

**Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der
Universität Tübingen**

Direktor: Professor Dr. H. Oßwald

Abteilung Molekularpharmakologie

Abteilungsleiter: Professor Dr. U. Quast

**Modulation der Bindung von Sulfonylharnstoffen und
 K_{ATP} -Kanalöffnern an rekombinante
Sulfonylharnstoffrezeptoren durch Lipide**

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

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

**vorgelegt von
Alexander Thomas Klein
aus
Stuttgart**

2004

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. U. Quast

2. Berichterstatter: Professor Dr. E. Schleicher

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen und Trivialnamen	6
1. Einleitung.....	8
1.1. Ionenkanäle	8
1.2. Kaliumkanäle.....	9
1.3. K_{ATP} -Kanäle.....	11
1.4. Aufbau von K_{ATP} -Kanälen.....	12
1.4.1. Die α -Untereinheit $K_{IR6.x}$	13
1.4.2. Die β -Untereinheit SUR.....	14
1.4.3. Gewebsspezifische Verteilung der K_{ATP} -Untereinheiten.....	16
1.5. Physiologische und pathophysiologische Rolle von K_{ATP} - Kanälen.....	17
1.6. K_{ATP} -Kanal Krankheiten.....	18
1.6.1. PHHI (Persistent hyperinsulinaemic hypoglycaemia of infancy).....	18
1.6.2. Diabetes mellitus Typ 2 (NIDDM).....	19
1.7. Pharmakologie von K_{ATP} -Kanälen.....	20
1.7.1. Blocker des K_{ATP}	20
1.7.2. Öffner des K_{ATP}	24
1.8. Modulation von K_{ATP} -Kanälen	26
1.8.1. Modulation durch das Phospholipid PIP_2 und DOGS-NTA	26
1.8.2. Modulation durch Acyl-CoA.....	28
1.9. Fragestellung der Arbeit.....	29
2. Material und Methoden	31
2.1. Chemikalien.....	31
2.2. Puffer und Medien.....	32
2.3. HEK 293 - Zellen.....	35
2.3.1. Kultivierung von HEK 293 – Zellen.....	35
2.3.2. Transfektion.....	36
2.3.3. Einfrieren von HEK293-Zellen.....	36
2.3.4. Auftauen von HEK293-Zellen.....	37
2.3.5. Herstellung einer mikrosomalen Membranfraktion aus HEK293- Zellen	38
2.4. Proteinbestimmung	39
2.5. Radioligand - Bindungsexperimente.....	40
2.5.1. Wahl des Radioliganden:.....	41
2.5.2. Gewinnung von Rezeptormaterial:	43
2.5.3. Inkubation:.....	43
2.5.4. Trennung von gebundenem und freiem Radioliganden durch Filtration:.....	44
2.5.5. Messung der Radioaktivität:	44
2.6. Modell der Rezeptorbindungsstudien	45

2.6.1.	Kompetitionsexperiment.....	46
2.6.2.	Verallgemeinerung der Bindungsisotherme nach Hill.....	48
2.7.	Datenauswertung.....	49
2.7.1.	Analyse der Bindungskurven.....	49
2.8.	Statistik.....	50
3.	Ergebnisse.....	52
3.1.	Vorbereitende Messungen:.....	52
3.1.1.	Bestimmung der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_D und der Anzahl der Bindungsstellen B_{max} für die Bindung des Radioliganden 3H -P1075 an die SUR2 Subtypen durch homologe Verdrängung in Membranen von HEK293-Zellen.....	52
3.1.2.	Ultraschallbehandlung zur Inkorporation der Lipide und Fettsäuren in die Membran: Einfluss der Ultraschalldauer auf die Bindung.....	53
3.2.	Modulation der Radioligand Bindung an SUR2A.....	54
3.2.1.	Effekt von PIP_2 auf die 3H -P1075 Bindung an SUR2A in Membranen.....	54
3.2.2.	Effekt von DOGS-NTA auf die 3H -P1075 Bindung an SUR2A in Membranen.....	55
3.2.3.	Effekt von Oleoyl-CoA auf die 3H -P1075 Bindung an SUR2A in Membranen.....	58
3.2.4.	Effekt von Oleoyl-CoA auf die 3H -P1075 Bindung an SUR2A/Kir6.2 in Membranen.....	59
3.2.5.	Effekt von Malonyl-CoA und Oleat auf die 3H -P1075 Bindung an SUR2A in Membranen.....	62
3.2.6.	Modulation der 3H -GBC Bindung an SUR2A (Y1206S) in Membranen.....	63
3.2.6.1.	Effekt von DOGS-NTA auf die 3H -GBC Bindung an SUR2A (Y1206S) in Membranen.....	63
3.2.6.2.	Effekt von Oleoyl-CoA auf die 3H -GBC Bindung an SUR2A (Y1206S) in Membranen.....	65
3.3.	Effekt von Poly-D-Lysin auf die Lipid- und Fettsäurewirkungen..	67
3.3.1.	Wirkung von Poly-D-Lysin auf B_{TOT} , NSB und B_S für 3H -P1075 und 3H -GBC.....	67
3.3.2.	Effekt von Poly-D-Lysin auf die Modulation der 3H -P1075 Bindung durch DOGS-NTA gemessen an SUR2A.....	69
3.3.3.	Effekt von Poly-D-Lysin auf die Modulation der 3H -P1075 Bindung durch Oleoyl-CoA gemessen an SUR2A.....	69
3.3.4.	Effekt von Poly-D-Lysin auf die Modulation der 3H -GBC Bindung durch Oleoyl-CoA gemessen an SUR2A (Y1206S).....	70
3.4.	Modulation der 3H-P1075 Bindung an SUR2B.....	72
3.4.1.	Effekt von PIP_2 auf die 3H -P1075 Bindung an SUR2B in Membranen.....	72
3.4.2.	Effekt von DOGS-NTA auf die 3H -P1075 Bindung an SUR2B in Membranen.....	74

3.4.3.	Effekt von Oleoyl-CoA auf die ³ H-P1075 Bindung an SUR2B in Membranen	75
3.5.	Modulation der ³H-GBC Bindung an SUR1	76
3.5.1.	Effekt von DOGS-NTA auf die ³ H-GBC Bindung an SUR1 in Membranen	77
3.5.2.	Effekt von Oleoyl-CoA auf die ³ H-GBC Bindung an SUR1 in Membranen	78
4.	Diskussion	80
4.1.	Vorbemerkungen: Fragestellung und Übersicht über die Ergebnisse.....	80
4.1.1.	Fragestellung.....	80
4.1.2.	Übersicht über die Ergebnisse	82
4.2.	Stimulation der Ligandbindung durch Lipide.....	84
4.3.	Hemmung der Ligandbindung durch Lipide.....	86
4.3.1.	PIP ₂	86
4.3.2.	DOGS-NTA	86
4.3.3.	Oleoyl-CoA.....	87
4.4.	Abschließende Bemerkungen.....	89
5.	Zusammenfassung	90
6.	Literaturverzeichnis	92
	Danksagungen:.....	103
	Lebenslauf.....	104

Abkürzungen und Trivialnamen

^3H	Tritium (Isotop des Wasserstoffs)
a.demin.	demineralisiertes Wasser
ABC	ATP-Bindungs-Kassette (ATP-binding cassette)
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
AP	Aktionspotential
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
B_{MAX}	Maximale Bindungskapazität
B_{S}	Spezifische Bindung
BSA	Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumine)
B_{TOT}	Totale Bindung
cDNA	copyDNA , DNA Kopie eines RNA Stückes mithilfe der Reversen Transkriptase
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembran Regulator
Ci	Curie, Einheit der spezifischen Aktivität eines radioaktiven Stoffes
cpm	Zerfälle pro Minute (counts per minute)
DAG	Diacylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOGS-NTA	($\text{C}_{53}\text{H}_{100}\text{N}_5\text{O}_{13}$) 1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Succinat[N-(5-amino-1-carboxypentyl)iminodiessigsäure]] (Ammonium Salz) = synthetisches PIP_2 Analogon
dpm	Zerfälle pro Minute (decays per minute)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykol-bis(2-amino-ethylether)-N,N,N',N',-tetraacetat
E_{k}	Nernstsches Gleichgewichts-potential für Kalium
FBS	Fötales Rinderserum
fmol	femtomol (10^{-15} mol)
g	Gravitationsbeschleunigung (9.81 m/s^2)
GBC	Glibenclamid
GK	Glucosekinase
GLUT2	Glutamat-2-Rezeptor
HEK-293-Zellen	Menschliche embryonale Nierenzelllinie (Human Embryonal Kidney)
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-(2-ethansulfonsäure)
IC_{50}	Konzentration des kalten Liganden, welche die halbmaximale Bindung bewirkt [M]
IP_3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
k-	Dissoziations- geschwindigkeits- konstante
k+	Assoziations- geschwindigkeits- konstante
K_{ATP} -Kanal	ATP-empfindlicher Kaliumkanal
KCO	Kaliumkanalöffner (K channel opener)
K_{D}	Gleichgewichts- dissoziationskonstante
kDa	kilo-Dalton (relative Molekülmasse)
K_{IR} -Kanäle	einwärtsgerichtete Kaliumkanäle (inward rectifying)

Abkürzungen und Trivialnamen

K _v -Kanäle	spannungsabhängige Kaliumkanäle (voltage dependent)
L ₀	Konzentration des Radioliganden im Inkubationsansatz
LC-Acyl-CoA	Langkettige Acyl-Coenzym A Ester
M	Molarität (mol/l)
MDR	Multi-drug resistance
MEM	Minimum Essential Medium
MgADP	magnesium-gebundenes ADP
MgATP	magnesium-gebundenes ATP
MIDD	Maternally-inherited diabetes with deafness
mM	Millimolar (10 ⁻³ M)
MODY	Maturity-onset diabetes in the young
MWG	Massenwirkungsgesetz
NBF	Nukleotidbindungsfalte
n _H	Hill-Koeffizient
NIDDM	Not Insulin Dependant Diabetes Mellitus (Typ 2)
nM	nanomolar (10 ⁻⁹ M)
NSB	nichtspezifische Bindung
OD ₇₇₀	Optische Dichte (Extinktion) bei einer Wellenlänge von 770 nm
Oleoyl-CoA	Oleoyl-Coenzym A
P1075	N-Cyano-N'-(1,1-Dimethylpropyl)-N''-3-pyridylguanidin
pcDNA	Plasmidvektor der Firma Invitrogen (San Diego), der die cDNA des zu exprimierenden Proteins enthält
PHHI	Persistent hyperinsulinaemic hypoglycaemia of infancy
pIC ₅₀	negativer dekadischer Logarithmus der halbmaximalen Bindung eines Liganden, [-log M]
PIP ₂	(C ₄₇ H ₉₄ N ₃ O ₁₉ P ₃) L-α-Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PK	Proteinkonzentration
pK _D	negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstante
PLC	Phospholipase C
RMP	Ruhemembranpotential
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur (22 °C)
SA	Spezifische Aktivität
SEM	standard error of the mean
SU	Sulfonylharnstoffe (sulfonyl ureas)
SUR	Sulfonylharnstoffrezeptor
TMD	Transmembrandomäne
TMS	Transmembransegment
TNP-ATP	((2',3'-O-(2,4,6-trinitrophenylcyclo-hexadienylidene) adenosine 5'-triphosphate), fluorisierendes ATP-Analogon
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
VOOC	spannungsabhängiger Calciumkanal (voltage operated calcium channel)
μM	micromolar (10 ⁻⁶ M)

1. Einleitung

1.1. Ionenkanäle

Biologische Membranen sind eine sehr effiziente Diffusionsbarriere für Ionen. Der hydrophobe innere Bereich der Membran verhindert den Zugang von Ionen und ermöglicht damit das Aufrechterhalten von Ionengradienten zwischen Zytoplasma und Extrazellulärraum. Ionenkanäle sind integrale Membranproteine, die hydrophile Poren in der Lipiddoppelschicht der Zellmembran ausbilden und den Transport anorganischer Ionen wie Na^+ , K^+ , Ca^{2+} oder Cl^- zwischen Zytoplasma und Extrazellulärraum ermöglichen. Diese Ionenbewegung ist durch passive Diffusion entlang des elektrochemischen Gradienten gekennzeichnet und geht mit extrem hohen Leitungsgeschwindigkeiten von bis zu 10^9 Ionen / s pro Kanal einher, was sie von Transportern oder Pumpen unterscheidet.

Viele dieser Kanäle besitzen eine Ionenselektivität, d.h. sie sind nur für bestimmte Ionen durchgängig (z.B. für K^+ - Ionen bei Kalium-Kanälen). Die Selektivität wird zum einen durch die Größe des Ions mitsamt seiner Hydrathülle bestimmt, zum anderen durch Interaktionen des Ions mit bestimmten Aminosäureresten der Pore, welche dadurch als Selektivitätsfilter wirken, da sie eine Engstelle darstellen. Zur Passage muss ein Ion einen Großteil seiner Hydrathülle durch schwache Bindung an die Pore ersetzen. Da diese Ablösung der Hydrathülle für das Ion energetisch ungünstig ist, wird es den Kanal nur dann durchqueren, wenn die Bindung dies energetisch kompensiert (Hille, 1992; Doyle et al., 1998).

Die Öffnung von Ionenkanälen wird über verschiedene Reize geregelt: diese sind bei spannungsabhängigen Ionenkanälen Änderungen des Membranpotenzials, 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 (Hille, 1992; Süßbrich und Busch, 1998),

1. Einleitung

Ca^{2+} , IP_3 , Lipide wie PIP_2 , Fettsäuren wie Oleoyl-CoA, G-Proteine, pH und vieles mehr moduliert werden.

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

1.2. Kaliumkanäle

Kaliumkanäle kommen ubiquitär in erregbaren wie in unerregbaren Geweben vor und bestimmen mit ihrer hohen K^+ -Leitfähigkeit das Ruhemembranpotenzial (RP) der meisten Zellen. Das Nernst'sche Gleichgewichtspotenzial für K^+ , E_K , liegt bei ≈ -90 mV und somit auch das Ruhepotential der Zelle. Allerdings entfernt sich das RP durch geringe Einwärtsströme (Na^+ und Ca^{2+} -Influx, Cl^- -Efflux) vom E_K und bewegt sich gewebeabhängig zwischen -80 und -30 mV (Hille, 1992). Die Zelle depolarisiert durch Schließung von K^+ -Kanälen, da K^+ vermehrt in der Zelle bleibt, wodurch die Membranspannung auf -60 bis -40 mV abfällt. Das polarisierte Membranpotential ermöglicht es in erregbaren Geweben (Neuronen, Herzmuskelzellen) die Aktivierung spannungsabhängiger Na^+ oder Ca^{2+} Kanäle, die ein Aktionspotential (AP) auslösen. In Muskeln ist der Ca^{2+} -Einstrom mit einer Kontraktion assoziiert.

Eine Öffnung von K^+ -Kanälen bewirkt durch K^+ -Ausstrom eine Hyperpolarisation des Membranpotenzials in Richtung des Kalium-Gleichgewichtspotenzials E_K^+ , wodurch die Länge und Dauer von Aktionspotentialen verkürzt wird. Zudem wird das Ruhemembranpotenzial negativer, was die Auslösung weiterer Aktionspotenziale erschwert.

K^+ -kanäle bestehen aus α -Untereinheiten (z.B. K_{IR}), welche die Pore des Kanals formen und zumeist in Form eines Tetramers angeordnet sind (Hille, 1992; Doyle et al., 1998). Diese Grundeinheit wird häufig ergänzt durch weitere Untereinheiten (z.B. β , γ ..), welche für die Regulation der Kanalaktivität eine wichtige Rolle spielen (Hille, 1992; Quayle et al., 1997).

1. Einleitung

Aufgrund ihrer molekularen Struktur werden Kaliumkanäle in 3 verschiedene Klassen eingeteilt (s. Abbildung 1):

- einwärts gleichrichtende K^+ -Kanäle (K_{IR} -Kanäle, *inward rectifying*) (KCNJ)
- spannungsabhängige K^+ -Kanäle (K_V -Kanäle, *voltage dependent*) (z.B. KCNA, KCNH, KCNQ..)
- Tandem-Kanäle (K_{2P} -Kanäle) (KCNK)

Unter diesen bilden die spannungsabhängigen K^+ -Kanäle die größte Gruppe und weisen eine ausgeprägte Auswärtsgleichrichtung der K^+ -Leitfähigkeit auf. Dagegen sind die K_{IR} -Kanäle dadurch charakterisiert, dass sie das K^+ -Ion besser in die Zelle hinein als heraus leiten. Über die Zugehörigkeit zu einer der beiden Klassen entscheidet die Anzahl der α -helikalen Transmembransegmente der α -Untereinheit: diese enthalten bei K_{IR} -Kanälen zwei Transmembransegmente (M1 und M2), bei K_V -Kanäle dagegen sechs.

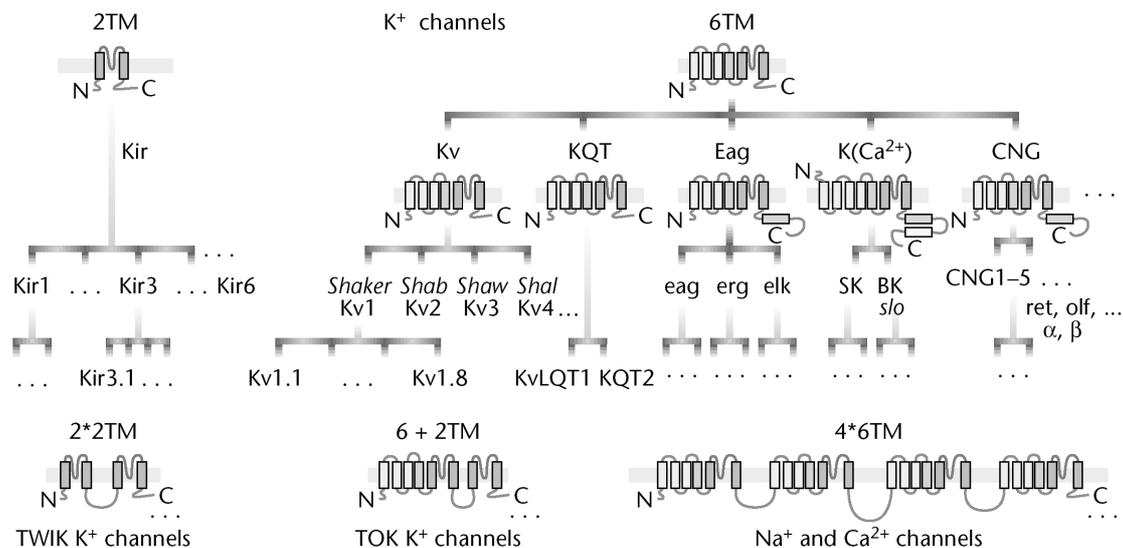


Abbildung 1: Übersicht über die Genfamilie der kaliumkanalformenden

Proteinuntereinheiten und damit verwandte Proteine; gezeigt sind nur die wichtigsten Mitglieder. Das Schema basiert auf Kaliumkanälen mit 2 und 6 Transmembransegmenten (2TM and 6TM), die weiteren kanalformenden Proteine haben sich wahrscheinlich durch Genduplikation oder Splicing entwickelt: 2*2TM (TWIK Kanäle), 6+2TM (TOK Kanäle), und 4*6TM (Natrium- und Calciumkanäle). Mehrere Vertreter der 2TM und 6TM Familie sind dargestellt; Punkte zeigen die vielen, durch den schnellen Fortschritt im Klonieren von Kanalgenen zu erwartenden Vertreter. (aus: Heinemann, 2001, modifiziert nach Wei et al., 1996)

1. Einleitung

Die Quartärstruktur des langsam aktivierenden I_{Ks} -Kanals, der zur K_V -Familie gehört, ist bis heute unbekannt. Es wurde jedoch gezeigt, dass dieser Kanal aus KvLQT1- und I_{sk} -Protein (für $I_{slow\ K\ a\ l\ i\ u\ m}$, Synonym: minK-Protein) zusammengesetzt ist. Mutationen im Gen, das für das KvLQT1-Protein kodiert, sind die Ursache für das vererbte QT-1-Syndrom (Wang et al., 1996).

Neben diesen beiden zuerst entdeckten Klassen von K^+ -Kanälen wurde inzwischen eine weitere Klasse gefunden: die Tandem oder K_{2P} -Kanäle. Bei ihnen sind in einer Untereinheit zwei Porenregionen hintereinander angeordnet, so dass für den vollständigen Kanal nur zwei Untereinheiten erforderlich sind. Als deren Vertreter wären die TOK1 (Two P-region-containing outwardly rectifying K⁺-channel) und die TWIK1-Kanäle (Tandem of P domains in a weak inward rectifying K⁺-channel) zu nennen, deren biologische Bedeutung unter anderem in der Aufrechterhaltung einer Hintergrundleitfähigkeit zu liegen scheint.

Innerhalb dieser drei strukturell unterscheidbaren Klassen der K_V -, K_{IR} - und K_{2P} -Kanäle wurden einige weitere Familien von Kalium-Kanälen entdeckt, welche sich durch ihre spezielle Kanalphysiologie unterscheiden. So zeigen beispielsweise HERG-Kanäle im Herzen strukturelle Verwandtschaft zu den K_V -Kanälen wie auch die Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Kanäle (K_{Ca}), die neben der Spannungsabhängigkeit durch erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentrationen aktiviert werden. Weiterhin gibt es als Unterform der Klasse der K_{IR} -Kanäle die ATP-gesteuerten K^+ -Kanäle (K_{ATP} -Kanäle).

1.3. K_{ATP} -Kanäle

Noma entdeckte das Vorhandensein von ATP-abhängigen K^+ -Kanälen (K_{ATP}) im Herzmuskel (Noma, 1983). Später stellte sich heraus, dass dieser Kanaltyp auch in vielen anderen Geweben wie z.B. im Pankreas (Cook und Hales, 1984), in Skelett- und glatter Muskulatur, in Neuronen und im Nierenepithel auftritt (Ashcroft und Ashcroft, 1992; Edwards und Weston, 1994; Quast, 1996).

Ihre wichtigste Eigenschaft ist die Nukleotidempfindlichkeit: durch das intrazelluläre Energiesubstrat ATP wird ihre Aktivität gehemmt; gibt man sie in

1. Einleitung

ATP-freies Medium, so erhöht dies wiederum ihre Offenwahrscheinlichkeit und somit die Aktivität. Weiterhin reagieren sie auch auf das ATP-Abbauprodukt MgADP bzw. auf zytoplasmatische Magnesiumnukleosiddiphosphate (MgNDP), die, im Gegensatz zu ATP, eine Kanalöffnung bewirken. Im Zellgefüge wird die Aktivität von K_{ATP} -Kanälen maßgeblich durch das Verhältnis von ATP zu NDP bestimmt, das den metabolischen Zustand der Zelle widerspiegelt. Durch diese Nukleotidempfindlichkeit verbinden die K_{ATP} -Kanäle den metabolischen Zustand der Zelle mit der elektrischen Aktivität der Plasmamembran und können dadurch die Zelle in Stresssituationen schützen, wie z.B. durch Verkürzung des Aktionspotentials im Herzen während einer Ischämie (Nichols und Lederer, 1991).

Weitere Kanaleigenschaften sind Spannungsunabhängigkeit und eine schwache Einwärtsgleichrichtung der K^+ -Leitfähigkeit.

K_{ATP} -Kanäle stellen therapeutische Angriffspunkte von Pharmaka dar, die z.B. bei Diabetes mellitus Typ II und Hypertonie eingesetzt werden. Dabei fördert die Inhibition des Kanals durch orale Antidiabetika wie die Sulfonylharnstoffe die Insulinsekretion aus pankreatischen β -Zellen (s. folgendes Kapitel). Öffnung von K_{ATP} -Kanälen der glatten Gefäßmuskeln bewirkt eine starke Vasorelaxation, was den Einsatz der sogenannten K^+ -Kanalöffner als Antihypertensiva erklärt. Darüber hinaus weisen tierexperimentelle Ansätze darauf hin, dass K^+ -Kanalöffner das Myokard vor Ischämie schützen können (Szewczyk und Marbán, 1999).

1.4. Aufbau von K_{ATP} -Kanälen

K_{ATP} -Kanäle sind Heteromultimere aus α - und β -Untereinheiten, wobei jede Untereinheit alleine exprimiert keinen aktiven K_{ATP} -Kanal ausbildet (Aguilar-Bryan et al., 1995; Inagaki et al., 1995; Sakura et al., 1995; Clement IV et al., 1997). Verantwortlich hierfür ist ein Retentionsmotiv, welches den alleinigen Einbau der $K_{IR6.x}$ Untereinheiten in die Membran verhindert. (Zerangue et al., 1999). Werden beide Untereinheiten exprimiert, setzen sie sich mit einer 4:4 Stöchiometrie zusammen: dabei sind 4 α und 4 β -Untereinheiten am Aufbau

1. Einleitung

K⁺-Selektivität bestimmt. Die Subtypen K_{IR}6.1 oder 6.2 (welche in ihrer Aminosäuresequenz zu 70% übereinstimmen; Inagaki et al., 1997) zeigen einen Selektivitätsfilter mit der Sequenz Gly-Phe-Gly anstelle des häufiger in anderen K_{IR}-Kanälen vorkommenden Gly-Tyr-Gly (Inagaki et al., 1995).

Das humane Gen für K_{IR}6.1 (KCNJ8) konnte auf Chromosom 12, Position 12p11.23 lokalisiert werden (nahe dem Gen für SUR2), ist ca. 9.7 kb lang und besitzt 3 Exons. Das daraus entstehende Protein (ca. 38 kDa) zeigt eine 98%ige Homologie zu murinem K_{IR}6.1 und umfasst 424 Aminosäuren. K_{IR}6.1 kann mit den β -Untereinheiten SUR1 (Ämmälä et al., 1996) und SUR2B funktionelle Kanäle ausbilden (Aguilar-Bryan et al., 1998); ob die Kombination mit SUR2A funktionelle Kanäle ergibt ist noch unklar (Babenko et al., 1998; Liu et al., 2001b). K_{IR}6.1 enthaltende Kanäle sind nur sehr schwach ATP empfindlich und haben eine unitäre Leitfähigkeit von ≈ 30 pS,

K_{IR}6.2 (syn. BIR), dessen intronloses Gen auf dem kurzen Arm von Chromosom 11 liegt (in der Nähe von SUR1), ist 390 Aminosäuren lang. K_{IR}6.2 kann mit allen drei Isoformen des SURs funktionelle K_{ATP}-Kanäle ausbilden (Inagaki et al., 1996, Isomoto et al., 1996). K_{IR}6.2 enthaltende Kanäle sind sehr ATP-empfindlich (K_i \sim 15-30 μ M) und haben eine unitäre Leitfähigkeit von \sim 80 pS (140 mM K⁺). Tucker et al., 1997b konnten zeigen, dass K_{IR}6.2-Kanäle, bei denen die 36 C-terminalen Aminosäuren entfernt wurden (K_{IR}6.2 Δ C36), durchaus in der Lage waren, bei alleiniger Expression K⁺-Ströme zu erzeugen; dies liegt daran, dass bei diesem Rumpfkanal das Retentionsmotiv R-K-R mit abgeschnitten wurde. Gleiches gilt für K_{IR} Δ C26. Beide Kanäle sind daher wichtige Werkzeuge, um die Pharmakologie des Kir6.2 zu studieren. Tucker et al., 1997b konnten zum Beispiel zeigen, dass der Block der K_{IR}6.2 / SUR-Kanäle durch ATP an der Bindung von ATP an K_{IR}6.2 liegt.

1.4.2. Die β -Untereinheit SUR

Die β -Untereinheit ist der sogenannte Sulfonylharnstoffrezeptor (SUR), welcher für das komplexe Regulationsverhalten der K_{ATP}-Kanäle verantwortlich ist. Er wurde erstmals aus der β -Zelle des Pankreas kloniert (Aguilar-Bryan et al., 1995). Inzwischen wurden 2 Subtypen, SUR1 und SUR2 identifiziert (Inagaki et

1. Einleitung

al., 1996; Isomoto et al., 1996), deren Gene auf Chromosom 11 (p15.1) und Chromosom 12 (11.23) liegen (Chutkow et al., 1996). Für SUR1 (1581 Aminosäuren) kodieren 39 Exons, für SUR2 (1549 AS) dagegen nur 38 Exons. Durch alternatives Spleißen wird SUR2 noch in SUR2A und SUR2B unterschieden.

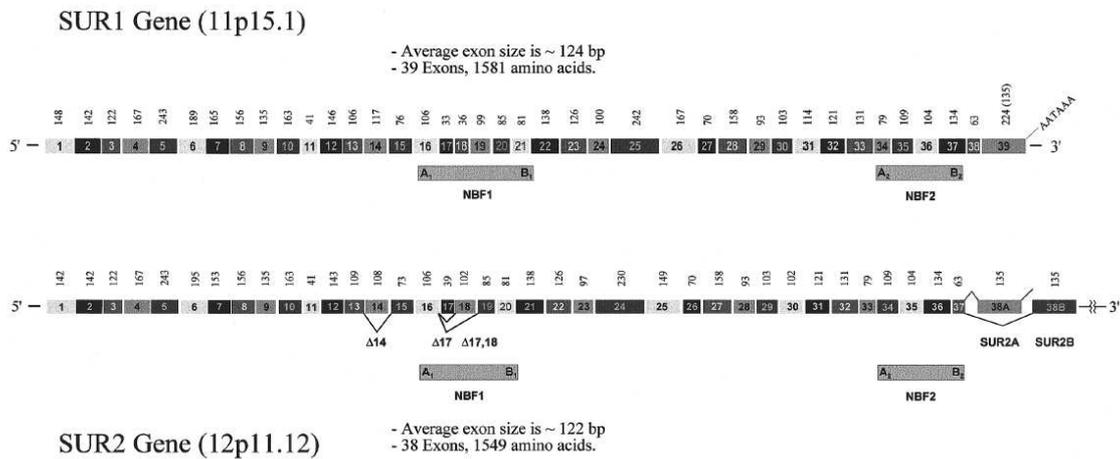


Abbildung 3: schematische Darstellung des humanen SUR1 und SUR2 Gens Intron-Exon Übergänge und Exongröße sind sehr ähnlich. SUR1 hat 39 Exons, SUR2 38. Der Unterschied resultiert aus der Entfernung des 18ten Exons von SUR1 aus dem SUR2 Gen (die für eine Sequenz in der NBF1 kodiert). SUR2A und SUR2B unterscheiden sich in ihren letzten 42 Aminosäuren durch die unterschiedliche Benutzung der 2 terminalen Exons (aus Aguilar-Bryan et al., 1998)

Sie vermittelten die pharmakologischen Effekte der Öffner, wie P1075 und der Schließer, wie der Sulfonylharnstoffe, was ihnen den Namen gab. Nach Hydrophathie-Analysen (Tusnády et al., 1997) besitzt SUR 3 Transmembran-Domänen (TMD 0-2) mit 5+6+6 Transmembranhelices (TM) sowie zwei intrazellulär gelegene Nukleotidbindungsfalten (NBF1 und 2). Dabei ist die NBF 1 nach 11 TM-Helices (=TMD0 + TMD1) angeordnet, es folgen 6 weitere TM-Helices (=TMD2) bis zur zweiten NBF, der C-Terminus ist wieder intrazellulär (s. Abbildung 2). In den NBF sind hoch konservierte Walker A- und B-Motive enthalten, die ATP binden können. Walker A umfasst die Sequenz -Gly-X-X-Gly-X-Gly-Lys-Ser/Thr-, wobei X eine beliebige AS ist. Hierbei ist das Lys wichtig für die Koordination der negativen Ladung am γ -Phosphat des ATP. Das Walker B-Motiv beinhaltet die Sequenz -Y-Y-Y-Y-Asp-, wobei Y eine hydrophobe AS darstellt (Walker et al., 1982). Hierbei koordiniert das Asp das Mg^{2+} im Mg^{2+} -Nukleotid-Komplex.

1. Einleitung

Mit dieser Struktur lässt sich SUR den ATP-Binding-Cassette-Proteinen zuordnen, zu der auch unter anderem der CFTR (cystic fibrosis transconductance regulator) und die MDR-Proteine (multi drug resistance proteins) gehören. Weitere Proteine, die in diese Kategorie gehören sind, HlyB, OppD, Hsl, Malk und viele mehr.

Ein weiteres Charakteristikum der ABC-Proteine ist ihre ATPase-Aktivität, an die häufig ein Transportvorgang gekoppelt ist. Auch für die SUR-Subtypen ist eine schwache ATPase Aktivität nachgewiesen, die v.a. im NBF2 lokalisiert ist (Bienengraeber et al., 2000; Matsuo et al., 2000) und die die Steuerung der Kanalaktivität kontrolliert (Zingman et al., 2001).

1.4.3. Gewebsspezifische Verteilung der K_{ATP} -Untereinheiten

Wie elektrophysiologische Messungen gezeigt haben koppeln die SUR Subtypen mit $K_{IR6.1}$ und $K_{IR6.2}$ zu unterschiedlichen Kanalkonstrukten. Dies bildet somit die Grundlage der Gewebsdiversität der K_{ATP} -Kanäle und erklärt deren verschiedene Eigenschaften in den einzelnen Geweben (s. **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** und Tabelle 1). Für die SUR2 Subtypen wurde auch die Wxistenz von „Mischkanälen“ der Form $(K_{IR6.1})_x (K_{IR6.2})_{4-x}$ und $(SUR2)_4$ gezeigt (Cui et al., 2001; Pountney et al., 2001).

	Glibenclamid, K_i (nM)	Öffner	Vorkommen	Referenzen
$K_{IR6.1} / SUR2B$	42 nM	Pinacidil Nicorandil	Gefäßmuskulatur, K_{NDP}	Russ et al., 1999; Yamada et al., 1997
$K_{IR6.2} / SUR1$	~1 nM	Diazoxid Pinacidil	β -Zellen, Pankreas Neurone	Inagaki et al., 1995; Gribble et al., 1997a
$K_{IR6.2} / SUR2A$	26 nM	Cromakalim Pinacidil Nicorandil	Herz- und Skelettmuskel	Russ et al., 2001; Inagaki et al., 1996; Okuyama et al., 1998
$K_{IR6.2} / SUR2B$	27 nM	Diazoxid Pinacidil	glatte Muskulatur	Russ et al., 2001; Isomoto et al., 1996

Tabelle 1: Kombinationen der Untereinheiten und deren Vorkommen, GBC gemessen in inside-out Patches bei 22°C

1.5. Physiologische und pathophysiologische Rolle von K_{ATP} – Kanälen

Durch ihre Empfindlichkeit auf ATP und ADP stellen K_{ATP} -Kanäle eine Verbindung zwischen dem metabolischen Zustand und dem Membranpotential der Zelle her. Dies ist eine einzigartige Eigenschaft, die die K_{ATP} -Kanäle zum Beispiel befähigt, in den β -Zellen des Pankreas eine Schlüsselrolle bei der Insulinsekretion einzunehmen:

In der β -Zelle wird das Ruhemembranpotential (RP) durch die Aktivität der K_{ATP} -Kanäle bestimmt und liegt bei ca. -70 mV. Dabei sind die spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanäle (L-VOCC = voltage operated calcium channel) noch geschlossen. Der

postprandiale Anstieg des Blutglucosespiegel führt, nach der Glucoseaufnahme durch den Transporter GLUT2 (a), zu einer gesteigerten intrazellulären ATP-Synthese aus ADP, wobei das ADP / ATP-Verhältnis zu ATP hin verschoben wird (b). Dies bewirkt eine K_{ATP} -Kanalblockierung, wodurch die Zelle depolarisiert (c) und sich die spannungsabhängige

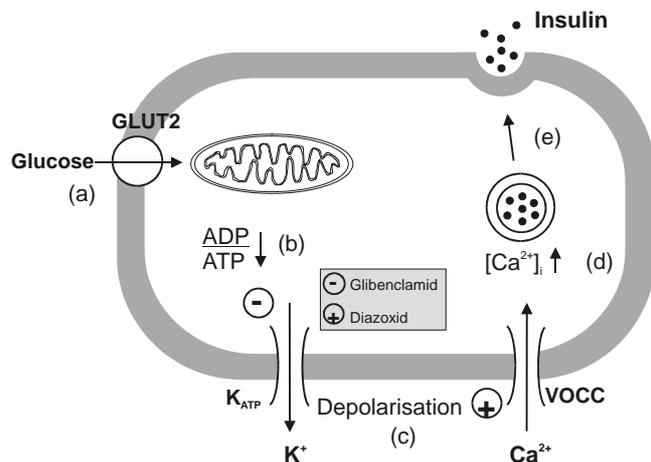


Abbildung 4: Modell der Insulinfreisetzung in den β -Zellen des Pankreas. (Konsensusmodell nach Cook und Hales, 1984) Aus Quast DMW 2002 (freundlicherweise überlassen von Conny Walz)

Ca^{2+} -Kanäle öffnen (d). Der resultierende Ca^{2+} -Einstrom wiederum löst die Exozytose von Insulinvesikeln aus (e) (s. Abbildung 4).

Bei Energiemangel der Zelle verbrauchen sich die intrazellulären ATP-Reserven und das ATP/ADP Verhältnis wird in Richtung ADP verschoben, wodurch sich die K_{ATP} -Kanäle öffnen. Dies treibt das RP in Richtung E_K , wobei die Zelle hyperpolarisiert wird und sich von der Aktivierungsschwelle der spannungsabhängigen Ionenkanäle entfernt. Somit wird die Zelle weniger erregbar und kann Energie einsparen. Dieser Mechanismus schützt z.B. das Myokard vor hypoxischen Schäden: unter Hypoxie öffnen sich die K_{ATP} -Kanäle

1. Einleitung

und wirken dadurch negativ inotrop. Ebenfalls zytoprotektiv wirkt die K_{ATP} -Kanalöffnung in Neuronen und Skelettmuskeln im Falle der Hypoxie bzw. Ischämie. In glatten Gefäßmuskeln sind K_{ATP} -Kanäle wichtige Determinanten des Gefäßtonus, da ihre Öffnung zur Vasorelaxation führt.

In der Niere sind K_{ATP} -Kanäle der juxtaglomerulären Zellen (umgewandelte glatte Gefäßmuskelzellen) an der Regulation der Reninsekretion beteiligt. Im Tubulusepithel sind sie an die Aktivität der Na^+ / K^+ -ATPase gekoppelt und spielen eine wichtige Rolle bei der Ionenrückresorption.

Die innere Membran von Mitochondrien enthält ebenfalls K_{ATP} -Kanäle (mito K_{ATP}) die an der Kaliumhomöostase beteiligt sein sollen, die einerseits das mitochondriale Volumen und andererseits den Protonengradienten aufrechterhält (Szewczyk et al., 1997). Bei kardialer Ischämie werden sie durch Adenosin via Proteinkinase C geöffnet und sind wesentliche Mediatoren des kardialen Preconditioning. Dies ist ein Mechanismus, bei dem kurze ischämische Perioden die Myozyten für eine anschließende längere Hypoxie resistent machen (Szewczyk und Marbán, 1999).

1.6. K_{ATP} -Kanal Krankheiten

1.6.1. PHHI (Persistent hyperinsulinaemic hypoglycaemia of infancy)

Pathophysiologische Relevanz erlangen K_{ATP} -Kanäle zum Beispiel bei der persistierenden hyperinsulinämischen Hypoglykämie im Kindesalter (PHHI). Diese wird verursacht durch rezessiv vererbte Mutationen im pankreatischen K_{ATP} -Kanal, die einen Verlust der Kanalöffnung bewirken. Das RP dieser Zellen ist ständig depolarisiert und liegt bei -35 mV, so dass die gesteigerte L-Typ Ca^{2+} -Kanalaktivität die Insulinsekretion erhöht und die Blutglukosekonzentration absenkt (Aguilar-Bryan und Bryan, 1996).

Ätiologisch wurden sowohl familiär vererbte als auch sporadisch auftretende Formen der Krankheit identifiziert. Die familiär vererbte Form der PHHI kommt in Nordeuropa nur zu ca. 1 zu 50000 Fällen vor, jedoch liegt die Wahrscheinlichkeit in Finnland und in Saudi Arabien bei ca. 1 von 2700 der

1. Einleitung

Geburten. Betroffene Patienten zeigen schon kurz nach der Geburt schwere Hypoglycämien, welche durch konstante Insulinfreisetzung, trotz niedrigen Blutglucosekonzentrationen, verursacht werden. Wird die Krankheit nicht rechtzeitig erkannt, so drohen durch die Hypoglycämien irreversible Gehirnschäden. Die bisherige Therapie besteht in der subtotalen Pankreatektomie (Cook und Bryan, 1998).

Das für PHHI verantwortliche Gen liegt auf Chromosom 11p14-15.1 (Thomas et al., 1995) wo auch die Gene für SUR1, SUR2 und $K_{IR6.2}$ lokalisiert sind. Daher gibt es Mutationen der verschiedenen Untereinheiten, die alle die PHHI verursachen können, wobei die des SUR1 am häufigsten ist. Die Mutationen kann man anhand der funktionellen Folgen in zwei Klassen aufteilen:

- a) totaler Verlust der Kanalaktivität durch Wegfall eines Phenylalanins an Position 1388 ($\Delta F1388$), sowie eine V187N-Mutation in der finnischen Abstammung (Otonkoski et al., 1999; Shyng et al., 1998; {Shyng & Nichols 1998 1867 /id}).
- b) Beeinträchtigte Regulation der Kanalaktivität bei erhaltenem inhibitorischen Effekt von ATP (Nichols et al., 1996; Shyng et al., 1998). Diese Mutationen verhindern die Fähigkeit des Kanals, auf metabolische Änderungen adäquat zu reagieren und verursachen somit eine dauerhafte Schließung des Kanals in den β -Zellen (Aguilar-Bryan und Bryan, 1999; Ashcroft und Gribble, 1999)

1.6.2. Diabetes mellitus Typ 2 (NIDDM)

Eine weitere Erkrankung, in der K_{ATP} -Kanäle eine pathophysiologische Rolle spielen, ist der Nichtinsulinabhängige Diabetes Mellitus (NIDDM, Typ 2 Diabetes). Diese Erkrankung ist multifaktoriell bedingt und macht sich unter anderem durch Insulinresistenz und nachlassende B-Zellfunktion bemerkbar. Zu den Faktoren, die zur genetischen Prädisposition beitragen, gehören unter anderem auch Mutationen am K_{ATP} -Kanal der B-Zelle, der ja die Insulinsekretion an den Blutzuckerspiegel koppelt.

1. Einleitung

Im SUR1-Gen wurden einige Polymorphismen beschrieben, für die eine Assoziation mit NIDDM berichtet wurde, jedoch führen diese Mutationen nicht zu funktionellen Änderungen des Kanals (Meirhaeghe et al., 2001; 't Hart et al., 1999).

Im Kir6.2 Gen wurde ein Polymorphismus gefunden, bei dem im Codon 23 Glu durch Lys ersetzt ist ($E^{23}K$) (s. Abb. 5) (Hansen et al., 1997). Bei Kaukasiern tritt der Basenaustausch mit einer Häufigkeit von 36 % auf, so dass die Häufigkeit für KK Homozygoten 13% beträgt. Wie eine Analyse der UKPDS Studie durch Gloyn et al., 2001 zeigte, sind die KK-Homozygoten für den $E^{23}K$ -Polymorphismus signifikant häufiger unter den Typ 2 Diabetikern zu finden als in der normoglykämischen Vergleichsgruppe.; die

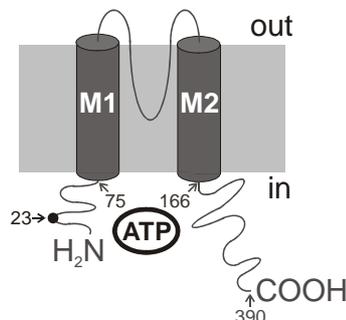


Abb. 5: Lage der Mutation $E^{23}K$ in der Nähe des Aminoterminus von Kir6.2. Nach Quast 2002 (freundlicherweise überlassen von Conny Walz)

Wahrscheinlichkeit dieser Assoziation konnte jetzt durch Schwanstecher et al., 2002 mit $p < 4 \times 10^{-6}$ angegeben werden.

Schwanstecher et al., 2002 zeigten, dass der $E^{23}K$ Polymorphismus im Kir6.2 zu einer leichten Hyperaktivität des Kanals führt, wodurch dieser eine erhöhte Offenwahrscheinlichkeit zeigt und sich schlechter durch ATP schließen lässt. Diese um den Faktor 2.3 geringere Empfindlichkeit für das blockierende ATP erhöht die Schwellenkonzentration, bei der Insulin ausgeschüttet wird und könnte so zum Diabetes Typ 2 beitragen.

1.7. Pharmakologie von K_{ATP} -Kanälen

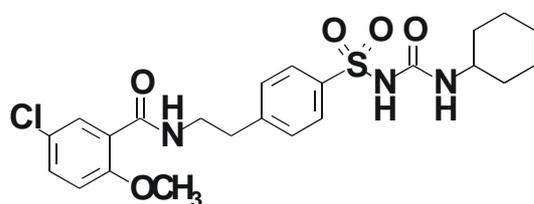
1.7.1. Blocker des K_{ATP}

Zu den klassischen Blockern des K_{ATP} -Kanals zählen die Sulfonylharnstoffe, wie Tolbutamid und Glibenclamid, die auch namensgebend für die β -Untereinheit SUR (Sulfonylharnstoffrezeptor) sind. Als weitere chemische Gruppe kommen die Benzoesäurederivate, wie Meglitinid oder Repaglinid hinzu. Die Sulfonylharnstoffe werden in die kurzkettige Erst- (z.B. Tolbutamid) und

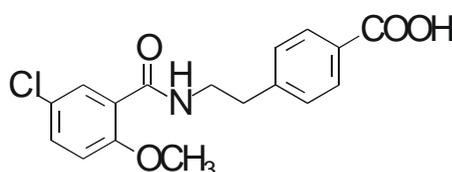
1. Einleitung

langkettige Zweitgenerationsabkömmlinge (z.B. Glibenclamid [GBC]) eingeteilt, wobei letztere zusätzlich eine Benzamidogruppe besitzen (s. Abbildung 6) und daher beide chemischen Klassen repräsentieren. Die Sulfonylharnstoffe fördern durch die Blockade der K_{ATP} -Kanäle die Insulinfreisetzung (s. Kap. 1.5) und werden daher mit Erfolg in der Behandlung des Typ2 Diabetes eingesetzt.

Beide Strukturklassen entfalten ihre kanalhemmende Wirkung über Hochaffinitätsbindungsstellen auf der β -Untereinheit SUR. Außerdem ist in der Literatur eine Hemmung durch niederaffine Bindung der Substanzen an die α -Untereinheit $K_{IR6.2}$ beschrieben, die sich jedoch erst in sehr hohen Konzentrationen auswirkt (Gribble et al., 1998b; Gros et al., 1999).



Glibenclamid (GBC)



Meglitinid

Abbildung 6: Strukturformeln von K_{ATP} -Blockern

Früher wurden die Sulfonylharnstoff-Empfindlichkeit zur Einteilung der SUR-Isoformen herangezogen und so unterschied man Hochaffinitäts- und Niederaffinitäts-SUR. Zu den Erstgenannten gehört der in pankreatischen β -Zellen vorkommende SUR1, dessen Bindungskonstante K_D in Radioligandstudien mit ³H-GBC an nativen β -Zellen 0.3-7 nM (Schwanstecher et al., 1992; Ashcroft und Ashcroft, 1992), in SUR1-transfizierten HEK293-Zellen \approx 5-7 nM betrug (Ämmälä et al., 1996; Hambrock et al., 2002a; Hambrock et al., 2002b); die IC_{50} des Kanalblocks lag im nativen wie auch im rekombinanten System <10 nM (Babenko et al., 1998). Die IC_{50} der Inhibition

1. Einleitung

des pankreatischen Kanals durch Tolbutamid betrug wenige μM (Ämmälä et al., 1996; Gribble et al., 1998).

Die SUR2-Isoformen werden traditionell als Niederaffinitäts-SUR bezeichnet. Neuere Radioligandbindungsstudien haben jedoch gezeigt, dass GBC mit einer $K_D \sim 30 \text{ nM}$ an SUR2A (Stephan und Quast, persönliche Mitteilung) und SUR2B bindet (Löffler-Walz et al., 2002). In elektrophysiologischen Experimenten hemmt GBC die $K_{\text{IR}6.2} / \text{SUR}2\text{x}$ -Kanäle mit IC_{50} -Werten um die 30 nM , wobei jedoch je nach den experimentalen Bedingungen (Präsenz von Nukleotiden, patch-clamp Konfiguration) auch abweichende Werte erhalten wurden (Gribble et al., 1998b, Okuyama et al., 1998, Beech et al., 1993, Russ et al., 1999, Russ et al., 2001; Zusammenfassung in der Habilitationsarbeit von Dr. U. Ruß, Inst. für Pharmakologie u. Toxikologie der Universität Tübingen).

Wie man in Abbildung 7 erkennen kann, bindet Glibenclamid hochaffin an zwei benachbarte Bindungsstellen an SUR1, einer Sulfonylharnstoff- und einer Benzamidbindungsstelle; bei Sur2A interagiert Glibenclamid hingegen nur mit der Benzamidbindungsstelle. Dies erklärt den langanhaltenden Block bei SUR1/ $K_{\text{IR}6.2}$ Kanälen durch GBC (Ashfield et al., 1999).

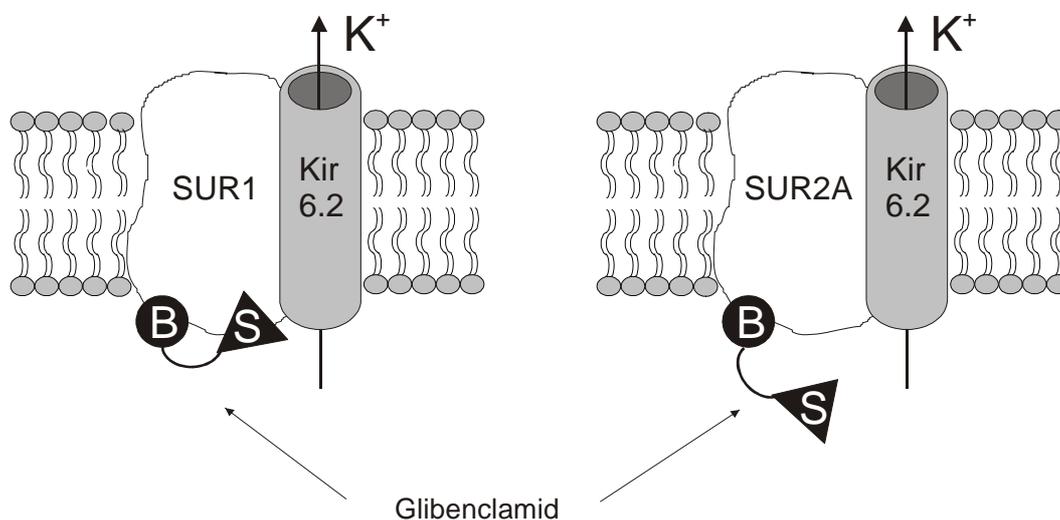


Abbildung 7: Modell der Bindungsstellen an SUR1 und SUR2A (nach Ashcroft und Gribble, 1999). Dargestellt ist das Bindungsverhalten der Hybridsubstanz GBC, dessen Benzamidogruppe durch einen Kreis (●), und dessen Sulphonylharnstoffgruppe durch ein Dreieck (▲) symbolisiert ist. Zur Vereinfachung ist der K_{ATP} -Kanal unvollständig mit jeweils nur einer α - und β -Untereinheit abgebildet.

Bis heute ist man sich allerdings nicht sicher, wie durch die Bindung der Sulfonylharnstoffe die K_{ATP} -Kanäle gehemmt werden. Am wahrscheinlichsten

1. Einleitung

erscheinen Wechselwirkungen mit der Aktion von ADP und ATP an den NBF. Ansätze dafür lieferte die Beobachtung, dass die Hemmung von rekombinanten SUR1/K_{IR}6.2-Kanälen durch die SU wie auch durch Meglitinid in Gegenwart von physiologischen Konzentrationen von MgADP verstärkt wurden, was auf einer Aufhebung der stimulatorischen Wirkung von MgADP zurückgeführt wurde, so dass die inhibitorischen Wirkung an K_{IR}6.2 übrig blieb (Gribble et al., 1997b). Die unterschiedliche Wirkung der Nukleotide auf die Bindung von GBC an die verschiedenen SUR-Subtypen und die Hemmung der K_{IR}6.2 / SURx Kanäle wurde jetzt von Hambrock et al., 2002a und Reimann et al., 2003 aufgeklärt.

Zur Klärung der Stöchiometrie der GBC-Hemmung wurden sowohl die Bindung als auch Elektrophysiologie an rekombinanten SUR1/K_{IR}6.2 und SUR2B/K_{IR}6.2-Kanälen studiert (Dörschner et al., 1999). Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse wurden durch einen tetrameren Aufbau der K_{ATP}-Kanäle gedeutet, wobei hierbei die Bindung eines GBC-Moleküls ausreicht, um einen Kanalblock herbeizuführen (Dörschner et al., 1999).

Im Gegensatz dazu zeigten Russ et al., 1999, dass die elektrophysiologische Hemmkonstante von GBC an SUR2B/K_{IR}6.1-Kanälen im Vergleich zu dessen Bindungskonstanten um einen Faktor 5-6 nach rechts verschoben war. Somit folgerten sie, dass 4 Moleküle GBC für einen Kanalblock erforderlich sind.

Medizinisch werden K_{ATP}-Blocker in der Behandlung des Diabetes mellitus Typ II eingesetzt, wobei bei noch erhaltener Inselzellfunktion eine Steigerung der Insulinsekretion erreicht wird. Aufgrund der höheren Affinität zu SUR1 sind die Wirkungen von Tolbutamid und Glibenclamid vornehmlich auf die β -Zellen beschränkt (Gribble et al., 1998b). Da GBC ja, wie oben besprochen, auch andere K_{ATP}-Kanäle inhibieren kann, sind Arzneimittelnebenwirkungen durchaus denkbar. Allerdings liegt der therapeutische Blutspiegel von Glibenclamid zwischen 1-10 nM (Matsuda et al., 1983; Coppack et al., 1990; Leibowitz und Cerasi, 1996) und somit unterhalb den publizierten IC₅₀-Werten von 27nM für SUR2A/K_{IR}6.2-Kanäle (Gribble et al., 1998b, Russ et al., 2001) und 40-100 nM für NDP-abhängige K_{ATP}-Kanäle in Gefäßen (Beech et al., 1993, Russ et al., 1997,)

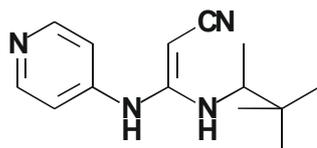
1. Einleitung

Umstritten ist die Frage, ob die Langzeitbehandlung mit dem am häufigsten eingesetzten Glibenclamid schädliche Auswirkungen auf das Herz hat. Bisher sind dazu aus klinischen Studien keine sicheren Aussagen möglich (Smits und Thien, 1995; Leibowitz und Cerasi, 1996), während die groß angelegte UKPDS-Studie von keinen Nebenwirkungen berichtet. Zu den unerwünschten Wirkungen auf das Herz könnte die Hemmung der kardioprotektiven Öffnung von K_{ATP} -Kanälen in der frühen Ischämie, aber auch die Erhöhung des Koronarwiderstands durch Hemmung von glattmuskulären K_{ATP} -Kanälen beitragen.

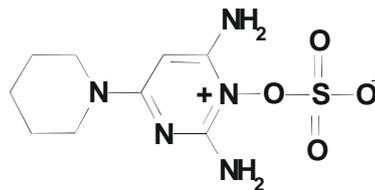
1.7.2. Öffner des K_{ATP}

Die K_{ATP} -Kanal Öffner (KCO, K^+ channel opener) sind chemisch gesehen eine heterogene Gruppe zu der unter anderem folgenden Vertreter gehören (s. auch Abbildung 8):

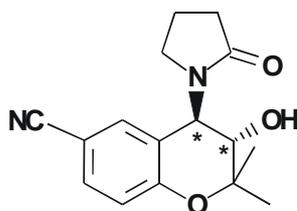
- Zyanoguanidine (Pinacidil und P1075)
- Benzpyrane (Levcromakalim)
- Benzothiadiazin (Diazoxid)
- Pyrimidin (Minoxidilsulfat, das als Pro-Drug Minoxidil verabreicht wird)



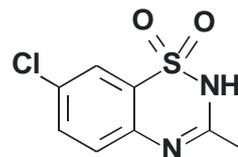
P1075



Minoxidilsulfat



Cromakalim



Diazoxid

Abbildung 8: Strukturformeln von K_{ATP} -Öffnern

1. Einleitung

Da die oben genannten Substanzen unter physiologischen ATP-Konzentrationen selektiv am vaskulären K_{ATP} -Kanal (SUR2B/ $K_{IR6.1}$) wirken, werden einige in der Medizin als Antihypertensiva in refraktären Fällen eingesetzt (Diazoxid, Minoxidil, Pinazidil sind hierfür zugelassen). Diazoxid besitzt außerdem noch die Eigenschaft, den K_{ATP} -Kanal der β -Zellen zu öffnen, was den therapeutischen Einsatz bei Hyperinsulinämie infolge eines Insulinoms ermöglicht. Außerdem versucht man durch gezielte Hemmung der Übererregbarkeit der Bronchialmuskulatur, Therapeutika zur Behandlung des Asthma Bronchiale zu entwickeln oder mit Öffnern, die Selektivität für den Urogenitaltrakt zeigen, Therapeutika für die Inkontinenz zu entwickeln. (Buchheit et al., 2002; Coghlan, et al. 2001)

Die Bindungsstelle der Öffner befindet sich ebenfalls auf der β -Untereinheit des K_{ATP} -Kanals, dem SUR (Hambrock et al., 1998; Schwanstecher et al., 1998); dabei benötigen alle Öffner zur hochaffinen Bindung und Kanalöffnung die Anwesenheit von hydrolysierbarem Mg^{2+} - gebundenem ATP (Quast et al., 1993; Dickinson et al., 1997; Löffler und Quast, 1997; Schwanstecher et al., 1998, Russ et al., im Druck, BJP).

Wie man durch Punktmutationen im Walker A-Motiv oder in Verbindungsbereichen der beiden NBFs zeigen konnte, wird die Aktivierung der hochaffinen Öffnerbindung mittels MgATP durch diese Mutationen aufgehoben. Daran erkennt man, dass beide NBFs im nativen SUR für die hochaffine Bindung und Wirkung der Öffner erforderlich sind. Höchstwahrscheinlich führt die Bindung und/oder die Hydrolyse von MgATP an beiden NBF 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 am SUR, 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., 1992, 1998, Löffler-Walz et al., 2002, Russ et al., im Druck, BJP).

Wie Hambrock et al., 1999 zeigen konnten, bewirken Varianten in den 42 C-terminalen Aminosäuren eine 4-5 fach niedrigere Affinität für die Öffnerbindung

an SUR2A im Vergleich zur Bindung an SUR2B. Dies zeigt, dass neben dem C-Terminus auch der restliche Anteil von SUR die Affinität beeinflusst (Schwanstecher et al., 1998).

Uhde et al., 1999 konnten zwei Regionen der TM-Domäne 2 von SUR2B identifizieren, die für die hochaffine Bindung von P1075 verantwortlich sind. Beide Regionen befinden sich am SUR2B in intrazellären Schleifen und bilden dabei Bindungstaschen für P1075 aus. Tauscht man die korrespondierenden Aminosäuren auf SUR1 aus, kann man die Affinität für P1075 in den submikromolaren Bereich steigern.

In ähnlicher Weise konnte die Bindungsstelle des Benzopyrans Levromakalim ebenfalls auf der TM-Domäne 2 von SUR2A lokalisiert werden (D'hahan et al., 1999, 2001). Austausch dieser Domäne durch den entsprechenden Bereich von SUR1 hob die Wirkung von Levromakalim auf.

Für die Diazoxidinteraktion konnte keine strenge Verbindung zu einer bestimmten Domäne hergestellt werden. Unterschiede in der Wirksamkeit von Diazoxid bei K_{ATP} -Kanälen mit SUR1 oder SUR2A als β -Untereinheit, könnten demnach auf unterschiedlicher Signaltransduktion von der Bindung hin zur Kanalöffnung beruhen. Dies wird durch Bindungsstudien an rekombinanten SUR1 und SUR2A unterstützt, die für Diazoxid ähnliche K_i -Werte ergaben (Hambrock et al., 1999; Schwanstecher et al., 1998, Russ et al., BJP, im Druck).

1.8. Modulation von K_{ATP} -Kanälen

1.8.1. Modulation durch das Phospholipid PIP_2 und DOGS-NTA

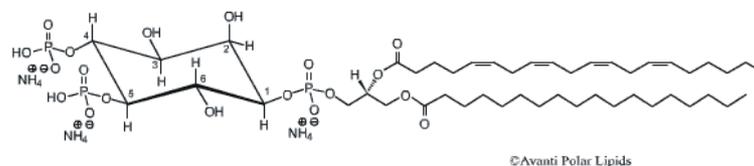
Phosphatidyl-Inositol-Bisphosphat (PIP_2) (s. Abbildung 9) ist ein Phospholipid mit einer stark anionischen Inositol-Kopfgruppe, das ein Membranbestandteil der Zelle ist und in der Signalverarbeitung eine wichtige Rolle spielt. Durch die G-Protein-aktivierte Phospholipase C (PLC) wird PIP_2 in DAG und IP_3 gespalten, die weitere Überträger in der Signaltransduktion darstellen und verschiedene

1. Einleitung

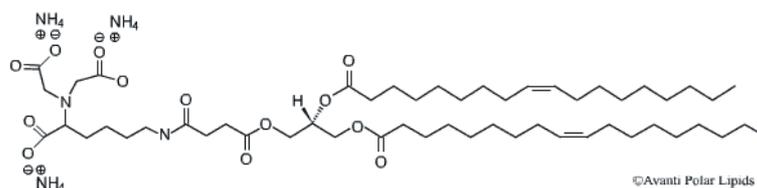
Stoffwechselprozesse in der Zelle schalten (Proteinkinase C, Ca^{2+} Efflux aus dem SR/ER etc).

In elektrophysiologischen Messungen an inside-out-patches wurden große Schwankungen der ATP-Empfindlichkeit des K_{ATP} -Kanals an kardialen Myozyten (Faktor 60!!) beobachtet (Findlay and Faivre, 1991). Später stellte sich heraus, dass PIP_2 auch an der Modulation der K_{ATP} -Kanäle beteiligt ist, indem es die Offenwahrscheinlichkeit erhöht (Furukawa et al., 1996, Hilgemann und Ball, 1996; Fan und Makielski, 1999) und indem die ATP Sensitivität erniedrigt wird (Baukrowitz et al., 1998; Shyng und Nichols, 1998; Fan und Makielski, 1999, Baukrowitz und Fakler, 2000). Der PIP_2 -Gehalt der Membran ändert sich mit der PLC Aktivität, die ihrerseits durch Neurotransmitter und Hormone gesteuert wird. Dadurch wird die ATP-Empfindlichkeit und damit der „Arbeitspunkt“ des Kanals moduliert (Baukrowitz et al., 1998).

MacGregor et al., 2002 konnten mit dem fluoreszieren ATP Analogon TNP-ATP (2',3'-O-(2,4,6-trinitrophenylcyclo-hexadienyliden) adenosin 5'-triphosphat) eine direkten Kompetition von ATP und PIP_2 um die ATP Bindungsstelle am COOH Terminus des K_{ATP} -Kanals zeigen, was die modulatorische Wirkung von PIP_2 erklären könnte.



PI(4,5)P₂



DOGS-NTA

Abbildung 9: chemische Struktur von Phosphatidyl-Inositol-Bisphosphat (**PIP₂**) und 1,2-Dioleoyl-*sn*-Glycero-3-Succinat [N-(5-Amino-1-Carboxypentyl)Imino-di-Essigsäure] (**DOGS-NTA**)

Weiterhin ist bekannt, dass die negative Ladung eine Rolle spielt (Wirkung von $\text{PIP}_3 > \text{PIP}_2 = \text{PIP} > \text{PI}$), wobei Versuche mit IP_3 zeigten (IP_3 blieb ohne Wirkung),

1. Einleitung

dass auch die Acylkette des PIP_2 an der Interaktion beteiligt ist und die negative Ladung alleine nicht ausreicht (Baukrowitz et al., 1998, Shyng und Nichols, 1998, MacGregor et al., 2002). Über den gleichen Mechanismus könnte auch das synthetische Peptid DOGS-NTA wirken, das eine negative Nitrilotriessigsäure (NTA) – Gruppe und zwei Acylketten besitzt und welches sich experimentell wie PIP_2 verhält (Krauter et al., 2001).

Krauter et al., 2001 untersuchten in ihrer Arbeit den Einfluss von PIP_2 und DOGS-NTA auf die Sulfonylharnstoff Empfindlichkeit der K_{ATP} -Kanäle. Dabei konnten sie zeigen, dass der Effekt der Lipide auf die ATP- (Baukrowitz et al., 1998; Shyng and Nichols, 1998; Fan 1999) und GBC-Wirkung am K_{ATP} -Kanal unterschiedlicher Natur sind. Die ATP-Hemmkurve wurde durch PIP_2 kompetitiv nach rechts hin zu höheren ATP-Konzentrationen verschoben, wobei sich auch der IC_{50} -Wert erhöhte (Baukrowitz et al., 1998). Die GBC-Hemmkurve hingegen verändert sich nicht-kompetitiv, d.h., es erhöhte sich die Anzahl der GBC-unempfindlichen Kanäle, wodurch sich das Maximum der durch Glibenclamid erreichbaren Hemmung, also die maximale Amplitude der GBC-Hemmkurve, verringerte; die IC_{50} (=16nM) der restlichen GBC-empfindlichen Kanäle blieb aber nahezu unverändert. Da die GBC-Hemmkurve, im Gegensatz zur ATP-Hemmkurve (allmählicher Shift zu höheren Konzentrationen), in einer „alle oder nichts“ Weise verändert wird, deutet dies auf einen allosterischen Mechanismus hin; der Kanal liegt in zwei Zuständen vor: GBC-empfindlich oder (nach PIP_2) – unempfindlich (Krauter et al., 2001).

Koster et al., 1999 haben einen vergleichbaren allosterischen Mechanismus für die Aufhebung der Öffnerwirkung (z.B. Diazoxid, P1075) gefunden, der durch Krauter et al. 2001 bestätigt wurde.

1.8.2. Modulation durch Acyl-CoA

Langkettige Acyl-Coenzym A Ester (LC-Acyl-CoA) werden aus Fettsäuren synthetisiert und dienen dem Herzen als Hauptstoffwechselsubstrat. Liu et al., 2001a beschreiben in Ihrem Artikel einen direkten Effekt von langkettigen Acyl-CoA-Estern auf die K_{ATP} – Aktivität in Herzmuskelzellen. Diese Erkenntnis

1. Einleitung

könnte ein Schlüsselmechanismus in der Regulation der K_{ATP} -Kanalaktivität des Herzens sein.

Liu et al., 2001a fanden eine Aktivierung der K_{ATP} – Kanäle durch LC-Acyl-CoA, die um ein Vielfaches höher war als in den pankreatischen β -Zellen (Bränström et al., 1997). Da die LC-Acyl-CoA aber an der K_{IR} -Untereinheit ansetzen (Bränström et al., 1998; Gribble et al., 1998a) und diese in beiden Fällen dieselbe ($K_{IR6.2}$) ist, muss man schließen, dass der SUR Subtyp den Effekt der LC-Acyl-CoA auf den $K_{IR6.2}$ moduliert.

Wie auch PIP_2 reduzieren die LC-Acyl-CoA die ATP Sensitivität, wodurch sich die Offenwahrscheinlichkeit des K_{ATP} -Kanals erhöht und sie verhindern beide die Inhibition der K_{ATP} -Kanäle durch Sulfonylharnstoffe. Allerdings unterscheiden sich PIP_2 und LC-Acyl-CoA dadurch, dass sich die LC-Acyl-CoA Wirkung nicht durch Ca^{2+} beeinflussen lässt, LC-Acyl-CoA schneller wirken und LC-Acyl-CoA nur K_{ATP} -Kanäle beeinflussen und nicht wie PIP_2 auch andere einwärts-gleichrichtende Kanäle (Liu et al., 2001a).

1.9. Fragestellung der Arbeit

Die Fragestellung dieser Arbeit beruht auf den Befunden von Krauter et al., 2001 und Liu et al., 2001a, die in Kapitel 1.8 ausführlicher dargestellt wurden. Die Autoren hatten gefunden, dass PIP_2 , DOGS-NTA und Oleoyl-CoA nicht nur die Kanalhemmung durch ATP aufheben, sondern dass Lipid-modifizierte $K_{IR6.2}/SUR2A$ - bzw. native Herzkanäle auch nicht mehr durch GBC geschlossen werden können. Krauter et al., fanden, dass der (funktionelle) Antagonismus zwischen Lipid und Glibenclamid am Kanal nichtkompetitiv ist, und sie bemerkten auch, dass Lipid-modifizierte $K_{IR6.2}/SUR2A$ -Kanäle nach Hemmung durch ATP in sehr hoher Konzentration nicht mehr durch P1075 geöffnet werden konnten.

Die Aufhebung der ATP Wirkung am $K_{IR6.2}$ durch die Lipide beruht auf deren Wechselwirkung mit der K_{IR} -Untereinheit (Kapitel 1.7, Fan und Makielski, 1999, Huang et al., 1998, Gribble et al., 1998a). Der Mechanismus der Lipidhemmung

1. Einleitung

auf die Wirkung der synthetischen Kanalmodulatoren (die ja am SUR ansetzen) ist hingegen nicht klar. Zwei Mechanismen sind denkbar:

- (a) Die Kanalmodulatoren setzen weiterhin unverändert am SUR an und ändern dessen Konformation; die vom Lipid modifizierte Pore ($K_{IR6.2}$) ist jedoch refraktär gegenüber der Konformationsänderung des SUR.
- (b) Das Lipid setzt am SUR an und verhindert so die Bindung und/oder die Signaltransduktion im SUR.

Um wenigstens teilweise zwischen diesen beiden Modellen unterscheiden zu können, wurde in Radioligandbindungsexperimenten untersucht, ob die Lipide PIP_2 , DOGS-NTA und Oleoyl-CoA die Bindung des Öffners 3H -P1075 und des Schließers 3H -GBC an die SUR-Subtypen beeinflussen. Im positiven Falle sollte insbesondere abgeklärt werden, ob

- (1) es Unterschiede in den drei Lipiden bezüglich ihrer Wirkung gibt,
- (2) die Bindung des Öffners und des Schließers ähnlich beeinflusst werden,
- (3) SUR-Subtyp-spezifische Effekte auftreten und ob
- (4) Koexpression mit $K_{IR6.2}$ die Lipideffekte verändert.

Die Radioligandbindungsexperimente wurden unter Standardbedingungen (0.3mM ATP, 1mM Mg^{2+} , 37 °C) in Membranen aus mit SUR stabil transfizierten HEK-Zelllinien durchgeführt.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien

Zur Herstellung von Konzentrationsreihen wurden von den Substanzen zunächst Stammlösungen in verschiedenen Konzentrationen hergestellt. Als Lösungsmittel wurde Inkubationspuffer, Ethanol/DMSO (1:1) oder DMSO verwendet. Für die weitere Verdünnung der jeweiligen Stammlösung zur Herstellung von Konzentrationsreihen wurden dieselben Lösungsmittel verwendet.

Die Aufbewahrung der Stammlösungen erfolgte bei -30°C.

ATP-Na ₂	605.20	g/mol	Boehringer Mannheim
CuSO ₄	159.60	g/mol	Merck
DMSO	1	l	Merck
DOGS-NTA (C ₅₃ H ₁₀₀ N ₅ O ₁₃) 1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Succinyl[N-(5-Amino-1-Carboxypentyl)Imino-Diessigsäure] (Ammonium Salz) 18:1	1015.4	g/mol	Avanti Polar Lipids
EDTA-Na ₂	372.24	g/mol	Fluka
EGTA	380.40	g/mol	Sigma
Ethanol 99% p.a.	500	ml	Merck
Geneticinsulfat	692.70	g/mol	GibcoBRL–Life Technologies
Gentamycin	50	mg/ml	GibcoBRL–Life Technologies
Glibenclamid	494.00	g/mol	Sigma
HEPES	238.30	g/mol	Sigma
HCl	25	%	Fluka
³ H–Glibenclamid	47-52	Ci/mmol	PerkinElmer Life Science
³ H-P1075	117-121	Ci/mmol	Amersham Buchler
KCl	74.56	g/mol	Merck
K ⁺ /Na ⁺ -Tartrat	282.23	g/mol	Merck

2. Material und Methoden

Lipofektamin			Invitrogen
Malonyl Coenzym A	853.6	g/mol	Sigma
NaCl	58.44	g/mol	Merck
Na ₂ CO ₃	105.99	g/mol	Merck
NaOH	40.00	g/mol	Merck
Oleoyl Coenzym A	1162.2	g/mol	ICN
Oleat 99%	282.5	g/mol	Sigma
Optimem 1			Life Technologies
P1075	231.30	g/mol	Leo Pharmaceuticals
PIP ₂ (C ₄₇ H ₉₄ N ₃ O ₁₉ P ₃)	~1044	g/mol	Sigma
<small>L-α-Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat</small>			
Poly-D-Lysin	30000 - 70000	g/mol	Sigma
TRIS	121.14	g/mol	Fluka
Ultima Gold LLT	2.50	l	Packard

2.2. Puffer und Medien

Alle Puffer wurden im Kühlraum (6°C) gelagert.

Puffer 1: Hypotoner Puffer für die Präparation von HEK293-Zellmembranen

10 mM	HEPES
1 mM	EGTA

Die Substanzen wurden in Aqua 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 2: Isotoner Bindungspuffer für HEK293-Zellmembranen

5 mM	HEPES
139 mM	NaCl
5 mM	KCl

Von diesem Puffer 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 Aqua demin. gelöst,

2. Material und Methoden

entweder im Kühlraum (6°C) über Nacht abgekühlt oder im Wasserbad (37°C) erwärmt und der pH-Wert bei 0°C (auf Eis) bzw. bei 37°C mit NaOH (1 M) auf 7.4 eingestellt.

Puffer 3: Puffer zur Herstellung von Geneticin – Aliquots

100 mM HEPES

Die Substanz wurde in Aqua demin. gelöst, und der pH-Wert bei Raumtemperatur mit NaOH (1 M) auf 7.3 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung bei 4 bar und 121 °C eine Stunde autoklaviert.

Waschpuffer: zum Stoppen der Inkubation und Waschen des Filters

50 mM Tris

154 mM NaCl

Als Lösungsmittel für die Substanzen diente Aqua 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 °C) mit HCl auf pH 7.4.

Hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum (FCS): Serumzusatz zum Zellkulturmedium

Für die Kultivierung der HEK-293-Zellen wurde dem Kulturmedium hitzeinaktiviertes FCS zugesetzt, welches zum Wachstum erforderliche mitogene Faktoren enthält.

Um eine Restaktivität von Serumproteasen auszuschließen, wurde das FCS durch Erhitzen auf 55°C im Wasserbad (1 Stunde) hitzeinaktiviert. Zur weiteren Verwendung wurde das FCS im Kühlschrank gelagert.

Kulturmedium für die HEK 293 - Zelllinie

MEM (Minimum Essential Medium)	90%
hitzeinaktiviertes FCS	10 %
Gentamycin	20 µg/ml

2. Material und Methoden

Es wurde jeweils eine Flasche MEM (500 ml) frisch angesetzt und zur weiteren Verwendung im Kühlschrank gelagert. Gentamycin wurde in 6 ml-Stammlösungen vorbereitet (2 mg/ml), bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt und bei der Herstellung des Kulturmediums zugegeben (Endkonzentration $c = 4 \cdot 10^{-5}$ mg/ml).

Geneticin

Zur Selektion der Zellen, die das Plasmid aufgenommen haben, wurde Geneticin, ein Aminoglykosid – Antibiotikum, welches auch auf eukaryontische Zellen toxisch wirkt, zugegeben.

30 mg/ml Geneticinsulfat

Die Substanz wurde in sterilem Puffer 3 gelöst, in 1 ml Eppendorf-Gefäßen aliquotiert und im Kühlschrank bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

Gefriermedium: Kryokonservierung von HEK 293-Zellen

Jeweils frisch angesetzt:

Gefriermedium A MEM mit 40 % (v/v) FCS

Gefriermedium B MEM mit 20 % (v/v) DMSO

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

Stammlösungen für die Proteinbestimmung

Lowry A:

2 % (w/v) Na_2CO_3 in 0.1 M NaOH
bidest.

Lowry B:

1 % (w/v) CuSO_4 in Aqua

Lowry C:

2 % (w/v) K^+/Na^+ -Tartrat in Aqua bidest.
(2 M)

Lowry D:

Folin-Ciocalteu-Reagenz

Lowry A - C wurden als Stammlösungen hergestellt und bei Raumtemperatur aufbewahrt. Lowry D wurde fertig erworben (Fluka).

2. Material und Methoden

Lowry E:

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

(wobei die Reihenfolge A-C-B der Zugabe einzuhalten ist, um ein Ausflocken zu vermeiden)

Lowry F:

Lowry D	1 Teil
Aqua demin.	1 Teil

Lowry E und F wurden für jede Proteinbestimmung frisch angesetzt.

2.3. HEK 293 - Zellen

Die HEK 293-Zelllinie stammt aus menschlichen embryonalen Nierenzellen (**H**uman **E**mryonal **K**idney Cells), die durch den DNA haltigen Adenovirus Typ 5 tumorös transformiert und dadurch immortalisiert wurden (Graham et al., 1977).

Die Zelllinie wurde von der Firma DSMZ, Braunschweig, Deutschland (Kat.-Nr. DSMACC305) bezogen.

2.3.1. Kultivierung von HEK 293 – Zellen

Die Zellen wurden jeweils in 10 ml Kulturmedium in Petrischalen (Fa. Greiner, Frickenhausen) aus Plastik mit 9.4 cm Durchmesser bei einer Temperatur von 37 °C im Brutschrank kultiviert. Die Atmosphäre war befeuchtet und hatte ein Luft:CO₂-Verhältnis von 95:5 %. Sobald die Zellen eine Konfluenz von 70-80 % (7-10 Millionen Zellen pro Schale) erreicht hatten, wurden sie in einem Verhältnis von 1:2 bis 1:4 passagiert. Dabei wurde zunächst das alte Medium abgesaugt; anschließend wurden die Zellen mit 3ml frischem, erwärmten Medium abgespült und auf 3 neue Kulturschalen verteilt (1:3 Passage). Danach wurden noch 9 ml Medium und 100µl Geneticin pro Kulturschale hinzugefügt.

2. Material und Methoden

Durch das zugegebene Geneticinsulfat wurden die transfizierten Zellen selektiert, da sie bei der Transfektion auch ein Geneticinresistenz - Plasmid erhalten hatten.

2.3.2. Transfektion

Es werden Schalen mit 70-80%iger Konfluenz verwendet und der pcDNA 3.1-Vektor (Invitrogen) zugesetzt, der die kodierende Sequenz für murinen SUR2A (Genbank-Nummer D86037, Isomoto et al., 1996), SUR2B (D86038), SUR2A(Y1206S) oder K_{IR}6.1 (D88159) enthält (Isomoto et al., 1996; Yamada et al., 1997). Zur Transfektion wird eine Lösung aus pcDNA und 25 µl Lipofektamin pro DNA-Fraktion hergestellt und diese mit Optimem auf 7.9 ml verdünnt; dazu wird gemäß Herstellerinformation 4 µg DNA (K_{IR}6.1) und / oder 6.4 µg (SURX) pcDNA zugesetzt und zu mindestens zwei Wochen in Kultur gebrachten HEK293-Zellen gegeben. Dann lässt man die Zellen die Liposomen mit der Fremd-DNA für 5 Stunden aufnehmen und tauscht das Transfektionsmedium gegen 80% Optimem und 20% FCS. Nach weiteren 24 Stunden post transfectionem können die Zellen dann mit gentamicinhaltigem Medium kultiviert werden, wodurch eine Isolierung der stabil transfizierten Zellen erreicht wird, da die nicht-transfizierten Zellen absterben.

2.3.3. Einfrieren von HEK293-Zellen

Es wurden Zellen verwendet, die in Petrischalen eine Konfluenz von 70-80 % erreicht hatten (7-10 Millionen Zellen pro Schale), wobei die Schalen in einem 1:1 Verhältnis auf die Kryoröhrchen verteilt und eingefroren wurden: nach Absaugen des alten Mediums wurden die Zellen in 4 ml Gefriermedium A / Schale von der Schalenoberfläche ab gespült und zentrifugiert (500 x g, 5 Min). Währenddessen wurden 500 µl vom Gefriermedium B in die einzelnen Kryoröhrchen vorgelegt. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt, die Zellen in 0.5 ml Gefriermedium A / Schale resuspendiert und zu 500µl Aliquots in die Kryoröhrchen abgefüllt. Danach wurden Sie bei -80 °C für 24 Stunden aufbewahrt und schließlich in flüssigem Stickstoff konserviert. Vor

2. Material und Methoden

allem die letzten Schritte erforderten schnelles Arbeiten, um den Kontakt der Zellen vor dem Einfrieren mit dem Detergens DMSO möglichst kurz zu halten, da sonst das Absterben der Zellen einsetzt.

2.3.4. Auftauen von HEK293-Zellen

Der Auftauvorgang wurde schnell durchgeführt, um wiederum den Kontakt der Zellen nach dem Auftauen mit DMSO möglichst kurz zu halten.

In ein 50 ml Falcon wurden 20 ml Kulturmedium (37 °C) vorgelegt. Im Wasserbad (37 °C) wurde ein aus dem flüssigen Stickstoff entnommenes Kryoröhrchen mit der Zellmenge von 1 Schale schnell aufgetaut, bis gerade noch ein Eiskern erkennbar war. Die Zellsuspension wurde dann rasch aus dem Kryoröhrchen in das vorbereitete Medium überführt und 2-3 Min. bei 200 x g. zentrifugiert.

Das entstandene Pellet (aufgetaute HEK293-Zellen) wurde in 10 ml Kulturmedium resuspendiert und in eine Petrischale (Ø 9.4 cm) ausgesät. Die erste Kultivierung nach dem Auftauen erfolgte ohne Geneticin, um ein gutes Anwachsen zu gewährleisten. Nach einer Brutdauer von ca. 3 Tagen werden die Zellen im Verhältnis 1:3 passagiert und unter Zugabe von 300 µg/ml Geneticin im Brutschrank kultiviert.

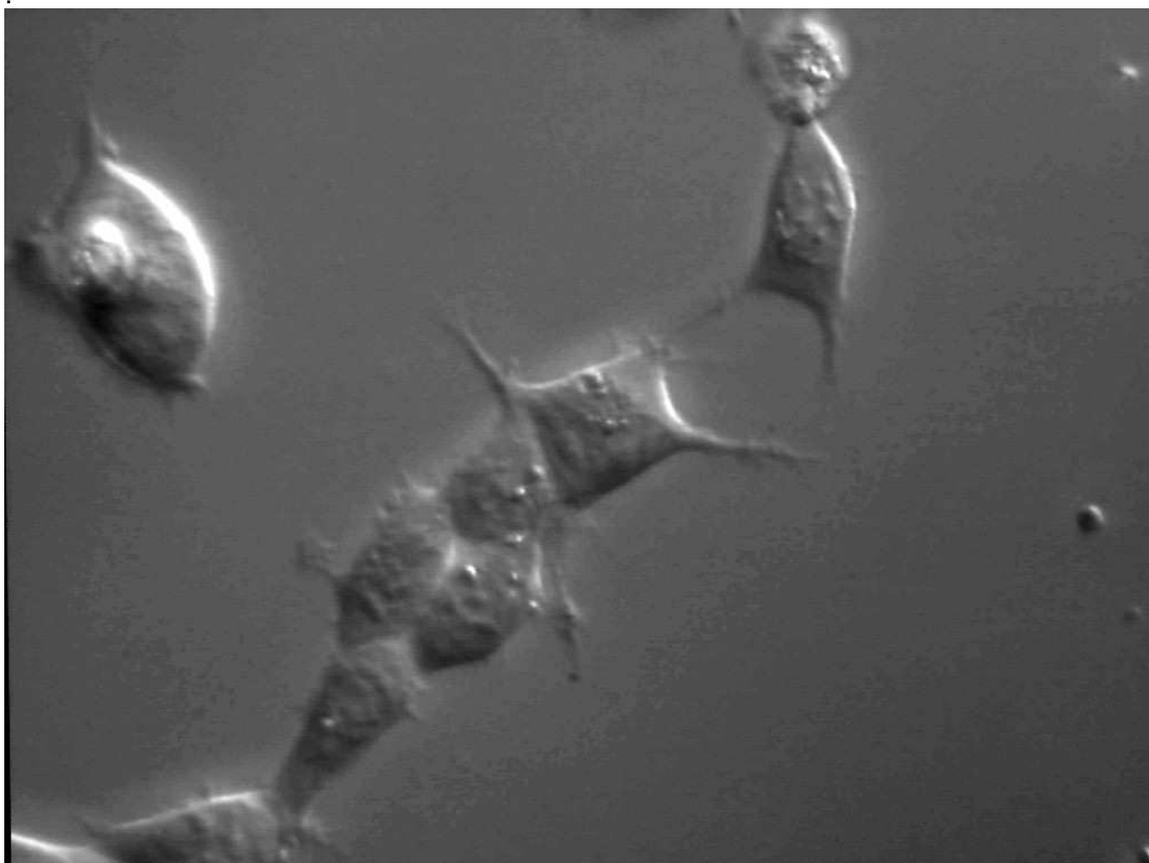


Abbildung 10: Lichtmikroskopische Darstellung von HEK293-Zellen in niedriger Konfluenz mit den für sie typischen Zellausläufern. Die Abbildung entstand in 40 facher Vergrößerung im Differenz-Interferenz-Kontrastmodus

2.3.5. Herstellung einer mikrosomalen Membranfraktion aus HEK293-Zellen

HEK293-Zellen mit einer Konfluenz von 70-80 % (7-10 Millionen Zellen pro Schale) wurden im alten Medium (10 ml/Schale) abgespült und darin bei Raumtemperatur zentrifugiert (500 x g, 5 Min.). Danach wurden Sie durch Resuspension des Pellets in hypotonem Puffer 1 lysiert (4 ml hypotoner Puffer / Schale) und bei 0°C ultrazentrifugiert (100 000 x g, 60 Min.). Das neue Pellet wurde in Puffer 2 (0°C) auf Eis resuspendiert (1 ml Puffer / 3 Schalen), in 2 ml Eppendorf zu je 1 ml aliquotiert. und bei -80 °C eingefroren. Vor jedem Versuch wurden die Membranen direkt nach dem Auftauen noch einmal im Polytron homogenisiert (5-8 s, 10 000 x g).

2.4. Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde nach Lowry et al. (1951) durchgeführt. Membranen bzw. der Puffer, in dem das Protein gelöst war, wurden in NaOH (0.1 M) verdünnt, so dass die Proteinkonzentration im linearen Bereich der Standardmesskurve bestimmt werden konnte (meistens 1:20).

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. Der Grund hierfür liegt in der chemischen Struktur dieser Puffersubstanz mit ihren freien Stickstoffgruppen. Für HEPES wurde auch eine Extinktionskurve bei verschiedenen Konzentrationen in NaOH (0.1 M) erstellt (nicht gezeigt).

Die Proteinbestimmung erfolgte in Halbmikroküvetten. Es wurden zu 200 µl verdünntem Protein/Puffer (NaOH 0.1 M als Leerwert) zunächst 1 ml Lowry E zugegeben und nach 5 Min. Inkubationsdauer zusätzlich 100 µl Lowry F. Die so erstellten Lösungen wurden danach gut durchmischt und bei Raumtemperatur für 20 Min. inkubiert.

In einem Spektralphotometer (Hitachi U-3.000) wurde danach 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 (Abbildung 11) wie auch der anfängliche Kurvenverlauf mit der Puffersubstanz HEPES (Abbildung 11). Die zur Berechnung der Proteinkonzentration gebildete Differenz zwischen der Extinktion des Proteins und der des Puffers war somit ebenfalls linear.

Bei Proteinextinktionen unter 0.3 konnte die Funktion der Eichgeraden angewendet werden:

$$OD_{770} = 0,0132 \cdot m_{Prot} \quad \text{bzw.} \quad m_{Prot} = \frac{OD_{770}}{0,0132}$$

Gleichung 1 a bzw. b

2. Material und Methoden

wobei m_{Prot} die Proteinmenge in der Küvette in μg und OD_{770} die Proteinextinktion bzw. Differenz Protein-Puffer bezeichnet.

Ist die Proteinkonzentration zu hoch, wird eine höhere Verdünnung angesetzt.

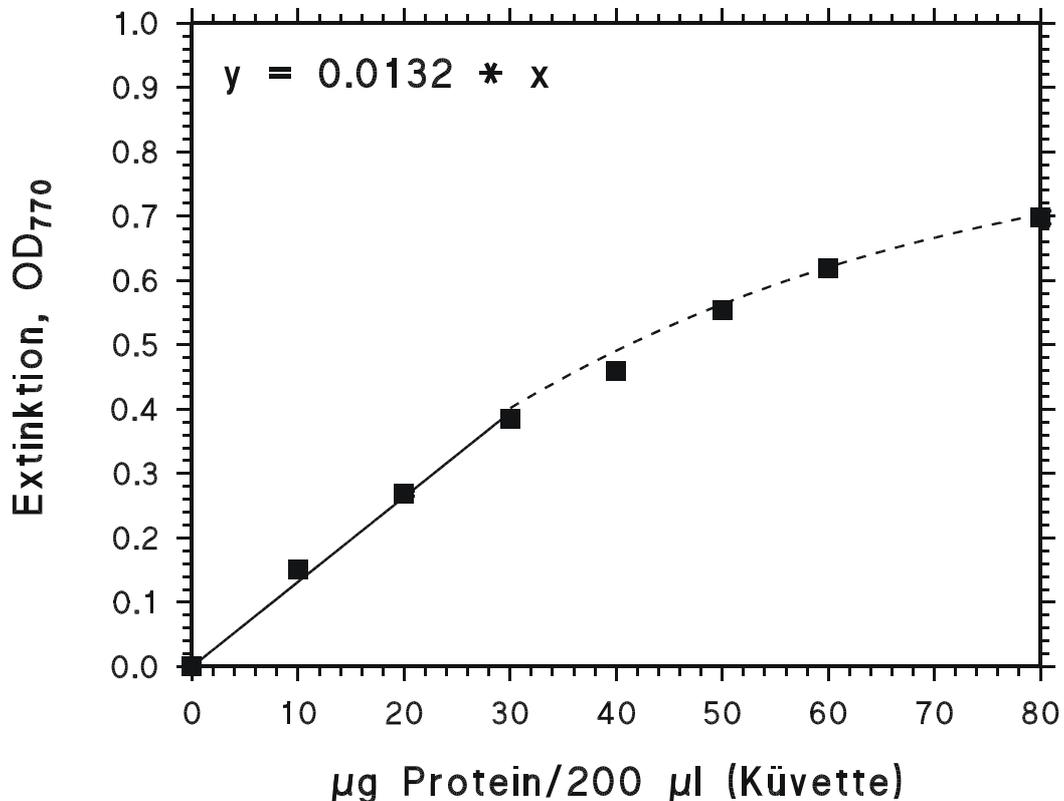


Abbildung 11: Eichkurve für die Proteinbestimmung nach Lowry. Die durchgezogene Linie gibt den linearen Bereich bis $30 \mu\text{g}$ Protein wieder; bei Berücksichtigung aller Messpunkte erhält man eine Sättigungsfunktion (gestrichelt, ω).

2.5. Radioligand - Bindungsexperimente

Mit Hilfe der Radioligandbindung lassen sich die Rezeptorenzahl sowie die Affinität zwischen Rezeptor und Radioligand bzw. Rezeptor und nicht radioaktiv markierten Liganden in einem Präparat direkt bestimmen.

Die Radioligandbindung ist im Allgemeinen reversibel und folgt dem Massenwirkungsgesetz (MWG). Dabei liefert die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D ein Maß für die Stärke der Bindung. Ein Beispiel für ein Gleichgewichtsexperiment ist die Hemmung der Radioligandbindung durch nicht-markierte Liganden (z.B. Konkurrenzexperiment). Dadurch wird die molekularpharmakologische Charakterisierung der jeweils untersuchten Bindungsstelle ermöglicht.

2. Material und Methoden

Allgemein kann man die folgenden zwei Fälle unterscheiden:

- a) Kompetitiver Ligand: Der nicht-markierte Ligand tritt mit dem Radioligand in Konkurrenz um den Bindungsplatz. Die (spezifische) Bindung des Radioliganden kann dadurch vollständig verdrängt werden (Kompetitionsexperiment).
- b) Allosterischer Modulator: Ein allosterischer Aktivator wie z.B. MgATP, der an den NBF's ansetzt, erhöht die Bindung eines Öffners ($^3\text{H-P1075}$) (Hambrock et al., 1998). Für $^3\text{H-GBC}$ wird eine Hemmung beobachtet (Hambrock et al., 2001, Hambrock et al., 2002a).

In dieser Arbeit wurde der Effekt der Lipide auf die Bindung der Radioliganden $^3\text{H-P1075}$ und $^3\text{H-GBC}$ untersucht. Die Daten zeigen, dass die Lipide allosterische Modulatoren der Bindung der Radioliganden an den SUR sind. In diesen Experimenten wurde das Rezeptormaterial mit den Lipiden ultraschallbehandelt (Sonorex RK52, Bandelin elektronik, Berlin), um deren Eindringen in die Membran zu gewährleisten.

In allen Fällen wurde zunächst der Rezeptor (in einer Membranfraktion) mit dem Radioliganden inkubiert. Nach der Inkubationszeit muss der freie Ligand vom gebundenen getrennt werden, z.B. durch Filtration.

2.5.1. Wahl des Radioliganden:

Der Radioligand muss verschiedene Kriterien erfüllen: er muss zum einen eine ausreichende Affinität zum Rezeptor besitzen, zum anderen sollte seine Dissoziationskonstante im nano- oder subnanomolaren Bereich liegen. Weiter sollte sich die biologische Wirkung durch die Markierung nicht verändern. Geprüft wurde zunächst das synthetisierte nicht-radioaktive Analogon zum Radioliganden. Vor allem bei mit Tritium markierten Liganden sind, im Gegensatz zu jodierten, keine Unterschiede zwischen markiertem und nicht-markiertem Liganden zu erwarten. Des Weiteren sollte der Anteil der unspezifischen an der spezifischen Bindung gering sein.

2. Material und Methoden

Für Bindungsmessungen an den SUR-Subtypen stehen zwei Radioliganden zur Verfügung:

- a) $^3\text{H-GBC}$: Der K_{ATP} -Kanalblocker Glibenclamid bindet mit deutlich höherer Affinität an SUR1 ($K_{\text{D}} \sim 1\text{nM}$) als an SUR2 ($K_{\text{D}} \sim 30\text{nM}$) (Hambrock et al., 2002b (SUR1), Hambrock et al., 2002a (SUR2B), Stephan und Quast, persönliche Mitteilung (SUR2A)). Das in dieser Arbeit verwendete Glibenclamid hatte eine Spezifische Aktivität (SA) von 47-52 Ci/mmol . Beim Verarbeiten des $^3\text{H-GBC}$ gibt es einige Besonderheiten: zum Beispiel muss das Aliquot zur Bestimmung der totalen Radioaktivität immer kurz vor der Filtration entnommen werden, da dieser Radioligand sehr stark an der Wand des Reaktionsgefäßes „kleben“ bleibt und sich dann nach und nach aus der Wand löst. Dies hat zur Folge, dass am Ende im Rest des Ansatzes eine viel höhere Konzentration gemessen wird, als ursprünglich vorhanden war. Weiterhin ist aus dem gleichen Grund bei $^3\text{H-GBC}$ darauf zu achten, dass die RadioligandstammLösung immer 10% EtOH enthält. Zum Ansatz werden dann immer 25 μl Radioligandstamm pro Ansatz (1 ml) pipettiert; d.h. im Ansatz sind 0.25% EtOH enthalten. Bei dieser Lösungsmittelkonzentration sind konstante Konzentrationen an $^3\text{H-GBC}$ gewährleistet. Die nichtspezifische Bindung der SUR2-Rezeptoren wird bei Glibenclamid (im Gegensatz zu Messungen mit P1075) mit 100 μM P1075 und nicht homolog mit GBC bestimmt, da in HEK-Zellmembranen endogene Bindungsstellen für GBC vorhanden sind, die jedoch keine Öffnerempfindlichkeit besitzen und somit für diese Untersuchungen nicht relevant sind.
- b) $^3\text{H-P1075}$: Der K_{ATP} -Kanalöffner bindet mit guter Affinität an SUR2B ($K_{\text{D}} \sim 5\text{-}10\text{nM}$; Bray und Quast, 1992), dagegen kaum an SUR1 ($K_{\text{D}} > 100\mu\text{M}$). Das in dieser Arbeit verwendete $^3\text{H-P1075}$ hatte eine SA von $\sim 117\text{-}121 \text{ Ci}/\text{mmol}$ und eine Konzentration von $\approx 5\mu\text{M}$. P1075 weist eine sehr geringe nichtspezifische Bindung auf. Beim Verarbeiten von $^3\text{H-P1075}$ gibt es keine Besonderheiten, daher kann die Abnahme der totalen Radioaktivität am Ende des Versuchs erfolgen. Die

2. Material und Methoden

nichtspezifische Bindung wird durch Zugabe von 10 μ M unmarkiertem P1075 ermittelt.

2.5.2. Gewinnung von Rezeptormaterial:

Die in dieser Arbeit untersuchten Rezeptoren befinden sich in den Membranen, die wie unter Kapitel 2.3.5 erläutert, gewonnen und nach dem Auftauen auf Eis gehalten wurden.

2.5.3. Inkubation:

Im Allgemeinen wurde die Bindungsreaktion durch Zugabe der Membran zum Reaktionsgemisch (Puffer + MgATP + Radioligand + zu untersuchende Substanz) gestartet. Außerdem hat sie unter definierten Inkubationsbedingungen zu erfolgen. Dazu gehören Temperatur, Zeit und Zusammensetzung des Inkubationsmediums.

Inkubationstemperatur:

In den hier durchgeführten Bindungsstudien soll die Temperatur möglichst ähnlich zur Körpertemperatur sein und wurde deshalb im Wasserbad auf 37°C festgelegt.

Inkubationszeit:

Die Inkubationszeit wurde mittels eines Assoziationsexperimentes ermittelt. Die Zeit wurde so gewählt, dass der Radioligand-Rezeptor-Komplex die Einstellung der Gleichgewichtslage erreicht hat (³H-P1075: SUR2A 13min, SUR2B 30min; ³H-GBC: SUR2A(Y1206S) 15min, SUR1 15min). Bei längeren Inkubationszeiten fällt die spezifische Bindung mit der Zeit ab.

Inkubationsmedium:

Das verwendete Medium ist bei physiologischem pH gepuffert (pH=7.4). Wichtig hierbei ist, dass der pH-Wert bei derjenigen Temperatur eingestellt wurde, bei dem die Inkubation stattfindet.

2.5.4. Trennung von gebundenem und freiem Radioliganden durch Filtration:

Am Ende der Inkubation muss der Radioligand-Rezeptor-Komplex vom freien Radioliganden separiert werden. Dies geschieht durch Filtration. Aus den Ansätzen, die 1 ml Volumen enthalten, werden drei Aliquots ($V = 0.3 \text{ ml}$) in 8 ml eiskaltem Waschpuffer verdünnt und unter Vakuum über Glasfaserfilter (Whatman GF/B) in einer Filtrationsanlage mit Hilfe einer Membranpumpe abgesaugt. Der eiskalte Waschpuffer (0°C) ist wichtig, um das Gleichgewicht (s. Kapitel 2.6), das sich bei 37°C während der Inkubation eingestellt hat, zu ‚fixieren‘. Da die Maschen dieser Filter enger als die festen Bestandteile des Präparats gewählt wurden, bleiben diese auf dem Filter zurück. Um unspezifisch im Präparat gebundene Radioaktivität zu entfernen, werden die Filter schnell zweimal mit 8 ml eiskaltem Waschpuffer nachgewaschen.

2.5.5. Messung der Radioaktivität:

Da Tritium Betastrahlen emittiert, erfolgt die quantitative Erfassung der Radioaktivität des Filters mittels eines Flüssigszintillators in einem Szintillationszähler. Um eine absolute Bestimmung vorzunehmen, ist es notwendig, die Zählausbeute des Gerätes zu kennen.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden mittels eines TRI-CARB® Liquid Scintillation Analyzer 2000CA von PACKARD mit einer Zählausbeute von ca. 54% durchgeführt, d.h., dass der Zähler 54% der Zerfälle pro Minute detektiert:

$$f = 0.54 = \frac{\text{gemessene Impulse/min}}{\text{Zerfälle/min}} = \frac{\text{cpm}}{\text{dpm}}$$

Da die Auswertung von Bindungsexperimenten in Konzentrationseinheiten erfolgt, ist eine Umrechnung von dpm in molare oder submolare Einheiten notwendig.

$$C = \frac{\text{gezählte dpm}}{2.2 \cdot 10^{12} \left(\frac{\text{dpm}}{\text{Ci}}\right) \cdot \text{SA} \left(\frac{\text{Ci}}{\text{mmol}}\right) \cdot V (\text{ml})} = \frac{\text{mol}}{\text{l}}$$

V = Volumen in ml

C = Konzentration in mol/l

SA= Spez. Aktivität in Ci/mmol

$1\text{Ci} = 2.2 \cdot 10^{12} \text{ dpm/min}$

2.6. Modell der Rezeptorbindungsstudien

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



Gleichung 2

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

Im Gleichgewicht gilt das Massenwirkungsgesetz:

$$K_D = \frac{k_-}{k_+} = \frac{R \cdot L}{C}$$

Gleichung 3

Dabei ist K_D die Gleichgewichtsdissoziationskonstante (mol/l).

Weiterhin gelten die Massenbilanzen

$$R_0 = R + C \quad \text{und} \quad L_0 = L + C$$

Gleichung 4 a bzw. b

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

Die Experimente werden nach Möglichkeit so angelegt, dass gilt

$$R_0 \ll L_0 \quad \Rightarrow \quad L_0 \approx L$$

Gleichung 4 c

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 Haften des Liganden am Protein und am Filter verursachte, nichtspezifische Bindung (B_{NS}). B_{NS} wurde gemessen, nachdem die spezifische Bindung durch einen Überschuss an kaltem Liganden ($L_{\text{kalt}} \approx 1000 \cdot K_D$) blockiert wurde.

2. Material und Methoden

Experimentell bestimmt werden die totale (B_{TOT}) und die nichtspezifische Bindung (B_{NS})

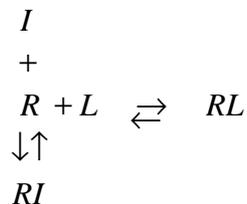
Aus diesen lässt sich B_S berechnen:

$$B_S = B_{TOT} - B_{NS}; \quad B_S \equiv C$$

Gleichung 5

2.6.1. Konkurrenzexperiment

Ausgegangen wurde von folgendem Reaktionsschema, in dem L und I um R konkurrieren:



Gleichung 6

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

In der Präparation gibt es nur eine Klasse von Bindungsstellen (Rezeptoren); L und I sind in Konkurrenz um R . Gemessen wurde die Abnahme von RL bei steigenden Konzentrationen von I . Im Versuch wird zur Zeit $t = 0$ die Rezeptorpräparation zugegeben und die Gleichgewichtseinstellung abgewartet. Die beobachtete Größe ist RL , die als Funktion des zugegebenen Inhibitors in einer Hemmkurve dargestellt wurde. Aus den Massenwirkungsgesetzen für die beiden oben dargestellten konkurrierenden Reaktionen

$$K_L = \frac{R \cdot L}{RL} \quad \text{bzw.} \quad K_I = \frac{R \cdot I}{RI}$$

Gleichung 7 a bzw. b

2. Material und Methoden

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

$$RL = R_0 \underbrace{\frac{L/K_L}{1 + L/K_L}}_{RL(I=0)} \cdot \underbrace{\frac{K_I(I + L/K_L)}{K_I(I + L/K_L) + I}}_{I \rightarrow 0 \rightarrow 1}$$

Gleichung 8

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

Die Beziehung zwischen IC_{50} und K_I heißt Cheng-Prusoff-Gleichung und erlaubt die Berechnung von K_I :

$$IC_{50} = K_I \cdot \left(1 + \frac{L}{K_L} \right)$$

Gleichung 9

Cheng und Prusoff, 1973 (hierzu muss K_L bekannt sein)

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

$$IC_{50} = K_L + L_0 \quad \text{bzw.} \quad K_L = IC_{50} - L_0$$

Gleichung 10

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

$$RL = RL(0) \cdot \frac{IC_{50}}{IC_{50} + I} \quad \text{logarithmiert} \quad RL = \frac{RL(0)}{1 + 10^{pIC_{50} - pI}}$$

mit $pI = -\log I$ und $pIC_{50} = -\log IC_{50}$

Gleichung 11 a bzw. b

Für den in den Experimenten erreichten Sättigungsgrad y , der die Fraktion der mit Ligand besetzten Rezeptoren darstellt, gilt:

$$y \equiv \frac{C}{R_0} = \frac{L}{L + K}$$

Gleichung 12

2. Material und Methoden

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

$$B_{MAX} = \frac{1}{y} \cdot B_S = \frac{L+K}{L} \cdot C$$

Gleichung 13

2.6.2. Verallgemeinerung der Bindungsisotherme nach Hill

Falls der nicht-markierte Ligand nicht mit dem Radioliganden kompetitiv ist, oder der Radioligand ein kompliziertes Bindungsverhalten zeigt, kann die Bindungsisotherme steiler oder flacher sein als es nach Gleichung 11 a bzw. b entspricht. In diesem Fall werden diese beiden Gleichungen durch die Einführung eines Exponenten n (= Hill-Koeffizient = n_H) verallgemeinert. Für die Inhibitionskurve gilt dann:

$$B_S = \frac{B_S(0)}{1 + 10^{n(pIC_{50} - pI)}}$$

Gleichung 14

Für die Sättigungsisotherme gilt:

$$RL = R_0 \cdot \frac{L^n}{\underbrace{L^n + K^n}_y} \quad \text{logarithmiert} \quad RL = \frac{R(0)}{1 + 10^{n(pL - pK)}}$$

Gleichung 15 a bzw. b

Dabei gilt: $B_S(0) = B_S$ in der Abwesenheit des nicht-markierten Liganden. 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 und führen eventuell auch durch allosterische Modulation zu einer erhöhten oder verminderten Radioligandbindung
- $n < 1$: 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. Datenauswertung

2.7.1. Analyse der Bindungskurven

Die einzelnen Bindungsexperimente wurden durch eine Anpassung der logarithmierten Hill Gleichung an die Daten ausgewertet: (*1-Komponenten-Modell*)

$$y = \frac{A}{1 + 10^{n \cdot (pIC_{50} - pX)}} + (100 - A)$$

Gleichung 16

es gilt:

$y = \%B_s$ (% der spezifischen Bindung)

$A =$ Amplitude (maximaler Effekt der Sättigung); $A=100 \rightarrow$ vollständige Hemmung

$pX = -\log x$, wobei x die Konzentration des Modulators in M bzw. bei den Vorexperimenten die Konzentration des Inhibitors

$pIC_{50} = -\log IC_{50}$: $IC_{50} =$ Mittelpunkt (Wendepunkt) der Hemmkurve

$n = n_H =$ Hill Koeffizient

Falls $A \approx 100\%$, $n_H=1$, dann wurden diese Parameter als Konstanten in die Anpassung eingegeben, um die Fehler der verbleibenden Parameter zu verringern.

2. Material und Methoden

Für Experimente, in denen auch eine stimulatorische Komponente sichtbar war, wurde eine Überlagerung von zwei Hillfunktionen mit $n_H=1$ verwendet: (2-Komponenten-Modell)

$$y = 100 + \frac{A_1}{1 + 10^{-(pX - pEC_{50})}} - \frac{A_1 + A_2}{1 + 10^{-(pX - pIC_{50})}}$$

Gleichung 17

es gilt zudem:

stimulatorische Komponente: pEC_{50}, A_1

inhibitorische Komponente: pIC_{50}, A_2

2.8. Statistik

Die Amplituden und die pIC_{50} Werte sind normalverteilt (Christopoulos, 1998). Daher wurden zur Auswertung einer Messreihe die arithmetischen Mittel dieser Parameter \pm SEM gebildet. Die Konfidenzintervalle der IC_{50} -Werte wurden berechnet als

$$10^{-y} \quad \text{mit} \quad y = pIC_{50} \pm 2 \text{ SEM}$$

Gleichung 18

Die so gewonnenen Parameter sind in die Tabellen eingetragen.

Zum Vergleich von Messserien wurden die einzelnen Amplituden und pIC_{50} Werte als normalverteilte Variable (Smirnow-Kolmogorow Test) einer einfachen Varianzanalyse unterzogen und eventuelle Unterschiede mit geeigneten Tests (t-Test,..) auf ihr Signifikanzniveau untersucht (SigmaPlot, SPSS Inc.).

In den Abbildungen sind die Mittelwertskurven der Messreihen gezeigt (gemittelte Daten \pm SEM). An diese Mittelwerte wurden ebenfalls die entsprechenden Modellgleichungen angepasst. Die so erhaltenen Parameter stimmen im Allgemeinen gut mit den gemittelten Parametern aus der Analyse der Einzelkurven überein, wurden aber nicht weiter verwendet.

Bei Rechnungen mit den Parametern wurden die Regeln der Fehlerrechnung angewandt (Bevington, 1969). Bei zwei Parametern mit Fehlern $a \pm \sigma_a, b \pm \sigma_b$ ($\sigma = \text{SEM}$) wurden die Fehler wie folgt berechnet:

2. Material und Methoden

Summen und Differenzbildung:

$$y = a \pm b \quad \rightarrow \quad \sigma_y = \sqrt{\sigma_a^2 + \sigma_b^2} \text{ (absolute Fehlerquadrate)}$$

Gleichung 19

Produkt und Quotient:

$$y = a \cdot b \quad \text{bzw.} \quad y = \frac{a}{b} \quad \rightarrow \quad \frac{\sigma_y}{y} = \sqrt{\frac{\sigma_a^2}{a^2} + \frac{\sigma_b^2}{b^2}} \text{ (relative Fehlerquadrate)}$$

Gleichung 20

3. Ergebnisse

3.1. Vorbereitende Messungen:

3.1.1. Bestimmung der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_D und der Anzahl der Bindungsstellen B_{max} für die Bindung des Radioliganden $^3\text{H-P1075}$ an die SUR2 Subtypen durch homologe Verdrängung in Membranen von HEK293-Zellen

Als Vorbereitung für die weiteren bindungsmodulierenden Experimente wurde zunächst durch homologe Konkurrenz die K_D der Radioliganden bestimmt und daraus und aus der spezifischen Bindung (B_S) bei einer gegebenen Radioligandenkonzentration mit Hilfe der Gleichung 13 die Konzentration der Bindungsstellen in der Präparation (maximale Bindung, B_{max}) abgeschätzt.

Aus $n = 12 / 7$ (SUR2A/SUR2B) Experimenten ergab bei 1mM ATP und 2.2 mM Mg^{2+} die homologe Konkurrenz der $^3\text{H-P1075}$ -Bindung mit nicht-markiertem P1075 $\text{p}K_D$ -Werte von $7.81 \pm 0.03 / 7.98 \pm 0.03$, welche K_D -Werten von 15.5 [13.5, 17.8] nM / 10.5 [9.1, 12.0] nM entsprechen. Die Hill-Koeffizienten von $1.00 \pm 0.03 / 0.94 \pm 0.04$ wiesen auf jeweils eine einfache Verdrängungskurve mit je einer Klasse von Bindungsstellen ohne Kooperativität hin.

Die folgenden Abbildungen zeigen die gemittelten Daten aus den 12/7 Experimenten:

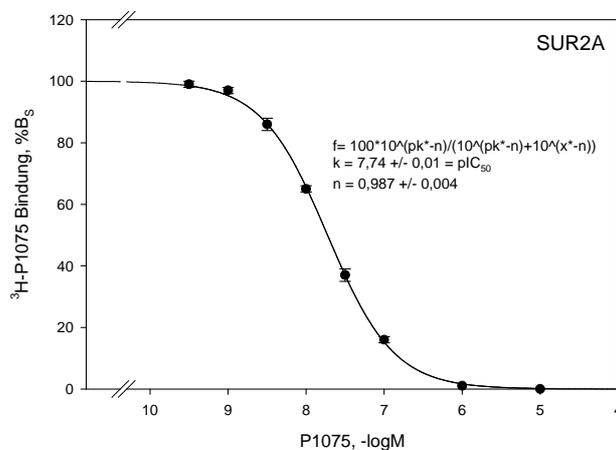


Abbildung 12: homologe Verdrängung der Bindung von $^3\text{H-P1075}$ an SUR 2A: Mittelwerte \pm SEM aus $n=12$ Experimenten, $L_0=2.63\text{nM}$, $B_S=105\pm 14$ fmol/mg (=100%), $B_{TOT}=121\pm 13$ fmol/mg, $\text{NSB}=15\pm 2\%B_{TOT}$, $\text{IC}_{50}=18.2$ nM [17.4, 19.1], $\text{pIC}_{50}=7.74\pm 0.01$, Proteinkonzentration (PK)= 0.24 ± 0.01 mg/ml, Inkubationszeit=13min

3. Ergebnisse

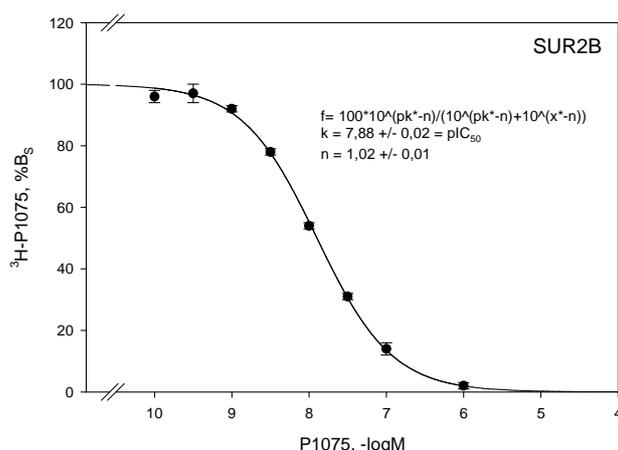


Abbildung 13: homologe Verdrängung der Bindung von ³H-P1075 an SUR 2B: Mittelwerte±SEM aus n=7 Experimenten, L₀= 1.70nM, B_S=256±58 fmol/mg (=100%), B_{TOT}=274±55 fmol/mg, NSB≈6%B_{TOT}, IC₅₀=13.2 nM [12.0, 14.5], pIC₅₀=7.88±0.02, PK=0.17±0.04mg/ml, Inkubationszeit=30min

Die in diesen Abschätzungen erhaltenen Parameter stimmen gut mit den gemittelten Parametern aus der Analyse der Einzelkurven überein, wurden aber nicht weiter verwendet.

Nach Korrektur der IC₅₀-Werte für die verwendeten Radioliganden -konzentrationen nach Cheng-Prusoff (Gleichung 9) und Abschätzung der B_{MAX} Werte aus der spezifischen Bindung (Gleichung 13) erhalten wir folgende Tabelle:

Radioligand	Rezeptor	K _D pK _D (-log M)	A(%B _S)	n _H	B _{max} , fmol/mg
³ H-P1075	SUR2A	15.5 [13.5, 17.8] nM 7.81±0.03	100	1.00±0.03	726±92
	SUR2B	10.5 [9.1, 12.0] nM 7.98±0.03	100	0.94±0.04	1793±373

Tabelle 2: homologe Verdrängung der Bindung von ³H-P1075 an SUR 2A/B (Gemittelte Parameter aus n=12/7 Einzelversuchen; Vergleiche Kap. 2.8)

3.1.2. Ultraschallbehandlung zur Inkorporation der Lipide und Fettsäuren in die Membran: Einfluss der Ultraschalldauer auf die Bindung

In der Literatur (z.B. Koster et al., 1999, Krauter et al., 2001) wurde beschrieben, dass eine Ultraschallbehandlung zur Inkorporation der Lipide in die Membran genutzt wurde. Hier wurde nun vorab untersucht, ob die Länge der Ultraschallbehandlung einen Einfluss auf die ³H-P1075 Bindung an SUR2B

3. Ergebnisse

und die Modulation dieser Bindung durch DOGS-NTA hat. Gemessen wurde in Eiswasser mit 0, 2 und 5 Minuten Ultraschallbehandlung (Sonorex RK52, Bandelin elektronik, Berlin) und $[\text{DOGS-NTA}] = 50 \mu\text{M}$. Unter diesen Bedingungen nahmen die Kontrollmessungen um maximal 12.5% ab; jedoch ergab sich kein signifikanter Unterschied in der Bindungsmodulation durch DOGS-NTA (Verringerung jeweils auf $57 \pm 2 \% B_{\text{TOT}}$).

Anhand dieser Ergebnisse wurde die Ultraschallbehandlungsdauer (Protein plus Lipid) für die folgenden Versuche auf 3 Minuten festgelegt, um ein Eindringen der Lipide in die Membran zu gewährleisten.

3.2. Modulation der Radioligand Bindung an SUR2A

3.2.1. Effekt von PIP_2 auf die $^3\text{H-P1075}$ Bindung an SUR2A in Membranen

Wie schon in der Einleitung angesprochen, ist PIP_2 ein Phospholipid der Zellmembran, das ein wichtiger physiologischer Regulator der K_{ATP} Kanäle hinsichtlich der Offenwahrscheinlichkeit und der ATP Sensitivität ist (Hilgemann und Ball, 1996, Fan und Makielski, 1997, Baukrowitz et al., 1998). Diese Effekte werden durch Bindung von PIP_2 an eine intrazelluläre Bindungsstelle der K_{IR} -Untereinheit vermittelt. Weiterhin wird ein modulierender Effekt bezüglich der KCO Sensitivität des K_{ATP} Kanals beschrieben, der hinsichtlich des Angriffsortes und des Wirkprinzips zum oben beschriebenen regulatorischen Effekt verschieden ist (Krauter et al., 2001). Wir untersuchen hier nun die Modulation der Bindung des KCO $^3\text{H-P1075}$ an SUR2A durch PIP_2 .

Aus $n = 7$ Experimenten ergab die Modulation der $^3\text{H-P1075}$ -Bindung mit PIP_2 einen signifikanten Anstieg der spezifischen Bindung bei $[\text{PIP}_2] = 30 \mu\text{M}$ auf $121 \pm 8 \% B_{\text{S}}$ (student t-Test: $t_{(30\mu\text{M})} = 2.76$; $p = 0.033$); bei höheren Konzentrationen fiel die Bindung wieder ab. Abbildung 14 zeigt den Versuch, die Superposition (Gleichung 17) von 2 Hill-Funktionen, mit $n_{\text{H}} = 1$ für den auf- und absteigenden Ast, an die Daten zu fitten:

3. Ergebnisse

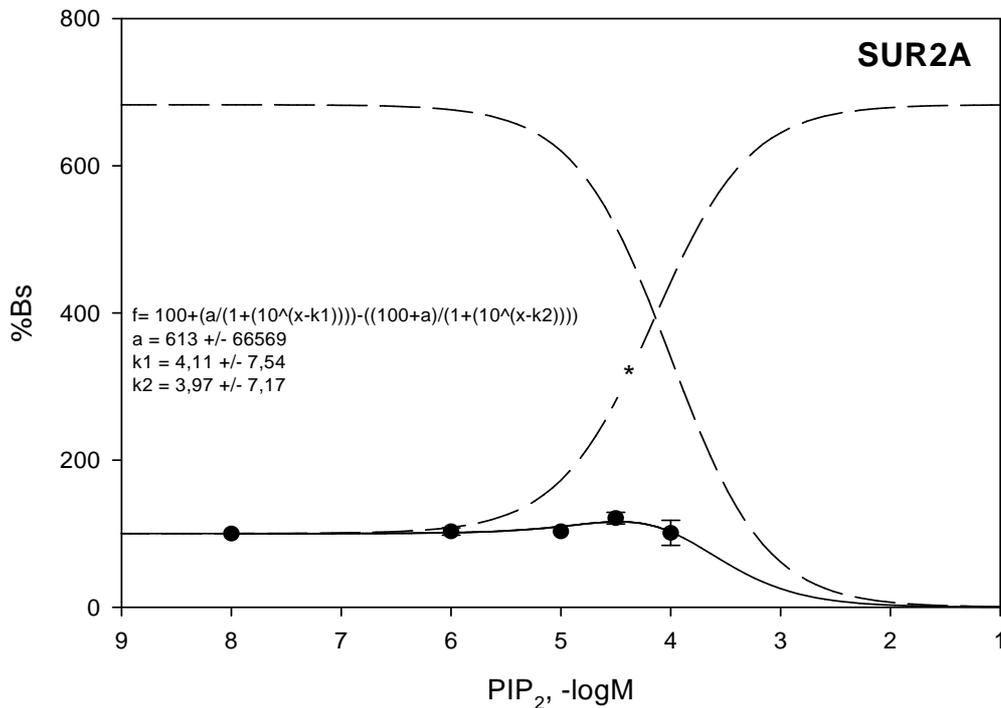


Abbildung 14: Effekt von PIP₂ auf die ³H-P1075 Bindung an SUR2A: Mittelwerte±SEM aus n=7 Experimenten; [ATP]=0.3 mM; [Mg²⁺]=1 mM; L₀= 3.13 nM; B_S= 93±24 fmol/mg (=100%), B_{TOT}=104±23 fmol/mg; NSB=15±3 %B_{TOT}; Proteinkonzentration (PK)=0.26±0.02mg/ml; Inkubationszeit=13min

Der absteigende Ast wurde nicht weiter gemessen, da er zum einen in unphysiologischen Bereichen liegt, zum anderen durch den Preis von 290 € / mg PIP₂ bei einem Molekulargewicht von 1044 g/mol so hohe Konzentrationen zu teuer wurden. Deswegen ist es auch unmöglich, den Fit endgültig zu beurteilen, da zu wenig Daten für eine sinnvolle Parameterschätzung vorliegen. Aus gleichem Grund wurde der Effekt von PIP₂ auch nur noch an SUR2B gemessen.

3.2.2. Effekt von DOGS-NTA auf die ³H-P1075 Bindung an SUR2A in Membranen

Wie Krauter et al., 2001 beschrieben haben, ist auch das synthetische Peptid DOGS-NTA (s. Abbildung 9), welches eine stark negative Nitrilotriessigsäure (NTA) - Gruppe besitzt, ebenso modulierend wirksam wie PIP₂. Es kommt bei

3. Ergebnisse

dem beschriebenen modulierenden Effekt der Lipide anscheinend weniger auf die genaue Struktur, sondern vor allem auf die Ladung des Modulators an, wie Vergleiche mit weniger geladenen Substanzen (PC, PI, DOG) zeigen. Krauter et al., 2001

Wir untersuchen hier, ob sich DOGS-NTA hinsichtlich der Bindung an SUR2A ähnlich wie PIP₂ verhält.

Bei den Experimenten fiel auf, dass DOGS-NTA konzentrationsabhängig die unspezifische Bindung erhöhte; Abbildung 15 zeigt die totale (B_{TOT}) und die unspezifische Bindung (NSB) als Funktion der DOGS-NTA Konzentration. Die spezifische Bindung als Differenz von B_{TOT} und NSB ist in Abbildung 16 und Abbildung 17 gezeigt. In einer ersten Analyse (Abbildung 16) wird zunächst der Punkt bei 3 μ M vernachlässigt. Analysiert man nun die Daten nach dem 1-Komponenten-Modell mit $n_H=1$ (Gleichung 16), so zeigt sich, dass DOGS-NTA die spezifische ³H-P1075 Bindung mit einem pIC_{50} -Wert von 4.14 ± 0.07 ($IC_{50}=72 \mu$ M [52, 100]) bis auf $88 \pm 8 \%B_S$ hemmt. Die Inhibition ist also nicht total.

Rohdaten:

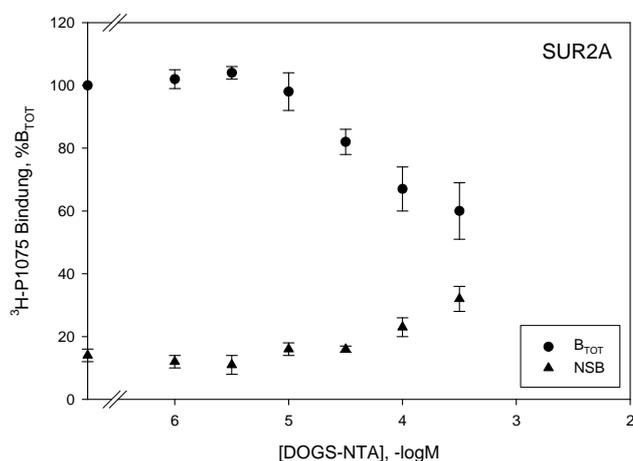


Abbildung 15: Effekt von DOGS-NTA auf die ³H-P1075 Bindung an SUR2A: Rohdaten

Analyse 1:

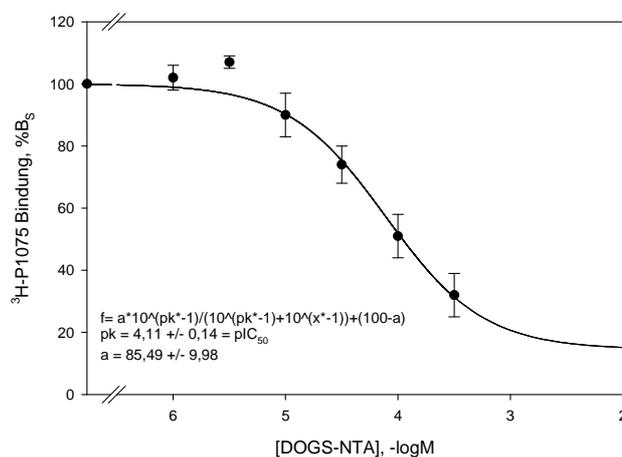


Abbildung 16: Effekt von DOGS-NTA auf die ³H-P1075 Bindung an SUR2A: Differenz von B_{TOT} und NSB. Punkt bei 5.5 vernachlässigt und mit 1-Komponenten-Modell (Gleichung 16) berechnet; $n_H=1$ (fix)

3. Ergebnisse

Allerdings konnte, wie auch schon bei PIP₂, eine die Bindung stimulierende Wirkung gezeigt werden. Die Analyse dieses Effekts ergab einen signifikanten Anstieg der spezifischen Bindung bei [DOGS-NTA] = 3 μM auf 107±2 %B_S (student t-Test: t_(3μM) = 3.81; p=0.032). Abbildung 17 zeigt die Auswertung nach dem 2-Komponenten-Modell (Gleichung 17) unter Berücksichtigung dieses stimulierenden Effektes; wegen der nur geringen Größe dieses Effekts sind die entsprechenden Parameter mit großen Fehlern behaftet.

Analyse 2:

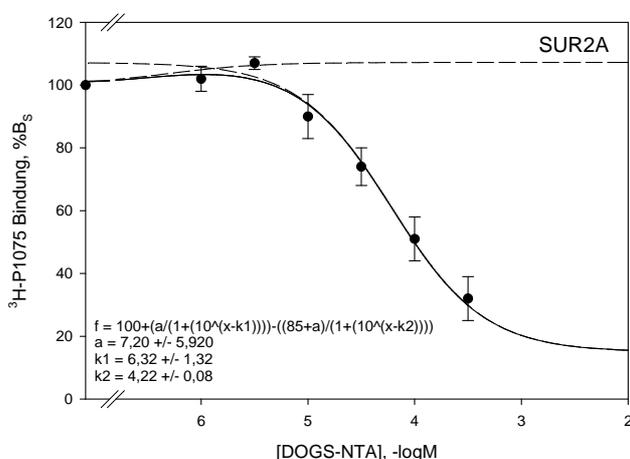


Abbildung 17: Effekt von DOGS-NTA auf die ³H-P1075 Bindung an SUR2A: stimulatorischer Effekt berücksichtigt und mit 2-Komponenten-Modell (**Gleichung 17**) berechnet; A-Wert aus Analyse 1 übernommen

Für die Abbildungen 15-17 gilt: : Mittelwerte±SEM aus n=7 Experimenten; [ATP]=0.3 mM; [Mg²⁺]=1 mM; L₀= 3.49±0.19 nM; B_S= 71±11 fmol/mg (=100%), B_{TOT}=81±12 fmol/mg; NSB=14-32 %B_{TOT}; PK=0.27±0.02 mg/ml; Inkubationszeit=13min

DOGS-NTA						
Rezeptor	Stimulation			Inhibition		
	EC ₅₀ pEC ₅₀ (-log M)	A(%B _S)	n _H	IC ₅₀ pIC ₅₀ (-log M)	A(%B _S)	n _H
monophasisch						
SUR2A			1 (fix)	72 [52, 100]μM 4.14±0.07	88±8	1 (fix)
Biphasisch (Werte aus dem Mittelwertsfit in Abbildung 17)						
SUR2A	0.5 [0.001, 209] μM 6.32±1.32	7.2±5.9	1 (fix)	60 [42, 87]μM 4.22±0.08	85 (fix)	1 (fix)

Tabelle 3: Effekt von DOGS-NTA auf die ³H-P1075 Bindung an SUR2A (Gemittelte Parameter aus n=7 Einzelversuchen; Vergleiche Kap. 2.8)

3.2.3. Effekt von Oleoyl-CoA auf die $^3\text{H-P1075}$ Bindung an SUR2A in Membranen

K_{ATP} -Kanäle koppeln die elektrische Membranaktivität an den Energiestoffwechsel der Zelle (Noma, 1983, Nichols und Lederer, 1991, Terzic et al., 1995, Benndorf et al., 1992). Liu et al., 2001a) beschreiben einen direkten Effekt von langkettigen Acyl-CoA-Estern (LC-Acyl-CoA) auf die K_{ATP} – Aktivität in Herzmuskelzellen. Sie fanden eine Aktivierung der K_{ATP} – Kanäle durch LC-Acyl-CoA die um ein Vielfaches höher war als in den pankreatischen β -Zellen (Bränström et al., 1997). Da die LC-Acyl-CoA aber an der K_{IR} -Untereinheit ansetzen (Bränström et al., 1998; Gribble et al., 1998a) und diese in beiden Fällen dieselbe ($K_{\text{IR}6.2}$) ist, muss man schließen, dass der SUR Subtyp den Effekt der LC-Acyl-CoA auf den $K_{\text{IR}6.2}$ moduliert. Wir untersuchen hier die Rolle der β -Untereinheit, SUR2A.

Im Gegensatz zu DOGS-NTA trat kein Anstieg der nichtspezifischen Bindung bei zunehmender Oleoyl-CoA Konzentration auf, und die spezifische $^3\text{H-P1075}$ Bindung liess sich vollständig verdrängen. Die 4 Experimente ergaben für die Hemmung der $^3\text{H-P1075}$ -Bindung an SUR2A durch Oleoyl-CoA bei einer Radioligandkonzentration von $L_0 = 2.89 \text{ nM}$ einen pIC_{50} -Wert von 4.85 ± 0.03 (s. Tabelle 4), welcher einem IC_{50} -Wert von $14.1 \text{ }\mu\text{M}$ [12.3, 16.2] entspricht; Abbildung 17 zeigt die Hemmkurve aus den Mittelwertsdaten.

Der Hill-Koeffizient betrug 1.42 ± 0.08 (s. Tabelle 4) und ist damit signifikant größer als 1.

In dieser Versuchsreihe konnte kein stimulatorischer Effekt nachgewiesen werden, was aber möglicherweise daran liegt, dass er in dieser Konstellation bei niederen Konzentrationen auftritt, die nicht geprüft wurden.

3. Ergebnisse

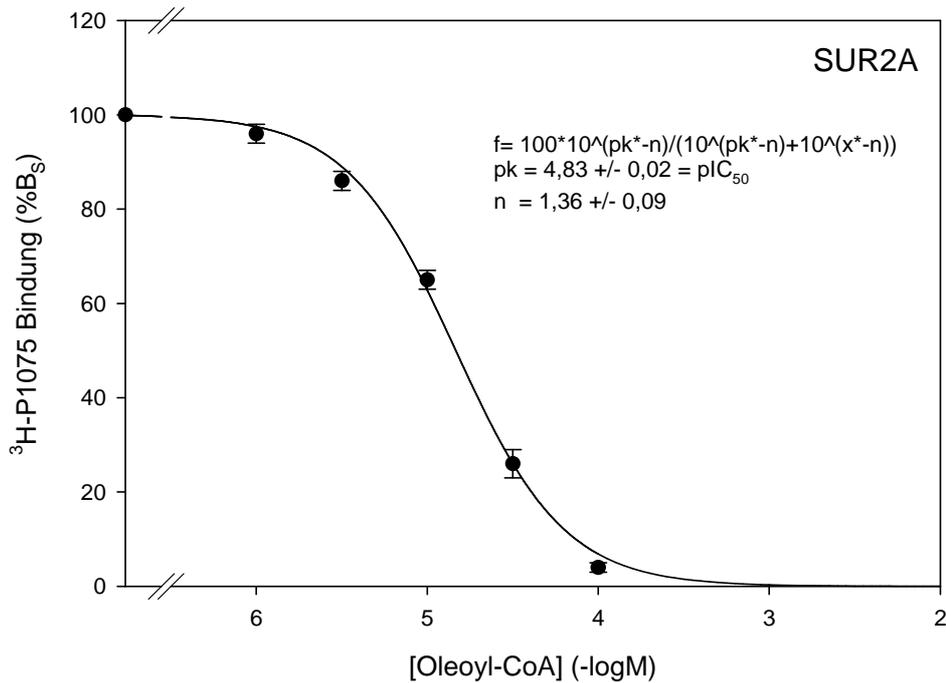


Abbildung 18: Effekt von Oleoyl-CoA auf die ³H-P1075 Bindung an SUR2A: Mittelwerte±SEM aus n=4 Experimenten; [ATP]=0.3 mM; [Mg²⁺]=1 mM; L₀= 2.89±0.04 nM; B_S= 63±34 fmol/mg (=100%), B_{TOT}=71±4 fmol/mg; NSB=7±1 %B_{TOT}; A=100 %B_S; PK=0.34±0.04 mg/ml; Inkubationszeit=13min

Oleoyl-CoA						
Rezeptor	Stimulation			Inhibition		
	EC ₅₀ pEC ₅₀ (-log M)	A(%B _S)	n _H	IC ₅₀ pIC ₅₀ (-log M)	A(%B _S)	n _H
SUR2A				14.1 [12.3, 16.2]μM 4.85±0.03	100	1.42±0.08

Tabelle 4: Effekt von Oleoyl-CoA auf die ³H-P1075 Bindung an SUR2A (Gemittelte Parameter aus n=4 Einzelversuchen; Vergleiche Kap. 2.8)

3.2.4. Effekt von Oleoyl-CoA auf die ³H-P1075 Bindung an SUR2A/Kir6.2 in Membranen

Der Vergleich der bisher gewonnen Bindungsdaten mit den Ergebnissen der elektrophysiologischen Experimente in der Literatur (s. Einleitung Kap 1.7) zeigt, dass die Hemmung der Radioligandbindung an SUR2A durch die Lipide erst bei etwa 100x größeren Konzentrationen auftritt als die

3. Ergebnisse

elektrophysiologischen Effekte. Bei diesem Vergleich ist allerdings zu bedenken, dass die elektrophysiologischen Effekte durch Bindung des Lipids an $K_{IR}6.2$ vermittelt werden und dass diese Effekte durch den SUR-Subtyp nur moduliert werden. Umgekehrt stellt sich daher die Frage, ob der Effekt der Lipide auf die Radioligandbindung an SUR durch Koexpression mit $K_{IR}6.2$ verändert wird, insbesondere ob die Hemmkurve sich zu physiologischen Lipidkonzentrationen nach links verschiebt.

Diese Frage wurde stellvertretend für den Effekt von Oleoyl-CoA auf die ^3H -P1075 Bindung an $K_{IR}6.2/\text{SUR2A}$ geprüft. Dazu verwendeten wir Membranen aus transient mit $K_{IR}6.2/\text{SUR2A}$ transfizierten Zellen von Dr. Annette Hambrock, die innerhalb von 24h nach Aufbereitung gemessen wurden. Allerdings konnten aus den bereitgestellten Chargen ($n=5$) nur zwei Messungen verwendet werden, da die spezifische Bindung in den restlichen Chargen zu gering war, um sinnvolle Ergebnisse zu gewinnen. Wegen Schwierigkeiten beim Nachschub der $K_{IR}6.2/\text{SUR2A}$ Membranen wurde die Versuchsreihe nicht weitergeführt.

Die zwei verwertbaren Messungen der Modulation der ^3H -P1075-Bindung durch Oleoyl-CoA ergab wiederum keinen Anstieg der nichtspezifischen Bindung (NSB) und zudem konnte auch, wie schon bei SUR2A, die spezifische ^3H -P1075 Bindung vollständig verdrängt werden. Dabei ergab, bei einer Radioligandkonzentration von $L_0 = 3.62 \text{ nM}$ die Verdrängung einen pIC_{50} -Wert von 4.19 ± 0.09 (s. Abbildung 19), entsprechend einem IC_{50} -Wert von $65 \text{ }\mu\text{M}$ [43, 98]. Daraus lies sich eine monophasische Verdrängungskurve nach Gleichung 16 erstellen, die einen Hill-Koeffizient von 1.19 ± 0.11 bei einer spezifische Bindung von $B_S = 13.7 \pm 1.4 \text{ fmol/mg}$ hatte (s. Tabelle 5).

Vergleicht man diese Messung mit dem allein exprimierten SUR2A (s. Tabelle 4), so stellten wir wider Erwarten sogar eine Erhöhung der IC_{50} um den Faktor 4.6 fest. Obwohl nur zwei Versuche unter den Bedingungen der Koexpression auswertbar waren, soll eine Fehlerabschätzung versucht werden. Auf der Ebene der pIC_{50} Werte ergibt sich für den Effekt der Koexpression (Tabelle 4 und Tabelle 5):

3. Ergebnisse

$$\Delta \equiv \text{pIC}_{50}(+\text{K}_{\text{IR}6.2}) - \text{pIC}_{50}(-\text{K}_{\text{IR}6.2}) = 4.19 \pm 0.09 - (4.85 \pm 0.03) = -0.66 \pm 0.10$$

Gleichung 21

Auf der Ebene der IC_{50} Werte erhält man mit

$$f = 10^{-(\Delta \pm \sigma_{\Delta})} = 4.6 (3.6, 5.8) .$$

Gleichung 22

Der geringe Fehler bzw. das kleine Konfidenzintervall lassen vermuten, dass die Erhöhung des IC_{50} -Wertes durch Koexpression mit $\text{K}_{\text{IR}6.2}$ signifikant ist. Auf jeden Fall kann man aber ausschließen, dass die Koexpression mit $\text{K}_{\text{IR}6.2}$ den SUR2A empfindlicher für Oleoyl-CoA macht, d.h. die Konzentrations- Wirkungskurve nach links zu physiologischen Konzentrationen verschiebt.

Wiederum wurden keine Konzentrationen $<10^{-6}\mu\text{M}$ untersucht, da zu diesem Zeitpunkt der stimulatorische Effekt noch nicht bekannt war. Daher wurde eine bei der Koexpression möglicherweise existierende stimulatorische Komponente nicht erfasst.

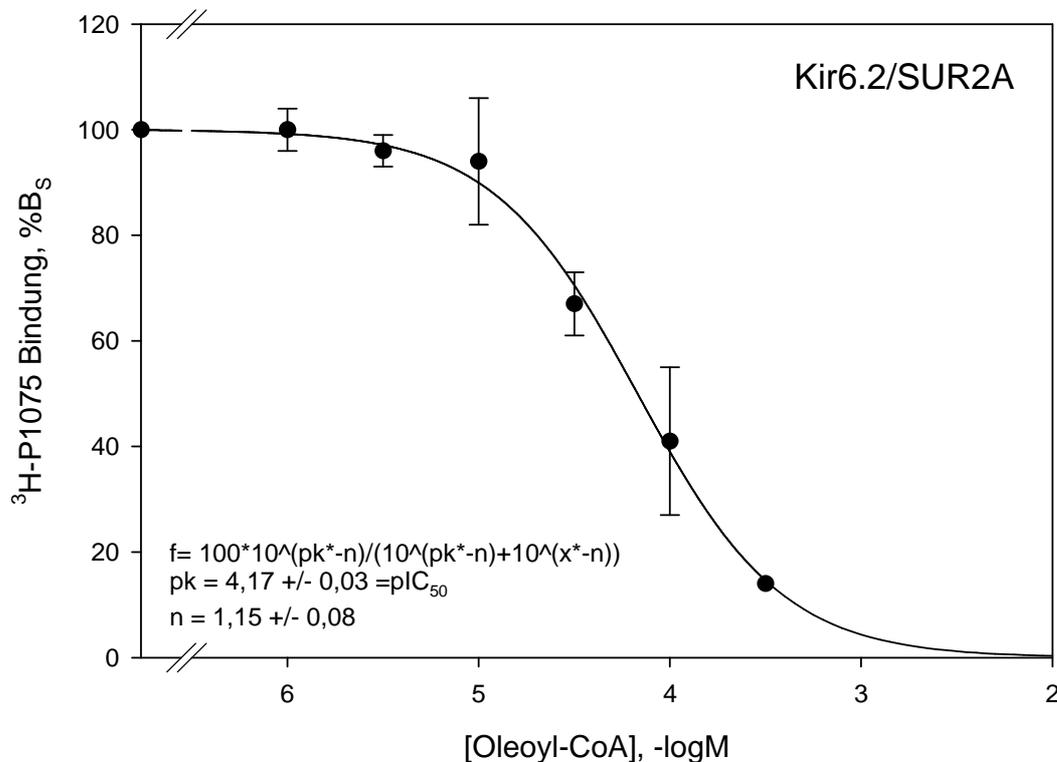


Abbildung 19: Effekt von Oleoyl-CoA auf die ${}^3\text{H-P1075}$ Bindung an SUR2A/Kir6.2:
Mittelwerte \pm SEM aus $n=2$ Experimenten; [ATP]=0.3 mM; $[\text{Mg}^{2+}] = 1$ mM; $L_0 = 3.62$ nM; $B_S = 13.7 \pm 1.4$ fmol/mg (=100%), $B_{\text{TOT}} = 19 \pm 1$ fmol/mg; $\text{NSB} = 26 \pm 3$ % B_{TOT} ; $A = 100$ % B_S ; $\text{PK} = 0.80 \pm 0.15$ mg/ml; Inkubationszeit=13min

3. Ergebnisse

Oleoyl-CoA						
Rezeptor	Stimulation			Inhibition		
	EC ₅₀ pEC ₅₀ (-log M)	A(%B _S)	n _H	IC ₅₀ pIC ₅₀ (-log M)	A(%B _S)	n _H
Kir6.2/SUR2A				65 [43, 98] μM 4.19±0.09	100	1.19±0.11

Tabelle 5: Effekt von Oleoyl-CoA auf die ³H-P1075 Bindung an SUR2A/Kir6.2 (Gemittelte Parameter aus n=2 Einzelversuchen; Vergleiche Kap. 2.8)

3.2.5. Effekt von Malonyl-CoA und Oleat auf die ³H-P1075 Bindung an SUR2A in Membranen

Um die Spezifität des langkettigen Acyl-CoA Oleoyl-CoA zu überprüfen, wurden auch Versuche mit einem kurzkettigen Acyl-CoA (Malonyl-CoA) und mit der Fettsäure Oleoilsäure vorgenommen. Liu et al., 2001a beschreiben eine Blockierung des K_{ATP}-Kanals durch Oleat, die sich auch nicht durch PIP₂ und Oleoyl-CoA aufheben ließ (gegenteiliger Effekt von Oleoyl-CoA). Bränström et al. 1998 konnten für Malonyl-CoA keinen Effekt auf K_{IR}6.2ΔC26 messen.

In unseren Versuchen erhöht 300μM Oleat die unspezifische Bindung auf das 2.7fache und hemmt die spezifische Bindung auf 14 ± 3 %B_S der Kontrolle. Unter denselben Bedingungen verdrängt 300μM Oleoyl-CoA die spezifische Bindung auf unter 5%, d.h. Oleoyl-CoA ist potenter als Oleat.

Malonyl-CoA hat keinen Einfluss auf die unspezifische Bindung. Bei 100μM zeigt Malonyl-CoA noch keinen Effekt (93±9%, p=0.474 (student t-Test)), bei 300μM erniedrigt es die spezifische Bindung auf 64 ± 7 % (student t-Test: t_(300μM) = 4.8; p=0.017). Daraus lässt sich schließen, dass die IC₅₀ zwischen 300 und 1000μM liegen muss.

3. Ergebnisse

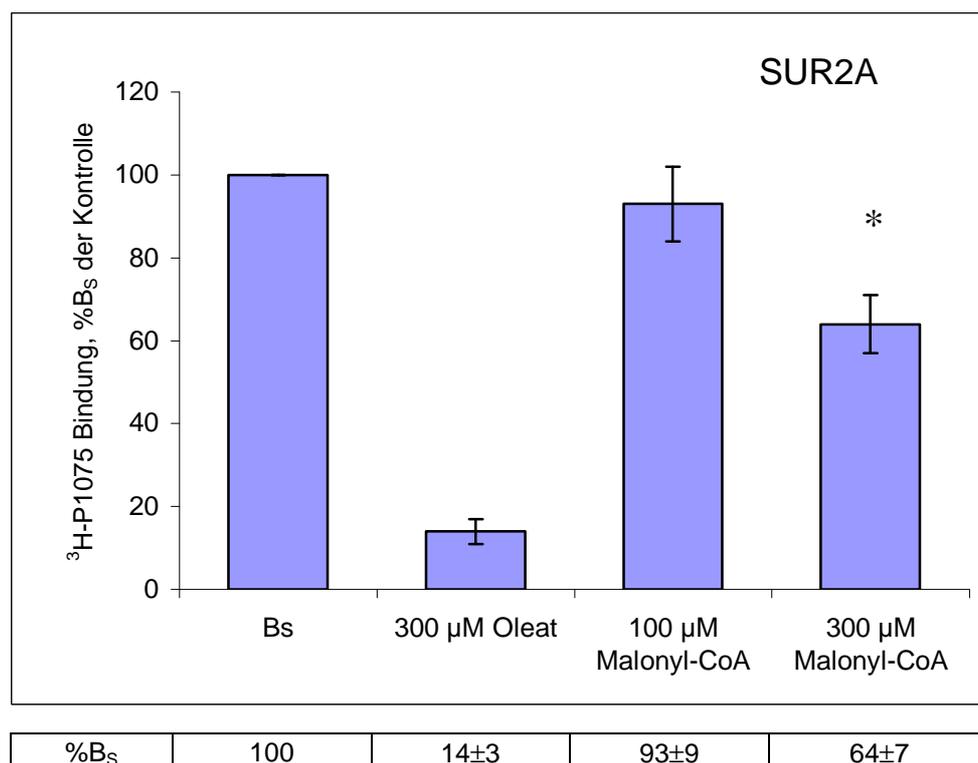


Abbildung 20: Effekt von Malonyl-CoA und Oleat auf die ³H-P1075 Bindung an SUR2A: Mittelwerte±SEM aus n=4 Experimenten; [ATP]=0.3 mM; [Mg²⁺]=1 mM; L₀= 1.79±0.08 nM; B_S= 61±8 fmol/mg (=100%), B_{TOT}=68±9 fmol/mg; NSB=27±4 (Oleat) / 7±1 (Malonyl-CoA) %B_{TOT}; PK=0.34±0.05 mg/ml; Inkubationszeit=13min

3.2.6. Modulation der ³H-GBC Bindung an SUR2A (Y1206S) in Membranen

3.2.6.1. Effekt von DOGS-NTA auf die ³H-GBC Bindung an SUR2A (Y1206S) in Membranen

Die Bindung von PIP₂ und anderen negativ geladenen Lipiden an K_{IR}6.2 macht die Kanäle unempfindlich für die blockierende Wirkung von Glibenclamid (GBC), wobei diese Hemmung nichtkompetitiv ist (Krauter et al., 2001). Wir wollen hier nun überprüfen, ob diese Lipide auch die Bindung von GBC an SUR beeinflussen. Da jedoch die Affinität der SUR2 Wildsubtypen für GBC mit K_D = 25-30 nM zu schwach für quantitative Bindungsexperimente ist, verwendeten wir die Mutante SUR2A (Y1206S). Durch den Austausch von Tyrosin an der Stelle 1206 zwischen dem Transmembransegment 15 und 16 des SUR2A (vgl.

3. Ergebnisse

Abbildung 2) durch Serin wurde die GBC-Bindung an SUR2 um ≈ 10 fach stärker, während sich die sonstigen pharmakologischen Eigenschaften (^3H -P1075 Bindung, etc) nicht ändern (Hambrock et al., 2001, 2002a, Löffler-Walz et al., 2002, Ruß et al., 2003, im Druck, Stauß et al., in Vorbereitung).

Bei ^3H -GBC wird die nichtspezifische Bindung durch heterologe Konkurrenz mit 100 μM P1075 gemessen (Hambrock et al., 2001, Löffler-Walz et al., 2002). Unsere 6 Experimente ergaben in diesem Zusammenhang, im Gegensatz zu den Experimenten mit ^3H -P1075 (Kap. 3.2.2), keinen Anstieg der nichtspezifischen Bindung von ^3H -GBC bei zunehmender DOGS-NTA Konzentration. Weiterhin zeigte sich, dass DOGS-NTA die spezifische ^3H -GBC Bindung ($B_S = 96 \pm 22$ fmol/mg) mit einem pIC_{50} -Wert von 4.43 ± 0.21 (IC_{50} -Wert = 37 μM [14, 98]) um $A = 82 \pm 11$ auf 18 ± 11 % B_S hemmt. (s. Abbildung 21 und Tabelle 6).

Ein stimulatorischer Effekt wurde in diesem Experiment mit der Mutante, im Gegensatz zum Wildtyp und ^3H -P1075 als Radioligand, nicht gefunden. Um ihn aber sicher auszuschließen, muss man noch den Bereich < 1 μM [DOGS-NTA] untersuchen, der hier nicht gemessen wurde.

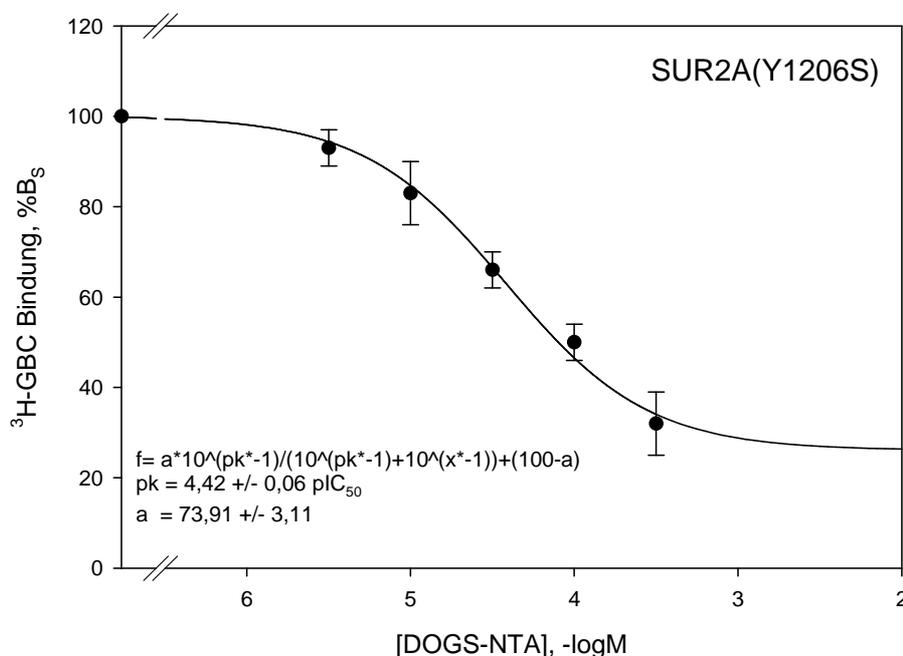


Abbildung 21: Effekt von DOGS-NTA auf die ^3H -GBC Bindung an SUR2A (Y1206S) : Mittelwerte \pm SEM aus $n=6$ Experimenten; [ATP]=0.3 mM; $[\text{Mg}^{2+}] = 1$ mM; $L_0 = 2.00 \pm 0.26$ nM; $B_S = 96 \pm 22$ fmol/mg (=100%), $B_{\text{TOT}} = 170 \pm 4$ fmol/mg; $\text{NSB} = 47 \pm 5$ % B_{TOT} ; $A = 74 \pm 3$ % B_S ; $\text{PK} = 0.38 \pm 0.04$ mg/ml; Inkubationszeit=15min

3. Ergebnisse

DOGS-NTA						
Rezeptor	Stimulation			Inhibition		
	EC ₅₀ pEC ₅₀ (-log M)	A(%B _S)	n _H	IC ₅₀ pIC ₅₀ (-log M)	A(%B _S)	n _H
SUR2A (Y1206S)	?	?	?	37 [14, 98] μM 4.43±0.21	82±11	1 (fix)

Tabelle 6: Effekt von DOGS-NTA auf die ³H-GBC Bindung an SUR2A (Y1206S) (Gemittelte Parameter aus n=6 Einzelversuchen; Vergleiche Kap. 2.8)

3.2.6.2. Effekt von Oleoyl-CoA auf die ³H-GBC Bindung an SUR2A (Y1206S) in Membranen

Analog den vorigen Experimenten mit ³H-P1075 und Wildtyp SUR2A untersuchten wir die Wirkung von Oleoyl-CoA auf die ³H-GBC Bindung an die Mutante SUR2A (Y1206S). In Kap. 3.2.3 zeigte sich am Wildtyp eine bis zu 100%ige monophasische Hemmung der ³H-P1075 Bindung. Die unspezifische Bindung von ³H-P1075 wurde nicht beeinflusst.

Demgegenüber fanden wir in unseren Experimenten an der Mutanten, dass Oleoyl-CoA konzentrationsabhängig die nichtspezifische Bindung von ³H-GBC (gemessen in Gegenwart von 100 μM P1075) reduzierte. Dieser Abfall konnte durch einen Fit mit den folgenden Werten beschrieben werden: pIC₅₀ = 4.46 ± 0.01; IC₅₀ = 35 μM [33, 36]; n_H = 1.00 ± 0.01; A = 35 ± 0,2 %B_S.

Die Modulation der spezifischen ³H-GBC-Bindung (an SUR2A(Y1206S)) durch Oleoyl-CoA zeigte eine stimulatorische und inhibitorische Komponente. Die Stimulation hatte eine Amplitude von 52 ± 6 %B_S mit einem pEC₅₀-Wert von 8.52 ± 0.36 (EC₅₀ = 0.003 [0.0006, 0.02] μM); die hemmende Komponente hatte eine Amplitude von 152 ± 6 %B_S; der pIC₅₀-Wert war 4.38 ± 0.09 (IC₅₀ = 42 [28, 63] μM) (s. Abbildung 22).

Es fällt auf, dass die Hemmung der spezifischen Bindung mit ähnlichem IC₅₀-Wert auftritt wie die Hemmung der NSB. Dies könnte zum einen auf die physikalisch-chemischen Eigenschaften des Oleoyl-CoA zurückzuführen sein (z.B. Mizellenbildung oder Ähnliches), zum anderen könnte es bei diesen Konzentrationen eine Interferenz mit der ³H-GBC Bindung ergeben.

3. Ergebnisse

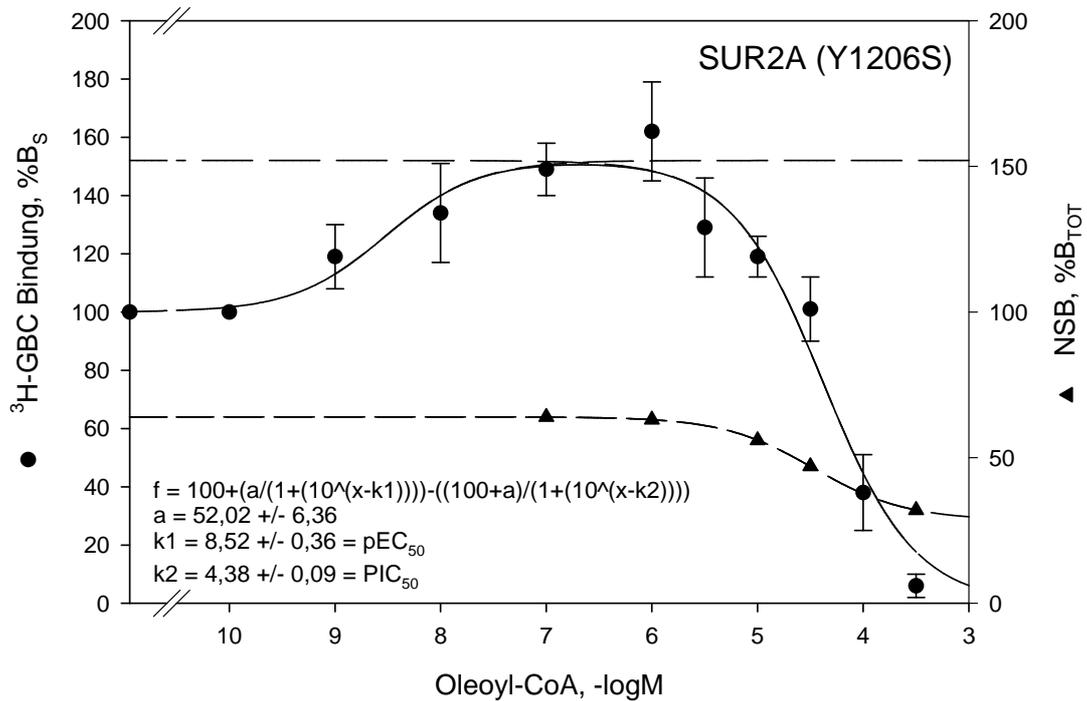


Abbildung 22: Effekt von Oleoyl-CoA auf die ^3H -GBC Bindung an SUR2A (Y1206S) : Mittelwerte \pm SEM aus n=6 Experimenten; [ATP]=0.3 mM; $[\text{Mg}^{2+}]$ =1 mM; L_0 = 2.34 \pm 0.17 nM; ● Modulation durch Oleoyl-CoA: B_S = 74 \pm 14 fmol/mg (=100%), B_{TOT} =109 \pm 6 fmol/mg; PK=0.36 \pm 0.02 mg/ml; Inkubationszeit=15min ▲ NSB: pIC₅₀=4.46 \pm 0.01, IC₅₀=35 μ M [33;35], n_H =1.00 \pm 0.01, **A = 35 \pm 0,2 %B_S**

Rezeptor	Oleoyl-CoA					
	Stimulation			Inhibition		
	EC ₅₀ pEC ₅₀ (-log M)	A(%B _S)	n _H	IC ₅₀ pIC ₅₀ (-log M)	A(%B _S)	n _H
SUR2A (Y1206S)	0.003 [0.0006, 0.02] μ M 8.52 \pm 0.36	52 \pm 6	1 (fix)	42 [28, 63] μ M 4.38 \pm 0.09	152	1 (fix)
NSB				35 [33, 36] μ M 4.46 \pm 0.01	35 \pm 1	1.00 \pm 0.01

Tabelle 7: Effekt von Oleoyl-CoA auf die ^3H -GBC Bindung an SUR2A (Y1206S) (alle Werte aus dem Mittelwertsfit in Abbildung 22)

3.3. Effekt von Poly-D-Lysin auf die Lipid- und Fettsäurewirkungen

Wie mehrere Autoren (Fan und Makielski, 1999; Huang et al., 1998; MacGregor et al., 2002) beschrieben haben, lässt sich die durch die stark negativ geladenen Anionen PIP_2 und DOGS-NTA hervorgerufene Sensitivitätsminderung von $\text{K}_{\text{IR}6.2}$ auf ATP durch Polykationen wie Neomycin und Poly-L-Lysin antagonisieren. Dies lässt darauf schließen, dass die Wirkung der Lipide am $\text{Kir}6.2$ vor allem elektrostatischer Natur ist. Allerdings veränderte sich durch Poly-Lysin nicht die durch PIP_2 (bzw. DOGS-NTA) hervorgerufene Wirkungslosigkeit der KCOs (Krauter et al., 2001) und auch der Effekt von Tolbutamid wurde nur sehr partiell wiederhergestellt (Koster et al., 1999).

Hier sollte nun untersucht werden, wie sich die Modulation der ^3H -P1075 Bindung an SUR2A durch DOGS-NTA und Oleoyl-CoA bei der Zugabe von Poly-Lysin (Poly-D-Lys) verhält. Wir wählten als Rezeptormaterial SUR2A für die ^3H -P1075 Bindung und die Mutante für ^3H -GBC, da hier die Modulation der Bindung der beiden Radioliganden durch DOGS-NTA und Oleoyl-CoA am deutlichsten war und sich deshalb eine mögliche Veränderung durch Poly-D-Lysin auch am stärksten abzeichnen sollte.

3.3.1. Wirkung von Poly-D-Lysin auf B_{TOT} , NSB und B_{S} für ^3H -P1075 und ^3H -GBC

Schon zu Beginn der ersten Experimente zeigte sich eine unerwartete Erhöhung der spezifischen Bindung (B_{S}) durch Poly-D-Lysin, die sich in den weiteren Versuchen als signifikant erwies (Students t-test ($n=10/9$): $p_{(\text{SUR}2\text{A}/3\text{H-P}1075)}=0.001$; $p_{(\text{SUR}2\text{A}(\text{Y}1206\text{S})/3\text{H-GBC})}=0.017$). Dabei unterschieden sich die beiden Systeme: Während sich bei SUR2A nach Zugabe von 0.1 mg/ml Poly-D-Lysin nur die totale Bindung (B_{TOT}) von 3H-P1075 erhöhte und die nichtspezifische Bindung (NSB) konstant blieb, so erhöhten sich bei SUR2A(Y1206S) sowohl B_{TOT} als auch NSB von 3H-GBC. In beiden Fällen stieg die spezifische Bindung des jeweiligen Radioliganden signifikant an (s. Abbildung 23 und Tabelle 8).

3. Ergebnisse

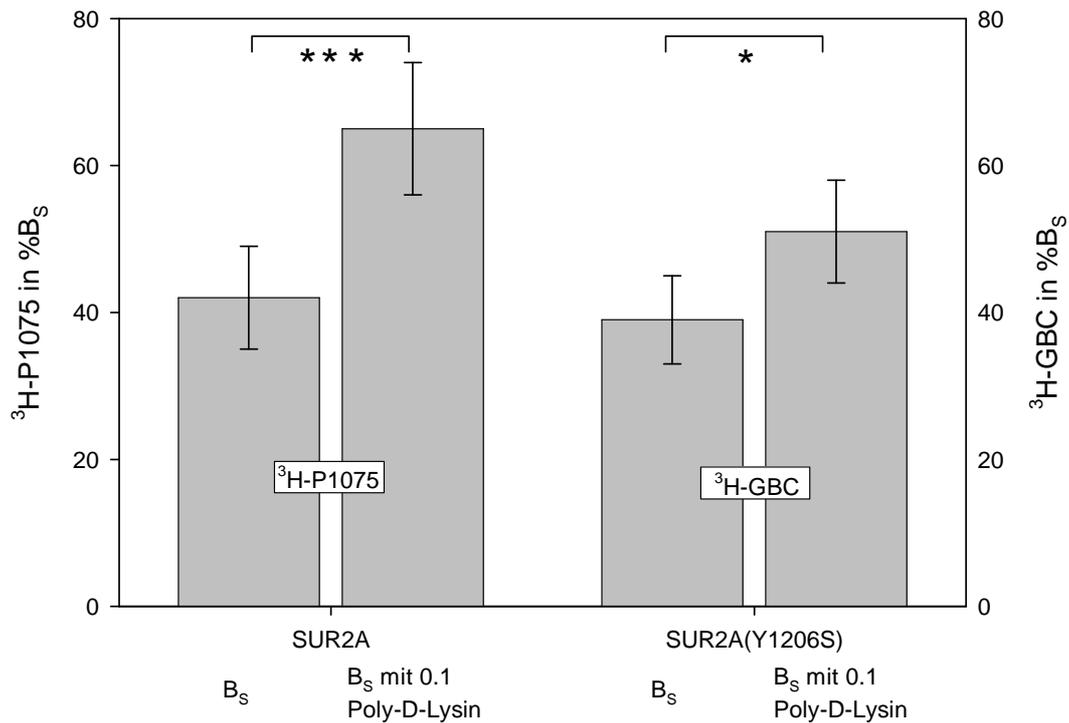


Abbildung 23: Wirkung von Poly-D-Lysin auf B_s

SUR	n	Radioligand L ₀ , nM	Protein μg/300μl	Kontrolle (- Poly-D-Lysin)			+ Poly-D-Lysin 0,1 mg/ml			ΔB _s ¹	ΔB _s / %B _s Kontrolle
				B _{TOT} ¹	NSB ¹	B _s ¹	B _{TOT} ¹	NSB ¹	B _s ¹		
2A	10	³ H-P1075 2,30±0,16	133±9	53±5	8±1	42±7	68±11	7±1	65±9	23±11	54±27%
2A (Y1206S)	9	³ H-GBC 2,15±0,04	101±10	139±9	90±12	39±6	203±17	152±12	51±7	12±9	30±23%

Tabelle 8: Wirkung von 0.1 mg/ml Poly-D-Lysin auf B_{TOT}, NSB und B_s, ¹ = in fmol/mg

Der Grund dieser Erhöhung ist unklar, denn es kann sowohl ein Effekt auf die maximale Bindung (B_{MAX}) als auch auf die Affinität der Radioliganden sein. Dieser Eigeneffekt von Poly-D-Lysin komplizierte die weitere Analyse der Versuche erheblich.

3. Ergebnisse

3.3.2. Effekt von Poly-D-Lysin auf die Modulation der $^3\text{H-P1075}$ Bindung durch DOGS-NTA gemessen an SUR2A

In dieser Versuchsreihe wurde versucht, die Hemmung der $^3\text{H-P1075}$ Bindung an SUR2A durch DOGS-NTA durch Poly-D-Lysin zu beeinflussen. Dabei wurden Lipid und Polykation dem Protein zeitgleich hinzugefügt. Wie sich im folgenden Versuch (Kap.3.3.3) herausstellte, neutralisierte Poly-D-Lysin einen Teil des DOGS-NTA, bevor dieses mit dem Protein interagieren konnte. Die durch diese Versuche gewonnenen Werte haben auf Grund der geringen Versuchszahl ($n=3$) nur vorläufigen Charakter und müssen durch weitere Versuche verifiziert werden. Es ergab sich kein signifikanter Effekt von Poly-D-Lysin: So reduzierten die eingesetzten $100\mu\text{M}$ DOGS-NTA die spezifische Bindung auf $49\pm 6\% B_S$ ($B_S = 47\pm 7\text{ fmol/mg}$); die Zugabe von 0.1 mg/ml Poly-D-Lysin erhöhte die spezifische Bindung um $31\pm 8\% B_S$. Folgend die Mittelwertstabelle:

B_S Kontrolle	Poly-D-L. 0.1 mg/ml	DOGS-NTA $100\mu\text{M}$	Poly-D-L. +DOGS-NTA	ΔB_S Poly-D-L.	ΔB_S (Poly-D-L. +DOGS-NTA)
fmol/mg	$\% B_S$	$\% B_S$	$\% B_S$	$\% B_S$	$\% B_S$
47 ± 7	131 ± 8	49 ± 6	72 ± 20	31 ± 8	23 ± 17

Tabelle 9: Effekt von 0.1 mg/ml Poly-D-Lysin auf die Modulation der $^3\text{H-P1075}$ Bindung durch DOGS-NTA gemessen an SUR2A: Mittelwertstabelle nach Zugabe von Poly-D-Lysin aus $n=3$ Versuchen; $[\text{ATP}]=0.3\text{ mM}$; $[\text{Mg}^{2+}]=1\text{ mM}$; $L_0= 2,33\pm 0,28\text{ nM}$; $B_S= 47\pm 7\text{ fmol/mg}$ ($=100\%$), $B_{\text{TOT}}=55\pm 6\text{ fmol/mg}$; $\text{NSB}=8\pm 2\% B_{\text{TOT}}$; $\text{PK}=0.40\pm 0.04\text{ mg/ml}$; Inkubationszeit= 13 min

3.3.3. Effekt von Poly-D-Lysin auf die Modulation der $^3\text{H-P1075}$ Bindung durch Oleoyl-CoA gemessen an SUR2A

In dieser Versuchsreihe wurde wieder Poly-D-Lysin und Oleoyl-CoA dem Protein zeitgleich hinzugefügt. Wie sich später herausstellte, neutralisierte das Poly-D-Lysin wahrscheinlich einen Teil des Oleoyl-CoA, bevor dieses mit dem Protein interagieren konnte. So wurden zwar $100\mu\text{M}$ Oleoyl-CoA eingesetzt, dieses entfaltete allerdings, wie der Vergleich mit der Hemmkurve (Abbildung 18, Kap. 3.2.3) zeigt, nur die Wirkung von $30\mu\text{M}$ Oleoyl-CoA. Deshalb wurden

3. Ergebnisse

noch zusätzlich Versuche mit der ‚richtigen‘ (Serie 2) Pipettierreihenfolge und 100µM Oleoyl-CoA durchgeführt (d.h. Poly-D-Lysin Zugabe erst, nachdem das Lipid durch Beschallung in die Membran inkorporiert worden war). Diese Versuche sind in Tabelle 10 zusammengefasst. Die wirksamen 30µM Oleoyl-CoA reduzierten die spezifische Bindung auf $23 \pm 1 \%B_S$ ($B_S = 51 \pm 9$ fmol/mg), die 100µM Oleoyl-CoA reduzierten auf $7 \pm 2 \%B_S$ ($B_S = 53 \pm 13$ fmol/mg). Trotz der geringen Versuchszahl (n=4) zeigen die Versuche, dass 0.1 mg/ml Poly-D-Lysin zumindestens den Effekt von 30 µM Oleoyl-CoA (Serie 1) auf die ^3H -P1075 Bindung an SUR2A zu einem Teil aufheben kann; gegen 100 µM Oleoyl-CoA ist kein signifikanter Effekt nachweisbar.

Serie	[Oleoyl-CoA]	– Poly-D-Lysin		+ Poly-D-Lysin		ΔB_S
		B_S Kontrolle fmol/mg	B_S Oleoyl-CoA % B_S	B_S Kontrolle fmol/mg	B_S Oleoyl-CoA % B_S	% B_S
1	30 µM	51±9	23±1	128±10	74±14	52±14
2	100 µM	53±13	7±2	139±12	20±6	13±4

Tabelle 10: Effekt von 0.1 mg/ml Poly-D-Lysin auf die Modulation der ^3H -P1075 Bindung durch Oleoyl-CoA gemessen an SUR2A: Mittelwertstabelle nach Zugabe von Poly-D-Lysin aus n=4 Versuchen; [ATP]=0.3 mM; $[\text{Mg}^{2+}]$ =1 mM; $L_0 = 2,21 \pm 0,20$ nM; $B_S = 51 \pm 9$ fmol/mg bzw. $= 53 \pm 13$ fmol/mg (=100%), $B_{\text{TOT}} = 56 \pm 7$ fmol/mg; NSB = $7 \pm 1 \%B_{\text{TOT}}$; PK = 0.39 ± 0.03 mg/ml; Inkubationszeit = 13min

3.3.4. Effekt von Poly-D-Lysin auf die Modulation der ^3H -GBC Bindung durch Oleoyl-CoA gemessen an SUR2A (Y1206S)

In diesen 10 Experimenten zeigte sich die für die ^3H -GBC Bindung an SUR2A(Y1206S) ‚typische‘ hohe unspezifische Bindung von $70 \pm 3 \%B_{\text{TOT}}$ ($B_{\text{TOT}} = 131 \pm 9$ fmol/mg). Die Zugabe von Poly-D-Lysin erhöhte die spezifische ^3H -GBC Bindung ($B_S = 40 \pm 5$ fmol/mg) um $24 \pm 6 \%B_S$. Oleoyl-CoA senkte zunächst die spezifische Bindung auf $46 \pm 8 \%B_S$ (s. Kap. 3.2.6.2) und wurde durch Zugabe von Poly-D-Lysin um 37 ± 6 fmol/mg auf $83 \pm 13 \%B_S$ erhöht.

3. Ergebnisse

Diese beiden Erhöhungen sind signifikant voneinander verschieden (student t-test: $p=0.026$), das heißt, dass Poly-D-Lysin den Effekt von Oleoyl-CoA zu einem kleinen Teil aufheben kann.

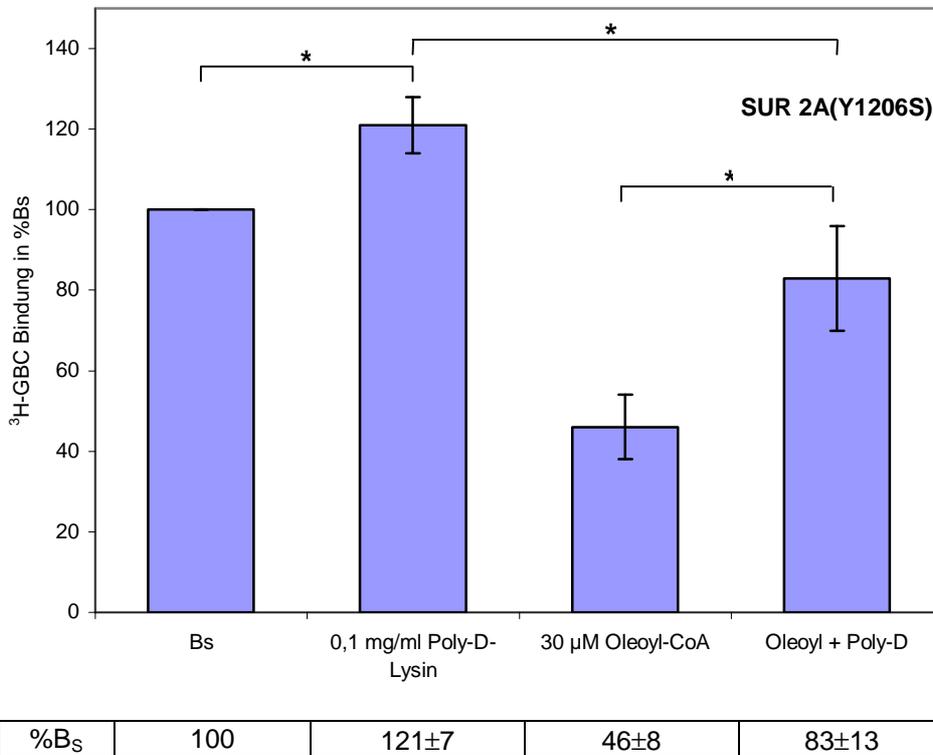


Abbildung 24: Effekt von Poly-D-Lysin auf die Modulation der ³H-GBC Bindung durch Oleoyl-CoA gemessen an SUR2A (Y1206S) : Mittelwerte±SEM aus n=10 Experimenten; [ATP]=0.3 mM; [Mg²⁺]=1 mM; L₀= 2.15±0.04 nM; B_S= 40±5 fmol/mg (=100%), B_{TOT}=131±9 fmol/mg; NSB=70±3 %B_{TOT}; PK=0.31±0.03 mg/ml; Inkubationszeit=15min

+ Poly-D-Lysin	+ Oleoyl-CoA	+ Poly-D-Lysin und Oleoyl-CoA	Δ B _S / Poly-D-Lysin	Δ Oleoyl / Poly-D-Lysin + Oleoyl-CoA
124±6	46±8	83±13	24±6	37±6

Tabelle 11: Effekt von Poly-D-Lysin auf die Modulation der ³H-GBC Bindung durch Oleoyl-CoA gemessen an SUR2A (Y1206S): alle Werte in %B_S (B_S=40±5)

3.4. Modulation der $^3\text{H-P1075}$ Bindung an SUR2B

SUR2B ist die regulatorische Untereinheit der K_{ATP} -Kanäle in glatten Muskelzellen. SUR2B ist zu 97% homolog zu SUR2A; die beiden Subtypen unterscheiden sich nur beim Spleißen der 2 terminalen Exons in den letzten 42 Aminosäuren (s. Kapitel 1.4.2). Es ist daher von Interesse, ob sich die Lipid- und Fettsäurewirkung auf die Ligandbindung der SUR2-Subtypen unterscheidet. Eventuelle Unterschiede könnten Hinweise auf eine Mitwirkung des Carboxyterminus auf die beobachteten Effekte geben.

3.4.1. Effekt von PIP_2 auf die $^3\text{H-P1075}$ Bindung an SUR2B in Membranen

Aus oben genanntem Grund untersuchten wir hier nun die PIP_2 Wirkung an SUR2B. Wie schon bei SUR2A (s. Kapitel 3.2.1) fiel kein Anstieg der nichtspezifischen $^3\text{H-P1075}$ Bindung auf. In 7 Experimenten zeigte sich eine konzentrationsabhängige Hemmung der $^3\text{H-P1075}$ Bindung, die bei $100\mu\text{M}$ $\text{PIP}_2 = 38 \pm 5 \%B_s$ betrug. Konzentrationen $>100\mu\text{M}$ wurden nicht gemessen, da zum einen der Preis von PIP_2 limitierend war, zum anderen unphysiologische Bereiche erreicht werden.

Extrapoliert man die Hemmkurve bis auf eine 100%ige Verdrängung der $^3\text{H-P1075}$ -Bindung durch PIP_2 mit einem Hill-Koeffizienten von $n_H = 1.0$, so ergibt sich ein theoretischer pIC_{50} – Wert von 3.76 ± 0.03 (s. Abbildung 25), welcher einem IC_{50} -Wert von $173 \mu\text{M}$ [151, 199] entspricht (s. Tabelle 12).

Im Gegensatz zu SUR2A (s. Abbildung 14) zeigte sich kein Anstieg der spezifischen $^3\text{H-P1075}$ Bindung (bei $B_s = 141 \pm 14 \text{ fmol/mg}$), was aber auch daran liegen kann, dass er bei niederen Konzentrationen auftritt, die hier nicht berücksichtigt wurden.

3. Ergebnisse

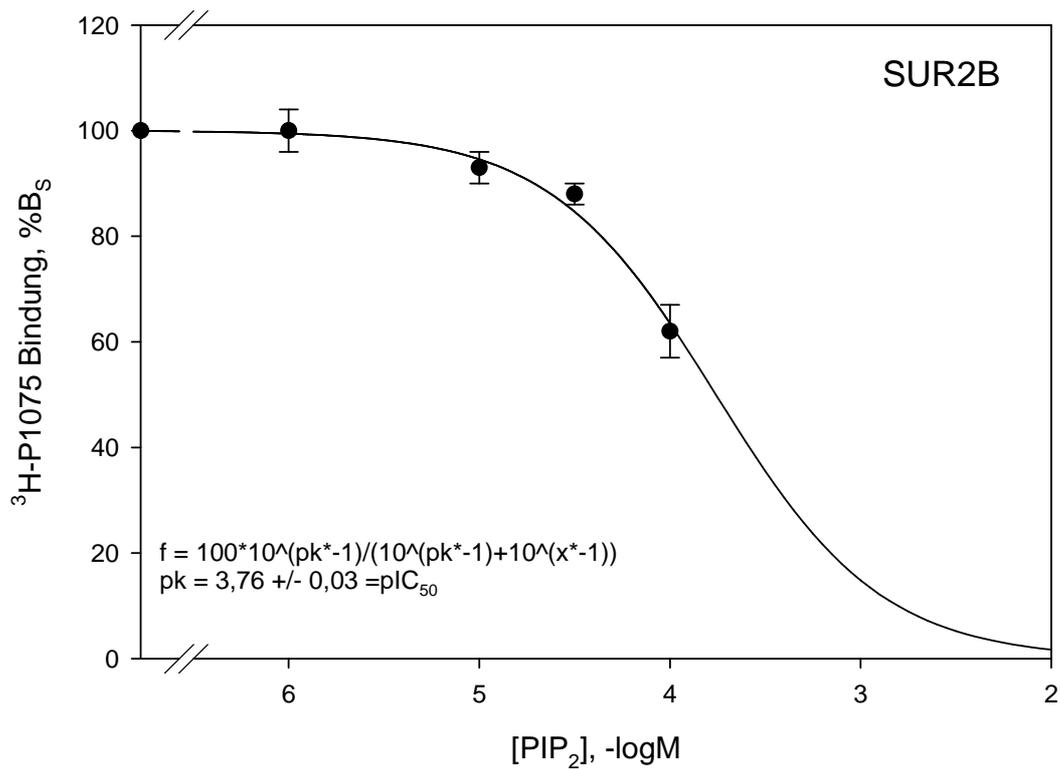


Abbildung 25: Effekt von PIP_2 auf die $^3\text{H-P1075}$ Bindung an SUR2B in Membranen: Mittelwerte \pm SEM aus $n=7$ Experimenten; $[ATP]=1$ mM; $[Mg^{2+}]=2.2$ mM; $L_0=1.93$ nM; $B_S=141 \pm 14$ fmol/mg (=100%), $NSB=6 \pm 1$ % B_{TOT} ; $A=100$ % B_S (fix); $PK=0.24 \pm 0.03$ mg/ml; Inkubationszeit=4min

Rezeptor	PIP_2					
	Stimulation			Inhibition		
	EC_{50} p EC_{50} (-log M)	A(% B_S)	n_H	IC_{50} p IC_{50} (-log M)	A(% B_S)	n_H
SUR2B				173 [151, 199] μM 3.76 \pm 0.03	100 (fix)	1 (fix)

Tabelle 12: Effekt von PIP_2 auf die $^3\text{H-P1075}$ Bindung an SUR2B in Membranen (alle Werte aus dem Mittelwertsfit in Abbildung 25)

3. Ergebnisse

3.4.2. Effekt von DOGS-NTA auf die ^3H -P1075 Bindung an SUR2B in Membranen

Analog dem vorherigen Experiment untersuchen wir hier, ob DOGS-NTA eine unterschiedliche Wirkung auf die ^3H -P1075 Bindung an SUR2A und SUR2B hat; dies würde einen konkreten Hinweis auf die Wirkstelle im SUR Protein ergeben.

Wie schon bei SUR2A (s. Abbildung 15) zeigte sich, dass sich die spezifische ^3H -P1075 Bindung ($B_S = 192 \pm 26$ fmol/mg) durch DOGS-NTA nicht vollständig, sondern nur um 87 ± 4 % B_S verdrängen ließ. Ebenso fiel ein vergleichbarer Anstieg der nichtspezifischen Bindung von 4 auf 10 % B_{TOT} auf (nicht dargestellt). Die 6 Experimente ergaben für die Modulation der ^3H -P1075-Bindung durch DOGS-NTA bei einer Radioligandkonzentration von $L_0 = 3.23$ nM einen pIC_{50} von 4.37 ± 0.09 (s.

Abbildung 26), welcher einem IC_{50} von 43 [28, 65] μM entspricht. Der Hill-Koeffizient lag bei 0.96 ± 0.04 (s. Tabelle 13).

In dieser Versuchsreihe konnte kein stimulatorischer Effekt wie bei SUR2A nachgewiesen werden, was aber möglicherweise daran liegt, dass er in dieser Konstellation bei niederen Konzentrationen auftritt, die nicht geprüft wurden.

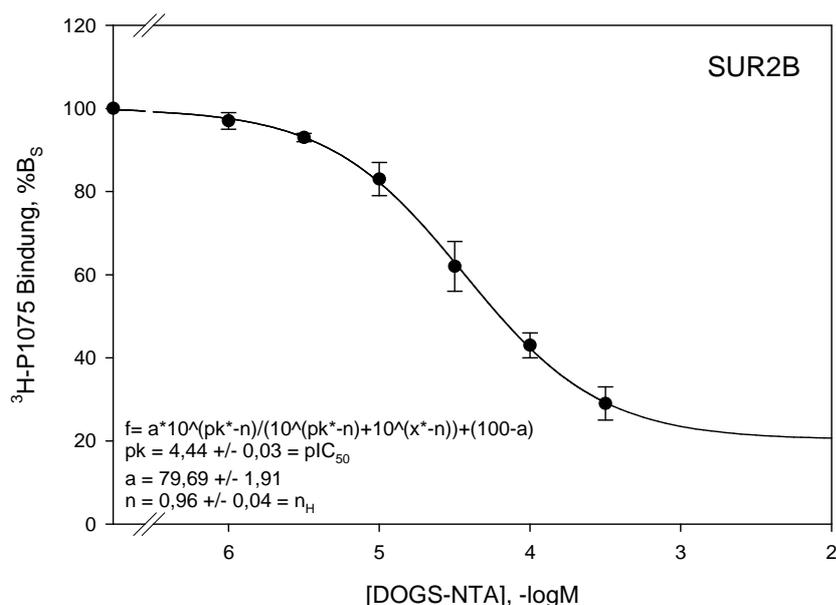


Abbildung 26: Effekt von DOGS-NTA auf die ^3H -P1075 Bindung an SUR2B: Mittelwerte \pm SEM aus $n=6$ Experimenten; [ATP]=0.3 mM; $[\text{Mg}^{2+}]$ =1 mM; $L_0 = 3.23 \pm 0.41$ nM; $B_S = 192 \pm 26$ fmol/mg (=100%), $B_{\text{TOT}} = 200 \pm 27$ fmol/mg; NSB=4-10 % B_{TOT} ; $A = 80 \pm 2$ % B_S ; $\text{PK} = 0.31 \pm 0.05$ mg/ml; Inkubationszeit=30min

3. Ergebnisse

DOGS-NTA						
Rezeptor	Stimulation			Inhibition		
	EC ₅₀ pEC ₅₀ (-log M)	A(%B _S)	n _H	IC ₅₀ pIC ₅₀ (-log M)	A(%B _S)	n _H
SUR2B				43 [28, 65] μM 4.37±0.09	87±4	0.96±0.04

Tabelle 13: Effekt von DOGS-NTA auf die ³H-P1075 Bindung an SUR2B (Gemittelte Parameter aus n=6 Einzelversuchen; Vergleiche Kap. 3.8)

3.4.3. Effekt von Oleoyl-CoA auf die ³H-P1075 Bindung an SUR2B in Membranen

Wie schon in Kapitel 3.2.3 beschrieben, fanden Liu et al., 2001a eine Aktivierung der K_{ATP} – Kanäle im Herzmuskel (K_{IR}6.2/SUR2A) durch LC-Acyl-CoA, die um ein Vielfaches höher war als in den pankreatischen β-Zellen (K_{IR}6.2/SUR1) (Bränström et al., 1997). Obwohl diese Effekte eindeutig auf der Bindung des Lipids an K_{IR}6.2 beruhen, hat der SUR-Subtyp eine modulierende Funktion. Daher untersuchten wir hier nun den bis auf 42 Aminosäuren dem SUR2A homologen SUR-Subtyp SUR2B.

Wie schon in Kapitel 3.2.3 an SUR2A fiel kein Anstieg der nichtspezifischen ³H-P1075 Bindung an SUR2B auf, wobei sich die spezifische ³H-P1075 Bindung (B_S = 207±23 fmol/mg) vollständig verdrängen ließ. Die 5 Experimente ergaben für die Modulation der ³H-P1075-Bindung durch Oleoyl-CoA bei einer Radioligandkonzentration von L₀ = 2.87 nM einen pIC₅₀-Wert von 4.91 ± 0.11 (s. Abbildung 27), welcher einem IC₅₀-Wert von 12.3 μM [7.4, 20.4] entspricht. Der Hill-Koeffizient lag bei 1.76 ± 0.19 (s. Tabelle 14) und ist damit ebenfalls signifikant größer als 1.

In dieser Versuchsreihe konnte kein stimulatorischer Effekt nachgewiesen werden, was aber möglicherweise daran liegt, dass er in dieser Konstellation bei niederen Konzentrationen auftritt, die nicht geprüft wurden.

3. Ergebnisse

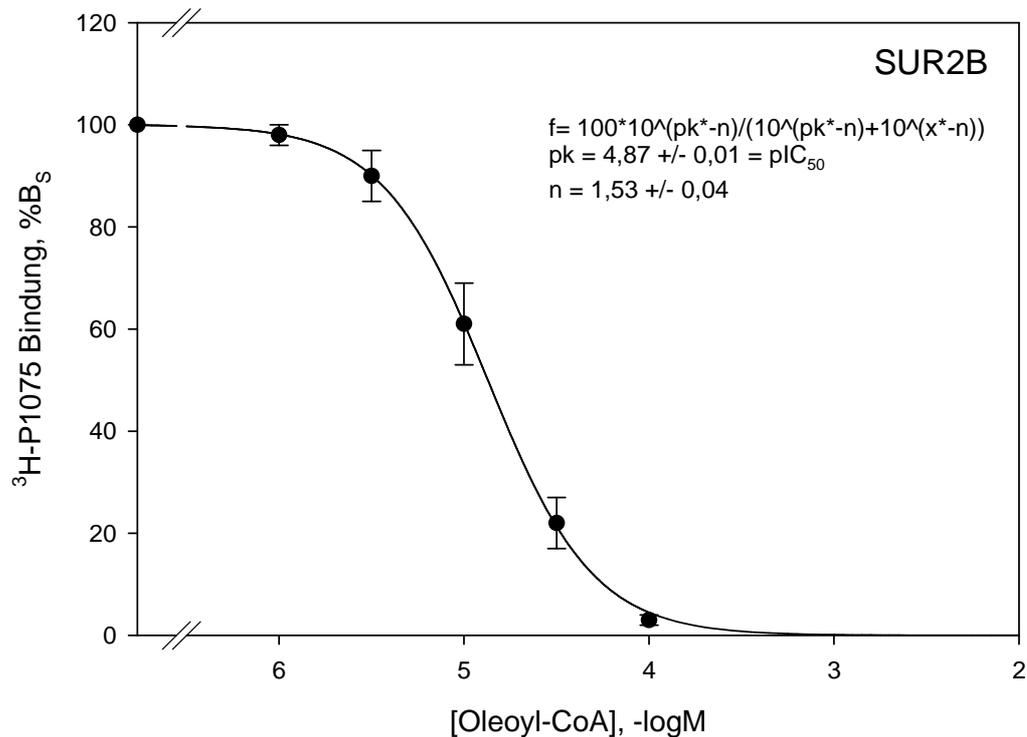


Abbildung 27: Effekt von Oleoyl-CoA auf die ³H-P1075 Bindung an SUR2B:

Mittelwerte \pm SEM aus n=5 Experimenten; [ATP]=0.3 mM; [Mg²⁺]=1 mM; L₀= 2.87 \pm 0.33 nM; B_S= 207 \pm 23 fmol/mg (=100%), B_{TOT}=217 \pm 21 fmol/mg; NSB=5 %B_{TOT}; A=100 %B_S; PK=0.31 \pm 0.04 mg/ml; Inkubationszeit=30min

Oleoyl-CoA						
Rezeptor	Stimulation			Inhibition		
	EC ₅₀ pEC ₅₀ (-log M)	A(%B _S)	n _H	IC ₅₀ pIC ₅₀ (-log M)	A(%B _S)	n _H
SUR2B				12.3 [7.4, 20.4] μ M 4.91 \pm 0.11	100	1.76 \pm 0.19

Tabelle 14: Effekt von Oleoyl-CoA auf die ³H-P1075 Bindung an SUR2B (Gemittelte Parameter aus n=5 Einzelversuchen; Vergleiche Kap. 3.8)

3.5. Modulation der ³H-GBC Bindung an SUR1

Der am C-Terminus veränderte Kanal K_{IR}6.2 Δ C26 lässt sich im Gegensatz zum Wildtyp auch ohne die β -Untereinheit SUR1 in die Membran einbauen (Tucker et al., 1997a. Bränström et al., 1998 schlossen aus ihren an diesem Kanal gemessenen Oleoyl-CoA Effekten, dass die α -Untereinheit der Angriffsort für Acyl-CoA ist, da auch eine Koexpression mit SUR1 keine Steigerung des

3. Ergebnisse

Effekts ergab. Wie unter Kap. 3.2.3 beschrieben, zeigten jedoch Liu et al., 2001a, dass die β -Untereinheit den Effekt von Oleoyl-CoA auf $K_{IR6.2}$ in erheblicher Weise verändert. Deshalb soll in dieser Versuchsreihe der modulierende Effekt von Oleoyl-CoA und DOGS-NTA auf die ^3H -GBC Bindung an SUR1 untersucht werden.

3.5.1. Effekt von DOGS-NTA auf die ^3H -GBC Bindung an SUR1 in Membranen

Betrachtet man die aus den 4 Experimenten gewonnenen Daten der Modulation der ^3H -GBC-Bindung durch DOGS-NTA, so kann man, auch im Analogschluss an SUR2A und SUR2B, die Daten durch eine Angleichung mit unvollständiger Hemmung der ^3H -GBC Bindung beschreiben (s. Abbildung 28). Dabei fällt die spezifische Bindung ($B_S = 625 \pm 33 \text{ fmol/mg}$) auf $52 \pm 11 \% B_S$ ab; der pIC_{50} -Wert ist hierbei 3.94 ± 0.19 (IC_{50} -Wert von 115 [48, 275] mit einem Hill-Koeffizienten von 1.46 ± 0.54). Extrapoliert man hingegen die Hemmkurve auf 100%, so erhält man eine Angleichung mit einem pIC_{50} -Wert von 3.34 ± 0.04 (IC_{50} -Wert von 457 [417, 501] μM) bei einem fixen Hill-Koeffizienten von $n_H = 1.0$ (s. Abbildung 29). Statistisch lässt sich zwischen den beiden Modellen kaum unterscheiden. Da jedoch bei SUR2A und SUR2B DOGS-NTA die ^3H -P1075 und die ^3H -GBC Bindung nur unvollständig verdrängt wurde ($A=88+87\%$, s. Kap. 3.2.2 + 3.4.2), ist das Modell in Abbildung 28 wohl vorzuziehen.

Unabhängig der Vollständigkeit der Verdrängung fällt wie schon bei SUR2A und SUR2B auch hier bei zunehmender DOGS-NTA Konzentration ein Anstieg der nichtspezifischen Bindung von 7 auf 23 $\% B_{\text{TOT}}$ auf.

Auch in dieser Versuchsreihe konnte kein stimulatorischer Effekt nachgewiesen werden, was aber möglicherweise wieder daran liegt, dass er in dieser Konstellation bei niederen Konzentrationen auftritt, die nicht geprüft wurden.

3. Ergebnisse

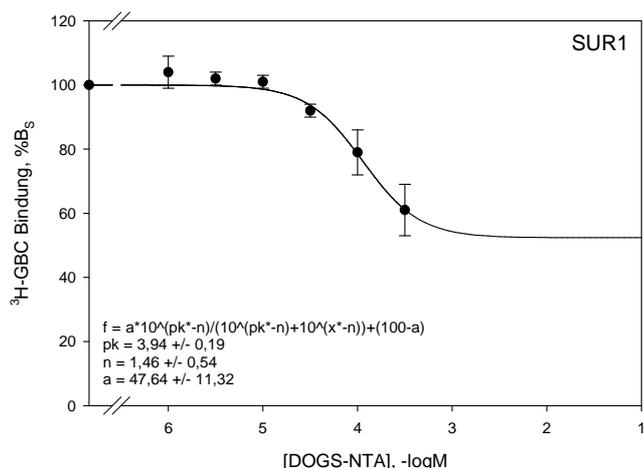


Abbildung 28: Effekt von DOGS-NTA auf die ³H-GBC Bindung an SUR1: Angleichung bei unvollständiger Verdrängung.

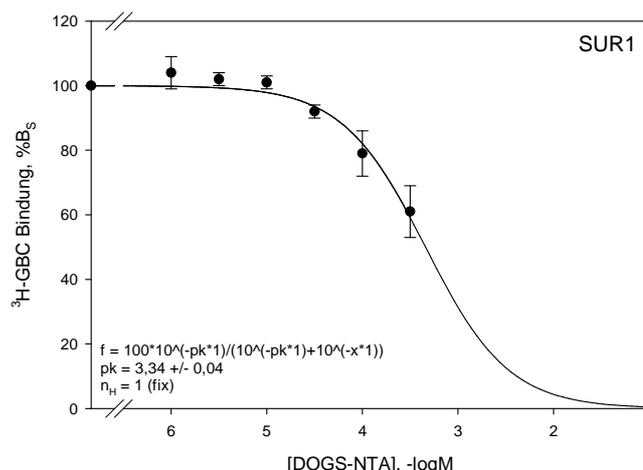


Abbildung 29: Effekt von DOGS-NTA auf die ³H-GBC Bindung an SUR1: Angleichung bei vollständiger Verdrängung.

Mittelwerte \pm SEM aus n=4 Experimenten; [ATP]=0.3 mM; [Mg²⁺]=1 mM; L₀= 0.81 \pm 0.03 nM; B_S= 625 \pm 33 fmol/mg (=100%), B_{TOT}=670 \pm 32 fmol/mg; NSB=7-23 %B_{TOT}; A=100 %B_S; PK=0.08 \pm 0.003 mg/ml; Inkubationszeit=15min

DOGS-NTA						
Rezeptor	Stimulation			Inhibition		
	EC ₅₀ pEC ₅₀ (-log M)	A(%B _S)	n _H	IC ₅₀ pIC ₅₀ (-log M)	A(%B _S)	n _H
SUR1				115 [48, 275] μ M 3.94 \pm 0.19	48 \pm 11	1.46 \pm 0.54

Tabelle 15: Effekt von DOGS-NTA auf die ³H-GBC Bindung an SUR1 (Gemittelte Parameter aus n=4 Einzelversuchen; Vergleiche Kap. 3.8)

3.5.2. Effekt von Oleoyl-CoA auf die ³H-GBC Bindung an SUR1 in Membranen

Die in den 4 Experimenten gewonnenen Daten der Modulation der ³H-GBC-Bindung durch Oleoyl-CoA ergaben, wie auch schon in den Versuchen an SUR2A und SUR2B, eine vollständige Verdrängung der ³H-GBC Bindung (B_S = 660 fmol/mg). Wie auch schon an SUR2A und SUR2B fiel kein Anstieg der nichtspezifischen Bindung bzw. auch kein Absinken (Vgl. 3.2.6.2) auf. Die Annäherung ergab einen pIC₅₀-Wert von 4.53 \pm 0.17, welcher einem IC₅₀-Wert von 30 [13, 65] μ M entspricht (s. Abbildung 30). Der Hill-Koeffizient lag bei 1.89 \pm 0.21 und war somit signifikant von eins verschieden (s. Tabelle 16).

3. Ergebnisse

Auch in diesem letzten Versuch konnte kein stimulatorischer Effekt nachgewiesen werden, was aber möglicherweise wieder daran liegt, dass er in dieser Konstellation bei niederen Konzentrationen auftritt, die nicht geprüft wurden.

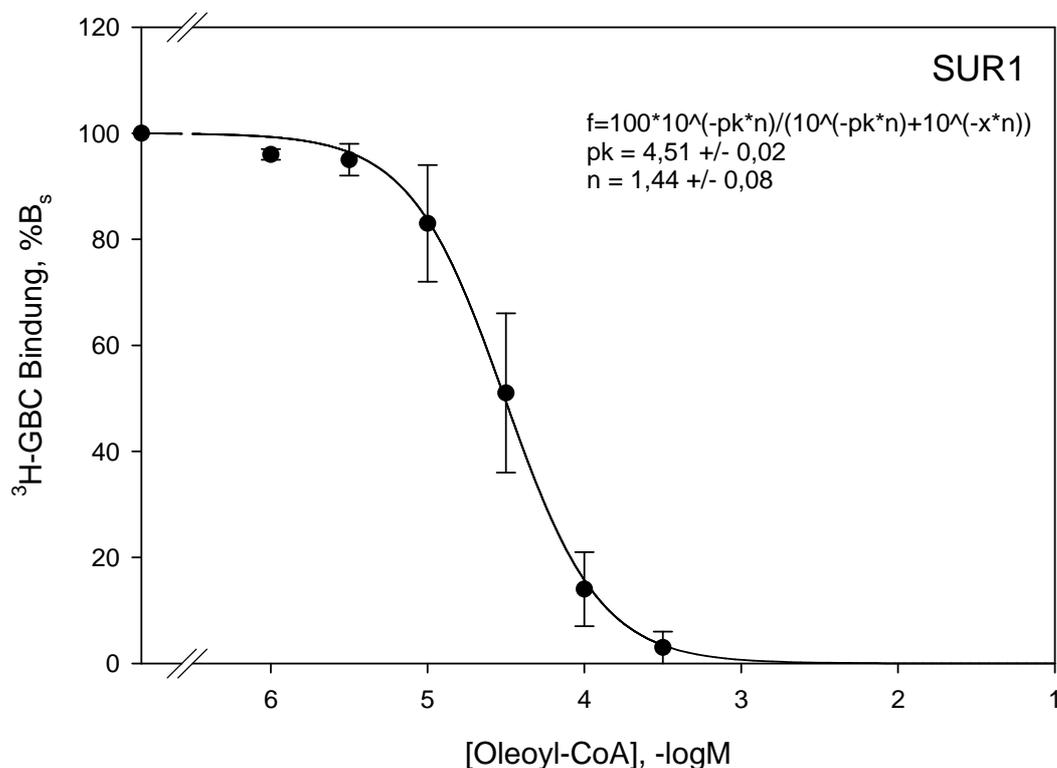


Abbildung 30: Effekt von Oleoyl-CoA auf die ³H-GBC Bindung an SUR1: Mittelwerte±SEM aus n=4 Experimenten; [ATP]=0.3 mM; [Mg²⁺]=1 mM; L₀= 1.00±0.21 nM; B_S= 660±139 fmol/mg (=100%), B_{TOT}=710±152 fmol/mg; NSB=7 %B_{TOT}; A=100 %B_S; PK=0.10±0.03 mg/ml; Inkubationszeit=15min

Oleoyl-CoA						
Rezeptor	Stimulation			Inhibition		
	EC ₅₀ pEC ₅₀ (-log M)	A(%B _S)	n _H	IC ₅₀ pIC ₅₀ (-log M)	A(%B _S)	n _H
SUR1				30 [13, 65]µM 4.50±0.17	100	1.89±0.21

Tabelle 16: Effekt von Oleoyl-CoA auf die ³H-GBC Bindung an SUR1 (Gemittelte Parameter aus n=4 Einzelversuchen; Vergleiche Kap. 3.8)

4. Diskussion

4.1. Vorbemerkungen: Fragestellung und Übersicht über die Ergebnisse

4.1.1. Fragestellung

Erst in den letzten Jahren sind Lipide, insbesondere Phospholipide als "Zweite Botenstoffe" (Second Messengers) in der zellulären Signaltransduktion erkannt worden (Übersicht: Hilgemann, 2003). Ein hervorragendes Beispiel ist PIP₂, das eine Schlüsselrolle bei so verschiedenen Prozessen wie der Zellproliferation, der Apoptose und dem "membrane trafficking". Einer der wesentlichen molekularen Mechanismen, durch die Lipide ihre zentrale Rolle in der Signaltransduktion ausüben, ist die Modulation der Aktivität verschiedenartiger Ionenkanäle und -transporter. Als Beispiel sei die Rolle von PIP₂, dem Vorläufer von PIP₃ diskutiert. Man hat seit der bahnbrechenden Arbeiten von Hilgemann und Ball, 1996 und Fan und Makielski, 1997 in zunehmendem Maße erkannt, dass die Bindung von PIP₂ (oder auch PIP₃) in physiologischen Konzentrationen an verschiedene Kanäle/Transporter deren Aktivität entweder erhöhen oder hemmen kann. Dabei ist zu bedenken, dass die Konzentration von PIP₂ ihrerseits von der Aktivität G-Protein gekoppelter Rezeptoren abhängt, die über die Aktivierung der Phospholipase C durch Spaltung von PIP₂ in IP₃ und DAG Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern freisetzen (Übersicht: Hilgemann, 2003).

Von besonderer Bedeutung im Rahmen dieser Arbeit ist die Beobachtung, dass PIP₂, oder strukturell ähnliche, ebenfalls stark negativ geladene Lipide, wie DOGS-NTA (Krauter et al., 2001) und Oleoyl-CoA (Larsson et al., 1996; Liu et al., 2001a), die Hemmung von K_{ATP}-Kanälen durch ATP schwächen bzw. sogar aufheben können; gleiches gilt für die Wirkungen von Glibenclamid oder den Öffnern auf den Kanal (Koster et al., 1999; Krauter et al., 2001). Mechanistisch ist wichtig, dass diese Effekte der Lipide durch Bindung an die K_{IR6.2}-Untereinheit des Kanals vermittelt werden (s.u.).

4. Diskussion

Die Modulation der ATP-Hemmung der $K_{IR6.2}$ -enthaltenden K_{ATP} -Kanäle durch Lipide wie PIP_2 und Oleoyl-CoA ist sehr gut untersucht. Langkettige Acyl-CoA Lipide wie Oleoyl-CoA aktivieren die durch ATP geschlossenen K_{ATP} -Kanäle auf pankreatischen β -Zellen ($K_{IR6.2}/SUR1$) und kardialen Myozyten ($K_{IR6.2}/SUR2A$) (Larsson et al., 1996; Liu et al., 2001a). Da die Konzentrationen von PIP_2 und Oleoyl-CoA physiologischen Schwankungen unterliegen (Baukrowitz et al., 1998; Liu et al., 2001a), wird die ATP-Empfindlichkeit der K_{ATP} -Kanäle und somit ihr eigentlicher Arbeitspunkt den Gegebenheiten der Zelle angepasst. ATP übt seinen hemmenden Effekt auf $K_{IR6.2}$ -enthaltende K_{ATP} -Kanäle durch Bindung an die $K_{IR6.2}$ -Untereinheit aus (Tucker et al., 1997a). Da die am C-Terminus abgeschnittenen Kanäle $K_{IR6.2}\Delta 26$ und $K_{IR6.2}\Delta 36$ auch ohne SUR funktionierende ATP-empfindliche Kanäle bilden (Tucker et al., 1997a), konnte mit diesem Rumpfkanal eindeutig gezeigt werden, dass die Lipidbindungsstelle, die mit der ATP-Hemmung interferiert, auf der $K_{IR6.2}$ Untereinheit sitzt (Bränström et al., 1998; Gribble et al., 1998a). Dabei trägt der Carboxyterminus des $K_{IR6.2}$ wesentlich zur Lipidbindung bei (Shyng et al., 2000; MacGregor et al., 2002). Die Abschwächung der ATP-Hemmung des Kanals folgt einem kompetitiven Mechanismus: Erhöhung der PIP_2 Konzentration verschiebt die ATP-Hemmkurve nach rechts, ohne ihr Maximum zu verändern (Baukrowitz et al., 1998); offensichtlich schließen sich Bindung von ATP und PIP_2 gegenseitig aus. Bemerkenswerterweise hängt die Effizienz des Acyl-CoA Effektes, trotz des Ansatzes des Lipids am $K_{IR6.2}$, vom SUR-Subtyp ab (Liu et al., 2001a).

Auch die Wirkung der K_{ATP} -Kanalmodulatoren, wie Glibenclamid und der Öffner, wird durch die Lipide geschwächt oder aufgehoben ($K_{IR6.2}/SUR1$: Koster et al., 1999; Herzkanäle oder $K_{IR6.2}/SUR2A$: Liu et al., 2001a; Krauter et al., 2001). Im Gegensatz zur Wirkung von PIP_2 auf die ATP-Hemmkurve folgt die Änderung der Glibenclamid-Hemmkurve durch PIP_2 einem nicht-kompetitiven Schema: Mit steigender Lipidkonzentration verringert sich das Maximum der durch Glibenclamid erreichbaren Hemmung, wobei der IC_{50} -Wert von Glibenclamid (im wesentlichen) unverändert bleibt (Krauter et al., 2001). Dies deutet auf einen allosterischen Mechanismus hin: Durch PIP_2 modifizierte Kanäle sind refraktär gegenüber der durch Glibenclamid erzeugten

4. Diskussion

Konformationsänderung, die den Kanal normalerweise schließt (Krauter et al., 2001); Ähnliches wurde für die Aufhebung der Öffnerwirkung geschlossen (Koster et al., 1999).

Diese Interpretation ist plausibel. Allerdings zeigen Versuche mit $K_{IR6.2}$ Mutanten, bei denen die Bindung von PIP_2 (oder dessen Wirkung auf die ATP-Empfindlichkeit) am $K_{IR6.2}$ abgeschwächt ist, keine deutliche Verringerung der PIP_2 Effekte auf Glibenclamid (Koster et al., 1999; Krauter et al. 2001). Es wäre demnach immerhin möglich, dass die Lipide, am SUR ansetzend, mit der Bindung der Kanalmodulatoren am SUR interferieren. Diese Arbeitshypothese sollte in der vorliegenden Arbeit durch Bindungsstudien an den verschiedenen SUR-Subtypen untersucht werden. Dazu wurden an Membranen aus HEK-293T-Zelllinien, die stabil mit den entsprechenden SURs transfiziert waren, der Effekt der drei Lipide PIP_2 , DOGS-NTA und Oleoyl-CoA auf die Bindung der Radioliganden 3H -P1075 und 3H -GBC untersucht.

4.1.2. Übersicht über die Ergebnisse

Alle Ergebnisse sind in der folgenden Übersichtstabelle wiedergegeben (Tabelle 17). Es ist festzustellen, dass

- (1) in zwei Fällen, SUR2A(Y1206S) / 3H -GBC / Oleoyl-CoA und SUR2A / 3H -P1075 / DOGS-NTA, überraschenderweise bei geringen (physiologischen) Konzentrationen der Lipide eine Stimulation der Radioligandbindung auftrat,
- (2) die Lipide die Bindung der beiden Radioliganden hemmen konnten, allerdings in unphysiologisch hohen Konzentrationen; die Reihenfolge der Wirkungsstärke war Oleoyl-CoA \geq DOGS-NTA \gg PIP_2 ,
- (3) keine wesentlichen Unterschiede zwischen der Modulation der beiden Radioliganden festzustellen war und
- (4) für die Empfindlichkeit der SUR-Subtypen gegenüber den Lipiden gilt: SUR2B \geq SUR2A $>$ SUR1.

Diese Punkte sollen im Folgenden diskutiert werden.

Übersichtstabelle

Lipid	SUR	Radioligand	Stimulation*		Inhibition			Effekt auf B _{NS}
			EC ₅₀ pEC ₅₀ (-log M)	A(%B _s)	IC ₅₀ pIC ₅₀ (-log M)	A(%B _s)	n _H	
PIP ₂	SUR2A	³ H-P1075		> 20 %	> 100 µM			-
	SUR2B	³ H-P1075			173 µM [151, 199] 3.76 ± 0.03	100 (fix)	1 (fix)	↑↓
DOGS-NTA	SUR2A	³ H-P1075	1-Komponenten-Modell		72 [52, 100]µM 4.14±0.07	88 ± 8	1 (fix)	↑
	SUR2A	³ H-P1075	0.5 [0.02, 10] µM 6.32±1.32	7.2 ± 5.9	60 [42, 87] µM 4.22±0.08	85 (fix)	1 (fix)	↑↑
	SUR2B	³ H-P1075			43 [28, 65] µM 4.37±0.09	87 ± 4	0.96±0.04	↑↑
	SUR2A (Y1206S)	³ H-GBC			37 [14, 98] µM 4.43±0.21	82 ± 11	1 (fix)	-
	SUR1	³ H-GBC			115 [48, 275] µM 3.94±0.19	48 ± 11	1.46±0.54	↑↑
Oleoyl-CoA	SUR2A	³ H-P1075			14.1 [12.3, 16.2]µM 4.85±0.03	100	1.42±0.08	-
	SUR2B	³ H-P1075			12.3 [7.4, 20.4] µM 4.91±0.11	100	1.76±0.19	-
	SUR2A (Y1206S)	³ H-GBC	0.003 [0.0006, 0.02] µM 8.52±0.36	52	42 [28, 63] µM 4.38±0.09	152	1 (fix)	↓↓
	SUR1	³ H-GBC			30 [13, 65]µM 4.50±0.17	100	1.89±0.21	-
	Kir6.2/ SUR2A	³ H-P1075			65 [43, 98] µM 4.19±0.09	100	1.19±0.11	-

Tabelle 17: Modulation der Ligandbindung an die SUR-Subtypen durch Lipide

* = bei Stimulation wurde n_H = 1 (fix) gewählt; ↑ Anstieg, - unverändert, ↓ Abfall

4.2. Stimulation der Ligandbindung durch Lipide

In zwei Fällen zeigte die Radioligandbindung an SUR eine glockenförmige Abhängigkeit von der Lipidkonzentration, d.h., der Hemmung der Radioligandbindung bei hohen Lipidkonzentrationen ging eine Stimulation bei kleinen Lipidkonzentrationen voraus: SUR2A(Y1206S) / ^3H -GBC / Oleoyl-CoA, (Abbildung 22) und SUR2A / ^3H -P1075 / DOGS-NTA (Abbildung 14). Diese Beobachtung war völlig überraschend. Der sehr kleine, aber statistisch signifikante Effekt in Abbildung 14 wurde zunächst als Ausreißer qualifiziert. Der prominente Effekt in Abbildung 22 wurde erst gegen Ende der Arbeit gemessen und daher konnten grundsätzliche Fragen bezüglich der Stimulation nicht mehr abgeklärt werden.

Da die stimulierende Komponente nur bei SUR2A / ^3H -P1075 und SUR2A(Y1206S) / ^3H -GBC beobachtet wurde, stellt sich die Frage, ob die Stimulation nur bei SUR2A auftritt. In diesem Fall müssten die letzten 42 Aminosäuren, die SUR2A von 2B unterscheiden, für den Effekt maßgeblich sein. Leider wurden kleine Lipidkonzentrationen ($<1\ \mu\text{M}$) in den anderen Konfigurationen von vornherein nicht geprüft, da in diesem Konzentrationsbereich kein Effekt erwartet worden war; im nachhinein war, aus Zeitgründen, eine Prüfung nicht mehr möglich.

Eine zweite Frage betrifft die Gegenwart von MgATP (1 mM) in diesen Experimenten. Würde die Stimulation auch in der Abwesenheit von MgATP auftreten? Dies hängt zusammen mit der Frage nach dem Mechanismus der beobachteten Erhöhung der Radioligandbindung: Eine Erhöhung der Bindung wird auftreten, wenn das Lipid entweder die Affinität der Bindung erhöht (d. h. die K_D erniedrigt) oder die Anzahl der verfügbaren Bindungsstellen (B_{MAX}) erhöht.

In diesem Zusammenhang sei erwähnt, dass erst MgATP den SUR in die Konformation mit hoher Affinität für die Öffner überführt (Quast et al., 1993, Hambrock et al., 1998; Schwanstecher et al., 1998) und, beim SUR2A, die B_{MAX} für ^3H -GBC Bindung um 50 % erniedrigt, ohne die K_D zu verändern (Hambrock et al., 2002a). Der Fall der Zunahme der ^3H -GBC Bindung an die SUR2A

4. Diskussion

Mutante um 50% sei genauer diskutiert: Die K_D unter Kontrollbedingungen beträgt ~ 5 nM (Hambrock et al., 2002a) und die ^3H -GBC-Konzentration in diesen Experimenten war 2.3 nM (Abbildung 22). Daraus berechnet man nach dem Massenwirkungsgesetz (Gleichung 12 in Kap. 2) einen Sättigungsgrad der Ligandbindung von ~ 32 %. Würde Oleoyl-CoA durch eine positiv-allosterische Wechselwirkung die K_D der Bindung auf von 5 auf 2.7 nM reduzieren, so würde der Sättigungsgrad um 50 % von 32 % auf 47 % steigen. In Anbetracht der Tatsache, dass MgATP die B_{MAX} der Glibenclamidbindung an die SUR2A Mutante erniedrigt, ist aber auch eine partielle Demaskierung der durch MgATP inaktivierten Bindungsstellen, z. B. durch Schwächung des MgATP Effektes, denkbar. Auch diese Frage wäre leicht durch Sättigungsmessungen der ^3H -GBC Bindung in Abwesenheit und Gegenwart des Lipids zu klären, doch blieb für solche Experimente keine Zeit mehr. Es sei noch angemerkt, dass die durch Oleoyl-CoA bewirkten Veränderungen von K_D und B_{MAX} der ^3H -GBC Bindung leicht durch eine negativ allosterische Wechselwirkung mit den an den NBFs gebundenem MgATP (und dessen Hydrolyse) zu erklären wären. Jedoch würde ein solches Modell nicht die Stimulation der ^3H -P1075 an SUR2A durch DOGS-NTA erklären können, da ja die Öffnerbindung positiv allosterisch an die Nukleotidbindung (und Hydrolyse) gekoppelt ist. Vielleicht liegt eine Nukleotid-unabhängige, unbekannte Wechselwirkung des Lipids bei geringen Konzentrationen mit dem SUR der beobachteten Stimulation der Kanalmodulatorenbindung zugrunde.

Eine weitere Frage betrifft die die physiologische Relevanz der beobachteten Stimulation. Der wirksame Konzentrationsbereich von Oleoyl-CoA ($\text{EC}_{50} = 3$ nM) ist im Bereich der in Herzzellen auftretenden physiologischen Konzentrationen (Liu et al., 2001a). Umso erstaunlicher ist, dass die Stimulation der GBC Bindung (die einen verstärkte Hemmung des Kanals bewirken sollte) mit dem beobachteten Effekt von Oleoyl-CoA auf den Kanal, nämlich einer Aktivierung, direkt im Widerspruch steht. Es wäre möglich, dass Koexpression mit $K_{\text{IR}}6.2$ die beobachtete Stimulation der GBC Bindung an SUR2A-(Mutante) durch Oleoyl-CoA stark schwächen oder ins Gegenteil verkehren könnte. Ein zentraler Einfluss der Koexpression mit $K_{\text{IR}}6.2$ auf das Ligandbindungsverhalten

4. Diskussion

von SUR ist von uns mehrfach beschrieben worden (Hambrock et al., 2000, 2002b). Diese Frage hätte leicht experimentell beantwortet werden können, jedoch musste dies aus Zeitgründen hier unterbleiben und die physiologische Bedeutung der überraschenden Stimulation kann noch nicht abschließend diskutiert werden.

4.3. Hemmung der Ligandbindung durch Lipide

Die drei hier untersuchten Lipide, PIP₂, DOGS-NTA und Oleoyl-CoA konnten jeweils die Radioligandbindung an SUR hemmen.

4.3.1. PIP₂

Mit PIP₂ wurde nur eine sehr schwache Hemmung beobachtet. Die Hemmung trat erst bei Konzentrationen auf, die 10- bis 100-fach höher waren als diejenigen (~ 5 µM), die bei Baukowitz et al., 1998 und Shyng und Nichols, 1998 die ATP-Empfindlichkeit verschiedener K_{ATP}-Kanäle um > 100-fach nach rechts verschoben und die Effekte von Tolbutamid (1 mM) und Diazoxid (500 µM) am K_{IR}6.2/SUR1 Kanal fast vollkommen zum Verschwinden gebracht hatten (Koster et al., 1999). Es ist zwar nicht bekannt, wieviel PIP₂ bei der hier angewandten Methode der Beschallung in die Membran inkorporiert wurde, aber es ist doch sehr wahrscheinlich, dass die hier beobachtete schwache Hemmung der Öffnerbindung nicht zu der von den früheren Autoren beobachteten Hemmung der Öffnereffekte beiträgt. Die Versuche wurden daher (und auch aus Kostengründen) nicht weiter fortgeführt. Sie zeigen aber klar, dass SUR2B empfindlicher auf PIP₂ reagiert als SUR2A.

4.3.2. DOGS-NTA

DOGS-NTA wurde von Krauter et al., 2001 als stabileres und kostengünstigeres PIP₂-Analogon eingeführt (vgl. Abbildung 9); es hat eine ähnliche Wirksamkeit wie PIP₂ auf die Reduktion der ATP-, Glibenclamid- und Öffnerempfindlichkeit des K_{IR}6.2/SUR2A-Kanals wie PIP₂. In unseren Versuchen wirkte es jedoch deutlich stärker (z. B. ³H-P1075 Bindung an SUR2B: 5x; Tabelle 17). Auffällig

4. Diskussion

ist, dass in keinem Fall eine vollständige Hemmung der Radioligandbindung erreicht wurde; die maximale Hemmung lag bei SUR2 immer bei ~85 %, bei SUR1 und ^3H -GBC sogar nur bei ~ 50% (Tabelle 17). Wiederum war SUR1 weniger empfindlich als die SUR2 Subtypen, sowohl was das Ausmaß der Hemmung als auch die IC_{50} angeht. Die beiden SUR2 Subtypen unterscheiden sich kaum in ihrer Empfindlichkeit gegen DOGS-NTA; auch ist die Hemmung der Öffner- und der Glibenclamidbindung ähnlich. Die hier bestimmten IC_{50} -Werte sind noch einen Faktor 3 - 6 höher als die von Krauter et al., 2001 benutzte Konzentration von 10 μM , die maximale Effekte am $\text{K}_{\text{IR}}6.2/\text{SUR}2\text{A}$ Kanal erzielte, so dass auch hier, wenn auch in geringerem Maße als bei PIP_2 , der Zweifel bleibt, ob die hier gemessenen Effekte am SUR2A zu den am Gesamtkanal gemessenen Beobachtungen beitragen. Zweifel an dieser Möglichkeit werden verstärkt durch die Beobachtung, dass bei SUR2A eine geringfügige Stimulation der ^3H -P1075 Bindung durch DOGS-NTA im submikromolaren Bereich festgestellt wurde (vgl. Abbildung 17), während elektrophysiologisch bei verschiedenen Konzentrationen von DOGS-NTA oder PIP_2 immer nur eine Entkopplung des Kanals vom Öffnereffekt beobachtet wurde (Krauter et al., 2001; Koster et al., 1999).

Es bleibt noch der Effekt auf die nichtspezifische Bindung von ^3H -P1075 zu erwähnen, der in den Experimenten mit SUR2A und SUR2B enthaltenden HEK-Zellmembranen auftrat. Dieser wurde bei den Versuchen mit ^3H -GBC + SUR2A-Mutante nicht gesehen, wohl aber bei den sehr hohen DOGS-NTA Konzentrationen, die nötig waren, den SUR1 zu beeinflussen (Tabelle 17, Abbildung 28).

4.3.3. Oleoyl-CoA

Die Wirkung von Oleoyl-CoA auf K_{ATP} Kanäle ist ähnlich der von PIP_2 und es ist unklar, ob die beiden Lipide an der gleichen Bindungsstelle ansetzen bzw. den gleichen Signalweg benutzen (Liu et al., 2001a; Baukowitz, persönl. Mitteilung). Oleoyl-CoA ist am $\text{K}_{\text{IR}}6.2/\text{SUR}2\text{A}$ Kanal wesentlich wirksamer als am $\text{K}_{\text{IR}}6.2/\text{SUR}1$ (vgl. Larsson et al., 1996 und Liu et al., 2001a). Obwohl eindeutig gezeigt wurde, dass Oleoyl-CoA am $\text{K}_{\text{IR}}6.2$ ansetzt (Bränström et al.,

4. Diskussion

1998; Gribble et al., 1998a), weist dies auf die wichtige Rolle des SUR bei der Modifikation des Kanals durch die Lipide hin. Oleoyl-CoA wirkt im submikromolaren Konzentrationsbereich (Larsson et al., 1996; Liu et al., 2001a); kurzkettige Acyl-CoA wie Palmitoyl-CoA sind unwirksam ebenso wie freies CoSH (Larsson et al., 1996) während freie Ölsäure den Kanal hemmt (Liu et al., 2001a).

In unseren Versuchen erwies sich Oleoyl-CoA als das potenteste und wirksamste der untersuchten Lipide. In allen Fällen wurde eine vollständige Hemmung der Radioligandbindung erreicht. Die Hillkoeffizienten waren oft signifikant größer 1. Dies könnte mit mehreren positiv allosterisch gekoppelten Lipidbindungsstellen am SUR erklärt werden oder, falls unsere Hypothese, dass auch SUR ohne K_{IR} als Tetramer vorliegt (Löffler-Walz et al., 2002) mit Wechselwirkungen einer Lipidbindungsstelle per Monomer mit denen auf anderen Untereinheiten des Tetramers. Betrachtung der Tabelle 17 zeigt, dass es bezüglich der $^3\text{H-P1075}$ Bindung keinen Unterschied zwischen den SUR2 Subtypen gibt. Die $^3\text{H-P175}$ Bindung an SUR2A reagiert empfindlicher auf Oleoyl-CoA als die $^3\text{H-GBC}$ Bindung an die entsprechende Mutante; in diesem System fiel die prominente Stimulation $^3\text{H-GBC}$ Bindung durch Oleoyl-CoA mit einer EC_{50} von 3 nM auf (s. Kap. 4.2). Die $^3\text{H-GBC}$ Bindung an SUR1 zeigte nur eine Hemmung auf Oleoyl-CoA; die IC_{50} war ähnlich wie die bei der SUR2A Mutanten.

Ein wichtiger Punkt betrifft den Einfluss der Koexpression mit $K_{IR6.2}$ auf die beobachteten Lipideffekte: Zum einen setzen ja die Lipide bei geringen Konzentrationen am $K_{IR6.2}$ an (Fan und Makielski, 1997; Huang et al., 1998; Shyng et al., 2000; Bränström et al., 1998; Gribble et al., 1998a) und die Modifikation des $K_{IR6.2}$ könnte die Eigenschaften des SUR verändern. Zum anderen haben wir und andere beobachtet, dass Koexpression mit K_{IR} die Eigenschaften des SUR auch für Liganden ändert, die nur am SUR angreifen (Hambrock et al., 2001; Gojkovic-Bukarica et al., 2002; Proks et al., 2001). Dieser Punkt wurde am System $^3\text{H-P1075}$ / SUR2A überprüft. Koexpression mit $K_{IR6.2}$ erhöhte den IC_{50} Wert um einen Faktor 4 von 14 auf 65 μM und führte zu einer leichten Abflachung der Hemmkurve (Tabelle 17). Der IC_{50} Wert von 65

4. Diskussion

μM für die Hemmung der ^3H -P1075 Bindung durch Oleoyl-CoA bei Koexpression muss mit den submikromolaren Konzentrationen von Oleoyl-CoA verglichen werden, die z. B. die ATP-Empfindlichkeit des $\text{K}_{\text{IR}6.2}/\text{SUR}2\text{A}$ Kanals verändern: Es klafft wiederum eine Lücke von ungefähr zwei Größenordnungen und man muss schließen, dass die hier gemessene Hemmung der K_{ATP} -Kanalmodulatorbindung am SUR2A wohl kaum eine Rolle spielt für die vollkommene Unempfindlichkeit des nativen Herzkanals gegen Glibenclamid hervorgerufen durch $1 \mu\text{M}$ Oleoyl-CoA.

4.4. Abschließende Bemerkungen

In dieser Arbeit wurde zu ersten Mal gezeigt, dass drei Lipide (PIP_2 , DOGS-NTA und Oleoyl-CoA), deren Wirkung auf den K_{ATP} -Kanal über die $\text{K}_{\text{IR}6.2}$ Untereinheit vermittelt wird, auch am SUR ansetzen und dort die Ligandbindungseigenschaften verändern. Von besonderem Interesse ist die im physiologischen Konzentrationsbereich gefundene Stimulation der Bindung an den SUR2A (Wildtyp und Mutante). Da dieser Effekt erst gegen Ende dieser Arbeit beobachtet wurde, konnte er noch nicht abschließend untersucht werden. In der durch die Lipide hervorgerufenen Hemmung der Kanalmodulatorbindung an SUR zeigte sich in der Wirksamkeit die Reihenfolge Oleoyl-CoA > DOGS-NTA >> PIP_2 . Der Mechanismus der Hemmung, ein Verlust an Affinität oder Bindungsstellen, ist noch nicht geklärt. Die für diese Hemmung notwendigen Lipidkonzentrationen liegen um Faktoren 10 - 100 über den Konzentrationen, die am $\text{K}_{\text{IR}6.2}$ ansetzen und zu einer permanenten Aktivierung des Kanals führen. Daher kann man dieser Hemmung wohl keine physiologische Bedeutung zusprechen. Dennoch bedarf die spezifische Wechselwirkung der Lipide, v.a. des Oleoyl-CoA mit den SUR Subtypen der genaueren Aufklärung, insbesondere die Ligandbindung aktivierende Wirkung, die ja bei physiologischen Konzentrationen auftritt.

5. Zusammenfassung

K_{ATP} -Kanäle sind ligandgesteuerte Kanäle; sie werden durch intrazelluläres ATP geschlossen und durch MgATP geöffnet. Damit koppeln sie die Erregbarkeit der Zelle an ihren metabolischen Zustand. Organspezifische Funktionen sind z. B. die Kopplung der Insulinsekretion an den Blutzuckerspiegel, die Vermittlung des hypoglykämischen Hungergefühls, die Regulation der Durchblutung einiger Gefäßbetten, z. B. der Herzkranzgefäße, und der Schutz des Herzens bei ischämisch / hypoxischen Attacken. Mutationen des Kanals führen zu Störungen der Insulinsekretion oder erhöhen das Risiko für Diabetes Typ 2. Pharmakologisch lassen sich die Kanäle durch Blocker wie die Sulfonylharnstoffe und durch Öffner wie Diazoxid, Minoxidilsulfat und Pinacidil beeinflussen. K_{ATP} -Kanäle sind tetradimere Komplexe aus den die Pore bildenden $K_{IR6.x}$ -Untereinheiten und den regulatorischen Untereinheiten, den Sulfonylharnstoffrezeptoren (SURs). Die Hemmung der Kanäle durch ATP setzt an der Pore ($K_{IR6.2}$) an, die Kanalmodulatoren binden an den SUR.

Erst in den letzten Jahren hat man erkannt, dass Membranphospholipide wie PIP_2 und langkettige Acyl-CoA Ester wie Oleoyl-CoA in physiologischen Konzentrationen die Nukleotidempfindlichkeit der Kanäle reduzieren und die Aktivierung erleichtern. Dabei setzen die Lipide an der $K_{IR6.2}$ Untereinheit an. Damit stellen diese Lipide, deren Konzentration entsprechend der physiologischen Situation schwankt, den Arbeitspunkt der Kanäle ein; sie sind die wichtigsten physiologischen Modulatoren der Kanäle. Pharmakologisch bedeutsam ist die Beobachtung, dass die Lipide gleichzeitig auch die Wirkung der Sulfonylharnstoffe und der Öffner aufheben; es wird angenommen, dass sie die Pore vom regulatorischen Einfluss der SUR Untereinheit entkoppeln. Man weiß jedoch nicht, ob die Lipide, durch einen Ansatz am SUR, direkt mit der Bindung der Kanalmodulatoren interferieren. Diese Frage sollte in dieser Arbeit geklärt werden.

Es wurden daher Radioligandbindungsmessungen mit einem Öffner (3H -P1075) und einem Sulfonylharnstoff (3H -Glibenclamid, 3H -GBC) an rekombinanten SURs in Gegenwart von MgATP bei 37 °C durchgeführt. Die 3H -P1075 Bindung wurde an SUR2A (Herz) und SUR2B (glatter Muskel), die 3H -GBC Bindung an

5. Zusammenfassung

einer SUR2A-Mutanten mit hoher Affinität für GBC und SUR1 (β -Zellen des Pankreas und Neuronen) gemessen. Als Lipide dienten PIP₂, sein Analogon DOGS-NTA (1,2-Dioleoyl-*sn*-Glycero-3-succinyl[N-(5-amino-1-carboxypentyl)iminodiessigsäure]) und Oleoyl-CoA.

Die drei Lipide konnten die Bindung der Radioliganden hemmen. Dabei erwies sich PIP₂ als außerordentlich schwach wirksam (typische Hemmkonzentrationen > 100 μ M) und es konnten keine vollständigen Hemmkurven gewonnen werden. DOGS-NTA wirkte deutlich stärker. Die Hemmkurven sättigten bei maximalen Werten von ~ 85 % Hemmung (SUR2 Subtypen) bzw. 50 % (SUR1); die IC₅₀-Werte lagen zwischen 37 und 115 μ M. Dabei war die Hemmung der Bindung der beiden Radioliganden an die SUR2 Subtypen kaum unterschiedlich, jedoch die der ³H-GBC Bindung an SUR1 weniger empfindlich. Oleoyl-CoA war der potenteste Hemmstoff der Bindung; alle Hemmkurven erreichten 100 % und zeigten häufig Hillkoeffizienten >1. Koexpression von SUR2A mit K_{IR}6.2 verschob die Hemmkurve der ³H-P1075 Bindung um einen Faktor 4 von 14 auf 65 μ M nach rechts.

Völlig überraschend wurde eine Stimulation der ³H-GBC Bindung an die SUR2A Mutante durch niedrige Oleoyl-CoA Konzentrationen beobachtet (EC₅₀ = 3 nM, Maximum 50 %); eine schwache aber signifikante Stimulation (7 %) der ³H-P1075 Bindung an SUR2A durch DOGS-NTA (1 μ M) weist darauf hin, dass dieses Phänomen vielleicht allgemein bei niedrigen Lipidkonzentrationen auftritt; jedoch konnte dies aus Zeitgründen nicht mehr untersucht werden.

Diese Arbeit zeigt damit zum ersten Mal, dass die Lipide auch am SUR ansetzen können und die pharmakologischen Eigenschaften des SUR verändern. Die überraschende Stimulation der Glibenclamidbindung an SUR2A tritt bei physiologischen Konzentrationen von Oleoyl-CoA auf, steht aber im Gegensatz zu den elektrophysiologischen Effekten. Die Hemmung der Radioligandbindung tritt erst bei Lipidkonzentrationen auf, die 10 - 100-fach höher sind als die, die durch Angriff am K_{IR}6.2 den Kanal modifizieren. Daher kann man dieser Hemmung wohl keine physiologische Bedeutung zusprechen. Dennoch bedarf die spezifische Wechselwirkung der Lipide, v.a. des Oleoyl-CoA mit den SUR Subtypen der genaueren Aufklärung.

6. Literaturverzeichnis

- Aguilar-Bryan L and Bryan J (1996) ATP-sensitive potassium channels, sulfonylurea receptors and persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Diabetes Reviews*, 4:336-346.
- Aguilar-Bryan, L. and Bryan, J. Molecular Biology of Adenosine Triphosphate-Sensitive Potassium Channels. *Endocrine Reviews* 1999;20(2):101-35.
- Aguilar-Bryan, L., Clement IV, J. P., Gonzalez, G., Kunjilwar, K., Babenko, A., and Bryan, J.. Toward Understanding the Assembly and Structure of K_{ATP} Channels. *Physiological Reviews* 1998;78(1):227-45.
- Aguilar-Bryan, L., Nichols, C. G., Wechsler, S. W., Clement IV, J. P., Boyd III, A. E., Gonzáles, G., Herrera-Soza, H., Nguy, K., Bryan, J., and Nelson, D. A. Cloning of the β Cell High-Affinity Sulfonylurea Receptor: a Regulator of Insulin Secretion. *Science* 1995;268:423-6.
- Ashcroft, F. M. and Gribble, F. M. ATP-Sensitive K^+ Channels and Insulin Secretion: Their Role in Health and Disease. *Diabetologia* 1999;42(8):903-19.
- Ashcroft, S. J. and Ashcroft, F. M. The Sulfonylurea Receptor. *Biochimica Et Biophysica Acta* 15-12-1992;1175(1):45-59.
- Ashfield, R., Gribble, F. M., Ashcroft, S. J. H., and Ashcroft, F. M. Identification of the High-Affinity Tolbutamide Site on the SUR1 Subunit of the K_{ATP} Channel. *Diabetes* 1999;48(6):1341-7.
- Ämmälä, C., Moorhouse, A., Gribble, F., Ashfield, R., Proks, P., Smith, P. A., Sakura, H., Coles, B., Ashcroft, S. J. H., and Ashcroft, F. M. Promiscuous Coupling Between the Sulphonylurea Receptor and Inwardly Rectifying Potassium Channels. *Nature* 1996a;379:545-8.
- Ämmälä, C., Moorhouse, A., and Ashcroft, F. The Sulphonylurea Receptor Confers Diazoxide Sensitivity on the Inwardly Rectifying K^+ Channel Kir6.1 Expressed in Human Embryonic Kidney Cells. *Journal of Physiology-London* 1996b;494(3):709-14.
- Babenko, A. P., Aguilar-Bryan, L., and Bryan, J. A View of SUR/ $K_{IR6.X}$, K_{ATP} Channels. *Annual Review of Physiology* 1998;60:667-87.
- Baukrowitz, T. and Fakler, B. K-ATP Channels Gated by Intracellular Nucleotides and Phospholipids. *European Journal Of Biochemistry* 2000;267(19):5842-8.

6. Literaturverzeichnis

- Baukrowitz, T., Schulte, U., Oliver, D., Herlitze, S., Krauter, T., Tucker, S. J., Ruppersberg, J. P., and Fakler, B. PIP₂ and PIP As Determinants for ATP Inhibition of K_{ATP} Channels. *Science* 6-11-1998;282(5391):1141-4.
- Beech, D. J., Zhang, H., Nakao, K., and Bolton, T. B. K Channel Activation by Nucleotide Diphosphates and Its Inhibition by Glibenclamide in Vascular Smooth Muscle Cells. *British Journal of Pharmacology* 1993;110:573-82.
- Benndorf, K., Bollmann, G., Friedrich, M., and Hirche, H. Anoxia Induces Time-Independent K⁺ Current Through K_{ATP} Channels in Isolated Heart Cells of the Guinea-Pig. *Journal of Physiology-London* 1992;454:339-57.
- Bevington, P. R., *Data reduction and error analysis for the physical sciences.* New York: McGraw-Hill; 1969.
- Bienengraeber, M., Alekseev, A. E., Abraham, M. R., Carrasco, A. J., Moreau, C., Vivaudou, M.I, Dzeja, P. P., and Terzic, A. ATPase Activity of the Sulfonylurea Receptor: a Catalytic Function for the K_{ATP} Channel Complex. *FASEB Journal* 2000;14(13):1943-52.
- Bray, K. M. and Quast, U. A Specific Binding Site for K⁺ Channel Openers in Rat Aorta. *The Journal of Biological Chemistry* 1992;267:11689-92.
- Bränström, R., Corkey, B. E., Berggren, P., and Larsson, O. Evidence for a Unique Long Chain Acyl-CoA Ester Binding Site on the ATP-Regulated Potassium Channel in Mouse Pancreatic Beta Cells. *The Journal of Biological Chemistry* 11-7-1997;272(28):17390-4.
- Bränström, R., Leibiger, I. B., Leibiger, B., Corkey, B. E., Berggren, P., and Larsson, O. Long Chain Coenzyme A Esters Activate the Pore-Forming Subunit (Kir6.2) of the ATP-Regulated Potassium Channel. *The Journal of Biological Chemistry* 20-11-1998;273(47):31395-400.
- Buchheit, K., Manley, P. W., Quast, U., Russ, U., Mazzoni, L., and Fozard, J. R. KCO912: a Potent and Selective Opener of ATP-Dependent Potassium (K_{ATP}) Channels Which Suppresses Airways Hyperreactivity at Doses Devoid of Cardiovascular Effects. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* 2002;365(3):220-30.
- Christopoulos, A. Assessing the Distribution of Parameters in Models of Ligand-Receptor Interaction: to Log or Not to Log. *Trends in Pharmacological Sciences* 1998;19(9):351-7.
- Chutkow, W. A., Simon, M. C., Le Beau, M. M., and Burant, C. F. Cloning, Tissue Expression, and Chromosomal Localization of SUR2, the Putative Drug-Binding Subunit of Cardiac, Skeletal Muscle, and Vascular K_{ATP} Channels. *Diabetes* 1996;45:1439-45.

6. Literaturverzeichnis

- Clement IV, J. P., Kunjilwar, K., Gonzalez, G., Schwanstecher, M., Panten, U., Aguilar-Bryan, L., and Bryan, J. Association and Stoichiometry of K_{ATP} Channel Subunits. *Neuron* 1997;18:827-38.
- Coghlan, M. J., Carroll, W. A., and Gopalakrishnan, M. Recent Developments in the Biology and Medicinal Chemistry of Potassium Channel Modulators: Update From a Decade of Progress. *Journal of Medicinal Chemistry* 24-5-2001;44(11):1627-53.
- Cook, D. L. and Hales, C. N. Intracellular ATP Directly Blocks K^+ Channels in Pancreatic B-Cells. *Nature* 20-9-1984;311(5983):271-3.
- Cook, D. L. and Bryan, J. ATP-Sensitive K^+ Channels Come of Age. *Trends in Pharmacological Sciences* 1998;19(12):477-8.
- Coppack, S. W., Lant, A. F., McIntosh, C. S., and Rodgers, A. V. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Studies of Glibenclamide in Non-Insulin Dependent Diabetes Mellitus. *Br.J.Clin.Pharmacol.* 1990;29(6):673-84.
- Cui, Yi, Giblin, J. P., Clapp, L. H., and Tinker, A. A Mechanism for ATP-Sensitive Potassium Channel Diversity: Functional Coassembly of Two Pore-Forming Subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 16-1-2001;98(2):729-34.
- D'hahan, N., Jacquet, H., Moreau, C., Catty, P., and Vivaudou, M.A Transmembrane Domain of the Sulfonylurea Receptor Mediates Activation of ATP-Sensitive K^+ Channels by K^+ Channel Openers. *Molecular Pharmacology* 1999;56(2):308-15.
- Dickinson, K. E. J., Bryson, C. C., Cohen, R. B., Rogers, L., Green, D. W., and Atwal, K. S. Nucleotide Regulation and Characteristics of Potassium Channel Opener Binding to Skeletal Muscle Membranes. *Molecular Pharmacology* 1997;52:473-81.
- Doyle, D. A., Cabral, J. M., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait, Brian T., and MacKinnon, R. The Structure of the Potassium Channel: Molecular Basis of K^+ Conduction and Selectivity. *Science* 3-4-1998;280(5360):69-77.
- Dörschner, H., Brekardin, E., Uhde, I., Schwanstecher, C., and Schwanstecher, M. Stoichiometry of Sulfonylurea-Induced ATP-Sensitive Potassium Channel Closure. *Molecular Pharmacology* 1999;55(6):1060-6.
- Edwards, G; Weston, A H. Effect of potassium channel modulating drugs on isolated smooth muscle. Szekeres, L. J. and Papp, G. *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 111. Heidelberg: Springer; 1994. pp.469-531.

6. Literaturverzeichnis

- Fan, Z. and Makielski, J. C. Anionic Phospholipids Activate ATP-Sensitive Potassium Channels. *The Journal of Biological Chemistry* 28-2-1997;272(9):5388-95.
- Fan, Z. and Makielski, J. C. Phosphoinositides Decrease ATP Sensitivity of the Cardiac ATP-Sensitive K(+) Channel. A Molecular Probe for the Mechanism of ATP-Sensitive Inhibition. *J.Gen.Physiol* 1999;114(2):251-69.
- Furukawa, Ti, Yamane, T., Terai, T., Katayama, Y., and Hiraoka, M. Functional Linkage of the Cardiac ATP-Sensitive K⁺ Channel to the Actin Cytoskeleton. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology* 1996;431:504-12.
- Gloyn, A. L., Hashim, Y., Ashcroft, S. J. H., Ashfield, R., Wiltshire, S., and Turner, R. C. Association Studies of Variants in Promoter and Coding Regions of Beta-Cell ATP-Sensitive K-Channel Genes SUR1 and Kir6.2 With Type 2 Diabetes Mellitus (UKPDS 53). *Diabetic Medicine* 2001;18(3):206-12.
- Gojkovic-Bukarica, L., Hambrock, A., Loffler-Walz, C., Quast, U., and Ruß, U. Mg(2+) Sensitizes K(ATP) Channels to Inhibition by DIDS: Dependence on the Sulphonylurea Receptor Subunit. *British Journal of Pharmacology* 2002;137(4):429-40.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., and Nairn, R. Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA From Human Adenovirus Type 5. *J.Gen.Virol.* 1977;36(1):59-74.
- Gribble, F. M., Ashfield, R., Ämmälä, C., and Ashcroft, F. M. Properties of Cloned ATP-Sensitive K⁺ Currents Expressed in *Xenopus* Oocytes. *Journal of Physiology-London* 1997a;498(1):87-98.
- Gribble, F. M., Proks, P., Corkey, B. E., and Ashcroft, F. M. Mechanism of Cloned ATP-Sensitive Potassium Channel Activation by Oleoyl-CoA. *The Journal of Biological Chemistry* 9-10-1998a;273(41):26383-7.
- Gribble, F. M., Tucker, S. J., and Ashcroft, F. M. The Interaction of Nucleotides With the Tolbutamide Block of Cloned ATP-Sensitive K⁺ Channel Currents Expressed in *Xenopus* Oocytes: a Reinterpretation. *Journal of Physiology-London* 1997b;504:35-45.
- Gribble, F. M., Tucker, S. J., Seino, S., and Ashcroft, F. M. Tissue Specificity of Sulfonylureas: Studies on Cloned Cardiac and B-Cell K_{ATP} Channels. *Diabetes* 1998b;47(9):1412-8.
- Gros, L., Virsolvy, A., Salazar, G., Bataille, D., and Blache, P. Characterization of Low-Affinity Binding Sites for Glibenclamide on the Kir6.2 Subunit of the Beta-Cell KATP Channel. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 1999;257.

6. Literaturverzeichnis

- Hambrock, A., Löffler-Walz, C., Kloor, D., Delabar, U., Horio, Y., Kurachi, Y., and Quast, U. ATP-Sensitive K⁺ Channel Modulator Binding to Sulfonylurea Receptors SUR2A and SUR2B: Opposite Effects of MgADP. *Molecular Pharmacology* 1999;55(5, May 1999):832-40.
- Hambrock, A., Löffler-Walz, C., Kurachi, Y., and Quast, U. Mg²⁺ and ATP Dependence of K_{ATP} Channel Modulator Binding to the Recombinant Sulphonylurea Receptor, SUR2B. *British Journal of Pharmacology* 1998;125(3):577-83.
- Hambrock, A., Löffler-Walz, C., and Quast, U. Glibenclamide Binding to Sulphonylurea Receptor Subtypes: Dependence on Adenine Nucleotides. *British Journal of Pharmacology* 2002a;136(7):995-1004.
- Hambrock, A., Löffler-Walz, C., Russ, U., Lange, U., and Quast, U. Characterization of a Mutant Sulphonylurea Receptor SUR2B With High Affinity for Sulphonylureas and Openers: Differences in the Coupling to Kir6.x Subtypes. *Molecular Pharmacology* 2001;60(1):190-9.
- Hambrock, A., Preisig-Müller, R., Russ, U., Piehl, A., Hanley, P. J., Ray, J., Daut, J., Quast, U., and Derst, C. Four Novel Splice Variants of Sulphonylurea Receptor 1. *American Journal of Physiology Cell Physiology* 2002b;283(2):C587-C598.
- Hansen, L., Echwald, S. M., Hansen, T., Urhammer, S. A., Clausen, J. O., and Pedersen, O. Amino Acid Polymorphisms in the ATP-Regulatable Inward Rectifier Kir6.2 and Their Relationships to Glucose- and Tolbutamide-Induced Insulin Secretion, the Insulin Sensitivity Index, and NIDDM. *Diabetes* 1997;46(3):508-12.
- Heinemann, S. H. Sodium, Calcium and Potassium Channels. *ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES* 2001.
- Hilgemann, D. W. Getting Ready for the Decade of the Lipids. *Annu.Rev.Physiol* 2003;65:697-700.
- Hilgemann, Donald W. and Ball, R. Regulation of Cardiac Na⁺, Ca²⁺ Exchange and K_{ATP} Potassium Channels by PIP₂. *Science* 1996;273:956-9.
- Hille, B., *Ionic channels of excitable membranes*. 2 ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates Inc.; 1992.
- Huang, C. L., Feng, S., and Hilgemann, D. W. Direct Activation of Inward Rectifier Potassium Channels by PIP₂ and Its Stabilization by Gβγ. *Nature* 1998;391:803-6.
- Inagaki, N., Gonoj, T., Clement IV, J. P., Namba, N.i, Inazawa, J., Gonzalez, G., Aguilar-Bryan, L., Seino, S., and Bryan, J. Reconstitution of I_{KATP}: an Inward Rectifier Subunit Plus the Sulphonylurea Receptor. *Science* 1995;270:1166-70.

6. Literaturverzeichnis

- Inagaki, N., Gonoï, T., Clement IV, J. P., Wang, C. Z., Aguilar-Bryan, L., Bryan, J., and Seino, S. A Family of Sulphonylurea Receptors Determines the Pharmacological Properties of ATP-Sensitive K⁺ Channels. *Neuron* 1996;16:1011-7.
- Inagaki, N., Gonoï, T., and Seino, S. Subunit Stoichiometry of the Pancreatic Beta-Cell ATP-Sensitive K⁺ Channel. *FEBS Letters* 9-6-1997;409(2):232-6.
- Isomoto, S., Kondo, C., Yamada, M., Matsumoto, S., Higashiguchi, O., Horio, Y., Matsuzawa, Y., and Kurachi, Y. A Novel Sulphonylurea Receptor Forms With BIR (KIR6.2) a Smooth Muscle Type ATP-Sensitive K⁺ Channel. *The Journal of Biological Chemistry* 1996;271(40):24321-4.
- Koster, J. C., Sha, Q., and Nichols, C. G. Sulphonylurea and K⁺-Channel Opener Sensitivity of K_{ATP} Channels - *Functional Coupling of Kir6.2 and SUR1 Subunits*. *Journal of General Physiology* 1999;114(2):203-13.
- Krauter, T., Ruppertsberg, J. P., and Baukrowitz, T. Phospholipids As Modulators of K_{ATP} Channels: Distinct Mechanisms for Control of Sensitivity to Sulphonylureas, K⁺ Channel Openers, and ATP. *Molecular Pharmacology* 2001;59(5):1086-93.
- Larsson, O., Deeney, J. T., Bränström, R., Berggren, P. O., and Corkey, B. E. Activation of the ATP-Sensitive K⁺ Channel by Long Chain Acyl-CoA. A Role in Modulation of Pancreatic Beta-Cell Glucose Sensitivity. *The Journal of Biological Chemistry* 3-5-1996;271(18):10623-6.
- Leibowitz, G. and Cerasi, E. Sulphonylurea Treatment of NIDDM Patients With Cardiovascular Disease: a Mixed Blessing? *Diabetologia* 1996;39(5):503-14.
- Liu, G. X., Hanley, P. J., Ray, J., and Daut, J. Long-Chain Acyl-Coenzyme A Esters and Fatty Acids Directly Link Metabolism to K_{ATP} Channels in the Heart. *Circulation Research* 11-5-2001a;88(9):918-24.
- Liu, Y., Ren, G., O'Rourke, B., Marbán, E., and Seharaseyon, J. Pharmacological Comparison of Native Mitochondrial K_{ATP} Channels With Molecularly Defined Surface K_{ATP} Channels. *Molecular Pharmacology* 2001b;59(2):225-30.
- Lorenz, E., Alekseev, A. E., Krapivinsky, G. B., Carrasco, A. J., Clapham, D. E., and Terzic, A. Evidence for Direct Physical Association Between a K⁺ Channel (Kir6.2) and an ATP-Binding Cassette Protein (SUR1) Which Affects Cellular Distribution and Kinetic Behavior of an ATP-Sensitive K⁺ Channel. *Mol. Cell Biol.* 1998;1652-9.
- Löffler-Walz, C., Hambrock, A., and Quast, U. Interaction of K_{ATP} Channel Modulators With Sulphonylurea Receptor SUR2B: Implication for Tetramer Formation and Allosteric Coupling of Subunits. *Molecular Pharmacology* 2002;61(2):407-14.

6. Literaturverzeichnis

- Löffler, C. and Quast, U. Pharmacological Characterization of the Sulphonylurea Receptor in Rat Isolated Aorta. *British Journal of Pharmacology* 1997;120:476-80.
- MacGregor, G. G., Dong, K., Vanoye, C. G., Tang, L., Giebisch, G., and Hebert, S. C. Nucleotides and Phospholipids Compete for Binding to the C Terminus of KATP Channels. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 5-3-2002;2726-31.
- Matsuda, A., K., T., Sugita, Y., and Kawashima, K. Plasma Levels of Glibenclamide in Diabetic Patients During Its Routine Clinical Administration Determined by a Specific Radioimmunoassay. *Horm.Metab Res.* 1983;15(9):425-8.
- Matsuo, M., Tanabe, K., Kioka, N., Amachi, T., and Ueda, K. Different Binding Properties and Affinities for ATP and ADP Among SU.onylurea Receptor Subtypes, SUR1, SUR2A, and SUR2B. *The Journal of Biological Chemistry* 15-9-2000;275(37):28757-63.
- Meirhaeghe, A., Helbecque, Ni., Cotel, D., Arveiler, D., Ruidavets, ., Haas, B., Ferrières, J., Tauber, J., Bingham, A., and Amouyel, P. Impact of SU.onylurea Receptor 1 Genetic Variability on Non- Insulin-Dependent Diabetes Mellitus Prevalence and Treatment: A Population Study. *American Journal Of Medical Genetics* 1-6-2001;101(1):4-8.
- Miki, T., Nagashima, K., and Seino, S. The Structure and Function of the ATP-Sensitive K⁺ Channel in Insulin-Secreting Pancreatic B-Cells. *Journal Of Molecular Endocrinology* 1999;22(2):113-23.
- Nichols, C. G. and Lederer, W. J. Adenosine Triphosphate-Sensitive Potassium Channels in the Cardiovascular System. *American Journal of Physiology* 1991;261(6 Pt 2):H1675-H1686.
- Nichols, C. G., Shyng, S.-L., Nestorowicz, A., Glaser, B., Clement IV, J. P., Gonzalez, G., Aguilar-Bryan, L., Permutt, M. A., and Bryan, J. Adenosine Diphosphate As an Intracellular Regulator of Insulin Secretion. *Science* 1996;272:1785-7.
- Noma, A. ATP-Regulated K⁺ Channels in Cardiac Muscle. *Nature* 1983;305:147-8.
- Okuyama, Y., Yamada, M., Kondo, C., Satoh, E., Isomoto, S., Shindo, T., Horio, Y., Kitakaze, M., Hori, M., and Kurachi, Y. The Effects of Nucleotides and Potassium Channel Openers on the SUR2A/Kir6.2 Complex K⁺ Channel Expressed in a Mammalian Cell Line, HEK293T Cells. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology* 1998;435:595-603.

6. Literaturverzeichnis

- Otonkoski, T., Ammala, C., Huopio, H., Cote, G. J., Chapman, J., Cosgrove, K., Ashfield, R., Huang, E., Komulainen, J., Ashcroft, F. M., Dunne, M. J., Kere, J., and T., P. M. A Point Mutation Inactivating the SU.onylurea Receptor Causes the Severe Form of Persistent Hyperinsulinemic Hypoglycemia of Infancy in Finland. *Diabetes* 1999;48(2):408-15.
- Pountney, D. J., Sun, Z., Porter, L. M., Nitabach, M. N., Nakamura, T. Y., Holmes, D., Rosner, E., Kaneko, M., Manaris, T., Holmes, T. C., and Coetzee, William A. Is the Molecular Composition of K_{ATP} Channels More Complex Than Originally Thought? *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2001;33(8):1541-6.
- Proks, P., Jones, P., and Ashcroft, F. M. Interaction of Stilbene Disulphonates With Cloned K_{ATP} Channels. *British Journal of Pharmacology* 2001;132(5):973-82.
- Quast, U. ATP-Sensitive K^+ Channels in the Kidney. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 1996;354:213-25.
- Quast, U., Bray, K. M., Andres, H., Manley, P. W., Baumlin, Y., and Dosogne, J. Binding of the K^+ Channel Opener [3H]P1075 in Rat Isolated Aorta: Relationship to Functional Effects of Openers and Blockers. *Molecular Pharmacology* 1993;43:474-81.
- Quayle, John M., Nelson, M. T., and Standen, N. B. ATP-Sensitive and Inwardly Rectifying Potassium Channels in Smooth Muscle. *Physiological Reviews* 1997;77:1165-232.
- Reimann, F., Dabrowski, M., Jones, P., Gribble, F. M., and Ashcroft, F. M. Analysis of the Differential Modulation of Sulphonylurea Block of Beta- Cell and Cardiac ATP-Sensitive K^+ (K_{ATP}) Channels by Mg-Nucleotides. *J.Physiol* 15-2-2003;547(Pt 1):159-68.
- Russ, U., Hambrock, A., Artunc, F., Löffler-Walz, C., Horio, Y., Kurachi, Y., and Quast, U. Coexpression With the Inward Rectifier K^+ Channel Kir6.1 Increases the Affinity of the Vascular SU.onylurea Receptor SUR2B for Glibenclamide. *Molecular Pharmacology* 1999;56(5):955-61.
- Russ, U., Lange, U., Löffler-Walz, C., Hambrock, A., and Quast, U. Interaction of the SU.onylthiourea HMR 1883 With SU.onylurea Receptors and Recombinant ATP-Sensitive K^+ Channels: Comparison With Glibenclamide. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2001;299(3):1049-55.
- Russ, U., Metzger, F., Kickenweiz, E., Hambrock, A., Krippeit-Drews, P., and Quast, U. Binding and Effects of K_{ATP} Channel Openers in the Vascular Smooth Muscle Cell Line, A10. *British Journal of Pharmacology* 1997;122(6):1119-26.

6. Literaturverzeichnis

- Russ, U., Lange, U., Löffler-Walz, C., Hambrock, A., Quast, U. Binding and effect of KATP channel openers in the absence of Mg²⁺. *British Journal of Pharmacology* 2003, in Druck
- Sakura, H., Ämmälä, C., Smith, P. A., Gribble, F. M., and Ashcroft, F. M. Cloning and Functional Expression of the CDNA Encoding a Novel ATP-Sensitive Potassium Channel Subunit Expressed in Pancreatic β -Cells, Brain, Heart and Skeletal Muscle. *FEBS Letters* 1995;377(3):338-44.
- Schwanstecher, C., Meyer, U., and Schwanstecher, M. K_{IR}6.2 Polymorphism Predisposes to Type 2 Diabetes by Inducing Overactivity of Pancreatic B-Cell ATP-Sensitive K⁺ Channels. *Diabetes* 2002;51(3):875-9.
- Schwanstecher, M., Brandt, C., Behrends, S., Schaupp, U., and Panten, U. Effect of MgATP on Pinacidil-Induced Displacement of Glibenclamide From the Sulphonylurea Receptor in a Pancreatic β -Cell Line and Rat Cerebral Cortex. *British Journal of Pharmacology* 1992;106(2):295-301.
- Schwanstecher, M., Löser, S., Chudziak, F., and Panten, U. Identification of a 38-KDa High Affinity SU.onylurea-Binding Peptide in Insulin-Secreting Cells and Cerebral Cortex. *The Journal of Biological Chemistry* 1994;269(27):17768-71.
- Schwanstecher, M., Sieverding, C., Dörschner, H., Gross, I., Aguilar-Bryan, L., Schwanstecher, C., and Bryan, J. Potassium Channel Openers Require ATP to Bind to and Act Through SU.onylurea Receptors. *The EMBO Journal* 1-10-1998;17(19):5529-35.
- Shyng, S.-L. and Nichols, C. G. Membrane Phospholipid Control of Nucleotide Sensitivity of K_{ATP} Channels. *Science* 6-11-1998;282(5391):1138-41.
- Shyng, S. L., Ferrigni, T., Shepard, J. B., Nestorowicz, A., Glaser, B., Permutt, M. A., and Nichols, C. G. Functional Analyses of Novel Mutations in the SU.onylurea Receptor 1 Associated With Persistent Hyperinsulinemic Hypoglycemia of Infancy. *Diabetes* 1998;47(7):1145-51.
- Shyng, S., Cukras, C. A., Harwood, J., and Nichols, C. G. Structural Determinants of PIP₂ Regulation of Inward Rectifier K_{ATP} Channels. *Journal of General Physiology* 2000;116(5):599-607.
- Smits, P. and Thien, T. Cardiovascular Effects of Sulphonylurea Derivates - Implication for the Treatment of NIDDM. *Diabetologia* 1995;38:116-21.
- Süßbrich, H. and Busch, A. E. Kaliumkanäle. *Deutsche Apotheker Zeitung* 1998;138(13):1139-48.
- Szewczyk, A., Wojcik, G., Lobanov, N. A., and Nalecz, M. J. The Mitochondrial SU.onylurea Receptor: Identification and Characterization. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 23-1-1997;230(3):611-5.

6. Literaturverzeichnis

- Szewczyk, A. and Marbán, E. Mitochondria: a New Target for K⁺ Channel Openers? *Trends in Pharmacological Sciences* 1999;20(4):157-61.
- 't Hart, L. M., de Knijff, P., Dekker, J. M., Stolk, R. P., Nijpels, G., van der Does, F. E. E., Ruige, J. B., Grobbee, D. E., Heine, R. J., and Maassen, J. A. Variants in the Sulphonylurea Receptor Gene: Association of the Exon 16-3f Variant With Type II Diabetes Mellitus in Dutch Caucasians. *Diabetologia* 1999;42(5):617-20.
- Terzic, A., Jahangir, A., and Kurachi, Y. Cardiac ATP-Sensitive K⁺ Channels: Regulation by Intracellular Nucleotides and K⁺ Channel-Opening Drugs. *American Journal of Physiology Cell Physiology* 1995;269(3):C525-C545.
- Thomas, P. M., Cote, G. J., Hallman, D. M., and Mathew, P. M. Homozygosity Mapping, to Chromosome 11p, of the Gene for Familial Persistent Hyperinsulinemic Hypoglycemia of Infancy. *Am.J.Hum.Genet.* 1995;56(2):416-21.
- Tucker, S. J., Gribble, F. M., Zhao, C., Trapp, S., and Ashcroft, F. M. Truncation of Kir6.2 Produces ATP-Sensitive K⁺ Channels in the Absence of the Sulphonylurea Receptor. *Nature* 8-5-1997a;387(6629):179-83.
- Tucker, S. J., Gribble, F. M., Zhao, Chao, Trapp, S., and Ashcroft, F. M. Truncation of Kir6.2 Produces ATP-Sensitive K⁺ Channels in the Absence of the Sulphonylurea Receptor. *Nature* 1997b;387:179-83.
- Tusnády, G. E., Bakos, E., Varadi, A., and Sarkadi, B. Membrane Topology Distinguishes a Subfamily of the ATP-Binding Cassette (ABC) Transporters. *FEBS Letters* 27-1-1997;402(1):1-3.
- Uhde, I., Toman, A., Gross, I., Schwanstecher, C., and Schwanstecher, M. Identification of the Potassium Channel Opener Site on Sulphonylurea Receptors. *The Journal of Biological Chemistry* 1999;274(40):28079-82.
- Walker, J. E., Saraste, M., Runswick, M. J., and Gay, N. J. 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. *The EMBO Journal* 1982;1(8):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., de Jager, T., Schwartz, P. J., Toubin, J. A., Moss, A. J., Atkinson, D. L., Landes, G. M., Connors, T. D., and Keating, M. T. Positional Cloning of a Novel Potassium Channel Gene: KVLQT1 Mutations Cause Cardiac Arrhythmias. *Nat.Genet.* 1996;12(1):17-23.
- Wei, A., Jegla, T., and Salkoff, L. Eight Potassium Channel Families Revealed by the *C. Elegans* Genome Project. *Neuropharmacology* 1996;35(7):805-29.

6. Literaturverzeichnis

- Yamada, M., Isomoto, S., Matsumoto, S., Kondo, C., Shindo, T., H., Yoshiyuki, and Kurachi, Y. Sulphonylurea Receptor 2B and Kir6.1 Form a Sulphonylurea-Sensitive but ATP-Insensitive K^+ Channel. *Journal of Physiology-London* 1997;499:715-20.
- Zerangue, N., Schwappach, B., Jan, Yuh N., and Jan, L. Y. A New ER Trafficking Signal Regulates the Subunit Stoichiometry of Plasma Membrane K_{ATP} Channels. *Neuron* 1999;22(3):537-48.
- Zingman, Le. V., Alekseev, A. E., Bienengraeber, M., Hodgson, D., Karger, A. B., Dzeja, P. P., and Terzic, A. Signaling in Channel/Enzyme Multimers: ATPase Transitions in SUR Module Gate ATP-Sensitive K^+ Conductance. *Neuron* 2-8-2001;31(2):233-45.

Danksagungen:

Viele Personen haben dazu beigetragen, dass die Dissertation in der vorliegenden Form möglich wurde.

Herrn Prof. Dr. U. Quast danke ich für die Bereitstellung des Themas, die stete Diskussionsbereitschaft mit vielen wichtigen Anregungen und für die hervorragende Betreuung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Besonders danken möchte ich allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Quast, die durch ihre Hilfsbereitschaft und Freundlichkeit für eine stets angenehme Arbeitsatmosphäre sorgten. Insbesondere gilt mein Dank Frau C. Löffler-Walz für die hervorragende Betreuung im Labor. Frau Eva Stauß, Herrn Holger Felsch, Herrn U. Lange, Herrn PD Dr. U. Ruß und Frau Julia Laske für die nette, freundschaftliche Zusammenarbeit; Frau Dr. A. Hambrock und Frau Claudia Müller für die Bereitstellung der transient transfizierten Zellen.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern meinen größten Dank aussprechen für ihre stete und großzügige Unterstützung, ohne die mein Studium so nicht möglich gewesen wäre. Ihnen widme ich diese Arbeit.

ALEXANDER THOMAS KLEIN

PERSÖNLICHE INFORMATION

- Geburtsdatum: 19.12.1976
- Geburtsort: Stuttgart, Deutschland

SCHULBILDUNG

1983 - 1987	Steinenberg Grundschule, Stuttgart
1987 - 1996	Wirtemberg – Gymnasium, 1996 Abschluss mit Abitur, Stuttgart / Deutschland

STUDIUM

1998	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen /Deutschland
März 2000	Ärztliche Vorprüfung (Physikum)
März 2001	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (1. Staatsexamen)
April 2001	Beginn der Dissertation am Molekularpharmakologischen Institut des Universitätsklinikum Tübingen
September 2003	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (2. Staatsexamen)
Oktober 2003	Praktisches Jahr im Paracelsus Krankenhaus Ruit
23. Nov. 2004	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (3. Staatsexamen)

FAMULATUREN

August 2000	Gastroenterologische Abteilung der Städtischen Krankenanstalten Esslingen
September 2001	Toledo Hospital und Toledo Children's Hospital, Ohio USA in den Abteilungen für Emergency Medicine und Pediatrics
September 2002	Abteilung für Infektionskrankheiten am Wilheminspital der Stadt Wien, Österreich

ERSATZDIENST

1996 - 1997	Zivildienst beim Malteser-Hilfsdienst in Stuttgart.
-------------	---