich, so z.B. Hypoglykämie, Hypertonie, Arrhythmien, Angina pectoris und Asthma (Lawson, 1996; Schwanstecher et al., 1998).

Die Prototypen der KCO, Pinacidil, Diazoxid, Minoxidilsulfat und (Lev-)Cromakalim, gehören zu den Strukturklassen der Zyanoguanidine, Benzothiadiazine, Pyrimidine bzw. Benzopyrane. Diese Stoffe üben ihre Wirkung z.B. auf sekretorische Zellen, glatte (Gefäß-) Muskelzellen sowie Herz- und Skelettmuskelzellen über eine Öffnung von  $K_{ATP}$ -Kanälen aus: Sie erhöhten in Effluxexperimenten mit Gefäßstreifen den Ausstrom von  $^{86}Rb^+$  oder  $^{42}K^+$ , welche als Marker für die  $K^+$ -Kanalöffnung eingesetzt werden (Quast 1987; Quast und Baumlin, 1988; Cook und Quast, 1990). Hierdurch wird, elektrophysiologisch betrachtet, eine Verschiebung des Membranpotentials in Richtung des Kalium-Gleichgewichtspotentials (Hyperpolarisation) bewirkt und so die elektrische Aktivität der Zelle reduziert (Edwards und Weston, 1993).

Die KCO wurden ursprünglich für die Verwendung am  $K_{ATP}$ -Kanal des glatten Gefäßmuskels (SUR2B/ $K_{IR6.1}$ ) optimiert und weisen dementsprechend diesem gegenüber eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Selektivität auf. Sie bewirken eine Gefäßrelaxation (Quast, 1993; Edwards und Weston, 1994), was ihre medizinische Anwendung als Antihypertensiva erklärt. Diazoxid allerdings ist ein KCO, welcher in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas eine ähnliche Potenz wie im glatten Muskel aufweist und deshalb therapeutisch bei Hyperinsulinämie infolge eines Insulinoms eingesetzt wird (Forth et al., 1996).

Der breite Einsatz der Kaliumkanalöffner wird beeinträchtigt durch ihre geringe Gewebespezifität und teilweise geringe Affinität (Lawson et al., 1996; D'Hahan et al., 1999). Auf der Suche nach Stoffen mit einem günstigeren Wirkprofil ist ein

## 1.6 Pharmakologische Modulation von $K_{ATP}$ -Kanälen

---

tiefergehendes Verständnis der Wirkungsmechanismen dieser Substanzen unerlässlich. Die molekularen Details ihres Wirkungsmechanismus sowie der Lokalisation ihrer Bindungsstelle sind jedoch noch immer nicht vollständig geklärt.

Hambrock et al. (1998) sowie Schwanstecher et al. (1998) haben festgestellt, dass die KCO an die Untereinheit SUR des  $K_{ATP}$ -Kanals binden und dass sie für diese Bindung wie auch für ihre Wirkung an dieser Bindungsstelle die Anwesenheit von hydrolysierbarem,  $Mg^{2+}$ -gebundenem ATP benötigen (Löffler-Walz und Quast, 1997; Schwanstecher et al., 1998). Punktmutationen im Walker A-Motiv oder in Verbindungsbereichen der beiden NBFs heben die Aktivierung der Öffnerbindung durch MgATP auf. Somit sind beide NBFs im nativen SUR für die Bindung und Wirkung der Öffner erforderlich. Höchstwahrscheinlich führt die Bindung und/oder die Hydrolyse von MgATP an beiden NBFs zu einer Konformationsänderung, die den  $K_{ATP}$ -Kanal öffnerempfindlich macht (Schwanstecher et al. 1998). Die ATP-Abhängigkeit der Öffnerbindung zeigt sich auch in Verdrängungsexperimenten mit  $^3H$ -GBC, bei denen die Öffner in Abwesenheit von MgATP die  $^3H$ -GBC-Bindung nur schwach hemmen können, unter Zugabe von MgATP jedoch eine stärkere Verdrängung beobachtet wird (Schwanstecher et al., 1998).

Untersuchungen von Schwanstecher et al. hatten 1998 eine im Vergleich zur Konzentration für die halbmaximale Aktivierung ( $EC_{50}$ ) 3,5-8mal höhere Bindungskonstante  $K_D$  an rekombinanten SUR2B/ $K_{IR}6.2$ -Kanälen ergeben. In Anbetracht der Tatsache, dass  $K^+$ -Kanäle Oktamere aus 4  $K_{IR}$ - und 4 SUR-Untereinheiten sind, wurde diese Rechtsverschiebung als Hinweis dafür gesehen werden, dass die Öffnung des Kanals die Besetzung mehrerer KCO-Rezeptorstellen pro Kanal erfordert (Schwanstecher et al., 1998). Es wurde daher davon ausgegangen, dass die Bindung von 4 Öffnermolekülen zur Kanalöffnung erforderlich ist, wobei jedes Öffnermolekül eine Bindungsstelle an der  $\beta$ -Untereinheit SUR besetzt (Schwanstecher et al., 1998). Unterstützt wurde diese Annahme durch die Hill-Koeffizienten der Aktivierungskurven, welche zwischen 1,3 und 2,1 lagen und auf eine Kooperativität der Wirkung hinweisen.

## 1. Einleitung

---

In neuen Untersuchungen von Gross et al. (1999) wurde diese Theorie jedoch widerlegt und gezeigt, dass die Bindung eines einzigen Öffnermoleküls für die Kanalaktivierung ausreichend ist.

Der KCO MxS verdrängt  $^3\text{H}$ -P1075 am SUR2B biphasisch bzw. unvollständig. (Hambrock et al., 1998; 1999; Schwanstecher et al., 1998; Kap. 3.2.5.3). Die Stöchiometrie der KCO-Bindung an den SUR ist noch nicht geklärt. Denkbar sind daher entweder eine einzige KCO-Bindungsstelle pro SUR oder mehrere, nicht miteinander interagierende. Die einfachste Erklärung der biphasischen Verdrängung ist daher die Vorstellung zweier Bindungsstellen pro SUR, wobei MxS die einzige Substanz darstellt, die unterscheidbar an beide bindet. Andererseits könnte die Bindung von MxS an eine Bindungsstelle erfolgen, welche von jener des verwendeten tritiierten P1075 verschieden, aber negativ allosterisch mit ihr gekoppelt ist. Als drittes Modell für die unvollständige Hemmung durch MxS wurde die Übertragung einer Sulfatgruppe dieses Stoffes auf eine der Öffnerbindungsstelle benachbarte Aminosäure vorgeschlagen (Hambrock et al., 1998).

Unterschiede in den 42 C-terminalen Aminosäuren bedingen 4-5 fach niedrigere Affinitäten für die Öffnerbindung an SUR2A im Vergleich zur Bindung an SUR2B; SUR1 besitzt Bindungskonstanten im mM Bereich. Dies zeigt, dass neben dem C-Terminus auch der restliche Anteil von SUR die Affinität beeinflusst (Schwanstecher et al., 1998; Hambrock et al., 1999).

Neuere Untersuchungen weisen darauf hin, dass die Empfindlichkeit für das Cromakalim-Analogon SR47063 mit der Transmembrandomäne TMD 2 des SUR in Zusammenhang steht (D'Hahan et al., 1999; Uhde et al., 1999). Auch geht aus diesen Untersuchungen hervor, dass die Diazoxid-Wirkung, die früher stets in Zusammenhang mit dem C-Terminus des SUR gebracht wurde (s.o.), wohl eher auf komplexen allosterischen Interaktionen mit verschiedenen Domänen des SUR beruht, wobei die Intaktheit der NBFs unerlässlich ist (Gribble et al., 1997). Unterschiede in der Wirksamkeit von Diazoxid bei  $K_{\text{ATP}}$ -Kanälen mit SUR1 oder SUR2A als  $\beta$ -Untereinheit könnten demnach auf unterschiedlicher Signaltransduktion der Bindung hin zur Kanalöffnung beruhen. Dies wird durch Bindungsstudien an rekombinanten SUR1 und SUR2A unterstützt, die für Diazoxid ähnliche  $K_{\text{I}}$ -Werte ergaben (Schwanstecher et al., 1998; D'Hahan et al., 1999).

## 1.6 Pharmakologische Modulation von $K_{ATP}$ -Kanälen

### 1.6.2 Kaliumkanalblocker

Eine sehr spezifische pharmakologische Eigenschaft von  $K_{ATP}$ -Kanälen ist ihre Blockade durch Sulfonylharnstoffe (SU), klassischerweise durch Glibenclamid (GBC). Weiterhin blockieren Benzamidoverbindungen wie z.B. Repaglinid (NovoNorm®, NovoNordisc®), Meglitinid oder AZ-DF 265 den Kanal. SU fördern die Insulinfreisetzung aus den  $\beta$ -Zellen des Pankreas und werden bei der Behandlung des Typ II-Diabetes mellitus (erhaltene Inselzellfunktion) breit eingesetzt. Ausser GBC gibt es eine Reihe weiterer Substanzen, die alle für die Blockade pankreatischer  $K_{ATP}$ -Kanäle entwickelt wurden (Quast, 1996b). Hierzu zählen beispielsweise Tolbutamid (TOL) bzw. Glibornurid als kurzkettige SU der 1. Generation und Glipizid bzw. Gliquidon als optimierte langkettige SU, zu welchen auch GBC gehört. Letztere besitzen zusätzlich zur klassischen SU-Gruppe eine Benzamidogruppe und stellen eine Besonderheit dar, da sie beide chemische Klassen in sich vereinen (Abb. 1.3).

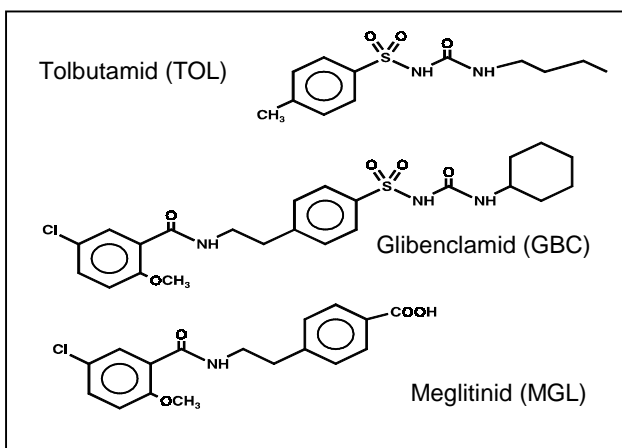


Abb. 1.3: Zusammensetzung der Hybridsubstanz GBC

Beide Strukturklassen entfalten ihre kanalhemmende Wirkung über eine Hochaffinitätsbindungsstelle auf der  $\beta$ -Untereinheit SUR; desweiteren ist eine Hemmung durch niederaffine Bindung der Substanzen an die  $\alpha$ -Untereinheit  $K_{IR6.2}$  beschrieben (Gribble et al., 1997).

Interaktion der Schliesser mit der Hochaffinitätsbindungsstelle ergibt

häufig eine unvollständige Hemmung des Kaliumstroms (Gribble et al., 1997; Dörschner et al., 1999). Mögliche Ursache ist die unvollständige Signaltransduktion von der Bindung des Schliessers am SUR bis hin zur messbaren Kanalblockade, welche mit einer Konformationsänderung der porenbildenden  $K_{IR6.x}$ -Untereinheit verbunden ist. In Ganzzellstom-Experimenten von Russ et al. (1999) wurde diese Beobachtung allerdings

## 1. Einleitung

---

nicht gemacht, so dass sie möglicherweise auf die patch-clamp-Konfiguration zurückzuführen ist.

Die verschiedenen SUR-Isoformen wurden bisher anhand ihrer unterschiedlichen Empfindlichkeit gegenüber SU in Hoch- und Niederaffinitäts-SUR unterschieden: den erstgenannten stellt der pankreatische SU1-Rezeptor dar, SUR2A und SUR2B hingegen galten traditionell als Niederaffinitäts-SUR. Neuere Untersuchungen zeigten jedoch, dass auch die SUR2-Isoformen durch GBC hochaffin gehemmt werden können (Gribble et al., 1998; Okuyama et al., 1998; Russ et al., 1999: SUR2B/K<sub>IR</sub>6.1:  $K_I = 42$  nM).

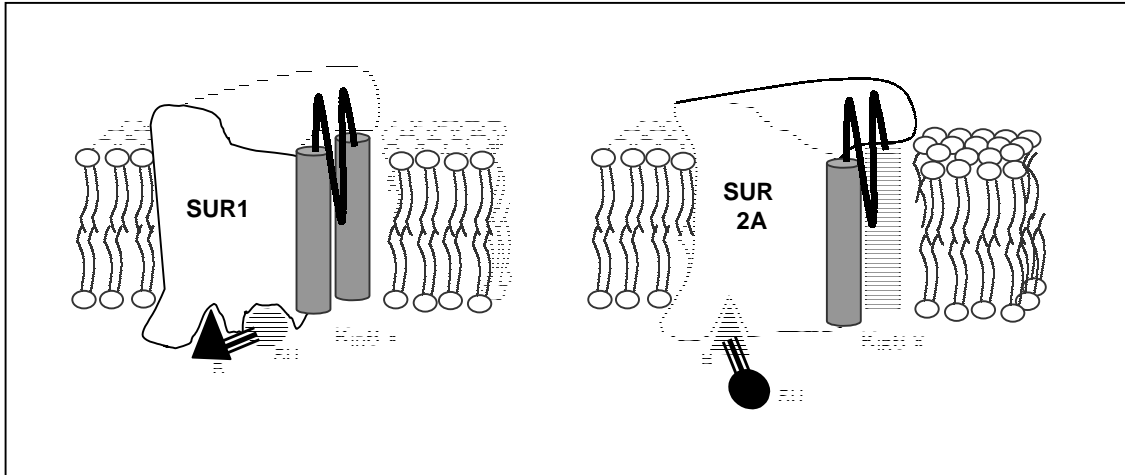
Kürzlich konnte die Bindungsstelle von Tolbutamid den TM-Segmente 14-16 des SUR1 zugeordnet werden (Ashfield et al., 1999). Im besonderen Masse scheint ein Serinrest an Position 1237, das in der intrazellulären Schleife zwischen TMS 15 und 16 liegt, an der Bindung beteiligt zu sein; seine Mutation in Tyrosin (S1237Y) hebt den hochaffinen Tolbutamidblock auf. Diese Erkenntnisse wurden durch Punktmutationen und durch Synthese von Chimären gewonnen, bei denen in beiden Richtungen verschiedene TM-Helices des Tolbutamid-unempfindlichen SUR2A durch korrespondierende TM-Segmente von SUR1 ersetzt wurden.

Weitere Bindungsexperimente mit <sup>3</sup>H-GBC zeigten, dass die Mutation S1237Y in SUR1 die hochaffine GBC-Bindung aufhebt und GBC nunmehr einen leicht auswaschbaren Kanalblock verursacht, der im Gegensatz zum im Wildtyp steht, wo eine relativ lang anhaltende Kanalinhhibition beobachtet wird. Meglitinid konnte die Ströme der Wildtypen SUR1/K<sub>IR</sub>6.2, SUR2A/K<sub>IR</sub>6.2 wie auch der S1237Y-Mutante in gleichem Masse hemmen.

Die Beobachtungen von Ashfield et al. (1999) untermauern die schon von Gribble et al. (1998) hervorgebrachte Modellvorstellung (Abb. 1.4), dass die Hybrids substanz GBC mit zwei eng benachbarten Bindungsstellen am SUR1 interagiert (und zwar einer SU- und einer Benzamid-Bindungsstelle) und somit über zwei Kontakte ein hochaffine und gleichermassen stabile Bindung ausbildet. An SUR1/K<sub>IR</sub>6.2-Kanälen wird damit ein langanhaltender Block erzeugt. Die Ablösung von GBC kann nur erfolgen, wenn sowohl die SU- (Tolbutamid) als auch die Benzamid-Hälfte (Meglitinid) des Moleküls (Abb. 1.3) gleichzeitig abdissoziieren.



## 1.6 Pharmakologische Modulation von $K_{ATP}$ -Kanälen



**Abb. 1.4: Modell der Bindungsstellen an SUR1 und SUR2A** (nach Ashfield et al., 1999). Dargestellt ist das Bindungsverhalten der Hybridsubstanz GBC, dessen Benzamidogruppe durch ein Dreieck (▲), seine Sulphonylharnstoffgruppe durch einen Kreis symbolisiert ist (●).

Da die Wahrscheinlichkeit hierfür gering ist, könnte dies der Grund für die Irreversibilität (oder zumindest sehr langsame Rückgängigkeit) der GBC-Hemmung an SUR1 sein (Ashfield et al., 1999).

Am SUR2A hingegen bindet GBC nur an eine (Benzamid-) Bindungsstelle, allerdings mit geringerer Affinität und Stabilität, was sich in einer leichter auswaschbaren Kanalhemmung äußert und die Abhängigkeit der Reversibilität der GBC-Hemmung von den Isoformen des SUR erklärt. Da sich SUR2A und SUR2B nur in den letzten 42 Aminosäuren des C-Terminus unterscheiden, ist für SUR2B ein ähnliches Modell anzunehmen. An SUR2B/ $K_{IR}6.1$  beträgt die  $IC_{50}$  für die Bindung von  $^3H$ -GBC an ganzen transfizierten HEK293-Zellen allerdings immerhin noch ca. 6 nM, eine Kanalhemmung in Ganz-Zell-Experimenten in *voltage clamp*-Konfiguration tritt mit einer  $IC_{50}$  von ca. 42 nM auf (Russ et al., 1999; s.a. Dörschner et al., 1999).

Unterschiede in den letzten 42 AS am COOH-Ende des Moleküls, wie sie z.B. zwischen SUR2A und SUR2B bestehen, bewirkten in Untersuchungen von Dörschner et al. (1999) keine relevante Affinitätsverschiebung, weshalb sie schlossen dass der C-Terminus selbst nicht Teil der Bindungstasche für SU ist. Dem widersprechen Ergebnisse von Hambrock et al. (1999), welche in Abhängigkeit vom SUR2-Subtyp

## 1. Einleitung

---

sowohl Unterschiede in der MgADP-Abhängigkeit und der Thermodynamik der  $^3\text{H}$ -P1075-Bindung als auch in den Affinitäten für Öffner und Glibenclamid fanden.

Für die Hemmung von  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanälen durch SU ist die Intaktheit des Zytoskeletts unerlässlich (Yokoshiki et al., 1997a; Löffler-Walz und Quast, 1997). Als Ursache für die verminderte Wirksamkeit von SU bei zerstörtem Zytoskelett wird eine Konformationsänderung des SUR vermutet, die eine SU-Bindung erschwert oder gar unmöglich macht.

Obwohl die Stöchiometrie der Sulfonylharnstoffbindung an den SUR noch nicht geklärt ist, weisen Verdrängungsexperimente auf eine Bindungsstelle pro Molekül hin, entsprechend vier Bindungsstellen pro Kanal (Russ et al., 1999; Dörschner et al., 1999). Dabei ist die Frage nach der Zahl der für die Blockade des  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanals erforderlichen Schliessermoleküle nicht endgültig geklärt. Dörschner et al. (1999) gehen davon aus, dass zur Schliessung des  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanals die Bindung von einem einzigen GBC-Molekül ausreichend ist. Sie konnten zeigen, dass die Bindungskonstanten um einen Faktor 3-6 höher waren als die Hemmkonstanten des Kanalstroms und der Hillkoeffizient der Hemmkurven bei 1,2 bis 1,3 lag. Russ et al. (1999) hingegen fanden das umgekehrte und vertreten die Auffassung, dass alle vier angenommenen SU-Bindungsstellen des Kanals besetzt sein müssen, um eine Blockade zu erreichen.

Der Mechanismus der Hemmung des  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanals durch SU ist noch unverstanden. Beobachtungen von Gribble et al. (1997) und Ashfield et al. (1999) lassen Wechselwirkungen mit der Aktion von ADP und ATP an den NBFs vermuten. GBC hemmt die  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanalaktivität möglicherweise über negativ allosterische Wechselwirkungen zur Aktion von MgATP an NBF 1 (Schwanstecher et al., 1992b; Ueda et al., 1999).

Die Bindungsstelle(n) für GBC ist von der Öffnerbindungsstelle des SUR verschieden und negativ allosterisch mit ihr gekoppelt (Bray und Quast, 1992; Quast et al., 1992).

### 1.7 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde an einer aus der Rattenaorta etablierten Zelllinie (A10; ATCC CRL1476) das Bindungsverhalten verschiedener Kaliumkanalmodulatoren charakterisiert.

A10-Zellen sind eine Zelllinie, welche der Aorta thoracica der embryonalen Ratte entstammt. Sie besitzen viele der für native glatte Muskelzellen charakteristischen Eigenschaften (Kimes und Brandt, 1976). In früheren Studien fanden Holevinsky et al. (1994) funktionelle Effekte von  $K_{ATP}$ -Kanalöffnern an A10-Zellen (Blockade von  $Cl^-$ -Kanälen bzw. Hyperpolarisation von A10-Zellen sowie  $K_{ATP}$ -Kanalaktivierung in Kardiomyozyten durch den KCO P1075). Diese Beobachtungen dienten als Grundlage für die Hypothese, dass A10-Zellen auch  $K_{ATP}$ -Kanäle exprimieren. Jedoch liessen die Ergebnisse offen, ob die beobachtete Hyperpolarisation durch KCO an A10-Zellen lediglich auf die Aktivierung von  $K^+$ -Auswärtsströmen zurückzuführen ist oder ob eine (zusätzliche) Hemmung des  $Cl^-$ -Auswärtsstroms vorliegt. Russ et al. untersuchten 1997 die Pharmakologie dieser  $K_{ATP}$ -Kanäle an ganzen Zellen mittels Bindungs- und elektrophysiologischer Studien und konnten eine Mitbeteiligung von  $Cl^-$ -Kanälen ausschliessen. In der vorliegenden Arbeit sollte nun erstmals die Pharmakologie an A10-Zellmembranen untersucht werden. A10-Zellen stellten zum damaligen Zeitpunkt ein leicht zugängliche Quelle für vaskuläre  $K_{ATP}$ -Kanäle in einer Zellkultur dar. Die Möglichkeit der rekombinanten Expression der einzelnen Kanaluntereinheiten (wie später an HEK293-Zellmembranen) bestand zu dieser Zeit noch nicht.

Folglich wurden Radioligandenbindungsexperimente mit dem tritiierten KCO  $^3H$ -P1075 unternommen, welche die  $^3H$ -P1075-Bindung an A10-Zellmembranen pharmakologisch charakterisieren sollten. Ausserdem sollte durch Vergleich der an A10-Zellmembranen erhaltenen Ergebnisse mit verschiedenen früheren Studien an intakten Zellen (Russ et al. 1997; Quast et al., 1992) geklärt werden, inwieweit die  $^3H$ -P1075-Bindung vom Vorhandensein eines intakten Zytoskeletts abhängig ist.

## 1. Einleitung

---

P1075 ist ein Pinacidilanalagon, welches zu den potentesten  $K_{ATP}$ -Kanalöffnern aus der Strukturklasse der Zyanoguanidinderivate gehört (Smallwood und Steinberg, 1988) und sich aufgrund seiner hohen Spezifität für die Bindung an den SUR2-enhaltenden  $K_{ATP}$ -Kanal zu dessen Charakterisierung eignet (Bray und Quast, 1992; Quast et al., 1992; Manley et al., 1993).

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden, ebenfalls mittels Radioligandenbindungsstudien mit dem  $K_{ATP}$  Kanalöffner  $^3H$ -P1075, an einer Membranpräparation aus SUR2B/ $K_{IR6.1}$ -transfizierten HEK293-Zellen neuartige Blocker des vaskulären  $K_{ATP}$ -Kanals gesucht. Vaskuläre  $K_{ATP}$ -Kanäle sind an der Regulation der Reninsekretion aus den in der Tunica media des Vas afferens liegenden juxtaglomerulären Zellen beteiligt. Blocker des vaskulären Kanals senken die Reninsekretion (1.4), indem sie eine Schliessung des Kanals mit nachfolgender Depolarisation der Zelle bewirken. Über mehrere Schritte zieht eine Senkung der Reninsekretion eine Relaxation des glatten Gefässmuskels nach sich, womit im Herz-Kreislauf-System Vor- und Nachlast gesenkt werden. Dieses Prinzip könnte nach Auffindung geeigneter Blocker zur Blutdrucksenkung bei renaler Hypertonie ausgenutzt werden.

Aus Gründen der Selektivität wurde dabei nicht an der porenbildenden Untereinheit des Kanals ( $K_{IR6.1}$ ), sondern an der Steueruntereinheit (SUR2B) angesetzt, welche in HEK293-Zellen (human embrional kidney cells) nach Transfektion mit muriner SUR2B-cDNA permanent exprimiert wurde (2.5.1).

Bis auf Phloxin B sind alle eingesetzten Testsubstanzen etablierte Liganden an  $P_2$ -Rezeptoren (Ralevic und Burnstock, 1998). Diese Rezeptoren gehören zur übergeordneten Gruppe der Purin- bzw. Pyrimidinrezeptoren und werden in ligandengesteuerte Ionenkanäle ( $P_{2X}$ -Rezeptoren) und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren ( $P_{2Y}$ -Rezeptoren) unterschieden. Diadenosinpolyphosphate sowie ATP, ADP, UTP und UDP sind endogene Agonisten an  $P_2$ -Rezeptoren. Hieraus wurde die Hypothese abgeleitet, dass die Testsubstanzen, welche am  $P_2$ -Rezeptor mit der ATP-Bindungsstelle

interagieren, auch am  $K_{ATP}$ -Kanal über eine Interaktion mit dem SUR (z.B. über dessen NBFs) Wirkung zeigen könnten.

Frühere Untersuchungen am CFTR (Steueruntereinheit des epithelialen Kaliumkanals) ergaben weiterhin, dass mit anionischen Verbindungen wie Phloxin B, Suramin ( $P_2$ -Rezeptorantagonist) die Potenz des bisher stärksten beschriebenen CFTR-Blockers, Glibenclamid ( $K_i \approx 20\text{-}50 \mu\text{M}$ ), um wenigstens einen Faktor 20 übertroffen wird (Bachmann et al., 1999). Am  $K_{ATP}$ -Kanal der pankreatischen  $\beta$ -Zelle wirkt Phloxin B kompetitiv zu Glibenclamid, d.h. beide Substanzen greifen an derselben Bindungsstelle, an (Schwanstecher et al., 1998).

DIDS ( $P_2$ -Rezeptorantagonist), eine Substanz aus der Klasse der Stilbendisulfonate, wurde bekannt als Hemmer des Anionen-Transportes und als Anionen- $(\text{Cl}^-)$ -Kanalblocker (Maddy, 1964; Frölich, 1982; Woll et al., 1987; Kokubun et al., 1991; Groschner und Kukovetz, 1992). Seine Eigenschaften ähneln denen der Sulfonylharnstoffe aufgrund ihrer chemischen Struktur, denn beide Substanzgruppen besitzen Benzolringe und sulfonierte Reste und sind somit negativ geladen (Cabantchik et al., 1978). Diese Tatsache veranlasste Furuwaka et al. (1993) mittels Patch-Clamp zu untersuchen, ob Stilbendisulfonate mit dem  $K_{ATP}$ -Kanal interagieren. Dabei wurde DIDS als Blocker des  $K_{ATP}$ -Kanals erkannt. Jedoch wurde die Substanz bisher noch nicht in Bindungsstudien am  $K_{ATP}$ -Kanal untersucht.

Diadenosinpolyphosphate (endogene Agonisten an  $P_2$ -Rezeptoren, s.o.) stellen eine endogene Stoffklasse dar, welche strukturelle Ähnlichkeiten mit ATP aufweist und aufgrund dieser Ähnlichkeit eventuell ebenso die  $K_{ATP}$ -Kanal-Aktivität modulieren könnte. Tatsächlich fanden Jovanovic et al. 1996 mittels Patch-Clamp in  $\text{AP}_5\text{A}$  einen potenten Antagonisten der  $K_{ATP}$ -Kanal-Aktivität.

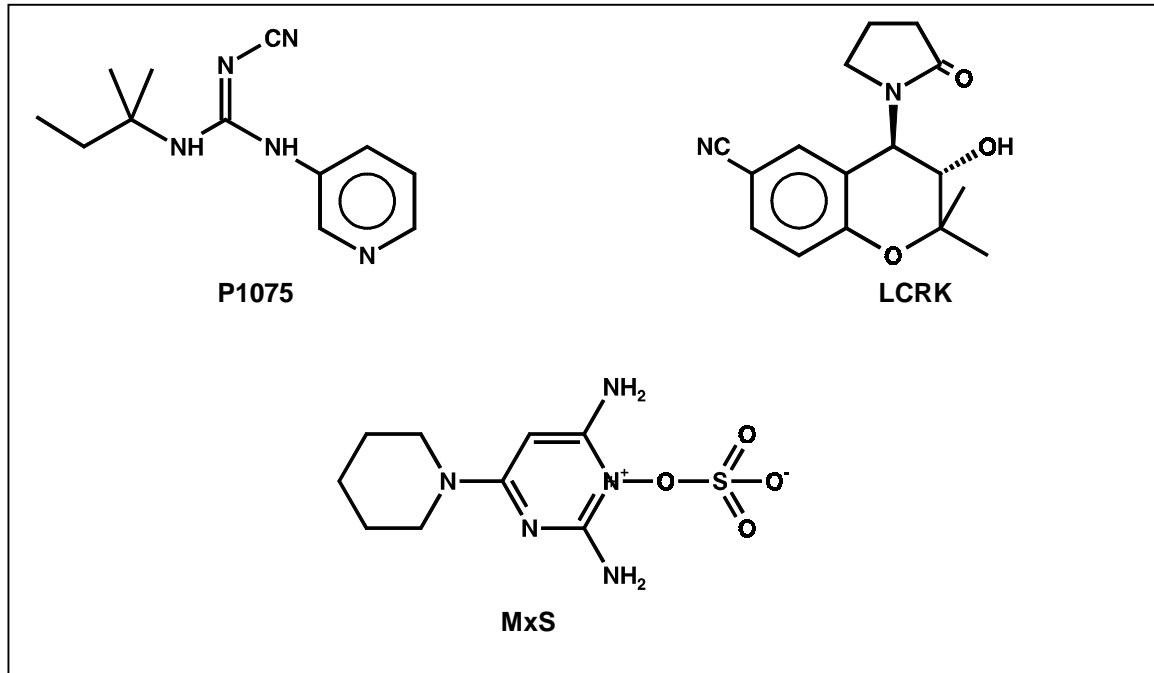
Die übrigen Testsubstanzen wurden entweder aufgrund ihrer strukturellen Verwandtschaft mit ATP (TNP-ATP,  $\beta\gamma$ -Methylen-ATP (zudem  $P_{2X}$ -Rezeptor-Agonist)) oder aufgrund ihrer Eigenschaft als  $P_2$ -Rezeptorantagonist ausgewählt: Reactive Red 2 (kompetitiv), Evans Blue, Cibacron Blue (Synonym: Reactive Blue; nicht-kompetitiv), PPADS (nicht-selektiv); (Ralevic und Burnstock, 1998).

## 1. Einleitung

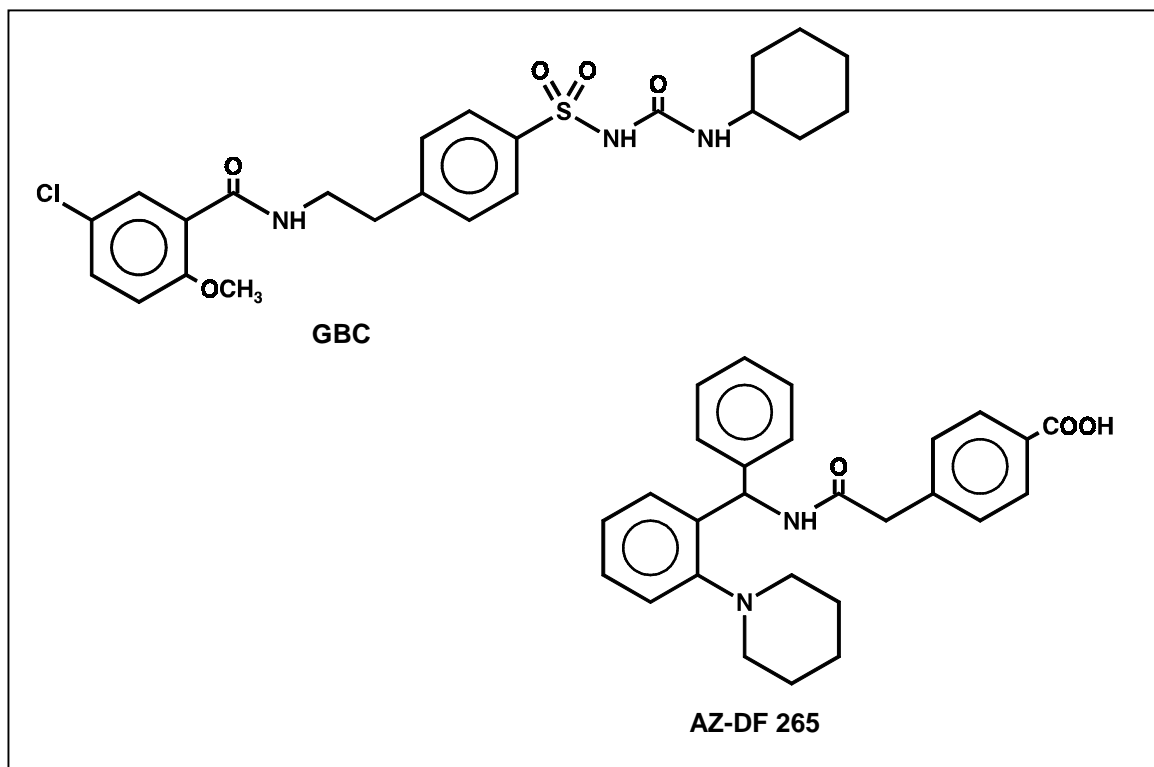
---

### 1.8 Strukturformeln

#### 1.8.1 $K_{ATP}$ -Kanalöffner

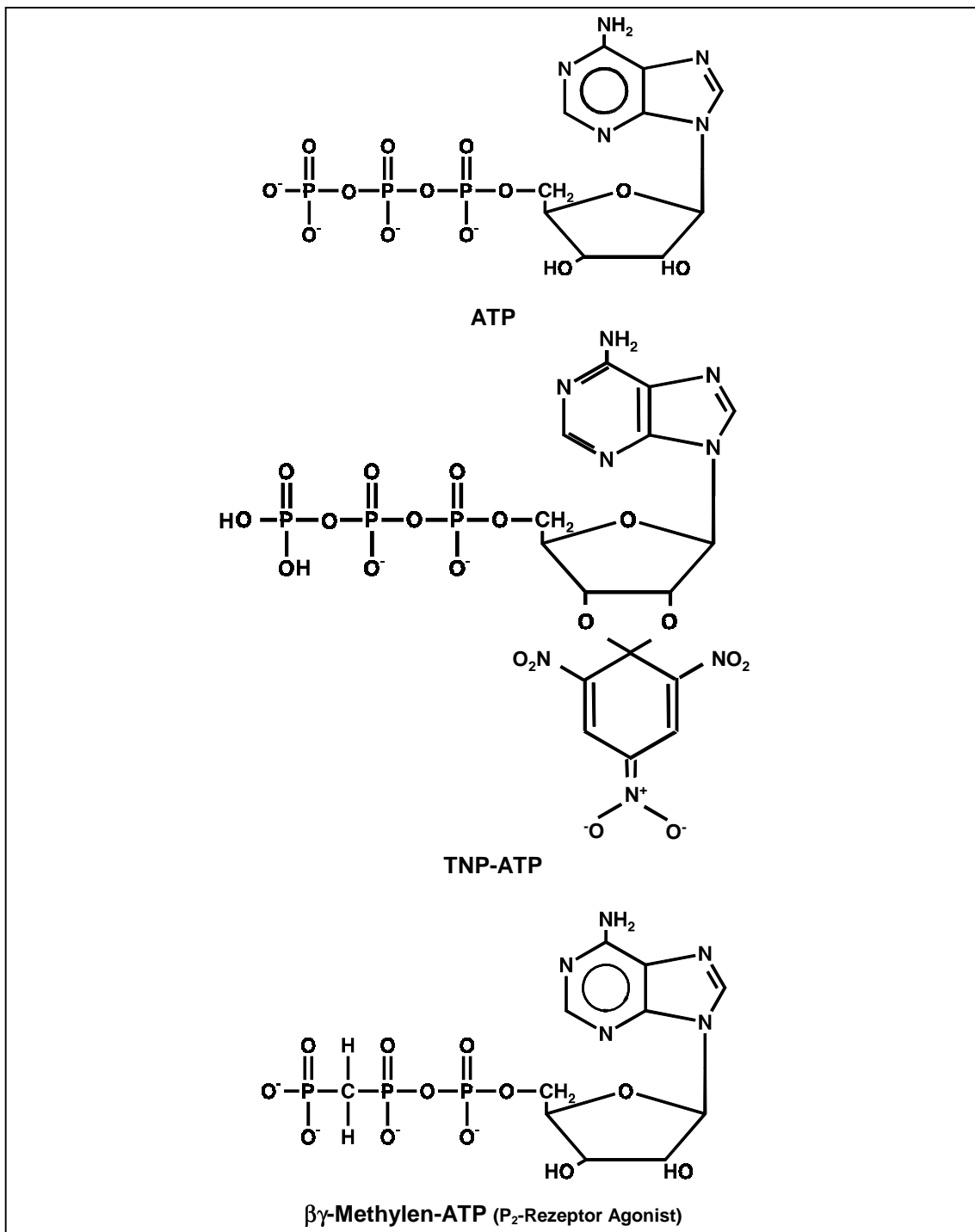


#### 1.8.2 $K_{ATP}$ -Kanalschliesser

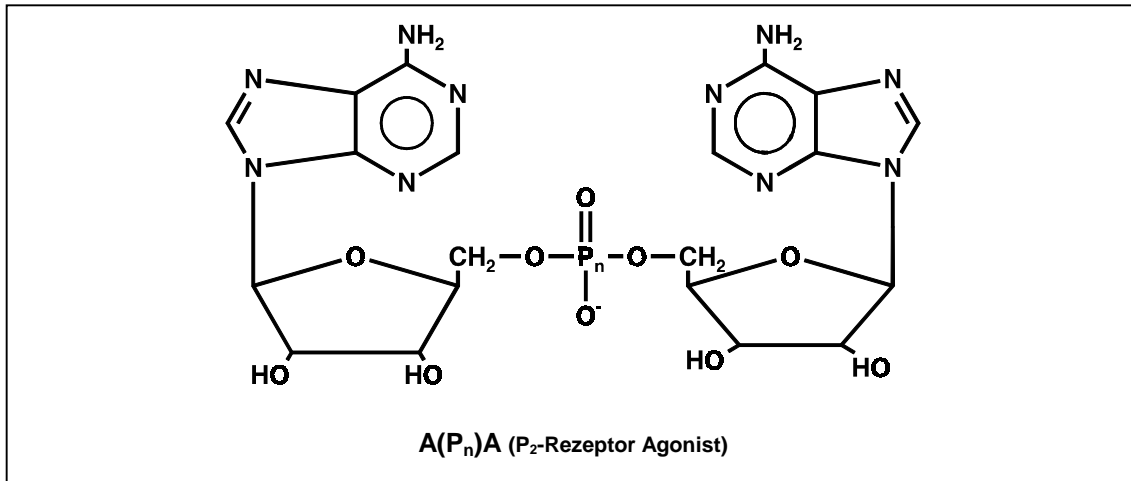


1.8.3 Testsubstanzen

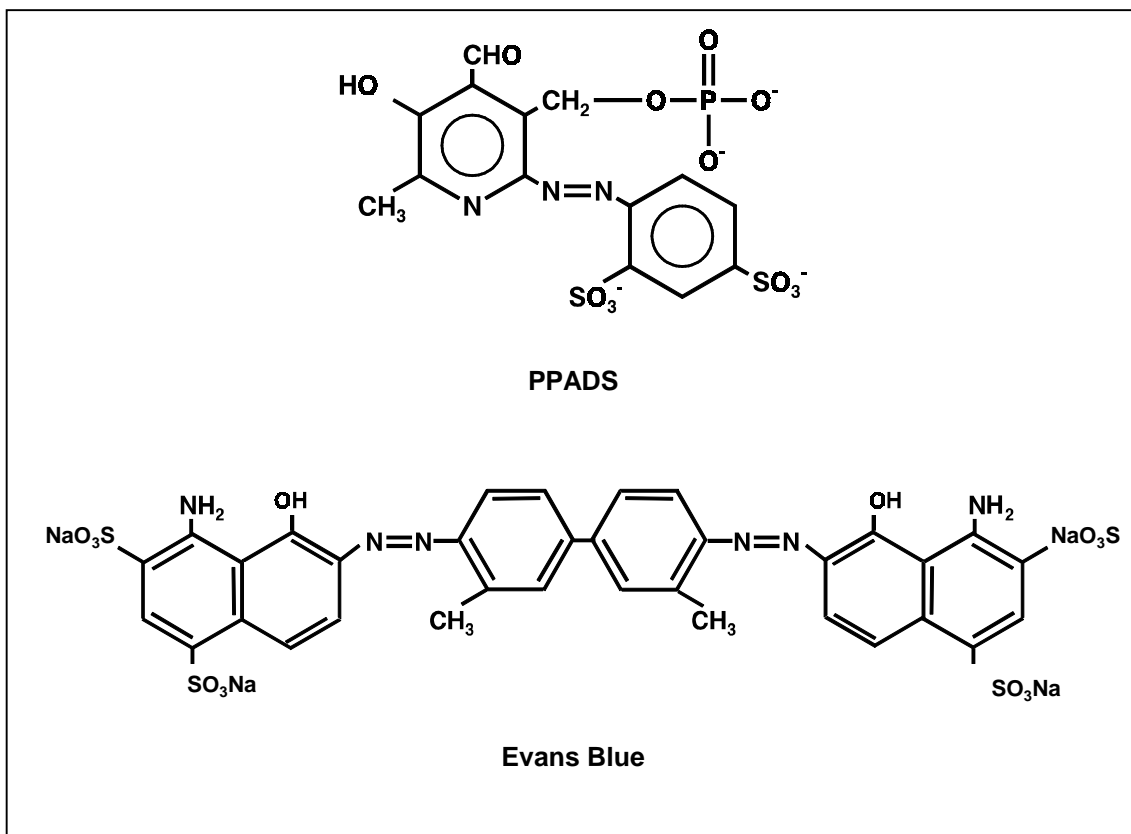
1.8.3.1 Strukturähnlichkeit mit ATP



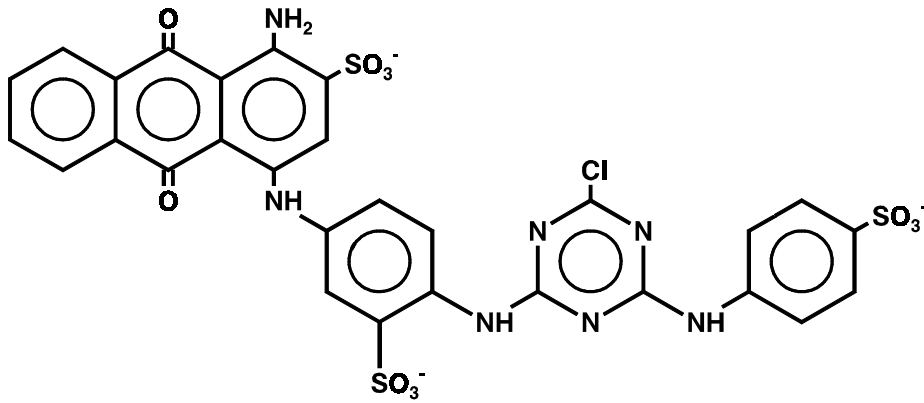
## 1. Einleitung



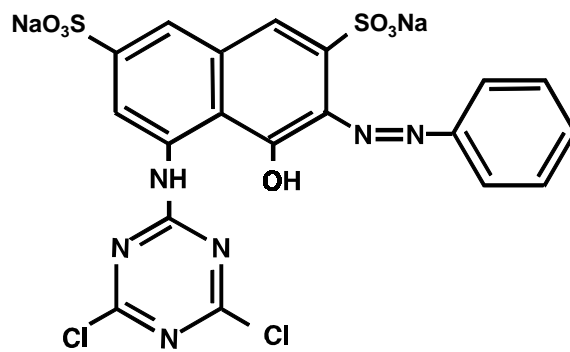
### 1.8.3.2 P<sub>2</sub>-Rezeptor Antagonisten



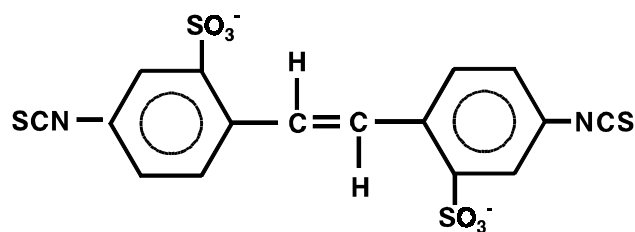




Cibacron Blue



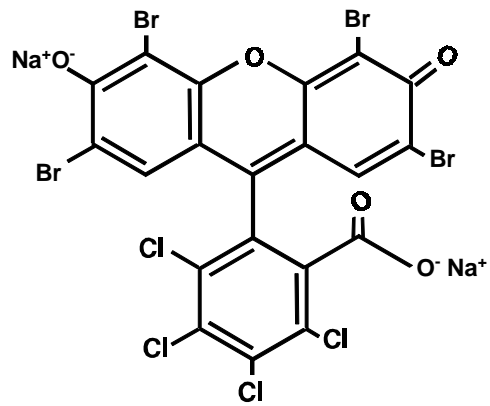
Reactive Red 2



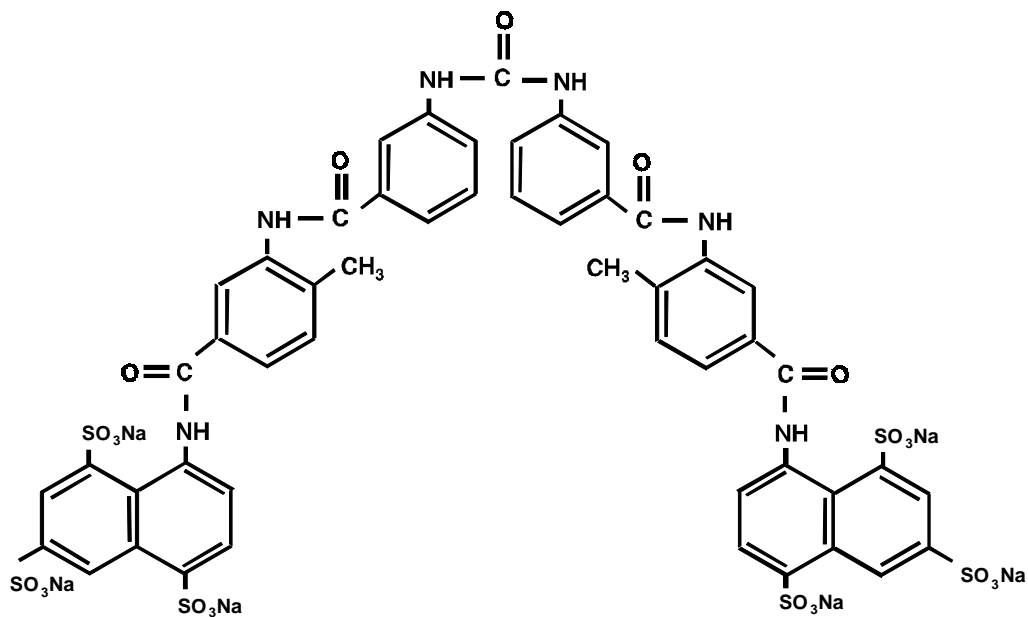
DIDS

## 1. Einleitung

### 1.8.3.3 CFTR-Blocker



Phloxin B



Suramin ( $\text{P}_2$ -Rezeptor-Antagonist)

---

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien

Zur Herstellung von Konzentrationsreihen wurden von den Substanzen zunächst Stammlösungen in Konzentrationen von 10, 20 oder 100 mM hergestellt. Als Lösungsmittel wurde Inkubationspuffer, Ethanol/DMSO (1:1) oder DMSO verwendet. Für die weitere Verdünnung der jeweiligen Stammlösung wurden dieselben Lösungsmittel verwendet, wobei die Lösungsmittelendkonzentration unter 0,5 % (v/v) lag. Die Aufbewahrung der Stammlösungen erfolgte bei – 30 °C für maximal 3 Monate.

AP <sub>2</sub> A	720,40	g/mol	Sigma
AP <sub>3</sub> A	752,40	g/mol	Sigma
AP <sub>4</sub> A	832,40	g/mol	Sigma
AP <sub>5</sub> A	1098,3	g/mol	Fluka
ATP-Na <sub>2</sub>	551,10	g/mol	Fluka
	605,20	g/mol	Boehringer Mannheim
Atropin	676,80	g/mol	Sigma
AZ-DF 265	428,00	g/mol	Thomae
βγ-Methylen-ATP	542,90	g/mol	Sigma
BSA	≈67.000	g/mol	Fluka
CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	147,02	g/mol	Merck
Cibacron Blue	794,2	g/mol	Sigma
Creatinphosphat-Na <sub>2</sub> * 1 H <sub>2</sub> O	255,10	g/mol	Sigma
Creatinphosphokinase (CK)	310	u/mg	Sigma
CuSO <sub>4</sub>	159,60	g/mol	Merck
DIDS	498,5	g/mol	Sigma
DMEM + Glc 4,5 g/dl + L-Gln	500	ml	Biowhitaker/Serva
DMSO	1	l	Merck
Ethanol 99% p.a.	500	ml	Merck

## 2. Material und Methoden

---

Evans Blue	960,82	g/mol	Tocris
FCS	500	ml	Gibco
Folin-Ciocalteu-Reagenz (2 M)	100	ml	Fluka
Foridon	367,00	g/mol	Testsubstanz Universität Köln
Geneticinsulfat	692,70	g/mol	GibcoBRL–Life Technologies
Gentamycin	50	mg/ml	GibcoBRL–Life Technologies
Glibenclamid	494,00	g/mol	Sigma
<sup>3</sup> H-Glibenclamid	SA 47	Ci/mmol	Dupont/NEN
D(+)-Glucose * 1 H <sub>2</sub> O	198,17	g/mol	Merck
HEPES	238,30	g/mol	Sigma
HCl	33	%	Merck
	25	%	Fluka
KCl	74,56	g/mol	Merck
K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> -Tartrat	282,23	g/mol	Merck
Levcromakalim	286,30	g/mol	SmithKline-Beecham
MEM + L-Gln + Earle's Salze	500	ml	GibcoBRL–Life Technologies
MgCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	203,3	g/mol	Merck
Minoxidilsulfat	289,00	g/mol	Sandoz
MOPS	209,30	g/mol	Sigma
NaCl	58,44	g/mol	Merck
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	105,99	g/mol	Merck
Na <sub>2</sub> -EDTA	372,24	g/mol	Fluka
Na <sub>2</sub> -EGTA	380,40	g/mol	Sigma
NaOH	40,00	g/mol	Merck
Penicillin	10.000	units/ml	Boehringer Mannheim
Pepstatin A	685,9	g/mol	Sigma

## 2.1 Chemikalien

---

PBS	500	ml	Biowhitaker/Serva
PF 5	310,00	g/mol	Testsubstanz Universität Köln
Phenylmethylsulfonylfluorid	174,20	g/mol	Fluka
Phloxin B	829,66	g/mol	Fluka
Pinacidil	245,33	g/mol	Sandoz
PPADS	725,42	g/mol	Tocris
P1075	231,30	g/mol	Leo Pharmaceuticals
<sup>3</sup> H-P1075	SA ≈ 120	Ci/mmol	Amersham Buchler
QNB	337,00	g/mol	RBI/Biotrend
<sup>3</sup> H-QNB	SA 44	Ci/mmol	RBI/Biotrend
Reactive Red 2	615,3	g/mol	Sigma
STI	10.000	units/mg	Sigma
Streptomycin	10.000	µg/ml	Boehringer Mannheim
Suramin	1429,2	g/mol	Sigma
TNP-ATP	782,2	g/mol	Molecular Probes
TRIS	121,14	g/mol	Fluka
Trypsin/EDTA	0,5 / 0,2	%	Biowhitaker/Serva
Ukraine 1	410,00	g/mol	Testsubstanz Universität Köln
Ukraine 3	533,00	g/mol	Testsubstanz Universität Köln
Ukraine 4	501,00	g/mol	Testsubstanz Universität Köln
Ultima Gold	2,5	l	Packard

## 2. Material und Methoden

---

### 2.2 Puffer und Medien

Alle Puffer wurden im Kühlraum (6 °C) gelagert. Die Puffer, die bei den Bindungsversuchen mit Rattenherzmembranen verwendet wurden, sind in dem jeweiligen Kapitel in Anhang A bzw. B aufgeführt.

#### ***Puffer 1***

*Hypotoner Puffer für die Präparation von A10-Zellmembranen*

- a. 10 mM HEPES  
1 mM EGTA
- b. 5 mM MOPS  
1 mM EGTA

Die Substanzen wurden in a. demin. gelöst und die Lösung im Kühlraum (6 °C) über Nacht abgekühlt. Der pH-Wert wurde anschließend auf Eis mit NaOH (1 M) auf 7,4 eingestellt.

#### ***Puffer 2***

*Isotoner Bindungspuffer für A10-Zellmembranen*

Die in früheren Experimenten an Rattenherzmembranen (s. Anhang A) etablierte Verwendung von HEPES als Puffersubstanz in Experimenten mit Membranen wurde auf MOPS umgestellt, nachdem sich bei der Proteinbestimmung eine Interferenz mit HEPES herausgestellt hatte (2.3).

- a. 10 mM HEPES  
139 mM NaCl  
5 mM KCl  
1,2 mM MgCl<sub>2</sub>
- b. 5 mM MOPS  
139 mM NaCl  
5 mM KCl

Diesem Puffer wurde zunächst im Inkubationsansatz

1,2 mM MgCl<sub>2</sub>

1 mM Na<sub>2</sub>ATP

zugefügt, nach Optimierung jedoch stets

3,8 mM MgCl<sub>2</sub>

3 mM Na<sub>2</sub>ATP.

Von Puffer 2a bzw. 2b wurden jeweils zwei Lösungen hergestellt, jeweils einmal mit pH 7,4 bei 0 °C und einmal mit pH 7,4 bei 37 °C.

Die Substanzen wurden in a. demin. gelöst, entweder im Kühlraum (6 °C) über Nacht abgekühlt oder im Wasserbad (37 °C) erwärmt und der pH-Wert bei 0 °C (auf Eis) oder bei 37 °C mit NaOH (1 M) auf 7,4 eingestellt.

### ***Puffer 3***

*Hypotoner Puffer für die Präparation von HEK293-Zellmembranen*

10 mM HEPES

1 mM EGTA

Die Substanzen wurden in a. demin. gelöst und die Lösung im Kühlraum (6 °C) über Nacht abgekühlt. Der pH-Wert wurde anschließend auf Eis mit NaOH auf 7,4 eingestellt.

### ***Puffer 4***

*Isotoner Bindungspuffer für HEK293-Zellmembranen*

5 mM HEPES

139 mM NaCl

5 mM KCl

Diesem Puffer wurde im Inkubationsansatz

3,8 mM MgCl<sub>2</sub>

3 mM Na<sub>2</sub>ATP

zugefügt.

## 2. Material und Methoden

---

Von Puffer 4 wurden zwei Lösungen hergestellt, eine mit pH 7,4 bei 0 °C und eine mit pH 7,4 bei 37 °C. Die Substanzen wurden in a. demin. gelöst, entweder im Kühlraum (6 °C) über Nacht abgekühlt oder im Wasserbad (37 °C) erwärmt und der pH-Wert bei 0 °C (auf Eis) oder bei 37 °C mit NaOH (1 M) auf 7,4 eingestellt.

### ***Puffer 5***

#### *Inkubationspuffer für Ganzzellversuche*

5 mM	HEPES
139 mM	NaCl
5 mM	KCl
1,2 mM	MgCl <sub>2</sub>

Die Substanzen wurden in a. demin. gelöst, und die Lösung im Kühlraum (6 °C) gelagert. Vor jedem Ganzzellversuch wurden 80 ml entnommen und für 40 Min. im Wasserbad bei 37 °C mit Carbogen (95 % O<sub>2</sub>/5 % CO<sub>2</sub>) begast. Nach Einstellung des pH auf 7,4 wurden

11 mM	D (+) - Glucose	sowie
1,25 M	CaCl <sub>2</sub>	

hinzugegeben. Der Puffer wurde bis zum Beginn der Inkubation weiter begast.

### ***Puffer 6***

#### *Puffer zur Herstellung von Geneticin–Stammlösungen*

100 mM	HEPES
--------	-------

Die Substanz wurde in a. demin. gelöst, und der pH-Wert bei RT mit NaOH (1 M) auf 7,4 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung bei 4 bar und 121 °C für eine Stunde autoklaviert.

### ***Waschpuffer***

#### *Verdünnung der Bindungsansätze vor der Filtration*

Tris	50 mM
NaCl	154 mM

Als Lösungsmittel für die Substanzen diente a. demin. Es wurde eine zehnfach



konzentrierte Stammlösung angesetzt, die zur Herstellung des Waschpuffers 1:10 verdünnt wurde. Vor der pH-Einstellung wurde die Lösung über Nacht im Kühlraum (6 °C) abgekühlt. Die Einstellung erfolgte auf Eis (0–4 °C) mit HCl auf pH 7,4.

### ***Hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum (FCS)***

#### *Serumzusatz zum Zellkulturmedium*

Für die Kultivierung der HEK293-Zellen wurde dem Kulturmedium hitzeinaktiviertes FCS zugesetzt, welches zum Wachstum der Zellen erforderliche mitogene Faktoren enthält.

Die Hitzeinaktivierung wurde durchgeführt, um eventuelle Restaktivitäten von Serumproteasen zu unterbinden. Dazu wurde die bis dahin bei –30 °C aufbewahrte 500 ml-Flasche aufgetaut und im Wasserbad (55 °C) für 30 Min. hitzeinaktiviert. Danach wurde die Flasche bis zu ihrer jeweiligen Verwendung im Kühlschrank aufbewahrt.

### ***Kulturmedium 1***

#### *Kulturmedium für die A10-Zelllinie*

DMEM	80 %
hitzeinaktiviertes FCS	20 %
Penicillin	100 units/ml
Streptomycin	100 µg/ml

Es wurde jeweils eine Flasche DMEM (500 ml) frisch angesetzt und bis zur Verwendung im Kühlschrank aufbewahrt. Zur Verwendung wurde es im Wasserbad auf 37 °C erwärmt.

### ***Gefriermedium 1***

#### *Kryokonservierung von A10-Zellen*

DMEM	60 %
hitzeinaktiviertes FCS	20 %
DMSO	20 %

Jeweils frisch angesetzt und auf Eis (0–4 °C) verwendet.

## 2. Material und Methoden

---

### ***Trypsin/EDTA-Lösung***

*Ablösen der A10-Zellen von den Kulturschalen*

Trypsin	0,15 %
EDTA	0,06 %

Aus den Stammlösungen wurden entsprechend verdünnte Aliquots hergestellt (in Dulbecco's PBS, Biowhitaker), die bis zu ihrer Verwendung bei  $-20\text{ °C}$  aufbewahrt wurden.

### ***Kulturmedium 2***

*Kulturmedium für die HEK293-Zelllinie*

MEM (Minimum Essential Medium)	90 % (v/v)
hitzeinaktiviertes FCS	10 % (v/v)
Gentamycin	20 $\mu\text{g/ml}$

Es wurde jeweils eine Flasche MEM (500 ml) frisch angesetzt und bis zur Verwendung im Kühlschrank aufbewahrt. Gentamycin wurde in 6 ml - Stammlösungen angesetzt ( $c = 2\text{ mg/ml}$ ), bei  $-20\text{ °C}$  aufbewahrt und bei der Herstellung des Kulturmediums zugegeben. Zur Verwendung wurde es im Wasserbad auf  $37\text{ °C}$  erwärmt.

### ***Gefriermedium 2***

*Kryokonservierung von HEK293-Zellen*

Jeweils frisch angesetzt:

<i>Gefriermedium 2A</i>	MEM + 40 % (v/v) FCS
<i>Gefriermedium 2B</i>	MEM + 20 % (v/v) DMSO

Nach Zugabe von gleichen Anteilen aus Gefriermedium A und B wurden die Zellen in einer Endkonzentration von 20 % FCS, 10 % DMSO in MEM eingefroren.

### ***Geneticin***

Zur Selektion derjenigen transfizierten HEK293-Zellen, die das Plasmid mit der cDNA der jeweiligen Untereinheit des  $K_{ATP}$ -Kanals ( $K_{IR6.1}$ , SUR2A oder SUR2B), aufgenommen haben, wurde Geneticin, ein Aminoglykosid-Antibiotikum mit toxischen Wirkungen auch auf eukaryontische Zellen, zugegeben.

30 mg/ml Geneticinsulfat

Die Substanz wurde in sterilem Puffer 6 gelöst, in 1 ml-Reaktionsgefäße aliquotiert und im Kühlschrank bei  $-20\text{ °C}$  aufbewahrt.

### ***Stammlösungen für die Proteinbestimmung***

#### **Lowry A:**

2 % (w/v)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  in NaOH (0,1 M)

#### **Lowry B:**

1 % (w/v)  $\text{CuSO}_4$  in a. demin.

#### **Lowry C:**

2 % (w/v)  $\text{K}^+/\text{Na}^+$ -Tartrat in a. demin.

#### **Lowry D:**

Folin-Ciocalteu-Reagenz (2 M)

Lowry A - C wurden als Stammlösungen hergestellt und bei RT aufbewahrt. Lowry D wurde fertig erworben.

#### **Lowry E:**

Lowry A	98 Teile
Lowry C	1 Teil
Lowry B	1 Teil

#### **Lowry F:**

Lowry D	1 Teil
a. demin.	1 Teil

Lowry E und F wurden für jede Proteinbestimmung frisch angesetzt.

## 2. Material und Methoden

---

### 2.3 Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde nach Lowry et al. (1951) durchgeführt. Membranen, Homogenate, ganze Zellen bzw. der Puffer, in welchem das Protein gelöst war, wurden in NaOH (0,1 M) verdünnt, so daß die Proteinkonzentration im linearen Bereich der Standardmeßkurve bestimmt werden konnte.

Die Standardmeßkurve wurde zuvor mit Rinderserumalbumin (BSA) erstellt, das in verschiedenen Konzentrationen in NaOH (0,1 M) gelöst wurde. Die Konzentrationsreihe mit BSA wurde als Eichgerade aufgetragen. Es konnte festgestellt werden, daß die Puffersubstanz HEPES mit der Proteinbestimmung erheblich interferiert. MOPS-Puffer zeigte ebenfalls eine Reaktion, sie war allerdings viel schwächer ausgeprägt. Der Grund hierfür liegt in der chemischen Struktur dieser Puffersubstanzen mit ihren freien Stickstoffgruppen. Für HEPES wurde auch eine Extinktionskurve bei verschiedenen Konzentrationen in NaOH (0,1 M) erstellt (Abb. 2.1, Einschub).

Die Proteinbestimmung erfolgte in Halbmikroküvetten. Zu jeweils 200 µl verdünntem Protein oder Puffer bzw. NaOH (0,1 M) beim Leerwert wurde zunächst 1 ml Lowry E gegeben und nach 5 Min. Inkubationsdauer zusätzlich 100 µl Lowry F.

Die nun in der Küvette vorliegende Lösung wurde danach mit einem dünnen Spatel gut durchgemischt und bei RT für 20 Min. inkubiert.

In einem Spektralphotometer (HITACHI U-3.000) wurde sodann die Messung der Proteinkonzentration durchgeführt. Die Wellenlänge der Wolfram-Lampe betrug dabei 770 nm bei einer Spaltbreite von 5 nm. Die optische Dichte ( $OD_{770}$ ) der jeweiligen Probe und des Puffers wurde gegen die des Leerwertes gemessen.

Die  $OD_{770}$  lag bis zu einer Proteinkonzentration von ca. 30 µg (in der Küvette) unter 0,3 und zeigte eine lineare Abhängigkeit (Abb. 2.1) wie auch der anfängliche Kurvenverlauf mit der Puffersubstanz HEPES (Abb. 2.1, Einschub) Die zur Berechnung der Proteinkonzentration gebildete Differenz zwischen der Extinktion des Proteins und der des Puffers war somit ebenfalls linear.

## 2.3 Proteinbestimmung

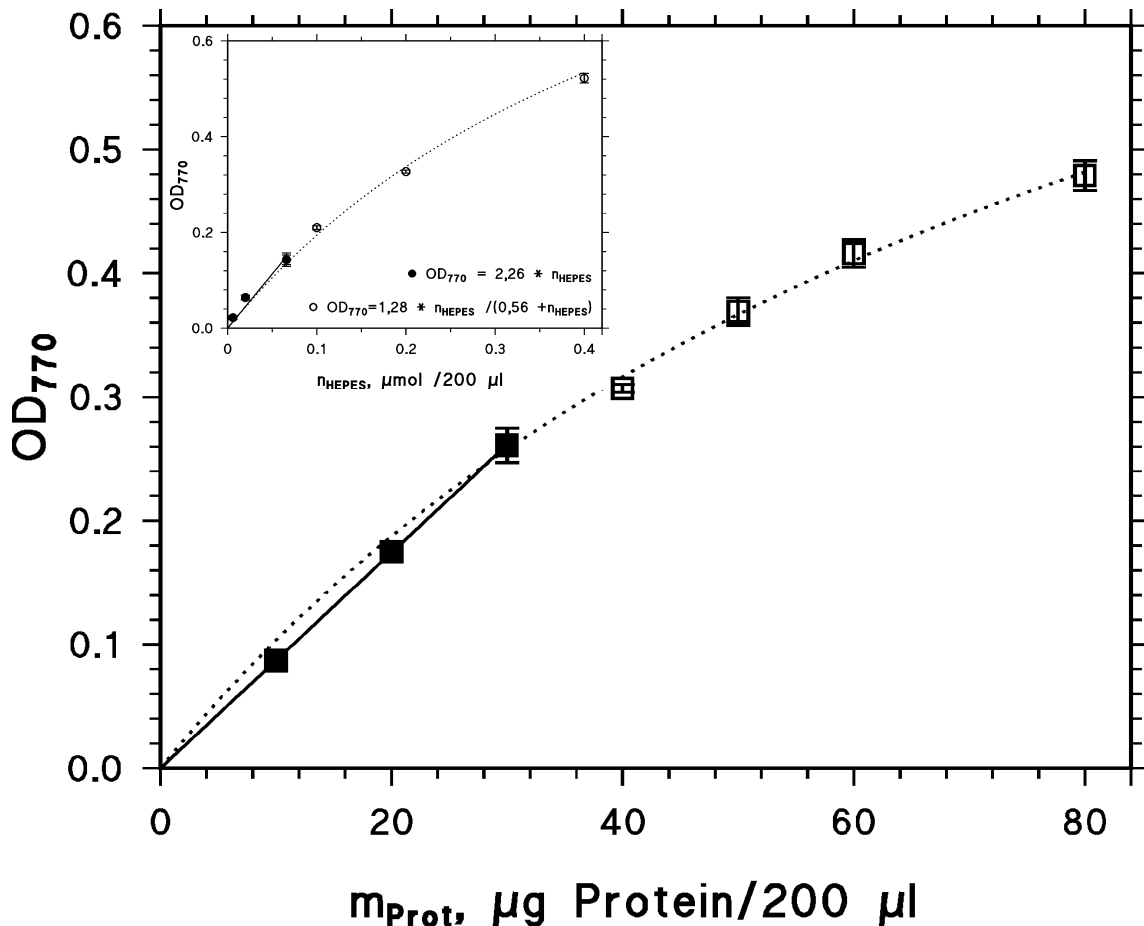
Bei Proteinextinktionen unter 0,3 konnte die Funktion der Eichgeraden angewendet werden:

$$OD_{770} = 0,0087 \cdot m_{Prot} \quad \text{bzw.} \quad m_{Prot} = \frac{OD_{770}}{0,0087} \quad (\text{Gl. 1a bzw. 1b})$$

wobei  $m_{Prot}$  die Proteinmenge in der Küvette in  $\mu\text{g}$  und  $OD_{770}$  die Proteinextinktion bzw. Differenzextinktion (Protein-Puffer) bezeichnet.

Bei Überschreiten des linearen Bereichs wurde die Proteinmenge nach der Sättigungsfunktion (gestrichelte Linie) extrapoliert:

$$OD_{770} = 1,11 \cdot \frac{m_{Prot}}{102,30 + m_{Prot}} \quad \text{bzw.} \quad m_{Prot} = 102,30 \cdot \frac{OD_{770}}{1,11 - OD_{770}} \quad (\text{Gl. 2a bzw. 2b})$$



**Abb. 2.1: Eichkurve für Proteinbestimmung nach Lowry.** Die Daten sind Mittelwerte aus 5-9 Einzelbestimmungen aus zwei Experimenten  $\pm$  SEM. Die durchgezogene Linie (-) gibt den linearen Bereich bis  $30 \mu\text{g}$  Protein wieder; bei Berücksichtigung aller Meßpunkte erhält man eine Sättigungsfunktion (gestrichelt,  $\square$ ) *Einschub*: Einfluß der Puffersubstanz HEPES auf die Extinktion. Die Daten sind Mittelwerte aus 3-5 Einzelbestimmungen aus einem Experiment  $\pm$  SEM. Linearer Bereich bis  $0,1 \mu\text{mol}/200 \mu\text{l}$ .

## 2. Material und Methoden

---

### 2.4 Kultivierung von A10-Zellen

Die A10-Zelllinie stammt aus der Aorta thoracica der embryonalen Ratte, es handelt sich um eine transformierte glatte Muskelzelle, die die Kontraktilität verloren hat, aber einige Rezeptoren und Kanäle exprimiert, darunter den  $K_{ATP}$ -Kanal. Die Zelllinie wurde von der „American Type Culture Collection“ (ATCC CRL1476) erworben. Zur Kultivierung der Zellen wurden jeweils 10 ml flüssiges Kulturmedium 1 zu den Zellen in eine Petrischale (Fa. PRIMARIA) aus Plastik mit 9,4 cm Durchmesser gegeben. Die Temperatur im Brutschrank mit hoher Luftfeuchtigkeit sowie einem Verhältnis von 95 % Luft zu 5 %  $CO_2$  betrug 37 °C. Alle 3-4 Tage wurde ein Medienwechsel durchgeführt. Sobald die Zellen eine Konfluenz von 80-100 % (ca. 1-1,5 Millionen Zellen) erreicht hatten, wurden sie passagiert (1:2 - 1:6). Dabei wurde zunächst das Medium (Kulturmedium 1) abgesaugt und die Zellen mit 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung für 5-10 Min. bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, so daß sie sich von der Schalenoberfläche ablösten. Die Zellen wurden dann mit der Pipette mit 3 ml Medium 1 abgespült und in ein 50 ml-Gefäß überführt. Die Aussaat der Zellen erfolgte nach Zentrifugation (500 x g, 5 Min.), Resuspension und Verdünnung in Kulturmedium 1.

#### 2.4.1 Einfrieren von A10-Zellen

Es wurden Zellen verwendet, die in Petrischalen eine Konfluenz von 70-80 % (ca. 1 Million Zellen) erreicht hatten. Sie befanden sich somit in der exponentiellen Wachstumsphase. Nach Absaugen des Mediums und Ablösen der Zellen durch Trypsinierung (s.o.) wurden die Zellen zentrifugiert (500 x g, 5 Min). Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen in einer Konzentration von ca.  $10^6$  Zellen/ml (entsprechend ca. 1 Schale) in eiskaltem Gefriermedium 1 resuspendiert. Es wurden Aliquots von 1 ml Gefriersuspension in Kryoröhrchen für 30 Min. auf Eis gestellt, anschließend für 24 Std. bei -80 °C aufbewahrt und schließlich in flüssigem Stickstoff konserviert.

### 2.4.2 Auftauen von A10-Zellen

Der Auftauvorgang wurde möglichst rasch durchgeführt, um den Kontakt der Zellen mit dem Detergens DMSO möglichst gering zu halten. In ein 50 ml-Gefäß wurden ca. 12-15 ml Kulturmedium 1 (37 °C) vorgelegt. Im Wasserbad (37 °C) wurde ein aus dem flüssigen Stickstoff entnommenes Kryoröhrchen mit  $10^6$  Zellen/ml schnell aufgetaut, bis gerade noch ein Eisstift erkennbar war. Die Zellsuspension wurde dann rasch aus dem Kryoröhrchen in das vorbereitete 50 ml-Gefäß überführt, dadurch in Medium verdünnt und bei 500 x g 5 Min. lang zentrifugiert. Der entstandene Bodensatz (aufgetaute A10-Zellen) wurde in 10 ml Kulturmedium resuspendiert, in eine Petrischale (10 cm) ausgesät und im Inkubator zur weiteren Kultivierung aufbewahrt.

### 2.4.3 Herstellung einer mikrosomalen Membranfraktion aus A10-Zellen

Alle Arbeitsschritte wurden bei 0 °C durchgeführt (Lösungen und Kulturschalen auf Eis). Die Kulturschale mit den Zellen (Konfluenz ca. 80-90 %, Zellzahl ca. 1-1,5 Millionen) wurde ca. 1-2 Min. auf Eis inkubiert, danach wurde das Medium abgesaugt. Die Zellen wurden mit 3 ml hypotonem Puffer 1 überschichtet und hierdurch osmotisch aufgebrochen. Nach ca. 30 s konnten sie mit dem Zellschaber abgeschabt und in ein Zentrifugenröhrchen überführt werden. Die Schale wurde mit weiteren 5 ml hypotonem Puffer 1 abgespült. Zentrifugiert wurde bei 100.000 x g für 60 Min. Der Überstand wurde abgesaugt, der Bodensatz in Inkubationspuffer 2 resuspendiert und kurz (3 s) im POLYTRON-Homogenisator bei 10 000 rpm homogenisiert. Nun wurde entweder sofort ein Filtrationsbindungsexperiment durchgeführt oder die Membransuspension in ein Kryoröhrchen überführt und bei -80 °C eingefroren. Nach dem Auftauen wurde die Membransuspension noch einmal homogenisiert (POLYTRON-Homogenisator, 5-8 s, 10 000 rpm).

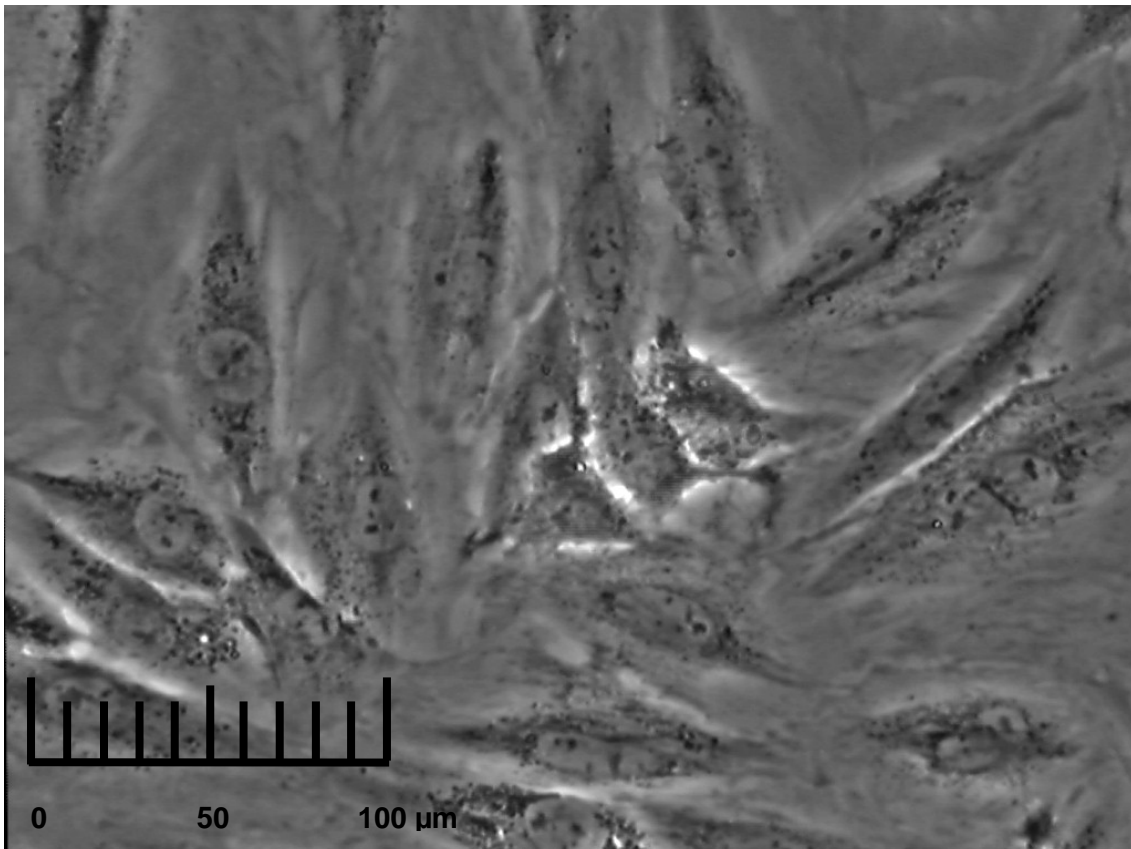
Der Proteingehalt pro Schale (ca. 1-1,5 Millionen Zellen bei einer Konfluenz von 80-90 %) betrug  $2,1 \pm 0,4$  mg Gesamtprotein, entsprechend ca. 1,3 mg Membranprotein pro  $10^6$  Zellen (s. Kap.3.1).

## 2. Material und Methoden

---

### 2.4.4 Präparation von ganzen A10-Zellen

A10-Zellen wurden bei einer Konfluenz von 80-90 % (1-1,5 Millionen Zellen pro Schale) verwendet. Die Zellen wurden im Medium 1 mit einem Zellschaber von der Schalenoberfläche abgeschabt, zunächst in 10 ml Kulturmedium 1 (37 °C) und nach Resuspension in 10 ml Inkubationspuffer 2 (37 °C) bei RT zentrifugiert (500 x g, 5 Min.). Der Bodensatz wurde wiederum in Inkubationspuffer 2 resuspendiert und die erhaltene Zellsuspension sofort **nach Bestimmung des Anteils der lebenden Zellen mittels Trypanblau** ( $(3,6 \pm 0,7 * 10^5)$  lebende Zellen pro Schale) in einem Filtrationsbindungsexperiment (2.6.1) verwendet.



**Abb. 2.2: Lichtmikroskopische Darstellung von A10-Zellen** mit der für sie typischen länglichen Form. Die Abbildung entstand in 20-facher Vergrößerung im Differenz-Interferenz-Kontrastmodus.



### 2.5 Kultivierung von HEK293-Zellen

Die HEK293-Zelllinie stammt aus menschlichen embryonalen Nierenzellen (Human Embryonal Kidney Cells), die durch den DNA-haltigen Adenovirus Typ 5 tumorös transformiert und dadurch immortalisiert waren (Graham et al., 1977).

Die Zelllinie wurde freundlicherweise von Dres. T. Krüger und J.E. Schultz (beide Fakultät für Chemie und Pharmazie, Abt. Pharmazeutische Chemie, Universität Tübingen) zur weiteren Verfügung überlassen.

Die Zellen wurden jeweils in 10 ml Kulturmedium 2 in einer Petrischale (Fa. GREINER, Frickenhausen) aus Plastik mit 9,4 cm Durchmesser bei einer Temperatur von 37 °C im Brutschrank mit hoher Luftfeuchtigkeit sowie einem Verhältnis von 95 % Luft zu 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Sobald die Zellen eine Konfluenz von 70-80 % (7-10 Millionen Zellen pro Schale) erreicht hatten, wurden sie in einem Verhältnis von 1:2 - 1:4 passagiert. Dabei wurde zunächst das alte Medium abgesaugt; anschließend wurden bei einer 1:3-Passage die Zellen mit 9 ml erwärmtem frischem Medium von der Schalenoberfläche abgespült und auf 3 neue Kulturschalen verteilt, wobei jeweils noch 7 ml Medium sowie 100 µl Geneticin pro Schale hinzugefügt wurden. Durch das zugegebene Geneticinsulfat konnten die Zellen, die transfiziert wurden, von den nicht-transfizierten selektiert werden, da sie mit der aufgenommenen DNA auch eine Geneticinresistenz erworben hatten.

#### 2.5.1 Transfektion

Die Transfektion der HEK293-Zellen wurde von Frau Dr. A. Hambrock durchgeführt. Zur Transfektion wurden Kulturschalen mit 60–80 %iger Konfluenz der pcDNA 3.1-Vektor (Invitrogen) zugesetzt, der die kodierende Sequenz für murinen SUR2A (Genbank-Bestellnummer D86037) oder SUR2B (D86038) oder K<sub>IR</sub>6.1 (D88159) enthielt (Isomoto et al., 1996; Yamada et al., 1997). Die Transfektion wurde unter Verwendung von LipofektAMINE und Opti-MEM (Life Technologies)

## **2. Material und Methoden**

---

durchgeführt; und zwar wurden gemäß Herstellerinformation entweder 4 µg DNA (K<sub>IR</sub>6.1) oder 6,4 µg (SUR2B) oder 6,4 µg (SUR2A) und 60 µl LipofektAMINE pro Kulturschale zugegeben. Man ließ die Zellen die Fremd-DNA für 48 Stunden exprimieren. Die Isolierung der stabil transfizierten Zellen wurde erreicht, indem die Zellen 2 Tage nach der Transfektion mit frischem Medium abgelöst, und die Zellsuspension 1:20 (v/v) in geneticinhaltigen Medium (700 µg/ml) verdünnt wurde. Nach 2 Monaten wurde das Geneticin auf 450 µg/ml, weitere 2 Monate später auf 300 µg/ml reduziert.

### **2.5.2 Einfrieren von HEK293-Zellen**

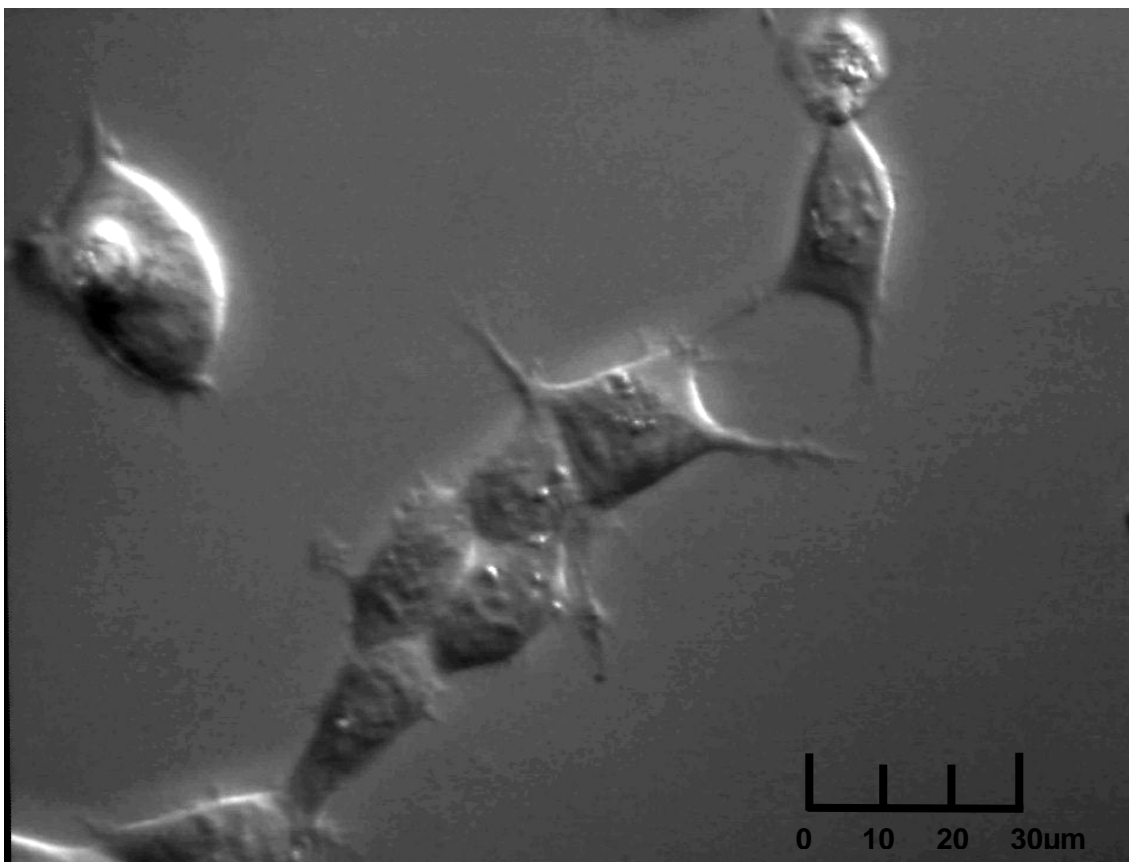
Es wurden Zellen verwendet, die in Petrischalen eine Konfluenz von 70-80 % (7-10 Millionen Zellen pro Schale) erreicht hatten; die Schalen wurden in einem 1:2 oder 1:3-Verhältnis auf vorbereitete Kryoröhrchen verteilt und eingefroren (2-5 Mio. Zellen pro Kryoröhrchen): nach Absaugen des alten Mediums wurden die Zellen in 4 ml Gefriermedium 2A/Schale von der Schalenoberfläche ab gespült und zentrifugiert (500 x g, 5 Min). Währenddessen wurden 500 µl Gefriermedium 2B in die einzelnen Kryoröhrchen vorgelegt. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt, die Zellen entsprechend dem Teilungsverhältnis in 1,5 bzw. 2 ml/Schale Gefriermedium 2A resuspendiert. Von dieser Zellsuspension wurden 500 µl in die Kryoröhrchen abgefüllt, bei -80 °C für 24 Stunden aufbewahrt und schließlich in flüssigem Stickstoff konserviert. Vor allem die letzten Schritte erforderten rasches Arbeiten, um die Kontaktzeit der Zellen mit dem Detergens DMSO möglichst gering zu halten.

### 2.5.3 Auftauen von HEK293-Zellen

Der Auftauvorgang wurde ebenfalls möglichst rasch durchgeführt, um die Kontaktzeit der Zellen mit dem Detergens DMSO so gering wie möglich zu halten.

In ein 50 ml-Gefäß wurden ca. 10 ml Kulturmedium 2 (37 °C) vorgelegt. Im Wasserbad (37 °C) wurde ein aus dem flüssigen Stickstoff entnommenes Kryoröhrchen mit der Zellmenge von ¼ Schale schnell aufgetaut, bis gerade noch ein Eisstift erkennbar war. Die Zellsuspension wurde dann rasch aus dem Kryoröhrchen in das vorbereitete 50 ml-Gefäß überführt, dadurch in Medium verdünnt und bei 200 x g 2-3 Min. lang zentrifugiert.

Der entstandene Bodensatz (aufgetaute HEK293-Zellen) wurde in 10 ml Kulturmedium 2 resuspendiert, in eine Petrischale (Durchmesser 9,4 cm) ausgesät und nach Zugabe von Geneticin (300 µg/ml) im Inkubator zur weiteren Kultivierung aufbewahrt.



**Abb. 2.3: Lichtmikroskopische Darstellung von HEK293-Zellen** mit den für sie typischen Zellausläufern. Die Abbildung entstand in 40-facher Vergrößerung im Differenz-Interferenz-Kontrastmodus.

## 2. Material und Methoden

---

### 2.5.4 Herstellung einer mikrosomalen Membranfraktion aus HEK293-Zellen

HEK293-Zellen wurden bei einer Konfluenz von 60-80 % (7-10 Millionen Zellen pro Schale) verwendet. Die Zellen wurden im alten Medium (10 ml/Schale) ab gespült und darin bei RT zentrifugiert (500 x g, 10 Min.). Die Zellen wurden durch Resuspension des Bodensatzes in hypotonem Puffer 3 lysiert (pro Schale 4 ml hypotoner Puffer) und ultrazentrifugiert (100 000 x g, 60 Min.). Der Bodensatz wurde kurz (3 s) im POLYTRON-Homogenisator bei 10 000 rpm homogenisiert und in Inkubationspuffer 4 resuspendiert (je 3 Schalen 1 ml Inkubationspuffer), in Kryoröhrchen aliquotiert und bei -80 °C eingefroren. Nach dem Auftauen wurde die Membransuspension noch einmal homogenisiert (POLYTRON-Homogenisator, 5-8 s, 10 000 s), also insgesamt zweimal, bevor die Membranen im Versuch verwendet wurden.

Die Effizienz der Membranpräparation wurde in n = 3 Präparationen untersucht, bei denen Schalen mit 80-85 % Konfluenz eingesetzt wurden. Die Zellzählung erbrachte  $7,1 \pm 1,6 \times 10^6$  Zellen/Schale, dies entsprach in der Proteinbestimmung  $3,0 \pm 0,1$  mg/Schale. Nach Lyse und anschließender Ultrazentrifugation der Zellen erschienen von dieser anfänglichen Proteinmenge, die 100% gesetzt wurde, im Homogenat  $60 \pm 5$  % ( $1,7 \pm 0,2$  mg/Schale),  $23 \pm 2$  % verblieben im Überstand; der Proteinverlust hierbei betrug  $15 \pm 4$  %.

### 2.5.5 Präparation von ganzen HEK293-Zellen

Experimente an ganzen Zellen setzen deren Vitalität und Integrität während der gesamten Präparation sowie der Inkubation mit dem Radioliganden voraus. Um dies zu garantieren, wurde ein begaster, O<sub>2</sub>- und CO<sub>2</sub>-gesättigter Puffer verwendet, der mit Glucose angereichert war (Puffer 5); desweiteren wurde versucht, alle Arbeitsschritte möglichst bei 37 °C zu halten.

Vor jedem Ganzzellversuch wurden 80 ml begaster Puffer hergestellt. Die Begasung mit Carbogen (95 % O<sub>2</sub>/5 % CO<sub>2</sub>) erfolgte für 40 Min. im Wasserbad bei 37 °C. Nach Einstellung des pH-Wertes auf 7,4 wurden 11 mM Glucose und schließlich 1,25 mM

## 2.5 Kultivierung von HEK293-Zellen

---

CaCl<sub>2</sub> zur Ionenbalance zugegeben. Der Puffer wurde während des gesamten Versuchs weiterbegast.

Zellen (aus 1–4 Kulturschalen) mit einer Konfluenz von 40 bis höchstens 85 % (3 - 10 Mio. Zellen pro Schale) wurden mit begastem Puffer abgelöst und in einem Volumen von 20 ml für 5 Min. bei 500 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt; der Bodensatz wurde zur Entfernung von Medienresten, die die Proteinbestimmung verfälscht hätten, in 10 ml begastem Puffer resuspendiert und erneut für 5 Min. bei 500 x g zentrifugiert (Waschschritt). Nach Abschütten des neuerlichen Überstands wurde der Bodensatz in begastem Puffer resuspendiert und während der anschließenden Inkubationsphase im Wasserbad bei 37 °C gehalten. Eine Schale lieferte abhängig von der Konfluenz ca. 1 – 3,5 mg Protein; die finale Proteinkonzentration in den Ansätzen bewegte sich zwischen 0,1 und 0,9 mg/ml ( $0,3 - 3,2 \cdot 10^6$  Zellen/ml).

## 2.6 Radioligandenbindungsexperimente

Mit Hilfe der Radioligandenbindung lassen sich die Rezeptorenzahl sowie die Affinität zwischen Rezeptor und Radioligand bzw. Rezeptor und kreuzreagierender, nicht radioaktiv markierter Liganden in einem Präparat direkt bestimmen.

Die Radioligandenbindung ist reversibel und gehorcht dem Massenwirkungsgesetz (MWG). Dabei liefert die Gleichgewichtsdissoziationskonstante  $K_D$  ein Maß für die Stärke der Bindung. Die Hemmung der Radioligandenbindung (Kompetitionsexperiment) durch nicht-markierte Liganden (Inhibitoren) ist ein Beispiel für ein Gleichgewichtsexperiment und ermöglicht die pharmakologische Charakterisierung der jeweils untersuchten Bindungsstelle. Umgekehrt kann durch Zugabe steigender Konzentrationen eines geeigneten Aktivators (wie etwa MgATP) die Radioligandenbindung gesteigert werden (Aktivierungsexperiment).

Ein weiteres Gleichgewichtsexperiment stellt das Sättigungsexperiment dar, bei welchem die Rezeptorkonzentration konstant gehalten, die des Radioliganden dagegen variiert wird.

## 2. Material und Methoden

---

Im Gegensatz zum Gleichgewichtsexperiment untersucht man mittels Ligand-Rezeptor-Kinetik die zeitlichen Bindungsabläufe und kann für ein bimolekulares Bindungsmodell die Geschwindigkeitskonstanten der Hin- ( $k_{on}$ ) und Rückreaktion ( $k_{off}$ ) ermitteln.

In allen Fällen wird der Rezeptor (z.B. in einer Membranfraktion) mit dem Radioliganden inkubiert. Danach muß der freie Ligand vom gebundenen abgetrennt werden. Dies kann z.B. in einem Filtrationsbindungsexperiment geschehen.

### 2.6.1 Filtrationsbindungsexperimente

Mit dem hier beschriebenen Versuchsablauf wurde die Radioligandenbindung an A10-Zellmembranen, ganzen A10-Zellen, Rattenherzmembranen, HEK293-Zellmembranen und ganzen HEK293-Zellen gemessen.

A10-Zellen wurden bei einer Konfluenz von 80-90 % verwendet. Die Herstellung einer Zellsuspension ist in Kap. 2.4.4 beschrieben.

HEK293-Zellen wurden bei einer Konfluenz von 40-85 % verwendet. Schalen mit höherer Konfluenz erzielten in einigen Versuchen eine deutlich geringere spezifische Bindung und wurden aus diesem Grunde für weitere Bindungsversuche nicht mehr eingesetzt. Die Herstellung einer Zellsuspension ist in Kap. 2.5.5 beschrieben.

A10-Zellmembranen, Rattenherzmembranen und HEK293-Zellmembranen (zur Herstellung der jeweiligen Membranen s. 2.4.3, 7.1.2.2 bzw. 2.5.4) wurden nach dem Auftauen homogenisiert (POLYTRON-Homogenisator;  $\approx 5$  s bei 10.000 rpm) und im Versuch eingesetzt.

Die Inkubation des Proteins mit dem jeweiligen Radioliganden erfolgte bei 37 °C in Ansätzen von zumeist 1 ml Volumen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden aus jedem Ansatz drei Aliquots ( $V = 0,3$  ml) in eiskaltem Waschpuffer verdünnt und unter Vakuum über Glasfaserfilter (Whatman GF/C für Experimente an A10-Zellmembranen sowie für Ganzzellversuche (sowohl an A10- wie auch an HEK293-Zellen), GF/B für Experimente an HEK293-Zellmembranen) in einer Multifiltrationsanlage mit Hilfe einer Membranpumpe abgesaugt. Da die Maschen dieser Filter enger als die festen

## 2.6 Radioligandenbindungsexperimente

---

Bestandteile des Präparats gewählt wurden, blieben diese auf dem Filter zurück. Um unspezifisch im Präparat gebundene Radioaktivität zu entfernen, wurden die Filter zweimal mit ca. 8 ml eiskaltem Waschpuffer (Zusammensetzung s. 2.2) gewaschen. Die Aktivität des gebundenen Radioliganden wurde in einem Szintillationszähler gemessen. Dazu wurde dem auf dem Filter befindlichen gebundenen Radioliganden in Szintillationsgefäßen 6 ml Szintillationsflüssigkeit (Ultima Gold) zugegeben und bei einer Effizienz von ca. 0,5 auf  $^3\text{H}$  gezählt.

### 2.6.2 Radioligandenstudien

Um festzustellen, ob eine spezifische Bindung des Radioliganden in einem vorliegenden Präparat existiert, wurden Gleichgewichtsexperimente vom einfachen Typ durchgeführt, in denen ausschließlich die totale und die unspezifische Bindung ( $B_{\text{TOT}}$  bzw.  $B_{\text{NS}}$ , s. 2.7) bestimmt wurden. Da die optimale Inkubationszeit nicht bekannt war, wurde eine Zeit gewählt, die sich bei Versuchen mit demselben Radioliganden an ähnlichen Präparationen vorteilhaft erwiesen hatte. Bei Vorliegen einer Bindungsstelle wurden Konkurrenzexperimente angeschlossen, um Aussagen hinsichtlich der Bindungskonstanten  $K_D$ , der Anzahl der Bindungsstellen und des Hill-Koeffizienten zu treffen; durch kinetische Experimente konnten Informationen über die ungefähre Affinität des Radioliganden und die Stabilität des Rezeptor-Ligand-Komplexes gewonnen werden. Anhand letzterer war man in der Lage, die Inkubationszeit zu optimieren.

## 2. Material und Methoden

---

### 2.7 Modell der Rezeptorbindungsstudien

Es wird die Bindung eines Radiolabels,  $L$ , an eine Klasse von nicht miteinander wechselwirkenden Bindungsstellen angenommen.



wobei  $R$  die freie Rezeptorkonzentration,  $L$  die freie Ligandkonzentration,  $C$  der Rezeptor-Ligand-Komplex,  $k_+$  die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante ( $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) und  $k_-$  die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante ( $\text{s}^{-1}$ ) darstellen.

Im Gleichgewicht gilt das Massenwirkungsgesetz:

$$K_D = \frac{k_-}{k_+} = \frac{R \cdot L}{C} \quad (\text{Gl. 2})$$

Dabei ist  $K_D$  die Gleichgewichtsdissoziationskonstante ( $\text{mol/l}$ ).

Weiterhin gelten die Massenbilanzen

$$R_0 = R + C \quad \text{und} \quad L_0 = L + C \quad (\text{Gl. 3a bzw 5b})$$

Der Index  $_0$  bedeutet totale Konzentration; also total = frei + gebunden.

Die Experimente werden nach Möglichkeit so angelegt, daß gilt

$$R_0 \ll L_0 \quad \Rightarrow \quad L_0 \approx L \quad (\text{Gl.5c})$$

d.h. die totale Ligandkonzentration ist viel größer als die totale Rezeptorkonzentration; der gebundene Anteil des Radioliganden sollte stets unter 5 % liegen.

Im Experiment überlagert sich der spezifischen Bindung des Radioliganden an die Rezeptoren,  $B_S$ , immer die durch das unspezifische Kleben des Liganden am Protein und am Filter verursachte nichtspezifische Bindung,  $B_{NS}$ .

$B_{NS}$  wird gemessen, nachdem die spezifische Bindung durch einen Überschuß an kaltem Liganden ( $L_{\text{kalt}} \approx 1000 * K_D$ ) blockiert wurde.

Experimentell bestimmt werden die totale,  $B_{TOT}$ , und die nichtspezifische Bindung,  $B_{NS}$ .

Aus diesen läßt sich  $B_S$  berechnen:

$$B_S = B_{TOT} - B_{NS} ; \quad B_S \equiv C \quad (\text{Gl. 4})$$



### 2.7.1 Sättigungsexperiment

Gemessen werden  $B_{TOT}$  und  $B_{NS}$  als Funktion der freien Labelkonzentration,  $L$ .

Da  $B_{NS}$  eine schwache Bindung des Liganden an sehr viele Bindungsplätze darstellt, bei der eine Sättigung nicht erreicht wird, gilt folgender linearer Ansatz:

$$B_{NS} = a \cdot L \quad (\text{Gl. 7})$$

Die spezifische Bindung,  $B_S$ , wird aus (Gl. 1) und (Gl. 3a bzw 5b) errechnet ( $B_S \equiv C$ ):

$$K = \frac{R \cdot L}{C} = \frac{(R_0 - C) \cdot (L_0 - C)}{C} \quad (\text{Gl. 8})$$

Diese Gleichung läßt sich unter der Bedingung (5c) umformen in

$$C = R_0 \cdot \frac{L}{L + K} \quad (\text{Gl. 9})$$

woraus ersichtlich ist, daß die spezifische Bindung,  $B_S \equiv C$ , mit der freien Ligandenkonzentration in Form einer rechtwinkligen Hyperbel wächst, ihre Sättigung für  $C \rightarrow R_0$  erreicht und Halbsättigung bei  $L = K$  vorliegt.

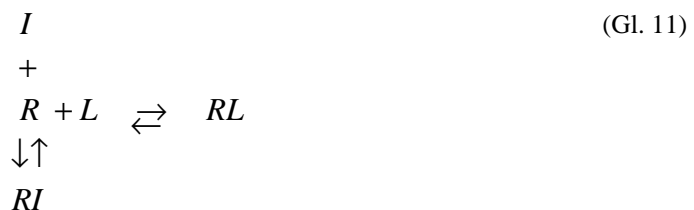
Direkt meßbar im Experiment sind  $B_{TOT}$ ,  $B_{NS}$  und  $L = L_0 - B_{TOT} - B_{NS}$ . Die Bindungsisotherme ist dann die Summe der spezifischen und unspezifischen Interaktion des Liganden.

$$B_{TOT} = R_0 \cdot \frac{L}{L + K} + a \cdot L \quad (\text{Gl. 10})$$

Nach Anpassung der Daten an Gl. 10 liefert der berechnete Graph  $B_{MAX}$  ( $= R_0$ ) und  $K_D$  ( $= K$ ).

### 2.7.2 Konkurrenzexperiment

Ausgegangen wird von folgender Reaktion:



## 2. Material und Methoden

---

mit  $I$  = Inhibitor,  $L$  = radioaktiver Ligand,  $R$  = Rezeptor,  $RL$  = Rezeptor-Ligand-Komplex und  $RI$  = Rezeptor-Inhibitor-Komplex.

Bemerkungen: In der Präparation gibt es nur eine Klasse von Bindungsstellen (Rezeptoren);  $L$  und  $I$  sind in Konkurrenz um  $R$ . Gemessen wird die Abnahme von  $RL$  bei steigenden Konzentrationen von  $I$ . Im Versuch werden zur Zeit  $t = 0$   $L$  und  $I$  gleichzeitig zur Rezeptorpräparation zugegeben und die Gleichgewichtseinstellung abgewartet.

Die beobachtete Größe ist  $RL$ , die als Funktion des zugegebenen Inhibitors in einer Hemmkurve dargestellt wird:

Aus den Massenwirkungsgesetzen für die beiden oben dargestellten konkurrierenden Reaktionen

$$K_L = \frac{R \cdot L}{RL} \quad \text{bzw.} \quad K_I = \frac{R \cdot I}{RI} \quad (\text{Gl. 12a bzw. 12b})$$

erhält man durch Umformen unter der Voraussetzung  $R_0 \ll L_0, I_0$ :

$$RL = R_0 \underbrace{\frac{L/K_L}{1 + L/K_L}}_{RL(I=0)} \cdot \underbrace{\frac{K_I(1 + L/K_L)}{K_I(1 + L/K_L) + I}}_{\xrightarrow{I \rightarrow 0} 0} \quad (\text{Gl. 13})$$

Der Mittelpunkt der Hemmkurve befindet sich bei einer Inhibitorkonzentration von  $I = K_I(1 + L/K_L)$  und wird mit  $IC_{50}$  bezeichnet.

Die Beziehung zwischen  $IC_{50}$  und  $K_I$  heisst Cheng-Prusoff-Gleichung (Cheng und Prusoff, 1973) und erlaubt die Berechnung von  $K_I$ . Hierzu muß  $K_L$  bekannt sein:

$$IC_{50} = K_I \cdot \left( 1 + \frac{L}{K_L} \right) \quad (\text{Gl. 14})$$

Eine andere Möglichkeit zur Bestimmung der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten  $K_I$  (und außerdem von  $K_L$ ), ebenfalls mit Hilfe der Cheng-Prusoff-Gleichung, besteht in der Auftragung der verschiedenen  $IC_{50}$ -Werte der einzelnen Experimente gegen die zugegebene Ligandenkonzentration,  $L_0$ .

Durch einfache Umformung der Cheng-Prusoff-Gleichung erhält man eine Geradengleichung mit Ordinatenabschnitt  $K_I$  und Steigung  $K_I/K_L$ :

## 2.7 Modell der Rezeptorbindungsstudien

---

$$IC_{50} = \frac{K_I}{K_L} \cdot L_0 + K_I \quad (\text{Gl. 15})$$

Im Falle der homologen Konkurrenz (Verdrängung des Radiolabels durch sein unmarkiertes Analogon) gilt:

$$IC_{50} = K_L + L_0 \quad \text{bzw.} \quad K_L = IC_{50} - L_0 \quad (\text{Gl. 16})$$

Unter Einbeziehung der Cheng-Prusoff-Gleichung lässt sich die Hemmkurve nun beschreiben als

$$RL = RL(0) \cdot \frac{IC_{50}}{IC_{50} + I} \quad \text{logarithmiert} \quad RL = \frac{RL(0)}{1 + 10^{pIC_{50} - px}} \quad (\text{Gl. 17a bzw. 17b})$$

Dabei gilt  $px = -\log I$ .

Für den in den Experimenten erreichten Sättigungsgrad  $y$ , die Fraktion der mit Ligand besetzten Rezeptoren, gilt im Falle der homologen Konkurrenz:

$$y \equiv \frac{C}{R_0} = \frac{L}{L + K} \quad (\text{Gl. 18})$$

Hieraus lässt sich die maximale Bindungskapazität, d.h. die Gesamtrezeptorenzahl,  $B_{MAX} \equiv R_0$ , berechnen zu

$$B_{MAX} = \frac{1}{y} \cdot B_S = \frac{L + K}{L} \cdot C \quad (\text{Gl. 19})$$

### 2.7.3 Aktivierungsexperiment

Im umgekehrten Fall der Aktivierung der Radioligandenbindung durch Zugabe steigender Konzentrationen eines Aktivators, A, gilt für die Aktivierungskurve:

$$RL = RL(0) \cdot \frac{A}{EC_{50} + A} \quad \text{logarithmiert} \quad RL = \frac{RL(0)}{1 + 10^{pA - pEC_{50}}} \quad (\text{Gl. 20a bzw. 20b})$$

Hierbei beschreibt die  $EC_{50}$  den Mittelpunkt der Aktivierungskurve,  $pA$  den negativen Logarithmus von A.

## 2. Material und Methoden

---

### 2.7.4 Verallgemeinerung der Bindungsisotherme nach Hill

Gelegentlich ist die Bindungsisotherme steiler oder flacher, als es (Gl. 17a bzw. 17b) bzw. (Gl. 10) entspricht. In diesem Fall wird (Gl. 17a bzw. 17b) bzw. (Gl. 10) durch die Einführung eines Exponenten  $n$  ( $= nH = \text{Hill-Koeffizient}$ ) verallgemeinert. Für die Inhibitionskurve gilt dann:

$$B_{TOT} = B_S(0) \cdot \frac{IC_{50}^n}{IC_{50}^n + I^n} + B_{NS} \quad \text{bzw.} \quad B_S = B_S(0) \cdot \frac{IC_{50}^n}{IC_{50}^n + I^n}$$

(Gl. 21a bzw. 21b)

Für die Sättigungsisotherme gilt:

$$RL = R_0 \cdot \frac{L^n}{\underbrace{L^n + K^n}_y}$$

(Gl. 22)

Da bei gilt:  $B_S(0) = B_S$  zum Zeitpunkt  $t = 0$ . Für Bindungsstudien lassen sich durch  $n_H$  folgende Schlußfolgerungen ziehen:

- $n = 1$ : übliche Bindungsisotherme; Vorhandensein nur einer Klasse von nicht miteinander wechselwirkender Bindungsstellen
- $n > 1$ : positive Kooperativität; mehrere Ligandenmoleküle binden mit steigender Affinität an den Rezeptor
- $n < 1$ : negative Kooperativität; die Bindung des ersten Liganden erschwert die Bindung weiterer Ligandenmoleküle; kommt in der Natur sehr selten vor. Meist sind in der Präparation mehrere Klassen von Bindungsstellen enthalten, die sich in ihrer Affinität für den Liganden um weniger als einen Faktor 10-30 unterscheiden. Da die einzelnen Komponenten dann nicht mehr deutlich voneinander getrennt sind, ergibt sich eine homogen flach abfallende Kurve.

### 2.7.5 Kinetik

Die Reaktion wird durch Zugabe des Proteins zum Radioliganden zum Zeitpunkt  $t = 0$  gestartet. Gemessen wird die Zunahme von RL über die Zeit,  $t$  (Assoziationskinetik) bzw. die Abnahme von RL nach Zugabe eines Überschusses an kaltem Liganden (Dissoziationskinetik) nach Gleichgewichtseinstellung.

Für Hin- und Rückreaktion ergeben sich nach (Gl. 1)

$$\text{Hintrkt.: } v_+ = k_+ \cdot R \cdot L \quad \text{bzw.} \quad \text{Rückrkt.: } v_- = k_- \cdot C \quad (\text{Gl. 23})$$

Die Hinreaktion folgt also einer Kinetik 2. Ordnung, die Rückreaktion einer Kinetik 1. Ordnung. Die Änderung der Komplexkonzentration über die Zeit ( $dC/dt$ , kurz  $\dot{C}$  genannt) ergibt sich aus der Summe von Hin- und Rückreaktion:

$$\dot{C} = k_+ \cdot R \cdot L - k_- \cdot C \quad (\text{Gl. 24})$$

Unter der Bedingung (Gl. 3a bzw 5b) erhält man durch einige Umformungen

$$\dot{C} + \underbrace{(k_+ \cdot L_0 + k_-)}_{k_{app}} \cdot C = \underbrace{k_+ \cdot L_0 \cdot R_0}_{\text{Hintrkt}} \quad (\text{Gl. 25})$$

Somit wird die Änderung von RL über die Zeit durch eine inhomogene Differentialgleichung 1. Ordnung beschrieben, deren Lösung lautet

$$C(t) = C_\infty \cdot (1 - e^{-k_{app} \cdot t}) \quad \text{mit } C_\infty = R_0 \cdot \frac{L_0}{L_0 + K} \quad (\text{Gl. 26a bzw. 26b})$$

Hierbei sind:

$C_\infty$  = Konzentration des Rezeptor-Ligand-Komplexes im Gleichgewicht

$k_{app}$  = scheinbare Assoziationskonstante; außer von den eigentlichen Zeitkonstanten  $k_-$  und  $k_+$  noch von  $L_0$  abhängig (Tallarida 1995).

Die Geschwindigkeitskonstante dieser Reaktion,  $k_{app}$ , enthält die kinetischen Konstanten der Hin- und Rückreaktion:

$$k_{app} = k_+ \cdot L_0 + k_- \quad (\text{Gl. 27})$$

## 2. Material und Methoden

---

Durch Ausklammern von  $k_-$  und (Gl.2) erhält man:

$$k_{app} = k_- \left( 1 + \frac{L_0}{K_D} \right) \quad (\text{Gl. 28})$$

Die Halbbildungszeit  $t_{1/2}^*$ , in der sich die Hälfte von  $C_\infty$  formiert, und die Halbwertszeit  $t_{1/2}$  des Komplexes berechnen sich zu

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_-} \quad \text{bzw.} \quad t_{1/2}^* = \frac{\ln 2}{k_{app}} \quad (\text{Gl. 29a bzw. 29b})$$

Der Verlauf der Dissoziation entspricht einem monoexponentiellen Zerfall und kann mit Hilfe der exponentiellen Zerfallsgleichung quantifiziert werden:

$$RL(t) = C_\infty \cdot e^{(-k_-t)} \quad (\text{Gl. 30})$$

### 2.8 Datenauswertung

#### 2.8.1 Konkurrenzexperimente mit $^3\text{H-P1075}$

Alle Ergebnisse wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung des Mittelwertes (standard error of the mean, SEM) ausgedrückt. Bei  $\text{IC}_{50}$ - oder  $K_D$ -Werten sind in Klammern die 95 %-Konfidenzintervalle angegeben (s. 2.9). Für die einzelnen Experimente wurden die Daten an die (Gl. 21a bzw. 21b) angepaßt. Die Experimente einer Serie wurden dann als %  $B_S$  gemittelt zusammengefaßt, dabei wurde der Fehler durch leicht unterschiedliche Radioligandenkonzentrationen (Abweichung  $< 5\%$ ) vernachlässigt. An die so erhaltenen Werte wurde die logarithmierte Form der (Gl. 21a bzw. 21b) angepaßt:

$$B_S(I) = \frac{100}{1 + 10^{-n \cdot (pX - p\text{IC}_{50})}} \quad \text{bzw.} \quad B_S(I) = \frac{100}{1 + 10^{-(pX - p\text{IC}_{50})}} \quad (\text{Gl. 31a bzw. 31b})$$

Für eine einfache, einstufige Verdrängung gilt  $n_H = 1$ ; bei der endgültigen Auswertung von Experimenten, in denen die Voraussetzung  $n_H \approx 1$  nach Anpassung an Gl. 21a bzw. 21b erfüllt war, wurde zur Minimierung der Fehler der Hill-Koeffizient in der Formel gleich 1 gesetzt (Gl. 31a bzw. 31b).

### 2.8.2 Konkurrenzexperimente mit $^3\text{H}$ -GBC

Alle Ergebnisse wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung des Mittelwertes (standard error of the mean, SEM) ausgedrückt. Bei  $\text{IC}_{50}$ - oder  $\text{K}_D$ -Werten sind in Klammern die 95 %-Konfidenzintervalle angegeben. Für einstufige Verdrängungen konnten die einzelnen Experimente mit (Gl. 21a bzw. 21b) beschrieben werden, für zweistufige Kurvenverläufe mußte diese Gleichung erweitert werden:

$$B_{TOT}(I) = R_1 \cdot \frac{\text{IC}_{50,1}}{\text{IC}_{50,1} + I} + R_2 \cdot \frac{\text{IC}_{50,2}}{\text{IC}_{50,2} + I} + B_{NS} \quad (\text{Gl. 32})$$

$R_1$  bzw.  $R_2$  repräsentieren die beiden Rezeptorpopulationen im Präparat.

An die gemittelten Werte wurden folgende Gleichungen angepaßt:

$$\%B_{TOT}(I) = 100 - \frac{A_1}{1 + 10^{n(p_x - p\text{IC}_{50})}} \quad \text{bzw.} \quad \%B_{TOT}(I) = 100 - \frac{A_1}{1 + 10^{p_x - p\text{IC}_{50,1}}} - \frac{A_2}{1 + 10^{p_x - p\text{IC}_{50,2}}} \quad (\text{Gl. 33a bzw. 33b})$$

$A_1$  bzw.  $A_2$  stellen die Amplituden der Kurven dar; für die zweistufige Gleichung wurden zur Vereinfachung die Hill-Koeffizienten gleich 1 gesetzt.

### 2.8.3 Kinetik der $^3\text{H}$ -P1075-Bindung

Für die Auswertung der einzelnen Experimente wurden die Daten an die Gl. 26a (Assoziation) bzw. Gl. 30 (Dissoziation) angepaßt. Die in den einzelnen Experimenten erhaltenen Werte für  $k_{app}$  bzw.  $k$  wurden gemittelt und hieraus nach Gl. 29a die Halbwertszeit bzw. nach Gl. 27  $k_+$  berechnet. Aus Gl. 28 bzw. Gl. 4 folgte die Berechnung der  $\text{K}_D$ . Dargestellt wurden jeweils nur Einzelexperimente.

## 2. Material und Methoden

---

### 2.8.4 Aktivierungsexperimente mit $^3\text{H-P1075}$

Alle Ergebnisse wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung des Mittelwertes (standard error of the mean, SEM) ausgedrückt. Für die Auswertung der einzelnen Experimente wurden die Daten an Gl. 20a angepaßt. Die Experimente einer Serie wurden dann als %  $B_S$  gemittelt zusammengefaßt, dabei wurde der Fehler durch leicht unterschiedliche Labelkonzentrationen (Abweichung  $< 5\%$ ) vernachlässigt. Die so erhaltenen Werte wurden an Gl. 20b angepaßt. Da für eine einfache, einstufige Aktivierung, wie sie hier vorlag,  $n_H = 1$  gelten muß, wurde zur Minimierung der Fehler der Hill-Koeffizient in der Formel weggelassen.

### 2.9 Statistik

Alle Ergebnisse wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung des Mittelwertes (standard error of the mean, SEM) ausgedrückt. Die einzelnen Experimente wie auch die zusammengefaßten Daten wurden mit den oben angegebenen Gleichungen nach der Methode der minimierten Fehlerquadrate im Figure P-Programm (Biosoft, Cambridge, U.K.) ausgewertet.

Fehler der Parameter wurden unter der Voraussetzung bestimmt, daß die Amplituden der Hemmkurven und die Logarithmen der  $IC_{50}$ -Werte (d.h. die  $pIC_{50}$ -Werte) normalverteilt waren. Bei  $IC_{50}$ - oder  $K_D$ -Werten sind in Klammern die 95 %-Konfidenzintervalle angegeben.

Bei der Auswertung zusammengefaßter Daten aus mehreren Einzelexperimenten wurden die Fehler durch univariate Annäherung bestimmt (Draper und Smith 1981).

In Berechnungen, in welche zwei Mittelwerte mit Standardfehlern eingingen, wurde eine Fehlerfortpflanzung nach Bevington (1969) berechnet.

Statistische Signifikanz von Unterschieden mit Hilfe des student's t-test ermittelt.



Um zu entscheiden, ob ein Modell mit zwei Bindungsstellen einem mit einer Bindungsstelle statistisch überlegen ist, wurden das Akaike-Kriterium und der F-Test herangezogen (Akaike, 1974; Bevington, 1969; Quast und Mählmann, 1982).

Dabei wird im F-Test ein sogenannter F-Wert gemäß folgender Gleichung berechnet:

$$F_{calc} = \frac{(SQ_1 - SQ_2)/(v_1 - v_2)}{SQ_2 / v_2} \quad (\text{Gl. 34})$$

$SQ_1$  und  $SQ_2$  stellen jeweils die Summe der Fehlerquadrate der Modelle mit einem oder mit zwei Bindungsstellen dar,  $v_1$  und  $v_2$  bezeichnen jeweils die Freiheitsgrade. Der F-Wert wird danach mit einem Tabellenwert  $F(\alpha\%, v_1 - v_2, v_2)$  verglichen, in dem  $\alpha$  als Signifikanzniveau eingeht.

Das Akaike-Kriterium bezeichnet einen Wert, der getrennt für die Modelle mit einer bzw. mit zwei Bindungsstellen kalkuliert wird:

(Gl. 35)

Dabei ist  $N$  die Anzahl der Meßpunkte,  $SQ_i$  die Summe der Fehlerquadrate und  $p_i$  die Anzahl der Parameter des jeweiligen Modells. Bevorzugt wird das Modell mit dem

$$AIC_i = N \ln SQ_i + 2p_i$$

niedrigeren AIC-Wert.

In den hier angewandten Fällen (Kap. 3.2.5.4, 3.3.1 und 3.5.1.1.6) unterstützten beide Tests das Modell mit zwei Bindungsstellen.

## **2. Material und Methoden**

---

---

### 3 Ergebnisse

Aufgrund der Bindungsexperimente mit  $^3\text{H}$ -P1075 an Rattenherzmembranen (s. Anhang A bzw. B) wurde davon ausgegangen, dass sowohl Versuchsablauf als auch Versuchsausrüstung für die Durchführung von Bindungsexperimenten an Zellmembranpräparationen geeignet waren.

#### 3.1 Membranherstellung

Um die Grösse des Proteinverlustes durch Ultrazentrifugation bei der Herstellung einer Membranfraktion aus A10-Zellen zu bestimmen, wurden in  $n = 3$  Experimenten jeweils 3 Kulturschalen mit A10-Zellen verwendet. Zunächst wurden die Zellen in der Kulturschale (Konfluenz  $\approx 80\text{-}90\%$ ) gezählt; eine Schale enthielt rund 1-1,5 Millionen Zellen. Nach osmotischem Aufbrechen wurden die Zellen von der Schalenoberfläche abgelöst: Dazu wurden die ausgewählten Kulturschalen für 1–2 Min. auf Eis inkubiert, das Medium aus den Schalen abgesaugt und Mediumreste durch Abspülen der fest auf der Schalenoberfläche haftenden Zellen mit je 3 ml Inkubationspuffer 2 entfernt. Die Zellen wurden sodann mit jeweils 1 ml hypotonem Puffer 1 überschichtet und dadurch osmotisch aufgebrochen. Nach ca. 30 s liessen sich die aufgebrochenen Zellen mittels Zellschaber von der Schalenoberfläche ablösen und in ein vorbereitetes Zentrifugenröhrchen überführen. Die Schalen wurden mit weiteren 1 ml hypotonem Puffer abgespült und die hierdurch gewonnenen Zellreste ebenfalls in das Zentrifugenröhrchen überführt. Aus dem so erhaltenen Homogenat wurden 2 ml zur Proteinbestimmung nach Lowry et al. (1951; s. 2.3) entnommen, die enthaltene Proteinmenge wurde 100 % gesetzt (Gesamtproteinmenge vor Zentrifugation = G). Der Rest des Homogenates wurde für 60 Min. bei  $100\,000 \times g$  ultrazentrifugiert ( $4\text{ }^\circ\text{C}$ , 29500 rpm; BECKMANN-Ultrazentrifuge). Der durch die Zentrifugation erhaltene Überstand wurde in ein Reagenzglas überführt und nach Durchmischung durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren wurden 2 ml zur Proteinbestimmung entnommen.

### 3. Ergebnisse

---

Der Proteingehalt im Überstand (Ü) betrug  $57 \pm 2 \%$  (zytosolisches Protein). Der Bodensatz, welcher die Zellmembranen enthielt, wurde in 0,5 ml Inkubationspuffer 2 aufgenommen und resuspendiert. Die nun gelösten Membranen wurden in ein Reaktionsgefäß überführt, 5 s bei 10 000 rpm homogenisiert (POLYTRON-Homogenisator), der Schneidestab wurde mit weiteren 1 ml Inkubationspuffer 2 abgespült. Der nach Lowry bestimmte Proteingehalt der erhaltenen Membransuspension (M) in  $V = 1,5$  ml betrug  $41 \pm 4 \%$ . Damit liess sich der Proteinverlust (P) durch Ultrazentrifugation berechnen:  $P = G - (\ddot{U} + M) = 4,7 \pm 0,3 \%$  ( $n = 3$ ).

Die Proteinmenge vor Zentrifugation betrug  $2,1 \pm 0,4$  mg Gesamtprotein pro Schale, entsprechend ca. 2,1 ng Protein pro Zelle (bei rund 1 Million Zellen pro Schale). Von diesem Gesamtzellprotein liessen sich ca. 57 % zytosolisches Protein abtrennen. Daraus folgt, dass  $10^6$  Zellen rund 1,3 mg Membranprotein ergeben.

#### 3.2 $^3\text{H}$ -P1075-Bindungsexperimente an A10-Zellmembranen

Die Bindungsexperimente wurden mit  $1,0\text{--}1,5 \times 10^6$  Zellen pro Schale (entsprechend einer Konfluenz von 80–90 %) wie in Kap. 2.6.1 beschrieben durchgeführt. Die Proteinkonzentration in den Ansätzen bewegte sich zwischen 0,2 und 0,6 mg/ml; die Reaktion fand in Puffer 2 und bei 37 °C statt.

##### 3.2.1 ATP-Abhängigkeit der $^3\text{H}$ -P1075-Bindung an A10-Zellmembranen

Zunächst wurde in  $n = 3$  Bindungsexperimenten untersucht, ob die  $^3\text{H}$ -P1075-Bindung von der im Inkubationsansatz vorliegenden Konzentration an  $\text{Na}_2\text{ATP}$  abhängt, um diese eventuell zu optimieren. Die Inkubationszeit betrug 30 Min. bei 0 °C, die Daten wurden auf 1 nM Ligandenkonzentration normiert. Verglichen wurde die spezifische Bindung in Anwesenheit von 1 mM bzw. 10 mM  $\text{Na}_2\text{ATP}$ :

$$B_{S, 1\text{mM}} = 7,5 \pm 0,9 \text{ fmol/mg}$$

$$B_{S, 10\text{mM}} = 7,6 \pm 1,4 \text{ fmol/mg.}$$

### **3.2 <sup>3</sup>H-P1075-Bindungsexperimente an A10-Zellmembranen**

---

Somit liess sich im Bereich von 1 bzw. 10 mM Na<sub>2</sub>ATP-Konzentration kein Unterschied in der <sup>3</sup>H-P1075-Bindung feststellen. In später mit ATP als Aktivator durchgeführten Aktivierungsexperimenten an SUR2B-transfizierten HEK293-Zellmembranen wurde jedoch festgestellt, dass die <sup>3</sup>H-P1075-Bindung durch ansteigende Konzentrationen von ATP durchaus gesteigert wird (3.5.2.1), der Bereich von 1-10 mM Na<sub>2</sub>ATP-Konzentration liegt jedoch bereits im Sättigungsbereich der Aktivierungskurve (Abb. 3.5). Alle weiteren Experimente wurden bei einer ATP-Konzentration von 3 mM durchgeführt.

Die gewählte Inkubationszeit war für die Inkubationstemperatur von 0 °C vermutlich zu kurz, denn bei der Betrachtung von Abb. 3.1 fällt auf, dass hier bei einer Inkubationstemperatur von 37 °C nach 25-30 Minuten gerade das Maximum erreicht wird.

#### **3.2.2 Temperaturabhängigkeit der <sup>3</sup>H-P1075-Bindung an A10-Zellmembranen**

In n = 2 Bindungsexperimenten wurde untersucht, inwieweit die <sup>3</sup>H-P1075-Bindung von der Inkubationstemperatur abhängt bzw. durch eine Änderung der Inkubationstemperatur gesteigert werden kann. Die Inkubationszeit betrug 30 Min., die Na<sub>2</sub>ATP-Konzentration 1 mM, die Daten wurden auf 1 nM Ligandenkonzentration normiert. Verglichen wurde die spezifische Bindung bei einer Inkubationstemperatur von 0 °C bzw. 37 °C:

$$B_{S, 0^{\circ}\text{C}} = 6,1 \pm 0,4 \text{ fmol/mg}$$

$$B_{S, 37^{\circ}\text{C}} = 13,2 \pm 1,6 \text{ fmol/mg.}$$

Dieses Ergebnis deutete an, dass die <sup>3</sup>H-P1075-Bindung durch eine Inkubationstemperatur von 37 °C ungefähr verdoppelt werden kann. Folglich wurden alle weiteren Versuchsansätze bei einer Temperatur von 37 °C inkubiert.

Hierzu muss jedoch festgestellt werden, dass die Daten eigentlich nicht vergleichbar sind, da wie oben erwähnt die Inkubationszeit von 30 Minuten bei einer Inkubationstemperatur von 0 °C zu kurz ist, um eine Gleichgewichtseinstellung zu

### 3. Ergebnisse

---

gewährleisten. Die Folgerung, dass eine Erhöhung der Inkubationstemperatur die  $^3\text{H}$ -P1075-Bindung steigert, kann daher nicht getroffen werden.

#### 3.2.3 $\text{Mg}^{2+}$ -Abhängigkeit der $^3\text{H}$ -P1075-Bindung an A10-Zellmembranen

Zur Optimierung der  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentration in den Experimenten wurde die Abhängigkeit der  $^3\text{H}$ -P1075-Bindung von der im Inkubationsansatz vorliegenden Konzentration an  $\text{MgCl}_2$  in  $n = 2$  Bindungsexperimenten untersucht. Die Inkubationszeit betrug 30 Min., die  $\text{Na}_2\text{ATP}$ -Konzentration 3 mM, die Daten wurden auf 2 nM Ligandenkonzentration normiert. Verglichen wurde die spezifische Bindung,  $B_S$ , in Anwesenheit von 0,92 mM bzw. 3,8 mM  $\text{MgCl}_2$ :

$$B_{S; 0,92\text{mM}} = 3,3 \pm 0,8 \text{ fmol/mg}$$

$$B_{S; 3,8\text{mM}} = 9,8 \pm 1,4 \text{ fmol/mg.}$$

Die  $^3\text{H}$ -P1075-Bindung konnte bei einer  $\text{MgCl}_2$ -Konzentration von 3,8 mM ungefähr verdreifacht werden. Aus diesem Grund wurden alle weiteren Versuche bei einer  $\text{MgCl}_2$ -Konzentration von 3,8 mM durchgeführt.

Inkubations-temperatur	Inkubationszeit	ATP-Konzentration	$\text{Mg}^{2+}$ -Konzentration	freies $\text{Mg}^{2+}$
37 °C	30 Minuten	3 mM	3,8 mM	0,8 mM (physiol. $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentration)

**Tab. 3.1: Optimale Bedingungen zur Durchführung von  $^3\text{H}$ -P1075-Bindungsexperimenten im Gleichgewicht.**

## 3.2 <sup>3</sup>H-P1075-Bindungsexperimente an A10-Zellmembranen

---

### 3.2.4 Kinetik der <sup>3</sup>H-P1075-Bindung an A10-Zellmembranen

Um den zeitlichen Verlauf der Reaktion zwischen dem Rezeptor und dem Liganden zu studieren und die Stabilität des Rezeptor-Ligand-Komplexes hinsichtlich einer optimalen Inkubationszeit zu erfassen, wurde in einer Serie von  $n = 8$  Experimenten die Kinetik der <sup>3</sup>H-P1075-Bindung an A10-Zellmembranen untersucht. Mit Hilfe dieser Kinetikexperimente konnten zudem orientierende Aussagen über die Lage der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten,  $K_D$ , getroffen werden.

Zum Zeitpunkt  $t = 0$  wurde die Reaktion durch Zugabe des Proteins zur Inkubationslösung mit dem Liganden gestartet; die Reaktion fand in Ansatzvolumina von 6 - 6,5 ml in Puffer 2 bei 37 °C und einer Ligandenkonzentration von  $1,93 \pm 0,06$  nM statt. In einem parallelen Reaktionsgefäß wurde der zeitliche Verlauf der nichtspezifischen Bindung in Gegenwart von 10 µM kaltem P1075 mitbestimmt. Die nichtspezifische Bindung,  $B_{NS}$ , blieb über die Dauer des Experiments konstant; sie betrug ungefähr 12 % der totalen Bindung im Gleichgewicht. Die spezifische Bindung,  $B_S$ , betrug  $19 \pm 2$  fmol/mg. Die Inkubation der Assoziation bei 37 °C wurde beendet durch Entnahme von 0,3 ml-Aliquots zu unterschiedlichen Zeiten (1.-90. Min.). Verdünnung in eiskaltem Waschpuffer und Filtration erfolgten wie in Kap. 2.6.1 beschrieben. Die erhaltenen Daten wurden mit einer monoexponentiellen Funktion (2.7.5, Gl. 26a) ausgewertet.

Die Dissoziation wurde nach 30-minütiger Vorinkubation der A10-Zellmembranen mit <sup>3</sup>H-P1075 bei 37 °C durch Zugabe von 10 µM P1075 zum Rezeptor-Ligand-Komplex eingeleitet. Wie bei der Assoziation wurden 0,3 ml-Aliquots zu unterschiedlichen Zeiten (31.-100. Min.) entnommen und wie oben beschrieben verdünnt und filtriert. An die erhaltenen Daten wurde eine monoexponentielle Zerfallsfunktion (2.7.5, Gl. 30) angepasst.

Es wurde eine scheinbare Assoziationskonstante,  $k_{app}$ , von  $0,11 \pm 0,03$  min<sup>-1</sup> errechnet sowie eine Dissoziationskonstante,  $k_{off}$ , von  $0,07 \pm 0,01$  min<sup>-1</sup>. Hieraus konnte eine Halbwertszeit ( $t_{1/2}$ ) von  $9,9 \pm 1,7$  Min. berechnet werden (2.7.5, Gl. 29a). Aus dieser

### 3. Ergebnisse

---

Halbwertszeit des Komplexes von ungefähr 10 Minuten kann geschlossen werden, dass die Bindung des Liganden an den Rezeptor für die Zeit zwischen Reaktionsstopp durch Verdünnung in eiskaltem Waschpuffer und Abfiltration (ca. 10 s) erhalten bleibt.

Aus der Beziehung  $k_{app} = k_{on} * L_0^* + k_{off}$  (2.7.5, Gl. 27), liess sich nun die Assoziationskonstante  $k_{on}$  ermitteln zu  $(2,1 \pm 1,7) * 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ , wobei der grosse Fehler durch die Fehlerfortpflanzung bei der Berechnung aus zwei fehlerbehafteten Ausgangswerten entstand.

Zusätzlich konnte mit diesen Daten ungefähr der  $K_D$ -Wert der Bindungsstelle bestimmt werden, da für eine einfache Bindungsreaktion die Beziehung  $K_D = k_{off}/k_{on}$  gilt (2.7, Gl. 4). Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante wurde so zu  $3,3 \pm 2,8 \text{ nM}$  errechnet. Dieser Wert steht mit dem Ergebnis der Konkurrenzexperimente ( $K_D = 7,9 (5,9; 10,3) \text{ nM}$ ) in zufriedenstellender Übereinstimmung (3.2.5.1).

Ein typisches Experiment ist in Abb. 3.1 dargestellt. Es lässt erkennen, dass die Bindung nach rund 25 Minuten vollständig ausgebildet und äquilibriert ist und dass die Konzentration des Rezeptor-Ligand-Komplexes im Gleichgewicht,  $RL_{\infty}$ , von Minute 25 bis 60 stabil blieb; daraus folgt, dass für spätere Gleichgewichtsexperimente (z.B. Konkurrenzexperimente) eine Inkubationszeit von 30 Min. gewählt werden konnte, um eine maximal hohe totale Bindung zu erzielen.



### 3.2 $^3\text{H}$ -P1075-Bindungsexperimente an A10-Zellmembranen

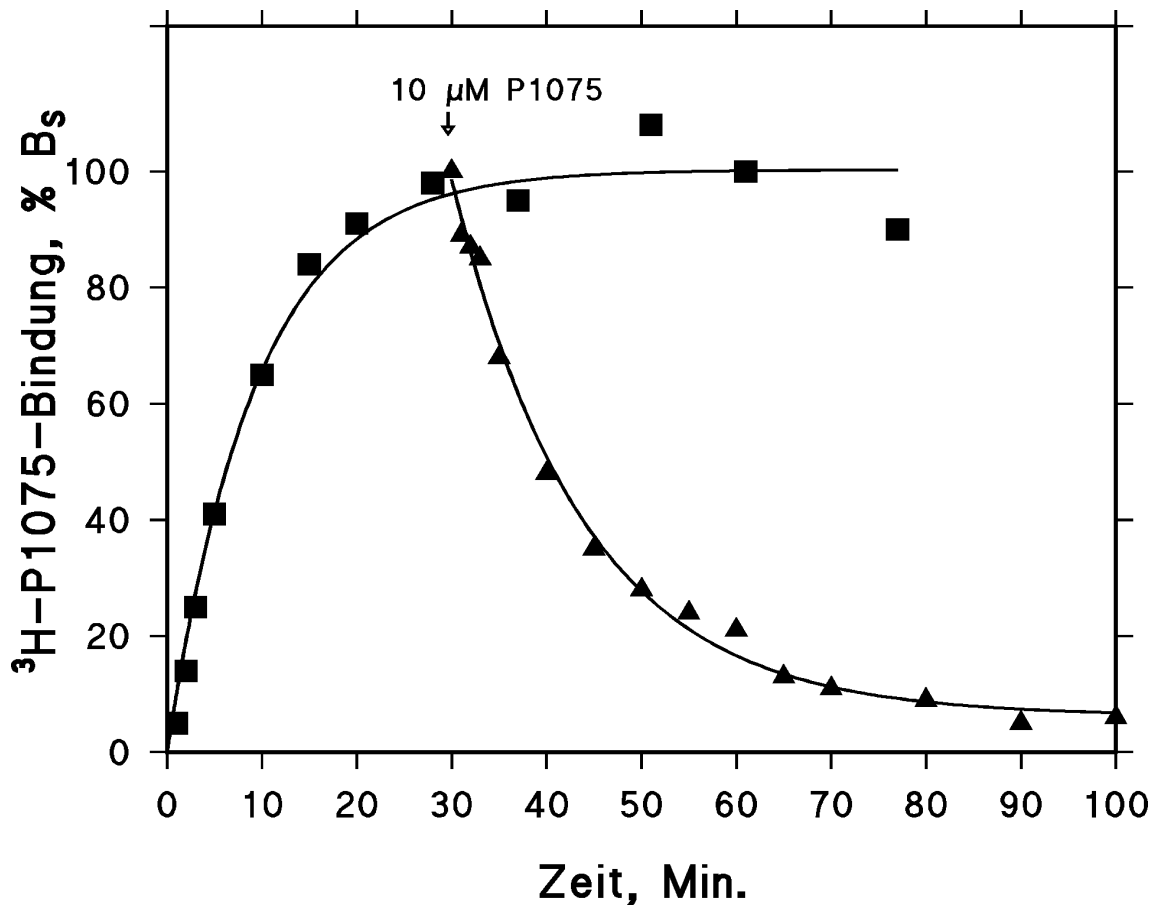


Abb. 3.1: Assoziation und Dissoziation der  $^3\text{H}$ -P1075-Bindung an A10-Zellmembranen bei 37 °C

Gezeigt sind die Daten aus einem typischen Einzelexperiment. Die Assoziationskinetik bei einer Ligandenkonzentration  $L_0 = 2,17 \text{ nM}$  ergab nach Gl. 26a (2.7.5) eine  $k_{\text{app}}$  von  $0,108 \pm 0,014 \text{ min}^{-1}$ . Dissoziation des Rezeptor-Ligandenkomplexes, gestartet durch Zugabe von  $10 \mu\text{M}$  P1075 (Pfeil), trat mit einer  $k_{\text{off}}$  von  $0,071 \pm 0,004 \text{ min}^{-1}$  auf (Gl. 30, 2.7.5). Mit diesen Werten wurde  $k_{\text{on}}$  zu  $(2,1 \pm 1,7) \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$  errechnet (Gl. 27, 2.7.5).

### 3. Ergebnisse

---

#### 3.2.5 **Kompetition der $^3\text{H}$ -P1075-Bindung an A10-Zellmembranen**

Um ein pharmakologisches Profil des  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanals an A10-Zellmembranen zu erstellen, wurde die spezifische  $^3\text{H}$ -P1075-Bindung durch einige  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanalmodulatoren gehemmt. Verwendet wurden Vertreter verschiedener Klassen von  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanalöffnern (P1075, MxS, LCRK), sowie von  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanalblockern (GBC, AZ-DF 265). Die Hemmkurven dieser  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanalmodulatoren sind in Abb. 3.2 dargestellt.

Die Daten wurden in % der spezifischen Bindung ohne Inhibitor (= 100 %) transformiert und die Hill-Funktion (2.8.1, Gl. 31a) angepasst. Die Extrapolation der  $\text{B}_{\text{MAX}}$  für  $^3\text{H}$ -P1075 aus den Daten der homologen Kompetition erfolgte über die Berechnung des Sättigungsgrades nach Gl. 19 (2.7.3).

##### 3.2.5.1 *Kompetition der $^3\text{H}$ -P1075-Bindung durch P1075*

Um das Bindungsverhalten von  $^3\text{H}$ -P1075 an Membranen von A10-Zellen zu untersuchen, wurden homologe Kompetitionsexperimente in An- und Abwesenheit des kalten (d.h. nicht radioaktiv markierten) Inhibitors P1075 durchgeführt. Die mittlere Ligandenkonzentration lag in  $n=4$  Experimenten bei  $1,95 \pm 0,08$  nM. Der Hill-Koeffizient lag mit  $0,93 \pm 0,08$  ungefähr bei 1, wie es für einen einfachen Bindungsprozess zu erwarten ist und wurde im Sinne einer Fehlerminimierung des  $\text{pIC}_{50}$ -Wertes für die endgültige Auswertung mit  $n_{\text{H}}=1$  festgesetzt. Durch die homologe Kompetition der  $^3\text{H}$ -P1075-Bindung mit nicht markiertem P1075 wurde ein  $\text{pIC}_{50}$ -Wert von  $8,01 \pm 0,04$  ermittelt, entsprechend einem  $\text{IC}_{50}$ -Wert von 9,8 (7,9; 12,2) nM. Daraus liess sich nach Cheng-Prusoff-Korrektur (Cheng und Prusoff, 1973; Gl. 16, 2.7.2) die  $\text{K}_{\text{D}}$  zu 7,9 (5,9; 10,3) nM berechnen (Tab. 3.2).

Die spezifische Bindung,  $\text{B}_{\text{S}}$ , betrug  $26 \pm 4$  fmol/mg ( $\approx 80 \pm 3$  % der totalen Bindung), sie wurde durch den Öffner P1075 vollständig verdrängt; die maximale Bindungskapazität,  $\text{B}_{\text{MAX}}$ , lag bei  $\approx 131$  (90; 172) fmol/mg (Gl. 18, 2.7.2). Die unspezifische Bindung, gemessen unter Zugabe von  $10 \mu\text{M}$  P1075, betrug  $\approx 17$  % der totalen Bindung im Gleichgewicht.

## 3.2 <sup>3</sup>H-P1075-Bindungsexperimente an A10-Zellmembranen

---

### 3.2.5.2 *Kompetition der <sup>3</sup>H-P1075-Bindung durch MxS*

Zur weiteren Charakterisierung des K<sub>ATP</sub>-Kanals an A10-Zellmembranen wurde in n = 4 heterologen Kompetitionsexperimenten die Bindung von <sup>3</sup>H-P1075 in An- und Abwesenheit des Öffners Minoxidilsulfat (MxS) bestimmt. Die Experimente wurden bei einer mittleren Ligandenkonzentration von  $L_0 = 1,80 \pm 0,05$  nM durchgeführt. Durch die Kompetition der <sup>3</sup>H-P1075-Bindung mit MxS wurde ein pIC<sub>50</sub>-Wert von  $7,07 \pm 0,03$  ermittelt, entsprechend einem IC<sub>50</sub>-Wert von 85 (68; 107) nM ermittelt. Daraus liess sich mittels Cheng-Prusoff-Korrektur nach Gl. 15 (2.7.2) die K<sub>I</sub> zu 69 (52; 91) nM berechnen (Tab. 3.2).

Die spezifische Bindung, B<sub>S</sub>, betrug  $13 \pm 2$  fmol/mg ( $\approx 76 \pm 2$  % der totalen Bindung). Der Hill-Koeffizient lag mit  $1,15 \pm 0,09$ , wie für einen einfachen Bindungsprozess zu erwarten, ungefähr bei 1. Der Öffner MxS verdrängte die spezifische Bindung nicht vollständig, sondern nur zu ca. 70 % (nicht verdrängter Anteil  $\approx 28,8 \pm 1,5$  %).

### 3.2.5.3 *Kompetition der <sup>3</sup>H-P1075-Bindung durch LCRK*

Als weiterer K<sup>+</sup>-Kanalöffner wurde bei einer mittleren Ligandenkonzentration von  $L_0 = 1,58 \pm 0,03$  nM in n = 4 Experimenten Levromakalim (LCRK) eingesetzt und die Bindung von <sup>3</sup>H-P1075 im Gleichgewicht in An- und Abwesenheit dieses Inhibitors bestimmt. Durch die heterologe Kompetition mit LCRK wurde ein pIC<sub>50</sub>-Wert von  $6,48 \pm 0,05$  ermittelt, entsprechend einem IC<sub>50</sub>-Wert von 332 (259; 424) nM ermittelt. Daraus liess sich nach Gl. 15 (2.7.2) die K<sub>I</sub> zu 276 (204; 368) nM berechnen (Tab. 3.2). Die spezifische Bindung, B<sub>S</sub>, betrug  $12 \pm 1$  fmol/mg ( $\approx 78 \pm 3$  % der totalen Bindung). Der Hill-Koeffizient lag mit  $0,87 \pm 0,10$ , nahe bei 1, wie es für einen einfachen Bindungsprozess zu erwarten ist und wurde im Sinne einer Fehlerminimierung des pIC<sub>50</sub>-Wertes für die endgültige Auswertung mit n<sub>H</sub> = 1 festgesetzt. Der Öffner LCRK verdrängte die spezifische Bindung vollständig.

### 3. Ergebnisse

---

#### 3.2.5.4 *Kompetition der <sup>3</sup>H-P1075-Bindung durch GBC*

Als weiterer K<sup>+</sup>-Kanalmodulator wurde der Blocker Glibenclamid (GBC) zur Untersuchung der <sup>3</sup>H-P1075-Bindung eingesetzt. In An- und Abwesenheit dieses Inhibitors wurde die Bindung von <sup>3</sup>H-P1075 im Gleichgewicht bei einer mittleren Ligandenkonzentration von  $L_0 = 1,86 \pm 0,04$  nM in  $n = 6$  Experimenten bestimmt. Durch die heterologe Kompetition zwischen <sup>3</sup>H-P1075 und GBC wurde ein pIC<sub>50</sub>-Wert von  $6,32 \pm 0,04$  ermittelt, entsprechend einem IC<sub>50</sub>-Wert von 474 (377; 598) nM. Daraus liess sich nach Gl. 15 (2.7.2) die Bindungskonstante K<sub>1</sub> zu 383 (287; 506) nM berechnen (Tab. 3.2).

Die spezifische Bindung, B<sub>s</sub>, betrug  $23 \pm 2$  fmol/mg ( $\approx 75 \pm 3$  % der totalen Bindung) und wurde durch den Blocker GBC vollständig verdrängt. Der Hill-Koeffizient sprach mit  $0,68 \pm 0,04$  gegen einen einfachen Bindungsprozess (2.7.4) und deutete stattdessen auf einen Bindungsprozess an zwei Bindungsstellen hin. Aus diesem Grund wurde an die Daten eine zweistufige Funktion angepasst. Hierbei ergaben sich nun die pIC<sub>50</sub>-Werte zu pIC<sub>50,1</sub> =  $6,73 \pm 0,07$  bzw. pIC<sub>50,2</sub> =  $5,04 \pm 0,21$  und somit die IC<sub>50</sub>-Werte zu 186 (126; 275) nM bzw. 9,1 (3,1; 26,4) μM. Hieraus liessen sich nach Cheng-Prusoff-Korrektur K<sub>I,1</sub> zu 150 (96; 233) nM und K<sub>I,2</sub> zu 7,3 (2,4; 22,4) μM berechnen (Tab. 3.2). Der Anteil der ersten Bindungsstelle betrug dabei  $73 \pm 5$  %. Sowohl im F-Test (s. 2.9) ( $F(95\%, 2, 9) = 19,4 < F_{\text{calc}} = 35,5$ ) als auch mit Akaike-Kriterium (Quast und Mählmann, 1982; s. 2.9) erwies sich das Modell mit zwei Bindungsstellen statistisch überlegen (Akaike: AIC<sub>1</sub> = 75,1; AIC<sub>2</sub> = 50,9).

#### 3.2.5.5 *Kompetition der <sup>3</sup>H-P1075-Bindung durch AZ-DF 265*

Schliesslich wurde neben GBC noch ein weiterer Kanalblocker, AZ-DF 265, in  $n = 4$  Experimenten untersucht. Bei der Bestimmung der Bindung von <sup>3</sup>H-P1075 in An- und Abwesenheit des Inhibitors AZ-DF 265 betrug die mittlere Ligandenkonzentration  $L_0 = 1,80 \pm 0,05$  nM. Durch die heterologe Kompetition mit AZ-DF 265 wurde ein pIC<sub>50</sub>-Wert von  $5,36 \pm 0,05$  ermittelt, entsprechend einem IC<sub>50</sub>-Wert von

### 3.2 <sup>3</sup>H-P1075-Bindungsexperimente an A10-Zellmembranen

4,4 (2,5; 5,8)  $\mu$ M ermittelt. Daraus liess sich nach Gl. 15 (2.7.2) die  $K_I$  zu 3,6 (2,5; 4,9)  $\mu$ M berechnen (Tab. 3.2).

Die spezifische Bindung,  $B_S$ , betrug  $13 \pm 2$  fmol/mg ( $\approx 75 \pm 1$  % der totalen Bindung). Der Hill-Koeffizient lag bei  $0,97 \pm 0,17$ , also ungefähr bei 1, wie es für einen einfachen Bindungsprozess zu erwarten ist und wurde im Sinne einer Fehlerminimierung des  $pIC_{50}$ -Wertes für die endgültige Auswertung mit  $n_H = 1$  festgesetzt. Der Blocker AZ-DF 265 verdrängte die spezifische Bindung auf  $7 \pm 3$  %.

**Tab. 3.2: Hemmung der <sup>3</sup>H-P1075-Bindung an A10-Zellmembranen durch  $K_{ATP}$ -Kanalmodulatoren.** Hierbei bezeichnen n die Anzahl der Experimente,  $L_0$  die gemittelte Ligandenkonzentration,  $pIC_{50}$  den negativen Logarithmus der  $IC_{50}$ -Werte, welche wiederum die halbmaximale Hemmkonzentration beschreiben,  $K_I$  die Gleichgewichtsinhibitionskonstante,  $pK_I$  den negativen Logarithmus der  $K_I$ -Werte,  $n_H$  den Hill-Koeffizienten und  $A_{MAX}$  die maximale Hemmung der spezifischen <sup>3</sup>H-P1075-Bindung.

Substanz	n	$L_0$ (nM)	$pIC_{50}$ (-log M)	$IC_{50}$ (nM)	$K_I$ (nM)	$pK_I$ (-log M)	$n_H$	$A_{MAX}$ (% $B_S$ )
<b>P1075</b>	4	$1,95 \pm 0,08$	$8,01 \pm 0,04$	9,8 (7,9; 12,2)	7,9 (5,9; 10,3)	$8,11 \pm 0,04$	$0,93 \pm 0,08$	100
<b>MxS</b>	4	$1,80 \pm 0,05$	$7,07 \pm 0,03$	85 (68; 107)	69 (52; 91)	$7,16 \pm 0,03$	$1,15 \pm 0,09$	$71 \pm 2$
<b>LCRK</b>	4	$1,58 \pm 0,03$	$6,48 \pm 0,05$	332 (259;424)	276 (204; 368)	$6,56 \pm 0,05$	$0,87 \pm 0,10$	100
<b>GBC</b> <i>einstufig</i> <i>zweistufig</i>	6	$1,86 \pm 0,04$	$6,32 \pm 0,04$	474 (377; 598)	383 (287; 506)	$6,42 \pm 0,04$	$0,68 \pm 0,01$	100
			$6,73 \pm 0,07$	186 (126; 275)	150 (96; 233)	$6,82 \pm 0,07$	1	$73 \pm 5$
			$5,04 \pm 0,21$	9,1 (3,1;26,4) $\mu$ M	7,3 (2,4;22,4) $\mu$ M	$5,14 \pm 0,21$		
<b>AZ-DF 265</b>	4	$1,80 \pm 0,05$	$5,36 \pm 0,05$	4,4 (2,5; 5,8) $\mu$ M	3,6 (2,5; 4,9) $\mu$ M	$5,45 \pm 0,05$	$0,97 \pm 0,17$	$93 \pm 7$

### 3. Ergebnisse

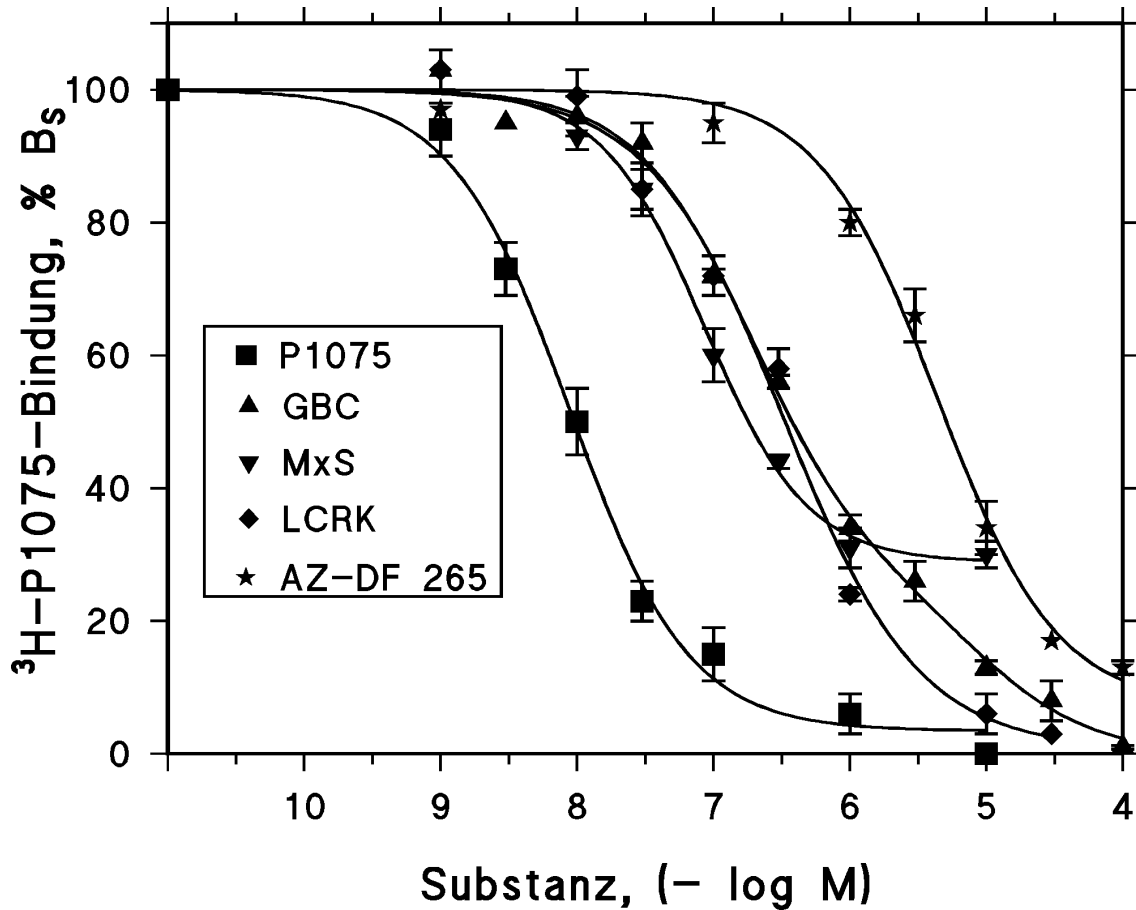


Abb. 3.2: Hemmung der  $^3\text{H}$ -P1075-Bindung an A10-Zellmembranen durch  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanalmodulatoren:

Kompetitionskurven mit den  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanalöffnern P1075 (■), Minoxidilsulfat (▼, MxS), Levromakalim (◆, LCRK), sowie mit den Blockern Glibenclamid (▲, GBC) und AZ-DF 265 (★). Die spezifische  $^3\text{H}$ -P1075-Bindung ( $L_0 = 1,80 \pm 0,03 \text{ nM}$ ) war  $17,9 \pm 1,5 \text{ fmol/mg}$  Membranprotein ( $77 \pm 1 \%$  der totalen Bindung) und wurde auf 100 % normiert; die Parameter der Anpassung an Gl. 31a (2.8.1) sind Tabelle 3.2 zu entnehmen. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 4–6 Experimenten.

### 3.3 <sup>3</sup>H-GBC-Bindungsexperimente an A10-Zellmembranen

---

#### 3.3 <sup>3</sup>H-GBC-Bindungsexperimente an A10-Zellmembranen

Um weitere Informationen über den  $K_{ATP}$ -Kanal zu erhalten und ihn nicht nur mit dem „Auge“ des Öffners, <sup>3</sup>H-P1075, sondern auch mit dem des Blockers, <sup>3</sup>H-GBC, betrachten zu können, wurde dieser Radioligand für weitere Bindungsstudien eingesetzt. Schon in früheren Untersuchungen an der Rattenaorta (Quast et al., 1992), an intakten A10-Zellen (Russ et al., 1997), sowie an der afferenten Arteriole des Glomerulums der Rattenniere (Metzger et al., 1997) wurde die <sup>3</sup>H-GBC-Bindung pharmakologisch charakterisiert. Mit den Ergebnissen dieser Studien wurden die folgenden Untersuchungen an A10-Zellmembranen verglichen.

Die Bindungsexperimente wurden mit  $1-1,5 \times 10^6$  Zellen pro Schale (entsprechend einer Konfluenz von 80–90 %) wie in Kap. 2.6.1 beschrieben durchgeführt. Es wurden hierbei 0,5 ml-Ansätze verwendet, die Proteinkonzentration betrug 0,3–0,6 mg/ml; die Reaktion fand in Puffer 2 und bei 37° C statt, die Inkubationszeit betrug 60 Minuten, die  $Na_2ATP$ -Konzentration lag bei 3 mM, die  $Mg^{2+}$ -Konzentration bei 3,8 mM.

Die Daten wurden in % der spezifischen Bindung ( $B_S$ ) ohne Inhibitor (= 100 %) transformiert und die Hill-Funktion (2.8.2, Gl. 33a bzw. 33b) angepasst. Die Extrapolation der  $B_{MAX}$  aus den Daten für die homologe Verdrängung von <sup>3</sup>H-GBC erfolgte über die Berechnung des Sättigungsgrades nach Gl. 18 (2.7.2).

#### 3.3.1 **Kompetition der <sup>3</sup>H-GBC-Bindung durch GBC**

Um das Bindungsverhalten von <sup>3</sup>H-GBC an Membranen von A10-Zellen zu untersuchen, wurden homologe Kompetitionsexperimente in An- und Abwesenheit des kalten Inhibitors GBC durchgeführt. Die mittlere Ligandenkonzentration lag in  $n = 5$  Experimenten bei  $2,04 \pm 0,05$  nM.

Durch die homologe Kompetition der <sup>3</sup>H-GBC-Bindung mit nicht-markiertem GBC wurde ein  $pIC_{50}$ -Wert von  $6,20 \pm 0,02$  ermittelt, entsprechend einem  $IC_{50}$ -Wert von

### 3. Ergebnisse

633 (536; 747) nM ermittelt. Daraus liess sich nach Gl. 16 (2.7.2) die  $K_D$  zu 631 (534; 745) nM berechnen (Tab. 3.3).

Die spezifische Bindung,  $B_S$ , die der Blocker GBC vollständig verdrängte, betrug  $30 \pm 5$  fmol/mg ( $\approx 63 \pm 1$  % der totalen Bindung), die maximale Bindungskapazität,  $B_{MAX}$ ,  $9 \pm 2$  pmol/mg. Der Hill-Koeffizient wies mit  $0,71 \pm 0,03$  auf einen Bindungsprozess an zwei Bindungsstellen hin (2.7.4). Aus diesem Grund wurde an die Daten eine zweistufige Funktion angepasst. Hierbei ergaben sich nun die  $pIC_{50}$ -Werte zu  $pIC_{50,1} = 6,84 \pm 0,12$  bzw.  $pIC_{50,2} = 5,59 \pm 0,12$ , ( $IC_{50}$ -Werte: 144 (76; 275) nM bzw. 2,6 (1,4; 4,9)  $\mu$ M), woraus sich  $K_{D,1}$  zu 142 (74; 273) nM und  $K_{D,2}$  zu 2,6 (1,4; 4,9)  $\mu$ M berechnen liessen. Der Anteil der ersten Bindungsstelle betrug dabei  $49 \pm 8$  %. Sowohl im F-Test (s. 2.9) ( $F(95 \%, 2, 8) = 19,4 < F_{calc} = 43,4$ ) als auch mit Akaike-Kriterium (Quast und Mählmann, 1982; s. 2.9) erwies sich das Modell mit zwei Bindungsstellen statistisch überlegen (Akaike:  $AIC_1 = 63,1$ ;  $AIC_2 = 37,9$ ).

Die Berechnung der  $B_{MAX}$  für die erste Bindungsstelle ergab 1 pmol/mg.

**Tab. 3.3: Hemmung der  $^3H$ -GBC-Bindung an A10-Zellmembranen durch GBC.** Hierbei bezeichnen  $n$  die Anzahl der Experimente,  $L_0$  die gemittelte Ligandenkonzentration,  $pIC_{50}$  den negativen Logarithmus der  $IC_{50}$ -Werte, welche wiederum die halbmaximale Hemmkonzentration beschreiben,  $K_I$  die Gleichgewichtsinhibitionskonstante,  $pK_I$  den negativen Logarithmus der  $K_I$ -Werte,  $n_H$  den Hill-Koeffizienten und  $A_{MAX}$  die maximale Hemmung der spezifischen  $^3H$ -GBC-Bindung.

Substanz	n	$L_0$ (nM)	$pIC_{50}$ (-log M)	$IC_{50}$ (nM)	$K_D$ (nM)	$pK_I$ (-log M)	$n_H$	$A_{MAX}$ (% $B_S$ )
GBC	5	$2,04 \pm 0,05$	$6,20 \pm 0,03$	633 (536; 747)	631 (534; 745)	$6,20 \pm 0,03$	$0,71 \pm 0,03$	100
			$6,84 \pm 0,12$	144 (76; 275)	142 (74; 273)	$6,85 \pm 0,12$	1 (fix)	$49 \pm 8$
			$5,60 \pm 0,18$	2,6 (1,4; 4,9) $\mu$ M	2,6 (1,4; 4,9) $\mu$ M	$5,60 \pm 0,18$	1 (fix)	



### 3.3 $^3\text{H}$ -GBC-Bindungsexperimente an A10-Zellmembranen

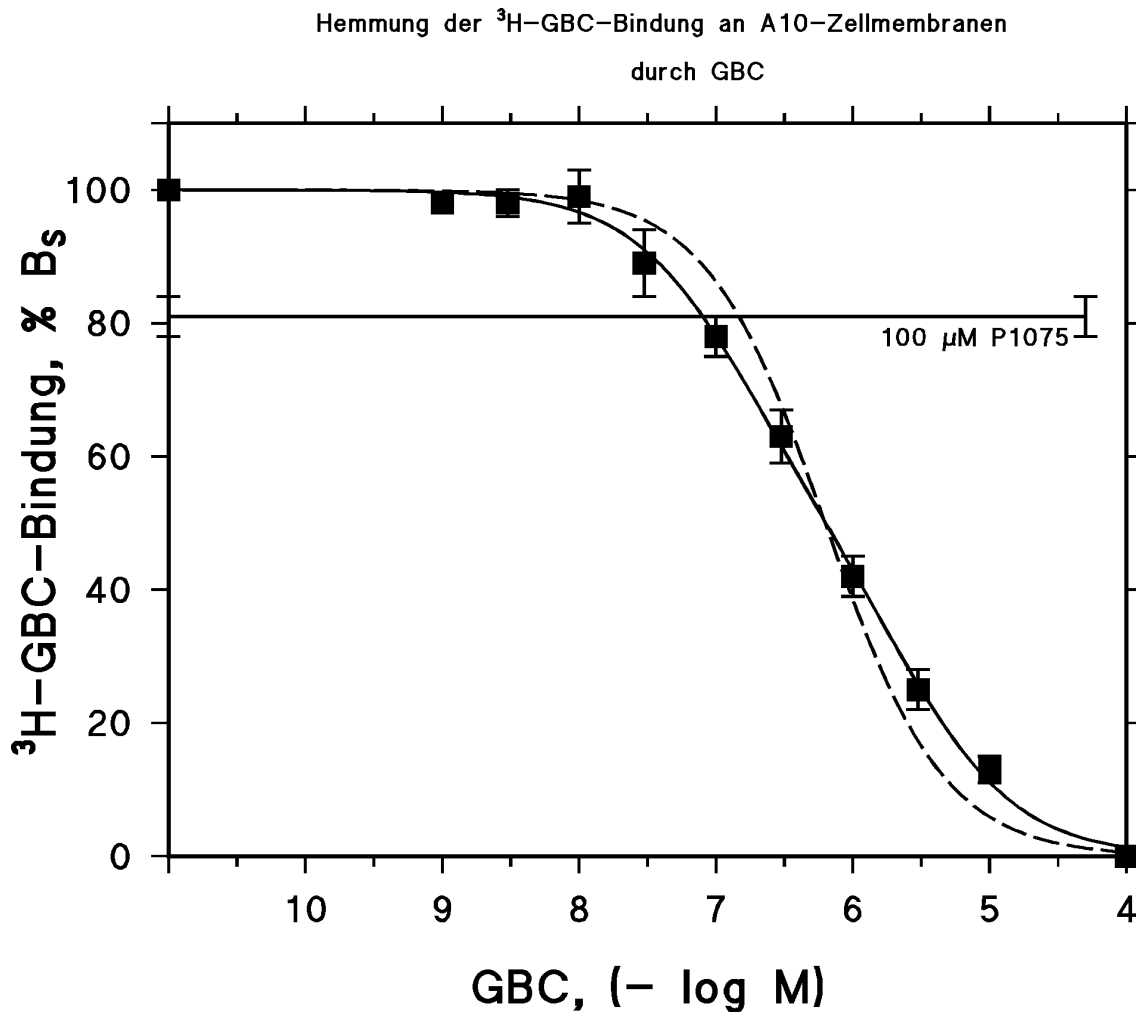


Abb. 3.3: Hemmung der  $^3\text{H}$ -GBC-Bindung an A10-Zellmembranen durch GBC.

Homologe Kompetitionskurve mit dem Blocker Glibenclamid (■, GBC). Die spezifische  $^3\text{H}$ -GBC-Bindung ( $L_0 = 2,04 \pm 0,05$  nM) war  $30 \pm 5$  fmol/mg Membranprotein ( $63 \pm 1$  % der totalen Bindung) und wurde auf 100 % normiert; die Parameter der Anpassung an Gl. 33a (1-Komponentenmodell, gestrichelte Linie (---)) bzw. 33b (2-Komponentenmodell, durchgezogene Linie (-)) (2.8.2) sind Tab. 3.3 zu entnehmen. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 5 Experimenten. Weiterhin ist der durch den Öffner P1075 ( $100 \mu\text{M}$ ) verdrängbare Anteil der  $^3\text{H}$ -GBC-Bindung aufgetragen.

### 3. Ergebnisse

---

#### 3.3.2 Konkurrenz der $^3\text{H}$ -GBC-Bindung durch P1075

Zur Untersuchung der Öffnerempfindlichkeit der  $^3\text{H}$ -GBC-Bindung wurde diese im Gleichgewicht in An- und Abwesenheit des Inhibitors P1075 bestimmt. In einer Serie von  $n = 5$  Experimenten betrug die mittlere Ligandenkonzentration  $L_0 = 2,04 \pm 0,05$  nM. Die Daten wurden in % der spezifischen Bindung ohne Inhibitor (= 100 %) transformiert. Die spezifische Bindung,  $B_s$ , betrug  $29 \pm 5$  fmol/mg. Selbst bei einer hohen Inhibitorkonzentration von  $100 \mu\text{M}$  konnte der Öffner P1075 die spezifische Bindung nur zu ca. 20 % verdrängen (auf  $80 \pm 3$  %).

#### 3.4 $^3\text{H}$ -P1075-Bindungsexperimente an ganzen A10-Zellen

Um später Ganzzelleexperimente mit  $^3\text{H}$ -GBC als Radioliganden durchführen zu können und in diesem Versuchsablauf das bisher noch nicht bekannte pharmakologische Profil der  $^3\text{H}$ -GBC-Bindung an ganzen A10-Zellen zu erstellen, sollte zunächst die  $^3\text{H}$ -P1075-Bindung an ganzen A10-Zellen etabliert werden. Früher waren bereits Versuche mit  $^3\text{H}$ -P1075 an ganzen A10-Zellen in der Schale durchgeführt worden (Russ et al., 1997), hierbei wurden die Zellen jedoch direkt in der Schale mit dem Radioliganden inkubiert; diese Methode lieferte Ergebnisse mit einem sehr grossen Fehler, da die Anzahl der Zellen pro Kulturschale von 1 bis 1,5 Millionen streute. Aus diesem Grund sollte nun eine Methode entwickelt werden, bei der die Zellen mehrerer Schalen von der Schalenoberfläche abgelöst und zusammen als ein Proteinstamm verwendet wurden. Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von 80-90 % verwendet, entsprechend  $1 - 1,5 \cdot 10^6$  Zellen pro Schale. A10-Zellen haften sehr stark an der Schalenoberfläche und können von dieser nur durch Trypsinierung oder mechanisch mit einem Zellschaber abgelöst werden. In diesem Falle wurde versucht, die Zellen mittels Zellschaber von der Schalenoberfläche zu lösen (2.4.4). Problematisch erwies sich dabei die Tatsache, dass eine grosse Anzahl an Zellen dieses Verfahren nicht überlebte. Enthielt eine Schale

### 3.4 <sup>3</sup>H-P1075-Bindungsexperimente an ganzen A10-Zellen

---

vorher ca. 1 – 1,5 Mio. Zellen, so waren im Proteinansatz nach Ablösen und Zentrifugation (400 x g) nur noch  $(3,6 \pm 0,7) \cdot 10^5$  (n = 4) lebende Zellen pro Schale enthalten. Der Verlust ist teils auf die Zentrifugation, teils auf die mechanische Strapazierung der Zellen beim Abschaben zurückzuführen, wobei viele Zellen zerstört wurden. Dadurch enthielt der Proteinansatz nicht nur ganze Zellen, sondern u.a. auch Zellmembranen, welche durch die Zentrifugation (400 x g) nicht abgetrennt wurden.

Die Filtrationsbindungsexperimente wurden wie in Kap. 2.6.1 beschrieben durchgeführt; als Inkubationspuffer (Inkubationszeit 30 Min. bei 37° C) verwendet wurde Puffer 2b unter Zusatz von 3,8 mM MgCl<sub>2</sub> und 3 mM Na<sub>2</sub>ATP.

In Vorversuchen, homologen Konkurrenzexperimenten mit <sup>3</sup>H-P1075, wurden Werte erzielt, die denen der Membranversuche entsprechen ( $pIC_{50} \approx 7,87$ ).

#### 3.5 $^3\text{H}$ -P1075-Bindungsexperimente an SUR2B-transfizierten HEK293-Zellmembranen: Untersuchung von $\text{P}_2$ -Rezeptorantagonisten

Die Bindungsexperimente wurden mit 7–10 Millionen Zellen pro Schale (entsprechend einer Konfluenz von 60–80 %) wie in Kap. 2.6.1 beschrieben durchgeführt.

Die Proteinkonzentration in den Ansätzen bewegte sich zwischen 0,1 und 0,2 mg/ml; die Reaktion fand in Puffer 4 und bei 37 °C statt, die Inkubationszeit betrug 30 Minuten, die  $\text{Na}_2\text{ATP}$ -Konzentration lag bei 3 mM, die  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentration betrug 3,8 mM.

##### 3.5.1 **Kompetition der $^3\text{H}$ -P1075-Bindung an HEK293-Zellmembranen (SUR2B)**

Zielsetzung der folgenden Experimente bestand darin, herauszufinden, ob sich unter den ausgewählten Testsubstanzen potente Inhibitoren der spezifischen  $^3\text{H}$ -P1075-Bindung am SUR2B befinden (1.7). Hierzu wurden zunächst Screening-Versuche mit allen Substanzen durchgeführt. In diesen Experimenten wurden jeweils die totale, die unspezifische und die spezifische  $^3\text{H}$ -P1075-Bindung in Gegenwart von 1  $\mu\text{M}$  bzw. 100  $\mu\text{M}$  Kompetitor sowie in dessen Abwesenheit bestimmt. Auf diese Weise wurden diejenigen Testsubstanzen selektiert, welche eine Verdrängung der spezifischen  $^3\text{H}$ -P1075-Bindung bewirkten. Mit diesen Substanzen wurden sodann  $^3\text{H}$ -P1075-Kompetitionsexperimente durchgeführt, um ihre Potenz zu bestimmen.

Die Hemmkurven dieser Testsubstanzen sind in Abb. 3.4 dargestellt.

Die Daten wurden in % der spezifischen Bindung ohne Inhibitor (= 100 %) transformiert und die Hill-Funktion (2.8.1, Gl.31a) angepasst.

##### 3.5.1.1 *Kompetition der $^3\text{H}$ -P1075-Bindung an SUR2B durch $\text{P}_2$ -Rezeptormodulatoren*

Im Rahmen der Screening-Versuche (s.o.) wurde die Bindung von  $^3\text{H}$ -P1075 im Gleichgewicht in An- und Abwesenheit der oben aufgeführten Inhibitoren bestimmt. In

### 3.5 <sup>3</sup>H-P1075-Bindungsexperimente an SUR2B-transfizierten HEK293-Zellmembranen

einigen Fällen stellte sich heraus, dass der jeweilige Inhibitor selbst in einer Konzentration von 100  $\mu$ M den Radioliganden <sup>3</sup>H-P1075 nur zu maximal 25 % verdrängen konnte (Tab. 3.4).

**Tabelle 3.4: Screening-Experimente zur Hemmung der <sup>3</sup>H-P1075-Bindung an SUR2B durch P<sub>2</sub>-Rezeptormodulatoren.**

A<sub>1  $\mu$ M</sub> bzw. A<sub>100  $\mu$ M</sub> beschreiben denjenigen Anteil der spezifischen Bindung, der bei einer Inhibitorkonzentration von 1  $\mu$ M bzw. 100  $\mu$ M **nicht** verdrängt wurde. Weiter stehen n für die Anzahl der durchgeführten Experimente, L<sub>0</sub> für die Ligandenkonzentration und B<sub>S</sub> für die spezifische Bindung.

Substanz	n	L <sub>0</sub> (nM)	B <sub>S</sub> (fmol/mg)	A <sub>1 <math>\mu</math>M</sub> (% B <sub>S</sub> )	A <sub>100 <math>\mu</math>M</sub> (% B <sub>S</sub> )
Phloxin B	4	1,90 ± 0,05	168 ± 27	29 ± 3	-
Suramin	4	1,98 ± 0,04	184 ± 26	90 ± 0	12 ± 2
Evans Blue	5	1,59 ± 0,03	106 ± 7	89 ± 4	7 ± 2
Cibacron Blue	5	1,53 ± 0,03	88 ± 18	86 ± 4	3 ± 2
Reactive Red 2	7	1,53 ± 0,03	105 ± 14	99 ± 1	42 ± 7
DIDS	4	1,59 ± 0,05	75 ± 14	71 ± 4	7 ± 3
AP <sub>2</sub> A	5	1,51 ± 0,07	86 ± 10	98 ± 3	100 ± 2
AP <sub>3</sub> A	4	1,43 ± 0,05	93 ± 13	100 ± 4	76 ± 3
AP <sub>4</sub> A	4	1,94 ± 0,02	93 ± 7	99 ± 2	76 ± 1
AP <sub>5</sub> A	4	1,59 ± 0,03	103 ± 8	-	98 ± 6
PPADS	6	1,63 ± 0,06	84 ± 10	100 ± 3	82 ± 2
TNP-ATP	4	1,59 ± 0,03	103 ± 3	-	103 ± 6
$\beta$ -Methylen-ATP	5	1,51 ± 0,07	86 ± 10	98 ± 2	95 ± 3

Da sich die im unteren Teil von Tabelle 3.4 aufgeführten Substanzen somit in den Screening-Versuchen nicht als taugliche K<sub>ATP</sub>-Kanalmodulatoren erwiesen hatten, wurden mit ihnen keine Hemmkurven erstellt.

Die im oberen Teil der Tabelle aufgeführten Testsubstanzen jedoch hatten in den Screening-Versuchen ihre Fähigkeit zur Verdrängung von <sup>3</sup>H-P1075 gezeigt. Mit diesen Substanzen wurden mittels <sup>3</sup>H-P1075-Kompetitionsexperimenten Hemmkurven erstellt und ihre Potenz bestimmt. Die erhaltenen Ergebnisse der einzelnen Substanzen sind im folgenden aufgeführt (Tab. 3.5).

### 3. Ergebnisse

---

#### 3.5.1.1.1 Konkurrenz der $^3\text{H}$ -P1075-Bindung an SUR2B durch Phloxin B

Die Bindung von  $^3\text{H}$ -P1075 im Gleichgewicht wurde in An- und Abwesenheit des Inhibitors Phloxin B bestimmt. Die Experimente ( $n = 4$ ) wurden bei einer mittleren Ligandenkonzentration von  $L_0 = 1,90 \pm 0,05$  nM durchgeführt. Durch die heterologe Konkurrenz von  $^3\text{H}$ -P1075 mit Phloxin B wurde ein  $\text{pIC}_{50}$ -Wert von  $6,50 \pm 0,03$ , entsprechend einem  $\text{IC}_{50}$ -Wert von 314 (259; 382) nM ermittelt. Daraus liess sich nach Gl. 15 (2.7.2)  $K_I$  zu 253 (196; 322) nM berechnen (Tab. 3.5).

Die spezifische Bindung,  $B_S$ , betrug  $168 \pm 27$  fmol/mg ( $\approx 78 \pm 3$  % der totalen Bindung). Sie wurde von Phloxin B nicht vollständig, sondern nur zu ca. 93 % verdrängt. Der Hill-Koeffizient lag mit  $n_H = 1,12 \pm 0,07$  ungefähr bei 1, wie es für einen einfachen Bindungsprozess zu erwarten ist (2.7.4). Aus diesem Grund wurde an die Daten eine einstufige Funktion angepasst.

#### 3.5.1.1.2 Konkurrenz der $^3\text{H}$ -P1075-Bindung an SUR2B durch Suramin

Die Potenz des als  $\text{P}_2$ -Rezeptorantagonist (Ralevic und Burnstock, 1998) bekannten Suramin wurde in  $n = 4$  Experimenten bei einer mittleren Ligandenkonzentration von  $L_0 = 1,98 \pm 0,04$  nM durch Konkurrenz mit der Bindung von  $^3\text{H}$ -P1075 im Gleichgewicht bestimmt. Durch die heterologe Konkurrenz der beiden Substanzen wurde ein  $\text{pIC}_{50}$ -Wert von  $5,19 \pm 0,03$  ermittelt, entsprechend einem  $\text{IC}_{50}$ -Wert von 6,46 (5,19; 8,05)  $\mu\text{M}$ . Daraus liess sich nach Gl. 15 (2.7.2)  $K_I$  zu 5,16 (3,89; 6,75)  $\mu\text{M}$  (Tab. 3.5) berechnen.

Die spezifische Bindung,  $B_S$ , betrug  $184 \pm 26$  fmol/mg ( $\approx 82 \pm 2$  % der totalen Bindung). Suramin verdrängte die spezifische Bindung nicht vollständig, sondern nur zu ca. 92 %. Der Hill-Koeffizient betrug  $1,16 \pm 0,09$  und lag somit ungefähr bei 1, wie es für einen einfachen Bindungsprozess zu erwarten ist (2.7.4), weshalb an die Daten eine einstufige Funktion angepasst wurde.

### 3.5 <sup>3</sup>H-P1075-Bindungsexperimente an SUR2B-transfizierten HEK293-Zellmembranen

#### 3.5.1.1.3 Konkurrenz der <sup>3</sup>H-P1075-Bindung an SUR2B durch Evans Blue

In An- und Abwesenheit des als Inhibitor fungierenden P<sub>2</sub>-Rezeptorantagonisten Evans Blue (Ralevic und Burnstock, 1998) wurde die Bindung von <sup>3</sup>H-P1075 im Gleichgewicht in n = 5 Experimenten bestimmt. Die mittlere Ligandenkonzentration betrug  $L_0 = 1,59 \pm 0,03$  nM. Es wurde ein pIC<sub>50</sub>-Wert von  $5,38 \pm 0,02$  ermittelt, entsprechend einem IC<sub>50</sub>-Wert von 4,13 (3,74; 4,55) μM. Daraus liess sich nach Gl. 15 (2.7.2) K<sub>I</sub> zu 3,43 (2,95; 3,94) μM berechnen (Tab. 3.5).

Die spezifische Bindung, B<sub>S</sub>, betrug  $106 \pm 7$  fmol/mg ( $\approx 81 \pm 1$  % der totalen Bindung). Evans Blue verdrängte die spezifische Bindung zu ca. 94 %. Der Hill-Koeffizient betrug  $n_H = 1,50 \pm 0,07$ .

#### 3.5.1.1.4 Konkurrenz der <sup>3</sup>H-P1075-Bindung an SUR2B durch Cibacron Blue

Unter Zugabe des nicht-kompetitiven P<sub>2</sub>-Rezeptorantagonisten Cibacron Blue (Ralevic und Burnstock, 1998) in ansteigender Konzentration wurde in n = 4 Experimenten wurden bei einer mittleren Ligandenkonzentration von  $L_0 = 1,53 \pm 0,03$  nM die Bindung von <sup>3</sup>H-P1075 im Gleichgewicht bestimmt. Es wurde ein pIC<sub>50</sub>-Wert von  $5,32 \pm 0,02$  ermittelt, entsprechend einem IC<sub>50</sub>-Wert von 4,81 (4,21; 5,50) μM. Daraus liess sich nach Gl. 15 (2.7.2) K<sub>I</sub> zu 4,03 (3,34; 4,79) μM berechnen (Tab. 3.5).

Die spezifische Bindung, B<sub>S</sub>, die Cibacron Blue vollständig verdrängte, betrug  $88 \pm 18$  fmol/mg ( $\approx 75 \pm 2$  % der totalen Bindung). Der Hill-Koeffizient lag mit  $n_H = 1,08 \pm 0,06$  ungefähr bei 1, wie es für einen einfachen Bindungsprozess zu erwarten ist (2.7.4); er wurde im Sinne einer Fehlerminimierung des pIC<sub>50</sub>-Wertes für die endgültige Auswertung mit  $n_H = 1$  festgesetzt. An die Daten wurde eine einstufige Funktion angepasst (Gl. 31b, 2.8.1).

### 3. Ergebnisse

---

#### 3.5.1.1.5 Konkurrenz der $^3\text{H}$ -P1075-Bindung an SUR2B durch Reactive Red 2

Die Bindung von  $^3\text{H}$ -P1075 im Gleichgewicht in An- und Abwesenheit des als Inhibitor wirkenden kompetitiven  $\text{P}_2$ -Rezeptorantagonisten Reactive Red 2, wurde in  $n = 5$  Experimenten bei einer mittleren Ligandenkonzentration von  $L_0 = 1,53 \pm 0,03 \text{ nM}$  bestimmt. Es ergab sich ein  $\text{pIC}_{50}$ -Wert von  $4,88 \pm 0,01$ , entsprechend einem  $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $13,27 (12,38; 14,23) \mu\text{M}$ . Daraus liess sich nach Gl. 15 (2.7.2)  $K_I$  zu  $11,08 (10,20; 12,41) \mu\text{M}$  berechnen (Tab. 3.5).

Die spezifische Bindung,  $B_s$ , betrug  $106 \pm 7 \text{ fmol/mg}$  ( $\approx 80 \pm 3 \%$  der totalen Bindung). Reactive Red 2 verdrängte die spezifische Bindung nur zu ca. 61 %. Der Hill-Koeffizient betrug  $1,50 \pm 0,05$ .

#### 3.5.1.1.6 Konkurrenz der $^3\text{H}$ -P1075-Bindung an SUR2B durch DIDS

Zur Bestimmung der Potenz des Stilbendisulfonates DIDS, eines  $\text{P}_2$ -Rezeptorantagonisten mit Strukturähnlichkeit zu GBC (1.7), zur Verdrängung von  $^3\text{H}$ -P1075 vom SUR wurde die  $^3\text{H}$ -P1075-Bindung in  $n = 5$  Experimenten in An- und Abwesenheit des Inhibitors DIDS gemessen. Die Experimente wurden bei einer mittleren Ligandenkonzentration von  $L_0 = 1,59 \pm 0,05 \text{ nM}$  durchgeführt. Dabei konnte ein  $\text{pIC}_{50}$ -Wert von  $5,34 \pm 0,03$  ermittelt werden, entsprechend einem  $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $4,59 (3,88; 5,43) \mu\text{M}$ . Daraus liess sich nach Gl. 15 (2.7.2)  $K_I$  zu  $3,82 (3,06; 4,70) \mu\text{M}$  berechnen (Tab. 3.5).

Die spezifische Bindung,  $B_s$ , betrug  $75 \pm 14 \text{ fmol/mg}$  ( $\approx 73 \pm 4 \%$  der totalen Bindung). DIDS verdrängte die spezifische Bindung vollständig. Der Hill-Koeffizient lag mit  $n_H = 0,72 \pm 0,03$  nicht wie für einen einfachen Bindungsprozess zu erwarten (2.7.4) ungefähr bei 1, sondern deutete auf einen Bindungsprozess an zwei Bindungsstellen hin. Aus diesem Grund wurde an die Daten eine zweistufige Funktion angepasst (Gl. 33b, 2.8.2). Hierbei ergaben sich nun die  $\text{pIC}_{50}$ -Werte zu  $\text{pIC}_{50,1} = 6,18 \pm 0,18$  bzw.  $\text{pIC}_{50,2} = 4,88 \pm 0,11$ , daraus liessen sich  $\text{IC}_{50,1} = 655 (232; 1851) \text{ nM}$  bzw.  $\text{IC}_{50,2} = 13,06 (7,18; 23,74) \mu\text{M}$  berechnen und es folgten  $K_{I,1}$  zu  $545 (183; 1603) \text{ nM}$



### 3.5 <sup>3</sup>H-P1075-Bindungsexperimente an SUR2B-transfizierten HEK293-Zellmembranen

und  $K_{I,2}$  zu  $10,86 (5,66; 20,56) \mu\text{M}$ . Der Anteil der ersten Bindungsstelle betrug  $36 \pm 9 \%$ . Sowohl im F-Test (s. 2.9) ( $F(95 \%, 2, 6) = 19,3 < F_{\text{calc}} = 29,2$ ) als auch mit Akaike-Kriterium (Quast und Mähmann, 1982; s. 2.9) erwies sich das Modell mit zwei Bindungsstellen statistisch überlegen (Akaike:  $AIC_1 = 52,2$ ;  $AIC_2 = 32,9$ ).

**Tab. 3.5: Hemmung der <sup>3</sup>H-P1075-Bindung an SUR2B durch P<sub>2</sub>-Rezeptormodulatoren.** Hierbei bezeichnen n die Anzahl der Experimente,  $L_0$  die gemittelte Ligandenkonzentration,  $pIC_{50}$  den negativen Logarithmus der  $IC_{50}$ -Werte, welche wiederum die halbmaximale Hemmkonzentration beschreiben,  $K_I$  die Gleichgewichtsdissoziationskonstante,  $pK_I$  den negativen Logarithmus der  $K_I$ -Werte,  $n_H$  den Hill-Koeffizienten und  $A_{\text{MAX}}$  die maximale Hemmung der spezifischen <sup>3</sup>H-P1075-Bindung.

Substanz	n	$L_0$ (nM)	$pIC_{50}$ (-log M)	$IC_{50}$	$K_I$	$pK_I$ (-log M)	$n_H$	$A_{\text{MAX}}$ (% B <sub>s</sub> )
Phloxin B	4	$1,90 \pm 0,05$	$6,50 \pm 0,03$	314 (259; 382)nM	259 (196; 322)nM	$6,59 \pm 0,03$	$1,12 \pm 0,07$	93
Suramin	4	$1,98 \pm 0,04$	$5,19 \pm 0,03$	6,5 (5,2; 8,1) $\mu\text{M}$	5,2 (3,9; 6,8) $\mu\text{M}$	$5,28 \pm 0,03$	$1,16 \pm 0,09$	92
Cibacron Blue	4	$1,53 \pm 0,03$	$5,32 \pm 0,02$	4,8 (4,2; 5,5) $\mu\text{M}$	4,0 (3,3; 4,8) $\mu\text{M}$	$5,40 \pm 0,02$	$1,08 \pm 0,06$ =>1 (fix)	100
Evans Blue	5	$1,59 \pm 0,03$	$5,38 \pm 0,02$	4,1 (3,7; 4,6) $\mu\text{M}$	3,4 (3,0; 3,9) $\mu\text{M}$	$5,47 \pm 0,02$	$1,50 \pm 0,07$	94
Reactive Red 2	5	$1,53 \pm 0,03$	$4,88 \pm 0,01$	13,3 (12,4; 14,2) $\mu\text{M}$	11,1 (10,2; 12,4) $\mu\text{M}$	$4,95 \pm 0,01$	$1,50 \pm 0,05$	61
DIDS	5	$1,59 \pm 0,05$	$5,34 \pm 0,03$	4,6 (3,9; 5,4) $\mu\text{M}$	3,8 (3,1; 4,7) $\mu\text{M}$	$5,42 \pm 0,03$	$0,72 \pm 0,03$	100
einstufig	$6,18 \pm 0,18$		655 (232; 1851)nM	545 (183; 1603)nM	$6,26 \pm 0,18$	1 (fix)		
zweistufig	$4,88 \pm 0,11$		13,1 (7,2; 23,7) $\mu\text{M}$	10,9 (5,7; 20,6) $\mu\text{M}$	$4,96 \pm 0,11$	1 (fix)		

### 3. Ergebnisse

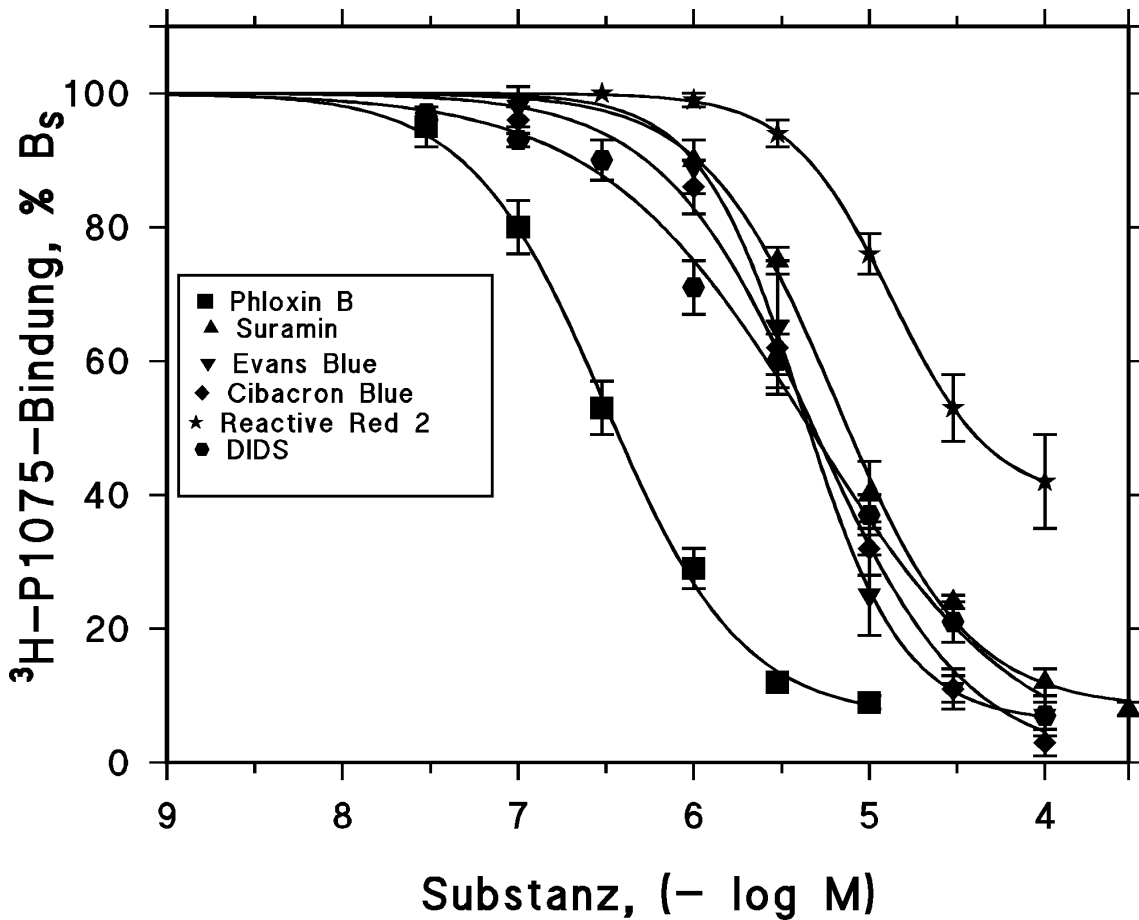


Abb. 3.4: Hemmung der  $^3\text{H}$ -P1075-Bindung an SUR2B durch verschiedene  $P_2$ -Rezeptor-modulatoren.

Kompetitionskurven mit den Inhibitoren Phloxin B (■), Suramin (▲), Evans Blue (▼), Cibacron Blue (◆), Reactive Red 2 (★) und DIDS (●). Die spezifische  $^3\text{H}$ -P1075-Bindung ( $L_0 = 1,66 \pm 0,03$  nM) war  $115 \pm 10$  fmol/mg Membranprotein ( $78 \pm 1$  % der totalen Bindung) und wurde auf 100 % normiert; die Parameter der Anpassung an Gl. 31a bzw. Gl. 31b (2.8.1) bzw. Gl. 33b (2.8.2) im Falle von DIDS sind Tabelle 3.5 zu entnehmen. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 4-7 Experimenten.

### 3.5 <sup>3</sup>H-P1075-Bindungsexperimente an SUR2B-transfizierten HEK293-Zellmembranen

#### 3.5.2 Aktivierung der <sup>3</sup>H-P1075-Bindung an HEK293-Zellmembranen (SUR2B)

Die getesteten Substanzen sind als P<sub>2</sub>-Modulatoren bekannt (Ralevic und Burnstock, 1998). An diesen Rezeptoren wirken normalerweise körpereigene Nukleotide (ATP, ADP, UTP, UDP). Nachdem durch die Konkurrenzexperimente mit diesen Substanzen wie auch mit Phloxin B gezeigt wurde, dass sie auch am K<sub>ATP</sub>-Kanal wirken (3.5.1), stellte sich die Frage, ob dieser Effekt möglicherweise auf eine Interferenz mit der dort vorliegenden Nukleotidbindungsstelle zurückzuführen ist. Dies wurde für einige der Substanzen untersucht, indem die ATP-Abhängigkeit der <sup>3</sup>H-P1075-Bindung in Abwesenheit und Gegenwart der Substanz gemessen wurde.

Die Bindungsexperimente wurden mit 7–10 Millionen Zellen pro Schale (entsprechend einer Konfluenz von 60–80 %) wie in Kap. 2.6.1 beschrieben durchgeführt.

Es wurden hierbei 0,3 ml-Ansätze verwendet, die Proteinkonzentration in den Ansätzen bewegte sich zwischen 0,1 und 0,2 mg/ml; die Reaktion fand in Puffer 4 und bei 37 °C statt, die Inkubationszeit betrug 30 Minuten, die Mg<sup>2+</sup>-Konzentration betrug 3,8 mM.

Die Daten wurden in % der spezifischen Bindung mit maximaler ATP-Konzentration (= 100 %) transformiert und die Aktivierungsgleichung (Gl. 14b, 2.7.2) angepasst, der Hill-Koeffizient wurde mit n<sub>H</sub> = 1 festgesetzt.

##### 3.5.2.1 Aktivierung der <sup>3</sup>H-P1075-Bindung an SUR2B durch ATP

In Kontrollexperimenten wurde die Abhängigkeit <sup>3</sup>H-P1075-Bindung von der zugegebenen Na<sub>2</sub>ATP-Konzentration untersucht. Hierzu wurde die Bindung von <sup>3</sup>H-P1075 im Gleichgewicht bei steigenden Konzentrationen an Na<sub>2</sub>ATP gemessen. Die Experimente (n = 4) wurden bei einer mittleren Ligandenkonzentration von 1,74 ± 0,11 nM durchgeführt.

Die Aktivierung der <sup>3</sup>H-P1075-Bindung durch ATP ergab einen pEC<sub>50</sub>-Wert (halbmaximale Aktivierungskonzentration) von 5,36 ± 0,03, entsprechend einem EC<sub>50</sub>-Wert von 4,40 (3,75; 5,16) μM. Bei einer Konzentration von ≈ 4,4 μM ATP ist die

### 3. Ergebnisse

Bindung von  $^3\text{H}$ -P1075 an seinen Rezeptor demzufolge halbmaximal. Die spezifische Bindung,  $B_s$ , betrug  $126 \pm 17$  fmol/mg ( $\approx 78 \pm 2$  % der totalen Bindung). Der Hill-Koeffizient betrug  $0,96 \pm 0,07$ , er lag damit ungefähr bei 1, wie es für einen einfachen Bindungsprozess zu erwarten ist und wurde im Sinne einer Fehlerminimierung des  $\text{pIC}_{50}$ -Wertes für die endgültige Auswertung mit  $n_H = 1$  festgesetzt.

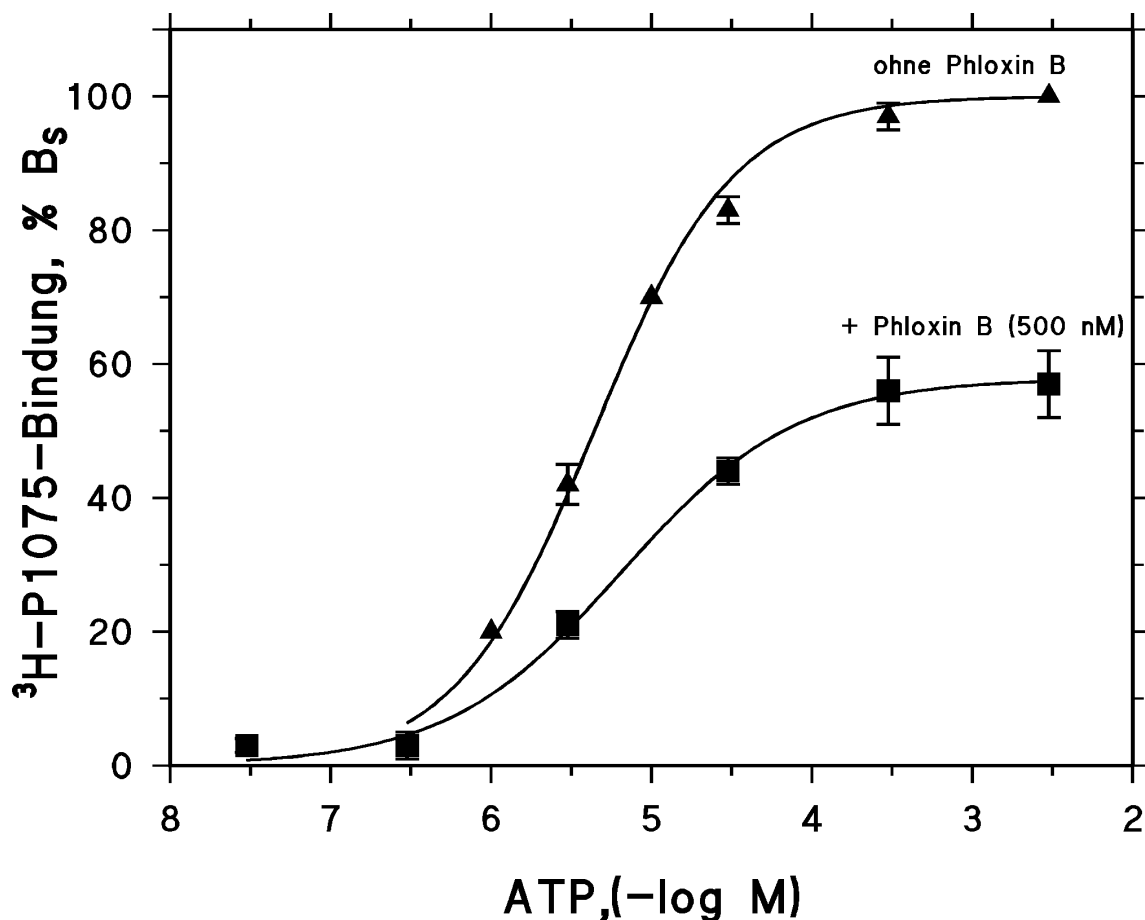


Abb. 3.5: Abhängigkeit der spezifischen  $^3\text{H}$ -P1075-Bindung an SUR2B von der ATP-Konzentration  $\pm$  Phloxin B (500 nM).

ATP wurde als  $\text{Na}^+$ -Salz hinzugegeben. Die spezifische  $^3\text{H}$ -P1075-Bindung in Gegenwart von 3 mM ATP ( $L_0 = 1,74 \pm 0,11$  nM) betrug  $126 \pm 17$  fmol/mg Membranprotein ( $78 \pm 2$  % der totalen Bindung) und wurde auf 100 % normiert; die Parameter der Anpassung an Gl. 20b (2.7.3) sind Tabelle 3.6 zu entnehmen. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 4-5 Experimenten.

### **3.5 <sup>3</sup>H-P1075-Bindungsexperimente an SUR2B-transfizierten HEK293-Zellmembranen**

---

#### *3.5.2.2 Aktivierung der <sup>3</sup>H-P1075-Bindung an SUR2B durch ATP unter Zugabe von Phloxin B (500 nM)*

Um zu untersuchen, ob Phloxin B mit der Nukleotidbindungsstelle interferiert, wurde die <sup>3</sup>H-P1075-Bindung wie oben beschrieben bei steigenden Konzentrationen an Na<sub>2</sub>ATP gemessen; zusätzlich jedoch wurde Phloxin B in einer Konzentration von 500 nM zugegeben. Diese Konzentration wurde gewählt, da sie ungefähr der IC<sub>50</sub> von Phloxin B entspricht (3.5.1.1.1), so dass eine Verdrängung der <sup>3</sup>H-P1075-Bindung um ungefähr die Hälfte zu erwarten ist. Stets wurde die totale Bindung in Gegenwart von 3 mM ATP ohne Zugabe von Phloxin B als Kontrollwert (ATP-Aktivierung ohne Phloxin B) mitbestimmt und 100 % gesetzt.

Die Experimente (n = 5) wurden bei einer Ligandenkonzentration von  $1,59 \pm 0,9$  nM durchgeführt. Die Aktivierung der <sup>3</sup>H-P1075-Bindung durch ATP in Gegenwart von 500 nM Phloxin B ergab einen pEC<sub>50</sub>-Wert von  $5,25 \pm 0,08$ , entsprechend einem EC<sub>50</sub>-Wert von 5,7 (3,5; 9,3) μM. Bei einer Konzentration von ca. 5,7 μM ATP ist die Bindung von <sup>3</sup>H-P1075 an seinen Rezeptor in Gegenwart von Phloxin B somit halbmaximal.

Die spezifische Bindung, B<sub>s</sub>, betrug  $66 \pm 8$  fmol/mg ( $\approx 59 \pm 3$  % der totalen Bindung unter Zugabe von Phloxin B). Dies bedeutet eine Reduktion der spezifischen Bindung mit Phloxin B auf ca. 56 % im Vergleich zur parallel gemessenen spezifischen Bindung in Gegenwart von 3 mM ATP ohne Phloxin B. Diese Bindungsabnahme ist auf die Zugabe von Phloxin B zurückzuführen, da Phloxin B gemäss seines Sättigungsgrades bei einer Konzentration von 500 nM 61 (57; 66) % der Rezeptoren besetzt hält (3.5.1.1.1) und eine Bindung des Öffners <sup>3</sup>H-P1075 verhindert. Die spezifische Bindung von <sup>3</sup>H-P1075 an seinen Rezeptor kann deshalb nur noch ca. 39 (34; 43) % betragen, in den Experimenten wurden noch  $56 \pm 4$  % der phloxinfreien spezifischen Bindung gemessen; dies steht in zufriedenstellender Übereinstimmung mit dem erwarteten Wert.

### 3. Ergebnisse

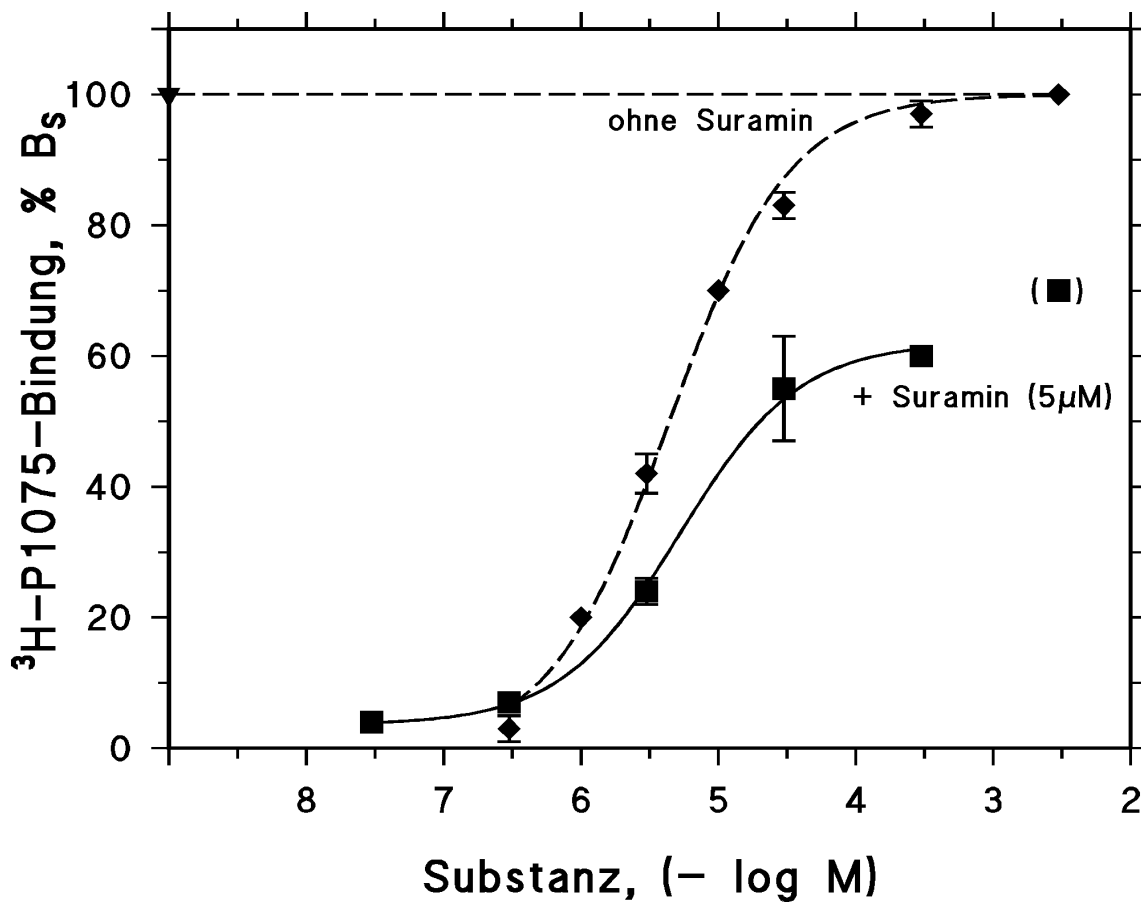
---

#### 3.5.2.3 Aktivierung der $^3\text{H}$ -P1075-Bindung an SUR2B durch ATP unter Zugabe von Suramin ( $5\ \mu\text{M}$ )

Die Experimente ( $n = 3$ ) wurden bei einer mittleren Ligandenkonzentration von  $2,03 \pm 0,06\ \text{nM}$  wie unter 3.5.2.2 für Phloxin B beschrieben durchgeführt. Die Aktivierung der  $^3\text{H}$ -P1075-Bindung durch ATP in Gegenwart von Suramin ( $5\ \mu\text{M}$ ) ergab einen  $\text{pEC}_{50}$ -Wert von  $5,28 \pm 0,06$ , entsprechend einem  $\text{EC}_{50}$ -Wert von  $5,25$  ( $2,89; 9,54$ )  $\mu\text{M}$ . Bei einer Konzentration von ca.  $5,3\ \mu\text{M}$  ATP ist die Bindung von  $^3\text{H}$ -P1075 an seinen Rezeptor in Gegenwart von Suramin somit halbmaximal.

Die spezifische Bindung,  $B_s$ , betrug  $83 \pm 9\ \text{fmol/mg}$  ( $63 \pm 3\ %$  der totalen Bindung unter Zusatz von Suramin). Dies bedeutet einen Abfall der spezifischen Bindung auf ca.  $63\ %$  der spezifischen Bindung ohne Suramin. Dieser Abfall ist auf die Zugabe von Suramin zurückzuführen, da Suramin gemäss seines Sättigungsgrades bei einer Konzentration von  $5\ \mu\text{M}$   $43$  ( $38; 49$ )  $\%$  der Rezeptoren besetzt hält, (3.5.1.1.2) und eine Bindung des Öffners  $^3\text{H}$ -P1075 verhindert. Daher kann die spezifische Bindung von  $^3\text{H}$ -P1075 an seinen Rezeptor nur noch ca.  $57$  ( $51; 62$ )  $\%$  betragen; in den Experimenten betrug sie in guter Übereinstimmung mit dem errechneten Wert noch  $63 \pm 3\ %$  (Abb. 3.5).

### 3.5 <sup>3</sup>H-P1075-Bindungsexperimente an SUR2B-transfizierten HEK293-Zellmembranen



**Abb. 3.6:** Abhängigkeit der spezifischen <sup>3</sup>H-P1075-Bindung an SUR2B von der ATP-Konzentration in Gegenwart von Suramin (5 μM).

ATP wurde als Na<sup>+</sup>-Salz hinzugegeben. Die spezifische <sup>3</sup>H-P1075-Bindung in Gegenwart von 3 mM ATP + 5 μM Suramin ( $L_0 = 2,03 \pm 0,06$  nM) betrug  $83 \pm 9$  fmol/mg Membranprotein ( $63 \pm 3$  % der totalen Bindung in Gegenwart von Suramin bzw.  $86 \pm 2$  % der totalen Bindung ohne Zugabe von Suramin) und wurde auf 100 % normiert; die Parameter der Anpassung an Gl. 20b (2.7.3) sind Tabelle 3.6 zu entnehmen. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 3 Experimenten. Gestrichelt dargestellt ist die ATP-Aktivierungskurve ohne Zugabe von Suramin.

### 3. Ergebnisse

---

#### 3.5.2.4 Aktivierung der $^3\text{H}$ -P1075-Bindung an SUR2B durch ATP unter Zugabe von Evans Blue (5 $\mu\text{M}$ )

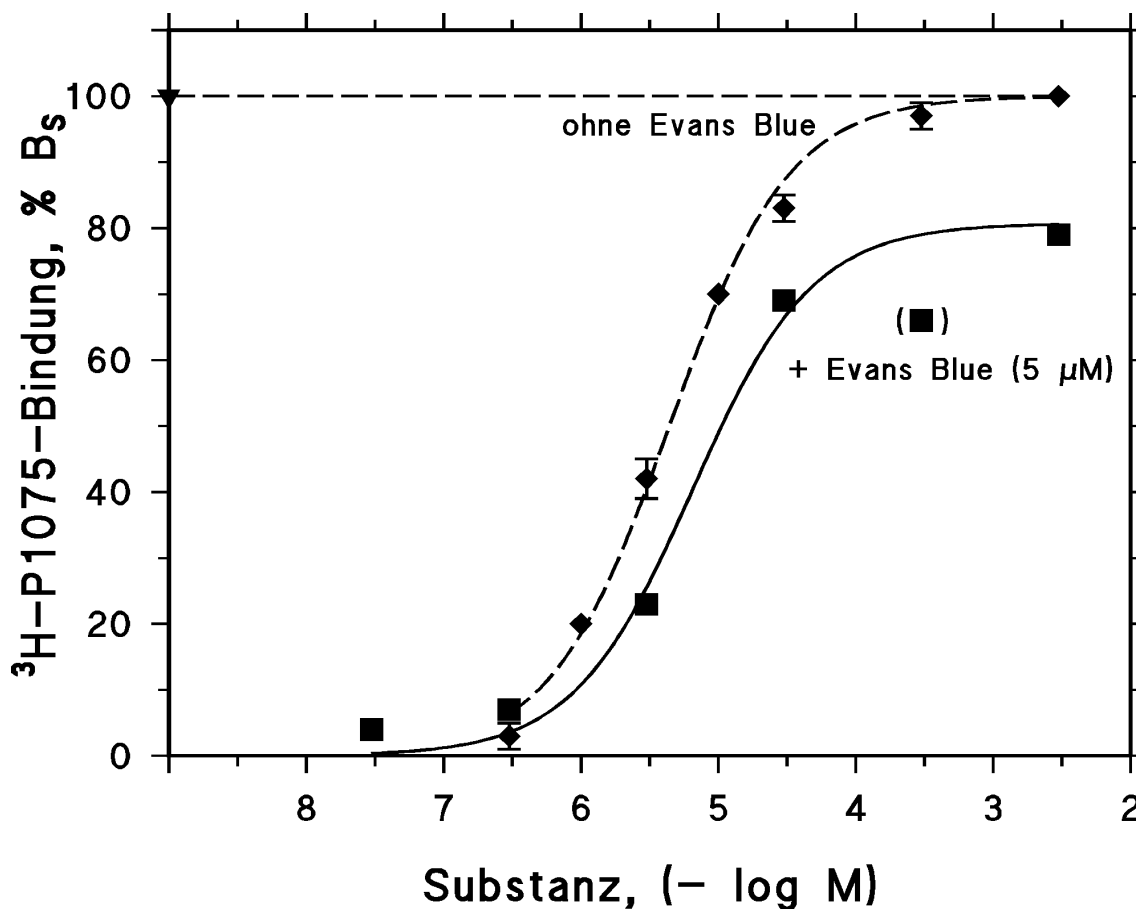
Bei einer mittleren Ligandenkonzentration von  $2,03 \pm 0,07$  nM wurden  $n = 3$  Experimente zur Bestimmung der Bindung von  $^3\text{H}$ -P1075 im Gleichgewicht bei steigenden Konzentrationen an  $\text{Na}_2\text{ATP}$  und in Gegenwart von Evans Blue (5  $\mu\text{M}$ ) wie unter 3.5.2.2 für Phloxin B beschrieben durchgeführt. Es ergab sich ein  $\text{pEC}_{50}$ -Wert von  $5,19 \pm 0,02$  entsprechend einem  $\text{EC}_{50}$ -Wert von 6,5 (5,8; 7,2)  $\mu\text{M}$ . Bei einer Konzentration von ca. 6,5  $\mu\text{M}$  ATP ist die Bindung von  $^3\text{H}$ -P1075 an seinen Rezeptor in Gegenwart von Evans Blue somit halbmaximal.

Die spezifische Bindung unter Zusatz von Evans Blue,  $B_s$ , betrug  $95 \pm 10$  fmol/mg ( $90 \pm 1$  % der totalen Bindung unter Zusatz von Evans Blue). Dies bedeutet einen Abfall der spezifischen Bindung auf ca.  $75 \pm 2$  % im Vergleich zur ohne Evans Blue gemessenen spezifischen Bindung. Dieser Abfall ist auf die Zugabe von Evans Blue zurückzuführen; Evans Blue hält gemäss seines Sättigungsgrades bei einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  55 (52; 57) % der Rezeptoren besetzt, (3.5.1.1.3) und verhindert eine Bindung des Öffners  $^3\text{H}$ -P1075. Damit kann die spezifische Bindung von  $^3\text{H}$ -P1075 an seinen Rezeptor nur noch ca. 45 (43; 48) % betragen, in den Experimenten betrug sie noch  $75 \pm 2$  %.

Problematisch bezüglich einer Mittelung der Daten erwies sich, dass im letzten Experiment die Aktivierungskurve nicht mehr nahe 0 %  $B_s$  begann wie bei Phloxin B und Suramin dargestellt (Abb. 3.5 bzw 3.6). Es zeigte sich vielmehr eine Art Sockel (33 % der spezifischen Bindung), auf dessen Basisbindung die Aktivierungskurve bereits bei Zugabe von nur 30 nM ATP begann (Abb. 3.7). Der  $\text{EC}_{50}$ -Wert dieses Experimentes unterschied sich dennoch nicht von den Werten der Experimente ohne diesen Sockel, weshalb die Werte gemittelt wurden. Der Unterschied betraf lediglich die Amplitude.



### 3.5 <sup>3</sup>H-P1075-Bindungsexperimente an SUR2B-transfizierten HEK293-Zellmembranen



**Abb. 3.7:** Abhängigkeit der spezifischen <sup>3</sup>H-P1075-Bindung an SUR2B von der ATP-Konzentration in Gegenwart von Evans Blue (5 μM).

ATP wurde als Na<sup>+</sup>-Salz hinzugegeben. Die spezifische <sup>3</sup>H-P1075-Bindung in Gegenwart von 3 mM ATP + 5 μM Evans Blue ( $L_0 = 2,03 \pm 0,07$  nM) betrug  $95 \pm 10$  fmol/mg Membranprotein ( $90 \pm 10$  % der totalen Bindung in Gegenwart von Evans Blue bzw.  $69 \pm 3$  % der totalen Bindung ohne Zugabe von Evans Blue) und wurde auf 100 % normiert; die Parameter der Anpassung an Gl. 20b (2.7.3) sind Tabelle 3.6 zu entnehmen. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus 3 Experimenten. Gestrichelt dargestellt ist die ATP-Aktivierungskurve ohne Zugabe von Evans Blue.

### 3. Ergebnisse

---

#### 3.5.2.5 Aktivierung der $^3\text{H}$ -P1075-Bindung an SUR2B durch ATP unter Zugabe von DIDS (5 $\mu\text{M}$ )

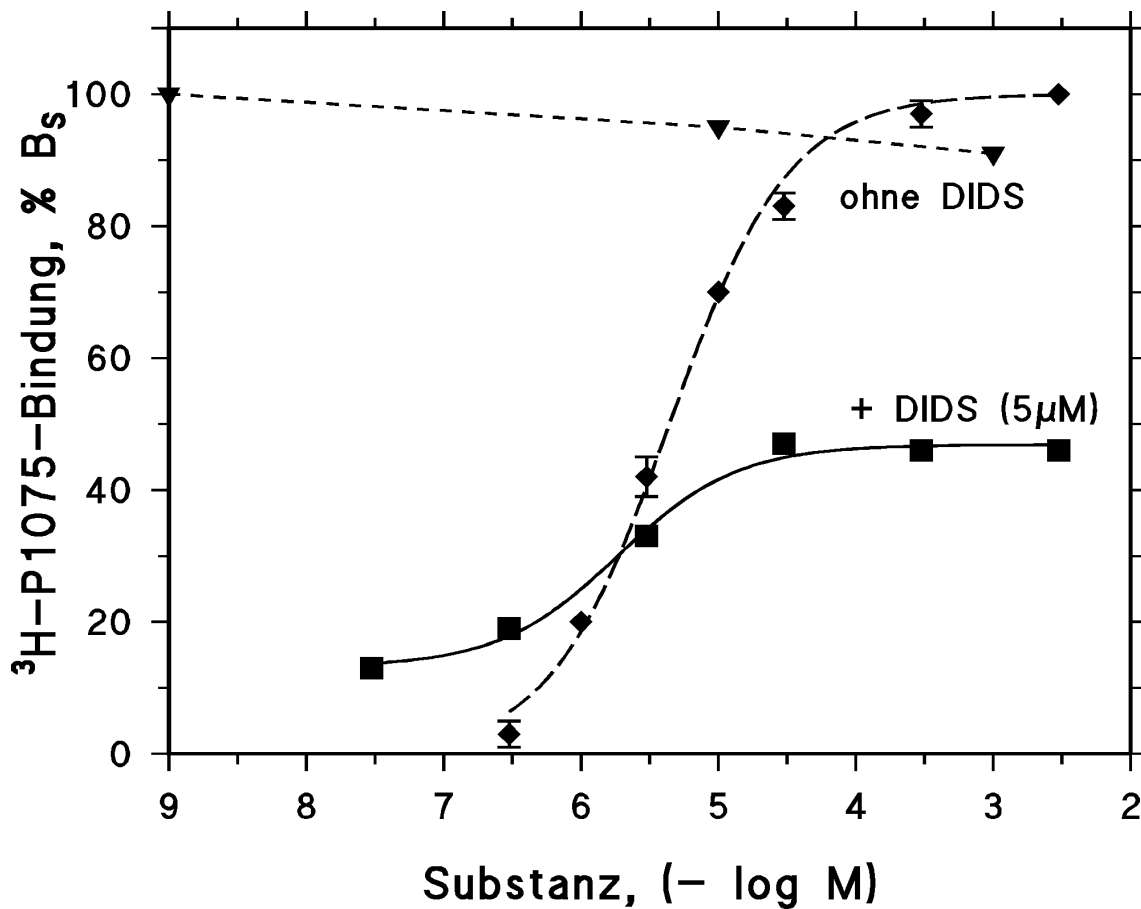
In  $n = 3$  Experimenten wurde bei einer mittleren Ligandenkonzentration von  $2,06 \pm 0,03$  nM die Bindung von  $^3\text{H}$ -P1075 im Gleichgewicht bei steigenden Konzentrationen an  $\text{Na}_2\text{ATP}$  in Gegenwart von DIDS (5  $\mu\text{M}$ ) wie unter 3.5.2.2 für Phloxin B beschrieben gemessen. Stets wurde die totale Bindung in Gegenwart von 3 mM ATP ohne Zugabe von DIDS als Kontrollwert mitbestimmt und 100 % gesetzt.

Die Experimente lieferten einen  $\text{pEC}_{50}$ -Wert von  $5,74 \pm 0,01$ , entsprechend einem  $\text{EC}_{50}$ -Wert von 1,8 (1,7; 1,9  $\mu\text{M}$ ). D.h. bei einer Konzentration von ca. 1,8  $\mu\text{M}$  ATP ist die Bindung von  $^3\text{H}$ -P1075 an seinen Rezeptor in Gegenwart von DIDS halbmaximal.

Die spezifische Bindung,  $B_s$ , betrug  $71 \pm 9$  fmol/mg ( $84 \pm 2$  % der totalen Bindung unter Zusatz von DIDS). Dies bedeutet einen Abfall der spezifischen Bindung auf ca.  $47 \pm 2$  %. Dieser Abfall ist auf die Zugabe von DIDS zurückzuführen, da DIDS gemäss seines Sättigungsgrades bei einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  52 (48; 56) % der Rezeptoren besetzt hält, (3.5.1.1.6) und eine Bindung des Öffners  $^3\text{H}$ -P1075 verhindert. Die spezifische Bindung von  $^3\text{H}$ -P1075 an seinen Rezeptor kann deshalb nur noch ca. 48 (44; 52) % betragen, in den Experimenten betrug sie in sehr guter Übereinstimmung mit dem erwarteten Wert noch  $47 \pm 2$  %.

Problematisch bezüglich einer Mittelung der Daten erwies sich, dass in den Experimenten die Aktivierungskurve nicht nahe 0 %  $B_s$  begann wie bei Phloxin B und Suramin dargestellt (Abb. 3.5 bzw. 3.6). Es zeigte sich vielmehr, wie schon bei Evans Blue beschrieben, eine Art Sockel (19 bzw. 35 % der spezifischen Bindung), auf dessen Basisbindung die Aktivierungskurve ohne Zugabe von ATP begann (Abb. 3.8). Die  $\text{EC}_{50}$ -Werte dieser Experimente unterschieden sich jedoch nicht, weshalb die Werte gemittelt wurden. Der Unterschied betraf lediglich die Amplitude.

### 3.5 $^3\text{H}$ -P1075-Bindungsexperimente an SUR2B-transfizierten HEK293-Zellmembranen



**Abb. 3.8:** Abhängigkeit der spezifischen  $^3\text{H}$ -P1075-Bindungen SUR2B von der ATP-Konzentration in Gegenwart von DIDS (5  $\mu\text{M}$ ).

ATP wurde als  $\text{Na}^+$ -Salz hinzugegeben. Die spezifische  $^3\text{H}$ -P1075-Bindung in Gegenwart von 3 mM ATP + 5  $\mu\text{M}$  DIDS ( $L_0 = 2,08$  nM) betrug 87 fmol/mg Membranprotein (87 % der totalen Bindung in Gegenwart von DIDS bzw. 43 % der totalen Bindung ohne Zugabe von DIDS) und wurde auf 100 % normiert; die Parameter der Anpassung an Gl. 20b (2.7.3) sind Tabelle 3.6 zu entnehmen. Gezeigt sind die Daten aus einem typischen Einzelexperiment. Gestrichelt dargestellt sind die gleichzeitige Mitbestimmung der ATP-Aktivierung ohne Zugabe von DIDS (---) sowie die ATP-Aktivierungskurve (— —). Der Sockel (ca. 19 %  $B_s$ ) scheint eine Art Basisbindung ohne Zugabe von ATP darzustellen.

### 3. Ergebnisse

---

**Tabelle 3.6: Aktivierung der  $^3\text{H}$ -P1075-Bindung an SUR2B durch ATP in Gegenwart verschiedener  $\text{P}_2$ -Rezeptormodulatoren.**

$A_{\text{MAX}}$  beschreibt die maximale Amplitude der spezifischen Bindung in Gegenwart von 3 mM ATP;  $\text{pEC}_{50}$  stellt den negativen Logarithmus der  $\text{EC}_{50}$ -Werte dar,  $\text{EC}_{50}$  steht für die halbmaximale Aktivierungskonzentration und  $\text{IC}_{50}$  für die halbmaximale Hemmkonzentration der jeweiligen Substanz bei 3 mM ATP.

Substanz	$\text{pEC}_{50}$ ( $-\log \text{M}$ )	$\text{EC}_{50}$ , ( $\mu\text{M}$ )	$A_{\text{MAX}}$ , ( $\%B_{\text{S}, 3 \text{ mM ATP}}$ )	$\text{IC}_{50}$ , ( $\mu\text{M}$ )
ATP	$5,36 \pm 0,03$	4,4 (3,8; 5,2)	100 %	-
ATP + Phloxin B (500 nM)	$5,25 \pm 0,08$	5,7 (3,5; 9,3)	$59 \pm 6 \%$	314 (259; 382) nM
ATP + Suramin (5 $\mu\text{M}$ )	$5,28 \pm 0,06$	5,3 (2,9; 9,5)	$70 \pm 2 \%$	6,5 (5,2; 8,1)
ATP + Evans Blue (5 $\mu\text{M}$ )	$5,15 \pm 0,01$	6,5 (5,8; 7,2)	$75 \pm 2 \%$	4,1 (3,8; 4,6)
ATP + DIDS (5 $\mu\text{M}$ )	$5,74 \pm 0,01$		$47 \pm 2 \%$	4,6 (3,9; 5,4)

#### 3.5.3 Aktivierung der $^3\text{H}$ -P1075-Bindung an SUR2B durch DIDS

In Aktivierungsexperimenten mit ATP unter Zugabe von DIDS (5  $\mu\text{M}$ ) (3.5.2.5) wurde festgestellt, dass auch ohne Zugabe von ATP, welches eine Voraussetzung für das Stattfinden einer Bindung von  $^3\text{H}$ -P1075 an seine Bindungsstelle ist (Schwanstecher et al., 1998; Hambrock et al., 1998), eine von der unspezifischen Bindung deutlich abgrenzbare (3-4mal so hohe)  $^3\text{H}$ -P1075-Bindung gemessen werden kann. Dies deutete auf eine Aktivierung der  $^3\text{H}$ -P1075-Bindung durch DIDS hin bzw. darauf, dass DIDS in vorliegenden Experimenten ATP wenigstens teilweise ersetzen konnte.

Zur Untersuchung der Fragestellung, ob die  $^3\text{H}$ -P1075-Bindung von der zugegebenen DIDS-Konzentration abhängt, wurde die Bindung von  $^3\text{H}$ -P1075 im Gleichgewicht bei steigenden Konzentrationen an DIDS gemessen. Die Experimente ( $n = 2$ ) wurden bei einer Ligandenkonzentration von ca. 1,93 nM durchgeführt.

In beiden Experimenten wurde die totale Bindung (110 bzw. 146 fmol/mg) bei 3 mM ATP ohne Zugabe von DIDS bestimmt und 100 % gesetzt.

Im ersten Experiment zeigte sich, dass selbst ohne Zugabe von DIDS und ATP eine wesentliche  $^3\text{H}$ -P1075-Bindung stattfand (3,7 mal  $B_{\text{NS}}$ ;  $B_{\text{NS}} = 5 \% B_{\text{TOT}}$ ). Diese Bindung (20 %  $B_{\text{TOT}}$ ) konnte durch steigende Konzentrationen an DIDS im Bereich zwischen 1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  DIDS gesteigert werden, das Maximum lag bei 10  $\mu\text{M}$  DIDS

### 3.5 $^3\text{H}$ -P1075-Bindungsexperimente an SUR2B-transfizierten HEK293-Zellmembranen

(28 %  $B_{\text{TOT}}$ ). Bei weiterer Zugabe sank die Bindung auf das Niveau der  $B_{\text{NS}}$  ab, welches bei Zugabe von 100  $\mu\text{M}$  DIDS erreicht war.

Im zweiten Experiment wurde dieser Konzentrationsbereich näher untersucht. Die Kurve zeigte diesmal ohne Zugabe von ATP und DIDS nur eine Erhöhung um einen Faktor 2 gegenüber der  $B_{\text{NS}}$  ( $B_{\text{NS}} = 5\% B_{\text{TOT}}$ ). Es zeigte sich wieder ein Bindungsanstieg im Konzentrationsbereich zwischen 1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  DIDS, das Maximum lag wiederum bei 10  $\mu\text{M}$  DIDS (32 %  $B_{\text{TOT}}$ ). Bei weiterer Zugabe fiel die Bindung ab auf das vorherige Niveau, welches bei Zugabe von 100  $\mu\text{M}$  DIDS erreicht war (Abb. 3.9).

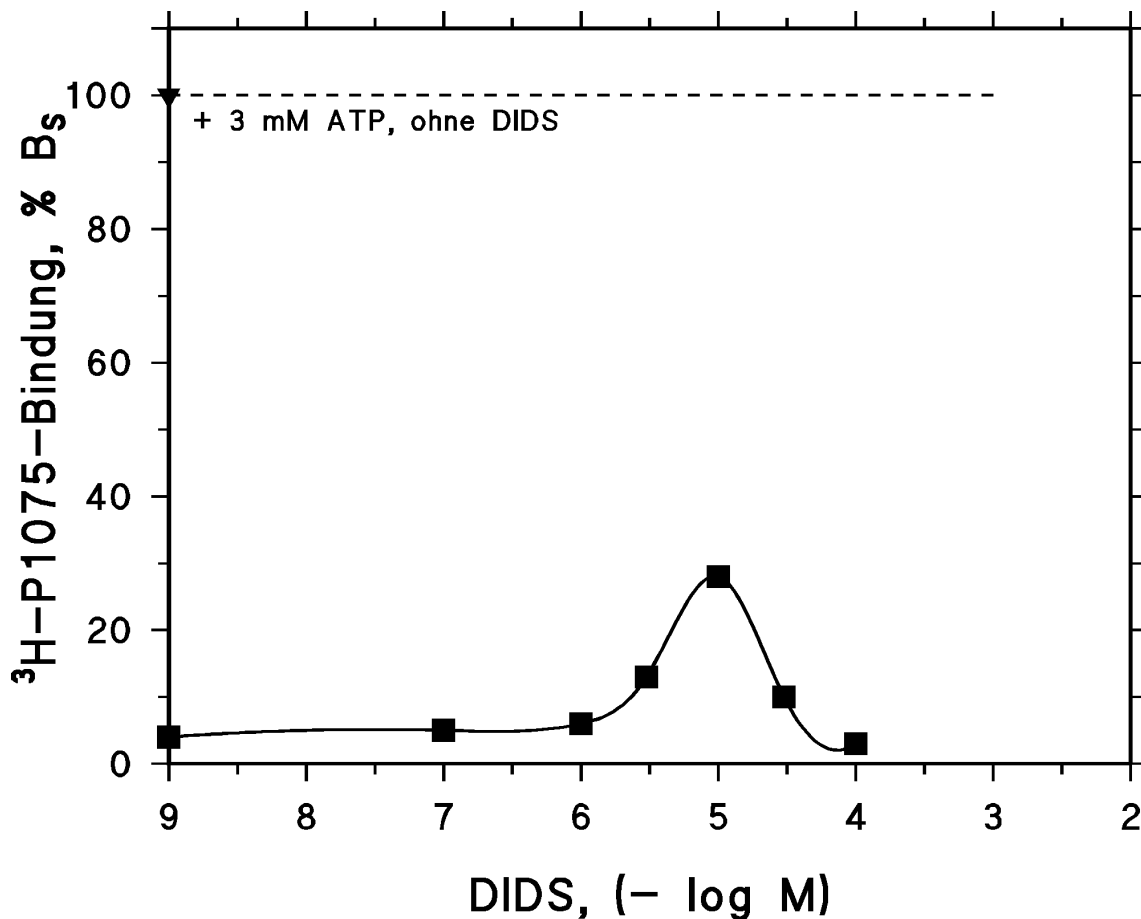


Abb. 3.9: Aktivierung der  $^3\text{H}$ -P1075-Bindung an HEK 293-Zellmembranen (SUR2B) durch DIDS.

Gezeigt sind die Daten aus einem typischen Einzelexperiment. Gestrichelt dargestellt ist die totale Bindung unter Zugabe von 3 mM ATP ohne Zugabe von DIDS. Dieser Wert (146 fmol/mg Membranprotein) wurde 100 % gesetzt. Die durchgezogene Linie zeigt die  $^3\text{H}$ -P1075-Bindung in Gegenwart von DIDS (ohne Zugabe von ATP). DIDS konnte die  $^3\text{H}$ -P1075-Bindung steigern mit einem Maximum bei ca. 10  $\mu\text{M}$  DIDS, an welchem die Bindung ca. 30 % der totalen Bindung erreichte.

### 3. Ergebnisse

---

#### 3.5.4 Kinetik der $^3\text{H}$ -P1075-Bindung an HEK293-Zellmembranen (SUR2B)

Homologe Dissoziationsexperimente erlauben eine Aussage über die Dissoziationsgeschwindigkeit des untersuchten Rezeptorligandenkomplexes. Die Dissoziation wird gestartet durch Zugabe des kalten Liganden im Überschuss, wenn die Bindung des markierten Liganden das Gleichgewicht erreicht hat. Mit Kenntnis der Halbwertszeit des Komplexes sowie seines  $k_{\text{off}}$ -Wertes (Kontrolle), lassen sich Aussagen über das Bindungsverhalten weiterer Stoffe, genauer gesagt, die Lokalisation der Bindungsstelle(n) dieser Stoffe, geben. Und zwar kann festgestellt werden, ob der jeweils untersuchte Stoff dieselbe Bindungsstelle wie der verwendete Radioligand oder aber eine von dieser verschiedene besitzt.

Untersucht man nämlich die Dissoziation des Rezeptor-Ligand-Komplexes unter Zusatz einer Testsubstanz, welche man gleichzeitig mit dem homologen Inhibitor zugibt, so ergeben sich für den Vergleich des  $k_{\text{off}}$ -Wertes mit jenem der Kontrollexperimente folgende Möglichkeiten: Unterscheiden sich die  $k_{\text{off}}$ -Werte nicht, so ist durch den neuen Stoff keine Beschleunigung der Dissoziation eingetreten. Man kann in diesem Fall davon ausgehen, dass zwischen der Testsubstanz und dem homologen Inhibitor eine direkte Konkurrenz um dieselbe Bindungsstelle stattfindet.

Gibt es jedoch einen Unterschied, d.h. beschleunigt oder verlangsamt die nicht-markierte Testsubstanz die Dissoziation, muss es einen transienten ternären Komplex, bestehend aus SUR,  $^3\text{H}$ -P1075 und der Testsubstanz, geben (Bray und Quast, 1992; Hambrock et al., 1998), d.h. die Bindungsstellen von  $^3\text{H}$ -P1075 und der Testsubstanz müssen verschieden sein. Beschleunigt die Testsubstanz die Dissoziation ( $k_{\text{off, Kontrolle}} < k_{\text{off, Testsubstanz}}$ ), lässt dies auf eine negativ allosterische Kopplung der Bindungsstellen für Inhibitor und Testsubstanz schließen. Unter der umgekehrten Voraussetzung,  $k_{\text{off, Kontrolle}} > k_{\text{off, Testsubstanz}}$ , die eine Verzögerung der Dissoziation durch die Testsubstanz darstellt, kann man davon ausgehen, dass die Testsubstanz die Bindung fördert.

Die Bindungsexperimente wurden mit 7–10 Millionen Zellen pro Schale (entsprechend einer Konfluenz von 60–80 %) durchgeführt. Die Dissoziation wurde nach 30-minütiger

### 3.5 <sup>3</sup>H-P1075-Bindungsexperimente an SUR2B-transfizierten HEK293-Zellmembranen

Vorinkubation der HEK293-Zellmembranen mit <sup>3</sup>H-P1075 bei 37° C durch Zugabe von 10 µM P1075 sowie gleichzeitig der jeweiligen Testsubstanz (ausser bei den Kontrollexperimenten) zum Rezeptor-Ligand-Komplex eingeleitet. Die Inkubation wurde beendet durch Entnahme von 0,3 ml-Aliquots zu unterschiedlichen Zeiten (31.-100. Min.); Verdünnung und Filtration erfolgten wie in Kap. 2.6.1 beschrieben.

Es wurden hierbei 6,5 ml-Ansätze verwendet, die Proteinkonzentration in den Ansätzen bewegte sich zwischen 0,1 und 0,2 mg/ml; die Reaktion fand in Puffer 4 und bei 37 °C statt, die Na<sub>2</sub>ATP-Konzentration lag bei 3 mM, die Mg<sup>2+</sup>-Konzentration betrug 3,8 mM. Die Daten wurden in % der spezifischen Bindung (= 100 %) transformiert und die monoexponentielle Zerfallsfunktion (Gl. 30, 2.7.5) angepasst.

#### *3.5.4.1 Kinetik der <sup>3</sup>H-P1075-Bindung an HEK293-Zellmembranen (SUR2B) ohne Zugabe von Testsubstanzen*

In einer Kontroll-Serie von n = 4 Experimenten wurde die Kinetik der <sup>3</sup>H-P1075-Bindung an HEK293-Zellmembranen untersucht. Die Experimente wurden bei einer mittleren Ligandenkonzentration von  $1,65 \pm 0,10$  nM durchgeführt. Es wurde eine Dissoziationskonstante,  $k_{\text{off}}$ , von  $0,07 \pm 0,01$  min<sup>-1</sup> ermittelt. Hieraus konnte eine Halbwertszeit ( $t_{1/2}$ ) von  $10,7 \pm 1,5$  Min. berechnet werden (2.7.5, Gl. 29a). Aus der Halbwertszeit des Komplexes von ca. 10 Minuten kann geschlossen werden, dass die Bindung des Liganden an den Rezeptor für die Zeit zwischen Reaktionsstopp durch Verdünnung in eiskaltem Waschpuffer und Abfiltration (ca. 10 s) erhalten bleibt.

#### *3.5.4.2 Kinetik der <sup>3</sup>H-P1075-Bindung an HEK293-Zellmembranen (SUR2B) unter Zugabe von Phloxin B (500 nM; 3 µM)*

Die Dissoziationskinetik unter Zugabe von 500 nM Phloxin B wurde in n = 3 Experimenten bei einer mittleren Ligandenkonzentration von  $1,60 \pm 0,19$  nM durchgeführt. Es wurde eine Dissoziationskonstante,  $k_{\text{off}}$ , von  $0,09 \pm 0,004$  min<sup>-1</sup> ermittelt. Hieraus konnte eine Halbwertszeit ( $t_{1/2}$ ) von  $7,9 \pm 1,7$  Min. berechnet werden

### 3. Ergebnisse

---

(2.7.5, Gl. 29a). Da hierbei kein grosser Unterschied zur Dissoziationskinetik ohne Zugabe von Phloxin B auftrat, wurde für die weiteren Experimente ( $n = 3$ ) die Konzentration von Phloxin B auf  $300 \mu\text{M}$  erhöht. Die mittlere Ligandenkonzentration betrug  $1,43 \pm 0,14 \text{ nM}$ . An die erhaltenen Daten wurde eine monoexponentielle Zerfallsfunktion (2.7.5, Gl. 30) angepasst. Es wurde eine Dissoziationskonstante,  $k_{\text{off}}$ , von  $0,17 \pm 0,01 \text{ min}^{-1}$  ermittelt. Hieraus konnte eine Halbwertszeit ( $t_{1/2}$ ) von  $4,2 \pm 0,7 \text{ Min.}$  berechnet werden (2.7.5, Gl. 29a).

#### 3.5.4.3 Kinetik der $^3\text{H}$ -P1075-Bindung an HEK293-Zellmembranen (SUR2B) unter Zugabe von Suramin ( $50 \mu\text{M}$ ; $300 \mu\text{M}$ )

Zunächst wurde ein Vorversuch unter Zugabe von  $50 \mu\text{M}$  Suramin bei einer Ligandenkonzentration von  $1,51 \text{ nM}$  durchgeführt. Es wurde eine Dissoziationskonstante,  $k_{\text{off}}$ , von  $0,088 \pm 0,01 \text{ min}^{-1}$  ermittelt. Hieraus konnte eine Halbwertszeit ( $t_{1/2}$ ) von  $7,9 \text{ Min.}$  berechnet werden (2.7.5, Gl. 29a).

Da hierbei kein grosser Unterschied zur Dissoziationskinetik ohne Zugabe von Suramin auftrat, wurde für die weiteren Experimente ( $n = 3$ ; mittlere Ligandenkonzentration  $1,54 \pm 0,07 \text{ nM}$ ) die Konzentration von Suramin auf  $300 \mu\text{M}$  erhöht. Es wurde nun eine Dissoziationskonstante,  $k_{\text{off}}$ , von  $0,24 \pm 0,01 \text{ min}^{-1}$  ermittelt. Hieraus konnte eine Halbwertszeit ( $t_{1/2}$ ) von  $2,90 \pm 0,07 \text{ Min.}$  berechnet werden (2.7.5, Gl. 29a). Der Lösungsmittelanteil in diesem Versuch betrug  $\approx 3 \%$  (v/v) und konnte wegen Lösungsschwierigkeiten beim Ansetzen höherkonzentrierter Stammlösungen nicht minimiert werden. Aus diesem Grunde wurden Experimente mit einer analogen Lösungsmittelkonzentration zur Kontrolle von Lösungsmittelleffekten angeschlossen (3.5.4.6).



### **3.5 <sup>3</sup>H-P1075-Bindungsexperimente an SUR2B-transfizierten HEK293-Zellmembranen**

---

#### *3.5.4.4 Kinetik der <sup>3</sup>H-P1075-Bindung an HEK293-Zellmembranen (SUR2B) unter Zugabe von Evans Blue (50 $\mu$ M; 300 $\mu$ M)*

Wiederum wurde zunächst ein Vorversuch bei einer Ligandenkonzentration von 1,47 nM, diesmal unter Zugabe von 50  $\mu$ M Evans Blue, durchgeführt. Dabei wurde eine Dissoziationskonstante,  $k_{\text{off}}$ , von  $0,074 \pm 0,004 \text{ min}^{-1}$  ermittelt. Hieraus konnte eine Halbwertszeit ( $t_{1/2}$ ) von 9,37 Min. berechnet werden (2.7.5, Gl. 29a).

Da hierbei kein grosser Unterschied zur Dissoziationskinetik ohne Zugabe von Evans Blue auftrat, wurde für die weiteren Experimente die Konzentration von Evans Blue auf 300  $\mu$ M erhöht.

Bei einer mittleren Ligandenkonzentration von  $1,56 \pm 0,03 \text{ nM}$  wurde nun eine Dissoziationskonstante,  $k_{\text{off}}$ , von  $0,40 \pm 0,01 \text{ min}^{-1}$  ermittelt. Hieraus konnte eine Halbwertszeit ( $t_{1/2}$ ) von  $1,75 \pm 0,02 \text{ Min.}$  berechnet werden (2.7.5, Gl. 29a). Der Lösungsmittelanteil in diesem Versuch betrug  $\approx 3 \%$  (v/v) und konnte wegen Lösungsschwierigkeiten beim Ansetzen höherkonzentrierter Stammlösungen nicht minimiert werden. Aus diesem Grunde wurden Experimente mit einer analogen Lösungsmittelkonzentration zur Kontrolle von Lösungsmittelleffekten angeschlossen (3.5.4.6).

#### *3.5.4.5 Kinetik der <sup>3</sup>H-P1075-Bindung an HEK293-Zellmembranen (SUR2B) unter Zugabe von DIDS (50 $\mu$ M; 300 $\mu$ M; 30 $\mu$ M)*

In zwei Vorversuchen unter Zugabe von 50  $\mu$ M DIDS bei einer Ligandenkonzentration von ca. 1,52 nM wurde eine Dissoziationskonstante,  $k_{\text{off}}$ , von ca.  $0,049 \text{ min}^{-1}$  ermittelt. Hieraus konnte eine Halbwertszeit ( $t_{1/2}$ ) von ca. 14,4 Min. berechnet werden (2.7.5, Gl. 29a).

Da hierbei im Unterschied zur Dissoziationskinetik ohne Zugabe von DIDS eine Verlangsamung auftrat, wurde zur Bestätigung der Verzögerung für die weiteren Experimente die Konzentration von DIDS auf 300  $\mu$ M erhöht. Die Ligandenkonzentration betrug im Mittel  $1,53 \pm 0,02 \text{ nM}$ . Es wurde eine

### 3. Ergebnisse

---

Dissoziationskonstante,  $k_{\text{off}}$ , von  $0,28 \pm 0,02 \text{ min}^{-1}$  ermittelt. Hieraus konnte nun eine Halbwertszeit ( $t_{1/2}$ ) von  $2,46 \pm 0,16 \text{ Min.}$  berechnet werden (2.7.5, Gl. 29a). Der Lösungsmittelanteil in diesem Versuch betrug  $\approx 3 \%$  (v/v) und konnte wegen Lösungsschwierigkeiten beim Ansetzen höherkonzentrierter Stammlösungen nicht minimiert werden. Aus diesem Grunde wurden Experimente mit einer analogen Lösungsmittelkonzentration zur Kontrolle von Lösungsmittelleffekten angeschlossen (3.5.4.6).

Um zu untersuchen, ob die Dissoziation der  $^3\text{H}$ -P1075-Bindung durch geringe DIDS-Konzentrationen tatsächlich verlangsamt wird, wie es sich unter Verwendung von  $50 \mu\text{M}$  DIDS andeutete, wurde in  $n = 2$  Experimenten gleichzeitig die Dissoziationskinetik mit und ohne Zugabe von  $30 \mu\text{M}$  DIDS untersucht.

Die Ligandenkonzentration betrug ca.  $1,59 \text{ nM}$ . Für die Reaktion unter Zugabe von  $30 \mu\text{M}$  DIDS wurde eine Dissoziationskonstante,  $k_{\text{off}}$ , von  $0,054 \text{ min}^{-1}$  ermittelt. Hieraus konnte eine Halbwertszeit ( $t_{1/2}$ ) von  $12,8 \text{ Min.}$  berechnet werden (2.7.5, Gl. 29a).

Für die Reaktion ohne Zugabe von DIDS betrug  $k_{\text{off}}$   $0,058 \text{ min}^{-1}$ , entsprechend einer Halbwertszeit ( $t_{1/2}$ ) von  $12,1 \text{ Min.}$  (2.7.5, Gl. 29a).

Somit trat keine wesentliche Verlangsamung der Dissoziation durch DIDS auf.

#### *3.5.4.6 Kinetik der $^3\text{H}$ -P1075-Bindung an HEK293-Zellmembranen (SUR2B) unter Zugabe von Lösungsmittel (3 % v/v)*

In den Experimenten mit einer Inhibitorkonzentration von  $300 \mu\text{M}$  betrug der Lösungsmittelanteil  $\approx 3 \%$  (v/v). Um auszuschliessen, dass die bei diesen Inhibitorkonzentrationen beobachtete Beschleunigung der Dissoziation auf den hohen Lösungsmittelanteil zurückzuführen ist, wurden Kontrollexperimente durchgeführt, bei denen anstelle des Inhibitors  $3 \%$  (v/v) Lösungsmittel zugegeben wurden.

Die Ligandenkonzentration in  $n = 2$  Experimenten betrug ca.  $1,59 \text{ nM}$ . Es wurde eine Dissoziationskonstante,  $k_{\text{off}}$ , von  $0,11 \text{ min}^{-1}$  ermittelt. Daraus errechnete sich eine Halbwertszeit ( $t_{1/2}$ ) von  $6,5 \text{ Min.}$  (2.7.5, Gl. 29a). Dies stellt ungefähr eine Verdopplung der Dissoziationsgeschwindigkeit im Vergleich zur Kontrolle ohne

### 3.5 <sup>3</sup>H-P1075-Bindungsexperimente an SUR2B-transfizierten HEK293-Zellmembranen

Lösungsmittelzugabe ( $k_{\text{off}} = 0,062 \pm 0,006 \text{ min}^{-1}$ ) dar. Die Differenz zwischen den beiden Werten wurde von den  $k_{\text{off}}$ -Werten der Versuche mit einer Inhibitor-konzentration von  $300 \mu\text{M}$  abgezogen. Die korrigierten Werte sind Tab. 3.7 zu entnehmen.

**Tabelle 3.7: Kinetik der <sup>3</sup>H-P1075-Bindung an HEK293-Zellmembranen (SUR2B).**

Die Dissoziationskonstante wird durch  $k_{\text{off}}$ , die Halbwertszeit durch  $t_{1/2}$  beschrieben. Weiter stehen  $L_0$  für die Ligandenkonzentration und  $K_I$  für die Gleichgewichtsinhibitionskonstante. Als Kontrolle dienten diejenigen Experimente, in welchen zur Einleitung der Dissoziation lediglich  $10 \mu\text{M}$  P1075 zugegeben wurde. In den übrigen Experimenten wurde zusätzlich die jeweilige Testsubstanz bzw. Lösungsmittel in den angegebenen Konzentrationen hinzugefügt. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 2–6 Experimenten.

Substanz	$L_0$ (nM)	$k_{\text{off}}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$t_{1/2}$ (min)	$K_I$ ( $\mu\text{M}$ )
<b>Kontrolle</b>	$1,65 \pm 0,10$	$0,062 \pm 0,006$	$11,18 \pm 0,99$	-
<b>Lsg.mittel</b> (3%, v/v)	1,59	0,107	6,48	-
<b>Phloxin B</b>				259(196;322) nM
500 nM	$1,60 \pm 0,19$	$0,089 \pm 0,004$	$7,8 \pm 0,35$	
3 $\mu\text{M}$	$1,43 \pm 0,14$	$0,166 \pm 0,005$	$4,18 \pm 0,15$	
<b>Suramin</b>				5,2(3,9;6,8)
50 $\mu\text{M}$	1,51	0,088	7,88	
300 $\mu\text{M}^*$	$1,54 \pm 0,07$	$0,195 \pm 0,006$	$3,55 \pm 0,06$	
<b>Evans Blue</b>				3,4(3,0;3,9)
50 $\mu\text{M}$	1,47	0,074	9,37	
300 $\mu\text{M}^*$	$1,56 \pm 0,03$	$0,350 \pm 0,005$	$1,98 \pm 0,02$	
<b>DIDS</b>				<i>einstufig:</i> 3,8(3,1,4,7)
30 $\mu\text{M}$	1,59	0,054	12,84	
50 $\mu\text{M}$	1,52	0,049	14,3	<i>zweistufig:</i>
300 $\mu\text{M}^*$	$1,53 \pm 0,02$	$0,237 \pm 0,020$	$2,92 \pm 0,16$	545(183;1603) nM 10,9(5,7;20,6)

\* Lösungsmittelkonzentration im Experiment  $\approx 3\%$  (v/v); die  $k_{\text{off}}$ -Werte wurden entsprechend der Differenz [ $k_{\text{off}}$  (Kontrollexperimente) –  $k_{\text{off}}$  (Lösungsmittelexperimente)] =  $0,045 \text{ min}^{-1}$  korrigiert.

### 3. Ergebnisse

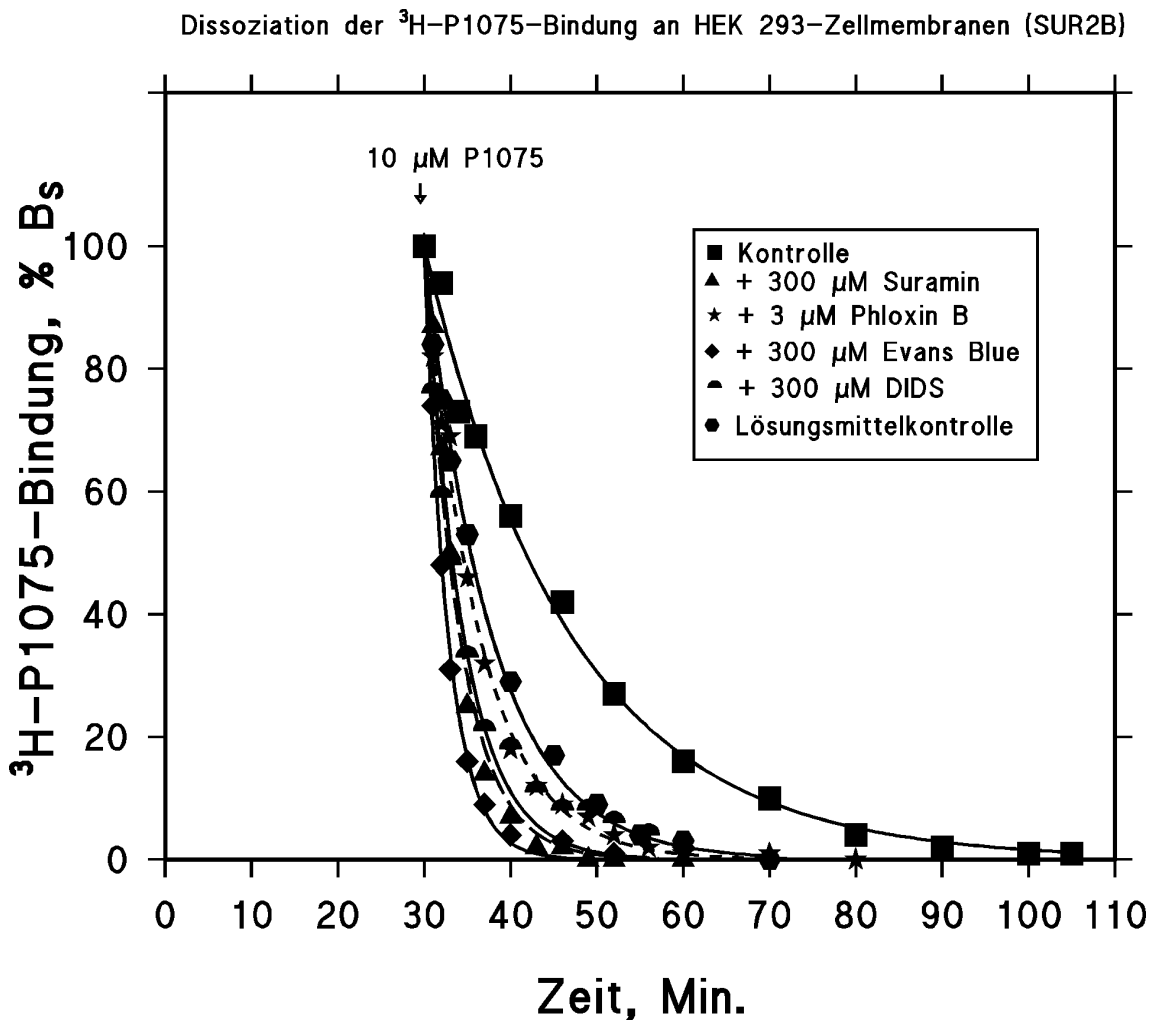


Abb. 3.10: Kinetik der  $^3\text{H}$ -P1075-Bindung an HEK293-Zellmembranen (SUR2B).

Die Dissoziation des Rezeptor-Ligand-Komplexes, wurde gestartet durch Zugabe von  $10\ \mu\text{M}$  P1075 (Pfeil) sowie der jeweiligen Testsubstanz (ausgenommen in den Kontrollexperimenten). Gezeigt sind jeweils Daten aus Einzelexperimenten. Die Parameter der Angleichung an Gl. 30 (2.7.5) sind Tabelle 3.7 zu entnehmen.

### 3.5 <sup>3</sup>H-P1075-Bindungsexperimente an SUR2B-transfizierten HEK293-Zellmembranen

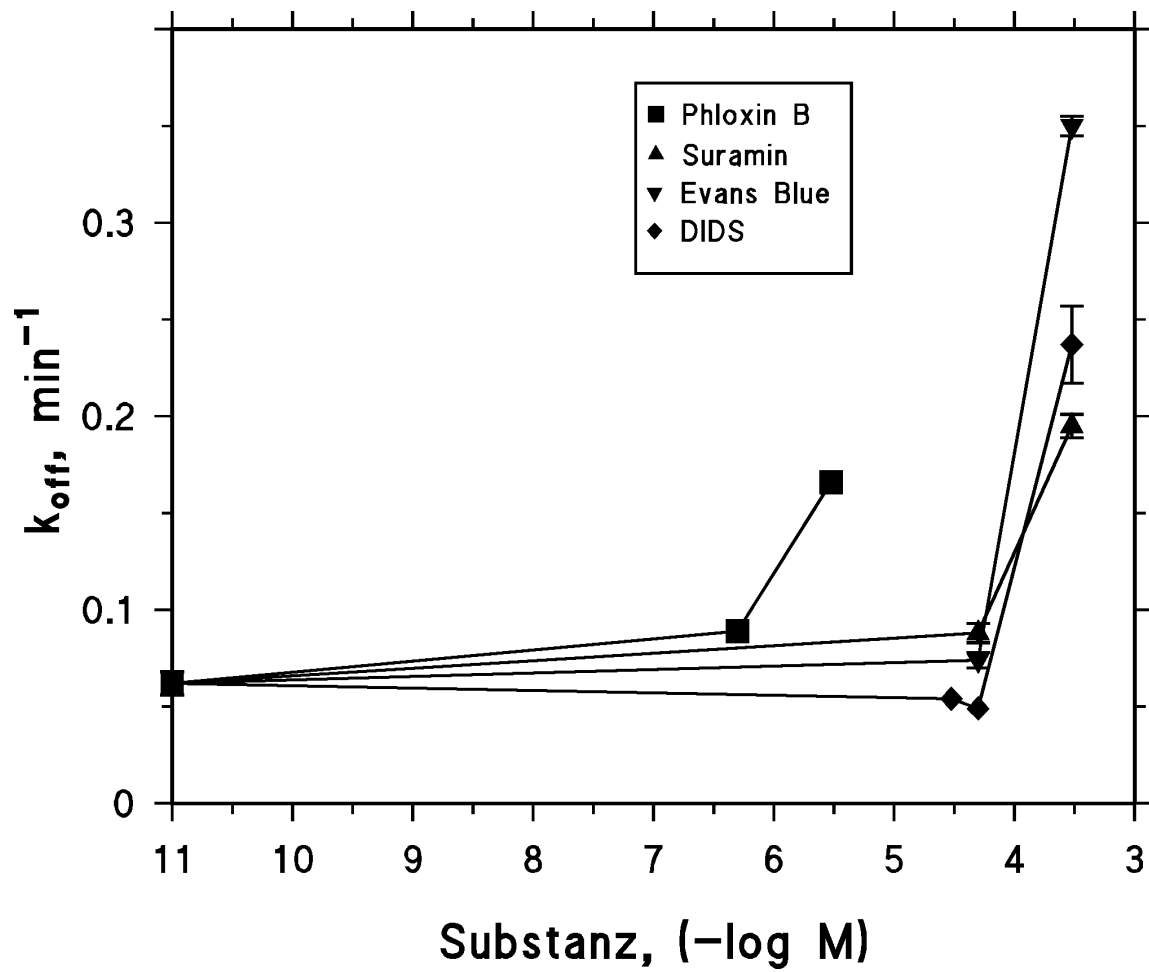


Abb. 3.11: Auftragung der  $k_{off}$ -Werte gegen die eingesetzte Konzentration der jeweiligen Substanz.

### 3. Ergebnisse

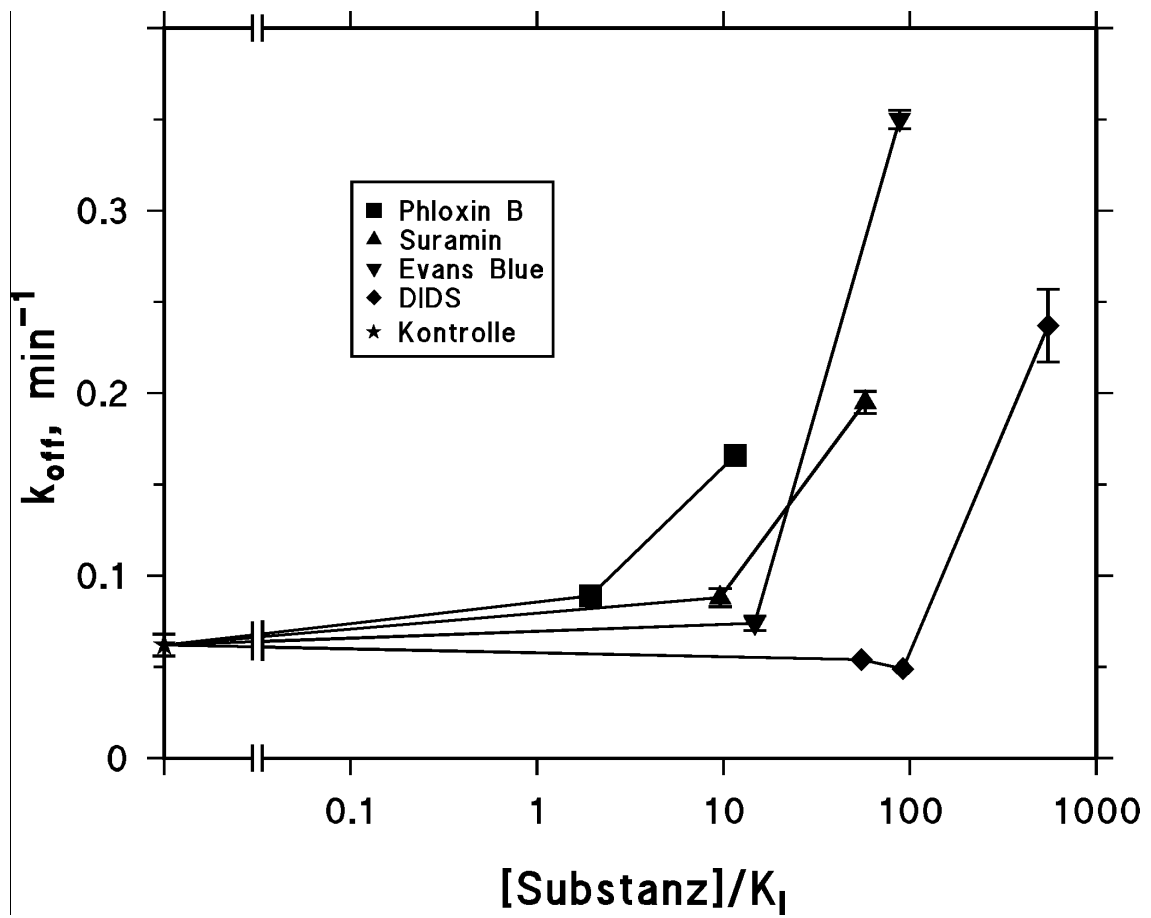


Abb. 3.12: Auftragung der  $k_{off}$ -Werte gegen den Quotienten aus der eingesetzten Substanzkonzentration und der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten  $K_I$ , ( $[M]/K_I$ ).

### 3.6 <sup>3</sup>H-P1075-Bindungsexperimente an ganzen HEK293-Zellen (SUR2B)

#### 3.6 <sup>3</sup>H-P1075-Bindungsexperimente an ganzen HEK293-Zellen (SUR2B)

An ganzen HEK293-Zellen (SUR2B) wurde untersucht, ob die Testsubstanzen membrangängig sind. Eine Permeation in die Zelle könnte entweder über Transporter oder aber durch die Membran hindurch erfolgen. Letzteres erscheint allerdings eher unwahrscheinlich, da die meisten der untersuchten Substanzen bei physiologischem pH negativ geladen, also Anionen sind (Strukturformeln s. 1.8.3.2).

Die Präparationen der HEK293-Zellen erfolgte wie unter 2.5.5 beschrieben. Die Bindungsexperimente an ganzen HEK293-Zellen wurden mit 7-10 Millionen Zellen ( $\approx 0,5$ - $1,6$  mg) pro Schale (entsprechend einer Konfluenz von 65–75 %) gemäss Kap. 2.6.1 durchgeführt.

Die Bindung von <sup>3</sup>H-P1075 im Gleichgewicht wurde in An- und Abwesenheit der unten aufgeführten Inhibitoren bestimmt. In allen Fällen stellte sich heraus, dass der jeweilige Inhibitor selbst in einer Konzentration von 100  $\mu$ M den Radioliganden <sup>3</sup>H-P1075 nur zu maximal 25 % verdrängen konnte (Tab. 3.8).

Da sich die in Tabelle 3.8 angeführten Substanzen nicht als membrangängig erwiesen hatten, konnten mit ihnen keine Hemmkurven an ganzen SUR2B-transfizierten HEK293-Zellen erstellt werden

**Tabelle 3.8: Hemmung der <sup>3</sup>H-P1075-Bindung an ganzen HEK293-Zellmembranen (SUR2B) durch P<sub>2</sub>-Rezeptormodulatoren.**

A<sub>100  $\mu$ M</sub> beschreibt denjenigen Anteil der spezifischen Bindung, der bei einer Inhibitorkonzentration von 100  $\mu$ M **nicht** verdrängt wurde. Weiter stehen L<sub>0</sub> für die Ligandenkonzentration und B<sub>S</sub> für die spezifische Bindung: L<sub>0</sub> = 1,39  $\pm$  0,10 nM; B<sub>S</sub> = 141  $\pm$  9 fmol/mg. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 4 Experimenten.

Substanz	A <sub>100 <math>\mu</math>M</sub> , (% B <sub>S</sub> )
Phloxin B	93 $\pm$ 3
Suramin	81 $\pm$ 3
Evans Blue	96 $\pm$ 4
DIDS	75 $\pm$ 3

### 3. Ergebnisse

---



---

## 4 Diskussion

### 4.1 Diskussion der $^3\text{H}$ -P1075-Bindungsexperimente an A10-Zellmembranen

#### 4.1.1 Allgemeine Eigenschaften der $^3\text{H}$ -P1075-Bindung

Die Daten aus den homologen Konkurrenzexperimenten mit  $^3\text{H}$ -P1075 weisen darauf hin, dass der  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanalöffner  $^3\text{H}$ -P1075 mit hoher Affinität ( $K_{\text{D}} \approx 7,9 \text{ nM}$ ) an nur eine Klasse von Bindungsstellen bindet (denkbar sind prinzipiell auch zwei (oder mehrere) verschiedene Bindungsstellen mit nur geringem Affinitätsunterschied für P1075), jedoch weisen Ergebnisse an SUR2B-transfizierten HEK293-Zellmembranen auf nur eine Öffnerbindungsstelle pro SUR-Molekül hin (Artunc, F., Charakterisierung des Bindungsverhaltens des Radioliganden  $^3\text{H}$ -Glibenclamid an den rekombinant exprimierten Untereinheiten SUR2A, SUR2B und  $\text{K}_{\text{IR}}6.1$  des ATP-abhängigen  $\text{K}^+$ -Kanals ( $\text{K}_{\text{ATP}}$ ), Med. Dissertation, Universität Tübingen, 1999).

Die Dichte dieser Bindungsstellen,  $B_{\text{MAX}}$ , in der vorliegenden Membranpräparation lag bei  $\approx 131 \text{ fmol/mg Protein}$ .

Der in den Konkurrenzexperimenten ermittelte  $K_{\text{D}}$ -Wert für P1075 von ca.  $7,9 \text{ nM}$  konnte durch die kinetischen Versuche bestätigt werden: Aus der ermittelten Dissoziationskonstanten,  $k_{\text{off}}$ , von  $0,07 \pm 0,01 \text{ min}^{-1}$  sowie der scheinbaren Assoziationskonstanten,  $k_{\text{app}}$ , von  $0,11 \pm 0,03 \text{ min}^{-1}$  liess sich mittels Gl. 27 die Assoziationskonstante,  $k_{\text{on}}$ , berechnen. Diese liegt mit  $(2,07 \pm 1,7) * 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$  um Grössenordnungen niedriger, als es für eine diffusionskontrollierte Assoziation zu erwarten gewesen wäre. Vielmehr liegt sie genau im Rahmen der Zeitkonstanten spezifischer Bindungsvorgänge wie z. B. für die Interaktion von  $\beta$ -adrenergen Antagonisten mit deren Rezeptor (Affolter et al., 1985). Schliesslich folgte aus der Beziehung  $K_{\text{D}} = k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$  (Gl. 4) die Berechnung der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten zu  $3,3 \pm 2,8 \text{ nM}$ .

## 4. Diskussion

---

Die spezifische Bindung pro mg Protein lag in den ersten Versuchen (P1075; GBC) als Verdränger um ca. einen Faktor 2 höher ( $\approx 24,4$  fmol/mg gegenüber  $\approx 12,8$  fmol/mg) als in den späteren Versuchen (MxS; LCRK; AZ-DF 265). Der Grund hierfür kann darin gesehen werden, dass für die Experimente mit P1075 bzw. GBC als Inhibitor Zellen verwendet wurden, die erst wenige Male passagiert worden waren (Anzahl der Passagen: 9-13). Je höher die Anzahl der Passagen war, die eine Zelllinie bereits erfahren hatte, desto niedriger erwies sich die spezifische Bindung an die daraus hergestellten Membranen (im Falle der Kompetitionen mit MxS, LCRK und AZ-DF 265 betrug die Passagenzahl 33 – 44). Vermutlich ist dies als ein Prozess der Zellalterung zu sehen, mit der Konsequenz, dass die Zellen mit steigendem Alter der Zelllinie weniger Kanäle in ihre Membranen einbauten. In späteren Experimenten, in denen wieder Zellen niedriger Passagen eingesetzt wurden, erreichte die spezifische Bindung pro mg Protein wieder Werte um 20-30 fmol/mg Protein.

### 4.1.2 **Kompetition der $^3\text{H}$ -P1075-Bindung an A10-Zellmembranen**

#### 4.1.2.1 *Spezifität der P1075-Bindung: $K_{\text{ATP}}$ -Kanal versus Cl-Kanal*

Die spezifische  $^3\text{H}$ -P1075-Bindung wurde durch  $K_{\text{ATP}}$ -Kanalöffner verschiedener Strukturklassen sowie durch die Blocker Glibenclamid (Sulfonylharnstoff) und AZ-DF 265 verdrängt (Abb. 3.2). Die Ergebnisse der Konkurrenzexperimente mit  $^3\text{H}$ -P1075 an A10-Zellmembranen zeigen, dass die untersuchte Bindungsstelle für P1075 von den wesentlichen für glatte Muskelzellen typischen  $K_{\text{ATP}}$ -Kanalmodulatoren erkannt wird; die  $K_{\text{ATP}}$ -Kanalmodulatoren verdrängen somit das mit hoher Affinität (3.2.5.1) bindende  $^3\text{H}$ -P1075 von Strukturen des  $K_{\text{ATP}}$ -Kanals.

Inzwischen ist die genaue Lokalisation der  $^3\text{H}$ -P1075-Bindungsstelle am  $K_{\text{ATP}}$ -Kanal durch Experimente an Zellen, die nur mit der SUR-Untereinheit bzw. nur mit der  $K_{\text{IR}}$ -Untereinheit des  $K_{\text{ATP}}$ -Kanals transfiziert worden waren, bekannt: Die Bindungsstelle für P1075 liegt an der  $\beta$ -Untereinheit SUR des  $K_{\text{ATP}}$ -Kanals (Hambrock et al., 1998; Schwanstecher et al., 1998). Aufgrund der heterologen Bindung von MxS (s.u.)

#### 4.1 Diskussion der $^3\text{H}$ -P1075-Bindungsexperimente an A10-Zellmembranen

---

ist ihre Stöchiometrie allerdings noch nicht endgültig geklärt. Es gibt jedoch Hinweise, dass am SUR jeweils eine SU- (Dörschner et al., 1999) und eine Öffnerbindungsstelle vorliegen (Artunc, F., Charakterisierung des Bindungsverhaltens des Radioliganden  $^3\text{H}$ -Glibenclamid an den rekombinant exprimierten Untereinheiten SUR2A, SUR2B und  $\text{K}_{\text{IR}}6.1$  des ATP-abhängigen  $\text{K}^+$ -Kanals ( $\text{K}_{\text{ATP}}$ ), Med. Dissertation, Universität Tübingen, 1999; Gross et al., 1999).

Durch Konkurrenzexperimente alleine ist dabei keine Aussage über den Modus der Verdrängung möglich. Um zu entscheiden, ob die Verdrängung durch direkte Konkurrenz um dieselbe Bindungsstelle oder durch negativ allosterische Kopplung zweier verschiedener Bindungsstellen erfolgt, sind Dissoziations- (Kinetik-) Experimente nötig. Diese wurden 1992 von Bray und Quast durchgeführt. Für die Öffner wurde dabei eine direkte Konkurrenz mit  $^3\text{H}$ -P1075 um dieselbe Bindungsstelle festgestellt, für den Blocker GBC hingegen ergaben sich Hinweise auf eine negativ allosterische Kopplung seiner Bindungsstelle(n) mit derjenigen von P1075. Gegen eine direkte Konkurrenz der Bindungsstellen von SU und Öffnern sprechen auch Untersuchungen von Schwanstecher et al. (1992).

P1075 zeigte in früheren Untersuchungen an glatten Gefäßmuskelzellen Wirkung als  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanalöffner und zugleich als  $\text{Cl}^-$ -Kanal-Blocker (Holevinsky et al., 1994).

Zwei verschiedene Modelle erklären dieses Ergebnis. Für das erste Modell gelte die Annahme, dass die  $\text{Cl}^-$ -Kanäle und die  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanäle keine gemeinsamen regulatorischen Proteine oder strukturellen Areale haben; damit muss P1075 an zwei verschiedene Bindungsstellen binden, eine Öffnerbindungsstelle am  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanal und eine Schliesserbindungsstelle am  $\text{Cl}^-$ -Kanal.

Im zweiten Modell wird angenommen, dass sich  $\text{Cl}^-$ -Kanal und  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanal ein gemeinsames regulatorisches Protein oder eine gemeinsame Untereinheit teilen. Dieses Modell erfordert nur ein einziges P1075-bindendes Protein, verlangt jedoch, dass dieses mit mindestens zwei verschiedenen Ionenkanälen interagiert. Es muss sich weiter um ein membranassoziiertes Protein handeln, denn gegen ein lösliches, zytosolisches Protein spricht die Tatsache, dass an A10-Zellmembranen ein Bindungserfolg stattfand. Bezieht man mit ein, dass die P1075-Bindungsstelle am SUR, der  $\beta$ -Untereinheit des

## 4. Diskussion

---

$K_{ATP}$ -Kanals, liegt (Hambrock et al., 1998; Schwanstecher et al., 1998; s.o.), so scheidet das zweite Modell aus.

In den vorliegenden Bindungsexperimenten wurde für P1075 an A10-Zellmembranen *nur eine Bindungsstelle* (und zwar am  $K_{ATP}$ -Kanal) gefunden. Die von Holevinsky et al. 1994 für P1075 beschriebene  $Cl^-$ -Kanal-Bindungsstelle an A10-Zellen konnte an Membranen nicht bestätigt werden. Es sei denn die beiden Bindungsstellen besitzen eine fast identische und somit nicht auflösbare Affinität.

Möglicherweise hängt die  $Cl^-$ -Kanal-Bindung von P1075 im Gegensatz zur  $K_{ATP}$ -Kanal-Bindung von der Intaktheit der Zelle und damit von einem intakten Zytoskelett ab und konnte deshalb nur in ganzen Zellen (Holevinsky et al., 1994) beobachtet werden. Auch unter dieser Annahme müssen die Bindungsstellen für P1075 an  $Cl^-$ -Kanal bzw.  $K_{ATP}$ -Kanal, wie im ersten Modell beschrieben, unabhängig sein.

### 4.1.2.2 *Unvollständige MxS-Verdrängungskurve*

Fast alle Öffner verdrängten  $^3H$ -P1075 vollständig, eine Tatsache, die für eine Konkurrenz um eine homogene Klasse von Bindungsstellen spricht. Jedoch deutet die von MxS nur zu ungefähr 71 % geleistete Verdrängung der  $^3H$ -P1075-Bindung auf eine Heterogenität der  $^3H$ -P1075-Bindungsstellen hin. Dasselbe Ergebnis wurde schon früher an Rattenherzmembranen belegt (Löffler-Walz und Quast, 1998) sowie an SUR2B-transfizierten HEK293-Zellen (Hambrock et al., 1998), an A10-Zellen (Russ et al., 1997) und an Koronararterien des Kalbes (Lemoine et al., 1996). An transient SUR2B/ $K_{IR6.2}$ -coexprimierten COS7-Zellen wurde für MxS eine zweistufige Verdrängung gefunden (Schwanstecher et al., 1998), wobei die erste Stufe der in A10-Zellmembranen gefundenen unvollständigen Verdrängung um 70 % entspricht; die zweite Stelle (im mM Bereich) wurde an A10-Zellmembranen nicht untersucht.

Für diesen Sachverhalt gibt es mehrere mögliche Erklärungen. Entweder bindet MxS (im Gegensatz zu den übrigen Öffnern) nur an einen gewissen Teil der (heterogenen und nicht miteinander interagierenden) P1075-Bindungsstellen oder aber an eine Klasse

## 4.1 Diskussion der $^3\text{H}$ -P1075-Bindungsexperimente an A10-Zellmembranen

---

von Bindungsstellen, die von der P1075-Bindungsstelle verschieden, aber negativ allosterisch mit ihr gekoppelt ist.

Für das erste Modell sprechen von Löffler-Walz und Quast (1998) veröffentlichte Daten, die eine durch MxS in hohen Konzentrationen (bis zu 100  $\mu\text{M}$ ) nicht gesteigerte Dissoziation des Komplexes aus  $^3\text{H}$ -P1075 und seinem Rezeptor beschreiben, was eine negativ allosterische Kopplung unwahrscheinlich erscheinen lässt, das Vorhandensein von zwei Klassen von Bindungsstellen mit sehr ähnlichen Affinitäten für alle Öffner mit Ausnahme von MxS dagegen unterstützt.

Doch es gibt noch ein drittes Modell, welches eine Erklärung für die unvollständige Hemmung durch MxS an einer homogenen P1075-Bindungsstelle gibt. Meisheri et al. berichteten 1993 über eine sehr leicht auftretende Proteinsulfatierung durch MxS. Somit ist denkbar, dass MxS seine Sulfat-Gruppe auf eine der Öffner-Bindungsstelle benachbarte Aminosäure überträgt und hierdurch eine weitere Bindung von MxS an diese Bindungsstelle verhindert (Hambrock et al., 1999).

### 4.1.2.3 Vergleich mit anderen Geweben

Die an A10-Zellmembranen erhaltenen  $\text{pIC}_{50}$ -Werte der einzelnen  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanalmodulatoren wurden mit den  $\text{pIC}_{50}$ -Werten dieser Substanzen aus früheren Bindungsexperimenten an Rattenherzmembranen (Löffler-Walz und Quast, 1998), an SUR2A- (Hambrock et al., 1999) bzw. SUR2B-transfizierten HEK293-Zellmembranen (Hambrock et al., 1998), an der Rattenaorta (Quast et al., 1992) sowie an ganzen A10-Zellen (Russ et al., 1997) verglichen (Tab. 4.1).

Durch den Vergleich mit den Ergebnissen der Studien an intakten Zellen sollte eine Zytoskelettabhängigkeit der  $^3\text{H}$ -P1075-Bindung untersucht, sowie die Korrelation der erhaltenen Daten mit denjenigen der anderen Studien ermittelt werden.

Insbesondere in den Experimenten mit GBC als Inhibitor fiel eine grosse Variabilität hinsichtlich der  $\text{pIC}_{50}$ -Werte sowie der Anzahl an Bindungsstellen auf. Aus diesem Grunde soll im folgenden der Vergleich für Öffner- und Schliesserbindung an den einzelnen Geweben getrennt erfolgen.

**Tabelle 4.1: Hemmung der <sup>3</sup>H-P1075-Bindung in verschiedenen Geweben durch K<sub>ATP</sub>-Kanalmodulatoren.**

A<sub>MAX</sub> bezeichnet die maximale Hemmung der spezifischen <sup>3</sup>H-P1075-Bindung, pK<sub>I</sub> den negativen Logarithmus der K<sub>I</sub>-Werte.

Zur Berechnung der pK<sub>I</sub>-Werte wurden die pIC<sub>50</sub>-Werte nach Cheng und Prusoff (1973) korrigiert (Gl. 15, 2.7.2). Grau hinterlegt sind die an Membranen erhaltenen Ergebnisse. Doppelt umrahmt sind die an Geweben mit SUR2B gemessenen Werte.

Substanz	A10-Zellmembranen		SUR2B-Membranen <sup>1</sup>		A10-Zellen <sup>2</sup>		Rattenaorta <sup>3</sup>		SUR2A-Membranen <sup>4</sup>		Rattenherzmembranen <sup>5</sup>	
	pK <sub>I</sub> (- log M)	A <sub>MAX</sub> (%B <sub>s</sub> )	pK <sub>I</sub> (- log M)	A <sub>MAX</sub> (%B <sub>s</sub> )	pK <sub>I</sub> (- log M)	A <sub>MAX</sub> (%B <sub>s</sub> )	pK <sub>I</sub> (- log M)	A <sub>MAX</sub> (%B <sub>s</sub> )	pK <sub>I</sub> (- log M)	A <sub>MAX</sub> (%B <sub>s</sub> )	pK <sub>I</sub> (- log M)	A <sub>MAX</sub> (%B <sub>s</sub> )
<b>P1075</b>	8,11 ± 0,04	100	8,48 ± 0,07	≈100	7,85 ± 0,03	100	8,54 ± 0,03	100	7,78 ± 0,02	≈100	8,14 ± 0,04	100
<b>MxS</b>	7,16 ± 0,03	71 ± 2	7,28 ± 0,02	≈70	6,97 ± 0,06	70 ± 2	7,45 ± 0,10	88	6,85 ± 0,05	≈70	7,19 ± 0,08	68 ± 2
<b>LCRK</b>	6,56 ± 0,05	100	6,95 ± 0,03	≈100	7,21 ± 0,04	85 ± 1	7,33 ± 0,06	88	6,37 ± 0,04	≈100	6,62 ± 0,03	94 ± 1
<b>GBC</b> , einstufig	6,42 ± 0,04	100	5,62 ± 0,05	≈100	5,35 ± 0,05	71 ± 2	6,36 ± 0,04	100	6,50 ± 0,04	≈100		
zweistufig	6,82 ± 0,07 5,14 ± 0,21	73 ± 5									7,12 ± 0,09 5,29 ±	60 ± 4
<b>AZ-DF 265</b>	5,45 ± 0,05	93 ± 7	5,20 ± 0,05	≈100	-	-	5,95 ± 0,03	100	5,51 ± 0,04	≈100	5,95 ± 0,11	62 ± 9

<sup>1</sup>Hambrock et al., 1998

<sup>2</sup>Russ et al., 1997

<sup>3</sup>Quast et al., 1992

<sup>4</sup>Hambrock et al., 1999

<sup>5</sup>Löffler-Walz und Quast, 1998

## 4.1 Diskussion der $^3\text{H-P1075}$ -Bindungsexperimente an A10-Zellmembranen

**Tab. 4.2: Vergleich der  $K_{\text{ATP}}$ -Kanalmodulatoren in verschiedenen Geweben.**

Lineare Korrelationsanalysen der  $\text{pK}_I$ -Werte aus Tab. 4.1 ergaben die unten aufgeführten Korrelationskoeffizienten ( $r$ ), Steigungen ( $s$ ), y-Achsenabschnitte ( $b$ ) und mittleren Differenzen ( $d = \text{pK}_I$  (Abszisse) -  $\text{pK}_I$  (Ordinate)) von der Identitätslinie;  $s = 1$  bedeutet, dass die  $\text{pK}_I$ -Werte auf den beiden Achsen einander proportional sind;  $10^d$  gibt den Faktor an, um welchen die  $\text{pK}_I$ -Werte auf der Ordinate im Mittel von denjenigen auf der Abszisse abweichen.

Abszisse	Ordinate	Korrelationsanalyse (nur Öffner)				Korrelationsanalyse (auch Blocker)			
		$r_1$	$s_1$	$d_1$	$b_1$	$r_2$	$s_2$	$d_2$	$b_2$
A10-Zellmembranen	Rattenherz-membranen <sup>1</sup>	1,0	0,98±0,01	-0,04±0,01	0,17±0,10	0,99	0,90±0,07	-0,18±0,08	0,83±0,46
A10-Zellmembranen	SUR2A-Membranen <sup>2</sup>	1,0	0,92±0,05	0,28±0,04	0,33±0,35	0,99	0,83±0,06	0,14±0,11	1,00±0,43
A10-Zellmembranen	SUR2B-Membranen <sup>3</sup>	0,98	1,01±0,19	-0,29±0,09	0,20±1,40	0,95	1,28±0,25	0,03±0,29	-1,90±1,68
A10-Zellmembranen	Intakte A10-Zellen <sup>4</sup>	0,79	0,47±0,35	-0,07±0,29	3,97±2,58	0,75	1,04±0,64	0,22±0,35	-0,50±4,56
A10-Zellmembranen	Rattenaorta <sup>5</sup>	0,95	0,81±0,26	-0,50±0,14	1,90±1,86	0,95	0,97±0,18	-0,39±0,14	0,60±1,23

<sup>1</sup>Löffler-Walz und Quast, 1998

<sup>2</sup>Hambrock et al., 1999

<sup>3</sup>Hambrock et al., 1998

<sup>4</sup>Russ et al., 1997

<sup>5</sup>Quast et al., 1992

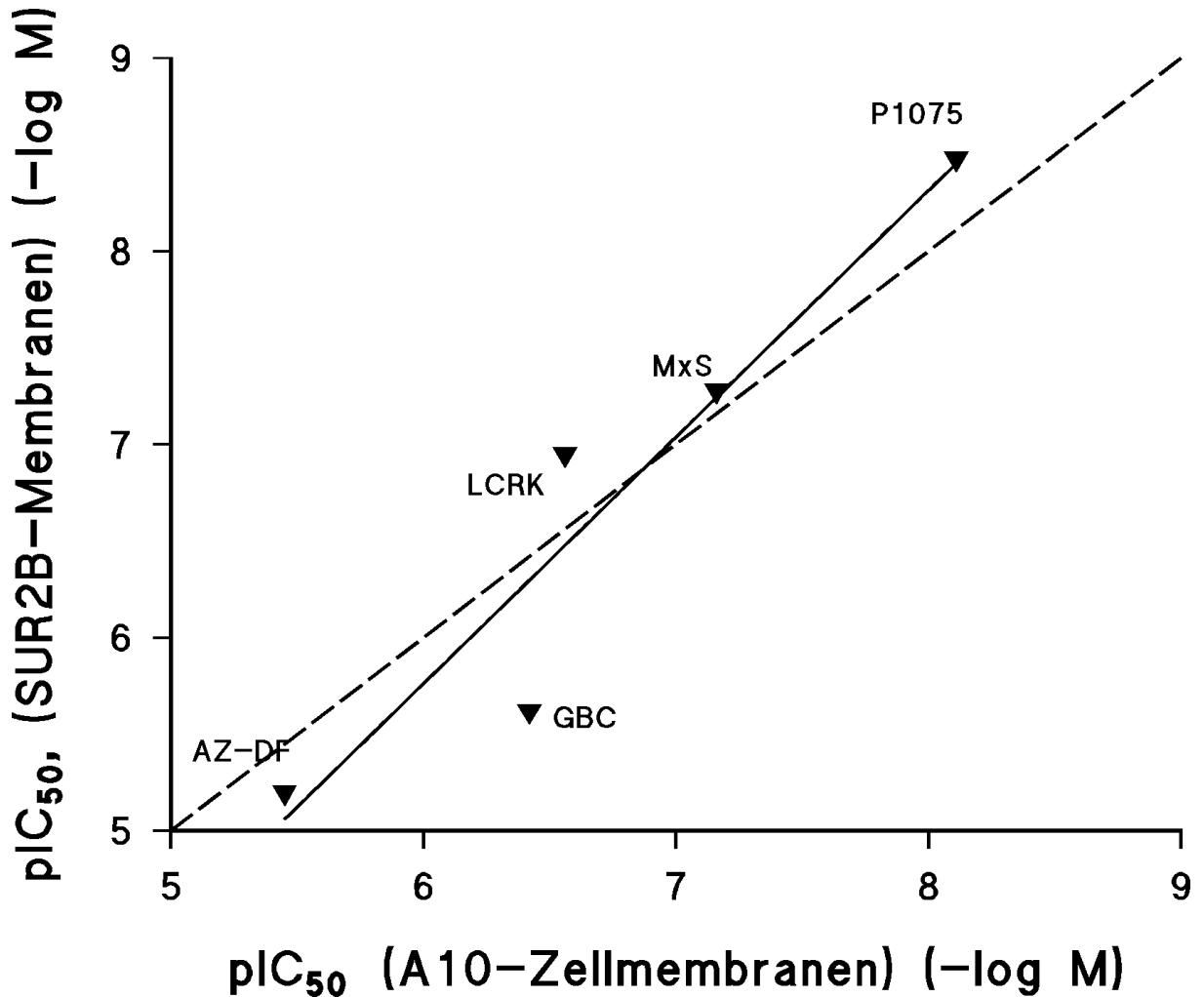


Abb. 4.1: Vergleich der pIC<sub>50</sub>-Werte in A10-Zellmembranen mit jenen aus SUR2B-transfizierten HEK293-Zellmembranen (Hambrock et al., 1998).

Die doppelt logarithmische Darstellung der Korrelation ( $pIC_{50} = -\log IC_{50} (M)$ ) ergab eine Steigung von  $1,28 \pm 0,25$  (y-Achsenabschnitt  $-1,90 \pm 1,68$ ;  $r = 0,95$ ). Die mittlere Differenz der pIC<sub>50</sub>-Werte in beiden Präparationen ( $d = pIC_{50} (A10\text{-Zellmembranen}) - pIC_{50} (SUR2B\text{-Membranen})$ ) war  $0,03 \pm 0,29$ .



#### 4.1 Diskussion der $^3\text{H}$ -P1075-Bindungsexperimente an A10-Zellmembranen

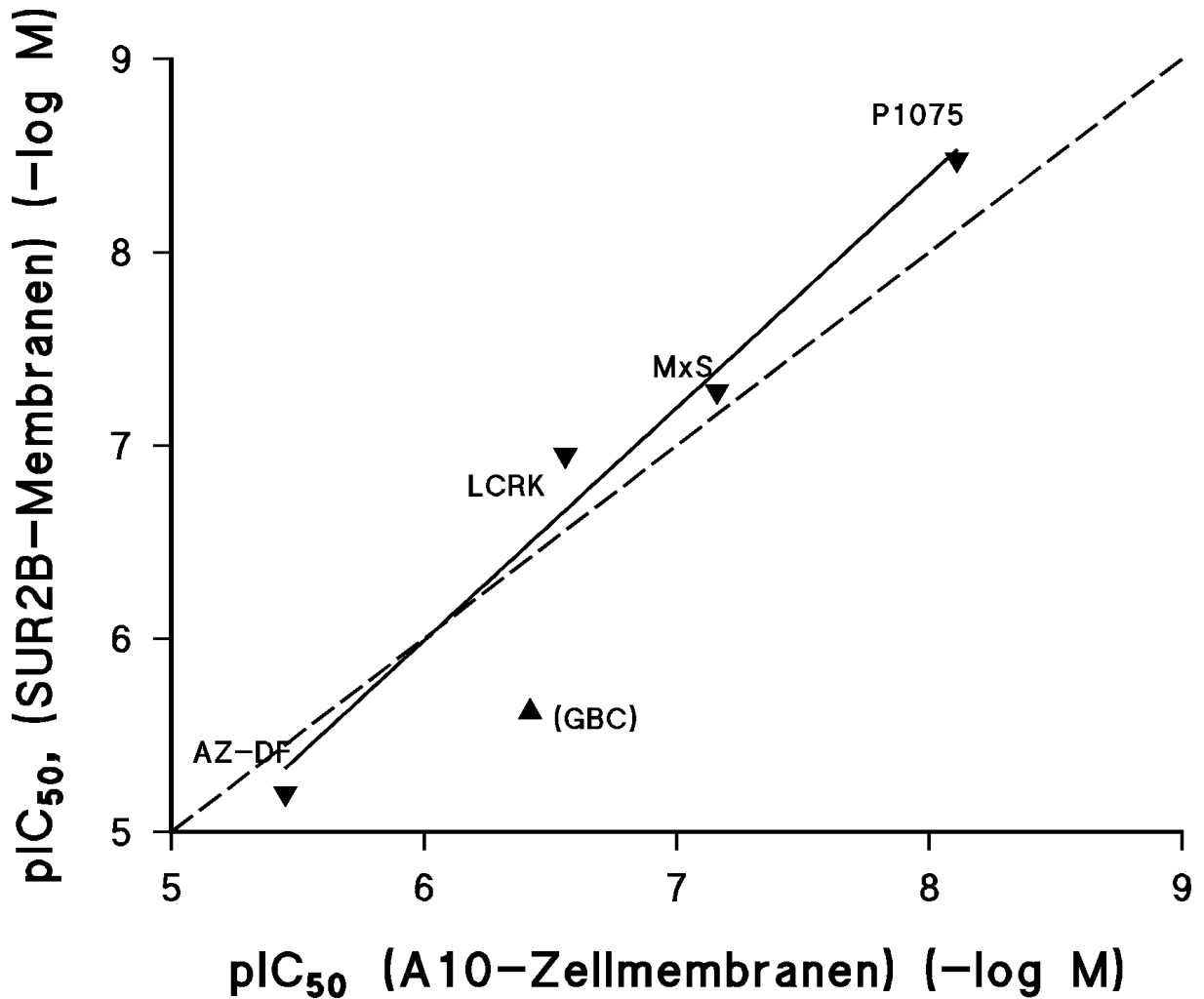


Abb 4.2: Korrelation unter Weglassung der Werte für GBC. Hierbei ergeben sich eine Steigung von  $1,20 \pm 0,12$ , ein y-Achsenabschnitt von  $-1,23 \pm 0,84$  und ein Korrelationskoeffizient von  $r = 0,99$ ; d errechnet sich zu  $-0,16 \pm 0,15$ :

## 4. Diskussion

---

### 4.1.2.3.1 Öffnerbindung

Vergleicht man die an A10-Zellmembranen erhaltenen Werte für die Öffner P1075, LCRK und MxS mit jenen an **SUR2B**- (Hambrock et al., 1998) bzw. an **SUR2A**- (Hambrock et al., 1999) transfizierten HEK293-Zellmembranen, so besteht in beiden Fällen eine hohe Korrelation (Tab. 4.2). Überraschenderweise ist die Korrelation mit SUR2A sogar höher als mit SUR2B, welcher als Untereinheit in glatten Muskelzellen, von denen die A10-Zellen abstammen, zu erwarten ist (Isomoto et al., 1996; Yamada et al., 1997). Die Werte für A10-Zellmembranen liegen zwischen denjenigen für SUR2A und SUR2B und weisen mit den an **Rattenherzmembranen** erhaltenen eine sehr hohe Übereinstimmung auf (Tab. 4.2), und zwar nicht nur in Bezug auf die Öffner, sondern auch in Bezug auf den Blocker GBC, bei welchem die Unterschiede in den verschiedenen Studien besonders gross sind.

Damit glichen sich die Affinitäten der  $K_{ATP}$ -Kanalmotoren in beiden Präparationen. Dies ist insofern überraschend, als in Rattenherzmembranen nicht die Bindungsstelle glattmuskulären Charakters der A10-Zellen mit Untereinheit SUR2B (Isomoto et al., 1996; Yamada et al., 1997), sondern diejenige des Herzens mit Untereinheit SUR2A zu erwarten ist (Inagaki et al., 1996; Okuyama et al., 1998).

Ein Grund hierfür könnte sein, dass bei der Präparation der Rattenherzmembranen glattmuskuläres Gewebe der Herzgefäße nicht von den eigentlichen Kardiomyozyten abgetrennt werden konnte (Löffler-Walz und Quast, 1998: Anteil der Kardiomyozyten an der Gesamtzahl an Zellen im Herzen: 33 %; Rest Endothelzellen, Perizyten, Fibroblasten, glatte Muskelzellen und Makrophagen (Nag, 1980)) und somit auch hieran Bindung erfolgte. Denn wie bei Tomlins et al. (1986) beschrieben, enthält eine Membranpräparation von nativem Rattenherzgewebe auch Plasmamembranen dieser weiteren Zelltypen. Zudem ist bekannt, dass sowohl Kardiomyozyten als auch glatte Gefässmuskelzellen, Endothelzellen (Ashcroft und Ashcroft, 1990; Quast, 1992; Edwards und Weston, 1993) sowie Mitochondrien (Paucek et al., 1992; Garlid et al., 1996; Szewczyk et al., 1997)  $K_{ATP}$ -Kanäle besitzen. Prinzipiell könnten diese Zelltypen also alle zu der beobachteten  $^3\text{H}$ -P1075-Bindung beigetragen haben. Jedoch stimmt das

#### 4.1 Diskussion der <sup>3</sup>H-P1075-Bindungsexperimente an A10-Zellmembranen

Profil der in Mitochondrien sowie der an Endothelzellen erhobenen Daten nicht mit demjenigen an Rattenherzmembranen überein (Löffler-Walz und Quast, 1998). Somit dürfte das pharmakologische Profil des  $K_{ATP}$ -Kanals an Rattenherzmembranen durch  $K_{ATP}$ -Kanäle in Kardiomyozyten sowie in glatten Gefäßmuskelzellen bestimmt sein. Aufgrund der hohen Übereinstimmung (s.o.) der Daten an Rattenherzmembranen mit denjenigen an A10-Zellmembranen liegt der Schluss nahe, dass das in Rattenherzmembranen erhaltene Profil durch glatte Gefäßmuskelzellen (d.h. SUR2B) mitbestimmt ist.

Eine andere Erklärung für die hohe Übereinstimmung der Affinitäten der  $K^+$ -Kanalmodulatoren an A10-Zellmembranen bzw. Rattenherzmembranen könnte die Unabhängigkeit der Öffnerbindung vom SUR-Subtyp sein. Jedoch konnten Hambrock et al. (1999) zeigen, dass die Öffnerbindung an SUR2A ungefähr viermal schwächer ist als an SUR2B (die GBC-Bindung dagegen ist an SUR2A achtmal stärker als an SUR2B).

Vielleicht ist die hohe Korrelation zwischen A10-Zell- und Rattenherzmembranen jedoch auch ganz einfach auf die Tatsache zurückzuführen, dass in beiden Fällen natives Gewebe und somit vollständige  $K_{ATP}$ -Kanäle vorlagen und nicht wie im Falle der transfizierten HEK293-Zellmembranen nur die jeweilige SUR-Untereinheit.

Beim Vergleich der Ergebnisse an A10-Zellmembranen und an **Rattenaorta** (Quast et al., 1992) zeigen die Daten für die Öffner P1075, MxS, und LCRK eine gute Korrelation ( $r = 0,95$ ; Tab. 4.2).

Die  $pK_I$ -Werte an A10-Zellmembranen sind niederaffiner als an Rattenaorta (s.o.). Diese Affinitätsniedrigung ist signifikant: der Y-Achsenabschnitt ist von Null verschieden (Tab. 4.2), was bei gleichzeitig unveränderter Steigung eine zur Ursprungsgeraden parallel verschobene Kurve anzeigt. Da in diesem Fall nun die Ergebnisse aus Versuchen an Zellmembranen mit denjenigen aus intakten Zellen verglichen wurden und hierbei an Membranen eine signifikante Affinitätsniedrigung auffiel, könnte man anzunehmen, dass die Öffnerbindung vom Vorhandensein eines intakten Zytoskeletts abhängig ist. Dies wird jedoch widerlegt durch Ergebnisse an intakten SUR2B-transfizierten HEK293-Zellen (Artunc, F.: Charakterisierung des

## 4. Diskussion

---

Bindungsverhaltens des Radioliganden  $^3\text{H}$ -Glibenclamid an den rekombinant exprimierten Untereinheiten SUR2A, SUR2B und  $\text{K}_{\text{IR}}6.1$  des ATP-abhängigen  $\text{K}^+$ -Kanals ( $\text{K}_{\text{ATP}}$ ), Med. Dissertation, Universität Tübingen, 1999) bzw. an daraus hergestellten Membranen (Hambrock et al., 1998), in welchen sich die Affinitäten für P1075 nicht unterscheiden. Die hier gefundene Affinitätsniedrigung könnte möglicherweise auf der Streuung zwischen den verschiedenen Methoden beruhen.

Vergleicht man nun weiter A10-Zellmembranen mit **intakten A10-Zellen**, so korrelieren die Werte für P1075 und MxS sehr gut (Tab 4.2). Hier tritt somit keine signifikante Affinitätsniedrigung durch das zerstörte Zytoskelett zutage.

Die Daten für den Öffner LCRK sind an A10-Zellmembranen etwas niederaffiner als an intakten A10-Zellen ( $\text{pK}_{\text{I}} = 7,21 \pm 0,04$ ). Eine Fehlbestimmung an A10-Zellmembranen ist nicht anzunehmen, da der hier ermittelte  $\text{pK}_{\text{I}}$ -Wert von  $6,56 \pm 0,05$  durch Ergebnisse an transient SUR2B-transfizierten COS7-Zellen (Schwanstecher et al., 1998) bestätigt wird ( $\text{pK}_{\text{I}} \approx 6,42$ ). Da sich jedoch die Ergebnisse für die Öffner P1075 und MxS (s.o.) an A10-Zellmembranen und A10-Zellen gut entsprechen, kann aufgrund des Ergebnisses für LCRK nicht auf eine generelle Affinitätsniedrigung der Öffner an Membranen im Vergleich zu intakten Zellen und somit auf eine Zytoskelettabhängigkeit der Öffner geschlossen werden, zumal ein Vergleich der  $\text{pK}_{\text{I}}$ -Werte für LCRK schon allein deshalb problematisch ist, da sich das maximale Ausmass der Verdrängung,  $A_{\text{MAX}}$ , an A10-Zellmembranen (100 %) und A10-Zellen (85 %) deutlich unterscheidet.

Insgesamt lässt sich sagen, dass die  $^3\text{H}$ -P1075-Bindung keine Zytoskelettabhängigkeit aufweist und die an A10-Zellmembranen in Konkurrenzexperimenten mit den Öffnern P1075, LCRK und MxS erhaltenen Ergebnisse mit den in früheren Studien erhaltenen Werten in guter Übereinstimmung stehen.

## 4.1 Diskussion der $^3\text{H}$ -P1075-Bindungsexperimente an A10-Zellmembranen

### 4.1.2.3.2 Schliesserbindung

Die heterologen Konkurrenzexperimente an A10-Zellmembranen deuten darauf hin, dass es für Glibenclamid zwei Bindungsstellen am  $K_{\text{ATP}}$ -Kanal gibt (Signifikanzprüfung mittels Akaike-Kriterium (Quast und Mähmann, 1982) und F-Test, s. 3.2.5.4). GBC konnte  $^3\text{H}$ -P1075 von zwei Bindungsstellen verdrängen. Da P1075 nachweislich spezifisch an SUR bindet (Hambrock et al., 1998; Schwanstecher et al., 1998), muss es von GBC von diesem verdrängt worden sein, z.B. durch direkte Konkurrenz um ein und dieselbe Bindungsstelle. Jedoch ist für GBC und P1075 keine direkte Konkurrenz anzunehmen, wie 1992 von Bray und Quast gezeigt wurde. Es handelt sich vielmehr um eine indirekte Konkurrenz von einer von der Öffnerbindungsstelle verschiedenen GBC-Bindungsstelle aus, welche jedoch mit dieser negativ allosterisch gekoppelt ist und daher vermutlich eine grosse räumliche Nähe aufweist.

Wie oben beschrieben beträgt der Anteil der ersten Bindungsstelle an den A10-Zellmembranen ca. 73 % ( $pK_{\text{I},1} = 6,82 \pm 0,07$ ;  $pK_{\text{I},2} = 5,14 \pm 0,21$ ). Diese Ergebnisse wurden durch die an **Rattenherzmembranen** (Löffler-Walz und Quast, 1998) erhaltenen bestätigt; der Anteil der ersten Bindungsstelle wurde hier zu ca. 60 % bestimmt,  $pK_{\text{I},1}$  betrug  $7,12 \pm 0,09$  und  $pK_{\text{I},2}$  ca. 5,29 (Tab. 4.2).

Im Gegensatz dazu wurde jedoch in den Konkurrenzexperimenten an **SUR2B-transfizierten HEK293-Zellmembranen** (Hambrock et al., 1998) bzw. an **SUR2A-transfizierten HEK293-Zellmembranen** (Hambrock et al., 1999) für GBC nur eine Bindungsstelle gefunden.

Da in den nativen Geweben der A10-Zell- sowie der Rattenherzmembranen der ganze  $K_{\text{ATP}}$ -Kanal, bestehend aus  $\alpha$ - ( $K_{\text{IR}}$ ) und  $\beta$ - (SUR) Untereinheit, und in den Experimenten jeweils eine zweistufige Verdrängung der  $^3\text{H}$ -P1075-Bindung durch GBC vorlagen, könnte eine mögliche Erklärung die niederaffine Bindung von GBC an von der SUR-Untereinheit verschiedene, nur in nativen Geweben vorliegende Strukturen sein. Aufgrund der Spezifität von  $^3\text{H}$ -P1075 gegenüber dem SUR (Hambrock et al., 1998; Schwanstecher et al., 1998) ist diese Möglichkeit nur unter der Voraussetzung einer negativ allosterischen Kopplung dieser Nicht-SUR-Bindungsstelle für GBC mit

#### 4. Diskussion

---

der Öffnerbindungsstelle in Betracht zu ziehen, was insgesamt recht unwahrscheinlich ist. Allerdings wurde beispielsweise eine niederaffine, im mikromolaren Bereich gelegene Bindung von GBC an  $K_{IR6.1}$  beschrieben, welcher in A10-Zellen die  $\alpha$ -Untereinheit bildet (Miller et al., 1999) und an welchen P1075 nicht bindet (Artunc, F., Charakterisierung des Bindungsverhaltens des Radioliganden  $^3\text{H}$ -Glibenclamid an den rekombinant exprimierten Untereinheiten SUR2A, SUR2B und  $K_{IR6.1}$  des ATP-abhängigen  $\text{K}^+$ -Kanals ( $K_{ATP}$ ), Med. Dissertation, Universität Tübingen, 1999). Dabei ist die GBC-Bindungsstelle am  $K_{IR6.1}$  nicht öffnerempfindlich, jedoch die GBC-Bindungsstelle am SUR. Eine Beteiligung von  $K_{IR6.1}$  an der niederaffinen GBC-Bindung bleibt noch zu klären.

Andererseits könnte die Heterogenität der Bindungsstellen auf zwei SUR-Subpopulationen in den Präparationen aus A10-Zell- bzw. Rattenherzmembranen zurückgeführt werden, die sich beispielsweise in der Phosphorylierung oder in ihrer Lokalisation in verschiedenen Zellorganellen unterscheiden. Eine ähnliche Beobachtung wurde bereits in Untersuchungen an SUR2B-transfizierten HEK293-Zellmembranen gemacht (Artunc, F., Charakterisierung des Bindungsverhaltens des Radioliganden  $^3\text{H}$ -Glibenclamid an den rekombinant exprimierten Untereinheiten SUR2A, SUR2B und  $K_{IR6.1}$  des ATP-abhängigen  $\text{K}^+$ -Kanals ( $K_{ATP}$ ), Med. Dissertation, Universität Tübingen, 1999).

A10-Zellmembranen und **Rattenaorta** korrelieren in Bezug auf den Schliesser GBC nicht, wenn man für die A10-Zellmembranen eine zweistufige Bindung voraussetzt. Denn an Rattenaorta wurde nur eine Bindungsstelle erkannt. Führt man das Vorhandensein zweier GBC-Bindungsstellen an A10-Zellmembranen auf zwei Rezeptorsubpopulationen zurück, so ist anzunehmen, dass in der Rattenaorta nur eine Population vorlag. (Möglicherweise lagen aber auch zwei Populationen vor und die zweite Bindungsstelle konnte nur nicht detektiert werden, weil sie sich in ihrer Affinität zur ersten um einen zu geringen Faktor unterscheidet und mittels der eingesetzten Messmethode nicht aufgelöst werden konnte.) Setzt man nämlich an den A10-Zellmembranen auch nur eine Bindungsstelle voraus, so korreliert diese gut mit der an Rattenaorta gefundenen.

#### 4.1 Diskussion der $^3\text{H}$ -P1075-Bindungsexperimente an A10-Zellmembranen

Nimmt man jedoch an, dass die zweite Bindungsstelle für GBC an A10-Zellmembranen am  $K_{\text{IR}}$  liegt, so hätten in der Rattenaorta ebenfalls zwei Bindungsstellen gefunden werden müssen, da auch hier der native Kanal vorlag. Dass die zweite Bindungsstelle nicht gefunden wurde, könnte zwar wie oben beschrieben daran gelegen haben, dass sie nicht aufgelöst werden konnte, wahrscheinlicher jedoch ist, dass die am  $K_{\text{IR}}$  gelegene GBC-Bindungsstelle mit der Öffnerbindungsstelle keine Wechselwirkung eingeht und somit hier auch nicht gemessen wurde.

Beim Vergleich zwischen A10-Zellmembranen und **intakten A10-Zellen** fällt auf, dass auch in diesem nativen Gewebe nur eine Bindungsstelle erkannt wurde, jedoch keine vollständige, sondern nur 70 %ige Verdrängung von dieser Bindungsstelle erfolgte.

Dieser Anteil der Verdrängung könnte der ersten an Membranen gefundenen Bindungsstelle entsprechen, welche dort ebenfalls rund 70 % ausmachte. Denkbar ist, dass der Anteil der zweiten an Membranen gefundenen Bindungsstelle von GBC an ganzen Zellen nicht gemessen oder aber nicht verdrängt werden konnte, sondern nur der Anteil dieser ersten Bindungsstelle, dies jedoch mit einer um ein Vielfaches geringeren Affinität für GBC an ganzen Zellen. Letzteres steht im Widerspruch zu der in homologen Konkurrenzexperimenten mit GBC (3.3.1) gefundenen Tatsache, dass die Zerstörung des Zytoskeletts eine Affinitätsniedrigung für GBC bedeutet. Da die Ergebnisse an intakten A10-Zellen in den restlichen Daten gut korrelieren, wird angenommen, dass die Affinität für den Blocker GBC möglicherweise etwas zu schwach bestimmt wurde, da in den Experimenten bedingt durch die angewandte Methode sehr grosse Fehler auftraten (Russ et al., 1997).

Auch in dieser Untersuchung liegt der native  $K_{\text{ATP}}$ -Kanal vor, d.h. unter der Annahme einer zweiten Bindungsstelle am  $K_{\text{IR}}$  müssten an intakten Zellen ebenfalls zwei Bindungsstellen erkannt werden; unter der Annahme, dass an Membranen verschiedene Rezeptorpopulationen verantwortlich waren, könnte in ganzen Zellen auch nur eine Bindungsstelle (aufgrund nur einer Population) vorliegen.

#### 4. Diskussion

---

Insgesamt bleiben beim Vergleich der GBC-Bindung in den einzelnen Geweben aufgrund der unterschiedlichen erhobenen Daten einige Fragen bezüglich der Anzahl an Bindungsstellen für P1075 am  $K_{ATP}$ -Kanal (SUR) offen, von welcher(n) es durch GBC verdrängt werden kann. Da die Ergebnisse früherer Untersuchungen darauf hinweisen, dass P1075 spezifisch (Hambrock et al., 1998; Schwanstecher et al., 1998) an die Untereinheit SUR des  $K_{ATP}$ -Kanals bindet und jeweils nur eine Bindungsstelle pro SUR-Molekül besitzt (Artunc, F., Charakterisierung des Bindungsverhaltens des Radioliganden  $^3\text{H}$ -Glibenclamid an den rekombinant exprimierten Untereinheiten SUR2A, SUR2B und  $K_{IR}6.1$  des ATP-abhängigen  $K^+$ -Kanals ( $K_{ATP}$ ), Med. Dissertation, Universität Tübingen, 1999; Gross et al., 1999), geben die Daten Grund zur Annahme, dass in manchen Präparationen, in denen GBC  $^3\text{H}$ -P1075 von zwei Bindungsstellen verdrängen konnte, entweder (mindestens) zwei Rezeptorsubpopulationen oder aber eine niederaffine zweite Bindungsstelle für GBC, z.B. an  $K_{IR}$ , vorlag. Diese GBC-Bindungsstelle am  $K_{IR}$  existiert tatsächlich (s.o.); um die hier gemessenen Ergebnisse zu erklären, müsste sie allerdings mit der (am SUR liegenden) P1075-Bindungsstelle negativ allosterisch gekoppelt sein.

Die Abhängigkeit der Schliesserbindung vom Zytoskelett wurden in nachfolgenden Experimenten mit  $^3\text{H}$ -GBC untersucht.



### 4.2 Diskussion der $^3\text{H}$ -GBC-Bindungsexperimente an A10-Zellmembranen

#### 4.2.1 Allgemeine Eigenschaften der $^3\text{H}$ -GBC-Bindung

Aus den homologen Konkurrenzexperimenten von  $^3\text{H}$ -GBC gegen GBC ergibt sich, dass an A10-Zellmembranen für GBC (mindestens) zwei Bindungsstellen vorliegen (Signifikanzprüfung mittels Akaike-Kriterium (Quast und Mähmann, 1982) und F-Test s. 3.3.1), deren Anteile jeweils ca. 50 % betragen.

Die Dichte der ersten Bindungsstelle,  $B_{\text{MAX},1}$ , in dieser Membranpräparation lag bei  $\approx 1$  pmol/mg Protein, die der zweiten Bindungsstelle,  $B_{\text{MAX},2}$ , bei  $\approx 19$  pmol/mg Protein. Der beträchtliche Unterschied zwischen den  $B_{\text{MAX}}$ -Werten für  $^3\text{H}$ -GBC zeigt an, dass die beiden GBC-Bindungsstellen auf zwei verschiedenen Proteinen lokalisiert sein müssen.

Problematisch wird es allerdings beim Vergleich der maximalen Bindungskapazitäten zwischen P1075 und GBC: Die Anzahl der Öffnerbindungsstellen errechnet sich in den homologen Experimenten mit  $^3\text{H}$ -P1075 zu rund 131 fmol/mg (Gl. 18); angenommen, die ersten Bindungsstellen für GBC stimmen in den heterologen und homologen Experimenten überein und liegen am SUR, so müsste die maximale Bindungskapazität, die für die erste Bindungsstelle in den homologen Konkurrenzen mit GBC (ca. 1 pmol/mg Protein) errechnet werden kann, mit der Anzahl der Öffnerbindungsstellen am SUR übereinstimmen – unter der Voraussetzung der 1:1-Stöchiometrie der Bindungsstellen von GBC und P1075, (Dörschner et al., 1999: vier SU-Bindungsstellen pro Kanal, Besetzung einer Stelle ausreichend für Kanalschließung; dagegen Russ et al., 1999: Besetzung aller 4 GBC-Bindungsstellen für Kanalschließung nötig; Schwanstecher et al., 1998: P1075 bindet spezifisch an SUR, Bindung von 4 Molekülen des Öffners nötig zur Kanalaktivierung; neu jedoch: Gross et al., 1999: Besetzung einer Öffnerbindungsstelle zur Kanalaktivierung ausreichend; Artunc, F., Charakterisierung des Bindungsverhaltens des Radioliganden  $^3\text{H}$ -Glibenclamid an den rekombinant exprimierten Untereinheiten SUR2A, SUR2B und  $K_{\text{IR}}6.1$  des ATP-abhängigen  $\text{K}^+$ -Kanals ( $K_{\text{ATP}}$ ), Med. Dissertation, Universität Tübingen, 1999; Russ et al., 1999 : 1:1-

#### 4. Diskussion

---

Stöchiometrie der Bindungsstellen für GBC und P1075 am SUR).

Rund 20 % des gebundenen  $^3\text{H}$ -GBC lassen sich durch P1075 verdrängen. P1075 bindet nur an SUR (Hambrock et al., 1998; Schwanstecher et al., 1998); mit hoher Wahrscheinlichkeit hat es daher  $^3\text{H}$ -GBC vom Sulfonylharnstoffrezeptor verdrängt. Die übrigen 80 % sind durch P1075 nicht verdrängbar.

Für diesen Sachverhalt gibt es zwei Erklärungsmodelle: Entweder konnte aufgrund der negativ allosterischen Kopplung der Bindungsstellen für GBC und P1075 (Bray und Quast, 1992) keine weitere Verdrängung von  $^3\text{H}$ -GBC durch P1075 erfolgen (obwohl die gesamte GBC-Bindung an SUR stattfand) und die GBC-Bindung ist nur wenig öffenerempfindlich.

Eine andere, wahrscheinlichere Erklärung dafür, dass nur 20 % des gebundenen  $^3\text{H}$ -GBC von P1075 verdrängt werden konnten, ist, dass eben nur diese 20 % tatsächlich an SUR gebunden haben, die übrigen 80 % dagegen an andere, unbekannte und aus stöchiometrischen Überlegungen (s.u.) wahrscheinlich vom niederaffin GBC-bindenden  $K_{\text{IR}}$  verschiedene Strukturen.

Geht man davon aus, dass der Öffner  $^3\text{H}$ -GBC vollständig (vom SUR) verdrängt, so hätte in der homologen Verdrängung mit  $^3\text{H}$ -GBC die erste Stufe 20 % statt 50 % der spezifischen Bindung ausmachen müssen. Dieser Wert wird auch durch homologe Verdrängungsversuche mit GBC an HEK293-Zellmembranen bestätigt (öffnerverdrängbarer hochaffiner Anteil der GBC-Bindung ca. 15 %; Russ et al., 1999).

Aus dieser Überlegung heraus wurde die homologe GBC-Verdrängungskurve neu berechnet, wobei der Anteil der ersten Bindungsstelle mit 20 % festgesetzt wurde. Damit ergaben sich folgende neue  $p\text{IC}_{50}$ -,  $\text{IC}_{50}$ - bzw.  $K_{\text{D}}$ -Werte:

$$p\text{IC}_{50,1} = 7,42 \pm 0,15;$$

$$p\text{IC}_{50,2} = 5,94 \pm 0,04;$$

$$\text{IC}_{50,1} = 38 (27; 54) \text{ nM};$$

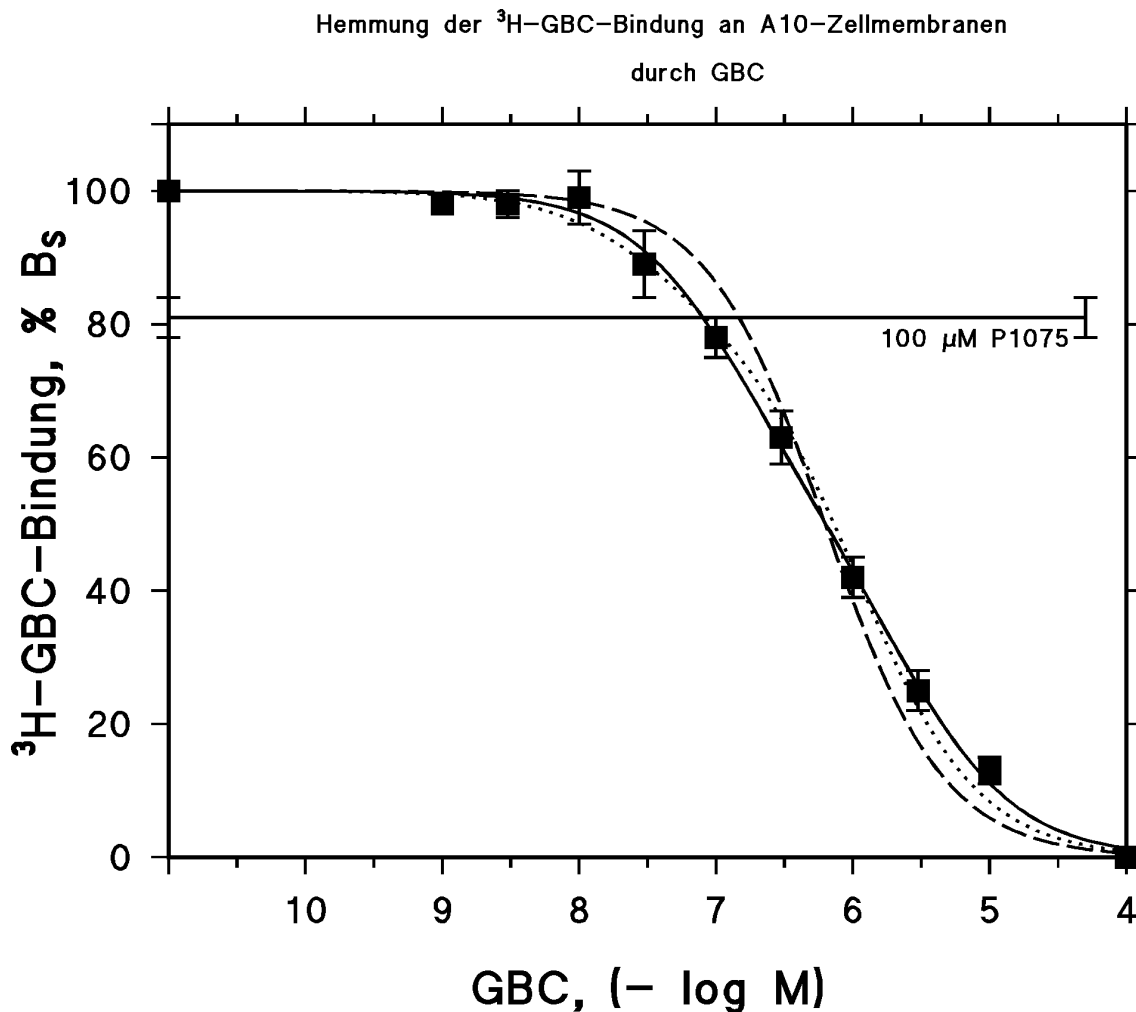
$$\text{IC}_{50,2} = 1,1 (1,2; 1,3) \mu\text{M};$$

$$K_1 = 36 (25; 52) \text{ nM};$$

$$K_2 = 1,1 (1,2; 1,3) \mu\text{M}.$$

Ausserdem liess sich nun die Bindungskapazität,  $B_{\text{MAX}}$ , der ersten GBC-Bindungsstelle berechnen zu rund **114 pmol/mg.**

## 4.2 Diskussion der $^3\text{H}$ -GBC-Bindungsexperimente an A10-Zellmembranen



**Abb. 4.3: Hemmung der  $^3\text{H}$ -GBC-Bindung an A10-Zellmembranen durch GBC mit festgesetzter Amplitude der ersten Bindungsstelle auf 20 % der spezifischen Bindung,  $B_s$ .**

Homologe Kompetitionskurve mit dem Blocker Glibenclamid (GBC, ■). Die spezifische  $^3\text{H}$ -GBC-Bindung ( $L_0 = 2,04 \pm 0,05$  nM) war  $30 \pm 5$  fmol/mg Membranprotein ( $63 \pm 1$  % der totalen Bindung) und wurde auf 100 % normiert; die Parameter der Anpassung an Gl. 33a (1-Komponentenmodell, gestrichelte Linie (---)) bzw. 33b (2-Komponentenmodell, durchgezogene Linie (-)) (2.8.2) sind Tab. 3.3 zu entnehmen. Die gepunktete Darstellung (···) gibt das 2-Komponentenmodell unter Festsetzung des Anteils der ersten Bindungsstelle auf 20 %  $B_s$  wider, die genauen Parameter finden sich unter Abschnitt 4.2.1. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 5 Experimenten. Parallel zur Abszisse ist mit einer durchgezogenen Linie der durch den Öffner P1075 (100  $\mu\text{M}$ ) verdrängbare Anteil der  $^3\text{H}$ -GBC-Bindung aufgetragen.

Unter diesen Voraussetzungen besteht nun eine gute Übereinstimmung der  $B_{\text{MAX}}$ -Werte der an SUR gefundenen Bindungsstellen für P1075 (131 fmol/mg) und GBC (114 fmol/mg), was eine 1:1-Stöchiometrie der Bindungsstellen von P1075 und GBC am

#### 4. Diskussion

---

SUR bestätigt, wie sie auch schon früher gefunden wurde (Russ et al., 1999).

Ungeklärt ist dabei die mangelnde Übereinstimmung des öffnerverdrängbaren Anteils der GBC-Bindung (20 %) mit dem Anteil der ersten Bindungsstelle an SUR in der homologen (in der ursprünglichen Berechnung  $49 \pm 8$  %, jetzt auf 20 % festgesetzt) bzw. heterologen Verdrängung ( $75 \pm 3$  %). Dennoch ist anzunehmen, dass die für GBC in der homologen sowie der heterologen Kompetition gemessenen ersten Bindungsstellen übereinstimmen und vermutlich ca. 20 % der gesamten GBC-Bindung ausmachen und dass P1075 den Radioliganden GBC vollständig verdrängt, da dieser Wert auch durch andere Studien bestätigt wird (s.o.).

Unter der Annahme, dass nur die erste, hochaffine Bindungsstelle (gemessen ca. 50 %, tatsächlich wohl ca. 20 %) für Glibenclamid am SUR liegt (denn gegen zwei Bindungsstellen am SUR sprechen Ergebnisse anderer Studien innerhalb der Arbeitsgruppe, die auf eine GBC-Bindungsstelle pro SUR hindeuten (Artunc, F., Charakterisierung des Bindungsverhaltens des Radioliganden  $^3\text{H}$ -Glibenclamid an den rekombinant exprimierten Untereinheiten SUR2A, SUR2B und  $\text{K}_{\text{IR}}6.1$  des ATP-abhängigen  $\text{K}^+$ -Kanals ( $\text{K}_{\text{ATP}}$ ), Med. Dissertation, Universität Tübingen, 1999), lässt sich ihr  $\text{IC}_{50}$ -Wert (38 (27; 54) nM) mit dem hochaffinen Wert aus der heterologen Kompetition von  $^3\text{H}$ -P1075 gegen GBC (186 (129; 268) nM) vergleichen. Der entweder an einer anderen Rezeptorsubpopulation oder einer anderen Struktur als SUR gemessene niederaffine Wert aus der heterologen Verdrängung wird dabei ausser acht gelassen.

Es fällt auf, dass die homologe Kompetition einen um rund einen Faktor 5 affineren  $\text{IC}_{50}$ -Wert als die heterologe Kompetition liefert. Dies ist nicht überraschend, denn auch in anderen Studien an SUR2B-transfizierten HEK293-Zellen wurde eine negative Allosterie der beiden Bindungsstellen für GBC und P1075 beobachtet. Es wurde eine nach vorheriger P1075-Bindung erniedrigte Affinität für GBC beschrieben (Artunc, F., Charakterisierung des Bindungsverhaltens des Radioliganden  $^3\text{H}$ -Glibenclamid an den rekombinant exprimierten Untereinheiten SUR2A, SUR2B und  $\text{K}_{\text{IR}}6.1$  des ATP-abhängigen  $\text{K}^+$ -Kanals ( $\text{K}_{\text{ATP}}$ ), Med. Dissertation, Universität Tübingen, 1999). Eine umgekehrte Störung der P1075-Bindung durch vorherige Bindung von GBC erfolgte hierbei nicht.

## 4.2 Diskussion der $^3\text{H}$ -GBC-Bindungsexperimente an A10-Zellmembranen

---

### 4.2.2 Konkurrenz der $^3\text{H}$ -GBC-Bindung

#### 4.2.2.1 Potentielle Angriffspunkte für GBC

Kompetitionsbindungsexperimente mit  $^3\text{H}$ -GBC an nativen HEK293-Zellmembranen zeigten keine Bindung für GBC (Artunc, F., Charakterisierung des Bindungsverhaltens des Radioliganden  $^3\text{H}$ -Glibenclamid an den rekombinant exprimierten Untereinheiten SUR2A, SUR2B und  $\text{K}_{\text{IR}6.1}$  des ATP-abhängigen  $\text{K}^+$ -Kanals ( $\text{K}_{\text{ATP}}$ ), Med. Dissertation, Universität Tübingen, 1999). Transfizierte man die Zellen mit der  $\alpha$ -Untereinheit des vaskulären  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanal,  $\text{K}_{\text{IR}6.1}$ , so wiesen die daraus hergestellten Zellmembranen nun eine niederaffine (im  $\mu\text{M}$  Bereich) Bindungsstelle für GBC auf. Transfektion mit der  $\beta$ -Untereinheit, SUR2B, lieferte eine zweistufige homologe Verdrängungskurve für GBC ( $\text{IC}_{50,1} \approx 89 \text{ nM}$ ,  $\text{IC}_{50,2} \approx 9 \mu\text{M}$ ). Die homologe Verdrängung von  $^3\text{H}$ -P1075 durch P1075, welches nur an den SUR bindet (Hambrock et al., 1998; Schwanstecher et al., 1998), verlief an derselben Membranpräparation einstufig ( $\text{IC}_{50} \approx 4 \text{ nM}$ ) und die berechnete Anzahl an Bindungsstellen für diese P1075-Bindungsstelle am SUR2B entsprach der Bindungskapazität der ersten Stufe der homologen GBC-Verdrängung. Somit wurden am rekombinanten System jeweils eine Öffner- und eine Sulfonylharnstoffbindungsstelle am SUR2B gefunden.

Die zweite Stufe der homologen GBC-Verdrängung wurde infolge der durch GBC in dieser Präparation ebenfalls monophasisch verdrängten  $^3\text{H}$ -P1075-Bindung ( $\text{IC}_{50} \approx 2,4 \mu\text{M}$ , Hambrock et al., 1998) auf eine in dieser Membranpräparation vorliegende zweite SUR2B-Rezeptorsubpopulation (z.B. andere Phosphorylierung, s. 4.1.2.3.2) oder die niederaffine Bindung an ein nicht bekanntes Protein zurückgeführt. Im nativen System der A10-Zellen mit sowohl zweistufiger Verdrängung der  $^3\text{H}$ -P1075- als auch der  $^3\text{H}$ -GBC-Bindung lässt sich unter diesen Voraussetzungen folgende Lokalisation der GBC-Bindungsstellen vermuten:

Die hochaffine GBC-Bindungsstelle ( $\text{IC}_{50} \approx 38 \text{ nM}$  bei homologer Konkurrenz) liegt am SUR(2B) selbst (s.o.), ihr Anteil an der gesamten GBC-Bindung beträgt rund 20 %. Problematisch bleibt dabei die oben bereits erwähnte mangelnde Übereinstimmung des öffnerverdrängbaren Anteils der GBC-Bindung (20 %) mit dem Anteil der ersten

## 4. Diskussion

---

Bindungsstelle an SUR in der homologen (gemessen  $49 \pm 8 \%$ , jedoch auf 20 % festgesetzt, s.o.) bzw. heterologen Verdrängung ( $75 \pm 3 \%$ ).

Die niederaffine GBC-Bindungsstelle (mit  $\mu\text{M}$  Affinität) liegt an einem von SUR verschiedenen, vermutlich endogenen Protein. Die Vermutung, es könnte sich dabei um die  $\alpha$ -Untereinheit des vaskulären  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanals  $\text{K}_{\text{IR}6.1}$ , wie sie in A10-Zellen vorliegt (Miller et al., 1999), handeln, erscheint eher unwahrscheinlich, obwohl GBC wie oben beschrieben mit  $\mu\text{M}$  Affinität an sie bindet und diese Bindung nicht öffenerempfindlich ist. Denn aufgrund der bekannten 1:1-Stöchiometrie zwischen SUR und  $\text{K}_{\text{IR}}$  und der Tatsache, dass beide nur eine GBC-Bindungsstelle besitzen (s.o.), müsste die Anzahl der Bindungsstellen für GBC an beiden gleich hoch sein. Doch es findet sich für die GBC-Bindung an SUR eine  $\text{B}_{\text{MAX}}$  von ca. 114 fmol/mg, an  $\text{K}_{\text{IR}}$  hingegen eine maximale Bindungskapazität von ca. 14 pmol/mg (120fach).

### 4.2.2.2 Vergleich mit anderen Geweben

Vergleicht man nun die an A10-Zellmembranen erhobenen Daten mit den Ergebnissen an Glomerulamembranen (Metzger et al., 1997), Rattenaortenringen (Löffler-Walz et Quast, 1997) sowie an Rattenglomerula (Metzger et al., 1997), so stellt man fest, dass in allen Geweben zwei Bindungsstellen für Glibenclamid vorliegen. Allerdings ist nicht bekannt, woran genau die an Glomerula gemessene  $^3\text{H}$ -GBC-Bindung erfolgt, da SUR im Nierenepithel nicht exprimiert wird und  $^3\text{H}$ -P1075 dort folgerichtig nicht bindet. Konkurrenzexperimente unter Verwendung von  $^3\text{H}$ -GBC als Radioliganden an Rattenherzmembranen (Gopalakrishnan et al., 1991) und an Rattenaortenringen (Löffler-Walz und Quast, 1997) zeigten ebenfalls eine Heterogenität der GBC-Bindungsstellen auf.

## 4.2 Diskussion der <sup>3</sup>H-GBC-Bindungsexperimente an A10-Zellmembranen

**Tabelle 4.3: Hemmung der <sup>3</sup>H-GBC-Bindung in verschiedenen Geweben durch GBC**

A<sub>MAX</sub> bezeichnet die maximale Hemmung der spezifischen <sup>3</sup>H-GBC-Bindung, pK<sub>I</sub> den negativen Logarithmus der K<sub>I</sub>-Werte. Zur Berechnung der pK<sub>I</sub>-Werte wurden die pIC<sub>50</sub>-Werte nach Cheng und Prusoff (1973) korrigiert (Gl. 15, 2.7.2).

Substanz	A10-Zellmembranen		Glomerulamembranen <sup>1</sup>		Rattenaortenringe <sup>2</sup>		Rattenglomerula <sup>1</sup>	
	pK <sub>I</sub> (- log M)	A <sub>MAX</sub> (%B <sub>S</sub> )	pK <sub>I</sub> (- log M)	A <sub>MAX</sub> (%B <sub>S</sub> )	pK <sub>I</sub> (- log M)	A <sub>MAX</sub> (%B <sub>S</sub> )	pK <sub>I</sub> (- log M)	A <sub>MAX</sub> (%B <sub>S</sub> )
GBC, einstufig	6,20±0,02	100 (n <sub>H</sub> =0,7)						
zweistufig	6,84±0,12 5,59±0,12	49±8	6,82±0,18 4,93±0,12	≈ 36	≈ 7,72 ≈ 4,49	≈ 20	7,33±0,08 5,01±0,04	≈ 33

<sup>1</sup>Metzger et al., 1997

<sup>2</sup>Löffler-Walz et Quast, 1997

Der prozentuale Anteil der ersten Bindungsstelle weist in allen Geweben eine gute Korrelation auf (Tab. 4.3) und die Affinität für GBC in den mit Membranen (A10-Zell- bzw. Rattenglomerulamembranen) durchgeführten Versuchen zeigt eine hohe Übereinstimmung (Tab. 4.3) und ist um ca. einen Faktor 5 geringer als in den ebenfalls miteinander gut korrelierenden (Tab. 4.3) Versuchen, in welchen intakte Zellen vorlagen (Rattenaortenringe bzw. Rattenglomerula). Es ist anzunehmen, dass die Zerstörung des Zytoskeletts in der Membranpräparation für die verminderte Affinität von GBC verantwortlich ist.

Somit ist im Gegensatz zur Öffnerbindung (3.2) die Schliesserbindung von der Intaktheit des Zytoskeletts abhängig und durch seine Zerstörung beeinflussbar.

Dieses Ergebnis wurde bestätigt durch Studien an SUR2B-transfizierten HEK293-Zellen und daraus hergestellten Membranen, in denen eine Affinitätsniedrigung um einen Faktor 2-3 nachgewiesen wurde (Artunc, F., Charakterisierung des Bindungsverhaltens des Radioliganden <sup>3</sup>H-Glibenclamid an den rekombinant exprimierten Untereinheiten SUR2A, SUR2B und K<sub>IR</sub>6.1 des ATP-abhängigen K<sup>+</sup>-Kanals (K<sub>ATP</sub>), Med. Dissertation, Universität Tübingen, 1999).

## 4. Diskussion

---

### 4.3 Diskussion der Bindungsexperimente an ganzen A10-Zellen

In den Bindungsexperimenten an ganzen A10-Zellen wurde der für Zellmembranversuche optimierte Puffer verwendet und das für <sup>3</sup>H-P1075-Membranversuche obligatorische (Hambrock et al., 1998; Schwanstecher et al., 1998) ATP zugesetzt. Dieses ist jedoch für ganze Zellen als Energielieferant nutzlos, da es nicht ins Innere der Zellen gelangen kann. Zudem wurde nicht beachtet, dass ganze Zellen einen mit Carbogen (95 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>) begasten und mit Glucose versetzten Puffer benötigen, d.h. metabolisch geschützt werden müssen und nicht bei Raumtemperatur zentrifugiert und präpariert werden sollten, sondern bei 37 °C.

Es ist anzunehmen, dass die Zellen ihre Vitalität und Integrität einbüßten und dass die Plasmamembran ihre Barrierefunktion nicht mehr erfüllen konnte, so dass das extrazellulär hinzugegebene ATP die Bindung ähnlich wie in den Membranversuchen zu aktivieren vermochte und die Experimente pIC<sub>50</sub>-Werte lieferten, die denen der Membranversuche entsprechen (pIC<sub>50</sub> = 7,87). Somit stellen diese Versuche keinen Bindungserfolg an ganzen Zellen dar.

Die Methode der Ganzzellversuche an A10-Zellen wurde wieder verlassen, da keine Möglichkeit bestand, die Zellen möglichst unbeschadet von der Schalenoberfläche abzulösen.



### 4.4 Diskussion der $^3\text{H}$ -P1075-Bindungsexperimente an SUR2B-transfizierten HEK293-Zellmembranen

#### **4.4.1 Allgemeine Eigenschaften der $^3\text{H}$ -P1075-Bindung an HEK293-Zellmembranen**

In homologen Konkurrenzexperimenten mit  $^3\text{H}$ -P1075 an SUR2B-transfizierten HEK293-Zellmembranen wurde die  $K_D$  zu  $\approx 4$  nM bestimmt (Hambrock et al., 1998). Der Bindungsvorgang verläuft monophasisch. Weitere Studien zeigten, dass P1075 spezifisch an die  $\beta$ -Untereinheit SUR des  $K_{ATP}$ -Kanals bindet (Hambrock et al., 1998; Schwanstecher et al., 1998) und vermutlich jeweils eine Bindungsstelle pro SUR-Molekül vorliegt (Gross et al., 1999). Diese Öffnerbindungsstelle ist mit der GBC-Bindungsstelle negativ allosterisch gekoppelt (Bray und Quast, 1992; Hambrock et al., 1998).

#### **4.4.2 Konkurrenz der $^3\text{H}$ -P1075-Bindung an HEK293-Zellmembranen**

$\text{AP}_{2-5}\text{A}$ , PPADS, TNP-ATP und  $\beta\gamma$ -Methylen-ATP hatten sich in den zunächst durchgeführten Screeningversuchen nicht als taugliche Hemmer der  $^3\text{H}$ -P1075-Bindung gezeigt und wurden daher nicht weiter untersucht.

Für die Diadenosinpolyphosphate mag dieses Ergebnis zunächst etwas überraschend erscheinen, da Jovanovic et al. (1996) mittels Patch-Clamp in  $\text{AP}_5\text{A}$  einen potenten Antagonisten der  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität an Kardiomyozyten gefunden hatten. Jedoch darf aus dessen Fähigkeit, den  $K_{ATP}$ -Kanal zu schliessen, nicht auf eine Bindung an die Öffnerbindungsstelle oder auch nur eine negativ allosterische Kopplung mit dieser (wie im Falle von GBC, s.o.) geschlossen werden. In den an SUR2B-transfizierten HEK293-Zellmembranen durchgeführten Konkurrenzexperimenten konnte  $\text{AP}_5\text{A}$  selbst in einer

#### 4. Diskussion

---

Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  die  $^3\text{H}$ -P1075-Bindung nur auf  $98 \pm 6 \%$  verdrängen. Daraus kann gefolgert werden, dass AP<sub>5</sub>A nicht mit P1075 um dessen Bindungsstelle konkurriert. Der Mechanismus über den AP<sub>5</sub>A eine Kanalschliessung bewirkt, ist ganz offensichtlich von der Öffnerbindungsstelle unabhängig. Möglicherweise verläuft er über eine Bindung an K<sub>IR</sub>6.2 (Quast, 2000; persönliche Mitteilung).

Das intrazellulär synthetisierte und strukturell mit ATP verwandte AP<sub>5</sub>A ist in der Lage, die Aktivität verschiedener nukleotidbindender Enzyme, wie z.B. Adenylatzyklase, zu hemmen, welche eine entscheidende Rolle in der Aufrechterhaltung der Energie-Homöostase von Muskelzellen spielen (Jovanovic et al., 1996). Dabei wird ihre Wirkung auf eine Interaktion mit intrazellulär gelegenen AMP- und/oder ATP-Bindungsstellen zurückgeführt. Aufgrund dieser offensichtlichen Affinität für Nukleotidbindungsstellen ist anzunehmen, dass diese Substanz auch eine Affinität zu nukleotidgesteuerten Ionenkanälen wie dem K<sub>ATP</sub>-Kanal besitzt, wie dies von Jovanovic et al. (1996) an K<sub>IR</sub>6.2 auch gezeigt werden konnte. Eine Interaktion mit den Nukleotidbindungsstellen des SUR2B wird durch die an HEK293-Zellmembranen durchgeführten Bindungsstudien auch nicht widerlegt, denn einerseits könnte die Substanz dort die Wirkung von ATP imitiert haben, doch auch im umgekehrten Fall einer reinen Besetzung der Nukleotidbindungsstellen ohne ATP-ähnliche Wirkung wäre kein erheblicher Verlust der  $^3\text{H}$ -P1075-Bindung eingetreten, obwohl diese auf das Vorhandensein von ATP angewiesen ist (Hambrock et al., 1998; Schwanstecher et al., 1998). Denn in den Experimenten lag ATP in gesättigter Konzentration (3 mM) vor.

Ähnliches könnte für die ATP-Abkömmlinge TNP-ATP und  $\beta\gamma$ -Methylen-ATP sowie den P<sub>2</sub>-Rezeptorantagonisten PPADS (Strukturformeln s. 1.8) zutreffen, müsste jedoch ebenfalls in elektrophysiologischen Experimenten (Nachweis einer Schliessung des Kanals) sowie in Aktivierungsexperimenten (Nachweis einer Interferenz mit der ATP-Bindungsstelle) überprüft werden. Voraussetzung ist allerdings in allen Fällen eine Hydrolysierbarkeit der Substanz, denn sonst ist selbst bei einer Bindung an die Nukleotidbindungsstelle(n) die ATP-ähnliche Wirkung nicht gewährleistet, da diese neben der Kanalhemmung auch die Förderung der  $^3\text{H}$ -P1075-Bindung umfasst, welche nur durch hydrolysierbare ATP-Analoga bewirkt wird (Hambrock et al., 1998;

#### 4.4 Diskussion der <sup>3</sup>H-P1075-Bindungsexperimente an SUR2B

Schwanstecher et al., 1998). Nicht-hydrolysierbare Substanzen sollten daher ihre Wirkung am  $K_{ATP}$ -Kanal in einer Hemmung der <sup>3</sup>H-P1075-Bindung äussern – entweder über eine Interferenz mit der Öffner- oder mit den Nukleotidbindungsstellen.

Die übrigen 6 der 13 eingesetzten Testsubstanzen, Phloxin B, Suramin, Evans Blue (EB), Cibacron Blue (CB), Reactive Red 2 (RR2) und DIDS, zeigten hingegen eine deutliche Verdrängung der <sup>3</sup>H-P1075-Bindung (Tab. 3.5).

Zur Auswahl der anionischen Verbindungen Phloxin B und Suramin hatte ihre in früheren Untersuchungen von Bachmann et al. (1999) gezeigte Blockade des CFTR (Steueruntereinheit des epithelialen  $K_{ATP}$ -Kanals) mit einer um einen Faktor 20 grösseren Potenz als Glibenclamid ( $K_i \approx 20\text{-}50 \mu\text{M}$ ) geführt. Ihre Hemmung der <sup>3</sup>H-P1075-Bindung am SUR verlief nahezu vollständig (ca. 90 %). Der Grund für ihre nicht 100 %ige Verdrängung ist dabei vermutlich in einer Allosterie ihrer Bindungsstelle mit derjenigen des Öffners P1075 zu suchen (s.u.). Für Phloxin B wurde dies sogar bereits gezeigt: Die Substanz konkurriert mit GBC um dessen Bindungsstelle am SUR, welche mit der Öffnerbindungsstelle negativ allosterisch gekoppelt ist (Bray und Quast, 1992), und ihre Affinität wird ebenso wie die von GBC durch die Anwesenheit von MgATP (300  $\mu\text{mol/l}$ ) deutlich reduziert (Schwanstecher et al., 1995).

Die Hill-Koeffizienten ( $n_H \approx 1$ ) von Phloxin B und Suramin zeigten einen Bindungsprozess an nur eine Bindungsstelle an (2.7.4). Theoretisch denkbar, jedoch eher unwahrscheinlich, ist auch eine Bindung an zwei in ihren Affinitäten sehr ähnliche und daher nicht auflösbare Bindungsstellen.

Evans Blue, Cibacron Blue, Reactive Red 2 und DIDS waren aufgrund ihrer Eigenschaften als  $P_2$ -Rezeptorantagonisten (Ralevic und Burnstock, 1998) als putative  $K_{ATP}$ -Kanalmodulatoren in Erwägung gezogen worden (1.7). Für DIDS sprach neben dem bekannten  $P_2$ -Rezeptorantagonismus die Strukturähnlichkeit mit GBC (Cabantchik et al. 1978). Zudem wurde es in elektrophysiologischen Studien von Furukawa et al. 1993 als  $K_{ATP}$ -Kanal-Schliesser erkannt.

Mit Ausnahme von Reactive Red 2, welches nur eine rund 60%ige Verdrängung leistete, verdrängten die übrigen Substanzen zwischen 90 % (Evans Blue) und 100 % (Cibacron Blue, DIDS) der <sup>3</sup>H-P1075-Bindung. Wie oben bereits angedeutet ist der

#### 4. Diskussion

---

Grund für die nicht immer vollständig verlaufende Verdrängung von  $^3\text{H}$ -P1075 vermutlich in einer allosterischen Kopplung ihrer Bindungsstellen mit derjenigen von  $^3\text{H}$ -P1075 zu suchen. So zeigten neue, bisher unveröffentlichte Experimente von Löffler-Walz und Quast (1999), dass DIDS sich gegenüber GBC am SUR1 kompetitiv verhält, d.h., dass DIDS an die GBC-Bindungsstelle bindet, welche wiederum mit der Öffnerbindungsstelle negativ allosterisch gekoppelt ist. Möglicherweise gilt für die übrigen Testsubstanzen dasselbe.

Bei der Betrachtung der Hill-Koeffizienten,  $n_H$ , der einzelnen Substanzen fallen insbesondere 3 Werte ins Auge: Zum einen der deutlich unter 1 liegende Hill-Koeffizient von DIDS ( $n_H \approx 0,7$ ), welcher auf einen Prozess an mehr als einer Bindungsstelle hinweist (Signifikanzprüfung mittels Akaike-Kriterium (Quast und Mählmann, 1982) und F-Test s. 3.5.1.1.6; andererseits wurden inzwischen von Löffler-Walz und Quast in bisher unveröffentlichten Experimenten Hillkoeffizienten von  $n_H = 1$  gefunden) und zum anderen die deutlich über 1 liegenden Hill-Koeffizienten ( $n_H \approx 1,5$ ) von Evans Blue und Reactive Red 2 (RR2), welche auf eine positive Kooperativität hindeuten, was bedeutet, dass mehrere Liganden mit steigender Affinität binden (2.7.4). Allerdings ist dabei  $n_H = 1$  nicht in allen Experimenten sicher ausschliessbar, so dass dies keinen sicheren Hinweis auf mehr als eine Bindungsstelle mit Angriff an mehreren Stellen des Moleküls darstellt.

Die Verdrängung durch Cibacron Blue erbrachte einen Hill-Koeffizienten,  $n_H$ , von  $\approx 1$  und liess damit auf nur eine Bindungsstelle schliessen (2.7.4).

Über die Lokalisation der Bindungsstelle(n) ist bei allen untersuchten Substanzen durch Konkurrenzexperimente alleine keine Aussage möglich. Zwar konnten die Testsubstanzen das spezifisch an den SUR bindende P1075 (Hambrock et al., 1998; Schwanstecher et al., 1998) von diesem verdrängen, damit ist jedoch nicht gesagt, dass sie dies durch direkte Konkurrenz um dieselbe (Öffner-)Bindungsstelle bewirkten. Aufgrund der nicht immer vollständig geleisteten Verdrängung von  $^3\text{H}$ -P1075 ist eine Hemmung durch Bindung an eine von der Öffnerbindungsstelle verschiedene, jedoch mit ihr negativ allosterisch gekoppelte Bindungsstelle sogar wahrscheinlicher (s.o.), wie dies früher schon für GBC gezeigt werden konnte (Bray und Quast, 1992). Doch auch

#### 4.4 Diskussion der <sup>3</sup>H-P1075-Bindungsexperimente an SUR2B

über eine Interferenz mit den Nukleotidbindungsstellen des SUR ist eine Reduktion der <sup>3</sup>H-P1075-Bindung möglich. Da die <sup>3</sup>H-P1075-Bindung ATP erfordert (Hambrock et al., 1998; Schwanstecher et al., 1998), ist zu erwarten, dass durch Verdrängung von ATP die <sup>3</sup>H-P1075-Bindung reduziert wird (vorausgesetzt, ATP liegt nicht gesättigt vor).

Aufgrund der Tatsache, dass es sich bei den meisten der eingesetzten Substanzen um P<sub>2</sub>-Rezeptormodulatoren handelt (1.7), ist eine Interaktion dieser Substanzen mit den Nukleotidbindungsstellen des SUR durchaus denkbar.

Die Beobachtung, dass die endogenen Agonisten an P<sub>2</sub>-Rezeptoren, die Diadenosinpolyphosphate, sowie die mit ATP grosse Strukturähnlichkeit aufweisenden Substanzen, TNP-ATP und βγ-Methylen-ATP, keine Hemmung der <sup>3</sup>H-P1075-Bindung zeigten, spricht durchaus nicht gegen diese Annahme (s.o.), denn auch ATP, welches bekanntlich wie AP<sub>5</sub>A eine Kanalschliessung bewirkt, hemmt die <sup>3</sup>H-P1075-Bindung nicht, sondern fördert sie im Gegenteil sogar (Hambrock et al., 1998; Schwanstecher et al., 1998). Entscheidend für die Hemmung der <sup>3</sup>H-P1075-Bindung bei einer eventuellen Interferenz mit den ATP-Bindungsstellen ist wie oben erwähnt die Nicht-Hydrolysierbarkeit des angreifenden Agens.

Im Falle von DIDS allerdings spricht dessen Strukturähnlichkeit mit GBC (1.7) und die von DIDS zu 100 % geleistete Verdrängung für eine von den Nukleotidbindungsstellen verschiedene Lokalisation der DIDS-Bindungsstelle, möglicherweise die GBC-Bindungsstelle. Zur Klärung dieser Frage werden <sup>3</sup>H-GBC-Sättigungsexperimente mit und ohne Zugabe der Testsubstanz benötigt, welche allerdings nur an SUR1-Membranen (wegen deren hoher GBC-Affinität) durchgeführt werden können. Diese Experimente wurden wie oben bereits erwähnt inzwischen von Löffler-Walz und Quast begonnen und ihre bislang unveröffentlichten Daten lieferten eine Kompetitivität zwischen GBC und DIDS am SUR1, wie dies auch für Phloxin B früher schon beobachtet wurde (Schwanstecher et al., 1995).

Zur Überprüfung der Frage, ob die übrigen Testsubstanzen möglicherweise über eine Konkurrenz mit ATP eine Erniedrigung der <sup>3</sup>H-P1075-Bindung bewirkten, wurden Aktivierungsexperimente mit ATP durchgeführt, um anhand einer eventuellen

## 4. Diskussion

---

Affinitätsverschiebung von ATP eine mögliche Interferenz mit den Nukleotidbindungsstellen zu erkennen.

### 4.4.3 Aktivierung der $^3\text{H}$ -P1075-Bindung an HEK293-Zellmembranen

Nachdem in heterologen Kompetitionsexperimenten die Wirksamkeit der untersuchten Substanzen am  $K_{\text{ATP}}$ -Kanal gezeigt worden war, stellte sich die Frage, ob dieser Effekt möglicherweise auf eine Interferenz mit den Nukleotidbindungsstellen zurückzuführen ist.

Im Falle einer Bindung der Testsubstanz an die Nukleotidbindungsstellen stellt dies eine Konkurrenz zu vorgegebenem ATP dar. Dies bedeutet eine Rechtsverschiebung der ATP-Aktivierungskurve bei unverändertem Maximalwert der Bindung.

Da die Bindung von  $^3\text{H}$ -P1075 an seinen Rezeptor ATP-abhängig ist (Hambrock et al., 1998; Schwanstecher et al., 1998), wird durch eine Konkurrenz der Testsubstanz mit ATP die  $^3\text{H}$ -P1075-Bindung erniedrigt, wenn die Testsubstanz die ATP-Bindungsstellen blockiert, ohne dessen Wirkung zu imitieren.

Erfüllt die Testsubstanz nämlich bei direkter Kompetition mit ATP auch dessen Wirkung, so ist auch ohne Zugabe von ATP eine  $^3\text{H}$ -P1075-Bindung messbar und es wäre in den Kompetitionsexperimenten keine Hemmung zu sehen gewesen. Denn steigende Konzentrationen von ATP bewirken keine Hemmung der  $^3\text{H}$ -P1075-Bindung, sondern fördern diese sogar (3.5.2.1; Hambrock et al., 1998; Schwanstecher et al., 1998).

Die in den Kompetitionsexperimenten (3.5.1) beobachtete Reduktion der  $^3\text{H}$ -P1075-Bindung kann jedoch durch eine direkte Kompetition mit ATP (aber ohne Wirkung an dessen Bindungsstellen) nicht erklärt werden, da in den Experimenten ATP jeweils gesättigt (3mM) vorlag; somit hätte auch bei direkter Kompetition der Testsubstanz um die Nukleotidbindungsstellen keine Reduktion der  $^3\text{H}$ -P1075-Bindung eintreten dürfen.

Eine Rechtsverschiebung der Kurve ist andererseits auch bei nicht-kompetitiver Hemmung der ATP-Bindung zu erwarten, allerdings mit verschiedenen Maximalwerten der Bindung. Denn die geringere Bindung von  $^3\text{H}$ -P1075 bei maximalem ATP in

#### 4.4 Diskussion der $^3\text{H}$ -P1075-Bindungsexperimente an SUR2B

Gegenwart der Testsubstanz zeigt, dass ATP und die Testsubstanz nicht um dieselbe Bindungsstelle konkurrieren und dass es einen ternären Komplex (s.u.) geben muss.

Eine Linksverschiebung bedeutet entweder eine verbesserte ATP-Bindung durch eine negativ allosterisch bindende Substanz oder eine Imitation der ATP-Wirkung durch eine direkt an die ATP-Bindungsstelle bindende Substanz mit höherer Affinität als ATP selbst.

Findet andererseits eine direkte oder negativ allosterische Wirkung der Testsubstanz auf die P1075-Bindungsstelle statt, so stellt dies eine zum ATP nicht-kompetitive Hemmung dar, welche dessen  $K_D$  unverändert lässt; das Plateau der Kurve jedoch sinkt abhängig von der zugegebenen Menge der getesteten Substanz, da diese (direkt oder negativ allosterisch)  $^3\text{H}$ -P1075 verdrängt. Die im Konkurrenzexperiment (3.5.1.) gesehene Hemmung der  $^3\text{H}$ -P1075-Bindung ist hierdurch ebenfalls erklärbar.

Als Kontrolle wurden zunächst Aktivierungsexperimente unter Zugabe steigender ATP-Konzentrationen ohne Zugabe einer Testsubstanz durchgeführt. Es zeigte sich, dass ATP die  $^3\text{H}$ -P1075-Bindung mit einer halbmaximalen Aktivierungskonzentration,  $EC_{50}$ , von ca. 4,4  $\mu\text{M}$  steigern konnte (vgl. auch Hambrock et al., 1998:  $EC_{50} \approx 3 \mu\text{M}$ ).

Mit diesem Kontrollwert wurden nun die  $EC_{50}$ -Werte der unter Zugabe der jeweiligen Testsubstanz in einer ihrer  $IC_{50}$  nahekommenden Konzentration ermittelten Aktivierungskurven verglichen.

In allen Fällen wurde das Plateau im Vergleich zur Kontrolle erheblich erniedrigt. Wie oben beschrieben, deutet dies auf eine Interferenz der zugegebenen Testsubstanz mit der P1075-Bindungsstelle hin - vorausgesetzt, die  $EC_{50}$  für ATP wird nicht verändert – und schliesst eine alleinige Bindung an die Nukleotidbindungsstellen aus. Dabei ist keine Aussage über den Modus dieser Wechselwirkung (kompetitiv oder negativ allosterisch) möglich. Dieser Frage wurde in Kinetikexperimenten nachgegangen (s.u.).

Da die Testsubstanzen in einer ihrer  $IC_{50}$  ähnlichen Konzentration zugegeben wurden, war bei einer Interferenz mit der  $^3\text{H}$ -P1075-Bindungsstelle eine Absenkung des Plateaus auf ca. 50 % des Kontrollwertes (welcher jeweils mitbestimmt wurde) zu erwarten. Für

#### 4. Diskussion

---

Phloxin B, Suramin und DIDS wurde dieser Wert auch relativ genau erreicht (3.5.2), unklarerweise jedoch nicht für Evans Blue (75%).

Gleichzeitig wurde keine wesentliche Verschiebung der ATP-Aktivierungskurve für Suramin und Phloxin B beobachtet. Diese beiden Substanzen bewirkten somit keine Affinitätsveränderung für ATP, liessen dessen  $EC_{50}$  nahezu unverändert. Hieraus kann geschlossen werden, dass sie keine Interferenz mit den Nukleotidbindungsstellen, sondern eine zu ATP nicht-kompetitive Hemmung der  $^3H$ -P1075-Bindung bewirkten, entweder durch direkte, wahrscheinlicher aber durch negativ allosterische Kompetition mit der  $^3H$ -P1075-Bindungsstelle. Für Phloxin B wurde ja bereits seine Kompetition mit GBC um dessen Bindungsstelle nachgewiesen (Schwanstecher et al., 1995).

Im Gegensatz dazu wurden für Evans Blue eine Rechts- und für DIDS eine Linksverschiebung der ATP-Aktivierungskurve beobachtet.

Die im Falle von Evans Blue aufgetretene angedeutete Rechtsverschiebung der  $EC_{50}$  von ATP, welche gleichzusetzen ist mit einer Affinitätserniedrigung für ATP, weist auf eine Interferenz mit den ATP-Bindungsstellen (kompetitiv oder nicht-kompetitiv) hin. Da Evans Blue jedoch bei gesättigtem ATP (3 mM) gleichzeitig die  $^3H$ -P1075-Bindung hemmt (3.5.1.1.3), kann es an den ATP-Bindungsstellen nicht direkt mit ATP konkurriert haben (s.o).

DIDS bewirkt eine deutliche Linksverschiebung der  $EC_{50}$  von ATP, d.h. eine Affinitätserhöhung von ATP. Die allgemein möglichen Ursachen einer Linksverschiebung wurden oben bereits erläutert. Im Falle von DIDS lässt sich eine Interferenz mit den ATP-Bindungsstellen in dem Sinne vermuten, dass die Bindung von ATP verbessert wird. Denkbar ist, dass DIDS an eine Nukleotidbindungsstelle geht und die Affinität der zweiten Nukleotidbindungsstelle für ATP/MgATP erhöht. Die Nukleotidbindungsstellen sind positiv allosterisch gekoppelt (Ueda et al., 1999).

Um eine mögliche direkte Wechselwirkung von DIDS mit den ATP-Bindungsstellen und eventuelle Wirkungsenfaltung (im Sinne einer ATP-Imitation) zu überprüfen, wurden Aktivierungsexperimente ohne Zugabe von ATP, dagegen mit steigenden Konzentrationen von DIDS durchgeführt (3.5.3). Es zeigte sich, dass bereits ohne Zugabe von ATP und DIDS eine um einen Faktor 2-4 gegenüber der  $B_{NS}$  erhöhte



#### 4.4 Diskussion der <sup>3</sup>H-P1075-Bindungsexperimente an SUR2B

<sup>3</sup>H-P1075-Bindung stattfand. Ursächlich hierfür dürften Spuren von ATP gewesen sein, welche vermutlich bereits in der Membranpräparation vorlagen. Bemerkenswert ist jedoch, dass diese Basisbindung durch Zugabe steigender Konzentrationen an DIDS im Bereich zwischen 1 µM und 10 µM gesteigert werden konnte. Einerseits könnte DIDS diese Wirkung durch Bindung an die Nukleotidbindungsstelle(n) und Imitation der ATP-Wirkung zustande gebracht haben. Andererseits muss aufgrund der schon vorher messbaren Basisbindung vom Vorhandensein geringer Mengen ATP ausgegangen werden, und die besondere Wirkung von DIDS könnte darin bestehen, dessen Bindung im Konzentrationsbereich zwischen 1 µM und 10 µM DIDS zu fördern. Hierfür spricht auch eine weitere Beobachtung, welche eine eigene Wirkung von DIDS an den ATP-Bindungsstellen eher unwahrscheinlich erscheinen lässt und die Vermutung, dass DIDS die Bindung bereits vorhandenen ATPs fördert, unterstützt. Denn betrachtet man die Aktivierungskurve, so fällt, wie auch bei Evans Blue, in einigen Experimenten ein Anfangseffekt auf. In diesen Experimenten begann die Aktivierungskurve nicht nahe bei Null wie in den Experimenten mit Suramin und Phloxin B, vielmehr liess sich eine Art Sockel beobachten, auf dessen Basisbindung die Aktivierungskurve bereits ohne Zugabe von ATP begann. Die EC<sub>50</sub>-Werte sowie die Maximalaktivierung blieben davon unbeeinflusst, lediglich die Amplitude wurde verringert. Dieser Anfangseffekt, welcher auf DIDS zu beruhen schien, konnte jedoch auch ohne DIDS beobachtet werden. Daher ist er möglicherweise nicht auf eine eigene Wirkung von DIDS an den Nukleotidbindungsstellen zurückzuführen, sondern auf die Wirkung geringer Mengen bereits vorhandenen ATPs in der Präparation. Klärung könnte hier nur die Messung der ATP-Konzentration in den Ansätzen bringen.

Der in den Aktivierungsexperimenten mit DIDS und Evans Blue beobachtete Anfangseffekt (Sockel) scheint der in den Konkurrenzexperimenten fast vollständigen Verdrängung der <sup>3</sup>H-P1075-Bindung zu widersprechen. Jedoch lagen dort in den Ansätzen stets 3 mM ATP vor, womit ein Vergleich der Daten nicht möglich ist. Vermutlich sind die bei Evans Blue und DIDS in den

#### 4. Diskussion

---

Aktivierungsexperimenten gemachten Beobachtungen nur bei niedrigen Konzentrationen von ATP möglich, was es jedoch noch genauer zu untersuchen gilt. Auch zeigen die Konkurrenzexperimente mit DIDS kein "Aktivierungsbuckelchen", da sie ebenfalls bei 3 mM ATP-Konzentration durchgeführt wurden, also in einem Bereich, in dem ATP bereits gesättigt vorliegt ( $EC_{50} = 4,4 \mu\text{M}$ ) und DIDS vermutlich nicht mehr erkannt werden kann. Aus diesem Grunde ist auch kein Schluss auf die beiden in den Konkurrenzexperimenten gefundenen DIDS-Bindungsstellen möglich; es kann keine Aussage darüber getroffen werden, dass DIDS z.B. an einer Bindungsstelle aktivierend, an der anderen dagegen hemmend wirkt.

In neueren und bisher unveröffentlichten Experimenten von Löffler-Walz und Quast konnte jedoch in ähnlichen Versuchen - allerdings bei einer Inkubationstemperatur von 25 °C - ein solches "Aktivierungsbuckelchen" nachgewiesen werden.

Wahrscheinlich unterstützt DIDS die Bindung von ATP an eine der Nukleotidbindungsstellen, ohne jedoch mit dieser Bindungsstelle zu interferieren, wie auch die übrigen Stoffe nicht mit der Nukleotidbindungsstelle interferieren.

Denkbar ist eine Wechselwirkung der Stoffe mit der GBC-Bindungsstelle (s.o.), da die Stoffe wie GBC negativ geladen sind. Eine Messung konnte jedoch aufgrund der Tatsache, dass  $^3\text{H}$ -GBC an *SUR2B*-Membranen nicht gemessen werden konnte, nicht durchgeführt werden.

In der Zwischenzeit wurden, wie oben bereits erwähnt, von Löffler-Walz und Quast neue, bisher unveröffentlichte Untersuchungen an *SUR1*-transfizierten Membranen von HEK293-Zellen gemacht und eine Konkurrenz zwischen DIDS und GBC am *SUR1* nachgewiesen. In weiteren Untersuchungen zeigten DIDS eine positive Allosterie mit der ATP-Bindung, GBC eine stark negative und Suramin sowie Phloxin B eine schwach negative Allosterie mit ATP.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Ursache für die beobachtete Hemmung der  $^3\text{H}$ -P1075-Bindung in einer allosterischen Wechselwirkung mit der Öffnerbindungsstelle zu suchen ist, z.B. in einer Besetzung der GBC-Bindungsstelle.

## 4.4 Diskussion der $^3\text{H}$ -P1075-Bindungsexperimente an SUR2B

Für Phloxin B (Schwanstecher et al., 1995) und DIDS (Löffler-Walz und Quast, unveröffentlichte Daten, 2000) wurde der Nachweis hierfür bereits erbracht. Für die übrigen Substanzen hingegen steht er noch aus. Eine Wechselwirkung mit den Nukleotidbindungsstellen konnte nicht ausgeschlossen werden.

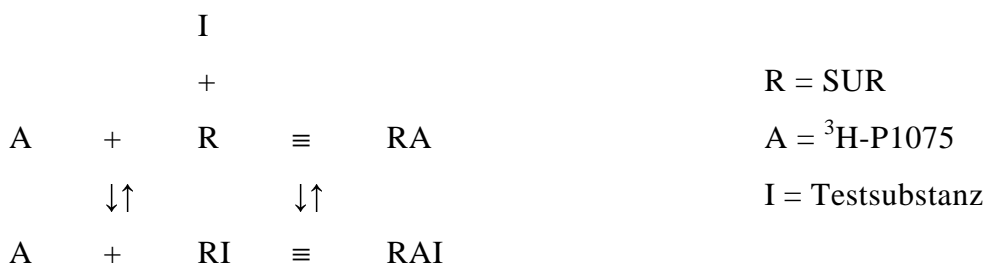
### 4.4.4 Kinetik der $^3\text{H}$ -P1075-Bindung an HEK293-Zellmembranen

Nachdem sich Hinweise auf eine Wechselwirkung mit der Öffnerbindungsstelle ergeben hatten, wurde in Kinetikexperimenten die Art und Weise dieser Wechselwirkung (kompetitiv oder negativ allosterisch, 3.5.4) genauer studiert.

Die Experimente mit den ausgewählten Testsubstanzen, Phloxin B, Suramin, Evans Blue und DIDS, lassen für alle Substanzen eine Beschleunigung der Dissoziation erkennen. Während diese bei Phloxin B bereits im Konzentrationsbereich von  $\approx 10 * \text{IC}_{50}$  auftrat, so war bei den übrigen Substanzen in diesem Konzentrationsbereich noch kein wesentlicher Unterschied im Vergleich zur Kontrolle (ohne Zugabe von Testsubstanzen) zu erkennen. Erst im Bereich von  $\approx 60 * \text{IC}_{50}$  trat eine deutlich Beschleunigung der Dissoziation zutage.

Diese Beschleunigung der Dissoziation des Rezeptor-Ligand-Komplexes lässt auf eine negativ allosterische Kopplung der Bindungsstellen der Testsubstanzen mit derjenigen von P1075 schließen (3.5.4). Dabei führt vermutlich die vorübergehende Ausbildung eines ternären Komplexes zwischen SUR,  $^3\text{H}$ -P1075 und der jeweiligen Testsubstanz zu einem beschleunigten Zerfall des Rezeptor-Liganden-Komplexes (Bray und Quast, 1992; Hambrock et al., 1998).

Modell der Bildung eines ternären Komplexes:



#### 4. Diskussion

---

Im Bereich von 1  $\mu\text{M}$  bis 100  $\mu\text{M}$  DIDS-Konzentration konnte in den Aktivierungsexperimenten eine Steigerung der Bindung durch DIDS beobachtet werden (3.5.3). Die in den Kinetikexperimenten bei 50  $\mu\text{M}$  DIDS angedeutete Verlangsamung der Dissoziation im Vergleich zur Kontrolle, konnte bei 30  $\mu\text{M}$  DIDS nicht bestätigt werden. Vermutlich war der Aktivierungseffekt von DIDS bei dieser Konzentration zu klein, um messbar zu sein (er betrug bei 30  $\mu\text{M}$  DIDS im Aktivierungsexperiment nur 10 %  $B_S$ ). Wie sich herausstellte wurde der maximale Aktivierungseffekt bei 10  $\mu\text{M}$  DIDS im Aktivierungsexperiment (30 %  $B_{\text{TOT}}$ ) gemessen, bei dieser Konzentration könnte möglicherweise auch in Kinetikexperimenten eine Verzögerung der Dissoziation messbar sein. Bei einer Konzentration von 300  $\mu\text{M}$  DIDS dagegen findet keine Aktivierung der Bindung mehr statt (3.5.3), daher erfolgt in den Kinetik-Experimenten hier eine Beschleunigung, da DIDS in höheren Konzentrationen ( $> 100 \mu\text{M}$ ) als Hemmer auf die  $^3\text{H}$ -P1075-Bindung wirkt.

Die beobachtete Beschleunigung im Lösungsmittelkontrollexperiment (3.5.4.6) stellt keinen spezifischen Effekt am  $K_{\text{ATP}}$ -Kanal dar, sondern macht die Zerstörung der Bindung durch DMSO sowie EtOH deutlich welche das Protein (und damit den Rezeptor) denaturieren.

Zusammenfassend kann damit gesagt werden, dass die durch die Testsubstanzen beobachtete Hemmung der  $^3\text{H}$ -P1075-Bindung auf einer negativ allosterischen Kopplung ihrer Bindungsstelle mit derjenigen für P1075 beruht. Die Lokalisation der Bindungsstelle bleibt damit jedoch unbekannt (mit Ausnahme von Phloxin B und DIDS, für welche eine Konkurrenz mit GBC belegt ist, s.o.). In Frage kommt auch für die übrigen Substanzen beispielsweise die GBC-Bindungsstelle am SUR. Weiterhin kann keine Aussage über die Wirkungsweise der einzelnen Substanzen am SUR getroffen werden; ob die Substanzen Öffner oder Schliesser des  $K_{\text{ATP}}$ -Kanals sind, muss in elektrophysiologischen Experimenten noch untersucht werden.

#### 4.5 Diskussion der $^3\text{H}$ -P1075-Bindungsexperimente an ganzen HEK293-Zellen

##### 4.5 Diskussion der $^3\text{H}$ -P1075-Bindungsexperimente an ganzen HEK293-Zellen (SUR2B)

Die Eigenschaften der eingesetzten Testsubstanzen sollten an ganzen Zellen weiter untersucht und mit den an Membranen erhaltenen Ergebnissen verglichen werden.

Voraussetzung für die Durchführbarkeit von Experimenten an ganzen Zellen ist jedoch die Membrangängigkeit der Testsubstanzen, denn aufgrund der intrazellulären Lage der  $^3\text{H}$ -P1075-Bindungsstelle muss eine Substanz, die  $^3\text{H}$ -P1075 verdrängen kann, entweder über Transporter oder durch die Membran hindurch in die Zelle gelangt sein. Dabei erscheint letzteres wegen der stark negativen Ladung der meisten Substanzen eher unwahrscheinlich.

Zur Untersuchung der Membrangängigkeit wurden zunächst Screeningversuche mit hohen Inhibitorkonzentrationen an intakten Zellen durchgeführt.

Dabei erwies sich bei allen Substanzen keine ausreichende Permeation in die Zelle, es konnte keine befriedigende Hemmung der  $^3\text{H}$ -P1075-Bindung erzielt werden.

Die Erstellung von Hemmkurven an ganzen SUR2B-transfizierten HEK293-Zellen wurde daher aufgegeben.

## 4. Diskussion

---

---

## 5 Zusammenfassung

Der erste Teil dieser Arbeit liefert Erkenntnisse über das Bindungsverhalten von  $^3\text{H}$ -P1075 und  $^3\text{H}$ -GBC an Membranen von A10-Zellen.

Die  $^3\text{H}$ -P1075-Bindung wurde schon in einigen früheren Studien untersucht (u.a. Quast et al., 1992; Russ et al., 1997; Löffler-Walz und Quast, 1998; Hambrock et al., 1998; 1999), jedoch noch nie an Membranen von A10-Zellen. Auch über die  $^3\text{H}$ -GBC-Bindung liegen bereits einige Arbeiten vor (u.a. Metzger et al., 1997; Gopalakrishnan et al., 1991; Löffler-Walz und Quast, 1997).

Durch Vergleich der in dieser Arbeit an A10-Zellmembranen erhaltenen Ergebnisse mit jenen aus früheren Untersuchungen sollten weitere Erkenntnisse über das Bindungsverhalten des vaskulären ATP-abhängigen  $\text{K}^+$ -Kanals ( $\text{K}_{\text{ATP}}$ ) gewonnen und dieser Kaliumkanal pharmakologisch noch genauer charakterisiert werden.

Die gute Übereinstimmung der für die Öffner gefundenen  $\text{K}_{\text{D}}$ -Werte mit früheren Studien (s.Tab. 3.2) weist die auf die korrekte Bindung an den  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanal hin.

Für den  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanal-Schliesser GBC wurden sowohl in den heterologen Konkurrenzexperimenten mit  $^3\text{H}$ -P1075 als auch in den homologen Verdrängungsversuchen jeweils zwei Bindungsstellen gefunden. Dabei konnte gezeigt werden, dass die jeweils ersten, hochaffinen Bindungsstellen übereinstimmen und am SUR liegen. Letzteres folgte aus der Berechnung der Bindungskapazitäten für den Öffner P1075 am SUR (131 fmol/mg) und Blocker GBC (erste Bindungsstelle in homologen Konkurrenzexperimenten bei Festsetzung der ersten Bindungsstelle auf 20 % der spezifischen  $^3\text{H}$ -GBC-Bindung: ca. 114 fmol/mg). Weiterhin wurde hierdurch ein Hinweis auf die 1:1-Stöchiometrie der Bindungsstellen für GBC und P1075 erbracht.

Unter Einbeziehung der Tatsache, dass  $^3\text{H}$ -P1075 spezifisch und hochaffin ( $\text{K}_{\text{D}} \approx 4 \text{ nM}$ , Hambrock et al., 1998) an die  $\beta$ -Untereinheit SUR bindet (Schwanstecher et al., 1998), liessen sich die Daten wie folgt interpretieren: Der Blocker GBC besitzt eine hochaffine Bindungsstelle am SUR(2B) ( $\text{K}_{\text{D}} \approx 36 \text{ nM}$ ), welche mit der Öffnerbindungsstelle, wie auch schon früher von Bray und Quast (1992) gezeigt,

## 5. Zusammenfassung

---

negativ allosterisch gekoppelt ist und welche rund 20 % der gesamten gemessenen spezifischen GBC-Bindung ausmacht. Dabei ist die GBC-Bindung durch den Öffner P1075 vollständig verdrängbar. Ausserdem besitzt GBC eine weitere, niederaffine (im  $\mu\text{M}$  Bereich) Bindungsstelle an einem unbekanntem, vermutlich endogenen Protein. Eine Identifikation dieses Protein war nicht möglich. In Betracht gezogen wurde die  $\alpha$ -Untereinheit  $K_{\text{IR}}$ , denn diese besitzt eine GBC-Bindungsstelle mit Affinität im  $\mu\text{M}$  Bereich (Artunc, F., Charakterisierung des Bindungsverhaltens des Radioliganden  $^3\text{H}$ -Glibenclamid an den rekombinant exprimierten Untereinheiten SUR2A, SUR2B und  $K_{\text{IR6.1}}$  des ATP-abhängigen  $\text{K}^+$ -Kanals ( $K_{\text{ATP}}$ ), Med. Dissertation, Universität Tübingen, 1999) und wird in A10-Zellen exprimiert (Miller et al., 1999), jedoch kommt sie aufgrund stöchiometrischer Überlegungen wohl eher nicht in Frage.

Dennoch liefert diese Arbeit damit eine mögliche Erklärung für die grosse Varietät hinsichtlich der Anzahl an Bindungsstellen für den Blocker GBC in den verschiedenen Geweben.

Weiterhin wird gezeigt, dass die GBC-Bindung im Gegensatz zur Öffnerbindung von der Intaktheit des Zytoskeletts abhängig ist und durch dessen Zerstörung in ihrer Affinität empfindlich beeinträchtigt wird.

Eine von Holevinsky et al. (1994) neben der  $K_{\text{ATP}}$ -Kanalaktivierung an A10-Zellen beobachtete zusätzliche Blockade von  $\text{Cl}^-$ -Kanälen konnte nicht bestätigt werden: An A10-Zellen liegt nur eine Bindungsstelle für P1075 vor; diese ist am SUR lokalisiert (Hambrock et al., 1998; Schwanstecher et al., 1998), denn von diesem konnte P1075 durch alle üblichen  $K_{\text{ATP}}$ -Kanal-Modulatoren verdrängt werden.

Die durch den Öffner MxS angedeutete Heterogenität der  $^3\text{H}$ -P1075-Bindung (Verdrängung der spezifischen  $^3\text{H}$ -P1075-Bindung um nur ca. 70 %) beruht am wahrscheinlichsten auf einer durch diese Substanz sehr leicht auftretende Sulfatierung der Bindungsstelle mit nachfolgend behinderter weiterer Bindung. Unter dieser Annahme liegt am SUR nur eine homologe Bindungsstelle für die Öffner vor; diese Vermutung wird durch weitere in der Arbeitsgruppe durchgeführte Studien unterstützt (Artunc, F., Charakterisierung des Bindungsverhaltens des Radioliganden  $^3\text{H}$ -Glibenclamid an den rekombinant exprimierten Untereinheiten SUR2A, SUR2B und



---

$K_{IR6.1}$  des ATP-abhängigen  $K^+$ -Kanals ( $K_{ATP}$ ), Med. Dissertation, Universität Tübingen, 1999; s.a. Gross et al., 1999).

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde an Membranen SUR2B-transfizierter HEK293-Zellen erstmalig das Bindungsverhalten von Testsubstanzen untersucht, von welchen eine Interaktion mit dem  $K_{ATP}$ -Kanal erhofft werden konnte, da sie an Purinrezeptoren, deren endogene Modulatoren ATP und einige ATP-Analoga sind, Wirkung zeigen (Ralevic und Burnstock, 1998). Ziel der Untersuchungen war die Auffindung neuartiger Blocker des  $K_{ATP}$ -Kanals.

Sollten sich unter den Substanzen Schliesser des  $K_{ATP}$ -Kanals befinden, so könnte mit Hilfe dieser Blocker eines Tages – ihre Selektivität für den vaskulären Kanal vorausgesetzt – ein geeignetes Instrument zur Bekämpfung der renalen Hypertonie gefunden werden. Denn an der Regulation der Reninfreisetzung aus den in der Tunica media des Vas afferens liegenden juxtaglomerulären Zellen sind vaskuläre  $K_{ATP}$ -Kanäle beteiligt. Die Schliessung dieser Kanäle bewirkt über eine Depolarisation der Zelle die Senkung der Reninsekretion. Nachfolgend tritt eine Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur auf und Vor- und Nachlast im Herz-Kreislaufsystem werden gesenkt und damit auch der Blutdruck.

Tatsächlich konnten einige Substanzen als potente  $K_{ATP}$ -Kanal-Modulatoren erkannt werden: Phloxin B, Suramin, Evans Blue und DIDS zeigten eine Verdrängung der  $^3H$ -P1075-Bindung vom SUR. Die Hemmkurven verliefen für Phloxin B, Suramin und Evans Blue einstufig, für DIDS deutete sich ein Bindungsprozess an zwei Bindungsstellen an. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Verdrängung nicht-kompetitiv mit  $^3H$ -P1075 verläuft. Die Bindungsstelle(n) der Testsubstanzen ist (sind) somit nicht die Öffnerbindungsstelle, doch ist (sind) sie mit dieser negativ allosterisch gekoppelt. Eine naheliegende direkte Interaktion mit den Nukleotidbindungsstellen (d.h. eine Konkurrenz mit ATP) konnte nicht sicher geklärt werden. Allerdings konnten Löffler-Walz und Quast in neueren, noch nicht veröffentlichten Experimenten eine schwache negative Allosterie zwischen Suramin bzw. Phloxin B und ATP, eine starke negative Allosterie zwischen GBC und ATP sowie eine positive Allosterie zwischen DIDS und ATP zeigen. Für DIDS konnten sie weiterhin in bisher ebenfalls

## 5. Zusammenfassung

---

unveröffentlichten Sättigungsexperimenten eine Konkurrenz mit GBC am SUR1 nachweisen. Damit findet also die Wirkung von DIDS am  $K_{ATP}$ -Kanal über eine Interaktion mit der GBC-Bindungsstelle statt, welche wiederum mit der Öffnerbindungsstelle (negativ) allosterisch gekoppelt ist (Bray und Quast, 1992).

Die genaue Lokalisation der Bindungsstelle(n) der übrigen Substanzen (evtl. ebenfalls die GBC-Bindungsstelle) muss in weiteren Experimenten untersucht werden; ebenso sind weiterführende elektrophysiologische Experimente vonnöten, um die Wirkung der einzelnen Substanzen auf den  $K_{ATP}$ -Kanal zu klären (Öffnung oder Schließung des Kanals), soweit sie noch nicht bekannt ist. Diese Arbeit legt den Grundstein zur Auffindung neuartiger Blocker des  $K_{ATP}$ -Kanals und zeigt auf, welche Substanzgruppen hierfür möglicherweise geeignet sind.

## 6 Literaturverzeichnis

- ACKERMANN, M. J. UND CLAPHAM, D. E. (1997): Ion channels – basic science and clinical disease. *New Engl J Med* Vol. 336, **22**, 1575-86
- AFFOLTER, H., HERTEL, C., JAEGGI, K., PORTENIER, M., STAEHELIN, M. (1985): (-)-S-[<sup>3</sup>H]CGP-12177 and its use to determine the rate constants of unlabelled beta-adrenergic antagonists. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**, 925-29
- AGUILAR-BRYAN, L., NICHOLS, C. G., WECHESLER, S. W., CLEMENT IV, J. P., BOYD III, A. E., GONZALEZ, G., HERRERA-SOSA, H., NGUY, K., BRYAN, J. UND NELSON, D. A. (1995): Cloning of the beta cell high affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. *Science* **268**, 423-26
- AGUILAR-BRYAN, L. UND BRYAN, J. (1996): ATP-sensitive potassium channels, sulfonylurea receptors and persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Diabetes Rev* **4**, 336-46
- AGUILAR-BRYAN, L., CLEMENT IV, J. P., GONZALEZ, G., KUNJILWAR, K., BABENKO, A. UND BRYAN, J. (1998): Toward understanding the assembly and structure of K<sub>ATP</sub> channels. *Am Physiol Soc* **78**, 227-45
- AKAIKE, H. (1974): I.R.E. *Trans Autom Control* **19**, 716
- AMES, G. F., MIMURA, C. S., HOLBROOK, S. R. UND SHYAMALA, V. (1992): Traffic ATPases: a superfamily of transport proteins operating from Escherichia coli to humans. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **65**, 1-47
- ÄMMÄLÄ, C., MOORHOUSE, A., GRIBBLE, F. M., ASHFIELD, R., PROKS, P., SMITH, P. A., SAKURA, H., COLES, B., ASHCROFT, J. H. UND ASHCROFT, F. M. (1996): Promiscuous coupling between the sulphonylurea receptor and inwardly rectifying potassium channels. *Nature* **379**, 545-8
- ARTUNC, F. H. (1999): Charakterisierung des Bindungsverhaltens des Radioliganden <sup>3</sup>H-Glibenclamid an den rekombinant exprimierten Untereinheiten SUR2A, SUR2B und K<sub>IR</sub>6.1 des ATP-abhängigen K<sup>+</sup>-Kanals (K<sub>ATP</sub>). *Med. Dissertation*, Universität Tübingen
- ASHCROFT, F. M. (1998): Exciting times for PIP<sub>2</sub>. *Science* **282**, 1059-60
- ASHCROFT, F. M. UND GRIBBLE, F. M. (1998): Correlating structure and function in ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *TINS* Vol. 21, No. **7**, 288-94
- ASHCROFT, F. M. UND KAKEI, M. (1989): ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in rat pancreatic beta-cells: modulation by ATP, Mg<sup>2+</sup> ions. *J Physiol* **416**, 349-67
- ASHCROFT, S. J. H. UND ASHCROFT, F. M. (1990): Properties and function of ATP-sensitive K<sup>+</sup>-channels. *Cell Signal* **2**, 197-214
- ASHCROFT, S. J. H. UND ASHCROFT, F. M. (1992): The sulfonylurea receptor. *Biochim Biophys Acta* **1175**, 45-49
- ASHFIELD, R., GRIBBLE, F. M., ASHCROFT, S. J. H. UND ASHCROFT, F. M. (1999): Identification of the high-affinity tolbutamide site on the SUR1 subunit of the K<sub>ATP</sub> channel. *Diabetes* Vol. **46**, 1341-47
- BABENKO, A. P., AGUILAR-BRYAN, L. UND BRYAN, J. (1992): Potassium channels in the cardiomyocyte sarcolemma: initial opening under influence of hypoxia. *Basic Appl Myology* **2**, 316-23

- BABENKO, A. P., AGUILAR-BRYAN, L. UND BRYAN, J. (1998): A view of SUR/K<sub>IR</sub>6.x, K<sub>ATP</sub>-channels. *Annu Rev Physiol* **60**, 667-87
- BACHMANN, A., RUSS, U. UND QUAST, U. (1999): Potent inhibition of the CFTR chloride channel by suramin. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **360**, 473-476
- BAUKROWITZ, T., SCHULTE, U., OLIVER, D., HERLITZE, S., KRAUTER, T., TUCKER, S. J., RUPPERSBERG, J. P. UND FAKLER, B. (1998): PIP<sub>2</sub> and PIP as determinants for ATP inhibition of K<sub>ATP</sub> channels. *Science* **282**, 1141-4
- BEECH D. J., ZHANG, H., NAKAO, K. UND BOLTON, T. B. (1993): K<sup>+</sup> channel activation by nucleotide diphosphates and its inhibition by glibenclamide in vascular smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* **110**, 573-82
- BERNARDI, H., DE WEILLE, J. R., EPELBAUM, J., MOURRE, C., AMOROSO, S., SLAMA, A., FOSSET, M., LAZDUNSKI, M. (1993): ATP-modulated K<sup>+</sup> channels sensitive to antidiabetic sulfonylureas are present in adenohypophysis and are involved in growth hormone release. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 1340-44
- BEVINGTON, P. R. (1969): *Data reduction and error analysis for the physical sciences*. McGraw-Hill, New York, S. 55-65 und S. 92-118
- BRAY, K. M. UND QUAST, U. (1992): A specific binding for K<sup>+</sup> channel openers in rat aorta. *J Biol Chem* Vol. 267, No. **17**, 11689-92
- CABANTCHIK, Z. I., KNAUF, P. A., ROTHSTEIN, A. (1978): The anion transport system of the red blood cell: The role of membrane protein evaluated by the use of ,probes'. *Biochim Biophys Acta* **515**, 239-302
- CARMELIET, E., STORMS, L. UND VEREECKE, Y. (1990): The ATP-dependent K<sup>+</sup> channel and metabolic inhibition. *Cardiac Electrophysiology*, 103-8
- CHENG, Y. UND PRUSOFF, W. H. (1973): Relationship between the inhibition constant K<sub>I</sub> and concentration of inhibitor that causes 50% inhibition (IC<sub>50</sub>) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* **22**, 3099-108
- CHOQUET, D. UND KORN, H. (1988): Modulation of voltage-dependent potassium channels in B lymphocytes. *Biochem Pharmacol* **37**, 3797-802
- CHUTKOW, W. A., SIMON, M. C., LE BEAU, M. M. UND BURANT, C. F. (1996): Cloning, tissue expression, and chromosomal localization of SUR2, the putative drug-binding subunit of cardiac, skeletal muscle, and cascular K<sub>ATP</sub> channels. *Diabetes* **45**, 1439-45
- CLEMENT IV, J. P., KUNJILWAR, K., GONZALEZ, G., SCHWANSTECHE, M., PANTEN, U., AGUILAR-BRYAN, L., BRYAN, J. (1997): Association and stoichiometry of K<sub>ATP</sub> channel subunits. *Neuron* **18**, 827-38
- COOK, D. L. UND BRYAN, J. (1998): ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels come of age. *TiPS* **19**, 477-8
- COOK, D. L. UND HALES, C. N. (1984): Intracellular ATP directly blocks K<sup>+</sup> channels in pancreatic β-cells. *Nature* **311**, 271-273
- COOK, N. S. UND QUAST, U. (1990): Potassium channel pharmacology. In: Cook, N. S. (Herausgeber): Potassium channels, structure, function and therapeutic potential. *Ellis Horwood Chichester Cookbook*, 181-255
- COOK, N. S., RUDIN, M., PALLY, C., BLARER, S., QUAST, U. (1993): Effects of the potassium channel openers SDZ-PCO 400 and cromakalim in an in vivo rat model

- of occlusive arterial disease assessed by  $^{31}\text{P}$ -NMR spectroscopy. *J Vasc Med Biol* **4**, 14-22
- CUEVAS, J., BASSETT, A. L., CAMERON, J. S., FURUKAWA, T., MYERBURG, R. J. UND KIMURA, S. (1991): Effect of  $\text{H}^+$  on ATP-regulated  $\text{K}^+$  channels in feline ventricular myocytes. *Am J Physiol* **261** (*Heart Circ Physiol* **30**), H755-61
- DART, C. UND STANDEN, N. B. (1993): Adenosine-activated potassium current in smooth muscle cells isolated from the pig coronary artery. *J Physiol (Lond.)* **471**, 767-86
- DAUT, J., MAIER-RUDOPH, W., VON BECKERATH, N., MEHRKE, G., GUENTHER, K., GOEDEL-MEINEN, L. (1990): Hypoxic dilatation of coronary arteries mediated by ATP-sensitive potassium-channels. *Science* **247**, 1341-44
- DEETJEN, P. UND SPECKMANN, E. J. (1994) *Physiologie*. 2. Aufl., Urban & Schwarzenberg, München-Wien-Baltimore, S. 344, S. 549
- D'HAHAN N., JACQUET, H., MOREAU, C., CATTY, P UND VIVAUDOU, M. (1999): A transmembrane domain of the sulfonylurea receptor mediates activation of ATP-sensitive  $\text{K}^+$  channels by  $\text{K}^+$  channel openers. *Mol Pharm* **56**, 308-15
- DÖRSCHNER, H., BREKARDIN, E., UHDE, I., SCHWANSTECHE, C. UND SCHWANSTECHE, M. (1999): Stoichiometry of sulfonylurea-induced ATP-sensitive potassium channel closure. *Mol Pharm* **55**, 1060-6
- DOYLE, D. A., CABRAL, J. M., PFUETZNER, R. A., KUO, A., GULBIS, J. M., COHEN, S. L., CHAIT, B. T. UND MACKINNON, R. (1998): The structure of the potassium channel: molecular basis of  $\text{K}^+$  conduction and selectivity. *Science* **280**, 69-76
- DRAPER, N. B. UND SMITH, H. (1981). *Applied Regression Analysis*. New York: Wiley, S.85-96 und S. 458-517
- DUNNE, M. J. UND PETERSEN, O. H. (1986a): Intracellular ADP activates  $\text{K}^+$  channels that are inhibited by ATP in an insulin-secreting cell line. *FEBS Lett* **208**, 59-62
- DUNNE, M. J. UND PETERSEN, O. H. (1986b): GTP and GDP activation of  $\text{K}^+$  channels that can be inhibited by ATP. *Pflügers Arch* **407**, 564-65
- EDWARDS, G. UND WESTON, A. H. (1993): The pharmacology of ATP sensitive potassium channels. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **33**, 597-637
- EDWARDS, G. UND WESTON, A. H. (1994): Effect of potassium channel modulating drugs on isolated smooth muscle. Szekeres L., Papp J.G. (eds) *Handbook of experimental pharmacology*, Vol. **111**, Springer, Heidelberg, 469-531
- ESCANDE, D. UND CAVERO, I. (1992):  $\text{K}^+$  channel openers and „natural“ cardioprotection. *Trends Pharmacol Sci* **13**, 269-72
- FAIVRE, J. F. UND FINDLAY, I. (1990): Action potential duration and activation of ATP-sensitive potassium current in isolated guinea-pig ventricular myocytes. *Biochim Biophys Acta* **1029**, 167-72
- FAKLER, B. UND RUPPERSBERG, J. P. (1996): Functional and molecular diversity classifies the family of inward-rectifier  $\text{K}^+$  channels. *Cell Physiol Biochem* **6**, 195-209
- FAN, Z. UND MAKIELSKI, J. C. (1997): Anionic phospholipids activate ATP-sensitive potassium channels. *J Biol Chem* **272**, 5388-95
- FICKER, E., TAGLIALATELA, M., WIBLE, B. A., HENLEY, C. M. UND BROWN, A. M. (1994): Spermine and spermidine as gating molecules for inward rectifier  $\text{K}^+$  channels. *Science* **266**, 1068-72

- FORTH, W., HENSCHLER, D., RUMMEL, W. UND STARKE, K. (1996): *Allgemeine und spezielle Pharmakologie*, 7. Aufl., Spektrum Verlag, Heidelberg-Berlin-Oxford
- FRÖHLICH, O. (1982): The external anion binding site of the human erythrocyte anion transporter: DNDS binding and competition with choride. *J Membrane Biol* **65**, 111-23
- FURUKAWA, T., VIRAG, L., FURUKAWA, N., SAWANOBORI, T., HIRAOKA, M. (1994): Mechanism for reactivation of the ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel by MgATP complexes in guinea-pig ventricular myocytes. *J Physiol* **479**, 95-107
- FURUKAWA, T., YAMANE, T., TERAI, T., KATAYAMA, Y. UND HIRAOKA, M. (1996): Functional linkage of the cardiac ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel to the actin cytoskeleton. *Pflügers Arch* **431**, 504-12
- GARLID, K. D., PAUCEK, P., YAROV-YAROVY, V., SUN, X. UND SCHINDLER, P. A. (1996): The mitochondrial K<sub>ATP</sub> channel an a receptor for potassium channel openers. *J Biol Chem* **271**, 8796-99
- GLOCKER, S., QUAST, U. (1997): Binding and effects of P1075, an opener of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels, in the aorta from streptozotocin-treated diabetic rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **356**, 210-15
- GOPALAKRISHNAN, M., JOHNSON, D. E., JANIS, R. A., TRIGGLE, D. J. (1991): Characterization of binding of the ATP-sensitive potassium channel ligand, [<sup>3</sup>H]glyburide, to neuronal and muscle preparations. *J Pharmacol Exp Therapeut* **257**, 1162-71
- GRAHAM, F. L., SMILEY, J., RUSSELL, W. C. UND NAIRN, R. (1977): Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* **36**, 59-72
- GRIBBLE, F. M., ASHFIELD, R., ÄMMÄLÄ, C., UND ASHCROFT, F. M. (1997c): Properties of cloned ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels expressed in *Xenopus* oocytes. *J Physiol* **498**, 87-98
- GRIBBLE, F. M., TUCKER, S. J. UND ASHCROFT, F. M. (1997a): The interaction of nucleotides with the tolbutamide block of cloned ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel currents expressed in *Xenopus* oocytes: a reinterpretation. *J Physiol* **504.1**, 35-45
- GRIBBLE, F. M., TUCKER, S. J. UND ASHCROFT, F. M. (1997b): The essential role of the Walker A motifs of SUR2a in K<sub>ATP</sub> channel activation by Mg-ADP and diazoxide. *EMBO J* **16**, 1145-52
- GRIBBLE, F. M., TUCKER, S. J., SEINO, S. UND ASHCROFT, F. M. (1998): Tissue specificity of sulfonylureas. *Diabetes* **47**, 1412-8
- GROSCHNER, K., KUKOVETZ, W. R. (1992): Voltage-sensitive chloride channels of large conductance in the membrane of pig aortic endothelial cells. *Pflügers Arch* **421**, 209-17
- GROSS, I., TOMAN, A., SCHWANSTECHE, C., UND SCHWANSTECHE, M. (1999): Stoichiometry of potassium channel opener action. *Mol Pharm* **56**, 1370-1373
- HACKENTHAL, E., PAUL, M., GANTEN, D., UND TAUGNER, R. (1990): Morphology, physiology and molecular biology of renin secretion. *Physiol Rev* **70**, 1067-1116
- HAMBROCK, A., LÖFFLER-WALZ, C., KLOOR, D., DELABAR, U., HORIO, Y., KURACHI, Y. UND QUAST, U. (1999): ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel modulator binding to sulfonylurea receptors SUR2A and SUR2B: opposite effects of MgADP. *Mol Pharm* **55**, 832-40

- HAMBROCK, A., LÖFFLER-WALZ, C., KURACHI, Y. UND QUAST, U. (1998): Mg<sup>2+</sup> and ATP dependence of K<sub>ATP</sub> channel modulator binding to the recombinant sulphonylurea receptor, SUR2B. *Br J Pharmacol* **125**, 577-83
- HERON, L. VIRSOLVY, A., PEYROLLIER, K., GRIBBLE, F. M., LE CAM, A., ASHCROFT, F. M. UND BATAILLE, D. (1998): Human  $\alpha$ -endosulfine, a possible regulator of sulfonylurea-sensitive K<sub>ATP</sub> channel: molecular cloning, expression and biological properties. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 8387-91
- HIGGINS, C. F. (1992): ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu. Rev. Cell Biol.* **8**, 67-113
- HILGEMANN, D. W. UND BALL, R. (1996): Regulation of cardiac Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> exchange and K<sub>ATP</sub> potassium channels by PIP<sub>2</sub>. *Science* **273**, 956-59
- HILLE, B. (1992): *Ionic channels of excitable membranes*. 2<sup>nd</sup> edn. Sinauer Associates Inc. Sunderland, Massachusetts
- HO, K., NICHOLS, C. G., LEDERER, W. J., LYTTON, J., VASSILEV, P. M., KANAZIRSKA, M. V. UND HEBERT, S. C. (1993): Cloning and expression of an inwardly rectifying ATP-regulated potassium channel. *Nature* **362**, 31-38
- HOLEVINSKY, K. O., FAN, Z., FRAME, M., MAKIELSKI, J. C., GROPPI, V. UND NELSON, D. J. (1994): ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel opener act as a potent Cl<sup>-</sup> channel inhibitor in vascular smooth muscle cells. *J Membr Biol* **137**, 59-70
- HUANG, C. L., FENG, S. UND HILGEMANN, D. W. (1998): Direct activation of inward rectifier potassium channels by PIP<sub>2</sub> and its stabilization by G beta gamma. *Nature* **391**, 803-6
- HUSSAIN, M. UND WAREHAN, A. C. (1994): Rundown and reactivation of ATP-sensitive potassium channels (K<sub>ATP</sub>) in mouse skeletal muscle. *J Membr Biol* **141**, 257-65
- INAGAKI, N., GONOI, T. UND SEINO, S. (1997): Subunit stoichiometry of the K<sub>ATP</sub> channel complex. *FEBS Lett* **409**, 232-36
- INAGAKI, N., GONOI, T., CLEMENT, J. P., NAMBA, N., INAZAWA, J., GONZALEZ, G., AGUILAR-BRYAN, L., SEINO, S. UND BRYAN, J. (1995a): Reconstitution of I<sub>KATP</sub>: an inward rectifier subunit plus the sulphonylurea receptor. *Science* **270**, 1166-9
- INAGAKI, N., GONOI, T., CLEMET, J. P., WANG, C. Z., AGUILAR-BRYAN, L., BRYAN, J. UND SEINO, S. (1996): A family of sulphonylurea receptors determines the pharmacological properties of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *Neuron* **16**, 1011-7
- INAGAKI, N., TSUURA, Y., NAMBA, N., MASUDA, K., GONOI, T., HORIE, M. SEINO, Y., MIZUTA, M. UND SEINO, S. (1995b): Cloning and functional characterization of a novel ATP-sensitive potassium channel ubiquitously expressed in rat tissues, including pancreatic islets, pituitary, skeletal muscle, and heart. *J Biol Chem* **270**, 5691-4
- INOUE, I., NAGASE, H., KISHI, K., HIGUTI, T. (1991): ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in the mitochondrial inner membrane. *Nature* **352**, 244-47
- ISOMOTO, S., KONDO, C., YAMADA, M., MATSUMOTO, S., HIGASHIGUCHI, O., HORIO, Y., MATSUZAWA, Y. KURACHI, Y. (1996): A novel sulphonylurea receptor forms with BIR (Kir 6.2) a smooth muscle type ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel. *J Biol Chem* **271**, 24321-4
- JACKSON, W. F. , KÖNIG, A., DAMBACHER, T., BUSSE, R. (1993): Prostacyclin-induced vasodilatation in rabbit heart is mediated by ATP-sensitive potassium channels. *Am J Physiol* **264**, H238-43

- JOVANOVIĆ, A., ALEKSEEV, A. E. UND TERZIC, A. (1996): Cardiac ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel: target for diadenosine 5',5''-P<sub>1</sub>,P<sub>5</sub>-pentaphosphate. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **353**, 241-44
- KAUBISCH, N., HAMMER, R., WOLLHEIM, C., RENOLD, A. E., OFFORD, R. E. (1982): Specific receptors for sulfonylureas in brain and in a beta-cell tumor in the rat. *Biochem Pharmacol* **31**, 1171-74
- KIMES, B. W. UND BRANDT, B. L. (1976): Characterization of two putative smooth muscle cell lines from rat thoracic aorta. *Exp Cell Res*, **98**, 349-66
- KIRSCH, G. E., CODINA, J., BIRBAUMER, L., BROWN, A. M. (1990): Coupling of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels to A<sub>1</sub> receptors by G proteins in rat ventricular myocytes. *Am J Physiol* **259**, H820-26
- KO, Y. H. UND PEDERSEN, P. L. (1995): The first nucleotide binding fold of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator can function as an active ATPase. *J Biol Chem* **270**, 22093-96
- KOH, S. D., BRADLEY, K. K., RAE, M. G., KEEF, K. D., HOROWITZ, B. UND SANDERS, K. M. (1998): Basal Activation of ATP-sensitive potassium channels in murine colonic smooth muscle cell. *Biophys J* **75**, 1793-800
- KOKUBUN, S., SAIGUSA, A., TAMURA, T. (1991): Blockade of Cl channels by organic and inorganic blockers in vascular smooth muscle cells. *Pflügers Arch*, **418**, 204-13
- KORONAKIS, E., HUGHES, C., MILISAV, I. UND KORONAKIS, V. (1995): Protein exporter function and in vitro ATPase activity are correlated in ABC-domain mutants of HlyB. *Mol Microbiol* **16**, 87-96
- LANG, F. (1990): *Pathophysiologie/Pathobiochemie*. 4. Aufl., Enke-Verlag, Stuttgart
- LAWSON, K. (1996). Is there a therapeutic future for „potassium channel opener“? *Clin Sci (Lond.)* **91**, 651-63
- LEDERER, W. J., UND NICHOLS, C. G. (1989): Nucleotide modulation of the activity of rat heart ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in isolated membrane patches. *J Physiol* **419**, 193-211
- LEMOINE, H., MANNHOLD, R. UND GRITNER, D. (1996): Binding studies with potassium channel openers (KCO) in smooth muscle cells of calf coronary artery as compared to rat cardiomyocytes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **353** (suppl.), R54
- LIGHT, P. (1996): Regulation of ATP-sensitive potassium channels by phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* **1286**, 65-73
- LIU, Y., GAO, W. D., O'ROURKE, B., MARBAN, E. (1995): Synergistic potentiation of ATP-sensitive potassium currents by protein kinase C and adenosine: Implications for ischemic preconditioning. *Circulation* **92**, 1197
- LOEFFLER-WALZ, C. UND QUAST, U. (1997): Disruption of the actin cytoskeleton abolishes high affinity <sup>3</sup>H-glibenclamide binding in rat aortic rings. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **357**, 183-5
- LOEFFLER-WALZ, C. UND QUAST, U. (1998): Binding of K<sub>ATP</sub> channel modulators in rat cardiac membranes. *Br J Pharmacol* **123**, 1395-402
- LOPATIN, A. N. (1994): K<sup>+</sup> channel block by cytoplasmic polyamines as the mechanism of intrinsic rectification. *Nature* **372**, 366-69
- LORENZ, E., ALEKSEEV, A. E., KRAPIVINSKY, G. B., CARRASCO, A. J., CLAPHAM, D. E. UND TERZIC, A. (1998): Evidence for direct physical association between a K<sup>+</sup>



- channel (Kir6.2) and an ATP-Binding Cassette Protein (SUR1) which affects cellular distribution and kinetic behaviour of an ATP-sensitivity K<sup>+</sup> channel. *Mol Cell Biol* Vol.18, No.3, 1652-9
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. UND RANDALL, R. J. (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 265-75
- MADDY, A. H. (1964): A fluorescent label for the outer components of the plasma membrane. *Biochim Biophys Acta* **88**, 390-99
- MANGEL, A. W., PRPIC, V., SNOW, N. D., BASAVAPPA, S., HURST, L. J, SHARARA, A. I., LIDDLE, R. A. (1994): Regulation of cholecystokinin secretion by ATP-sensitive potassium channels. *Am J Physiol* **267**, G595-600
- MANLEY, P. W., QUAST, U.; ANDRES, H., BRAY, K. M. (1993): Synthesis of radioligand binding studies with a tritiated pinacidil analogue: Receptor interactions of structurally different classes of potassium channel openers and blockers. *J Med Chem* **35**, 2004-10
- MCNICHOLAS, C. M., GUGGINO, W. B., SCHWIEBERT, E. M., HEBERT, S. C., GIEBISCH, G. UND EGAN, M. E. (1996): Sensitivity of a renal K<sup>+</sup> channel (ROMK2) to the inhibitory sulfonylurea compound, glibenclamide, is enhanced by co-expression with the ATP-binding cassette transporter CFTR. *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**, 8083-88
- MEISHERI, K. D., JOHNSON, G. A. UND PUDDINGTON, L. (1993): Enzymatic and non-enzymatic sulfation mechanisms in the biological actions of minoxidil. *Biochem Pharmacol* **45**, 271-79
- METZGER, F. (1996): Pharmakologische Charakterisierung von Bindungsstellen für Modulatoren ATP-gesteuerter Kaliumkanäle in isolierten Rattenglomerula und A10-Zellen; *Biolog. Dissertation*, Universität Tübingen
- METZGER, F., LÖFFLER, C. UND QUAST, U. (1997): Sulphonylurea binding in rat isolated glomeruli: pharmacological characterization and dependence on cellmetabolism and cytoskeleton. *Naunyn-Schmiedeberg´s Arch Pharmacol* **355**, 141-9
- MILLER, T. R., TABER, R. D., MOLINARI, E. J., WHITEAKER, K. L., MONTEGGIA, L. M., SCOTT, V. E., BRIONI, J. D., SULLIVAN, J. P., GOPALAKRISHNAN, M. (1999): Pharmacological and molecular characterization of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in the TE671 human medulloblastoma cell line. *Eur J Pharmacol* **370** (2), 179-85
- MISLER, S., FALKE, L. C., GILLIS, K. UND MCDANIEL, M. L. (1986): A metabolite-regulated potassium channel in rat pancreatic B cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**, 7119-123
- NAG, A. C. (1980): Study of non-muscle cells of the adult mammalian heart: a fine structural analysis and distribution. *Cytobios*, **28**, 41-61
- NELSON, M. T. UND QUAYLE, J. M. (1995): Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol* **268**, C799-822
- NESTOROWICZ, A., SCHOOR, K. P., WILSON, B A., GLASER, B., SEINO, S. UND PERMUTT, M. A. (1996): Identification of a non-sense mutation in the  $\beta$ -cell inward rectifier, BIR, associated with familial hyperinsulinsm. In: *Int. Congr. Endocrinology*, 10<sup>th</sup>, San Francisco CA
- NICHOLS, C. G., SHYNG, S. L., NESTOROWICZ, A., GLASER, B., CLEMENT IV, J. P., GONZALEZ, G., AGUILAR-BRYAN, L., PERMUTT, M A. UND BRYAN, J. (1996):

- Adenosine diphosphate as an intracellular regulator of insulin secretion. *Science* **272**, 1785-7
- NOMA, A. (1983): ATP-regulated K<sup>+</sup> channels in cardiac muscle. *Nature* **305**, 147-8
- OHNO-SHOSAKU, T. B., ZÜNKLER, J. UND TRUBE, G. (1987): Dual effects of ATP on K<sup>+</sup> currents of mouse pancreatic  $\beta$ -cells. *Pflügers Arch* **408**, 133-8
- OKUYAMA, Y., YAMADA, M., KONDO, C., SATOH, E., ISOMOTO, S., SHINDO, T., HORIO, Y., KITAKAZE, M., HORI, M. UND KURACHI, Y. (1998): The effects of nucleotides and potassium channel openers on the SUR2A/Kir6.2 complex K<sup>+</sup> channel expressed in HEK293 cells. *Pflügers Arch* **435**, 595-603
- OLESEN, S. P. UND BUNDGAARD, M. (1993): ATP-dependent closure and reactivation of inward rectifier K<sup>+</sup> channels in endothelial cells. *Circ Res* **73**, 492-95
- OSSWALD, H. UND QUAST, U. (1995): Ion channels and renin secretion from juxtaglomerular cells. In: Scherübl, H., Hescheler, J. (Editoren): The electrophysiology of neuroendocrine cells. *CRC Press*, 301-14
- OZANNE, S. E., GUEST, P. C., HUTTON, J. C. UND HALES, C. N. (1995): Intracellular localization and molecular heterogeneity of the sulphonylurea receptor in insulin-secreting cells. *Diabetologia* **38**, 277-82
- PAUCEK, P., MIRONOVA, G., MAHDI, F., BEAVIS, A. D. WOLDEGIORGIS, G., GARLID, K. D. (1992): Reconstitution and partial purification of the glibenclamide-sensitive ATP-dependent K<sup>+</sup> channel from rat liver and beef heart mitochondria. *J Biol Chem* **267**, 26062-69
- PROKS, P., TAKANO, M. UND ASHCROFT, F. M. (1994): Effects of intracellular pH on ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in mouse pancreatic  $\beta$ -cells. *J Physiol* **475**, 33-44
- QUAST, U. (1987): Effect of the K<sup>+</sup> efflux stimulating vasodilator BRL34915 on <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup> efflux and spontaneous activity in guinea-pig portal vein. *Br J Pharmacol* **91**, 569-78
- QUAST, U. (1993): Do the K<sup>+</sup> channel openers relax smooth muscle by opening K<sup>+</sup> channels? *Trends Pharmacol Sci* **14**, 332-36
- QUAST, U. (1996a): ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in the kidney. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **354**, 213-25
- QUAST, U. (1996b): Effects of potassium channel activators in isolated blood vessels. In: Evans, J. M., Hamilton, T. C., Stemp, G. (Editoren): *Potassium channels and their modulators: from synthesis to clinical experience*. Taylor & Francis, London, S. 173-195
- QUAST, U. UND BAUMLIN, Y. (1988): Comparison of the effluxes of <sup>42</sup>K<sup>+</sup> and <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup> elicited by cromakalim (BRL34915) in tonic and phasic vascular tissue. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **338**, 319-26
- QUAST, U. UND COOK, N. S. (1989): Moving together: K<sup>+</sup> channel openers and ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *Trends Pharmacol Sci* **10**, 431-35
- QUAST, U. UND GLOCKER, S. (1995a): Vascular pathology and the K<sub>ATP</sub> channel. In: *Myocardial Protection and the K<sub>ATP</sub> channel*. Yellon, D. M. und Gross, G. J., eds Kluwer, S. 31-50
- QUAST, U. UND MÄHLMANN, H. (1982): Interaction of [<sup>3</sup>H]-Flunitrazepam with the benzodiazepine receptor: evidence for a ligand-induced conformation change. *Biochem Pharmacol* Vol. 31, **17**, 2761-8

- QUAST, U., BRAY, K. M., ANDRES, H., MANLEY, P. W., BAUMLIN, Y. UND DOSOGNE, J. (1992): Binding of the K<sup>+</sup> channel opener [<sup>3</sup>H]P1075 in rat isolated aorta: relationship to functional effects of openers and blockers. *Mol Pharm* **43**, 474-81
- QUAST, U., GUILLON, J.-M., UND CAVERO, I. (1995b): Modulation of K<sup>+</sup> channels: pharmacological and therapeutic aspects. *Pharmacological Control of Calcium and Potassium Homeostasis*, Kluwer Academic Publishers and Fondazione Giovanni Lorenzini, 23-42
- RALEVIC, V. UND BURNSTOCK, G. (1998): Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* **50**, 413-92
- RAO, R., MIANO, J. M., OLSON, E. N., SEIDEL, C. L. (1997): The A10 cell line: a model for neonatal, neointimal or differentiated vascular smooth muscle cells? *Cardiovascular Research* **36**, 118-26
- RIORDAN, J. R. (1993): The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Annu Rev Physiol* **55**, 609-30
- RORSMAN, P. UND TRUBE, G. (1985): Glucose dependent K<sup>+</sup> channels in pancreatic  $\beta$ -cells are regulated by intracellular ATP- *Pflügers Arch* **405**, 305-9
- RUSS, U., METZGER, F., KICKENWEIZ, E., HAMBROCK, A., KRIPPEIT-DREWS, P. UND QUAST, U. (1997): Binding and effects of K<sub>ATP</sub> channel openers in the vascular smooth muscle cell line, A10. *Br J Pharmacol* **122**, 1119-26
- RUSS, U., HAMBROCK, A. ARTUNC, F. LÖFFLER-WALZ, C. HORIO, Y., KURACHI, Y. UND QUAST, U. (1999): Coexpression with the inward rectifier Kir6.1 increases the affinity of the vascular sulfonylurea receptor sulfonylurea receptor SUR2B for glibenclamide. *Mol Pharm* **56**, 955-61
- SAKURA, H., ÄMMÄLÄ, C., SMITH, P. A., GRIBBLE, F. M. UND ASHCROFT, F. M. (1995): Cloning and functional expression of the cDNA encoding a novel ATP-sensitive potassium channel subunit expressed in pancreatic beta-cells, brain, heart and skeletal muscle. *FEBS Lett* **377**, 338-44
- SARASTE, M., SIBBALD, P. R. UND WITTIGHOFER, A. (1990): The P-loop - a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends Biochem Sci* **15**, 430-34
- SCHWANSTECHE, C., DICKEL, C., PANTEN, U. (1992a): Cytosolic nucleotides enhance the tolbutamide sensitivity of the ATP-dependent K channel in mouse pancreatic  $\beta$ -cells by their combined actions at inhibitory and stimulatory sites. *Mol Pharm* **41**, 480-86
- SCHWANSTECHE, C., DICKEL, C., PANTEN, U. (1994b): Interaction of tolbutamide and cytosolic nucleotides in controlling the ATP-sensitive K-channels in mouse  $\beta$ -cells. *Br J Pharmacol* **111**, 302-10
- SCHWANSTECHE, M., BRANDT, C., BEHREND, S., SCHAUPP, U. UND PANTEN, U. (1992b): Effect of MgATP on pinacidil-induced displacement of glibenclamide from the sulphonylurea receptor in a pancreatic  $\beta$ -cell line and rat cerebral cortex. *Br J Pharmacol* **106**, 295-301
- SCHWANSTECHE, M., LÖSER, S., CHUDZIAK, F. UND PANTEN, U. (1994a): Identification of a 38-kDa high affinity sulfonylurea-binding peptide in insulin-secreting cells and cerebral cortex. *J Biol Chem* Vol. 269, No. **27**, 17768-71
- SCHWANSTECHE, M., BACHMANN, C., LÖSER, S., PANTEN, U. (1995): Interaction of fluorescein derivatives with sulfonylurea binding in insulin-secreting cells. *Pharmacology* **50**, 182-91

- SCHWANSTECHE, M., SIEVERDING, C., DÖRSCHNER, H., GROSS, I., AGUILAR-BRYAN, L., SCHWANSTECHE, C. UND BRYAN, J. (1998): Potassium channel openers require ATP to bind to and act through sulfonylurea receptors. *EMBO J* Vol. 17, No.19, 5529-35
- SHEPPARD, D. N. UND WELSH, M. J. (1992): Effect of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel regulators on cystic fibrosis transmembrane conductance regulated chloride currents. *J Gen Physiol* **100**, 573-91
- SHYNG, S. L. UND NICHOLS, C. G. (1997): Octameric stoichiometry of the K<sub>ATP</sub> channel complex. *J Gen Physiol* **110**, 655-64
- SHYNG, S. L. UND NICHOLS, C. G. (1998): Membrane phospholipid control of nucleotide sensitivity of K<sub>ATP</sub> channels. *Science* **282**, 1138-41
- SILBERNAGL, S. UND LANG, F. (1998): *Taschenatlas der Pathophysiologie*. Thieme Verlag, Stuttgart-München- New York
- SMALLWOOD, J. K. UND STEINBERG, M. I. (1988): Cardiac electrophysiological effects of pinacidil and related pyridylcyanoguanidines: relationship to antihypertensive activity. *J Cardiovasc Pharmacol* **12**, 102-9
- SMITH, P. A., ASHCROFT, F. M. UND RORSMAN, P. (1990): Simultaneous recordings of glucose-dependent electrical activity and ATP-regulated K<sup>+</sup> currents in isolated mouse pancreatic β-cells. *FEBS Lett* **261**, 187-90
- STRYER, L. (1991): *Biochemie*. Korr. Nachdruck, Spektrum Verlag, Heidelberg-Berlin-New York
- STURGESS, N. C., ASHFORD, M. L. J., COOK, D. L., HALES, C. N.: The sulphonylurea receptor may be an ATP-sensitive potassium channel. *Lancet II* (8453), 474-475 (1985)
- SÜBBRICH, H. UND BUSCH, A. E. (1998): Kaliumkanäle; Struktur, Funktion und Pharmakologie. *Dt. Apotheker Zeitung* **13**, 47-58
- SZEWCZYK, A., WOJCIK, G., LOBANOV, N. A. UND NALCEZ, M. (1997): The mitochondrial sulfonylurea receptor: identification and characterization. *Biochem Biophysical Res Comm* **230**, 611-15
- TALLARIDA, R. J. (1995): Receptor discrimination and control of agonist-antagonist binding. *Am J Physiol* **269**, E379-91
- TERZIC, A. UND KURACHI, Y. (1996): Actin microfilament disrupters enhance K<sub>ATP</sub> channel opening in patches from guinea-pig cardiomyocytes. *J Physiol* **492.2**, 395-404
- TERZIC, A., FINDLAY, I. HOSOYA, Y. UND KURACHI, Y. (1994a): Dualistic behavior of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels toward intracellular nucleoside diphosphates. *Neuron* **12**, 1049-58
- TERZIC, A., JAHANGIR, A. UND KURACHI, Y. (1995): Cardiac ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels: regulation by intracellular nucleotides and K<sup>+</sup> channel-openig drugs. *Am J Physiol* **269** (*Cell Physiol* **38**) C525-45
- TERZIC, A., TUNG, R. T., INANOBE, A., KATADA, T. UND KURACHI, Y. (1994b): G proteins activate ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels by antagonizing ATP-dependent gating. *Neuron* **12**, 885-93
- THOMAS, P., COTE, G. J., HALLMAN, D. M. UND MATHEW, P. M. (1995a): Homozygosity mapping of the gene for familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy to chromosome 11p. *Am J Hum Genet* **56**, 416-21

- THOMAS, P., COTE, G. J., WOHLIK, N., HADDAD, B., MATHEW, P. M., RABL, W., AGUILAR-BRYAN, L., GAGEL R. F. UND BRYAN, J. (1995b): Mutations in the sulfonylurea receptor gene in familial hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Science* **268**, 426-9
- THOMAS, P., YE, Y. UND LIGHTNER, E. (1996): Mutations of the pancreatic islet inward rectifier also lead to familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Hum Mol Genet* **5**, 1809-12
- TOMLINS, B., HARDING, S. E. , KIRBY, M. S., POOLE-WILSON, P. A. UND WILLIAMS, A. J. (1986): Contamination of a cardiac sarcolemmal preparation with endothelial plasma membrane. *Biochim Biophys Acta*, **856**, 137-143
- TRAVIS, S. M., CARSON, M. R., RIES, D. R. UND WELSH, M. J. (1993): Interaction of nucleotides with membrane-associated cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem* **268**, 15336-39
- TRUBE, G. UND HESCHELER, J. (1984): Inward-rectifying channels in isolated patches of the heart cell membrane: ATP-dependence and comparison with cell-attached patches. *Pflügers Arch* **401**, 178-84
- TRUBE, G., RORSMAN, P., UND OHNO-SHOSAKU, T. (1986): Opposite effects of tolbutamide and diazoxide on the ATP-dependent K<sup>+</sup> channel in mouse pancreatic  $\beta$ -cells. *Pflügers Arch* **407**, 493-99
- TUCKER, S. J., GRIBBLE, F. M., ZHAO, C., TRAPP, S. UND ASHCROFT, F. M. (1997): Truncation of Kir6.2 produces ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in the absence of the sulphonylurea receptor. *Nature* **387**, 179-83
- TUNG, R. T. UND KURACHI, Y. (1991): On the mechanism of nucleotide diphosphate activation of the ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel in ventricular cell of guinea-pig. *J Physiol* **437**, 239-56
- TUSNADY, G. E., BAKOS, E., VARADI, A. UND SARKADI, B. (1997): Membrane topology distinguishes a subfamily of the ATP-binding cassette (ABC) transporters. *FEBS Lett* **402**, 1-3
- UEDA, K., KOMINE, J., MATSUO, M., SEINO, S. UND AMACHI, T. (1999): Cooperative binding of ATP and MgADP in the sulfonylurea receptor is modulated by glibenclamide. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 1268-72
- UHDE, I., TOMAN, A., GROSS, I., SCHWANSTECHE, C. UND SCHWANSTECHE, M. (1999): Identification of the potassium channel opener site on sulfonylurea receptors. *J Biol Chem* Vol. **274**, No. **40**, 28079-82
- VANDENBERG, C. A. (1987): Inward rectification of a potassium channel in cardiac ventricular cells depends on internal magnesium ions. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**, 2560-64
- VENKATESH, N, LAMP, S. T. UND WEISS, J. N. (1991): Sulfonylureas, ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels, and cellular K<sup>+</sup> loss during hypoxia, ischemia and metabolic inhibition in mammalian ventricle. *Circ Res* **69**, 623-37
- WALKER, J. E., SARASTE, M., RUNSWICK, M. J. UND GAY, N. J. (1982): Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J* **1**, 945-51

- WANG, Q., CURRAN, M. E., SPLAWSKI, I., BURN, T. C., MILLHOLLAND, J. M., VANRAAY, T. J., SHEN, J., TIMOTHY, K. W., VINCENT, G. M., DEJAGER, T., SCHWARTZ, P. J., TOWBIN, J. A., MOSS, A. J., ATKINSON, D. L., LANDES, G. M., CONNORS, T. D., KEATING, M. T. (1996): Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias. *Nature Genet* **12**, 17-23
- WOLL, K. H., LEIBOWITZ, M. D., NEUMCKE, B. UND HILLE, B. (1987): A high conductance anion channel in adult amphibian skeletal muscle. *Pfluegers Arch* **410**, 632-40
- YAMADA, Y. M., ISOMOTO, S., MATSUMOTO, S., KONDO, C., SHINDO, T., HORIO, Y. UND KURACHI, Y. (1997): Sulfonylurea receptor 2B, Kir6.1 form a sulfonylurea-sensitive but ATP-insensitive K<sup>+</sup> channel. *J Physiol* **499**, 715-20
- YOKOSHIKI, H., KATSUBE, Y., SUNAGAWA, M., SEKI, T., SPERELAKIS, N. (1997) Disruption of actin cytoskeleton attenuates sulfonylurea inhibition of cardiac ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *Pflüger's Arch* **434**, 203-5
- YOKOSHIKI, H., SUNAGAWA, M., SEKI, T., SPERELAKIS, N. (1998): ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in pancreatic, cardiac and vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol (Cell Physiol)* **43**, C25-37
- ZERANGUE, N., SCHWAPPACH, B., JAN, Y. N., JAN, L. Y. (1999): A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane K-ATP channels. *Neuron* **22**, 537-48
- ZHANG, H. L. UND BOLTON, T. B. (1995): Activation by intracellular GDP, metabolic inhibition and pinacidil of a glibenclamide-sensitive K<sup>+</sup> channel in smooth muscle cells of rat mesenteric artery. *Br J Pharmacol* **114**, 662-72
- ZHANG, H. L. UND BOLTON, T. B. (1996): Two types of ATP-sensitive potassium channels in rat portal vein smooth muscle. *Br J Pharmacol* **188**, 105-14
- ZHOU, H., TATE, S. S. UND PALMER, L. G. (1994): Primary structure and functional properties of an epithelial K<sup>+</sup> channel. *Am J Physiol* **266**, C809-24
- ZÜNKLER, B. J., LINS, S., OHNO-SHOSAKU, T., TRUBE, G., PANTEN, U. (1988): Cytosolic ADP enhances the sensitivity of tolbutamide of ATP-dependent K<sup>+</sup> channels from pancreatic  $\beta$ -cells. *FEBS Lett* **239**, 241-44

### **Eigene Publikationen**

- YAGUPOLSKII, L. M., ANTEPOHL, W., ARTUNC, F., HANDROCK, R., KLEBANOV, B. M., MALETINA, I. I., MARXEN, B., PETKO, K. I., QUAST, U., VOGT, A., WEISS, C., ZIBOLD, J. UND HERZIG, S. (1999): Vasorelaxation by new hybrid compounds containing dihydropyridine and pinacidil-like moieties. *J Med Chem* **42**, 5266-71

---

## 7 Anhang

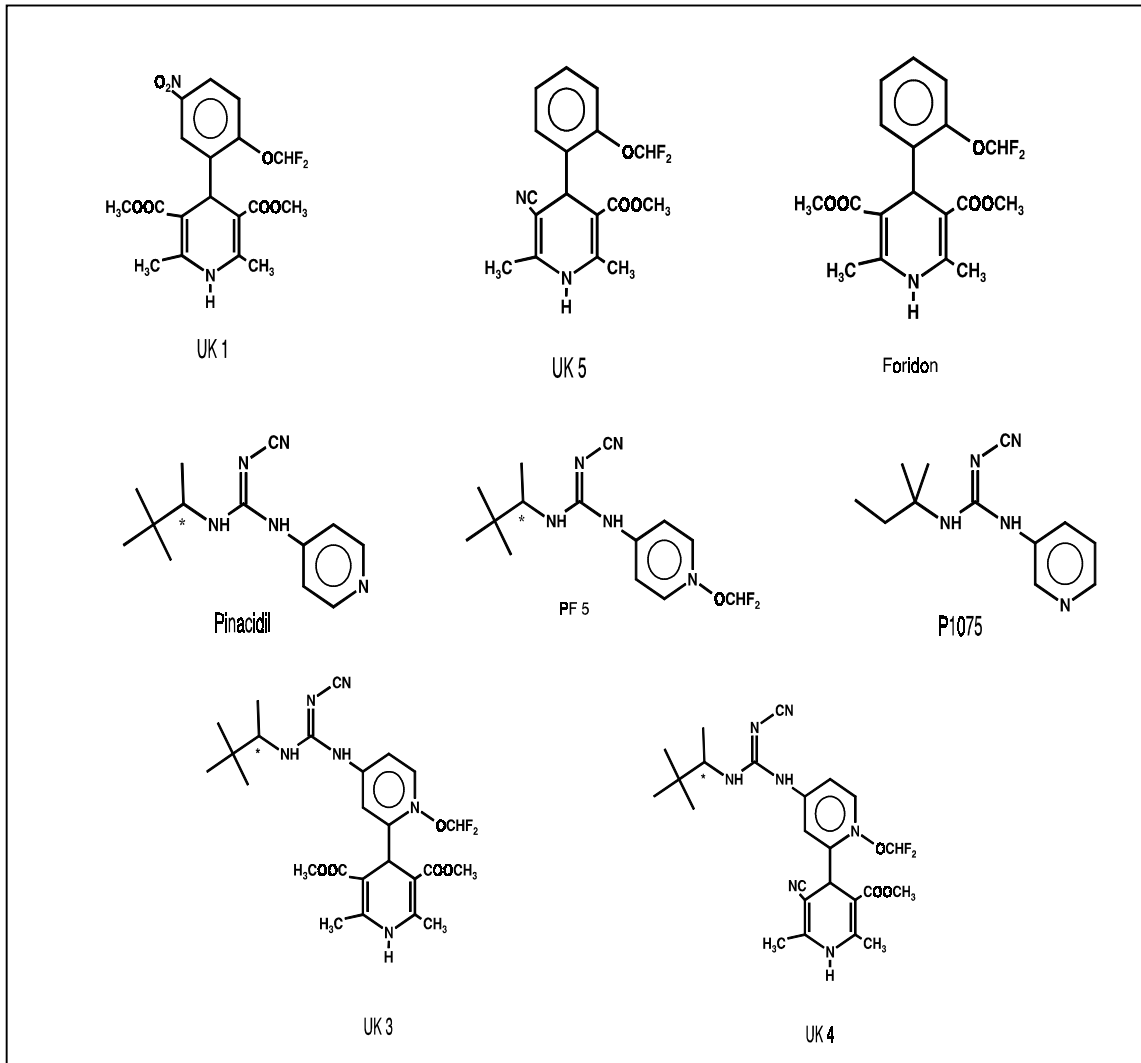
### 7.1 Anhang A: Charakterisierung des Bindungsverhaltens neuartiger Hybridspezies mittels $^3\text{H}$ -P1075-Bindungsstudien an Rattenherzmembranen

#### 7.1.1 Einleitung

$\text{Ca}^{2+}$ -Antagonisten und  $\text{K}^+$ -Kanalöffner entfalten ihre antihypertensive Wirkung durch direkten Angriff am glatten Gefäßmuskel, wo sie eine Vasorelaxation hervorrufen. Dabei blockieren  $\text{Ca}^{2+}$ -Antagonisten den spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal vom L-Typ und verhindern somit den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Muskelzelle. Dies führt vor allem in der glatten Muskelschicht arteriöler Widerstandsgefäße zu einer Erschlaffung. Daneben können  $\text{Ca}^{2+}$ -Antagonisten auch am Herzen wirksam sein, wo sie durch Hemmung desselben  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals die Erregungsentstehung und -weiterleitung sowie das Kontraktionsvermögen der Myokardzelle negativ beeinflussen. Die gebräuchlichen  $\text{Ca}^{2+}$ -Antagonisten werden in drei chemische Klassen unterschieden, von denen die sog. Dihydropyridine eine Besonderheit darstellen, da sie mit guter Selektivität ( $\approx 100$ fach) am glatten Gefäßmuskel wirken und nicht mit den kardialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen interagieren (Forth et al., 1996).

$\text{K}^+$ -Kanalöffner sind eine chemisch heterogene Wirkstoffklasse, die die Offenwahrscheinlichkeit des ATP-empfindlichen Kaliumkanals ( $\text{K}_{\text{ATP}}$ ) steigern und somit durch einen hyperpolarisierenden  $\text{K}^+$ -Ausstrom die Erregbarkeit vermindern kann. Eine wichtige Klasse von  $\text{K}^+$ -Kanalöffnern stellen die Zyanoguanidine mit ihren Vertretern P1075 und Pinacidil dar. Sie sind hochaffine Liganden am  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanal vom glattmuskulären Typ SUR2B/ $\text{K}_{\text{IR}}6.1$  und besitzen Bindungskonstanten im nanomolaren Bereich (Löffler-Walz und Quast, 1998a; Hambrock et al., 1998).

## 7. Anhang



**Abb. 7.1: Strukturformeln der eingesetzten Substanzen.** Mit einem Stern (★) sind die Chiralitätszentren gekennzeichnet.

Durch Synthese von Substanzen, die sowohl den L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal als auch den  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanal hemmen können, könnte ein neuartiges antihypertensives Prinzip geschaffen werden. Um solche Substanzen zu erhalten, wurden ausgehend von einem Dihydropyridin und einem Zyanoguanidin Hybridstoffe synthetisiert, die die pharmakologischen Eigenschaften ihrer Ursprungssubstanzen beibehalten sollten.

Abb. 7.1 zeigt die Strukturformeln der Ausgangs- und der Hybridsubstanzen; dabei stellen Foridon, UK 1 und UK 5 reine Dihydropyridine dar, die am Phenyling in Orthostellung eine Difluoromethoxygruppe aufweisen; UK 1 besitzt noch zusätzlich



eine phenylische Nitrogruppe, bei UK 5 befindet sich am Dihydropyridinring eine Zyanogruppe anstelle des Methylesters. Die Zyanoguanidine Pinacidil, PF 5 und P1075 besitzen einen Pyridinring, der im Falle des PF 5 einen p-Difluoromethoxysubstituenten trägt; bei P1075 ist der Pyridinstickstoff in Metastellung angeordnet. Desweiteren unterscheiden sich Pinacidil und PF 5 von P1075 durch einen um eine Methylengruppe verlängerten Kohlenwasserstoffterminus, der ein Chiralitätszentrum enthält. Die Hybridsubstanzen UK 3 und UK 4 gingen durch Fusion von PF 5 mit Foridon oder UK 5 hervor. Dabei wurde bei PF 5 der jeweilige Dihydropyridinrest von Foridon oder UK 5 in Metastellung eingeführt.

Die so entstandenen Hybridstoffe UK 3 bzw. UK 4 wurden daraufhin untersucht, wie sie mit dem L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal und dem  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanal interagieren; neben Bindungsexperimenten kamen auch Relaxationsexperimente an Mesenterialarterien zur Anwendung.

Im folgenden wurde das Bindungsverhalten von UK 3 und UK 4 am  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanal studiert. Dazu wurden Competitionsexperimente mit dem Radioliganden  $^3\text{H}$ -P1075 an Rattenherzmembranen durchgeführt; Bindungsexperimente mit den Ursprungssubstanzen PF 5 (Zyanoguanidin) und UK 1 bzw. Foridon (Dihydropyridine) dienten zum Vergleich der mit den Hybridsubstanzen erhaltenen Ergebnisse.

Die vorliegenden Experimente entstanden in Zusammenarbeit mit der Pharmakologischen Abteilung der Universität Köln und mit dem Institut für Organische Chemie der Universität Kiev; die Ergebnisse wurden unter dem Titel „Vasorelaxation by new hybrid compounds containing dihydropyridine und pinacidil-like moieties“ publiziert (YAGUPOLSKII, L. M., ANTEPOHL, W., ARTUNC, F., HANDROCK, KLEBANOV, B. M., R., MALETINA, I. I., MARXEN, B., PETKO, K. I., QUAST, U., VOGT, A., WEISS, C., ZIBOLD, J. UND HERZIG, S. [1999], *J Med Chem* Vol. 42, No. 25, 5266-71).

## 7. Anhang

---

### 7.1.2 Material und Methoden

#### 7.1.2.1 *Verwendete Puffer*

Alle Puffer wurden im Kühlraum (6 °C) gelagert.

#### ***Puffer A***

*Aufnahme frisch entnommener Rattenherzen*

5 mM	HEPES
1 mM	EGTA
139 mM	NaCl
5 mM	KCl
1,2 mM	MgCl <sub>2</sub>

Die Substanzen wurden in a. demin. gelöst und die Lösung im Kühlraum (6 °C) über Nacht abgekühlt. Anschliessend wurde der pH-Wert auf Eis mit NaOH auf 7,4 eingestellt.

#### ***Puffer B***

*Hypotoner Homogenisationspuffer zur Präparation von Rattenherzmembranen*

10 mM	HEPES
1 mM	EGTA

sowie die Proteaseinhibitoren

0,2 mM	Phenylmethylsulfonylfluorid
0,2 µM	Pepstatin A
10 µM	Leupeptin
10 µg ml <sup>-1</sup>	Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor

Die Substanzen wurden in a. demin. gelöst und die Lösung im Kühlraum (6 °C) über Nacht abgekühlt. Anschliessend wurde der pH-Wert auf Eis mit NaOH auf 7,4 eingestellt.

**Puffer C**

*Aufnahme der mikrosomalen Membranfraktion aus Rattenherzen*

20 mM	HEPES
139 mM	NaCl
5 mM	KCl
2 mM	MgCl <sub>2</sub>

Die Substanzen wurden in a. demin. gelöst und die Lösung im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Anschliessend wurde der pH-Wert bei 37 °C mit NaOH auf 7,4 eingestellt.

**Puffer D**

*Isotoner Bindungspuffer für Rattenherzmembranen*

5 mM	HEPES
139 mM	NaCl
5 mM	KCl
25 mM	MgCl <sub>2</sub>

Die Substanzen wurden in a. demin. gelöst, die Lösung im Wasserbad auf 37° C erwärmt und der pH bei 37 °C auf 7,4 eingestellt.

Unmittelbar vor jedem Versuch wurden noch

1,25 mM	CaCl <sub>2</sub>
20 mM	CP
3 mM	Na <sub>2</sub> ATP
50 U/ml	CK zugegeben.

**7.1.2.2 Herstellung einer mikrosomalen Membranfraktion aus Rattenherzen**

Männliche Sprague-Dawley-Ratten (200–350 g) wurden durch Genickschlag getötet, anschliessend dekapitiert und ausgeblutet. Die Herzen wurden rasch entnommen und in eiskaltem Puffer A aufgenommen. Nach Entfernung der Vorhöfe wurden die Ventrikel in kleine Stücke geschnitten und in Puffer B gegeben. Das Kammergewebe wurde durch ein Edelstahlsieb (Maschenweite 320 µm) gepresst, um Bindegewebe und grössere

## 7. Anhang

---

Koronargefäße zurückzuhalten. Danach wurde das erhaltene Material in Puffer B zentrifugiert (45 Min.,  $10^5 \times g$ ), der entstandene Bodensatz in 15–20 Volumina eiskaltem Puffer C resuspendiert, homogenisiert (POLYTRON; 5 s bei 10.000 rpm) und bei  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  eingefroren.

Die Proteinkonzentration wurde nach Lowry et al. (1951) bestimmt (s. Kap. 2.3).

### 7.1.2.3 Bindungsexperimente mit $^3\text{H-P1075}$

Die Bindung des Öffners  $^3\text{H-P1075}$  an Rattenherzmembranen wurde bereits ausführlich studiert (Löffler-Walz und Quast, 1998). Dabei kann die Bindung nur in Anwesenheit von MgATP stattfinden; die Bindungskonstante  $K_D$  wurde in Sättigungsexperimenten zu  $\approx 6\text{ nM}$  ermittelt. Es ist anzunehmen, dass die hierbei untersuchte mikrosomale Membranpräparation aus Rattenherzen Sulfonylharnstoffrezeptoren sowohl der Kardiomyozyten (SUR2A) als auch der glatten Gefäßmuskelzellen (SUR2B) enthält, der Öffner  $^3\text{H-P1075}$  jedoch mit sehr ähnlichen Affinitäten an beide bindet (Löffler-Walz und Quast, 1998).

Das Bindungsverhalten der Hybrid- wie auch der Ursprungssubstanzen am  $K_{\text{ATP}}$ -Kanal wurde anhand von Konkurrenzexperimenten mit  $^3\text{H-P1075}$  untersucht. Dabei kann die  $^3\text{H-P1075}$ -Bindung von seinen Rezeptoren nur durch spezifische Interaktion der Testsubstanzen mit diesen Rezeptoren verdrängt werden.

Für die Konkurrenzexperimente wurde die Membranpräparation in einer Konzentration von 0,8 mg Protein/ml mit dem Radioliganden  $^3\text{H-P1075}$  (1-2 nM) und aufsteigenden Konzentrationen der zu untersuchenden Substanzen für 30 Min. bei  $37\text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert. Die unspezifische Bindung  $B_{\text{NS}}$  wurde in Gegenwart von  $10\text{ }\mu\text{M}$  kaltem P1075 ermittelt. Die Reaktion fand in Ansätzen zu 1,1 ml in Puffer D statt, der ein ATP-regenerierendes System, bestehend aus Kreatinphosphat (CP) und Kreatinkinase (CK), enthielt. Die Inkubation wurde durch Verdünnen von 0,3 ml-Aliquots in 8 ml Waschpuffer beendet, die Filtration erfolgte über GF/C – Filter unter zweimaligen Nachspülen mit 8 ml Waschpuffer.

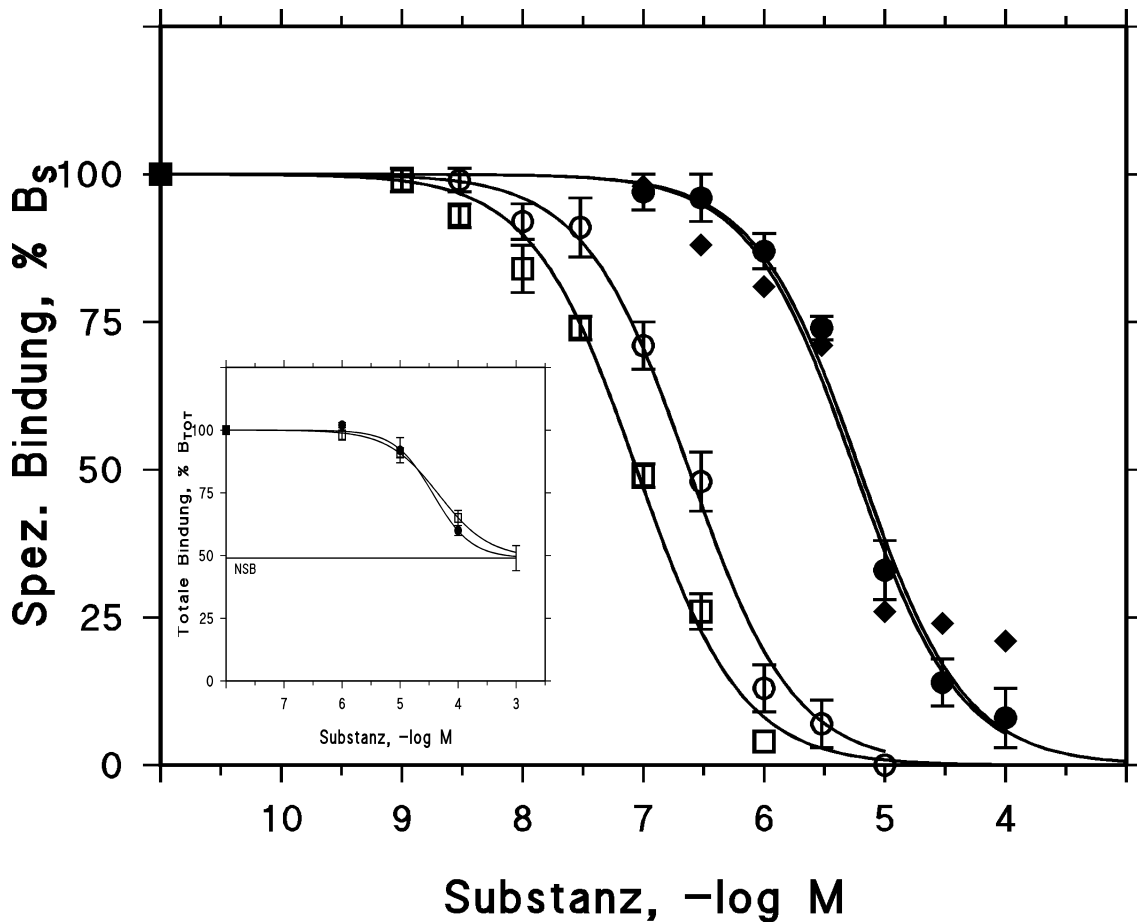
### 7.1.3 Ergebnisse

Die Ergebnisse der einzelnen Konkurrenzexperimente sind in Tab. 7.1 dargestellt. Dabei lag die totale Bindung der einzelnen Serien zwischen 7,5 und 10,8 fmol/mg (im Mittel  $9,1 \pm 0,5$  fmol/mg), die spezifische Bindung zwischen 4,5 und 6,2 fmol/mg (im Mittel  $5,2 \pm 0,5$  fmol/mg). Mit der Bindungskonstanten von  $^3\text{H-P1075}$  ( $\approx 6$  nM; Löffler-Walz und Quast, 1998b) läßt sich  $B_{\text{MAX}}$  bei einer mittleren Ligandenkonzentration von  $1,19 \pm 0,15$  nM zu  $\approx 31$  fmol/mg extrapolieren. Die unspezifische Bindung bewegte sich abhängig von der vorliegenden Ligandenkonzentration (0,88-1,69 nM) zwischen 32 und 49 %  $B_{\text{TOT}}$ . Die Daten der einzelnen Serien wurden zusammengefaßt und mit Gl. 21b ausgewertet. Da von monophasischen Verdrängungsvorgängen ausgegangen wurde, konnte der Hill-Koeffizient zur Fehlerreduktion gleich 1 gesetzt werden. Die Verdrängungskurven sind in Abb. 7.2 zusammen dargestellt.

Die Verdrängung der  $^3\text{H-P1075}$ -Bindung durch UK 1 und Foridon war in den eingesetzten Konzentration 1-100  $\mu\text{M}$ ) noch nicht gesättigt. Die Daten konnten dennoch quantitativ mit Gl. 21b ausgewertet werden, indem die nichtspezifische Bindung als untere Grenze der Kurve gesetzt wurde. Die Kurven dieser Substanzen sind als Einschub in Abb. 7.2 gezeigt.

Substanz	Stoffklasse	Anz. Versuche	$\text{pIC}_{50}$	$K_I$
UK 1	DHP	3	$4,43 \pm 0,10$	29 (14; 59) $\mu\text{M}$
Foridon	DHP	3	$4,34 \pm 0,02$	36 (31; 41) $\mu\text{M}$
PF 5	ZG	5	$7,05 \pm 0,04$	74 (61; 92) nM
Pinacidil	ZG	5	$6,62 \pm 0,04$	196 (162; 237) nM
UK 3	Hybrid	5	$5,21 \pm 0,04$	5,4 (4,3; 6,7) $\mu\text{M}$
UK 4	Hybrid	2	$5,25 \pm 0,10$	4,9 (2,9; 8,4) $\mu\text{M}$

Tab. 7.1: Ergebnisse der Konkurrenzexperimente der einzelnen Substanzen mit  $^3\text{H-P1075}$  als Radioligand; DHP= Dihydropyridin; ZG= Zyanoguanidin.



**Abb. 7.2: Konkurrenz der  $^3\text{H}$ -P1075-Bindung durch PF 5 ( $\square$ ), Pinacidil ( $\circ$ ), UK 3 ( $\bullet$ ) und UK 4 ( $\square$ ), dargestellt als % der spezifischen Bindung (100% entsprechen  $5,2 \pm 0,5$  fmol/mg). Die Daten sind Mittelwerte aus  $n = 5$  Einzelerperimenten  $\pm$  SEM (Ausnahme UK 4:  $n = 2$ ). Amplituden der einzelnen Kurven 400-1000 dpm.**

**Einschub: Verdrängung der  $^3\text{H}$ -P1075-Bindung durch UK 1 ( $\bullet$ ) und Foridon ( $\square$ ) als % der totalen Bindung (100% entsprechen  $8,9 \pm 0,5$  fmol/mg). Die Daten sind Mittelwerte aus  $n = 3$  Einzelerperimenten  $\pm$  SEM. Die Bindung ist im eingesetzten Konzentrationsbereich nicht vollständig verdrängt; höhere Konzentrationen konnten wegen Lösungsmittelartefakten nicht eingesetzt werden.**

### 7.1.4 Diskussion

Die Zyanoguanidine PF 5 und Pinacidil sind im Gegensatz zum P1075 chirale Moleküle mit einem (+) und (-)-Enantiomer. Im Falle des Pinacidils konnte zuvor gezeigt werden, dass das (-)-Enantiomer die aktive Form darstellt und bei Konkurrenzexperimenten mit  $^3\text{H}$ -P1075 an derselben Membranpräparation aus Rattenherzen eine  $K_I$  von  $\approx 100$  nM besitzt (Löffler-Walz und Quast, 1998). Die hier ermittelte  $K_I$  von Pinacidil mit 200 nM liegt um einen Faktor 2 nach rechts verschoben und spiegelt die Tatsache wider, dass in diesen Experimenten ein Razemat verwendet wurde. Die Enantiomere des PF 5, das ebenfalls als racemisches Gemisch eingesetzt wurde, wurden allerdings nicht auf ihre Aktivität hin untersucht.

Wenn man davon ausgeht, dass die Zyanoguanidine alle dieselbe Bindungsstelle am SUR2B besetzen, ist eine negative allosterische Wechselwirkung zwischen der Bindung von  $^3\text{H}$ -P1075, Pinacidil und PF 5 ausgeschlossen. Somit reflektieren die ermittelten Inhibitionskonstanten  $K_I$  von Pinacidil und PF 5 die Affinität dieser Zyanoguanidine am SUR2B; sie können ferner mit der Bindungskonstanten  $K_D$  von P1075 verglichen werden ( $\approx 6$  nM; Löffler-Walz und Quast, 1998). Beim Vergleich der  $K_I$ -Werte von Pinacidil und PF 5 zeigt sich, dass die Einführung der Difluoromethoxygruppe am Pyridinstickstoff die Affinität um einen Faktor 2 steigert. Die Bedeutung des Pyridinrings wird weiter durch die unterschiedliche Position des Stickstoffatoms in Pinacidil und P1075 unterstrichen, das sich im Falle des P1075 in meta-Stellung befindet. Der Kohlenwasserstoffterminus ist ebenso von grossem Einfluss auf das Bindungsverhalten der Zyanoguanidine: dieser enthält im Pinacidil- und PF 5-Molekül ein chirales Zentrum und führt dazu, dass nur ein Enantiomer die Fähigkeit zur hochaffinen Bindung besitzt. Beide Aspekte tragen dazu bei, dass P1075 mit höherer Affinität am SUR2B binden kann.

Die Dihydropyridine UK 1 und Foridon konnten die  $^3\text{H}$ -P1075-Bindung mit Inhibitionskonstanten um  $30 \mu\text{M}$  verdrängen, was auf eine spezifische Interaktion am SUR2B hindeutet. Ob sie dieselbe Bindungsstelle wie die Zyanoguanidine besitzen, kann aus den durchgeführten Experimenten nicht gefolgert werden; es ist jedoch möglich, dass

## 7. Anhang

---

sie aufgrund ihrer chemischen Struktur (zwei Ringsysteme) partiell die Bindungsstelle der Zyanoguanidine besetzen und eine niederaffine Bindung ausbilden.

Die Hybridsubstanzen UK 3 und UK 4 waren ebenfalls in der Lage, die  $^3\text{H}$ -P1075-Bindung spezifisch zu hemmen; ihre  $K_I$ -Werte lagen bei  $\approx 5 \mu\text{M}$  und waren um einen Faktor 50 schwächer als der  $K_I$ -Wert von PF 5 und um einen Faktor 6 stärker als die  $K_I$ -Werte der Dihydropyridine UK 1 und Foridon. Daraus kann man schliessen, dass durch Einführung des Dihydropyridinrings in die Zyanoguanidingrundstruktur die Fähigkeit zur hochaffinen Bindung im nanomolaren Bereich verloren wird. Wie oben bereits erläutert, hat die chemische Struktur am Pyridinring der Zyanoguanidine wesentlichen Einfluss auf das Bindungsverhalten. Die Frage, ob die Hybridsubstanzen dieselbe Bindungsstelle wie die Zyanoguanidine besetzen, könnte in Versuchen geklärt werden, in denen die Dissoziationskinetik der  $^3\text{H}$ -P1075-Bindung unter Zugabe der Testsubstanz untersucht wird.

Aus medizinischer Sicht lassen die oben erwähnten Hybridsubstanzen durch ihren zweifachen Angriff am glatten Gefässmuskel eine starke vasorelaxierende Wirkung *in vivo* erwarten, die mit einem eventuell starken Blutdruckabfall einher gehen könnte. Dies würde eine verstärkte sympathische Gegenregulation des Körpers einschliesslich der Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems hervorrufen. Die Folge wären eine erhöhte Vasokonstriktion und eine massive  $\text{H}_2\text{O}$ - und  $\text{Na}^+$ -Retention in der Niere, wodurch jedoch die therapeutische Wirksamkeit dieser Hybridsubstanzen einschränkt würde und ihre Verwendung in der Monotherapie der arteriellen Hypertonie nicht geeignet wäre. Abhilfe dafür könnte die Kombination mit einem  $\beta$ -Blocker schaffen, wodurch die sympathische Gegenregulation unterdrückt würde.

### 7.1.5 Verwendete Literatur

- FORTH, W., HENSCHLER, D., RUMMEL, W. UND STARKE, K. (1996): *Allgemeine und spezielle Pharmakologie*, 7. Aufl., Spektrum Verlag, Heidelberg-Berlin-Oxford, S. 421-6
- HAMBROCK, A., LÖFFLER-WALZ, C., KURACHI, Y. UND QUAST, U. (1998):  $\text{Mg}^{2+}$  and ATP dependence of  $\text{K}_{\text{ATP}}$  channel modulator binding to the recombinant sulphonylurea receptor, SUR2B. *Br J Pharmacol* **125**, 577-83
- LOEFFLER-WALZ, C. UND QUAST, U. (1998): Binding of  $\text{K}_{\text{ATP}}$  channel modulators in rat cardiac membranes. *Br J Pharmacol* **123**, 1395-402



---

## 7.2 Anhang B: Bindung von $^3\text{H}$ -QNB und Atropin an Rattenherzmembranen

### 7.2.1 Einleitung

Die Rezeptoren des cholinergen Systems umfassen neben den nikotinischen Rezeptoren, die ligandengesteuerte Ionenkanäle darstellen, die Muscarinrezeptorenfamilie. Letztere sind vom Typ her metabotrop, d.h. sie setzen innerhalb der Zelle eine Signalkette in Gang, an deren Ende second messenger frei werden. Man kann die m-Cholinorezeptoren in 8 Subtypen diversifizieren, von denen heute die Typen  $M_{1-3}$  am besten physiologisch und pharmakologisch charakterisiert sind.

$M_1$ -Rezeptoren kommen auf peripheren Neuronen (z.B. am Magen mit Beteiligung an der Säuresekretion) und im ZNS (z.B. Corpus Striatum, Brechzentrum) vor und modulieren Erregungsvorgänge. Sie vermitteln über ein  $G_q$ -Protein eine Aktivierung der Phospholipase C mit Anstieg der second messenger Diacylglycerin (DAG; membranständig) bzw. Inositoltriphosphat ( $IP_3$ ; zytosolisch). Beide führen zu einer Aktivierung der Proteinkinase C bzw. eine Konzentrationserhöhung des intrazellulären Calciums.

$M_2$ -Rezeptoren sind typisch für das Herz, deren Rezeptordichte im Vorhof wegen der bestehenden parasympathischen Innervation höher ist als im Ventrikelmyokard, das weniger parasympathischer Fasern aufweist.  $M_2$ -Rezeptoren erzeugen ihre Effekte über ein inhibitorisches  $G_i$ -Protein, welches einerseits  $K^+$ -Kanäle öffnet (ACh-abhängige  $K^+$ -Kanäle,  $K_{ACH}$ ) andererseits durch Hemmung der Adenylatcyclase den am Herzen sympathischen Second Messenger cAMP erniedrigt. Die Aktivierung bewirkt eine negative Chrono-, Dromo-, und Inotropie; letzteres ist im Ventrikel schwach ausgeprägt, da dort kein  $I_{KACH}$ -Kanal exprimiert wird. Weitere Vorkommen erstrecken sich auf Gefäßmuskelzellen, die sie zur Relaxation bringen sowie auf postganglionäre sympathische und parasympathische Axone, wo sie als Autorezeptoren eine Transmitterfreisetzung abschwächen.

## 7. Anhang

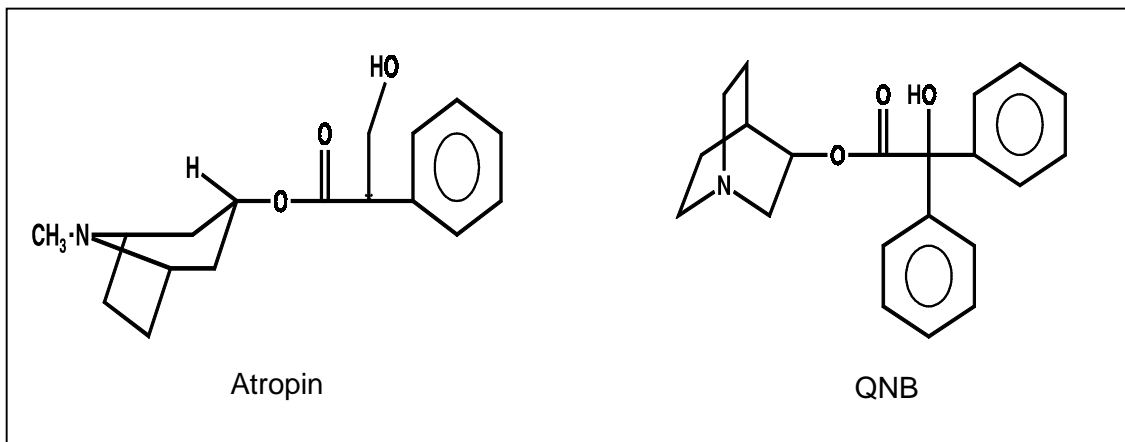


Abb. 7.3: Strukturformeln der untersuchten m-Cholinoantagonisten

M<sub>3</sub>-Rezeptoren koppeln an dieselbe Kaskade wie der Subtyp M<sub>1</sub>. Man findet sie vornehmlich an den parasymphatisch innervierten inneren Organen wie Lunge, Gastro-Intestinal-Trakt, Drüsen, Auge und Urogenitaltrakt. Dabei wird Sekretion und Kontraktion (Erhöhung des intrazellulären Calciums) verursacht. Bemerkenswert ist, dass Endothelien trotz fehlender Innervation M<sub>3</sub>-Rezeptoren aufweisen, wodurch die NO-Synthase aktiviert wird, was zur vermehrten Freisetzung des vasodilatatorisch wirkenden NO führt (Forth et al., 1996).

Atropin stellt einen unspezifischen kompetitiven Antagonisten an allen 3 Subtypen dar. Als natürliches Alkaloid ist es in der Familie der Nachtschattengewächse (Solanaceae) enthalten. Wichtige Vertreter sind die Tollkirsche (*Atropa belladonna*) und das Bilsenkraut (*Hyoscamus niger*). Es wird therapeutisch bei Bradykardie, Spasmen der Bronchien und des Magen-Darm-Trakts, ferner zur Verhinderung von vagalen Reflexen intraoperativ verwendet. Im Gegensatz dazu ist QNB, welches auch ein unspezifischer kompetitiver M-Antagonist ist, therapeutisch nicht einsetzbar, da es halluzinogene Nebenwirkungen besitzt; heute wird es nur noch in der wissenschaftlichen Forschung verwendet, nachdem es ursprünglich in den 80er Jahren in den USA als ein Anti-Riot-Mittel entwickelt, aber nie eingesetzt wurde (Quast, U., persönliche Mitteilung).

### 7.2.2 Methoden

#### 7.2.2.1 *Herstellung einer mikrosomalen Membranfraktion aus Rattenherzen*

Die Präparation der Rattenherzen wurde bereits in Anhang A, Kap. 7.1.2.2 beschrieben.

#### 7.2.2.2 *Kompetitionsexperimente*

Das durch die Membranherstellung gewonnene Protein (0,11 bzw. 0,27 mg/ml) wurde für 60 Min. mit  $^3\text{H}$ -QNB (0,12-0,49 nM) in einem Gesamtvolumen von 1,1 ml bei 37 °C und pH 7,4 in Inkubationspuffer (Puffergehalt in mM: NaCl, 139; KCl, 5; MgCl<sub>2</sub>, 1,2; HEPES, 5; CaCl<sub>2</sub>, 1,25) inkubiert, als Kompetitor wurden kaltes QNB oder Atropin in steigender Konzentration zugegeben.

Die Inkubation wurde durch Entnahme von 0,3 ml-Aliquots (Dreifachbestimmung) beendet, die in 8 ml eiskaltem Waschpuffer (50 mM Tris, 154 mM NaCl, pH 7,4) gelöscht wurden. Die Gesamtradioaktivität wurde durch Entnahme von 50 µl aus dem jeweiligen Ansatz vor Abfiltration bestimmt. Gebundener und freier Ligand wurden durch rasche Vakuumfiltration über Whatman GF/C-Filter getrennt. Die Filter wurden 2 mal mit 8 ml eiskaltem Waschpuffer gewaschen und in Gegenwart von 3 ml Szintillator (Ultima Gold; Packard) auf  $^3\text{H}$  gezählt.

#### 7.2.2.3 *Sättigungsexperimente*

Das durch die Membranherstellung gewonnene Protein (0,27 mg/ml) wurde für 60 Min. mit einer aufsteigenden  $^3\text{H}$ -QNB-Konzentrationsreihe (20-300 pM) in einem Gesamtvolumen von 1,1 ml bei 37 °C und pH 7,4 in Inkubationspuffer (Puffergehalt in mM: NaCl, 39; KCl, 5; MgCl<sub>2</sub>, 1,2; HEPES, 5; CaCl<sub>2</sub>, 1,25) inkubiert.

## 7. Anhang

---

In einer parallelen Konzentrationsreihe wurde die unspezifische Bindung von  $^3\text{H-QNB}$  in Gegenwart von  $1\ \mu\text{M}$  Atropin erfasst.

Nach der Inkubationszeit wurden den Ansätzen  $0,3\ \text{ml}$  Aliquots entnommen und wie oben beschrieben unter zweimaligem Nachspülen über GF/C-Filter abfiltriert.

### 7.2.3 Ergebnisse

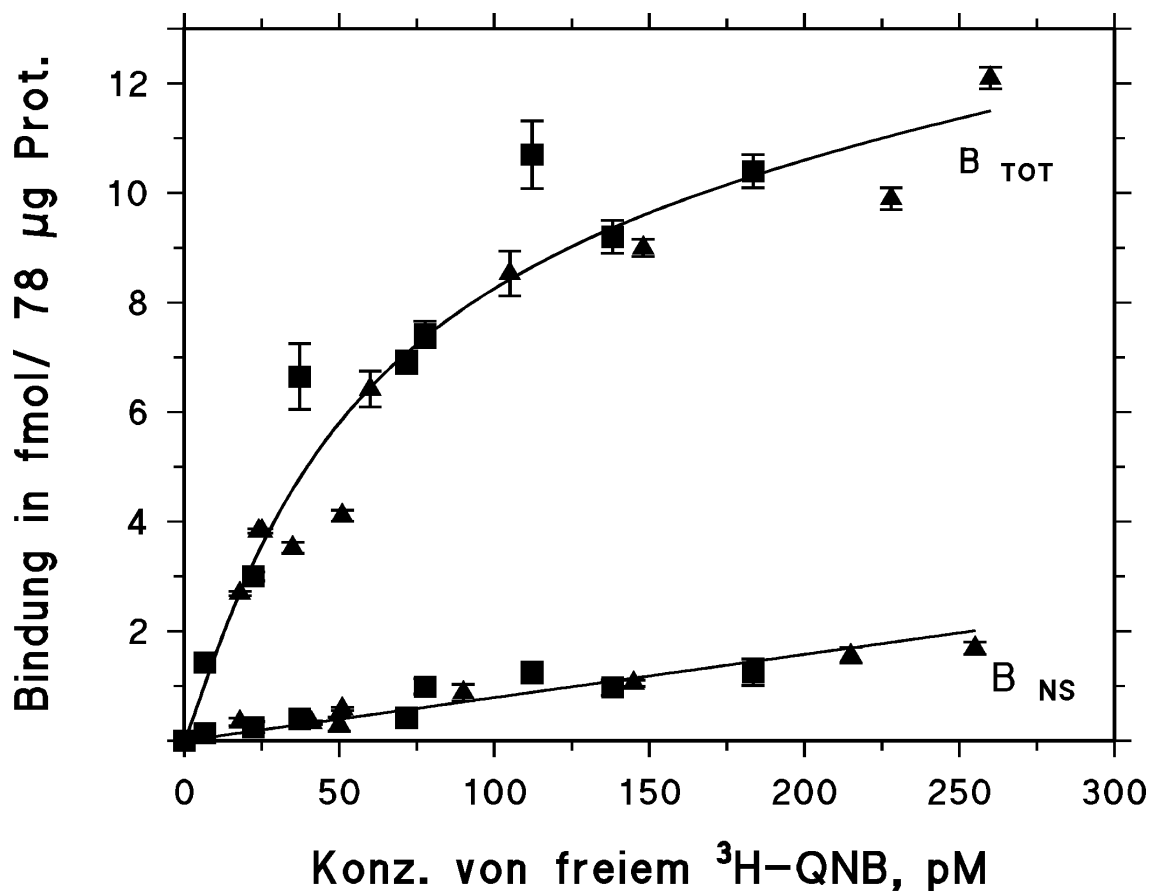
#### 7.2.3.1 Homologe Konkurrenz der $^3\text{H-QNB}$ -Bindung

Die homologe Konkurrenz der  $^3\text{H-QNB}$ -Bindung wurde in  $n = 2$  Versuchen bei einer Ligandenkonzentration von  $0,16\ \text{nM}$  und einer Proteinkonzentration von  $0,26\ \text{mg/ml}$  untersucht. Die totale Bindung  $B_{\text{TOT}}$  betrug beide Male  $\approx 13\ \text{fmol/mg}$ , die unspezifische Bindung, gemessen in Anwesenheit von  $1\ \mu\text{M}$  kaltem QNB, lag bei  $5\text{-}8\ %\ B_{\text{TOT}}$ . Bei Anpassung der Daten an Gl. 21a zeigte sich ein Hill-Koeffizient,  $n_{\text{H}}$ , der nahe bei 1 lag und auf einen monophasischen Prozess hindeutete; zur weiteren Auswertung wurde  $n_{\text{H}}$  gleich 1 gesetzt. Dadurch resultierten  $\text{IC}_{50}$ -Werte von  $143 \pm 13$  bzw.  $71 \pm 10\ \text{pM}$ , aus denen sich jedoch keine  $K_{\text{D}}$ -Werte berechnen liessen, da die Anwendung der Gl. 16 negative  $K_{\text{D}}$ -Werte lieferte. Eine Erklärung dafür liefert die Tatsache, dass der gebundene Anteil des Radioliganden in den Versuchen  $\approx 27\ %$  betrug und weit über den maximal zulässigen  $5\ %$  lag, was eine quantitative Auswertung nach Cheng-Prusoff nicht mehr zuließ und sich in unsinnigen negativen  $K_{\text{D}}$ -Werten äusserte. Um dennoch eine quantitative Aussage zu erhalten, hätte für weitere Konkurrenzexperimente die Ligandenkonzentration höher gewählt werden müssen.

#### 7.2.3.2 Sättigung der $^3\text{H-QNB}$ -Bindung

Zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten  $K_{\text{D}}$  von QNB an Rattenherzmembranen wurden  $n = 2$  Sättigungsexperimente durchgeführt (Abb. 7.4); dabei wurden beide Versuche ohne Mittelung zusammengefasst und mit Gl. 8 bzw. Gl. 22 ausgewertet. Die

unspezifische Bindung  $B_{NS}$  zeigte eine lineare Abhängigkeit mit einer Steigung von  $0,0079 \text{ fmol}/78\mu\text{g Protein}/\text{pM freiem } ^3\text{H-QNB}$ ; zum Erhalt der Bindungskonstanten  $K_L$  wurden die Daten für die  $B_{TOT}$ -Werte an Gl. 23 angepasst, in die obige Steigung eingesetzt wurde. Es zeigte sich ein Hill-Koeffizient von  $n=1,14 \pm 0,35$ , der unter Annahme eines einstufigen Bindungsverhaltens gleich 1 gesetzt wurde; damit konnte eine  $K_{D, QNB}$  von  $60 \pm 14 \text{ pM}$  erhalten werden. Die Gesamtzeptorenzahl  $R_0$  betrug  $11,8 \pm 1,0 \text{ fmol}/78 \mu\text{g Protein}$ , auf  $1 \text{ mg Protein}$  normiert bedeutet dies eine Rezeptordichte von  $151 \pm 13 \text{ fmol}/\text{mg Protein}$ .



**Abb. 7.4: Sättigung der <sup>3</sup>H-QNB-Bindung an Rattenherzmembranen.** Die Daten sind aus  $n = 2$  Einzelerperimenten zusammengefasst; einzelne Messpunkte sind Dreifachbestimmungen  $\pm$  SEM. Die totale Bindung zeigt einen anfangs hyperbolischen Verlauf, der zunehmend von der unspezifischen Bindung überlagert wird.

## 7. Anhang

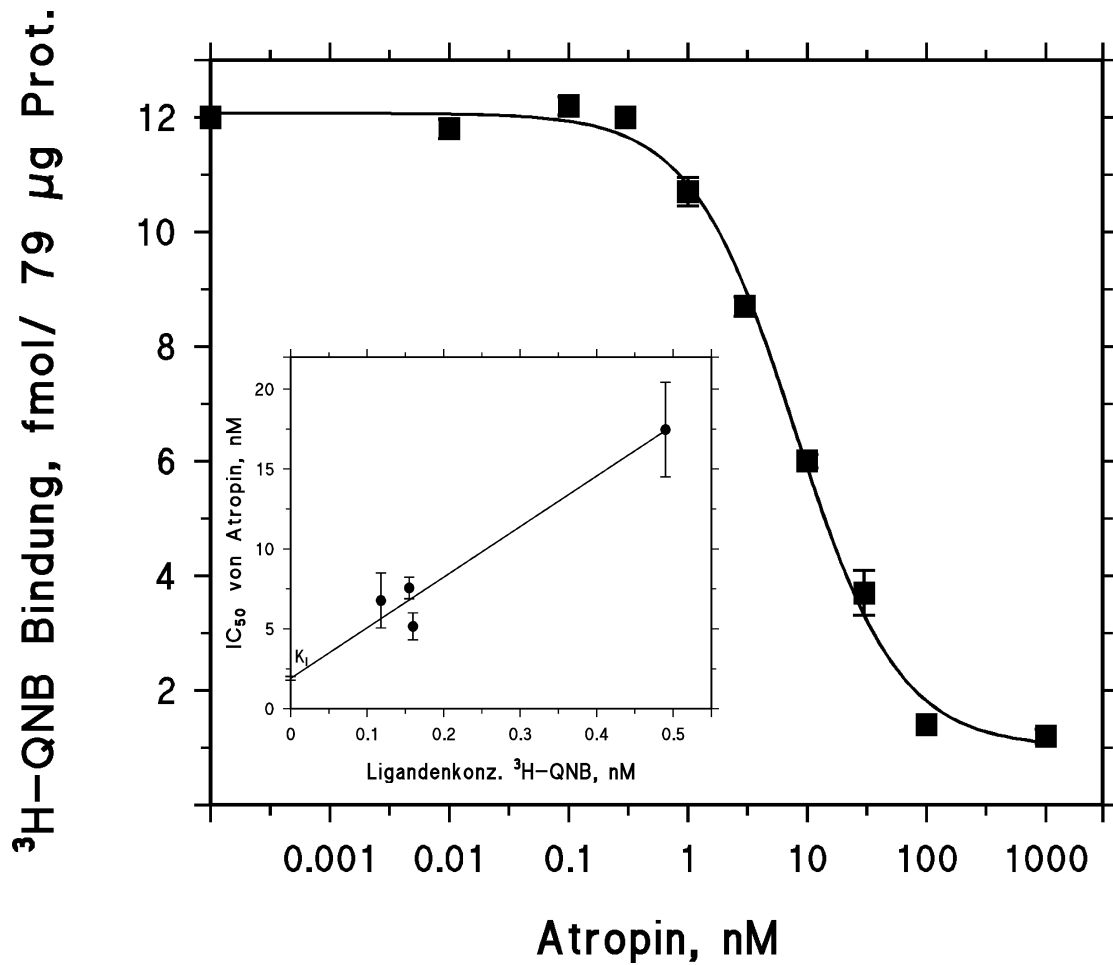
---

### 7.2.3.3 Heterologe Konkurrenz der $^3\text{H}$ -QNB-Bindung durch Atropin

Die Verdrängung der  $^3\text{H}$ -QNB durch Atropin wurde in  $n = 4$  Experimenten untersucht. Die mittlere Ligandenkonzentration betrug in  $n = 3$  Versuchen  $\approx 0,15 \pm 0,01$  nM, dabei wurde eine totale Bindung  $B_{\text{TOT}}$  von  $150 \pm 11$  fmol/mg Protein erhalten; abweichend dazu lag die Ligandenkonzentration in einem Versuch bei 0,49 nM, was mit einem höheren  $B_{\text{TOT}}$  (222 fmol/mg Protein) und gleichzeitig niedrigeren Anteil an gebundenem Radioliganden ( $< 5\%$ ) einher ging. Die unspezifische Bindung, gemessen in Anwesenheit von  $1 \mu\text{M}$  Atropin, bewegte sich zwischen 9 und 24 %  $B_{\text{TOT}}$ .

Die Auswertung der einzelnen Versuche unter Annahme eines monophasischen Verdrängungsvorganges mit Gl. 21a lieferte  $\text{IC}_{50}$ -Werte, die unter Einbeziehung der im Versuch vorliegenden Ligandenkonzentration und oben ermittelten Bindungskonstanten  $K_{\text{D}}$  von QNB mit Hilfe der Cheng-Prusoff-Gleichung (Gl. 14) in  $K_{\text{I}}$ -Werte umgerechnet wurden. Die Mittelung dieser  $K_{\text{I}}$ -Werte ergab eine mittlere Inhibitionskonstante der  $^3\text{H}$ -QNB-Bindung durch Atropin von  $\approx 1,9 \pm 0,2$  nM; ein typisches Experiment ist in Abb. 7.5 dargestellt.

Durch Auftragung der erhaltenen  $\text{IC}_{50}$ -Werte gegen die eingesetzte Ligandenkonzentration von  $^3\text{H}$ -QNB kann unter Kenntnis des  $K_{\text{D}}$ -Werts von  $^3\text{H}$ -QNB ebenfalls der  $K_{\text{I}}$ -Wert von Atropin erhalten werden (Gl. 15); dabei besitzt die resultierende Gerade den Ordinatenabschnitt  $K_{\text{I}}$ , der sich hier zu  $1,9 \pm 0,1$  nM errechnen liess und hervorragend mit dem gemittelten  $K_{\text{I}}$ -Wert übereinsimpte.



**Abb. 7.5: Typisches Einzelexperiment einer heterologen Verdrängung** der  $^3\text{H}$ -QNB-Bindung durch Atropin; einzelne Messpunkte sind Dreifachbestimmungen  $\pm$  SEM. Bei einer Ligandenkonzentration von 0,16 nM beträgt die  $\text{IC}_{50}$   $7,9 \pm 0,9$  nM, der Hill-Koeffizient ist gleich 1 gesetzt.

*Einschub:* Auftragung der  $\text{IC}_{50}$ -Werte gegen die Ligandenkonzentration von  $^3\text{H}$ -QNB. Die Gerade besitzt die Steigung  $K_I/K_L$  und den Ordinatenabschnitt  $K_I$ .

## 7. Anhang

---

### 7.2.4 Diskussion

Die Versuche zeigen, dass  $^3\text{H}$ -QNB in Rattenherzmembranen an eine homogene Klasse von Rezeptoren mit einer Bindungskonstanten von 60 pM bindet. Ähnliche Ergebnisse waren schon von Bindungsversuchen mit  $^3\text{H}$ -QNB an intakten Zellen von Hühnerherzen erhalten worden: dort wurde ebenfalls ein monophasischer Bindungsvorgang mit einem  $K_D$ -Wert von 14 pM beobachtet (Brown und Goldstein, 1986). Dieselben Autoren erhielten für die Verdrängung der  $^3\text{H}$ -QNB-Bindung durch Atropin einen  $K_I$ -Wert von 2,2 nM bei einem Hill-Koeffizienten von 1, was hervorragend mit den hier erhaltenen Ergebnissen übereinstimmt ( $K_{I, \text{Atropin}} 1,9 \pm 0,2$  nM).

Beim Vergleich von  $K_{L, \text{QNB}}$  mit  $K_{I, \text{Atropin}}$  erscheint QNB ein um einen Faktor 30 affinerer Ligand am muskarinischen ACh-Rezeptor als Atropin. Dabei muss man sich darüber im klaren sein, dass  $K_D$  und  $K_I$ -Werte nicht identisch sind und nur dann vergleichbare Grössen darstellen, wenn die Bindungsstelle des Kompetitors mit derjenigen des Radioliganden übereinstimmt. In diesem Falle wären negativ allosterische Wechselwirkungen zwischen Radioligand und Kompetitor ausgeschlossen und der Verdrängungsvorgang würde auf einer kompetitiven Hemmung beruhen. Die hier untersuchten m Cholinoantagonisten weisen beide ein ähnliches chemisches Gerüst auf (Abb. 7.3), so dass die Vermutung nahe liegt, dass beide Substanzen dieselbe Bindungsstelle am muskarinischen ACh-Rezeptor besetzen. Endgültige Klärung könnten Experimente liefern, in denen die Dissoziationskinetik des Radioliganden in Anwesenheit der Testsubstanz untersucht wird.

### 7.2.5 Verwendete Literatur

- BROWN, J. H. UND GOLDSTEIN, D. (1986): Analysis of cardiac muscarinic receptors recognized selectively by nonquaternary but not by quaternary ligands. *J Pharm Exp Therap* Vol. **238**, No.2, 580-6
- FORTH, W., HENSCHLER, D., RUMMEL, W. UND STARKE, K. (1996): *Allgemeine und spezielle Pharmakologie*, 7. Aufl., Spektrum Verlag, Heidelberg-Berlin-Oxford S.135-43



## **Dank**

Mein erster und ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. U. Quast. Er hat mir nicht nur einen ausgezeichnet eingerichteten Arbeitsplatz zur Verfügung gestellt, sondern auch ein interessantes Thema für die Doktorarbeit vermittelt, welches sich Dank der hervorragend etablierten Arbeitsmethode gut bearbeiten liess. Bei auftauchenden Schwierigkeiten war er stets zur Diskussion bereit und ermöglichte so eine intensive Betreuung meiner Doktorarbeit. Besonders bedanken möchte ich mich für die Unterstützung bei der Bewerbung um ein Stipendium des Interdisziplinären Zentrums für Klinische Forschung (IZKF) zur Förderung medizinischer Doktoranden, welches mir eine intensive Arbeit im Labor ermöglichte.

Mein Dank gilt weiterhin Herrn Professor Dr. H.-U. Häring für seinen Einsatz als Koreferent und die Übernahme des Zweitgutachtens meiner Arbeit.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich ausserdem bei Frau Dr. Annette Hambrock, welche mich in den Umgang mit Zellkulturen einführte, die Transfektion der HEK293-Zellen durchführte und mit ihrer Freundlichkeit und Hilfsbereitschaft für Motivation sorgte.

Herrn Dr. Ulrich Russ möchte ich für das Fotografieren der HEK293-Zellen und seine Hilfe bei der Arbeit im Labor danken.

Herrn Dr. Ferruh Artunc danke ich herzlich für die Unterstützung bei der Laborarbeit, seine Hilfe bei der Durchführung der Experimente, bei der Auswertung der Daten und für viele interessante, anregende und bereichernde Diskussionen.

Weiter gilt mein Dank den Computerspezialisten Tobias und Karl Zibold für ihre Geduld und unerschütterliche Unterstützung auf der Suche nach abgestürzten Daten. Dasselbe gilt für Michael Bulling, dem ich ausserdem ganz besonders herzlich für die Einweisung in den Umgang mit WORD und in das Erstellen des Layouts danke.



## Curriculum vitae

Name	Jutta Zibold
Geburtsdatum	12.03.1974
Geburtsort	Ludwigsburg
<i>Schulbildung</i>	
1980-1984	Hölderlinschule Asperg
1984-1993	Friedrich-List-Gymnasium Asperg
<i>Studium</i>	
Okt. 1993-Sept. 1994	Studium der Mathematik an der Universität Stuttgart
Seit Okt. 1994	Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen
Sept. 1996	Ärztliche Vorprüfung
Sept. 1997	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Okt. 1997	Beginn der Dissertation bei Prof. Dr. U. Quast am Pharmakologischen Institut der Universität Tübingen, Abteilung für Molekularpharmakologie; Titel: Charakterisierung des Bindungsverhaltens verschiedener Modulatoren der ATP-abhängigen K <sup>+</sup> -Kanäle (K <sub>ATP</sub> ) an den nativen vaskulären K <sub>ATP</sub> -Kanal und seine rekombinant exprimierte Untereinheit SUR2B
Okt.1998-März 1999	Urlaubssemester im Rahmen des Stipendiums des Interdisziplinären Zentrums für klinische Forschung (IZKF) zur Förderung medizinischer Doktoranden
März 2000	Beendigung der Dissertation
30.April 2002	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

