

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Tübingen

Direktor: Professor Dr. med. H. Oßwald

Abteilung für Molekularpharmakologie

Abteilungsleiter: Professor Dr. U. Quast

**Die Bindung eines neuen Dihydropyridins, A-312110, an
rekombinante Sulfonylharnstoffrezeptoren: Vergleich
mit dem Cyanoguanidin P1075**

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

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

**vorgelegt von
Holger Felsch
aus
Stuttgart**

2004

Dekan: Professor Dr. D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. U. Quast

2. Berichterstatter: Professor Dr. E. Schleicher

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Die Plasmamembran	1
1.2	Membrankanäle für Ionen	1
1.3	Kaliumkanäle	3
1.3.1	Spannungsabhängige Kaliumkanäle	3
1.3.2	Ca ²⁺ -abhängige Kaliumkanäle	4
1.3.3	Einwärtsgleichrichtende Kaliumkanäle	5
1.3.4	Tandem-Kaliumkanäle	6
1.4	ATP abhängige Kaliumkanäle	7
1.4.1	Aufbau von ATP abhängigen K ⁺ -Kanälen	8
1.4.2	Die α -Untereinheit K _{IR} 6.x	9
1.4.3	Die β -Untereinheit SUR	10
1.4.4	Regulation des K _{ATP} -Kanals	12
1.4.5	Gewebsspezifische Verteilung der K _{ATP} -Untereinheiten	14
1.5	Physiologische und pathophysiologische Rolle von K_{ATP} – Kanälen	14
1.6	K_{ATP}-Kanal Krankheiten	17
1.6.1	Persistierende hyperinsulinämische Hypoglykämie	17
1.6.2	Rolle des β -Zell K _{ATP} -Kanals bei Diabetes Mellitus Typ 2	18
1.7	Pharmakologie der K_{ATP}-Kanäle	19
1.7.1	Blocker des ATP abhängigen Kaliumkanals	19
1.7.1.1	Sulfonylharnstoffe und Glinide	19
1.7.1.2	Weitere Blocker des K _{ATP} -Kanals mit Ansatzpunkt am SUR	22
1.7.1.3	K _{ATP} -Kanal Blocker mit Ansatzpunkt am Kir 6.2	24
1.7.2	Öffner des ATP-abhängigen Kaliumkanals	25
1.7.2.1	Neuere therapeutische Indikationen für KCOs	27
1.8	Fragestellung der Arbeit	31
2	MATERIAL UND METHODEN	33
2.1	Chemikalien	34
2.2	Puffer und Medien	36
2.3	HEK293 - Zellen	40
2.3.1	Kultivierung von HEK293 – Zellen	40

2.3.2	Transfektion von HEK293-Zellen	41
2.3.3	Einfrieren von HEK293-Zellen	42
2.3.4	Auftauen von HEK293-Zellen	43
2.3.5	Herstellung einer mikrosomalen Membranfraktion aus HEK293-Zellen	44
2.4	Proteinbestimmung	44
2.5	Radioligand-Bindungsexperimente	46
2.5.1	Wahl des Radioliganden	47
2.5.2	Gewinnung von Rezeptormaterial	48
2.5.3	Inkubation	48
2.5.4	Trennung von gebundenem und freiem Radioliganden durch Filtration:	49
2.5.5	Messung der Radioaktivität:	50
2.6	Modell der Rezeptorbindungsstudien	50
2.6.1	Sättigungsexperiment	52
2.6.2	Kompetitionsexperiment	53
2.6.3	Verallgemeinerung der Bindungsisotherme nach Hill	56
2.7	Datenauswertung	57
2.7.1	Analyse der Bindungskurven	57
2.8	Statistik	58
3	ERGEBNISSE	61
3.1	³H-P1075-Verdrängungsmessungen an mit SUR2A transfizierten HEK-Zellmembranen	61
3.1.1	Homologe Verdrängung der ³ H-P1075-Bindung an SUR2A.	62
3.1.2	Heterologe Verdrängung der ³ H-P1075-Bindung an SUR2A durch A-312110	63
3.2	³H-P1075-Verdrängungsmessungen in mit SUR2B transfizierten HEK-Zellmembranen	64
3.2.1	Homologe Verdrängung der ³ H-P1075-Bindung an SUR2B	65
3.2.2	Heterologe Verdrängung der ³ H-P1075-Bindung mit A-312110 an SUR2B	66
3.3	Messungen mit ³H-GBC an mit SUR2A(Y1206S) transfizierten HEK-Zellmembranen	67
3.3.1	Sättigung der ³ H-GBC Bindung an HEK-Zellmembranen permanent transfiziert mit SUR2A(Y1206S)	68
3.3.2	Heterologe Verdrängung der ³ H-GBC-Bindung an SUR2A(Y1206S) mit P1075	70
3.3.3	Heterologe Verdrängung der ³ H-GBC-Bindung an SUR2A(Y1206S) mit A-312110	72
3.4	³H-GBC-Messungen in mit SUR2A(Y1206S) / Kir6.2 transient transfizierten HEK-Zellmembranen	74

3.4.1	Sättigung der ³ H-GBC Bindung an HEK-Zellmembranen transient transfiziert mit SUR2A(Y1206S) / Kir 6.2	74
3.4.2	Heterologe Verdrängung der ³ H-GBC-Bindung von SUR2A(Y1206S) / Kir6.2 mit A-312110	75
3.5	³H-GBC-Messungen in mit SUR2B(Y1206S) transfizierten HEK-Zellmembranen	77
3.5.1	Sättigung der ³ H-GBC Bindung an HEK-Zellmembranen permanent transfiziert mit SUR2B(Y1206S)	77
3.5.2	Heterologe Verdrängung der ³ H-GBC-Bindung von SUR2B(Y1206S) mit P1075	78
3.5.3	Heterologe Verdrängung der ³ H-GBC-Bindung an SUR2B(Y1206S) mit A-312110	80
3.6	³H-GBC-Messungen an mit SUR1w.t. transfizierten HEK-Zellmembranen	82
3.6.1	Sättigung der ³ H-GBC Bindung an HEK-Zellmembranen permanent transfiziert mit SUR1w.t.	82
3.6.2	Heterologe Verdrängung der ³ H-GBC-Bindung an SUR 1w.t. mit P1075	83
3.6.3	Heterologe Verdrängung der ³ H-GBC-Bindung an SUR1w.t. mit A-312110	84
3.7	Zusammenfassung der Ergebnisse	86
4	DISKUSSION	88
4.1	Bindung von A-312110 und P1075 an die nativen SUR2-Subtypen unter Verwendung von ³H-P1075 als Radioligand	88
4.2	Bindung von A-312110 und P1075 an SUR2A(Y1206S) und SUR2B(Y1206S) unter Verwendung von ³H-GBC als Radioligand	91
4.3	Bindung von A-312110 und P1075 an SUR1w.t unter Verwendung von ³H-GBC als Radioligand	94
4.4	Allosterische Koppelung an Nukleotide	95
4.4.1	Koppelung an Nukleotide bei Bindungsexperimenten mit ³ H-P1075 als Radioligand	95
4.4.2	Koppelung an Nukleotide bei Bindungsexperimenten mit ³ H-GBC als Radioligand	97
4.5	Effekte der Koexpression mit Kir 6.2 auf die Bindungseigenschaften von SUR2A(Y1206S)	99
4.5.1	³ H-GBC Bindung und allosterische Kopplung an MgATP	99
4.5.2	Effekt der Koexpression mit Kir 6.2 auf die Hemmung der ³ H-GBC-Bindung an SUR2A(Y1206S) durch A-312110	100
5	ZUSAMMENFASSUNG DER ARBEIT	102

Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1 KcsA Kanal von <i>Streptomyces lividans</i>	10
Abb. 2 Struktur und funktionell wichtige Regionen des K_{ATP} -Kanals der β -Zelle	12
Abb. 3 Modell der Insulinfreisetzung aus den β -Zellen des Pankreas. (Konsensusmodell nach Cook and Hales, 1984; Löffler-Walz und Quast, unveröffentlicht).	15
Abb. 4 Mechanismen der IPC	17
Abb. 5 Lage der Mutation E ²³ K in der Nähe des Aminoterminus von Kir6.2. Quelle: Quast und Löffler-Walz, unveröffentlicht.	19
Abb. 6 K_{ATP} -Kanal Blocker der ersten, zweiten und dritten Generation	20
Abb. 7 Modell der Bindungsstellen an SUR1 und SUR2A (nach Ashcroft and Gribble, 1999).	21
Abb. 8 K_{ATP} -Kanal Blocker mit Ansatzpunkt am SUR,	22
Abb. 9 Blocker am Kir 6.2.	24
Abb. 10 K_{ATP} -Kanal Öffner der ersten Generation,	25
Abb. 11 Kardioselektive K_{ATP} -Öffner,	27
Abb. 12 K_{ATP} -Blocker bei bronchialer Hyperreaktivität	28
Abb. 13 K_{ATP} -Öffner bei hyperaktiver Blase	29
Abb. 14 [¹²⁵ I]A-312110 ein neuer hochaffiner K_{ATP} -Öffner mit 1,4-Dihydropyridinstruktur	30
Abb. 15: Lichtmikroskopische Darstellung von HEK293-Zellen in niedriger Konfluenz	41
Abb. 16 : Eichkurve für die Proteinbestimmung nach Lowry.	46
Abb. 17 Homologe Verdrängung der ³ H-P1075 Bindung an mit SUR2A permanent transfizierten HEK-Zellen.	62
Abb. 18 Heterologe Verdrängung der ³ H-P1075 Bindung durch A-312110 an mit SUR2A permanent transfizierten HEK-Zellen.	64
Abb. 19 Homologe Verdrängung der ³ H-P1075 Bindung an SUR2B in Membranen aus stabil transfizierten HEK-Zellen.	65

Abb. 20 Heterologe Verdrängung der ^3H -P1075 Bindung durch A-312110 an mit SUR2B permanent transfizierten HEK-Zellen	66
Abb. 21 ^3H -GBC Sättigungsexperimente an HEK 293-Zellmembranen permanent transfiziert mit SUR2A(Y1206S)	69
Abb. 22: Heterologe Verdrängung der ^3H -GBC Bindung durch P1075 an mit SUR2A(Y1206S) permanent transfizierten HEK-Zellen.	71
Abb. 23 Heterologe Verdrängung der ^3H -GBC Bindung durch A-312110 an mit SUR2A(Y1206S) permanent transfizierten HEK-Zellen.	73
Abb. 24 ^3H -GBC Sättigungsexperimente an HEK 293-Zellmembranen transient transfiziert mit SUR2A(Y1206S) / Kir6.2	75
Abb. 25 Heterologe Verdrängung der ^3H -GBC Bindung durch A-312110 an mit SUR2A(Y1206S) / Kir6.2 transient transfizierten HEK-Zellen.	76
Abb. 26 ^3H -GBC Sättigungsexperimente an HEK 293-Zellmembranen permanent transfiziert mit SUR2B(Y1206S)	78
Abb. 27 Heterologe Verdrängung der ^3H -GBC Bindung durch P1075 an mit SUR2B(Y1206S) permanent transfizierten HEK-Zellen.	79
Abb. 28 Heterologe Verdrängung der ^3H -GBC Bindung durch A-312110 an mit SUR2B(Y1206S) permanent transfizierten HEK-Zellen.	81
Abb. 29 ^3H -GBC Sättigungsexperimente an HEK 293-Zellmembranen permanent transfiziert mit SUR1w.t.	83
Abb. 30 Heterologe Verdrängung der ^3H -GBC Bindung durch P1075 an mit SUR1w.t. permanent transfizierten HEK-Zellen.	84
Abb. 31 Heterologe Verdrängung der ^3H -GBC Bindung durch A-312110 an mit SUR1w.t. permanent transfizierten HEK-Zellen.	85

Verzeichnis der Tabellen

Tab. 1 Wichtige chemische Strukturklassen von KCO und einige zugehörige Wirkstoffe	25
Tab. 2 Tabellarische Auflistung der verwendeten Reagentien	36
Tab. 3 Homologe Verdrängung der ^3H -P1075 Bindung an mit SUR2A permanent transfizierten HEK-Zellen.	63
Tab. 4 Heterologe Verdrängung der ^3H -P1075 Bindung durch A-312110 an mit SUR2A permanent transfizierten HEK-Zellen.	64
Tab. 5 Homologe Verdrängung der ^3H -P1075 Bindung aus SUR2B	66
Tab. 6 Heterologe Verdrängung der ^3H -P1075-Bindung an SUR2B durch A-312110	67
Tab. 7 ^3H -GBC Sättigungsexperimente an HEK 293-Zellmembranen permanent transfiziert mit SUR2A(Y1206S)	69
Tab. 8 Heterologe Verdrängung der ^3H -GBC Bindung durch P1075 an mit SUR2A(Y1206S) permanent transfizierten HEK-Zellen.	71
Tab. 9 Heterologe Verdrängung der ^3H -GBC Bindung durch A-312110 an mit SUR2A(Y1206S) permanent transfizierten HEK-Zellen.	73
Tab. 10 ^3H -GBC Sättigungsexperimente an HEK 293-Zellmembranen transient transfiziert mit SUR2A(Y1206S) / Kir6.2	75
Tab. 11 Heterologe Verdrängung der ^3H -GBC Bindung durch A-312110 an mit SUR2A(Y1206S) / Kir6.2 transient transfizierten HEK-Zellen.	76
Tab. 12 ^3H -GBC Sättigungsexperimente an HEK 293-Zellmembranen permanent transfiziert mit SUR2B(Y1206S)	78
Tab. 13 Heterologe Verdrängung der ^3H -GBC Bindung durch P1075 an mit SUR2B(Y1206S) permanent transfizierten HEK-Zellen.	80
Tab. 14 Heterologe Verdrängung der ^3H -GBC Bindung durch A-312110 an mit SUR2B(Y1206S) permanent transfizierten HEK-Zellen.	81
Tab. 15 ^3H -GBC Sättigungsexperimente an HEK 293-Zellmembranen permanent transfiziert mit SUR1w.t.	83

Tab. 16 Wichtige Unterschiede der experimentellen Bedingungen zwischen der vorliegenden Arbeit und der Studie von Davis-Taber et al., 2003	90
Tab. 17 Vergleich der MgATP-Verschiebung, mit A-312110 und P1075 , am nativen SUR2 unter Verwendung von ³ H-P1075 als Radioligand	97

Verzeichnis der Abkürzungen

A	Amplitude der spezifischen Bindung / Verdrängung in %SB
ABC-Proteine	ATP-Binding-Cassette-Proteins
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
AP	Aktionspotential
Aqua demin.	demineralisiertes Wasser
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
B _{MAX}	maximale Bindungskapazität
BSA	Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumine)
B _{TOT}	totale Bindung
cDNA	DNA Kopie eines RNA Stückes mithilfe der Reversen Transkriptase, copyDNA
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembran Regulator
DAG	Diacylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
dpm	Zerfälle pro Minute (decays per minute)
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis (2-Aminoethylether)-N,N,N',N',- tetraacetat
f	$10 \exp \Delta pK_D$, Maß zur quantifizierung eines MgATP - shifts
FCS	fötale Kälberserum
GBC	Glibenclamid
GLUT2	Glutamat-2-Rezeptor
HCl	Salzsäure
HEK-Zellen	humane embryonale Nierenzellen (<u>H</u> uman <u>E</u> mbryonal <u>K</u> idney cells)
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl) piperazin-N-(2-ethansulfonsäure)
³ H	Tritium (Isotop des Wasserstoffs)

$^3\text{H-GBC}$	mit Tritium markiertes Glibenclamid
$^3\text{H-P1075}$	mit Tritium markiertes P1075
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
$\text{K}_{2\text{P}}$	Tandem Kaliumkanal (für vollständigen Kanal sind nur zwei Untereinheiten notwendig)
K_{ATP} -Kanal	ATP-empfindlicher Kaliumkanal
KCO	Kaliumkanalöffner (K^+ - channel opener)
K_D	Gleichgewichts- dissoziationskonstante
kDa	kilo-Dalton (relative Molekülmasse)
K_i	Dissoziationskonstante des heterologen Inhibitors
Kir	einwärts gleichrichtender Kaliumkanal (inward rectifying K^+ - channel)
Komp.	Kompetitor
K_V	spannungsabhängiger Kaliumkanal (voltage dependent K^+ - channel)
L_0	totale Konzentration des Radioliganden im Inkubationansatz
L_{kalt}	kalter Ligand, Ligand ist nicht radioaktiv markiert
MDR	Multi-Drug Resistance
MEM	Minimal Essential Medium
MgADP	magnesium-gebundenes ADP
MgATP	magnesium-gebundenes ATP
MODY	Maturity Onset Diabetes of the Young
m_{Prot}	Masse des Proteins in der Messküvette bei der Proteinbestimmung nach Lowry
MWG	Massenwirkungsgesetz
n	Anzahl der Einzelversuche
NBF	Nukleotid-Bindungsfalte eines ABC-Proteins

n_H	Hill-Koeffizient
NIDDM	Not Insulin Dependant Diabetes Mellitus (Typ 2)
NSB	nichtspezifische Bindung
OD ₇₇₀	Optische Dichte bei einer Wellenlänge des Lichts von 770 nm
Oleoyl-CoA	Oleoyl-Coenzym A
P1075	N-Cyano-N'-(1,1-Dimethylpropyl)-N''-3-pyridylguanidin
pcDNA	Plasmidvektor, der die cDNA des zu exprimierenden Proteins enthält
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PHHI	Persistierende hyperinsulinämische Hypoglykämie des Kindesalters
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-bisphosphate
PK	Proteinkonzentration
pK _D	negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichts-Dissoziationskonstante
PLC	Proteinaktivierte Phospholipase C
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur (22 °C)
SA	spezifische Aktivität
SB	spezifische Bindung
SEM	standard error of the mean
SUR	Sulfonyl-harnstoffrezeptor
TM	Transmembranhelix
TMD	Transmembran-Domäne
TNP-ATP	((2',3'-O-(2,4,6-trinitrophenylcyclo-hexadienylidene) adenosine 5'-triphosphate), fluoreszierendes ATP-Analogon
TOK1	Two P-region-containing Outwardly rectifying K ⁺ -channel
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

TWIK1	Tandem of P domains in a Weak Inward rectifying K ⁺ -channel
w.t.	wild type
x g	x mal Gravitations-beschleunigung (9.81 m/s ²)

1 Einleitung

1.1 Die Plasmamembran

Die Plasmamembran der Zellen besteht aus einer kontinuierlichen etwa 5 nm dicken Lipiddoppelschicht. Die Membranlipide sind zum größten Teil amphiphil mit einem nach außen zeigenden hydrophilen Kopfteil an den sich zwei hydrophobe Kohlenwasserstoffketten anschließen, die im Inneren der Doppelschicht eine nicht-wässrige Phase bilden. Für geladene Teilchen, wie Na^+ , K^+ , Ca^{2+} oder Cl^- Ionen, ist die Plasmamembran impermeabel. Diese Teilchen können die Membran über eingelagerte Transportproteine, z.B. Ionenkanäle, passieren.

1.2 Membrankanäle für Ionen

Ionenkanäle sind integrale Membranproteine, die häufig aus mehreren Untereinheiten bestehen. Sie schalten hochfrequent zwischen offenen (die mittlere Öffnungsdauer beträgt wenige Millisekunden) und geschlossenen Zuständen hin und her und stellen daher keine mit Wasser gefüllte starre Röhre, sondern ein Labyrinth von sich schnell bewegenden Molekülgruppen und Ladungen dar. Dabei ist die treibende Kraft der Ionenbewegung zwischen dem intra- und dem extrazellulären Raum, der elektrochemische Gradient für das Ion, das sich durch einen Kanal, durch die passive Diffusion entlang des elektrochemischen Gradienten bewegt. Ionenkanäle arbeiten meist selektiv und lassen nur bestimmte Ionen passieren. Man unterscheidet zum Beispiel Natrium-, Kalium- und Kalziumkanäle, die durch Ladungen oder Bindungsstellen an der Kanalwand den Durchtritt für ihr spezifisches Ion erleichtern, ihn für andere Stoffe aber unmöglich machen können (Alberts et al., 1990; Hille, 1992b) Wichtige Parameter der Ionenselektivität sind die Größe eines Teilchens einschließlich seiner Hydrathülle und seine Ladung. Für die

Passage eines Ionenkanals muss ein Ion den größten Teil seiner Hydrathülle ablegen, um die Energie für schwache Bindungen an den geladenen funktionellen Gruppen von Aminosäuren entlang des Kanals aufbringen zu können. Der Verlust der Hydrathülle ist für das Ion energetisch ungünstig und es kann den Kanal nur dann durchqueren, wenn sein Energieverlust durch die schwache Bindung an die Kanalwand kompensiert wird (Doyle et al., 1998; Hille, 1992b).

Betrachtet man das Energieprofil eines Ionenkanals findet man, zu einem bestimmten Zeitpunkt, über den Kanal verteilt Energiegipfel, die Permeationsschranken darstellen und Senken, die zum Beispiel als schwache Bindungen interpretiert werden können. Mit der Zeit verschiebt sich das Energieprofil im Kanal in zyklischer Weise und das Ion kann plötzlich auf der anderen Seite eines Energiegipfels liegen und passieren (Läuger, 1985). Das Energieprofil eines Ionenkanals ist für verschiedene Ionen unterschiedlich und stellt einen weiteren Erklärungsansatz für die Ionenselektivität der Kanäle dar.

Der Ionenstrom durch einen einzelnen Kanal hängt von der Leitfähigkeit (γ) des Kanals und dem elektrochemischen Gradienten ab. Die Einheit der Leitfähigkeit ist Siemens [S], sie beschreibt die Anzahl der passierenden Ionen pro Zeiteinheit. Die kleinen Leitfähigkeiten von Ionenkanälen misst man in pico-Siemens $1 \text{ pS} = 10^{-12} \text{ S}$.

Die Aktivität von Ionenkanälen wird auf vielfältige Weise geregelt. Eine grobe Einteilung umfasst spannungsabhängige (voltage gated) Kanäle, die durch das Membranpotential der Zelle gesteuert werden, mechanisch kontrollierte Ionenkanäle und ligandengesteuerte Kanäle (ligand gated). Ligandengesteuerte Kanäle können zum einen durch extrazelluläre Botenstoffe (der Neurotransmitter Acetylcholin steuert beispielsweise einen als nicotinischen Acetylcholinrezeptor bezeichneten schnellen Kationenkanal), zum anderen durch Liganden, die innerhalb der Zelle aktiv werden wie die second messenger Ca^{2+} und IP_3 (Inositol-1,4,5-Triphosphat), G-Proteine, Nukleotide und das Lipid PIP_2 (Phosphatidyl-Inositol-Biphosphat) moduliert werden. Eine weitere Möglichkeit der Aktivitätsbeeinflussung von Ionenkanälen stellt die

Proteinphosphorylierung/-dephosphorylierung durch Proteinkinasen dar (Hille, 1992a; Süßbrich and Busch, 1998).

1.3 Kaliumkanäle

Es wurden bis zum jetzigen Zeitpunkt mehr als 50 verschiedene Kaliumkanäle (K^+ Kanäle) identifiziert, die in vier verschiedene Klassen eingeteilt werden können (Salkoff and Jegla, 1995). Der eigentliche Kanal formiert sich zu einem Tetramer oder Dimer meist aus homologen α -Untereinheiten. Dazu können β -Untereinheiten treten, die für die Regulation der Kanalaktivität eine wichtige Rolle spielen (Leicher et al., 1996).

1.3.1 Spannungsabhängige Kaliumkanäle

Spannungsabhängige Kaliumkanäle (K_V) dienen vor allem der Repolarisation von Zellen erregbarer Gewebe (z.B. Neurone, Myozyten) nach einem Aktionspotential, oder einer langsamen Depolarisation.

Die α -Untereinheit des K_V besitzt sechs α -helikale Transmembransegmente (Jan and Jan, 1997). Die eigentliche Pore bildet dabei die hoch konservierte H5-Domäne (beim K_V lokalisiert zwischen den Transmembransegmenten S5 und S6), die für die Kaliumselektivität des Kanals von essentieller Bedeutung ist und bei allen K^+ Kanälen vorkommt (Heginbotham et al., 1994). Diese Domäne dient daher auch der Identifikation neu entdeckter Clone als K^+ -Kanäle.

K_V -Kanäle weisen eine ausgeprägte Auswärtsgleichrichtung der K^+ -Leitfähigkeit auf, dabei besitzt jeder Typ von K_V -Kanal eine spezifische Schwellenspannung, bei deren Überschreitung sich seine Offenwahrscheinlichkeit rapide erhöht. Für diese Aktivierung wird eine potential-induzierte Ladungsverschiebung im Transmembransegment S4 verantwortlich gemacht, die eine Konformationsänderung im Kanal, zur Passage von K^+ , hervorruft.

Bei verlängerter Depolarisation geht der K_V in einen inaktivierten Zustand über. Es existiert eine schnelle und eine langsame Form der Inaktivierung von K_V -

Kanälen. Die schnelle Inaktivierung lässt sich am besten durch das „Ball and Chain-Modell“ erklären: Der intrazellulär gelegene Amino (N)-Terminus hat in etwa die Form eines Balles, mit positiv geladenen Aminosäure-Gruppen auf einer Seite, an einer Kette. Kurz nach der Depolarisation verschließt dieser Ball, angezogen durch negative Ladungen des Kanalproteins den Kanal (Isacoff et al., 1991). Die langsame Inaktivierung führt vermutlich durch ein Proteinrearrangement, induziert durch den Carboxyl (C)-terminus, zu einer Verengung des Kanaleingangs an der Membraninnenseite (Liu et al., 1996).

Das angeborene Long QT-Syndrom (Romano-Ward Syndrom) ist eine seltene genetische Erkrankung die durch eine verzögerte Repolarisation der Herzmuskelzelle (verlängertes QT-Intervall im EKG) zu Arrhythmien, Synkopen und plötzlichem Herztod führen kann. Verantwortlich für diese Erkrankung sind vor allem zwei Typen von K_V -Kanälen, die erst in neuerer Zeit entdeckt wurden:

1. HERG (human ether-a-go-go-related gene- K_V6) oder KCNH1 (neue Nomenklatur) der einen schnellen K^+ Auswärtsstrom (I_{Kr}) am Herzen erzeugt und damit zur Repolarisation nach dem Aktionspotential beiträgt (Sanguinetti et al., 1995). Es wurden sechs vererbare Mutationen des HERG-Gens entdeckt, die zu einer starken Reduktion von I_{Kr} führten (Curran et al., 1995).
2. KVLQT1 (KCNQ1 nach der neuen Nomenklatur) der einen langsamen Auswärtsstrom I_{Ks} erzeugt. Die Mutation dieses Kanals verzögert ebenfalls die Repolarisation und verlängert damit das QT-Intervall (Splawski et al., 1997).

1.3.2 Ca^{2+} -abhängige Kaliumkanäle

Ca^{2+} -abhängige Kaliumkanäle (K_{Ca}) finden sich in fast allen Zelltypen. Sie sind in ihrer Struktur den K_V Kanälen sehr ähnlich, . Allerdings weisen K_{Ca} -Kanäle einen verlängerten C-terminus auf, von dem man vermutet, dass er der Bestimmung von intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen zur Modulation der Kanalaktivität dient. Diese Kanäle werden also durch Depolarisierung oder die Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels aktiviert. Dabei führt eine

Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} zu einer Erniedrigung des Schwellenpotentials der spannungsabhängigen Komponente (Köhler et al., 1996).

Man unterscheidet K_{Ca} -Kanäle mit hoher Leitfähigkeit (150-250 pS, BK_{Ca}), schneller Aktivierung (1-2 ms) und fast ebenso schneller Inaktivierung (~10ms) (Rudy, 1988; Butler et al., 1993) und Kanäle von geringerer Leitfähigkeit (10-14 pS, SK_{Ca}) mit langsamer Aktivierung (10-1000 ms) und Schließung nach wenigen Sekunden (Rudy, 1988; Köhler et al., 1996). K_{Ca} -Kanäle mit hoher Leitfähigkeit dienen der schnellen Hyperpolarisierung von Depolarisierten Zellen mit folglich hohen intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen, durch schnellen K^+ Auswärtsstrom. Bei den K_{Ca} Kanälen mit niedriger Leitfähigkeit geht man davon aus, dass die Zelle durch die Verhinderung des Ca^{2+} Einstroms (wegen der verringerten Offenwahrscheinlichkeit von spannungsabhängigen Ca^{2+} Kanälen durch die Hyperpolarisation) vor Übererregung und schädlich hohen Ca^{2+} Konzentrationen geschützt werden soll. Es wurden in manchen Geweben auch K_{Ca} -Kanäle mit mittlerer Leitfähigkeit (~18-50 pS, IK_{Ca}) beschrieben (Ramboer and Boeynaems, 1989).

1.3.3 Einwärtsgleichrichtende Kaliumkanäle

Die Einwärtsgleichrichtenden Kaliumkanäle (K_{ir} = „inward rectifying“) können als „funktionelles Fragment“ des K_{v} verstanden werden. Hier verbindet die H5-Domäne nur zwei Transmembransegmente, M1 und M2 (Kubo et al., 1993); Sie entsprechen den Segmenten S5 und S6 des K_{v} Kanals. Der K_{ir} spielt eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung des Ruhepotentials und der Regulierung der Erregbarkeit von Zellen (Doupnik et al., 1995). Das Ruhepotential der Zelle schwankt gewebeabhängig zwischen -80 und -30 mV (Hille, 1992b). Das Nernst Gleichgewichtspotential für K^+ liegt bei -90 mV; bei den Geweben mit hohem Ruhepotential ist die Leitfähigkeit der ruhenden Membran für K^+ meistens weitaus größer, als für die anderen am Membranpotential beteiligten Ionen (Na^+ , Ca^{2+} , Cl^-).

Einwärts Gleichrichtung bedeutet dass ein Ion über den Kanal wesentlich leichter ins Zellinnere gelangen kann, als nach außen. Man beobachtet beim Kir also einen K^+ -Einwärtsstrom. Dieser Mechanismus funktioniert allerdings nur in der Nähe des Ruhepotentials, ab einem Membranpotential von etwa -70 mV wird der Kir von positivgeladenen Substanzen (Mg^{2+} , Polyamine) von innen verschlossen (Doupnik et al., 1995).

Einen G-Protein gekoppelten Kir stellt der GIRK (G-protein-linked Inwardly Rectifying K^+ -channel) dar (Dascal et al., 1993), der am Herzen über einen muscarinischen (M2) Acetylcholinrezeptor durch den Parasympathicus gesteuert wird (Pfaffinger et al., 1985; Yatani et al., 1990). Durch Aktivierung des Kanals erhöht sich die Kaliumleitfähigkeit, und die Membran wird hyperpolarisiert. Dadurch verlängert sich die Zeit bis die Schrittmacherzellen die Schwelle zur Auslösung eines Aktionspotentials erreicht haben und die Herzfrequenz nimmt ab.

Eine weitere Sonderform des Kir stellt dar ATP-abhängige K^+ -Kanal dar, der im Kapitel 1.4 ausführlich beschrieben wird.

1.3.4 Tandem-Kaliumkanäle

Eine Klasse von Kanälen, die erst in den letzten Jahren entdeckt wurden, sind die Tandem-Kanäle (K_{2P}), bei denen zwei Kirs auf einer Polypeptidkette liegen, sodass zur Bildung eines Kanals nur zwei Untereinheiten nötig sind (Ketchum et al., 1995). Den zuerst entdeckten TOK1 (Two P-region-containing Outwardly rectifying K^+ -channel) fand man in Hefezellen. Im Weiteren wurden acht K_{2P} -Kanäle bei Säugetieren entdeckt (KCNK1-8) (Lesage et al., 1996; Salinas et al., 1999; Reyes et al., 1998; Chavez et al., 1999; Fink et al., 1996; Duprat et al., 1997; Fink et al., 1998). Diese Kanäle sind in den verschiedensten Geweben verbreitet und generieren einen kontinuierlichen, spannungsunabhängigen schwach gleichrichtenden Kaliumstrom. Es scheint, dass sie für die Erhaltung der Hintergrundleitfähigkeit der Zellen mitverantwortlich sind, die das Membranpotential der Zelle nahe dem K^+ -Gleichgewichtspotential einstellt. TREK-1 (KCNK2) und TRAAK (KCNK4) sind mechanosensitive Kanäle und

werden durch Arachidonsäure und andere ungesättigte Fettsäuren moduliert (Maingret et al., 1999). TWIK-1 (KCNK1) und TWIK-2 (KCNK6) bilden schwache einwärtsgerichtete K^+ -Kanäle, die durch Proteinkinase C und Ansäuerung der Zelle inhibiert werden können (Lesage et al., 1996; Chavez et al., 1999). TASK-1 (KCNK3) und TASK-2 (KCNK5) reagieren auf Veränderungen des extrazellulären pH-Wertes (Reyes et al., 1998; Duprat et al., 1997). TASK-3 ist ein erst vor kurzem entdeckter K_{2P} -Kanal, der ausschließlich im Gehirn exprimiert wird (Rajan et al., 2000). Möglicherweise ist das Vorkommen von K_{2P} -Kanälen unter allen K^+ -Kanälen am häufigsten.

1.4 ATP abhängige Kaliumkanäle

K_{ATP} -Kanäle wurden zum erstenmal im Herzmuskel beschrieben (Noma, 1983; Trube and Hescheler, 1984). Später stellte sich heraus, dass dieser Kanaltyp auch in vielen anderen Geweben vertreten ist (siehe Kapitel 1.4.5). Charakteristisch für K_{ATP} -Kanäle ist, daß sie durch intrazelluläres ATP geschlossen und durch MgADP geöffnet werden (Ashcroft and Ashcroft, 1990b). Daraus wird ersichtlich, dass K_{ATP} -Kanäle in der Lage sind den metabolischen Zustand der Zelle an die elektrische Aktivität der Zellmembran zu koppeln. Ist der Energiezustand der Zelle (d.h. der Quotient [ATP / ADP]) gut, schliessen sich die K_{ATP} -Kanäle, die Zellmembran wird depolarisiert und die Zelle damit leichter erregbar. Bei einem niedrigen [ATP / ADP] Quotienten wird die Zelle hyperpolarisiert.

K_{ATP} -Kanäle sind Heteromultimere, die sich aus zwei Typen von Untereinheiten zusammensetzen: den Untereinheiten des einwärtsgerichtenden Kaliumkanals Kir6.x (α -Untereinheit) und dem Sulfonylharnstoffrezeptor SUR (β -Untereinheit). K_{ATP} -Kanäle bilden dabei aus je vier Einheiten Kir6.x und vier Einheiten SUR einen oktameren Komplex. Es gibt 2 Subtypen der Kir 6.x Familie (vgl. Kapitel 1.4.2) und 2 Subtypen des SUR (vgl. Kapitel 1.4.3); aus dem SUR2-Gen entstehen durch alternatives Spleißen die physiologisch wichtigen Isoformen SUR2A (Inagaki et al., 1996) und SUR2B. Der

Sulfonylharnstoffrezeptor kann nun je nach Gewebe mit Kir6.1 (Inagaki et al., 1995b) oder Kir6.2 (Sakura et al., 1995; Inagaki et al., 1995a) kombiniert sein. Beispielsweise wird in der β -Zelle des Pankreas die Kombination SUR1 / Kir6.2 exprimiert.

Man kann K_{ATP} -Kanäle durch ihre elektrische Aktivität, ihre Empfindlichkeit gegenüber Nukleotiden und ihre Pharmakologie charakterisieren:

K_{ATP} Kanäle sind schwache Einwärtsgleichrichter (Ashcroft and Rorsman, 1989; Ashcroft and Ashcroft, 1990a). Die elektrische Aktivität des K_{ATP} -Kanals ist an der β -Zelle des Pankreas am besten untersucht. Nach einem allosterischen Modell der Funktion des K_{ATP} Kanals, existieren in Abwesenheit von Liganden drei Zustände ein stabiler geschlossener Zustand C_0 und ein offener Zustand O , der kurzzeitig in einen vorübergehenden geschlossenen Zustand C_1 übergehen kann (Kakei and Noma, 1984). ATP und Sulfonylharnstoffe (siehe auch Kapitel 1.7.1) binden bevorzugt an C_0 , und stabilisieren damit diesen Zustand. Dies führt zu einer verminderten Offenwahrscheinlichkeit des Kanals (Gillis et al., 1989). MgADP und der K_{ATP} -Kanalöffner Diazoxid (siehe auch Kapitel 1.7.2) binden vor allem am geöffneten Kanal (O), und aktivieren ihn damit (Kozlowski et al., 1989). Ein Ligand stabilisiert also immer den Kanalzustand, an den er am besten bindet, d.h. zu dem er die höchste Affinität hat. K_{ATP} Kanäle werden auch auf andere, vielfältige Weise wie z.B. durch G-Proteine (Sánchez et al., 1998), durch das Phospholipid PIP_2 (Baukrowitz et al., 1998) oder durch Oleyl CoA (Liu et al., 2001) moduliert.

1.4.1 Aufbau von ATP abhängigen K^+ -Kanälen

K_{ATP} -Kanäle sind Heterooktamere aus α - und β -Untereinheiten (Aguilar-Bryan et al., 1995; Inagaki et al., 1995a; Sakura et al., 1995; Clement IV et al., 1997), die sich mit einer 4:4 Stöchiometrie zusammensetzen: dabei sind 4 α und 4 β -Untereinheiten am Aufbau eines Kanals beteiligt, dessen relative Molekülmasse ≈ 950 kDa beträgt (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). Die Assoziation mit SUR1 konnte in Experimenten mit $K_{IR6.2}$ spezifischen Antikörpern (Graham et al., 1977) und dem Photoradioliganden ^{125}I -Azido-GBC (Schwanstecher et al., 1994b; Clement IV et al., 1997) nachgewiesen werden. (Tucker et al., 1997) konnten allerdings zeigen, dass $K_{IR6.2}$ -Kanäle, denen die 36 C-terminalen Aminosäuren entfernt waren ($K_{IR6.2}\Delta C36$), durchaus in der Lage waren, K^+ -Ströme bei alleiniger Expression zu erzeugen, da bei diesem Rumpfkanal das Retentionsmotiv R-K-R mit abgeschnitten wurde. Gleiches gilt für $K_{IR}\Delta C26$. Beide Kanäle sind daher wichtige Werkzeuge, um die Pharmakologie des Kir6.2 zu studieren.

1.4.2 Die α -Untereinheit $K_{IR6.x}$

Das humane Gen für $K_{IR6.1}$ (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 (~ 38 kDa) zeigt eine 98%ige Homologie zu murinem $K_{IR6.1}$ und umfasst 424 Aminosäuren. Das intronlose Gen von Kir6.2 (oder BIR = β -cell inward rectifier) liegt auf dem kurzen Arm von Chromosom 11 (in der Nähe von SUR1), hat eine Länge von 390 Aminosäuren und eine relative Molekülmasse von 43.5 kDa.

Kir6.x bildet in einem tetrameren Komplex den eigentlichen Kanal für die Membranpassage von K^+ Ionen. Wie die anderen Mitglieder der Familie der Einwärtsgleichrichter (siehe Kapitel 1.3.3) verfügt er über zwei Transmembransegmente M1 und M2. Diese flankieren die hoch konservierte H5-Domäne (P-loop), die die eigentliche Pore bildet. Die Struktur der Pore wurde anhand eines verwandten Kanals, des KcsA-Kanals (siehe Abb. 1) des Bakteriums *Streptomyces lividans* untersucht (Doyle et al., 1998). Der KcsA-Kanal ist ein Tetramer aus vier identischen Untereinheiten, die sich um die zentrale Pore gruppieren. Dabei sind vier M2-Helices trichterförmig zum Zytoplasma konvergierend angeordnet und bilden somit ein Tor, das sich öffnen und schließen kann.

Die H5-Domäne ist dabei in der Nähe der Außenseite des Kanals positioniert. Sie dient als Selektivitätsfilter, bei dem die Carbonylgruppen der Sequenz Gly-Tyr-Gly eine zentrale Rolle spielen. Unterhalb des Selektivitätsfilters liegt ein Vorraum, $\sim 10 \text{ \AA}$ im Durchmesser, der über einen wassergefüllten Tunnel aus hydrophoben Aminosäuren mit dem Zellinneren verbunden ist.

Im Gegensatz zum KcsA-Kanal zeigen $K_{IR}6.2$ oder 6.1, welche in ihrer Aminosäuresequenz zu 70% übereinstimmen (Sakura et al., 1995; Inagaki et al., 1997), einen Selektivitätsfilter mit der Sequenz Gly-Phe-Gly (Inagaki et al., 1995a). Außerdem gibt es, wie von (Reimann and Ashcroft, 1999) diskutiert, trotz der großen strukturellen Ähnlichkeit der Kir Familie mit dem KcsA-Kanal, auch einige wichtige Unterschiede. Aus diesem Grund sollte der KcsA nicht als Vorbild für eine definitive Beschreibung der Struktur des Kir6.x betrachtet werden.

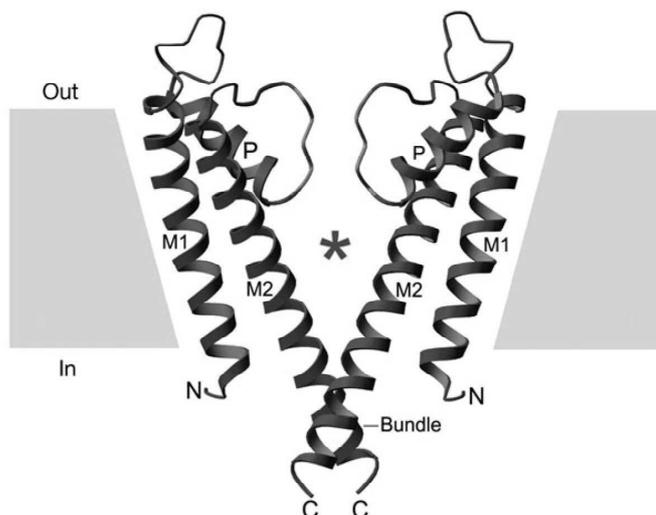


Abb. 1 KcsA Kanal von *Streptomyces lividans*

Zwei der vier Untereinheiten sind von der Seite gezeigt, die extrazelluläre Seite liegt oben. Eine Untereinheit besteht aus einer äußeren Helix (M1), der H5-Domäne (P) und der inneren Helix (M2). Beim Eintritt in das Zytoplasma formen die Helices ein Bündel, das das physikalische „Gate“ des Kanals bildet. Der Zugang zur Pore ist mit einem Stern markiert.

(Aus Doyle et al., 1998)

1.4.3 Die β -Untereinheit SUR

Es existieren mindestens 2 Subtypen der β -Untereinheit SUR des K_{ATP} -Kanals: SUR1 und SUR2 (Inagaki et al., 1996; Isomoto et al., 1996), deren Gene auf Chromosom 11 (p15.1) bzw. Chromosom 12 (11.23) liegen (Chutkow et al., 1996). Durch unterschiedliches Spleißen von Exon 38 entstehen die Varianten

SUR2A (Exon 38a) und SUR2B (Exon 38b) (Isomoto et al., 1996). SUR2A unterscheidet sich nur in seinen 42 C-terminalen Aminosäuren von SUR2B (Inagaki et al., 1996; Isomoto et al., 1996).

Für SUR1 (1581 Aminosäuren, relative Molekülmasse ~176kDa) kodieren 39 Exons, für SUR2 (1549 AS) dagegen nur 38 Exons (Bryan and Aguilar-Bryan, 1999).

Der Sulfonylharnstoffrezeptor gehört gemeinsam mit dem CFTR (cystic-fibrosis-transmembrane-regulator), dem MRP (multidrug-resistance-protein), dem cMOAT (canalicular multispecific organic anion transporter), dem YCF1 (yeast cadmium factor protein) und einigen anderen zur Familie der ATP-binding-cassette-(ABC)-proteins (Altschul and Lipman, 1990).

Hydropathie Analysen und der Vergleich mit der MRP-Familie legen nahe, dass SUR1 (siehe Abb. 2) einen extrazellulär gelegenen N-Terminus aufweist. Darauf folgen fünf Transmembranhelices (TM), die die TMD0 (Transmembrandomäne 0) bilden, und über eine kurze intrazellulär gelegene Schleife mit der aus 6 TM bestehenden TMD1 verbunden sind. Zwischen TMD1 und der darauf folgenden TMD2 (6 TM) befindet sich eine grosse intrazellulär gelegene Domäne (~40kDa) die die NBF1 (Nukleotid-Bindungs-Falte 1) enthält. Zwischen dem ebenfalls intrazellulär gelegenen C-Terminus und TMD2 befindet sich eine weitere Domäne (~38kDa), die die NBF2 enthält (Tusnády et al., 1997). Die ausgeprägteste Strukturgleichheit findet sich unter MRPs in den Nukleotidbindungsfalten. Jede NBF enthält ein Walker A- (-Gly-X-X-Gly-X-Gly-Lys-Ser/Thr-, wobei X eine beliebige AS ist) und ein Walker B- (-Y-Y-Y-Y-Asp-, wobei Y eine hydrophobe Aminosäure darstellt) Motiv (Walker et al., 1982), die über die Sequenzen -Leu-Ser-Gly-Gly-Gln- in NBF1 und -Phe-Ser-Gln-Gly-Gln- in NBF2 miteinander verbunden sind. Allerdings enthält die NBF2 von SUR2 ein verändertes Walker B-Motiv (-Phe-Ser-Val-Gly-Gln-). Man nimmt an, dass das Walker A-Motiv mit PO_4^- -Ionen, das Walker B-Motiv mit Mg^{2+} -Ionen interagiert (Hilgenfeld, 1995).

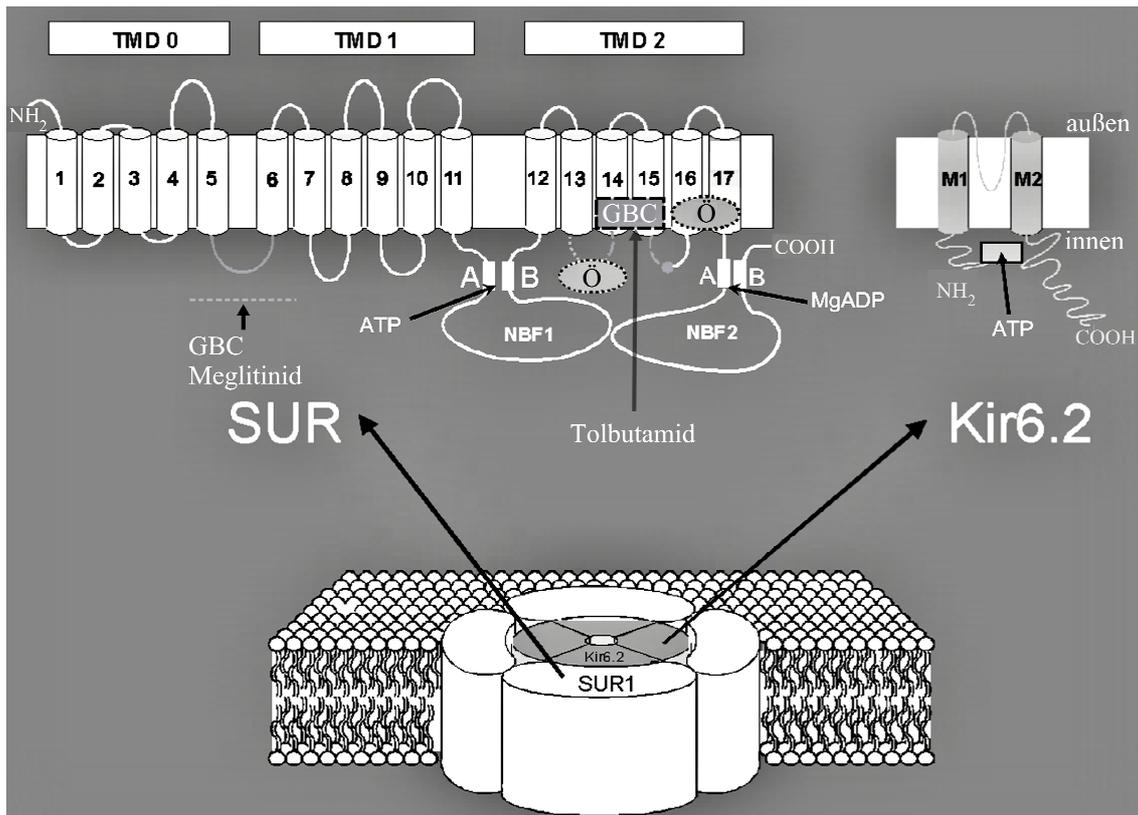


Abb. 2 Struktur und funktionell wichtige Regionen des K_{ATP} -Kanals der β -Zelle

TMD = Transmembrandomäne; M1,M2 = Transmembranhelices von Kir6.2; GBC = Bindungsstellen von GBC; Ö = Öffnerbindungsstellen; ATP = Bindungsstellen von ATP; MgADP = Bindungsstelle von MgADP; A = Walker-A-Motiv; B = Walker-B-Motiv; 1-17 Transmembranhelices des SUR1; NBF = Nukleotidbindungsfasle.
 Modifiziert nach Löffler Walz und Quast, unveröffentlicht.

1.4.4 Regulation des K_{ATP} -Kanals

Tucker et al., 1997 konnten zeigen, dass Kanäle gebildet aus Kir6.2 Δ C (ohne SUR) durch ATP in ihrer Aktivität gehemmt werden konnten, während MgATP keinen Einfluss hatte. Die Sensitivität von Kir6.2 für ATP ($K_i \sim 100\mu\text{M}$) ist allerdings geringer, als bei der Koexpression mit SUR1 ($K_i \sim 10\mu\text{M}$). Den direkten Beweis für die Existenz einer ATP Bindungsstelle an Kir6.2 lieferten Tanabe et al., 1999 mit einem speziell markierten ATP ($[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-8-azido-ATP}$). SUR enthält je eine Nukleotid-Bindungsstelle in NBF1 und NBF2 (Ueda et al., 1997; Matsuo et al., 2000). Nach einem von Ueda et al., 1999 vorgeschlagenen Modell für den β -Zell- K_{ATP} -Kanal bindet NBF1 ATP und NBF2 MgADP wenn der Quotient $[\text{ATP} / \text{ADP}]$ klein ist (niedrige Energieladung der Zelle). In dieser

Konstellation bindet Kir6.2 das ATP mit niedriger Affinität und der Kanal bleibt offen. Wenn der Quotient ($[ATP / ADP]$) in der Zelle ansteigt, führt die verminderte Konzentration von MgADP zu einer Dissoziation von MgADP von NBF2 und nachfolgend zu einer verminderten Bindung von ATP an NBF1. Daraus resultiert eine Konformationsänderung von SUR1, die zu einer Affinitätserhöhung von Kir6.2 für ATP führt und der Kanal schließt sich.

Die SUR Subtypen unterscheiden sich in ihren Nukleotidbindungseigenschaften: SUR1 zeigt im Gegensatz zu SUR2 eine ausgeprägte Mg^{2+} Abhängigkeit seiner MgADP Bindung an NBF2. Die Affinität der NBF1 von SUR1 für ATP ist deutlich höher als diejenige von SUR2. Die NBF2 von SUR2B weist eine signifikant höhere Affinität für ADP auf als die NBF2 von SUR2A (Matsuo et al., 2000).

Die Aktivität der K_{ATP} -Kanäle wird auch wesentlich durch negativ geladene Lipide, z.B. LC-Acyl-CoA und PIP_2 bestimmt. Langkettige Acyl-Coenzym A Ester (LC-Acyl-CoA) werden aus Fettsäuren synthetisiert und dienen dem Herzen als Hauptstoffwechselsubstrat. Liu et al., 2001 fanden eine deutliche Aktivierung der K_{ATP} – Kanäle im Herzen durch LC-Acyl-CoA. Bränström et al., 1997 konnten dasselbe, allerdings mit wesentlich geringerer Aktivierung des Kanals in pankreatischen β -Zellen zeigen. Da die LC-Acyl-CoA an der K_{IR} -Untereinheit ansetzen (Bränström et al., 1998; Gribble et al., 1998a) und diese in beiden oben genannten 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.

Auch PIP_2 (L- α -Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat) ist an der Modulation der K_{ATP} -Kanäle beteiligt, indem es zum einen die Offenwahrscheinlichkeit erhöht (Hilgemann and Ball, 1996; {Fan & Makielski 2650 /id}), zum anderen die ATP Sensitivität erniedrigt (Baukrowitz et al., 1998; Shyng and Nichols, 1998; Baukrowitz and Fakler, 2000).

Es bestehen Hinweise dass auch G-Proteine (Sánchez et al., 1998), Endosulfine (Heron et al., 1998) und die Phosphorylierung des Kanals durch Proteinkinase A (Béguin et al., 1999) die Aktivität von K_{ATP} -Kanälen beeinflussen können. Die physiologische Rolle dieser Regulationsmechanismen ist aber zum jetzigen Zeitpunkt noch ungeklärt.

1.4.5 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. Für die SUR2 Subtypen wurde auch die Existenz von Mischkanälen der Form $(Kir6.1)_x (Kir6.2)_{4-x}$ und $(SUR2)_4$ gezeigt (Cui et al., 2001; Pountney et al., 2001).

	Glibenclamid, K_i (nM)	Öffner	Vorkommen	Referenzen
Kir6.1 / SUR2B	42 nM	Pinacidil Nicorandil	Gefäßmuskulatur, K_{NDP}	Russ et al., 1999; Yamada et al., 1997
Kir6.2 / SUR1	~1 nM	Diazoxid Pinacidil	β -Zellen, Pankreas, Neurone	Inagaki et al., 1995a; Gribble et al., 1997a
Kir6.2 / SUR2A	26 nM	Cromakalim Pinacidil Nicorandil	Herz- und Skelettmuskel	Russ et al., 2001; Inagaki et al., 1996; Okuyama et al., 1998
Kir 6.2 / SUR2B	27 nM	Diazoxid Pinacidil	glatte Muskulatur	Russ et al., 2001; Isomoto et al., 1996

Tab. 1 Kombinationen der Untereinheiten und deren Vorkommen.

Die GBC-Konzentrationen wurden in inside-out patches bei 22 °C gemessen.

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

Die K_{ATP} -Kanäle in den β -Zellen des Pankreas spielen eine zentrale Rolle bei der Regulation der Insulinsekretion:

Das Ruhepotential der β -Zellmembran wird vor allem 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) geschlossen. Der postprandiale Anstieg des Blutglucose-spiegels führt, nach der Glucoseaufnahme durch den Transporter GLUT2 (**a**), über die Glycolyse zu

einer gesteigerten intrazellulären ATP-Synthese aus ADP, wobei der Quotient ($[ATP/ADP]$) in der Zelle ansteigt (b). Dies führt zu einer Schließung der K_{ATP} -Kanäle und einer daraus resultierenden Depolarisierung des Membranpotentials (c). Wird ihr Schwellenpotential überschritten, öffnen sich die spannungsabhängigen Ca^{2+} -

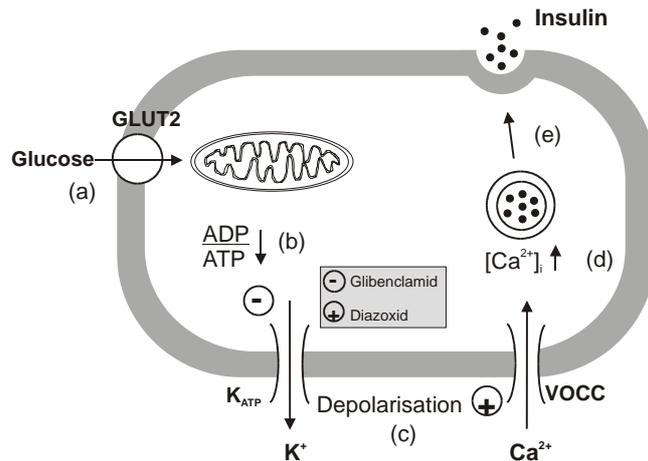


Abb. 3 Modell der Insulinfreisetzung aus den β -Zellen des Pankreas. (Konsensusmodell nach Cook and Hales, 1984; Löffler-Walz und Quast, unveröffentlicht).

Kanäle der Zellmembran (d). Der resultierende Ca^{2+} -Einstrom löst über eine Reaktionskaskade die Exozytose von Insulinvesikeln aus (e) (siehe Abb. 3).

K_{ATP} Kanäle scheinen auch eine Schlüsselrolle bei der ischämischen Präkonditionierung des Myokards (IPC) zu spielen. Die IPC ist ein Schutzmechanismus des Myokards gegen Infarzierung während längerer Perioden der Ischämie, der durch vorangehende kurze Ischämiephasen aktiviert wird (Murry et al., 1986; Cohen et al., 2000; Gross and Fryer, 1999). Die K_{ATP} Kanäle der Zellmembran des Herzens (SUR2A/Kir6.2) sind normalerweise geschlossen (Nichols and Lederer, 1991; Caverio et al., 1995). In der Ischämie erniedrigt sich der Quotient ATP / ADP in der Zelle. Dies führt zu einer Öffnung der K_{ATP} Kanäle, die allerdings wenig Einfluss auf das Ruhepotential des Kardiomyozyten hat, da dieses sich grundsätzlich nahe dem Gleichgewichtspotential von K^+ befindet. Allerdings verursacht sie eine Verkürzung des Aktionspotentials die, wenn ausgeprägt genug, dazu führen kann, dass die Zelle nicht mehr erregbar ist. Es wurde vorgeschlagen, dass die Zelle durch ihre verminderte Erregbarkeit und die damit verbundene verminderte Zirkulation von Ionen Energie einsparen kann (Nichols et al., 1991). Allerdings zog die Feststellung, dass die K_{ATP} -Kanal Öffner Diazoxid (Birincioglu et al., 1999), Chromakalim (Grover et al., 1995b) oder BMS-180448 (Grover et al., 1995a) zwar in der Lage waren die Ausdehnung eines Infarktes zu

vermindern, aber nur geringen oder keinen Einfluss auf die Länge des Aktionspotentials hatten diese Hypothese in Zweifel.

In patch-clamp Studien konnte ein mitochondrialer Kanal (mitoK_{ATP}) mit ähnlichen Eigenschaften wie der Oberflächen-K_{ATP}, der durch ATP inhibierbar und durch GBC blockierbar war, entdeckt werden. (Inoue et al., 1991). Garlid et al., 1997 konnten zeigen, dass Diazoxid in der Lage war den mitoK_{ATP} mit 1000- bis 2000-fach höherer Potenz zu öffnen als den Oberflächen-K_{ATP}. Dabei konnte die IPC mit HMR-1883, einem selektiven Blocker des Oberflächen-K_{ATP} nicht unterbunden werden (Jung et al., 2000; Dhein et al., 2000). Daraus kann man folgern, dass der protektive Effekt von K⁺-Kanal Öffnern über mitochondriale K_{ATP} Kanäle vermittelt wird.

Reguliert wird der mitoK_{ATP} vermutlich durch Adenosin, das von den Kardiomyozyten während einer Ischämie freigesetzt wird. Die Signaltransduktion (siehe Abb. 4) verläuft über den Adenosinrezeptor und die Phospholipase C zur PKC (Proteinkinase C), die schließlich den mitoK_{ATP} aktiviert (Cohen et al., 2000). Auch andere Substanzen wie Acetylcholin, die die Phospholipase C aktivieren, können eine Öffnung von mitoK_{ATP} vermitteln (siehe Abb. 4).

Obwohl vieles darauf hindeutet, dass mitoK_{ATP} die eigentlichen Vermittler der IPC sind, ist nicht von der Hand zu weisen, dass die Beeinflussung des Energiemetabolismus der Zelle durch mitoK_{ATP} (z.B. vermittelt durch in den Mitochondrien entstehende ROS (= reactive oxygen species) oder durch die PKC) zu Sekundäreffekten an Oberflächen-K_{ATP} führen kann. Umgekehrt könnte die Beeinflussung des Membranpotentials (z.B. durch Oberflächen-K_{ATP}) zu einer Veränderung der Aktivität der mitoK_{ATP} führen.

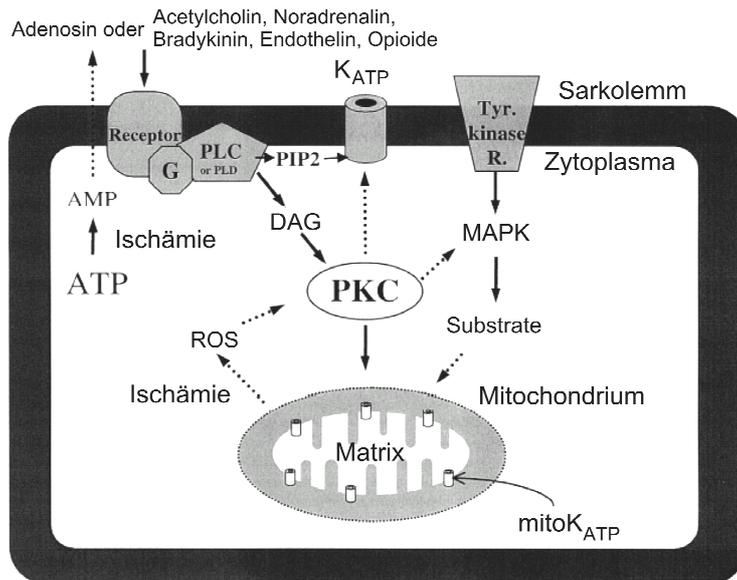


Abb. 4 Mechanismen der IPC

Adenosin führt über ein G-Protein zur Aktivierung von Phospholipase C bzw. D, die wiederum die Freisetzung von PIP_2 , von dem bekannt ist, dass es sarkolemmale K_{ATP} Kanäle moduliert, und DAG, verursacht. Signaltransduktion über die PKC oder die Thyrosinkinase und MAPK (mitogen aktivated protein kinase) führt zur IPC. Retrograde Transduktionswege über ROS und PKC sind ebenfalls dargestellt. Modifiziert aus O'Rourke, 2000 .

Die Aktivierung von K_{ATP} -Kanälen in Neuronen und Skelettmuskeln wirkt ebenfalls zytoprotektiv. In glatten Gefäßmuskeln sind K_{ATP} -Kanäle wichtige Determinanten des Gefäßtonus, da ihre Öffnung zu einer Vasorelaxation führt. Die K_{ATP} -Kanäle der juxtaglomerulären Zellen der Niere (umgewandelte glatte Gefäßmuskelzellen) sind an der Regulation der Reninsekretion beteiligt. Im Tubulusepithel der Niere spielen K_{ATP} Kanäle eine wichtige Rolle bei der Ionenrückresorption (Quast, 1996a).

1.6 K_{ATP} -Kanal Krankheiten

1.6.1 Persistierende hyperinsulinämische Hypoglykämie

Die persistierende hyperinsulinämische Hypoglykämie im Kindesalter (PHHI) beruht auf einer Mutationen des β -Zell K_{ATP} -Kanals die dazu führt, dass die K_{ATP} -Kanäle geschlossen bleiben. Die Patienten erleiden oft schon kurz nach der Geburt schwere Hypoglycämien, die durch Hemmstoffe der Insulinfreisetzung wie Diazoxid oder Somatostatin meist nicht zu beherrschen sind. Wird die Krankheit nicht rechtzeitig erkannt, drohen irreversible

Gehirnschäden durch die persistierende Hypoglycämie. Die in den schweren Fällen wirksame Therapie besteht zur Zeit in der subtotalen Pankreatektomie (Cook and Bryan, 1998), bei der etwa 95% des Pankreasgewebes entfernt werden.

Pathophysiologisch führt der Funktionsverlust der K_{ATP} -Kanäle zu einer ständigen Depolarisierung der β -Zelle und konsekutiv zu einer Aktivitätssteigerung der L-Typ Ca^{2+} -Kanäle. Das intrazellulär erhöhte Ca^{2+} verursacht nun eine ständige Insulinsekretion die zur Hypoglykämie führt (Aguilar-Bryan and Bryan, 1999).

Es wurden sowohl familiär vererbte, als auch sporadisch auftretende Formen der Krankheit identifiziert. Die familiär vererbte Form der PHHI kommt in Nordeuropa nur in etwa 1 von 50000 Fällen vor, jedoch liegt die Prävalenz z.B. in bestimmten Regionen Finnlands oder bei Semiten weit über diesem Wert.

Am häufigsten sind Mutationen im SUR1-Gen (zur Zeit unterscheidet man mehr als 40 verschiedene Arten). Etwas weniger häufig sind Mutationen im Kir6.2-Gen (3 bekannte Arten) (Glaser et al., 2000). Beide Gene liegen auf Chromosom 11. Von der funktionellen Seite betrachtet führen diese Mutationen entweder zu einem beeinträchtigten Transport der Untereinheiten zur Zellmembran bzw. zu einer gestörten Vereinigung zum vollständigen Kanal oder zu einer starken Verminderung der ADP-abhängigen Regulierbarkeit der Kanalaktivität (Nichols et al., 1996; Dunne et al., 1997; Kane et al., 1997; Shyng et al., 1998; Otonkoski et al., 1999).

1.6.2 Rolle des β -Zell K_{ATP} -Kanals bei Diabetes Mellitus Typ 2

Der Nichtinsulinabhängige Diabetes Mellitus (NIDDM), kurz Typ-2 Diabetes ist eine polygene Erkrankung die durch angeborene Faktoren und Umwelteinflüsse verursacht wird. Pathogenetisch spielen vor allem eine herabgesetzte Insulinwirkung (Insulinresistenz) und eine gestörte Insulinsekretion der β -Zellen eine Rolle. Da der K_{ATP} -Kanal der β -Zelle, wie in Kapitel 1.5 beschrieben, die Insulinsekretion an den Blutzuckerspiegel koppelt, ist anzunehmen dass Mutationen dieses Kanals existieren, die Diabetes verursachen können. Im

SUR1-Gen wurden drei Polymorphismen beschrieben (Exon 16 -3c→t, Exon 18 ACC→ACT und Exon 31 AGA→AGG), für die eine Assoziation mit NIDDM berichtet wurde, jedoch führen diese Mutationen nicht zu Veränderungen der Kanalfunktion (Hart et al., 1999; Inoue et al., 1996; Hani et al., 1997; Rissanen et al., 2000).

Im Kir6.2 Gen wurde der Polymorphismus E²³K gefunden (siehe Abb. 5), bei dem in Position 23 die Aminosäure Glutamat (E) durch Lysin (K) ersetzt ist (Hansen et al., 1997). Bei europäischen Kaukasiern tritt der Basenaustausch heterozygot mit einer Häufigkeit von ~ 45 % auf (Gloyn et al., 2001; Sakura et al., 1996; Inoue et al., 1997), die Häufigkeit der KK Homozygoten (bei denen in beiden Allelen E durch K ersetzt ist) beträgt ~13%. Es konnte gezeigt werden,

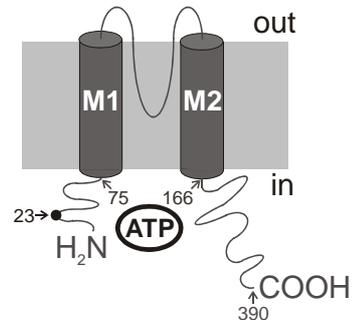


Abb. 5 Lage der Mutation E²³K in der Nähe des Aminoterminus von Kir6.2. Quelle: Quast und Löffler-Walz, unveröffentlicht.

dass zwischen dem Auftreten von Typ-2 Diabetes und der homozygoten Form des E²³K Polymorphismus eine deutliche Assoziation besteht (Gloyn et al., 2001; Hani et al., 1998). Der E²³K Polymorphismus bewirkt dabei eine erhöhte spontane Offenwahrscheinlichkeit und eine verminderte Sensitivität des Kir6.2 für ATP. Zusammen führt dies zu einer Erhöhung der für die Insulinsekretion nötigen ATP-Konzentration (~1.5-fach / ~3.1-fach für den E/K / K/K Polymorphismus) (Schwanstecher et al., 2002).

1.7 Pharmakologie der K_{ATP}-Kanäle

1.7.1 Blocker des ATP abhängigen Kaliumkanals

1.7.1.1 Sulfonylharnstoffe und Glinide

Bei den Sulfonylharnstoffen unterscheidet man Blocker der ersten Generation, dies sind kurzkettige Sulfonylharnstoffe wie Tolbutamid, Blocker der zweiten Generation (langkettige Sulfonylharnstoffe, z.B. Glibenclamid) und Blocker der

dritten Generation (Glinide), wie z.B. die Benzamidoverbindung Meglitinid. Glibenclamid enthält eine Benzamido- und eine Sulfonylharnstoffgruppe (siehe Abb. 7). Sulfonylharnstoffe und Benzamidoverbindungen binden hochaffin an die β -Untereinheit SUR, fördern durch die Blockade der β -Zell K_{ATP} -Kanäle die Insulinfreisetzung und werden daher mit Erfolg in der Behandlung des Typ-2 Diabetes eingesetzt. Aufgrund der höheren Affinität zu SUR1 sind die Wirkungen von Tolbutamid und GBC vornehmlich auf die β -Zellen beschränkt (Gribble et al., 1998b). Umstritten ist allerdings die Frage, ob die Langzeitbehandlung mit dem häufig eingesetzten GBC zur Schädigung des Herzens führt (Smits and Thien, 1995; Leibowitz and Cerasi, 1996). Die UKPDS Studie lieferte in diesem Zusammenhang für GBC allerdings keine Hinweise bezüglich einer herzscheidenden Wirkung. Insbesondere bei den neueren K_{ATP} -Kanal-Blockern (Glinide) liegen, hinsichtlich der Frage nach einer Herzscheidenden Wirkung, noch zu wenig Daten vor, um klare Aussagen treffen zu können.

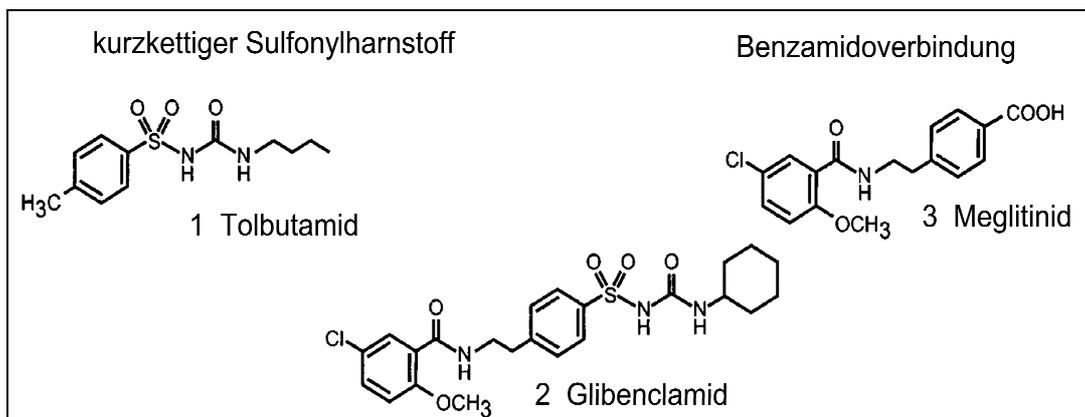


Abb. 6 K_{ATP} -Kanal Blocker der ersten, zweiten und dritten Generation

Modifiziert aus Coghlan et al., 2001

Tolbutamid führt zwar zur Schließung des K_{ATP} -Kanals der β -Zelle, lässt aber kardiale K_{ATP} -Kanäle (SUR2A/Kir6.2) unbeeinflusst. Man geht daher davon aus, dass SUR2A keine Hochaffinitätsbindungsstelle für Tolbutamid (bzw. Sulfonylharnstoffe) besitzt (Venkatesh et al., 1991; Gribble et al., 1998b). Meglitinid hingegen bindet sowohl an kardiale als auch an β -Zell K_{ATP} -Kanäle mit hoher Affinität (Gribble et al., 1997b). Man hat daraus gefolgert, dass beide β -Untereinheiten, SUR1 und SUR2A, über eine Bindungsstelle für Benzamido-

Verbindungen verfügen. Auch Glibenclamid (GBC) bindet hochaffin an beide Kanäle, allerdings ist die durch GBC vermittelte Blockierung des β -Zell K_{ATP} kaum reversibel. Man vermutet daher, dass die Hybridsubstanz GBC am SUR1 sowohl an die Bindungsstelle für Sulfonylharnstoffe als auch an diejenige für Benzamido-Verbindungen bindet (siehe auch Abb. 7, vgl. Abb. 2) und daher nur im Falle einer simultanen Verdrängung von beiden Bindungsstellen vom Rezeptor dissoziieren würde (Ashcroft and Gribble, 1999).

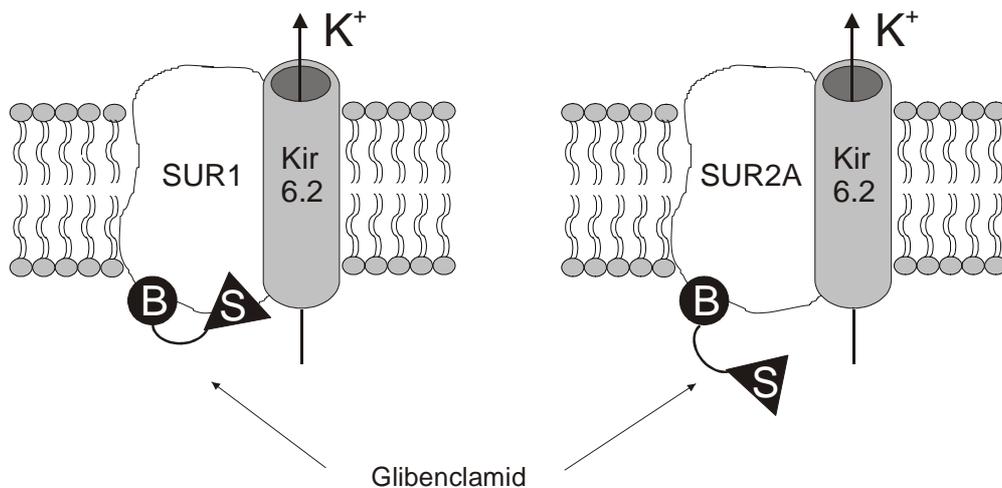


Abb. 7 Modell der Bindungsstellen an SUR1 und SUR2A (nach Ashcroft and Gribble, 1999).

Dargestellt ist das Bindungsverhalten der Hybridsubstanz GBC, dessen Benzamidogruppe durch einen Kreis, und dessen Sulphonylharnstoffgruppe durch ein Dreieck symbolisiert ist. Die Tolbutamid (Sulfonylharnstoff-) Bindungsstelle (S) liegt innerhalb der TMD2 auf den TM 14 und 15 sowie auf dem halben cytoplasmatischen Loop zwischen TM 13 und TM 14 und auf dem halben cytoplasmatischen Loop zwischen TM 15 und TM 16 (vgl. Abb. 2). Die Meglitinid- (Benzamido-) Bindungsstelle (B) liegt auf dem cytosolischen Loop, der die TM 5 und 6 miteinander verbindet (Gribble and Reimann, 2002). Zur Vereinfachung ist der K_{ATP} -Kanal unvollständig mit jeweils einer α - und β -Untereinheit abgebildet. Beschreibung der genauen Lokalisation von B und S: siehe Seite 22.

Für alle im Vorgehenden genannten Substanzen existiert auch eine niederaffine Bindungsstelle am Kir6.2 (Gribble et al., 1997b; Gribble et al., 1998b). Klinisch hat diese niederaffine Bindungsstelle aber keine Bedeutung, da die Plasmakonzentrationen der Kanalblocker im Patienten nicht hoch genug sind um einen Kanalblock über Kir6.2 zu vermitteln. Somit sind die Hochaffinitäts-Bindungsstellen der β -Untereinheiten des K_{ATP} verantwortlich für die therapeutischen Effekte der K_{ATP} -Blocker.

Über die Anzahl der Sulfonylharnstoffmoleküle, die nötig sind um den K_{ATP} zu schließen, herrscht keine Einigkeit: (Dörschner et al., 1999) postulierten, dass die Bindung eines Sulfonylharnstoffmoleküles für den Kanalschluss ausreicht, während eine Studie von Russ et al. (1999) an Kir6.1/SUR2B ergab, dass alle vier Bindungsstellen des K_{ATP} -Kanals mit Sulfonylharnstoffmolekülen besetzt sein müssen um ihn zu schließen.

Am β -Zell K_{ATP} führt die Bindung von MgATP und MgADP zur Dissoziation der ^3H -GBC Bindung (mit dem Radioisotop Tritium markiertes GBC) (Niki et al., 1990). Schwanstecher et al. (1992) konnten zeigen, dass die scheinbare K_D des GBC keine lineare Funktion von [MgATP] darstellte und daher eine kompetitive Inhibition zwischen GBC und MgATP nicht anzunehmen war (siehe auch Hambrock et al., 2002). Man geht daher davon aus, dass die Bindung von MgATP / MgADP an die NBFs die GBC-Bindungsstelle modifiziert. Einen klaren Beweis für die Kommunikation zwischen NBF und GBC-Bindungsstelle lieferten Ueda et al., 1999. Sie demonstrierten die konzentrationsabhängige Dissoziation von vorher gebundenem 8-azido-[α - ^{32}P]ATP von SUR1 durch die Applikation von GBC in Anwesenheit von MgATP oder MgADP.

1.7.1.2 Weitere Blocker des K_{ATP} -Kanals mit Ansatzpunkt am SUR

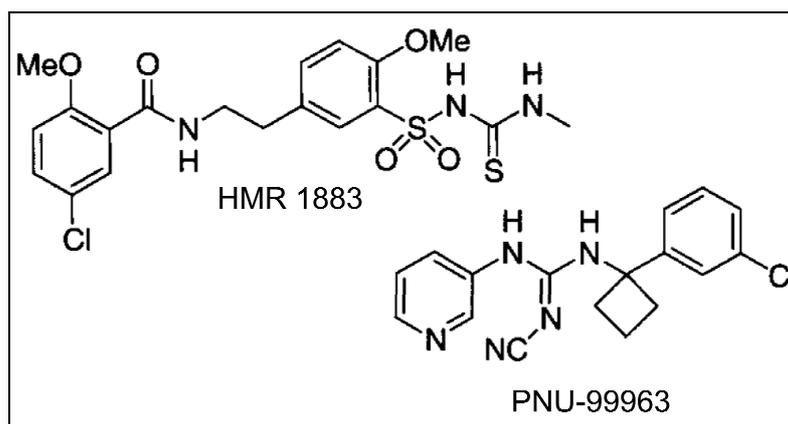


Abb. 8 K_{ATP} -Kanal Blocker mit Ansatzpunkt am SUR,

Abbildung aus Coghlan et al., 2001

In neuerer Zeit wurden einige Substanzen entwickelt, die sich z.B. durch ihre Spezifität gegenüber bestimmten Subtypen des K_{ATP} -Kanals oder eine verstärkte insulinotrope Wirkung auszeichneten:

Repaglinid (nicht gezeigt), ein Benzamido-Derivat, das klinisch bereits beim Typ-2 Diabetes eingesetzt wird, besitzt eine höhere Potenz als GBC, β -Zell K_{ATP} -Kanäle zu schließen. Es benötigt im Gegensatz zu GBC die Gegenwart von Glukose für den Schluß des Kanals (Coghlan et al., 2001).

Der neue K_{ATP} -Blocker HMR-1883 (Gögelein et al., 2000; Russ et al 2001) beziehungsweise dessen Natriumsalz HMR-1098 wird zur Zeit in klinischen Phase-II Studien untersucht. Er soll zur Behandlung von ventrikulären Arrhythmien (Gögelein et al., 1999) und zur Prophylaxe des plötzlichen Herztodes eingesetzt werden. HMR-1883 (siehe auch Abb. 8) ist zwar weniger potent als GBC, zeigt aber Selektivität für kardiale K_{ATP} -Kanäle (SUR2A / Kir6.2).

Man ging bisher davon aus, dass K_{ATP} Öffner und Blocker an verschiedenen Regionen des SUR binden (Babenko et al., 2000; Uhde et al., 1999). Die Abwesenheit von strukturellen Ähnlichkeiten zwischen Öffnern und Blockern unterstützte diese Theorie. Verblüffenderweise gehört der potente K_{ATP} -Blocker PNU-99963 hingegen zur Klasse der Cyanoguanidine (Khan et al., 1997) d.h., der selben Klasse, der auch die K_{ATP} -Kanal Öffner P1075 und Pinacidil angehören (siehe auch Kapitel 1.7.2). Ebenfalls um ein Cyanoguanidin handelt es sich bei dem racemischen Blocker PNU-94750, dessen R-Enantiomer PNU-96293 einen Blocker des K_{ATP} -Kanals darstellt, während es sich bei dessen S-Enantiomer um einen schwachen K_{ATP} -Kanal Öffner handelt (Lange et al., 2002).

1.7.1.3 K_{ATP}-Kanal Blocker mit Ansatzpunkt am Kir 6.2

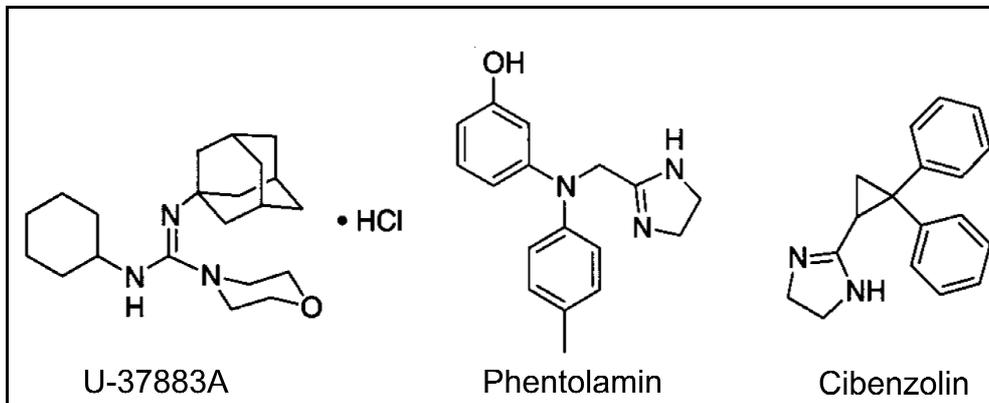


Abb. 9 Blocker am Kir 6.2.

Abbildung modifiziert aus Coghlan et al., 2001

U-37883A, ein gefäßselektiver K_{ATP}-Blocker (Löffler-Walz and Quast, 1998a) besitzt diuretische Wirksamkeit (Humphrey and Ludens, 1998). An Ratten und Hunden gezeigte kardiovaskuläre Nebenwirkungen verhinderten allerdings seine Weiterentwicklung (Humphrey et al., 1996). Zu den schwachen, nichtselektiven Blockern gehören Phentolamin und Cibenzolin. Nach Horie et al., 2000 blockieren sie direkt die Kir6.x- Untereinheit (siehe Abb. 9).

IMID-4F (McPherson et al., 1999) (nicht gezeigt) weist strukturelle Ähnlichkeiten mit Phentolamin auf (siehe Abb. 9). Seine Potenz K_{ATP}-Kanäle zu Blockieren ist jedoch mit der von GBC an Gefäßpräparationen vergleichbar (Challinor-Rogers and McPherson, 1994). Anders als GBC ist IMID-4F ein nichtkompetitiver Antagonist der Öffner Chromakalim und P1075 und hat daher wahrscheinlich eine von GBC verschiedene Bindungsstelle am Kanal. Man vermutet, dass IMID-4F, ähnlich dem Phentolamin, direkt mit der Kanal-Pore von Kir6.x interagiert.

1.7.2 Öffner des ATP-abhängigen Kaliumkanals

Verschiedene chemische Strukturklassen sind dafür bekannt, K_{ATP} -Kanäle zu öffnen. Tab. 2 zeigt die wichtigsten Vertreter und die dazu gehörigen Wirkstoffe. Dabei sind die tertiären Carbinole (ZD-6169) und die Dihydropyridine (ZM-244085, A-312110) erst in neuerer Zeit in Erscheinung getreten.

Strukturklasse	Wirkstoff
Zyanoguanidine	Pinacidil, P1075, WAY-133537
Benzopyrane	Levcromakalim, BMS-180448, BMS-191095, SDZ-217-744
Benzothiadiazine	Diazoxid
Pyrimidine	Minoxidilsulfat
Tertiäre Carbinole	ZD-6169
Dihydropyridine	ZM-244085, A-312110

Tab. 2 Wichtige chemische Strukturklassen von KCO und einige zugehörige Wirkstoffe

Wichtige Vertreter der K_{ATP} -Kanal Öffner (KCO – K_{ATP} Channel Opener) der ersten Generation, sind Diazoxid und Minoxidilsulfat. Wegen schwerer Nebenwirkungen werden sie klinisch nur in besonderen Fällen eingesetzt: Diazoxid zur Behandlung der hypertensiven Krise, Minoxidilsulfat bei therapierefraktärer Hypertonie. Diazoxid besitzt außerdem die Fähigkeit den β -Zell K_{ATP} -Kanal zu öffnen und ist daher zur Behandlung von Hyperinsulinämien beim Insulinom indiziert. Nicorandil (nicht gezeigt) ein K_{ATP} -Öffner und Guanylat-Cyclase-Aktivator wird zur Behandlung der Angina Pectoris eingesetzt (Karow and Lang, 2002; Quast, 1996b). Cromakalim und das Pinacidilderivat P1075 haben vor allem wissenschaftliche Bedeutung (vergleiche Abb. 10) .

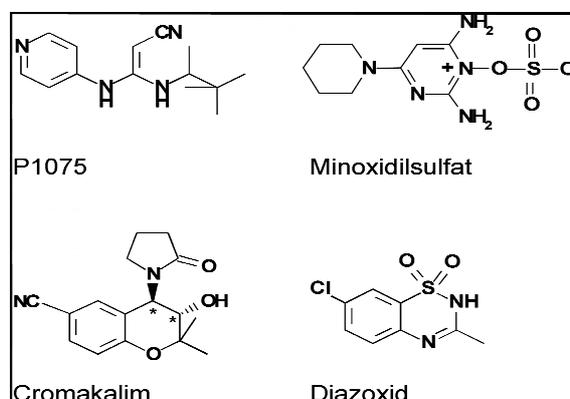


Abb. 10 K_{ATP} -Kanal Öffner der ersten Generation, modifiziert aus Russ et al. 2003.

Der Wirkort der K_{ATP} -Öffner befindet sich auf der β -Untereinheit (SUR) des K_{ATP} -Kanals (Hambrock et al., 1998; Schwanstecher et al., 1998), wobei der SUR somit auch für gewebsspezifische Unterschiede im Ausmaß der Aktivierung des K_{ATP} durch die KCO verantwortlich ist (vergleiche Tab. 1) (Gribble et al., 1997a). KCO benötigen zur hochaffinen Kanalöffnung und zur Bindung am Rezeptor, hydrolysierbares MgATP oder MgADP (positiv allosterische Koppelung) (Schwanstecher et al., 1992; Quast et al., 1993; Dickinson et al., 1997; Löffler and Quast, 1997; Schwanstecher et al., 1998; Hambrock et al., 1998, 1999). Die Datenlage zur Regulation der KCO-Bindung an SUR durch Nukleotide ist alles andere als eindeutig (Russ et al., 2003; Ashcroft, 2000). Das zur Zeit populärste Modell schlägt vor, dass die Bindung von MgADP an die NBF2 zusammen mit der Öffnerbindung eine Konformation des Kanals stabilisiert, die ihn für die inhibitorische Wirkung von ATP am Kir 6.2 unempfindlich macht. Zusätzlich spielen möglicherweise ATPase-Aktivitäten der NBFs eine Rolle (Schwanstecher et al., 1998; Bienengraeber et al., 2000; Zingman et al., 2001).

Mit der Herstellung von Chimären aus SUR1 und SUR2A, gelang es D'hahan et al. (1999) zu zeigen, dass die TMD2 an der Bindungstasche des Chromakalim an SUR2A beteiligt ist.

Zwei Regionen innerhalb der TMD2 haben essentielle Bedeutung für die Bindung des KCO P1075 an SUR2B. Die erste (KCO1) liegt auf einer intrazellulär gelegenen Schleife zwischen M13 und M14 (Tyr¹⁰⁵⁹ – Leu¹⁰⁸⁷), die zweite (KCO2) liegt im Bereich von M16 und M17 (Arg¹²¹⁸ – Asn¹³²⁰) (Uhde et al., 1999). Zwei Aminosäuren innerhalb der Transmembranhelix 17 (Thr¹²⁵³ und Leu¹²⁴⁹) von SUR2A sind Determinanten der Öffner-Sensitivität für Benzopyrane und Zyanoguanidine (Moreau et al., 2000).

Die Bindungsstelle für Diazoxid scheint sich allerdings im Bereich von TMD6-11 und der NBF1 zu befinden (Babenko et al., 2000)

Da die KCO1 wahrscheinlich intrazellulär liegt, ist anzunehmen, dass KCO wie die Sulfonylharnstoffe (Schwanstecher et al., 1994a) die Plasmamembran durchqueren müssen um an ihren Wirkort zu gelangen.

Zwischen den beiden Öffnerbindungsstellen (KCO1 und KCO2) liegt die Bindungsstelle für Sulfonylharnstoffe (Uhde et al., 1999; Dörschner et al., 1999). Sie unterliegt, wie in Bindungsstudien gezeigt (Bray and Quast, 1992; Schwanstecher et al., 1992), einer allosterischen Koppelung mit der Öffnerbindungsstelle.

1.7.2.1 Neuere therapeutische Indikationen für KCOs

Da mittlerweile eine beträchtliche Anzahl an verschiedenen K_{ATP} -Öffnern syntetisiert wurde, deren Beschreibung im Einzelnen den Rahmen dieser Dissertation sprengen würde, bezieht sich dieser Abschnitt nur auf die in therapeutischer Hinsicht interessantesten Neuerscheinungen und erhebt keinerlei Anspruch auf Vollständigkeit.

Kardioprotektion (Benzopyrane):

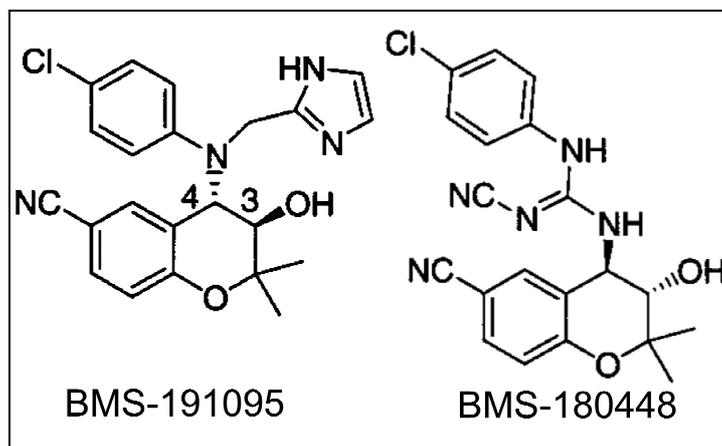


Abb. 11 Kardioselektive K_{ATP} -Öffner,
Ref.: Coghlan et al., 2001

Wie sich erst in neuerer Zeit herausgestellt hat, ist vor allem der mitochondriale K_{ATP} -Kanal des Kardiomyozyten für kardioprotektive Effekte von K_{ATP} -Öffnern verantwortlich (vergleiche Kapitel 1.5).

Der erste in der Literatur beschriebene kardioselektive K_{ATP} -Öffner war BMS-180448, ein Benzopyran-Derivat (Atwal et al., 1993; Grover et al., 1995c). Die Selektivität von BMS-180448 für kardioprotektive Effekte war etwa 200-mal höher als die des Cromakalim. BMS-180448 führt beim Hund zu kardioprotektiven Effekten, ohne dabei Konzentrationen zu erreichen, die zu einer Blutdrucksenkung führen würden (Grover et al., 1995c). Außerdem verursacht es keine Verkürzung des Aktionspotentials (vermittelt durch sarkolemmale K_{ATP}), da es nur an $mitoK_{ATP}$ bindet (Grover et al., 1995a). Der kardioprotektive Effekt von BMS-180448 kann durch 5-Hydroxydecanoat, einem K_{ATP} -Blocker selektiv für $mitoK_{ATP}$ aufgehoben werden (Sato et al., 1998). Eine Weiterentwicklung des BMS-180448 ist das BMS-191095 das im Vergleich zu BMS-180448 eine ~20-fach höhere Selektivität für kardioprotektive Effekte besitzt (Rovnyak et al., 1997). BMS-191095 wird zur Zeit in Phase-I Studien zur Behandlung von myokardialen Ischämien klinisch getestet.

Atemwegshyperreaktivität (Benzopyrane)

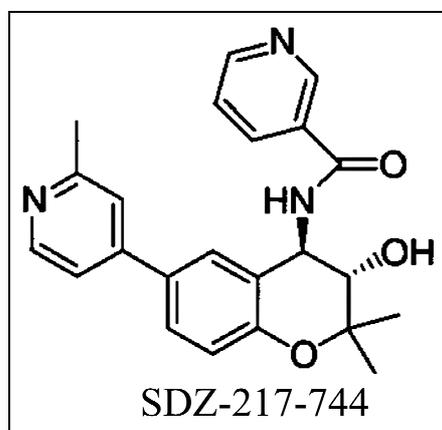


Abb. 12 K_{ATP} -Öffner bei bronchialer Hyperreaktivität

Verschiedene K_{ATP} -Öffner wurden bereits klinisch auf ihre Nutzbarkeit im Rahmen eines Asthma Bronchiale untersucht. Allerdings ergab sich dabei, selbst bei inhalativer Applikationsform, die Entstehung von Kopfschmerzen durch Vasodilatation als limitierende Nebenwirkung (Faurischou et al., 1994). Der neue K_{ATP} -Öffner SDZ-217-744 (Benzopyran-Struktur) zeigte eine erhöhte

Selektivität für die Hemmung der bronchialen Hyperreaktivität gegenüber Cromakalim bei Meerschweinchen (Buchheit and Fozard, 1999). Dabei wirken die KCOs nicht als Bronchiodilatatoren; vielmehr scheinen sie die Freisetzung konstriktiver Mediatoren (Acetylcholin, Substanz P) an Nervenendigungen und den Zellen des Entzündungssystems zu hemmen. Ob die Selektivität des SDZ-217-744 für bronchiale K_{ATP} -Kanäle auch im klinischen Bereich von Vorteil ist, werden zukünftige Studien zeigen. SDZ-217-744 kann tritiiert werden; [3H]SDZ-217-744 ist ein potenter Kanalöffner und bindet mit einer $K_D \sim 20$ nM an SUR2B (Manley et al., 2001).

Urogenitaltrakt (überwiegend Carbinole und Dihydropyridine):

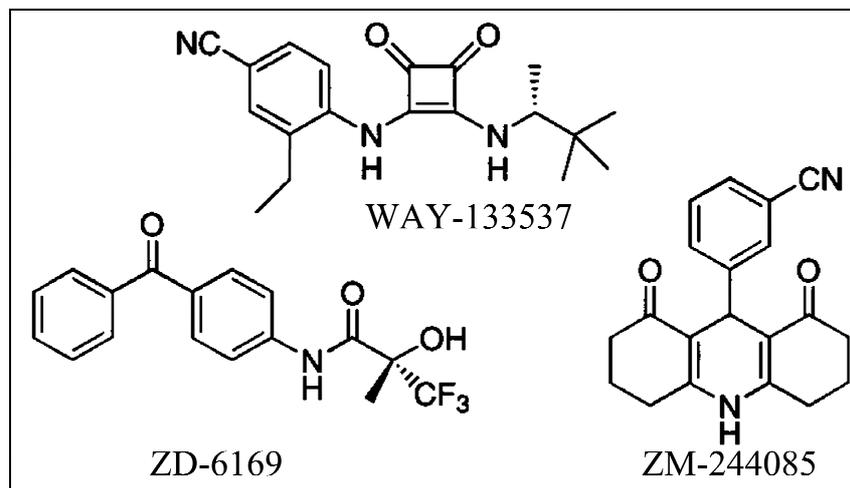


Abb. 13 K_{ATP} -Öffner bei hyperaktiver Blase
Ref.: Coghlan et al., 2001

Die hyperaktive Blase ist eine häufige, vor allem beim älteren Menschen, vorkommende Erkrankung, die durch imperativen und häufigen Harndrang gekennzeichnet ist. Die Erkrankung kann mit einer Dranginkontinenz vergesellschaftet sein.

Der erste Öffner mit Selektivität für die Harnblase war ZD-6169, ein tertiäres Carbinol (Howe et al., 1995). Obwohl K_{ATP} -Kanal Öffner die Blasenfunktion vor allem über die Entspannung der glatten Muskulatur beeinflussen, scheint ZD-6169 auch einen inhibitorischen Effekt auf die Aktivität von neuronalen C-Fasern (Protopathische Sensibilität) auszuüben. ZD-6169 war in der Lage, eine

durch Essigsäure induzierte Blasenhyperaktivität in der selben Weise wie das C-Faser spezifische Neurotoxin Capsaicin zu unterbinden (Yu and de Groat, 1998).

Auch das Arylsquarat WAY-133537, ein Derivat des Pinacidil (Butera et al., 2000), zeigt in vivo (Ratten) Selektivität für die glatte Muskulatur der Blase. Im in vitro Modell konnte diese Selektivität aber wie bei ZM-244085 (siehe nächster Abschnitt) nicht bestätigt werden.

Die Strukturklasse der Dihydropyridine ist vor allem bekannt durch die Kalziumantagonisten (z.B. Nifedipin), die spannungsabhängige L-Typ Calciumkanäle blockieren (Triggle, 1994). Das Dihydropyridin ZM-244085 hingegen, ist ein K_{ATP} -Öffner mit ~30-facher in vivo Selektivität für die glatte Muskulatur der Blase im Vergleich zur glatten Gefäßmuskulatur (Li, 1997). Eine Interferenz mit spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen (VOCCs) findet bei dieser Substanz nicht mehr statt. Bei Ratten verminderte ZM-244085 die Blasenaktivität ohne auf den arteriellen Mitteldruck (MAP) Einfluss zu nehmen. Diese Selektivität konnte allerdings bei in vitro Experimenten, bei denen der Öffner die K_{ATP} -Kanäle der Pfortader mit höherer Potenz öffnete als die der Blase, nicht bestätigt werden.

A-312110:

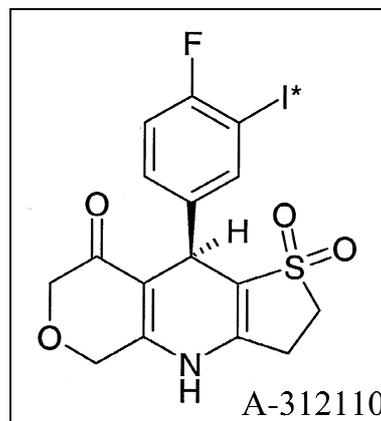


Abb. 14 [125 I]A-312110 ein neuer hochaffiner K_{ATP} -Öffner mit 1,4-Dihydropyridinstruktur
[125 I]A-312110 [(9R)-9-(4'-fluoro-3'- 125 iodophenyl)-2,3,5,9-tetrahydro-4H-pyrano[3,4-
b]thieno[2,3-e]pyridin-8(7H)-eins-1,1-dioxid]

Im Rahmen des Syntheseprogramms der Firma Abbot, zur Findung neuer KCOs mit Selektivität für die Harnblase wurde das Dihydropyridin A-312110 synthetisiert, das in der Position 3' des Phenylsubstituenten ein Jodmolekül enthält (Abb. 14). Durch Radioisotopenaustausch mit ^{125}I erhält man [^{125}I]A-312110 (Davis-Taber et al., 2003), einen mit dem Radioisotop ^{125}I markierten, K_{ATP} -spezifischen Liganden mit 1,4-Dihydropyridinstruktur.

A-312110 zeigt, bis zu Konzentrationen von 30 μM keine Interaktionen mit L-Typ Calciumkanälen mehr.

[^{125}I]A-312110 bindet (beim Meerschweinchen) mit hoher Affinität an Membranpräparationen der glatten Muskulatur der Harnblase ($K_{\text{D}} = 4.9 \text{ nM}$) und der quergestreiften Muskulatur des Herzens ($K_{\text{D}} = 5.8 \text{ nM}$). Dabei war die Bindung saturierend, MgATP-abhängig und bezog sich auf nur eine Gruppe von Bindungsstellen. A-312110 öffnete K_{ATP} -Kanäle der Herzmuskulatur und der glatten Muskulatur der Harnblase mit höherer Potenz als der etablierte hochaffine Öffner P1075. Durch seine Markierung mit ^{125}I verfügt A-312110 ($\sim 2000 \text{ Ci/mmol}$) über eine höhere spezifische Aktivität als das mit Tritium markierte P1075 ($\sim 110 \text{ Ci/mmol}$). Der Anteil der spezifischen Bindung lag bei A-312110, unter den selben Bedingungen, höher als bei P1075. Daher stellt [^{125}I]A-312110 ein nützliches Werkzeug zur Erforschung von molekularen und funktionellen Eigenschaften von K_{ATP} -Kanälen und zur Identifikation neuer K_{ATP} Blocker und Öffner, die mit Herz- bzw. glatter Muskulatur interagieren, dar (Davis-Taber et al. 2003).

1.8 Fragestellung der Arbeit

Mit dem Cynaoguanidin ^3H -P1075 (Bray and Quast, 1992) dem Benzopyran ^3H -217-774 (Manley et al., 2001) und dem Dihydropyridin ^{125}I -A312110 (Davis-Taber et al., 2003) liegen drei gut charakterisierte Radioliganden aus verschiedenen Strukturgruppen der KCO vor. Jedoch wurde das Dihydropyridin nur an Geweben des Meerschweinchens und der Ratte, jedoch noch nicht an isolierten SUR-Subtypen untersucht. Ziel dieser Arbeit war es, die Bindungseigenschaften von (nicht radioaktiv markiertem) A-312110 an die verschiedenen SUR-Subtypen zu erfassen. Dazu wurden

Kompetitionsexperimente mit den Radioliganden ^3H -P1075 und ^3H -GBC an Membranen von HEK-Zellen durchgeführt, in denen der entsprechende SUR-Subtyp exprimiert war. Damit sollten insbesondere folgende Fragen geklärt werden:

- a) Wie ist die Bindung an die Öffnerbindungsstelle(n) der SUR2-Subtypen, gesehen durch das Auge des Radioliganden Öffners ^3H -P1075?
- b) Wie ist die allosterische Kopplung an die GBC Bindungsstelle der SUR-Subtypen erfaßt durch ^3H -GBC-Kompetitionsexperimente?
- c) Wie ist die Kopplung der A-312110 Bindung an die Nukleotidbindung (in ^3H -P1075 und ^3H -GBC-Kompetitionsexperimenten).
- d) Welchen Einfluß hat die Koexpression mit Kir6.2 auf die Bindung von A-312110 an die SUR2-Subtypen.

Diese Fragen wurden bereits für das Cyanoguanidin P1075 beantwortet (Hambrock et al., 1998; 1999; 2001; 2002). Der Vergleich mit den Resultaten dieser Arbeit sollte dann Rückschlüsse darüber zulassen, ob sich die verschiedene chemische Struktur der beiden Öffner (Dihydropyridin vs. Cyanoguanidin/Pyridin) in unterschiedlichen Wechselwirkungen mit dem SUR äußert oder ob ihnen beiden ein gemeinsames Pharmakophor zur Kopplung an den SUR zugrunde liegt. Weiterhin sollte der Vergleich mit den in Davis-Taber (2003) beschriebenen Ergebnissen in nativen Geweben Rückschlüsse über die Bindungseigenschaften des neuen Dihydropyridins an rekombinanten SURs im Vergleich zu nativen K_{ATP} -Kanälen erlauben.

2 Material und Methoden

Die Ergebnisse dieser Dissertation wurden mit Hilfe von Radioligandenbindungsexperimenten erzielt. Bei einem Radioliganden-Bindungs-Experiment (siehe auch Kapitel 2.5) werden Zellen oder Zellmembranen, die den Rezeptor enthalten zusammen mit einem Radioliganden (z.B. ^3H -P1075, siehe auch Kapitel 2.5.1) inkubiert. Nach Abtrennung des rezeptorgebundenen Anteils des radioaktiven Liganden durch Filtration kann die gebundene Radioaktivität in einem Szintillationszähler gemessen werden. Dabei muss zwischen dem spezifisch am Rezeptor gebundenen (spezifische Bindung = SB) und dem unspezifisch an Membranen und Filter haftenden Radioliganden (unspezifische Bindung = NSB) unterschieden werden. In dieser Arbeit wurden Membran-Präparationen von mit SUR transfizierten „Human Embryonal Kidney cells“ (HEK293-Zellen, siehe Kapitel 2.3) für die Radioliganden-Bindungs-Experimente verwendet.

Eine Sonderform von Radioligandenbindungsexperimenten sind die Gleichgewichtsexperimente, bei denen Rezeptor und Ligand(en) bis zur Einstellung des chemischen Gleichgewichts inkubiert werden. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich ausschließlich mit zwei Formen des Gleichgewichtsexperiments: Dem Sättigungsexperiment und dem Konkurrenzexperiment.

a) Sättigungsexperiment: Erstellt man eine Messreihe mit ansteigenden Konzentrationen des Radioliganden (Label oder L_0), lässt sich aus den Messwerten rechnerisch eine Bindungsisotherme ermitteln. Aus dieser Isotherme sind die Affinität des Liganden zum Rezeptor und die maximale Bindungskapazität (B_{MAX}), die der Konzentration der Rezeptoren im Versuchsansatz entspricht, ableitbar (siehe auch Kapitel 2.6.1, Sättigungsexperiment).

b) **Kompetitionsexperiment:** Eine weitere Möglichkeit Radioliganden-Bindungsstudien durchzuführen ist das Kompetitionsexperiment, bei dem die Konzentration des Radioliganden konstant gehalten wird, nun aber sukzessiv ansteigende Konzentrationen eines nicht radioaktiv markierten Liganden (z.B. P1075 oder A-312110) zugegeben werden, der das Label von seiner Bindungsstelle am Rezeptor verdrängen soll. Die sich aus den Messwerten ergebende Bindungskurve dient hier vor allem der Ermittlung der Affinität des nicht radioaktiv markierten Liganden (kalter Ligand) zum Rezeptor (siehe auch Kapitel 2.6.2).

Nach der tabellarischen Auflistung der verwendeten Chemikalien wird zunächst die Herstellung einiger Pufferlösungen und Nährmedien beschrieben, die einerseits zur Durchführung der Radioligandenbindungsexperimente andererseits zur Kultivierung von HEK-293 Zellen (siehe Kapitel 2.3) benötigt werden. Im Verlauf der Radioligandenbindungsexperimente ist es notwendig die Konzentration an zugefügtem Protein (HEK-293 Zellmembranen) in den Ansätzen zu bestimmen. Hier kommt die Proteinbestimmung nach Lowry zur Anwendung (Kapitel 2.4). Anschließend wird genauer auf die Durchführung (Kapitel 2.5) und das theoretische Modell (Kapitel 2.6) der Rezeptorbindungsstudien eingegangen. Zuletzt folgen Abschnitte über die Datenauswertung der Experimente (Kapitel 2.7) und zur Statistik (Kapitel 2.8).

2.1 Chemikalien

Zur Herstellung von Konzentrationsreihen mit P1075 und A-312110 wurden von den Substanzen zunächst Stammlösungen in verschiedenen Konzentrationen hergestellt. Als Lösungsmittel wurde Ethanol / DMSO (1 : 1) verwendet. Die Aufbewahrung der Stammlösungen erfolgte bei -30°C.

Reagenzien:	Einheiten:		Hersteller:
A-312110	461	g/mol	Abbott Laboratories, Illinois, USA
ATP-Na ₂	605.20	g/mol	Boehringer, Mannheim, DE
BSA	~67 000	g/mol	Fluka, Buchs, Schweiz
CuSO ₄	159.60	g/mol	Merck & Co. Inc., USA
DMSO	1	l	Merck & Co. Inc., USA
EDTA-Na ₂	372.24	g/mol	Fluka, Buchs, Schweiz
EGTA	380.40	g/mol	Sigma, München, Deutschland
³ H-Glibenclamid	47	Ci/mmol	Dupont / NEN, Boston, USA
³ H-P1075	117- 121	Ci/mmol	Amersham Buchler, Braunschweig, Deutschland
Ethanol 99% p.a.	500	ml	Merck & Co. Inc., USA
FBS	500	ml	GibcoBRL – Life Technologies, Gaithersburg, USA
Folin-Ciocalteu-Reagenz (2 M)	100	ml	Fluka, Buchs, Schweiz
Geneticinsulfat	692.70	g/mol	GibcoBRL–Life Technologies, Gaithersburg, USA
Gentamycin	50	mg/ml	GibcoBRL–Life Technologies, Gaithersburg, USA
Glibenclamid	494.00	g/mol	Sigma, München, Deutschland
HCl	25	%	Fluka, Buchs, Schweiz,
HEPES	238.30	g/mol	Sigma, München, Deutschland

K ⁺ /Na ⁺ -Tartrat	282.23	g/mol	Merck & Co. Inc., USA
KCl	74.56	g/mol	Merck & Co. Inc., USA
MEM + L-Gln + Earle´s Salze	500	ml	GibcoBRL–Life Technologies, Gaithersburg, USA
MgCl ₂ ·6 H ₂ O	203.30	g/mol	Merck & Co. Inc., USA
Na ₂ CO ₃	105.99	g/mol	Merck & Co. Inc., USA
NaCl	58.44	g/mol	Merck & Co. Inc., USA
NaOH	40.00	g/mol	Merck & Co. Inc., USA
P1075	231.30	g/mol	Leo Pharmaceuticals, Ballerup, Dänemark
TRIS	121.14	g/mol	Fluka, Buchs, Schweiz
Ultima Gold	2.50	l	Packard Instruments, USA

Tab. 3 Tabellarische Auflistung der verwendeten Reagenzien

2.2 Puffer und Medien

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

Puffer 1: Hypotoner Puffer für die Lyse von HEK293-Zellen zur Herstellung einer Zellmembransuspension.

10 mM	HEPES (N-(2-Hydroxyethyl) piperazin-N-(2-ethansulfonsäure))
1 mM	EGTA (Ethylenglycol-bis (2-Aminoethylether)-N,N,N',N',-tetraacetat

Die Substanzen wurden in aqua demin. gelöst und der pH-Wert bei 4°C 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, 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: zur Entfernung nicht gebundener Radioaktivität aus dem Filter und zur Fixierung der Inkubation.

50 mM	Tris	(Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)
154 mM	NaCl	

Eine zehnfach konzentrierte Stammlösung mit aqua demin. als Lösungsmittel diente zur Herstellung des Waschpuffers. Hierbei verdünnte man die Stammlösung wieder 1:10 mit aqua demin.. Der pH-Wert des Waschpuffers wurde bei 4°C (auf Eis) mit HCl auf 7,4 eingestellt.

Hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum (FCS):

FCS enthält für die Kultivierung von HEK293- Zellen wichtige mitogene Faktoren.

Um eventuelle Restaktivitäten von Serumproteasen zu unterbinden wurde das bis dahin bei -30° C aufbewahrte FCS aufgetaut und im Wasserbad (55°C) für 60 Min. hitzeinaktiviert. Danach wurde es bis zu seiner jeweiligen Verwendung im Kühlschrank (6 °C) gelagert.

Kulturmedium für die HEK293 – Zelllinie:

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

Gentamycin wurde in 6 ml-Stammlösungen, mit aqua demin. als Lösungsmittel, angesetzt (c = 2 mg/ml), bei -20 °C aufbewahrt und bei der Herstellung des Kulturmediums zum Schutz vor bakterieller Besiedelung zugegeben (Endkonzentration c = 0.04 µg/ml). Das Kulturmedium wurde bis zu seiner Verwendung im Kühlschrank (6 °C) gelagert. Die Blaufärbung des vom Hersteller beigefügten Indikators zeigte an, wann das Medium zu basisch wurde und nicht mehr zur Zellkultivierung genutzt werden konnte.

Geneticinsulfat:

Gleichzeitig mit der cDNA, die für die jeweilige Untereinheit des K_{ATP} –Kanals (SUR 2A, SUR 2B oder SUR 1w.t) kodierte, wurde durch Plasmide auch ein Resistenz-Gen für das Aminoglykosid–Antibiotikum Geneticin transfiziert. Dadurch können mittels Geneticinzugabe während der Zellkultivierung diejenigen HEK293-Zellen vernichtet werden, bei denen der Einbau der cDNA für die Untereinheit des K_{ATP} –Kanals nicht erfolgreich war. Die Substanz wurde bei einer Konzentration von 30 mg/ml Geneticinsulfat in sterilem Puffer 3 gelöst,

in 1-ml Eppendorf-Gefäße aliquotiert und im Kühlschrank bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

Gefriermedium: Kryokonservierung von HEK293-Zellen

Es wurden jeweils beim Einfrieren von Zellen frisch angesetzt:

<i>Gefriermedium A</i>	MEM mit	40 % (v/v) FCS
<i>Gefriermedium B</i>	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

Lowry B:

1 % (w/v) CuSO_4 in aqua bidest.

Lowry C:

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

Lowry D:

Folin-Ciocalteu-Reagenz (2 M)

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

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 HEK293 - Zellen

Die HEK293-Zelllinie (siehe Abb. 15) stammt aus menschlichen embryonalen Nierenzellen, die durch den DNA haltigen Adenovirus Typ 5 tumorös transformiert und dadurch immortalisiert wurden (Graham et al., 1977).

2.3.1 Kultivierung von HEK293 – 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 (Heraeus Instruments, Deutschland) kultiviert.

Die Atmosphäre war befeuchtet und hatte ein Luft:CO₂-Verhältnis von ~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 beispielsweise mit 3 ml 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.

Die Endkonzentration von Geneticinsulfat im Kulturansatz betrug 300 µg/ml. Sämtliche Arbeiten mit lebendigen Zellen wurden unter keimarmen Bedingungen an einer Sterilbank mit laminar-air-flow (Hera Safe, Heraeus Instruments, Deutschland) durchgeführt.

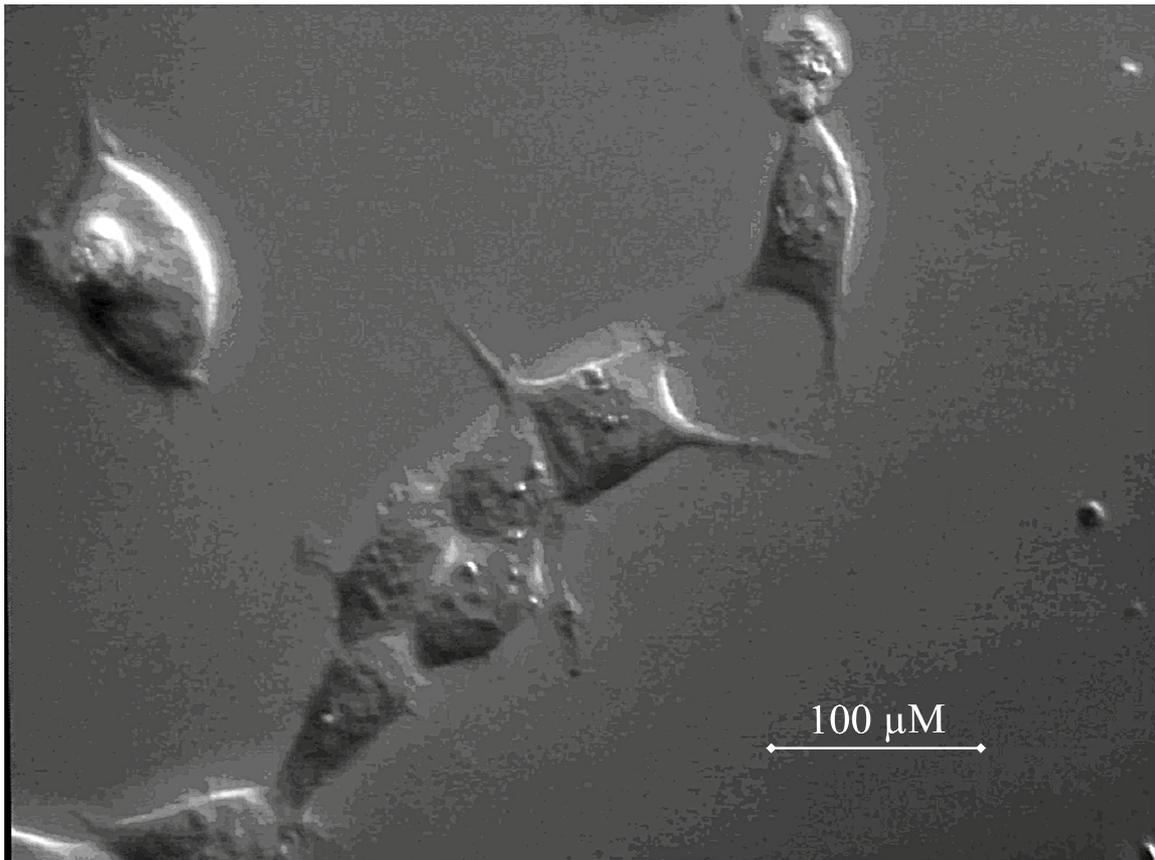


Abb. 15: Lichtmikroskopische Darstellung von HEK293-Zellen in niedriger Konfluenz

Sichtbar sind die für HEK293-Zellen typischen Zellausläufer. Die Abbildung entstand in 400-facher Vergrößerung im Differenz-Interferenz-Kontrastmodus.

2.3.2 Transfektion von HEK293-Zellen

Zur Transfektion wurde, Schalen mit 60–80%iger Konfluenz, der pcDNA 3.1-Vektor (Invitrogen) zugesetzt, der die kodierende Sequenz für murinen SUR2A (Genbank-Bestellnummer D86037) oder SUR2B (D86038) (Isomoto et al., 1996) , K_{IR}6.1 (D88159) (Yamada et al., 1997), oder Kir 6.2 (D50581), (Inagaki et al., 1996) enthält. Zur Transfektion wurde eine Lösung aus pcDNA und 25 μ l Lipofektamin pro DNA-Fraktion hergestellt und diese mit Optimem auf 7.9 ml verdünnt; dazu wurde gemäß Herstellerinformation 4 μ g pcDNA (K_{IR}6.1) und / oder 6.4 μ g (SUR6.x) pcDNA zugesetzt und zu mindestens zwei Wochen in Kultur gebrachten HEK293-Zellen gegeben. Dann ließ man die Zellen die Liposomen mit der Fremd-DNA für 5 Stunden aufnehmen und tauschte das

Transfektionsmedium gegen 80% Optimem und 20% FCS. Die Isolierung der stabil transfizierten Zellen wurde erreicht, indem man die Zellen 2 Tage nach der Transfektion mit frischem Medium ablöste, und die Zellsuspension 1:20 (v/v) in Geneticin-haltigem Medium (700 µg/ml) verdünnte. Nach 2 Monaten wurde das Geneticin auf 450 µg/ml, weitere 2 Monate später auf 300 µg/ml reduziert.

Die Mutanten 2B(Y1206S) und 2A(Y1206S) der SUR-Untereinheit wurden mithilfe des QuickChange Site-Directed Mutagenesis System (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) hergestellt. Murine SUR2B bzw. SUR2A cDNA wurde in den p.c.DNA3.1-Vektor eingefügt und als Template-DNA verwendet. Es wurden zwei komplementäre Primer (31-Aminosäuren lange Oligonucleotide), die die Mutation (TAC nach TCC) in der mittleren Region enthielten entwickelt. Für jede Reaktion wurden 125 ng vor- bzw. rückwärts mutagene Primer zusammen mit 100 ng muriner Wild-Typ SUR2B- oder SUR2A-cDNA, enthalten in pcDNA3.1 und 2,5 U Pfu-Turbo-DNA-Polymerase in einer PCR (Polymerase Chain Reaction) über 18 Cyclen zur Reaktion gebracht (Denaturierung 30 Sek. bei 95°C, Annealing 60 Sek. bei 55°C, Extension, 29 Min. bei 68°C). Die elterliche methylierte DNA wurde durch die Restriktionsendonuklease DpnI durch Verdauung zerstört. Die neu synthetisierte DNA wurde in MAX-Efficiency-DH5,α-Kompetente Zellen (E. coli, Invitrogen) transformiert und die Anwesenheit der gewünschten Mutation über eine Nucleotid-Sequenzierung der relevanten DNA-Region bestätigt. Die Cotransfektion von SUR 2A(Y1206S) und Kir6.2 wurde transient, mit einem molaren Plasmidverhältnis von 1:1 vorgenommen (Hambrock et al., 1998). Die molekularbiologischen Arbeiten, die Herstellung der stabil exprimierenden Zelllinien sowie die transienten Transfektionen wurden von Fr. Dr. Hambrock (Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinikum Tübingen) vorgenommen.

2.3.3 Einfrieren von HEK293-Zellen

Nur Petrischalen in denen die Zellen eine Konfluenz von 70-80 % erreicht hatten (7-10 Millionen Zellen pro Schale), wurden zum Einfrieren

herangezogen. Nach Absaugen des alten Mediums wurden die Zellen mit 4 ml Gefriermedium A pro Schale von der Schalenoberfläche abgespült und zentrifugiert (500 x g, 5 Min.). Währenddessen wurden 500 µl Gefriermedium B in die einzelnen Kryoröhrchen vorgelegt. Anschließend an die Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen mit 500 µl Gefriermedium A pro Schale resuspendiert. Nach der Zugabe von 500µl Zellsuspension zu den Kryoröhrchen (Cryo.s, Greiner Labortechnik), musste zügig gearbeitet werden, da DMSO zwar eine Zerstörung der Zellen durch das Einfrieren bzw. Auftauen verhindert, bei Raumtemperatur aber zytotoxisch ist. Die Zellen wurden über Nacht bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ in der Tiefkühltruhe gelagert und am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff (-180°C) überführt.

2.3.4 Auftauen von HEK293-Zellen

Der Auftauvorgang wurde möglichst rasch durchgeführt, um den Kontakt der Zellen mit dem Detergens DMSO möglichst gering zu halten.

In ein 50 ml-Falcon-Tube (Becton Dickinson, NJ, USA) wurden ca. 30 ml Kulturmedium ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$) vorgelegt. Im Wasserbad ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$) wurde ein aus dem flüssigen Stickstoff entnommenes Kryoröhrchen schnell aufgetaut, bis gerade noch ein Eisstift erkennbar war. Die Zellsuspension wurde dann rasch aus dem Kryoröhrchen in das vorbereitete 50 ml-Falcon-Tube überführt, dadurch in Medium verdünnt und bei 200 x g, 2-3 Min. lang zentrifugiert.

Der entstandene Bodensatz (aufgetaute HEK293-Zellen) wurde in 10 ml Kulturmedium resuspendiert und in eine Petrischale (Durchmesser 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 wurden die Zellen im Verhältnis 1:3 passagiert und unter Zugabe von $300\text{ }\mu\text{g} / \text{ml}$ Geneticin im Brutschrank kultiviert.

2.3.5 Herstellung einer mikrosomalen Membranfraktion aus HEK293-Zellen

Verwendete Petrischalen wiesen eine Konfluenz von 60-80 % der HEK-293 Zellen auf. Die Zellen (7-10 Millionen Zellen pro Schale) wurden mit dem alten, bereits in den Schalen vorhandenen, Medium (10 ml/Schale) abgespült und darin bei Raumtemperatur zentrifugiert (500 x g, 10 Min.). Dann wurden sie durch Resuspension des Bodensatzes (Pellet) in hypotonem Puffer 1 lysiert (pro Schale 4 ml hypotoner Puffer) und bei 4 °C ultrazentrifugiert (100 000 x g, 30 Min.). Das Pellet wurde anschliessend mit Puffer 2 (pH 7,4 bei 4°C) resuspendiert, in 2ml-Eppendorf-Gefässe aliquotiert und bei -80 °C eingefroren. Vor jedem Versuch wurden die Membranen direkt nach dem Auftauen im Polytron (PT 3000, Kinematika AG, Schweiz) homogenisiert (5-8 s, 10000 U/min).

2.4 Proteinbestimmung

Als Grundlage für die Proteinbestimmung nach Lowry (Lowry et al., 1951) wurde eine Standardmesskurve mit Rinderserumalbumin (BSA) erstellt, das in verschiedenen Konzentrationen in NaOH (0.1 M) gelöst wurde. Die Konzentrationsreihe mit BSA wurde als Eichgerade aufgetragen (Abb. 16). Es konnte festgestellt werden, dass die Puffersubstanz HEPES, die sich in Puffer 2 befindet, in dem die Zellmembranen suspendiert sind, 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).

Es wurden bei jedem Versuch 35µl der verwendeten Membranen und 35µl des verwendeten Inkubationspuffers in je ein Eppendorfgefäß pipettiert und mit NaOH (0.1 M) verdünnt (meistens 1:20), so dass die Proteinkonzentration und

die Pufferkonzentration im linearen Bereich der Standardmesskurven bestimmt werden konnten.

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}) des jeweiligen Membranproteins und des Puffers wurde gegen die des Leerwertes gemessen.

Die OD_{770} lag bis zu einer Proteinkonzentration von ca. 30 µg (in der Messküvette) unter 0.3 und zeigte eine lineare Abhängigkeit (Abb. 16) wie auch der anfängliche Kurvenverlauf bei der Puffersubstanz HEPES. 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:

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

Gleichung 1 a bzw. b

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

War die Proteinkonzentration zu hoch, wurde eine höhere Verdünnung angesetzt.

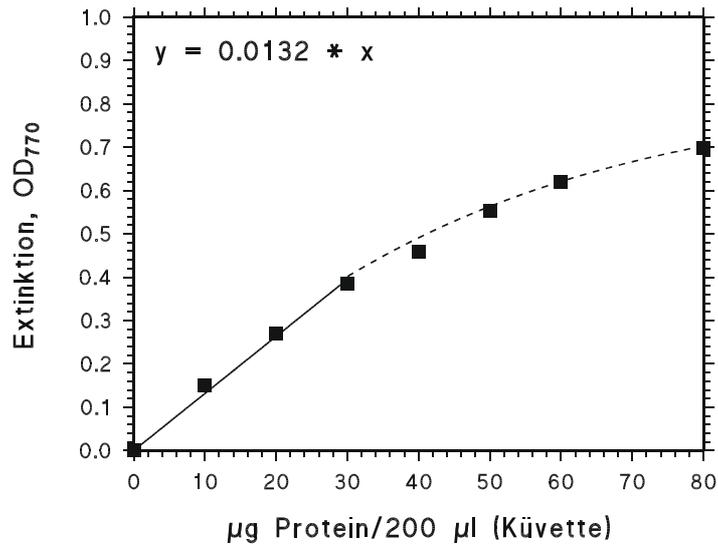


Abb. 16 : Eichkurve für die Proteinbestimmung nach Lowry.

Die durchgezogene Linie gibt den linearen Bereich bis 30 µg 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 experimentell bestimmen (Gleichgewichtsexperiment). Ausserdem kann man den zeitlichen Bindungsverlauf eines Radioligand-Rezeptorkomplexes (Assoziation und Dissoziation) experimentell zur Darstellung bringen (Ligand-Rezeptor-Kinetik).

Allgemein lassen sich die folgenden beiden Fälle der Ligand-Rezeptor-Interaktion 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.

B.) Allosterischer Modulator: Ein allosterischer Aktivator wie z.B. MgATP der an den NBF ansetzt, erhöht die Bindung eines Öffners (z.B. ³H-P1075)

(Hambrock et al., 1998). Für ^3H -GBC wird eine Hemmung beobachtet (Hambrock et al., 2001, Hambrock et al., 2002)). Auch die Wechselwirkung zwischen Öffnern und Sulfonylharnstoffen am SUR ist allosterischer Natur (Bray and Quast, 1992; Schwanstecher et al., 1992).

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 (K_D) im nano- oder subnanomolaren Bereich liegen. Weiter sollte sich die biologische Wirkung durch die Markierung nicht verändern. Vor allem bei mit Tritium markierten Liganden sind, im Gegensatz zu jodierten, kaum Veränderungen der chemischen Eigenschaften des Liganden zu erwarten. Des weiteren sollte der Anteil der unspezifischen an der spezifischen Bindung gering sein. Tritium (^3H) eignet sich gut für Bindungsstudien, da es seine spezifische Radioaktivität durch die lange Halbwertszeit (12.26 Jahre) im Versuchszeitraum kaum ändert. Andererseits bringt ein ^3H -Atom nur eine spezifische Aktivität von $\sim 30 \text{ Ci}/\text{mmol}$ ein. Für Bindungsmessungen an den SUR-Subtypen wurden in dieser Arbeit zwei Radioliganden verwendet, die beide mit dem Radioisotop Tritium markiert sind:

^3H -GBC: Der K_{ATP} -Kanalblocker Glibenclamid bindet mit deutlich höherer Affinität an SUR1 ($K_D \sim 1 \text{ nM}$) als an SUR2 ($K_D \sim 30 \text{ nM}$) (Hambrock et al., 1998; 2002; Schwanstecher et al., 1998). Das in dieser Arbeit verwendete Glibenclamid hatte eine spezifische Aktivität (SA) von 47-52 Ci/mmol . 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 endogene Bindungsstellen für GBC vorhanden sind, die jedoch keine Öffnerempfindlichkeit besitzen und somit für diese Untersuchungen nicht relevant sind (Hambrock et al., 2001).

³H-P1075: Der K_{ATP} -Kanalöffner bindet mit guter Affinität an SUR2B ($K_D \sim 5-10$ nM; (Bray and Quast, 1992), dagegen kaum an SUR1 ($K_D > 100$ μ M). Das in dieser Arbeit verwendete ³H-P1075 hatte eine SA von $\sim 117-121$ Ci/mmol und eine Konzentration von ~ 5 μ M. P1075 weist eine sehr geringe nichtspezifische Bindung auf, was es zu einem sehr geeigneten Liganden für Bindungsstudien macht. Die nichtspezifische Bindung wird in der Gegenwart von 10 μ M unmarkiertem P1075 ermittelt.

2.5.2 Gewinnung von Rezeptormaterial

Die in dieser Arbeit untersuchten Rezeptoren befanden 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 Membranen zum Reaktionsgemisch (Puffer $2 \pm$ MgATP + Radioligand \pm 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 sollte die Temperatur möglichst ähnlich der Körpertemperatur sein und wurde deshalb im Wasserbad auf 37°C festgelegt.

Inkubationszeit:

Bei Gleichgewichtsexperimenten wird vorausgesetzt, dass gemäß dem Massenwirkungsgesetz (MWG) die Gleichgewichtslage erreicht ist. Die Geschwindigkeit der Einstellung der Gleichgewichtslage ist aber nicht nur von

den kinetischen Konstanten sondern auch von der Konzentration der Reaktionsteilnehmer abhängig. Daher sind die kleinsten im Versuch vorkommenden Konzentrationen von Rezeptor und Ligand maßgeblich für die Festlegung der Inkubationszeit.

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

Inkubationsmedium:

Das verwendete Medium (meist Puffer 2) war bei physiologischem pH gepuffert (pH = 7.4). Wichtig hierbei ist, dass der pH-Wert bei derjenigen Temperatur eingestellt wird, bei der 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 enthielten wurden drei Aliquots ($V = 0.3 \text{ ml}$) in je 8 ml eiskaltem Waschpuffer verdünnt und unter Vakuum über Glasfaserfilter (Whatman GF/B) in einer Filtrationsanlage mit Hilfe einer Membranpumpe abgesaugt. Der eiskalte Waschpuffer ($\sim 4^\circ\text{C}$) 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, blieben diese auf dem Filter zurück. Um unspezifisch im Präparat gebundene Radioaktivität zu entfernen, wurden die Filter schnell zweimal mit 8 ml eiskaltem Waschpuffer nachgewaschen.

2.5.5 Messung der Radioaktivität:

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

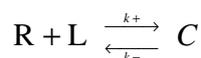
Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden mittels eines TRI-CARB® Liquid Scintillation Analyzer 2000CA von PACKARD mit einer Zählausbeute von ca. 54% durchgeführt, d.h. der Zähler detektiert 54% der Zerfälle pro Minute. Jeder Messpunkt wurde in den Einzelversuchen drei mal bestimmt und daraus das arithmetische Mittel gebildet.

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

$C = \frac{\text{gezählte dpm}}{2.2 \cdot 10^{12} \left(\frac{\text{dpm}}{\text{Ci}}\right) \cdot \text{SA} \left(\frac{\text{Ci}}{\text{mmol}}\right) \cdot V (\text{ml})} = \frac{\text{mol}}{\text{l}}$	<p>V = Volumen in ml C = Konzentration in mol / l SA = Spez. Aktivität in Ci / mmol 1Ci = 2.2 * 10¹² dpm / min</p>
--	---

2.6 Modell der Rezeptorbindungsstudien

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



Gleichung 2

Dabei stellt R die freie Rezeptorkonzentration, L die freie Ligandenkonzentration, C den Rezeptor-Ligand-Komplex, k_+ die Assoziations-Geschwindigkeits-Konstante [$M^{-1}s^{-1}$] und k_- die Dissoziations-Geschwindigkeits-Konstante [s^{-1}] dar.

Im Gleichgewicht gilt das Massenwirkungsgesetz:

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

Gleichung 3

Dabei ist K_D die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante [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, d.h. 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

Das bedeutet, dass die totale Ligandenkonzentration viel größer ist als die totale Rezeptorkonzentration. Dabei sollte der gebundene Anteil des Radioliganden stets unter 5% liegen.

Im Experiment überlagert sich der spezifischen Bindung des Radioliganden an die Rezeptoren (SB) immer die, durch das unspezifische Haften des Liganden am Protein und am Filter verursachte, nichtspezifische Bindung (NSB). Die NSB wurde gemessen, nachdem die spezifische Bindung durch einen Überschuss

an kaltem Liganden ($L_{\text{kalt}} = 1000 \cdot K_D$) blockiert wurde. Experimentell bestimmt werden die totale (B_{TOT}) und die nichtspezifische Bindung (NSB).

Aus diesen lässt sich SB berechnen:

$$SB = B_{\text{TOT}} - \text{NSB}; \quad SB \equiv C$$

Gleichung 5

2.6.1 Sättigungsexperiment

Beim Sättigungsexperiment wird die Konzentration des Rezeptors konstant gehalten und man variiert die Konzentration des Radioliganden. Es sollten, wenn möglich, 70-80% des Bindungsbereichs abgedeckt werden. Parallel zum eigentlichen Bindungsexperiment (totale Bindung) muss eine zusätzliche Bindungskurve mit einem genügend hohen Überschuss ($c = 100 - 1000 \cdot K_D$ des Radioliganden) an nicht markiertem Liganden, der alle freien Rezeptorbindungsstellen besetzen soll, erstellt werden. Damit wird die nichtspezifische Bindung (d.h. die Bindung des Radioliganden an anderen Stellen als an dem Rezeptor) quantifiziert. Die nichtspezifische Bindung steigt beim Sättigungsexperiment, im Gegensatz zum Konkurrenzexperiment, bei dem sie näherungsweise konstant bleibt, proportional zur Radioligand-Konzentration an.

Gemessen werden B_{TOT} und NSB als Funktion der freien Radioliganden-Konzentration L .

Da die NSB eine schwache Bindung des Liganden an sehr viele Bindungsplätze darstellt, bei der eine Sättigung nicht erreicht wird, gilt folgender lineare Ansatz:

$$\text{NSB} = a \cdot L$$

Gleichung 6

Die spezifische Bindung (SB) wird aus Gleichung 2 und Gleichung 4 a bzw. b errechnet, mit $SB \equiv C$:

$$K = \frac{R \cdot L}{C} = \frac{(R_0 - C) \cdot L}{C}$$

Gleichung 7

Diese Gleichung lässt sich unter der Bedingung (4c) umformen in

$$C = R_0 \cdot \frac{L}{L + K}$$

Gleichung 8

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

Direkt messbar im Experiment sind B_{TOT} , NSB und L_0 ; dabei gilt: $L = L_0 - B_{TOT} - NSB$. Die Bindungsisotherme ergibt sich dann als Summe der spezifischen und der unspezifischen Interaktion des Liganden mit dem Rezeptor.

$$B_{TOT} = R_0 \cdot \frac{L}{L + K} + a \cdot L$$

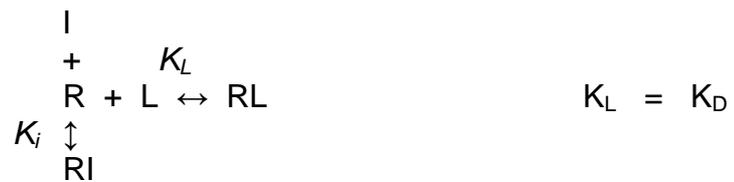
Gleichung 9

2.6.2 Konkurrenzexperiment

Das Prinzip des Konkurrenzexperimentes beruht auf der Konkurrenz eines radioaktiv markierten und eines unmarkierten Liganden um dieselbe Rezeptorbindungsstelle. Dabei kann es sich bei dem radioaktiv markierten und dem nicht markierten Liganden um die gleiche Substanz handeln (homologe Konkurrenz) oder um zwei verschiedene Substanzen (heterologe Konkurrenz).

Durch das Konkurrenzexperiment lassen sich einerseits der IC_{50} -Wert (Konzentration des Kompetitors welche dessen halb-maximale Bindung bewirkt, bzw. die SB des Radioliganden um 50% erniedrigt) des unmarkierten Kompetitors, andererseits wichtige Hinweise bezüglich möglicher Heterogenität von Bindungsstellen finden. Aus dem IC_{50} -Wert lassen sich die K_D (bei homologer Konkurrenz) bzw. mittels der Korrektur nach Cheng-Prusoff (siehe Kapitel 2.6.2) die K_i (Gleichgewichts-Dissoziations-Konstante des unmarkierten Inhibitors) berechnen. Die K_D eines homologen bzw. die K_i eines heterologen Kompetitors kann allerdings nur ermittelt werden wenn vorher die K_D des Radioliganden durch ein Sättigungsexperiment bestimmt wurde.

Ausgegangen wird von folgendem Reaktionsschema:



Gleichung 10

Hierbei bilden der Inhibitor (I) und der Rezeptor (R) reversibel den Rezeptor-Inhibitor Komplex (RI), der Radioligand (L) und der Rezeptor formieren sich zum Rezeptor-Ligand Komplex (RL). Dabei kompetieren I und L um R. K_L ist die Dissoziationskonstante des Radioliganden, K_i ist diejenige des unmarkierten Inhibitors.

In der Präparation gibt es nur eine Klasse von Bindungsstellen (Rezeptoren). Gemessen wird 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 wird. Aus den Massenwirkungsgesetzen für die beiden oben dargestellten konkurrierenden Reaktionen

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

Gleichung 11 a bzw. b

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

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

Gleichung 12

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

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

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

Gleichung 13

Cheng and Prusoff, 1973; hierzu muss K_L bekannt sein.

Im Falle der homologen Kompetition (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 14

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

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

Gleichung 15 a und b

beschreiben als:

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

Gleichung 16 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 17

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

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

Gleichung 18

2.6.3 Verallgemeinerung der Bindungsisotherme nach Hill

Falls der nicht-markierte Ligand nicht mit dem Radioliganden kompetitiv ist oder der Radioligand ein kompliziertes Bindungsverhalten zeigt, ist die Bindungsisotherme steiler oder flacher als es der Gleichung 16 a bzw. b entspricht. In diesem Fall werden diese beiden Gleichungen durch die Einführung eines Exponenten (Hill-Koeffizient = n_H) verallgemeinert. Für die Inhibitionskurve gilt dann:

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

Gleichung 19

Für die Sättigungsisotherme gilt:

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

Gleichung 20 a bzw. b

Dabei gilt: $SB(0) = SB$ zum Zeitpunkt $t = 0$. Für Bindungsstudien lassen sich mit Hilfe von n_H folgende Schlussfolgerungen ziehen:

$n = 1$:	<i>übliche Bindungsisotherme</i> : Vorhandensein nur einer Klasse von nicht miteinander in Wechselwirkung stehenden Bindungsstellen
$n > 1$:	<i>positive Kooperativität</i> : mehrere Ligandenmoleküle binden mit steigender Affinität an den Rezeptor und führen eventuell auch durch allosterische Modulation zu einer erhöhten oder verminderten Radioligandenbindung
$n < 1$:	<i>negative Kooperativität</i> : 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 21

Dies stellt eine Verallgemeinerung der Gleichung 19 für nicht-vollständige Hemmung dar. Dabei gilt:

$y = \%SB$ (% der spezifischen Bindung)
A = Amplitude (maximaler Effekt der Sättigung); A = 100 → vollständige Hemmung
$pX = -\log x$ (wobei x die Konzentration des homologen bzw. die Konzentration des heterologen Inhibitors darstellt.)
$pIC_{50} = -\log IC_{50}$: Der IC_{50} ist der Mittelpunkt (Wendepunkt) der Hemmkurve
$n = n_H =$ Hill Koeffizient

Falls die Einzelexperimente darauf hinwiesen, dass $A \sim 100\%$ und $n_H \sim 1$, wurden diese beiden Parameter als Konstanten in die Anpassung eingegeben, um die Fehler der verbleibenden Parameter zu verringern.

Im Falle biphasischer Hemmkurven, wurde ein Modell mit zwei Komponenten (Gleichung 21) mit $n_H = 1$ und $A_2 = 100 - A_1$ angewendet.

$$y = \frac{A_1}{1 + 10^{-(pIC_{50,1} - pX)}} - \frac{100 - A_1}{1 + 10^{-(pIC_{50,2} - pX)}}$$

Gleichung 22

2.8 Statistik

Die Amplituden und die pIC_{50} -Werte sind normalverteilt (Christopoulos, 1998); folglich trifft dies auch für pK_D bzw pK_i -Werte zu. Vorteilhaft an normalverteilten Werten ist, dass parametrische Tests wie der student's t-test anwendbar sind. Daher wurden aus den experimentell ermittelten Daten durch Angleichung an Gleichung 21 bzw. Gleichung 22 zunächst die pIC_{50} -Werte ermittelt. Dann wurden mit der Korrektur nach Cheng-Prusoff (Gleichung 13) bei heterologer bzw. Gleichung 14 bei homologer Competition die K_i bzw. K_D -Werte errechnet. Anschließend folgte die Berechnung des negativen dekadischen Logarithmus dieser Werte (pK_D , pK_i). Zuletzt wurden die arithmetischen Mittel der pK_D bzw.

pK_i-Werte aus den Einzelversuchen gebildet und deren Standardabweichung des Mittelwerts (SEM = standard error of the mean) errechnet.

Die Konfidenzintervalle der IC₅₀-Werte ergaben sich zu

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

Gleichung 23

Die so gewonnenen Parameter sind in die Tabellen im Kapitel 3 eingetragen.

Stichproben, die im t-test auf ihr Signifikanzniveau untersucht werden sollten, wurden zunächst, sofern es die Anzahl der Einzelversuche zuließ ($n > 4$), mithilfe des Tests nach Smirnow-Kolmogorow auf Normalverteilung untersucht. Danach stellte der F-test fest, ob die Standardabweichungen der untersuchten Stichproben gleich waren, die Stichproben also der gleichen Grundgesamtheit entstammten.

Waren diese beiden Voraussetzungen erfüllt, wurde zum statistischen Vergleich zweier Stichproben (z.B. Vergleich der Einzelversuche der Konkurrenz ³H-P1075 - A-312110 an SUR2A, mit und ohne MgATP) in den meisten Fällen ein zweiseitiger student's t-test für unpaare Stichproben angewandt (Software: GraphPad InStat version 3.05 for Windows, GraphPad Software Inc.). Wurden abgewandelte Formen des statistischen Vergleichs angewandt (z.B. ein t-test für paarige Stichproben) ist dies speziell im Text erwähnt.

In einem Fall musste ein modifizierter t-test (t-test mit Welch-Korrektur) (siehe Kapitel 3.5.1) angewendet werden, da der F-Test einen signifikanten Unterschied der Standardabweichungen der beiden untersuchten Stichproben festgestellt hatte.

In einem weiteren Fall (siehe Kapitel 4.4.1) wurde der Unterschied zweier Mittelwerte im zweiseitigen t-test für unpaare Stichproben untersucht. Hierbei gehen n_1 und n_2 (n_1 bzw. n_2 = Anzahl der Versuche für die jeweilige Stichprobe) als Anzahl der Freiheitsgrade mit in die Berechnung ein: $f = n_1 + n_2 - 2$.

In den Abbildungen des dritten Kapitels sind die Mittelwertskurven der Messreihen gezeigt (gemittelte Daten der Einzelversuche \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 der Ermittlung des Fehlers der ΔpK_D bzw. ΔpK_i -Werte (siehe auch Kapitel 3.1.1) 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:

Summen- und Differenzbildung:

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

Gleichung 24

Bei $n_H \neq 1$ musste entschieden werden ob ein Modell mit einer oder eines mit zwei Bindungsstellen statistisch überlegen war. Für diese Entscheidung wurde das Akaike Kriterium herangezogen (Quast and Mählmann, 1982; Akaike, 1974).

Das Akaike Kriterium wird getrennt für das Modell mit einer und für das Modell mit zwei Bindungsstellen berechnet.

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

Gleichung 25

Dabei ist N die Anzahl der Messpunkte, SQ_i die Summe der Fehlerquadrate und p_i die Anzahl der Parameter des jeweiligen Modells. Bevorzugt wird das Modell mit dem niedrigeren AIC-Wert.

3 Ergebnisse

3.1 ³H-P1075-Verdrängungsmessungen an mit SUR2A transfizierten HEK-Zellmembranen

Wie in der Einleitung (Kapitel 1.7.2) dargelegt, binden die KCO an die SUR-Untereinheit des K_{ATP} -Kanals. (Hambrock et al., 1998; Hambrock et al., 1999; Schwanstecher et al., 1998). In diesen Experimenten wurde ebenfalls gezeigt, daß eine hochaffine Bindung der KCO die Gegenwart hydrolysierbarer Nukleosidtriphosphate und Mg^{2+} benötigt (Schwanstecher et al., 1998) und daß die halbmaximale Aktivierung der hochaffinen Öffnerbindung bei 3 – 5 μM MgATP auftritt (Hambrock et al., 1998; 1999). Die Nukleotide und die Öffner binden an verschiedene Stellen des SUR (vgl. Kapitel 1.4.3 und 1.7.2); daher stellt die Aktivierung der Öffnerbindung durch MgATP die positiv allosterische Kopplung zwischen der MgATP- und der Öffnerbindungsstelle dar.

Hier wird, wie auch schon in früheren Untersuchungen (Hambrock et al., 1998; 1999), die Stärke dieser allosterischen Kopplung erfaßt, in dem die Öffnerbindung bei vollständiger Sättigung (mit MgATP, 1 mM) und bei weniger als Halbsättigung (3 μM MgATP) verglichen wird. In Kompetitionskurven finden wir, daß bei 3 μM MgATP die (spezifische) Bindung des Radioliganden um etwa 70-80% erniedrigt wird (vergleiche Legende Abb. 17 und Abb. 18) und daß die Inhibitionskurve nach rechts verschoben ist. Diese Rechtsverschiebung wird als ein Maß für die positiv allosterische Kopplung zwischen Nukleotidbindung und KCO-Bindungsstelle betrachtet. Vermutlich sagt die Verschiebung etwas über die intrinsische Effizienz (efficacy) der verschiedenen KCO aus. Solche Versuche wurden bisher überwiegend am SUR2B (der SUR Isoform im glatten Muskel) durchgeführt und werden hier auf den SUR2A (SUR Isoform in Skelett- und Herzmuskel) übertragen.

3.1.1 Homologe Verdrängung der ^3H -P1075-Bindung an SUR2A.

Abb. 17 zeigt die homologen Verdrängungskurven ^3H -P1075-P1075 bei 1 mM und 3 μM MgATP in normierter Form (d.h. in %SB). Die Inhibitionskurven sind monophasisch mit Hill Koeffizient 1. Die normierte Darstellung wurde gewählt, um die Rechtsverschiebung der Kurve bei 3 μM MgATP hervorzuheben; in absoluten Einheiten (fmol/mg) würde diese Kurve um etwa 69% tiefer beginnen. Bei 1 mM MgATP wurde aus $n = 12$ Einzelversuchen ein mittlerer pK_D von 7.81 ± 0.03 und für 3 μM MgATP aus $n = 5$ Experimenten ein pK_D von 7.71 ± 0.05 bestimmt; dies entspricht K_D -Werten von 16 [14, 18] nM und 20 [16, 25] nM. Diese Werte unterscheiden sich nur unwesentlich von dem Fit (Gleichung 21, Modell mit einer Bindungsstelle) der zusammengefassten Daten, der in Abb. 17 gezeigt ist. Die Rechtsverschiebung wurde durch Subtraktion der pK_D -Werte quantifiziert und betrug $\Delta\text{pK}_D = 0.10 \pm 0.06$ (Tab. 4), wobei der Fehler des ΔpK_D -Wertes als Wurzel aus der Summe der Fehlerquadrate der beiden pK_D -Werte berechnet wurde (Material und Methoden, Kapitel 2.8). Daraus ergab sich rechnerisch ein f-Wert ($f = 10 \exp \Delta\text{pK}_D = K_{D, 0.003 \text{ mM}} / K_{D, 1 \text{ mM}}$) von 1.3 [1.0, 1.7]. Die pK_D -Werte der Einzelversuche wurden einem student's t-test für unpaarige Stichproben unterzogen. Es ergab sich mit $p = 0,0792$ (zweiseitig) kein signifikanter Unterschied zwischen den pK_D Werten bei 1 mM bzw. 3 μM MgATP.

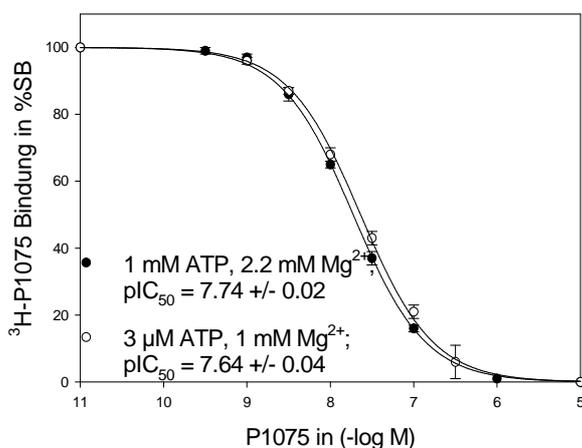


Abb. 17 Homologe Verdrängung der ^3H -P1075 Bindung an mit SUR2A permanent transfizierten HEK-Zellen.

Die Regressionskurven repräsentieren den Fit der Gleichung 21 an die zusammengefassten Daten der Einzelerperimente. Die Bedingungen waren: 2,2 mM Mg^{2+} , 1 mM ATP (a) und 1 mM Mg^{2+} , 3 μM ATP (b); $n = 12 / 5$; Konzentration des Radioliganden (L_0) = $2.63 \pm 0.12 / 3.18 \pm 0.08$ nM; Proteinkonzentration (PK) = $0.24 \pm 0.01 / 0.27 \pm 0.01$ mg/ml; Totale Bindung (B_{TOT}) = $121 \pm 13 / 56 \pm 5$ fmol/mg; Spezifische Bindung (SB) = $105 \pm 14 / 33 \pm 4$ fmol/mg; Nichtspezifische Bindung (NSB) $\sim 15\% / \sim 42\%$ von B_{TOT} .

3 Ergebnisse

Tab. 4 Homologe Verdrängung der $^3\text{H-P1075}$ Bindung an mit SUR2A permanent transfizierten HEK-Zellen.

SUR	Radio-ligand	Komp.	MgATP, μM	pIC_{50}	pK_D	K_D , nM	n_H	ΔpK_D	f
SUR2A	$^3\text{H-P1075}$	P1075	1000	7.74 ± 0.02	7.81 ± 0.03	16 [14, 18]	1.00 ± 0.03	0.10 ± 0.06	1.3 [1, 1.7]
SUR2A	$^3\text{H-P1075}$	P1075	3	7.64 ± 0.04	7.71 ± 0.05	20 [16, 25]	0.89 ± 0.03		

Parametertabelle (Mittelwerte \pm SEM aus Einzelfits der logistischen Gleichung (Gleichung 21); [x, y], 95% Konfidenzintervall; Komp.= Kompetitor; $f = 10 \exp \Delta\text{pK}_D = K_{D, 0.003 \text{ mM}} / K_{D, 1 \text{ mM}}$)

3.1.2 Heterologe Verdrängung der $^3\text{H-P1075}$ -Bindung an SUR2A durch A-312110

Es sollte nun äquivalent zu den Versuchen zur homologen Verdrängung der $^3\text{H-P1075}$ Bindung der neue Ligand A-312110 untersucht werden. Zur Berechnung der K_i -Werte aus den ermittelten IC_{50} -Werte wurde die Methode nach Cheng-Prusoff (siehe Kapitel 2.6.2) angewandt. Für 2.2 mM Mg^{2+} , 1 mM ATP ergab sich ein mittlerer pK_i von 7.87 ± 0.02 ($K_i = 14$ [12, 15] nM) und für 1 mM Mg^{2+} , 3 μM ATP ein pK_i von 7.52 ± 0.02 ($K_i = 30$ [28, 33] nM). Die Rechtsverschiebung betrug $\Delta\text{pK}_i = 0.35 \pm 0.03$ mit $f = 2.2$ [1.9, 2.6]. Im zweiseitigen student's t-test wurde mit $p < 0,0001$ ein hoch signifikanter Unterschied der pK_i -Werte bei 2.2mM Mg^{2+} , 1mM ATP beziehungsweise bei 1mM Mg^{2+} , 3 μM ATP festgestellt. In Abb. 18 sind die gemittelten Hemmkurven normiert dargestellt. In absoluten Einheiten (fmol/mg) würde die Kurve bei 3 μM ATP um ca. 82% tiefer beginnen. Eine Zusammenfassung der ermittelten Werte ist in Tab. 5 dargestellt.

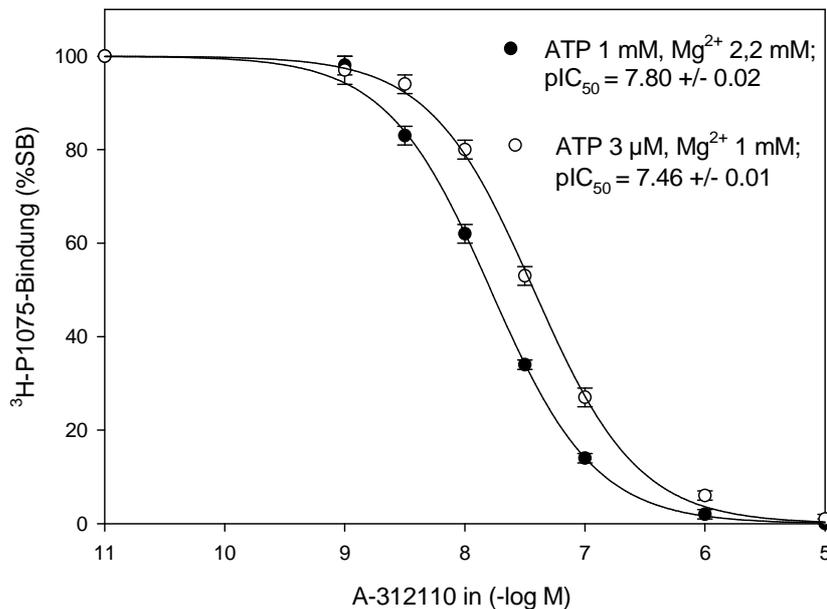


Abb. 18 Heterologe Verdrängung der ^3H -P1075 Bindung durch A-312110 an mit SUR2A permanent transfizierten HEK-Zellen.

Konzentrationen: 2,2 mM Mg^{2+} , 1 mM ATP (a) und 1 mM Mg^{2+} , 3 μM ATP (b). (a/b): $n = 4 / 4$; $L_0 = 2.98 \pm 0.06 / 2.93 \pm 0.04$ nM; $\text{PK} = 0.25 \pm 0.02 / 0.26 \pm 0.03$ mg/ml; $B_{\text{TOT}} = 122 \pm 22 / 31 \pm 3$ fmol/mg; $\text{SB} = 114 \pm 22 / 21 \pm 1$ fmol/mg; $\text{NSB} \sim 6\% / \sim 27\%$ von B_{TOT} .

Tab. 5 Heterologe Verdrängung der ^3H -P1075 Bindung durch A-312110 an mit SUR2A permanent transfizierten HEK-Zellen.

SUR	Radio-ligand	Komp.	MgATP, μM	pIC_{50}	pK_i	K_i , nM	n_H	ΔpK_i	f
SUR2A	^3H -P1075	A-312110	1000	7.80 ± 0.02	7.87 ± 0.02	14 [12, 15]	1.02 ± 0.04	0.35 ± 0.03	2.2 [1.9, 2.6]
SUR2A	^3H -P1075	A-312110	3	7.46 ± 0.01	7.52 ± 0.02	30 [28, 33]	1.06 ± 0.09		

Parametertabelle (Mittelwerte \pm SEM aus Einzelfits der logistischen Gleichung (Gleichung 21); [x, y], 95% Konfidenzintervall; Komp. = Kompetitor; $f = 10 \exp \Delta\text{pK}_D = K_{D, 0.003 \text{ mM}} / K_{D, 1 \text{ mM}}$)

3.2 ^3H -P1075-Verdrängungsmessungen in mit SUR2B transfizierten HEK-Zellmembranen

Eine weitere Isoform des Sulfonylharnstoffrezeptors stellt SUR2B, der in glatten Muskelzellen exprimiert wird (vgl. Kapitel 1.4.5), dar. In Kapitel 3.2 sollte, wie zuvor an SUR2A, die Affinität von A-312110 zum Rezeptor und die Stärke der allosterischen Kopplung zwischen Nukleotidbindung und der Bindungsstelle von A-312110 an SUR2B untersucht und mit derjenigen von P1075 verglichen werden.

3.2.1 Homologe Verdrängung der ^3H -P1075-Bindung an SUR2B

Die Kurven in Abb. 19 zeigen, in normierter Form, die gemittelten Hemmkurven von P1075. Für 2.2 mM Mg^{2+} , 1 mM ATP ergab sich ein mittlerer pK_D von 8.04 ± 0.03 (Tab. 6) und für 1 mM Mg^{2+} , 3 μM ATP ein pK_D von 7.75 ± 0.02 . Die entsprechenden K_D -Werte sind 9.1 [7.1, 11] nM und 18 [16, 20] nM. Die Rechtsverschiebung betrug $\Delta\text{pK}_D = 0.29 \pm 0.04$ mit einem f-Wert von 2.0 [1.6, 2.3]. In absoluten Einheiten (fmol/mg) würde die Kurve bei 3 μM ATP um ca. 78 % tiefer beginnen. Es ergab sich im student's t-test mit $p < 0.001$ ein hoch signifikanter Unterschied der pK_D Werte bei 1 mM beziehungsweise 3 μM ATP.

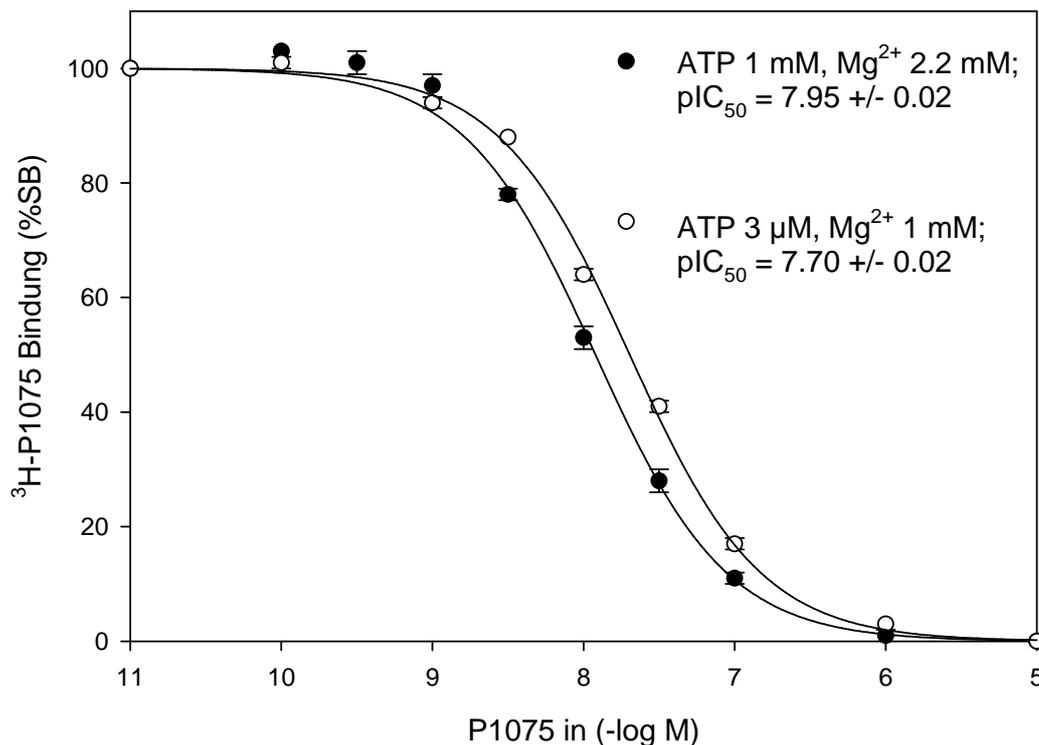


Abb. 19 Homologe Verdrängung der ^3H -P1075 Bindung an SUR2B in Membranen aus stabil transfizierten HEK-Zellen.

Konzentrationen: (a) 1 mM MgATP (a) und (b) 3 μM MgATP; freies Mg^{2+} war ≈ 1 mM, $n = 4 / 3$; $\text{PK} = 0.17 \pm 0.03 / 0.40 \pm 0.02$ mg/ml, $L_0 = 2.11 \pm 0.02 / 2.06 \pm 0.02$ nM; $B_{\text{TOT}} = 220 \pm 22 / 49 \pm 3$ fmol/mg, $\text{SB} = 202 \pm 21 / 44 \pm 3$ fmol/mg; $\text{NSB} \sim 6\% / \sim 12\%$ von B_{TOT}

Tab. 6 Homologe Verdrängung der ³H –P1075 Bindung aus SUR2B

SUR	Radio- ligand	Komp.	MgATP, μM	pIC ₅₀	pK _D	K _D , nM	n _H	ΔpK _D	f
SUR2B	³ H-P1075	P1075	1000	7.95± 0.02	8.04± 0.03	9.1 [7.1, 11]	1.00± 0.03	0.29±	2.0
SUR2B	³ H-P1075	P1075	3	7.70± 0.02	7.75± 0.02	18 [16, 20]	0.96± 0.03	0.04	[1.6, 2.3]

Parametertabelle (Mittelwerte ± SEM aus Einzelfits der logistischen Gleichung (Gleichung 21));
[x, y] , 95% Konfidenzintervall; Komp.= Kompetitor; $f = 10 \exp -\Delta pK_D = K_{D, 0.003 \text{ mM}} / K_{D, 1 \text{ mM}}$

3.2.2 Heterologe Verdrängung der ³H-P1075-Bindung mit A-312110 an SUR2B

Abb. 20 zeigt zwei gemittelte Hemmkurven, die eine unter Zugabe von 1 mM ATP mit einem pK_i von 7.75 ± 0.02 (K_i = 18 [16, 20] nM) , die andere bei einer Konzentration von 0.003 mM ATP mit pK_i = 7.65 ± 0.02 (K_i = 22 [20, 25] nM). In absoluten Einheiten (fmol/mg) würde die Kurve bei 3μM ATP um ca. 68 % tiefer beginnen. Bei einem Mg²⁺-ATP-shift der pK_i-Mittel von 0,10 ± 0,03 (siehe auch Tab. 7) ergab sich f = 1.3 [1.1, 1.4]. Der zweiseitige t-test für unpaarige Stichproben ergab mit p < 0,01 einen signifikanten Unterschied der beiden Stichproben.

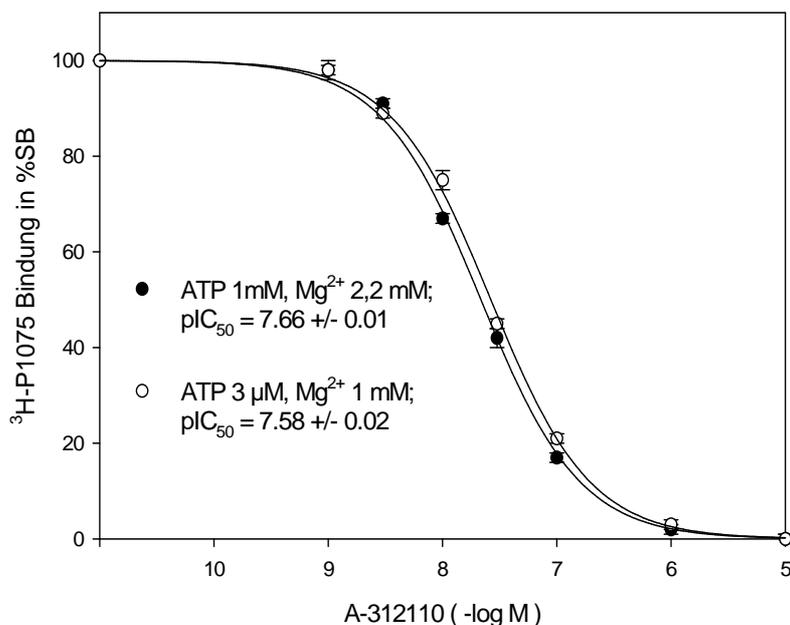


Abb. 20 Heterologe Verdrängung der ³H-P1075 Bindung durch A-312110 an mit SUR2B permanent transfizierten HEK-Zellen

Konzentrationen: 2,2 mM Mg²⁺, 1 mM ATP (a) und 1 mM Mg²⁺, 3 μM ATP (b). Die Daten sind Mittelwerte aus jeweils n = 4 Experimenten: (a/b): L₀ = 2.29 ± 0.28 / 2.76 ± 0.22 nM; PK = 0.26±0.03 / 0.32±0.02 mg/ml; B_{TOT} = 218 ± 12 / 77 ± 11 fmol/mg; SB = 214 ± 14 / 68 ± 10 fmol/mg; NSB ~ 5% / ~ 13% von B_{TOT}.

3 Ergebnisse

Tab. 7 Heterologe Verdrängung der ^3H -P1075-Bindung an SUR2B durch A-312110

SUR	Radio-ligand	Komp.	MgATP, μM	pIC_{50}	pK_i	K_i , nM	n_H	ΔpK_i	f
SUR2B	^3H -P1075	A-312110	1000	7.66 ± 0.01	7.75 ± 0.02	18 [16, 20]	1.07 ± 0.03	0.10 ± 0.03	1.3 [1.1, 1.4]
SUR2B	^3H -P1075	A-312110	3	7.58 ± 0.02	7.65 ± 0.02	22 [20, 25]	1.01 ± 0.02		

Parametertabelle (Mittelwerte aus Einzelfits der logistischen Gleichung (Gleichung 21))

[x, y], 95% Konfidenzintervall; Komp. = Kompetitor; $f = 10 \exp \Delta\text{pK}_D = K_{D, 0.003 \text{ mM}} / K_{D, 1 \text{ mM}}$

3.3 Messungen mit ^3H -GBC an mit SUR2A(Y1206S) transfizierten HEK-Zell membranen

Die Verwendung von ^3H -GBC als Radioligand bietet den Vorteil, dass MgATP auf null reduziert werden kann, da MgATP die GBC-Bindung hemmt. Die Affinität der SUR2-Subtypen zu GBC ist mit einer $K_D \sim 25\text{-}30 \text{ nM}$ (Hambrock et al., 2001; Stauß et al., in Vorbereitung), nicht hoch genug, um präzise Resultate bei Bindungsstudien erzielen zu können. Daher wurden Mutanten, bei denen Tyrosin in Position 1206 durch Serin, die korrespondierende Aminosäure im SUR1, ersetzt ist, entwickelt. Diese Mutation steigert die Affinität der SUR2-Subtypen für GBC um etwa das Zehnfache (Hambrock et al., 2001; Stauß et al., in Vorbereitung), führt aber nur zu einer geringen, weniger als 2-fachen Verminderung der Affinität der Öffner (Hambrock et al., 2001; Russ et al., 2003). Die gleichzeitige hochaffine Bindung von Sulfonylharnstoffen und K^+ -Kanal-Öffnern an die SUR2(Y1206S)-Subtypen erlaubt eine präzisere Analyse der Beziehung von Öffner- und Sulfonylharnstoffbindung als der SUR2 Wildtyp (Hambrock et al., 2001; Löffler-Walz et al., 2002).

In den folgenden Experimenten wird zunächst die K_D von ^3H -GBC an SUR2A(Y1206S) ermittelt. Dann folgt ein Vergleich der Bindungscharakteristika von P1075 und A-312110 in der heterologen Konkurrenz mit ^3H -GBC an SUR2A(Y1206S).

3.3.1 Sättigung der ^3H -GBC Bindung an HEK-Zellmembranen permanent transfiziert mit SUR2A(Y1206S)

Das Sättigungsexperiment führt bei der Bestimmung der K_D eines Liganden zu den genauesten Werten (siehe Kapitel 2.6.1). Wie in den vorangehenden Kapiteln wird diese K_D zur Korrektur der ermittelten IC_{50} -Werte der nachfolgenden heterologen Konkurrenzexperimente mit P1075 und A-312110 nach Cheng-Prusoff benötigt. Es wurden vier Sättigungsexperimente in der Gegenwart und drei in der Abwesenheit von MgATP durchgeführt. Dabei wurde den Ansätzen ohne MgATP der Komplexbildner 1 mM EDTA (Ethylendiamintetraacetat) zugefügt um kontaminierendes Mg^{2+} im Inkubationspuffer zu binden. Jedes Einzelexperiment wurde nach dem Massenwirkungsgesetz (MWG, siehe Gleichung 9) ausgewertet und eine K_D sowie ein B_{MAX} -Wert (maximale Bindungskapazität) ermittelt. Für die Abb. 21 wurden die Einzelversuche normiert, d.h. die spezifische Bindung wurde in $\%B_{MAX}$ des jeweiligen Experiments ausgedrückt.

Es ergaben sich in Anwesenheit von 1 mM ATP und 2.2 mM Mg^{2+} eine K_D von 6.6 [4.5, 10] nM ($pK_D = 8.17 \pm 0.09$), in Abwesenheit von Magnesium und ATP eine K_D von 5.6 [3.9, 8.1] nM ($pK_D = 8.25 \pm 0.08$). Die beiden pK_D -Werte (mit / ohne MgATP) waren nicht voneinander verschieden. Mit $p < 0.05$ ergab sich aber im zweiseitigen t-test für unpaarige Stichproben ein signifikanter Unterschied der B_{MAX} -Werte.

Die gemittelten Werte aus den Einzelexperimenten sind in der Tab. 8 angegeben.

3 Ergebnisse

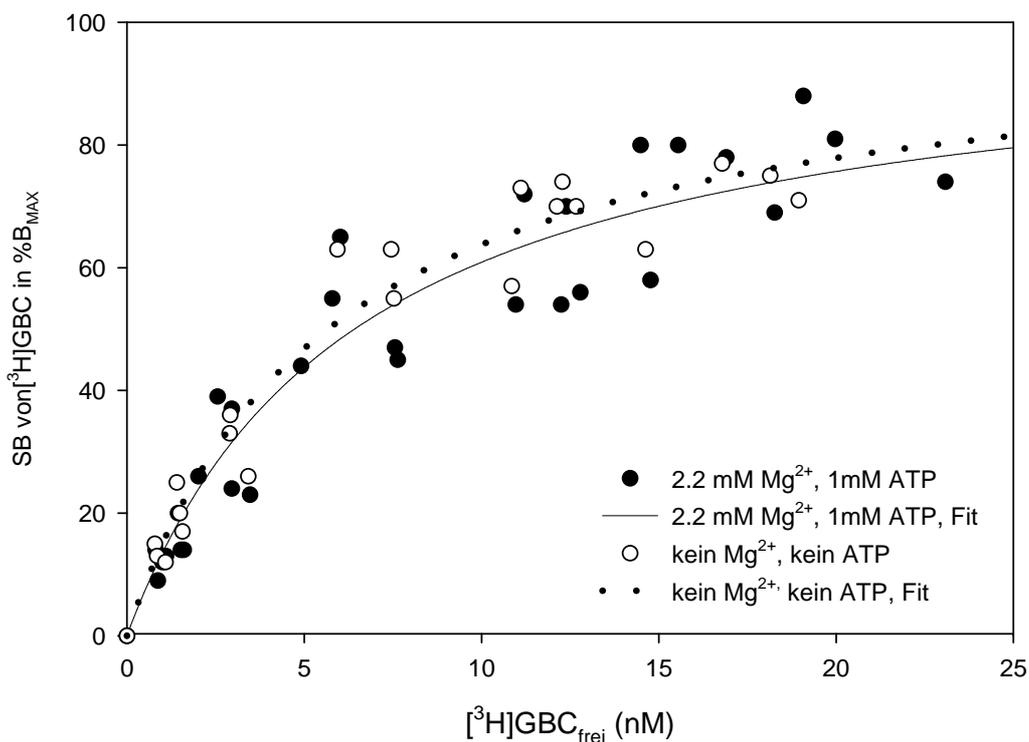


Abb. 21 ³H-GBC Sättigungsexperimente an HEK 293-Zellmembranen permanent transfiziert mit SUR2A(Y1206S)

Die Regressionskurven repräsentieren den Fit der Gleichung 9 an die zusammengefassten Daten der Einzelerperimente. Die Bedingungen waren: 2,2 mM Mg²⁺, 1 mM ATP (a) und Abwesenheit von Mg²⁺ und ATP (b): (a/b); n = 4 / 3; B_{MAX} = 626 ± 107 / 1144 ± 128 fmol/mg; PK = 0.26 ± 0.03 / 0.22 ± 0.01. Die NSB wurde in der Gegenwart von P1075 (100µM) ermittelt und stieg proportional zur Konzentration an freiem Label an:

NSB = 39 ± 2 / 53 ± 1 fmol/mg*x. Somit betrug die NSB bei 10 nM Labelkonzentration ~52% / 42% von B_{TOT}, bei Konzentrationen von L₀ = 20 nM betrug die NSB ~ 64% / 54% von B_{TOT}. Die SB wurde aus B_{TOT} – NSB errechnet und im Schaubild in %B_{MAX} angegeben. Die Versuche wurden von Cornelia Löffler-Walz durchgeführt und sind hier der systematischen Vollständigkeit wegen aufgeführt.

Tab. 8 ³H-GBC Sättigungsexperimente an HEK 293-Zellmembranen permanent transfiziert mit SUR2A(Y1206S)

SUR	Radio- ligand	MgATP, µM	K _D , nM	pK _D , -log M	B _{MAX} , fmol/mg
SUR2A(Y1206S)	³ H-GBC	1000	6.6 [4.5, 10]	8.17±0.09	626±107
SUR2A(Y1206S)	³ H-GBC	0	5.6 [3.9, 8.1]	8.25±0.08	1144±128

Parametertabelle (Mittelwerte aus Einzelfits ± SEM an das Massenwirkungsgesetz (Gleichung 9)); [x, y], 95% Konfidenzintervall

3.3.2 Heterologe Verdrängung der ³H-GBC-Bindung an SUR2A(Y1206S) mit P1075

Wie in der Einleitung dargelegt, liegen die Bindungsstellen für ³H-GBC und die Öffner auf verschiedenen Teilen des SUR. Es wurde gezeigt, dass die Öffner die ³H-GBC Bindung durch einen allosterischen Mechanismus hemmen. Die Darstellung in Abb. 22 zeigt dass, in Anwesenheit von 1mM ATP, P1075 die ³H-GBC Bindung an die SUR2A-Mutante mit einem biphasischen Kurvenverlauf hemmt. Die Hochaffinitätskomponente ist beschrieben durch einen $pK_{i,1} = 7.72 \pm 0.07$ ($K_{i,1} = 19 [14, 26]$ nM) und eine Amplitude von $A_1 = 63 \pm 2$ % der SB. Die niederaffine Komponente zeigt einen $pK_{i,2}$ von 5.82 ± 0.15 ($K_{i,2} = 1.5 [0.8, 3.0]$ μ M) mit einem Amplitudenanteil von 37 ± 2 % (siehe auch Tab. 9). In Abwesenheit von MgATP verschiebt sich die Bindungskurve bei einem pK_i von 5.66 ± 0.05 nach rechts ($K_i = 2.2 [1.7, 2.8]$ μ M) und verläuft mit $n_H = 0.89 \pm 0.05$ monophasisch. Entsprechend dem mono- bzw. biphasischen Kurvenverlauf erfolgte der in Abb. 22 dargestellte Fit nach Gleichung 21 bzw. Gleichung 22. Hierbei entspricht, wie am SUR2B(Y1206S) schon gezeigt (Hambrock et al., 2001; Löffler-Walz et al., 2002; Russ et al., 2003,) der $pK_{i,1}$ -Wert der Hochaffinitätskomponente bei Anwesenheit von MgATP dem pK_D der mit ³H-P1075 in der homologen Konkurrenz (Kapitel 3.1.1) erzielt wurde (t-test für unpaarige Stichproben). Der $pK_{i,2}$ der niederaffinen Bindungsstelle liegt im μ -molaren Bereich und ist statistisch vom pK_i der monophasischen Bindungskurve an SUR2A(Y1206S) bei Abwesenheit von MgATP nicht verschieden.

Um wie am nativen SUR2 einen ΔpK_i -Wert zu errechnen, wurde stellvertretend für den $K_D(K_i)$ -Wert bei 1mM MgATP an SUR2 der $pK_{i,1}$ -Wert der biphasischen Bindungskurve unter Anwesenheit von MgATP an SUR2A(Y1206S) herangezogen. Der pK_D -Wert bei 3 μ M MgATP am nativen SUR2 wurde an SUR2(Y1206S) ersetzt durch den pK_i in Abwesenheit von MgATP. Somit ergibt sich ein ΔpK_i -Wert von 2.0 ± 0.08 ($pK_{i,1} (+ \text{MgATP}) - pK_i (- \text{MgATP})$) und ein daraus resultierender f-Wert ($f = 10 \exp \Delta pK_i$) von 110 [76, 170]. Auch hier

3 Ergebnisse

wurde auf die normierte Darstellung zurückgegriffen. Die Bindungskurve unter Anwesenheit von 1 mM MgATP würde in absoluten Einheiten (fmol/mg) ~62% tiefer beginnen als die Kurve ohne Mg²⁺ und ATP.

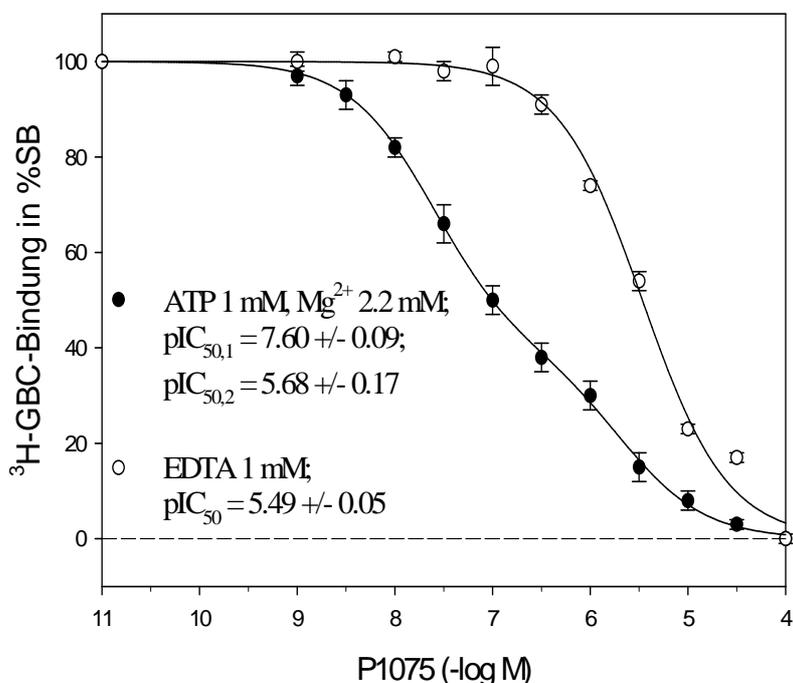


Abb. 22: Heterologe Verdrängung der ³H-GBC Bindung durch P1075 an mit SUR2A (Y1206S) permanent transfizierten HEK-Zellen.

Die Bedingungen waren: 2,2 mM Mg²⁺, 1 mM ATP (a) und EDTA 1 mM, 0 Mg²⁺, 0 ATP (b): (a/b); n = 4 / 5; L₀ = 2.51 ± 0.11 / 2.69 ± 0.10 nM; PK = 0.231 ± 0.03 / 0.20 ± 0.02 mg/ml; B_{TOT} = 197 ± 10 / 392 ± 12 fmol/mg; SB = 94 ± 6 / 247 ± 19 fmol/mg; NSB ~ 52% / ~ 37% von B_{TOT}, wobei die NSB bei 100µM P1075 bestimmt wurde. Die Versuche unter Anwesenheit von MgATP wurden von Eva Stauß und Cornelia Löffler-Walz durch-geführt.

Tab. 9 Heterologe Verdrängung der ³H-GBC Bindung durch P1075 an mit SUR2A(Y1206S) permanent transfizierten HEK-Zellen.

SUR	n _H	Mg ATP, µM	pIC _{50,1} , -log M	pIC _{50,2} , -log M	pK _{i,1} , -log M	K _{i,1} , nM	pK _{i,2} , -log M	K _{i,2} , µM	A ₁ , %SB	A ₂ , %SB	f
SUR2A (Y1206S)	--	1000	7.60± 0.09	5.68± 0.17	7.72± 0.07	19 [14, 26]	5.82± 0.15	1.5 [0.8, 3.0]	63± 2	37± 2	110 [76, 170]
SUR2A (Y1206S)	0.89± 0.05	0	--	5.49± 0.05	--	--	5.66± 0.05	2.2 [1.7, 2.8]	0	100	

Radioligand: ³H-GBC

Parametertabelle (Mittelwerte aus Einzelfits ± SEM der logistischen Gleichung (Gleichung 21 bzw. Gleichung 22)); [x, y], 95% Konfidenzintervall; f = 10 exp ΔpK_D

3.3.3 Heterologe Verdrängung der ^3H -GBC-Bindung an SUR2A(Y1206S) mit A-312110

In der Gegenwart von 1 mM MgATP zeigte A-312110 eine deutlich biphasische Inhibitionskurve. Wie aus Abb. 23 ersichtlich verdrängt A-312110 bei einer Konzentration von 100 μM geringfügig mehr ^3H -GBC als P1075 (NSB). Dieser kleine Effekt wurde vernachlässigt. Die Hochaffinitätskomponente schloss 69% der totalen Inhibition mit einem $\text{pK}_{i,1}$ -Wert von 8.09 ± 0.05 ein ($K_{i,1} = 8 [7, 10]$ nM). Die niederaffine Komponente ($A_2 = 31\%$) wies einen $\text{pK}_{i,2}$ -Wert von 5.52 ± 0.11 auf ($K_{i,2} = 3.0 [1.8, 3.9]$ μM). Mit der Abwesenheit von MgATP ergab sich eine Rechtsverschiebung der Bindungskurve. Nach Anpassung der Versuchsdaten an Gleichung 21 (Modell mit einer Bindungsstelle) fand man einen pK_i von 5.94 ± 0.02 ($K_i = 1.2 [1.1, 1.3]$ μM) bei einem Hill-Koeffizienten von 0.75 ± 0.04 und eine Amplitude von 100%. Der pK_i der monophasischen Bindungskurve (Abwesenheit von MgATP) war von dem $\text{pK}_{i,2}$ der biphasischen Bindungskurve (mit MgATP) statistisch signifikant ($p < 0.05$) verschieden. Es ergab sich ein ΔpK_i -Wert von 2.1 ± 0.07 mit einem resultierenden f-Wert von 140 [100, 190].

Ein $n_H < 1$ weist auf eine eventuelle Heterogenität der Bindungskurve hin (vergleiche Kapitel 2.6.3). Ein alternativer Fit nach Gleichung 22 (Modell mit zwei Bindungsstellen) ergab einen $\text{pK}_{i,1}$ -Wert von 6.45 ± 0.1 ($K_{i,1} = 360 [190, 680]$ nM) und einen $\text{pK}_{i,2} = 5.21 \pm 0.13$ ($K_{i,2} = 6.2 \mu\text{M} [3.4, 11]$), wobei die hochaffine Komponente $58 \pm 5\%$ der spezifischen Bindung überstrich, der niederaffine Anteil beanspruchte $42 \pm 5\%$ der SB.

Zum Vergleich der beiden Modelle wurde das Akaike-Kriterium (siehe Kapitel 2.8) herangezogen (Quast and Mählmann, 1982). Der Test zeigte, dass das Modell mit zwei Bindungsstellen leicht vorzuziehen war ($p < 0.05$).

Die Bindungskurve bei Anwesenheit von MgATP würde bei diesem Modell in absoluten Einheiten (fmol/mg) $\sim 52\%$ tiefer beginnen als die Kurve ohne Mg^{2+} und ATP.

3 Ergebnisse

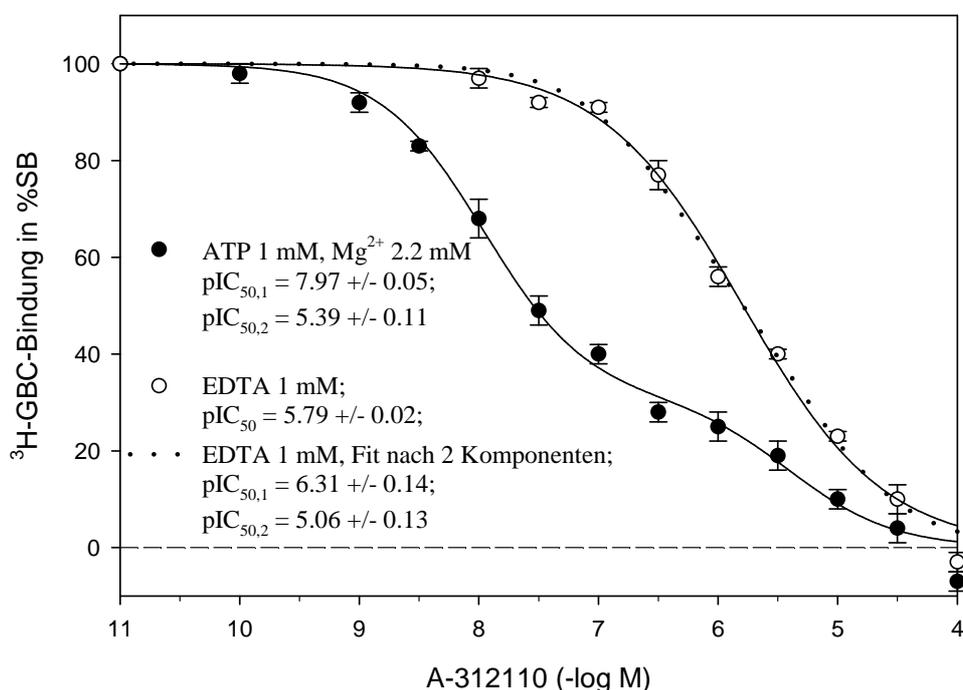


Abb. 23 Heterologe Verdrängung der ^3H -GBC Bindung durch A-312110 an mit SUR2A(Y1206S) permanent transfizierten HEK-Zellen.

Bei den Bindungskurven in Abwesenheit von MgATP repräsentiert die durchgezogene Linie das Modell mit einer Bindungsstelle (Gleichung 21), die punktierte Linie das Modell mit zwei Bindungsstellen (Gleichung 22). Die Bedingungen waren: 2,2 mM Mg^{2+} , 1 mM ATP (a) und 1 mM EDTA, 0 Mg^{2+} , 0 ATP (b): (a/b); $n = 5 / 4$; $L_0 = 2.26 \pm 0.04 / 2.28 \pm 0.07$ nM; $\text{PK} = 0.42 \pm 0.04 / 0.17 \pm 0.01$ mg/ml; $B_{\text{TOT}} = 174 \pm 16 / 324 \pm 20$ fmol/mg; $\text{SB} = 99 \pm 9 / 204 \pm 8$ fmol/mg; $\text{NSB} \sim 43\% / \sim 37\%$ von B_{TOT} , wobei die NSB bei 100 μM P1075 bestimmt wurde.

Tab. 10 Heterologe Verdrängung der ^3H -GBC Bindung durch A-312110 an mit SUR2A(Y1206S) permanent transfizierten HEK-Zellen.

SUR	n_H	Mg ATP, μM	$\text{pIC}_{50,1}$, -log M	$\text{pIC}_{50,2}$, -log M	$\text{pK}_{i,1}$, -log M	$K_{i,1}$, nM	$\text{pK}_{i,2}$, -logM	$K_{i,2}$, μM	A_1 , %SB	A_2 , %SB	f
SUR2A (Y1206S)	--	1000	7.97 ± 0.05	5.39 ± 0.11	8.09 ± 0.05	8 [7, 10]	5.52 ± 0.11	3.0 [1.8, 3.9]	69 ± 2	31 ± 2	140 [100, 190]
SUR2A (Y1206S) A	0.75 ± 0.04	0	--	5.79 ± 0.02	--	--	5.94 ± 0.02	1.2 [1.1, 1.3]	0	100	
SUR2A (Y1206S) B	1.0 (fix)	0	6.31 ± 0.14	5.06 ± 0.13	6.45 ± 0.14	360 [190, 680]	5.21 ± 0.13	6.2 [3.4, 11]	58 ± 5	42 ± 5	--

Radioligand: ^3H -GBC

A: Anpassung an Gleichung 21 (Modell mit einer Bindungsstelle).

B: Alternativer Fit nach 2 Komponenten (Gleichung 22, Modell mit zwei Bindungsstellen).

[x, y], 95% Konfidenzintervall; $f = 10 \exp \Delta \text{pK}_D$

3.4 ³H-GBC-Messungen in mit SUR2A(Y1206S) / Kir6.2 transient transfizierten HEK-Zellmembranen

An mit SUR2B(Y1206S) transfizierten Membranen wurde gezeigt, dass sich die Affinität des Rezeptors für ³H-GBC durch Koexpression mit Kir 6.2 nicht verändert. Auch die Affinität des Öffners P1075 für SUR2B(Y1206S) wurde durch die Koexpression nicht beeinflusst (Hambrock et al., 2001). Hier werden zunächst Sättigungsexperimente der ³H-GBC Bindung an SUR2A(Y12062S) / Kir 6.2 beschrieben und mit denen an SUR2A(Y12062S) allein verglichen. Im Anschluss folgt die heterologe Konkurrenz von ³H-GBC gegen A-312110.

3.4.1 Sättigung der ³H-GBC Bindung an HEK-Zellmembranen transient transfiziert mit SUR2A(Y1206S) / Kir 6.2

Die gemittelten Werte der Einzelversuche (SB in %B_{MAX}) sind in Abb.24 normiert dargestellt. In Anwesenheit von MgATP konnte eine K_D von 1.18 [0.86, 1.48] nM (pK_D = 8.94 ± 0.05), in Abwesenheit von Mg²⁺ und ATP eine K_D von 1.85 [1.05, 2.65] nM (pK_D = 8.76 ± 0.11) ermittelt werden. Die beiden pK_D-Werte, sowie die beiden B_{MAX}-Werte (mit / ohne MgATP) unterschieden sich statistisch nicht.

Tab. 11 fasst die ermittelten Werte zusammen.

3 Ergebnisse

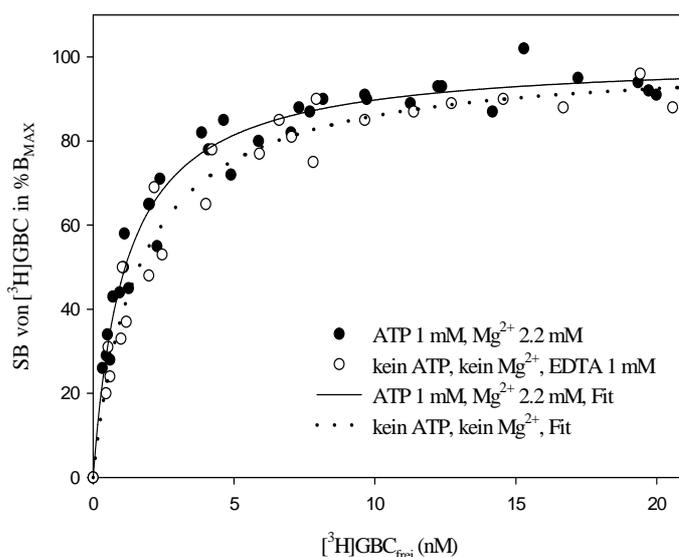


Abb.24 ³H-GBC Sättigungs-experimente an HEK 293-Zellmembranen transient transfiziert mit SUR2A(Y1206S) / Kir6.2

Die Kurven sind nach Gleichung 9 gefittet. Bedingungen: 2,2 mM Mg²⁺, 1 mM ATP (a) und Abwesenheit von Mg²⁺ und ATP (b): (a/b); n = 4 / 3; B_{MAX} = 569 ± 48 / 772 ± 102 fmol/mg; PK = 0.19 ± 0.02 / 0.2 ± 0.03; NSB (P1075 100µM) = 32 ± 2 / 30 ± 0 fmol/mg*x. Bei L₀ = 5 nM betrug die NSB ~26% / 22% von B_{TOT}, bei L₀ = 10 nM wurde eine NSB von ~39% / 32% der B_{TOT} bei L₀ = 20 nM eine NSB von ~55% / 47% ermittelt.

Tab. 11 ³H-GBC Sättigungsexperimente an HEK 293-Zellmembranen transient transfiziert mit SUR2A(Y1206S) / Kir6.2

SUR	Radioligand	MgATP, µM	K _D , nM	pK _D , -log M	B _{MAX} , fmol/mg
SUR2A(Y1206S) / Kir6.2	³ H-GBC	1000	1.18 [0.86, 1.48]	8.94±0.05	569±48
SUR2A(Y1206S) / Kir6.2	³ H-GBC	0	1.85 [1.05, 2.65]	8.76±0.11	772±102

Parametertabelle (Mittelwerte ± SEM aus Einzelfits an das Massenwirkungsgesetz (Gleichung 9)); [x, y], 95% Konfidenzintervall.

3.4.2 Heterologe Verdrängung der ³H-GBC-Bindung von SUR2A(Y1206S) / Kir6.2 mit A-312110

Auch bei der Koexpression von SUR2A(Y1206S) und Kir6.2 zeigte sich bei Anwesenheit von MgATP (1mM) eine biphasische Hemmkurve für A-312110. Die Hochaffinitätskomponente (A₁) der Bindungskurve überstrich 71% der totalen Inhibition, während die niederaffine Komponente A₂ einen Anteil von 29% der SB inne hatte. Der pK_{i,1}-Wert der hochaffinen Bindungsstelle betrug 7.50 ± 0.05 (K_{i,1} = 32 [25, 40] nM) während die niederaffine Bindungsstelle einen pK_{i,2}-Wert von 5.55 ± 0.15 (K_{i,2} = 2.8 [1.4, 5.6] µM) aufwies. In Abwesenheit von MgATP ergab sich eine monophasische Bindungskurve mit einem pK_i von 5.83 ± 0.03 (K_i = 1.5 [1.3, 1.7] µM). Dabei fand man einem Hill-

Koeffizienten von 1.05 ± 0.06 und eine Amplitude von 100% (siehe Abb. 25, Tab. 12). Der pK_i der monophasischen Bindungskurve (Abwesenheit von MgATP) war von dem $pK_{i,2}$ der biphasischen Bindungskurve (mit MgATP) im t-test für unpaare Stichproben nicht verschieden. Es ergaben sich ein ΔpK_i -Wert von 1.7 ± 0.06 ($pK_{i,1}$ mit MgATP - pK_i ohne MgATP) und ein f-Wert von 47 [35, 62].

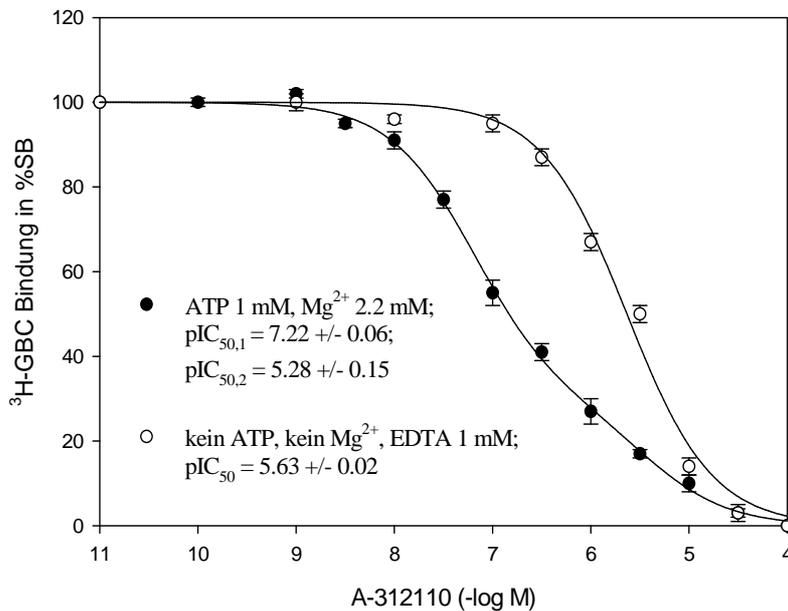


Abb. 25 Heterologe Verdrängung der ³H-GBC Bindung durch A-312110 an mit SUR2A (Y1206S) / Kir6.2 transient transfizierten HEK-Zellen.

Konzentrationen: 2,2 mM Mg²⁺, 1 mM ATP (a) und 1 mM EDTA, 0 Mg²⁺, 0 ATP (b): (a/b); n = 5 / 3; L₀ = 1.04 ± 0.05 / 1.07 ± 0.06 nM; PK = 0.07 ± 0.00 / 0.13 ± 0.01; B_{TOT} = 462 ± 36 / 367 ± 17 fmol/mg; SB = 364 ± 34 / 179 ± 9 fmol/mg; NSB ~ 20% / ~ 51% von B_{TOT}, wobei die NSB bei 100µM P1075 bestimmt wurde. Entsprechend dem mono- bzw. bi-phasischen Kurvenverlauf erfolgte der Fit nach Gleichung 21 bzw. Gleichung 22.

Tab. 12 Heterologe Verdrängung der ³H-GBC Bindung durch A-312110 an mit SUR2A(Y1206S) / Kir6.2 transient transfizierten HEK-Zellen.

SUR	n _H	Mg ATP, µM	pIC _{50,1} , -log M	pIC _{50,2} , -log M	pK _{i,1} , -log M	K _{i,1} , nM	pK _{i,2} , -log M	K _{i,2} , µM	A ₁ , %SB	A ₂ , %SB	f
SUR2A (Y1206S) / Kir6.2	--	1000	7.22± 0.06	5.28± 0.15	7.50± 0.05	32 [25, 40]	5.55± 0.15	2.8 [14, 5.6]	71± 6	29± 6	47 [35, 62]
SUR2A (Y1206S) / Kir6.2	1.05± 0.06	0	--	5.63± 0.02	--	--	5.83± 0.03	1.5 [1.3, 1.7]	0	100	

Radioligand: ³H-GBC

Parametertabelle (Mittelwerte ± SEM aus Einzelfits der logistischen Gleichung (Gleichung 21 bzw. Gleichung 22)); [x, y], 95% Konfidenzintervall; f = 10 exp ΔpK_i

3.5 $^3\text{H-GBC}$ -Messungen in mit SUR2B(Y1206S) transfizierten HEK-Zellmembranen

In diesem Kapitel werden, wie in den vorangehenden, als Grundlage für die nachfolgende homologe bzw. heterologe Kompetition wurden zunächst, wie zuvor bei SUR2A(Y1206S) und der Koexpression mit Kir6.2, Sättigungsexperimente zur Ermittlung der K_D des Radioliganden ($^3\text{H-GBC}$) an SUR2B(Y1206S) beschrieben.

3.5.1 Sättigung der $^3\text{H-GBC}$ Bindung an HEK-Zellmembranen permanent transfiziert mit SUR2B(Y1206S)

Abb. 26 zeigt eine normierte Darstellung der gemittelten Einzelversuche (SB in % B_{MAX}). In Anwesenheit von 1mM ATP und 2.2mM Mg^{2+} konnte eine K_D von 3.9 [3.0, 4.8] nM ($pK_D = 8.42 \pm 0.05$), in Abwesenheit von Mg^{2+} und ATP eine K_D von 4.1 [3.0, 5.6] nM ($pK_D = 8.39 \pm 0.07$) ermittelt werden. Die beiden pK_D -Werte waren nicht verschieden. Da sich die Standardabweichungen der B_{MAX} -Werte unter An- bzw. Abwesenheit von MgATP im F-Test signifikant unterschieden, wurde hier ein modifizierter t-test (t-test für unpaarige Stichproben mit Welch-Korrektur) angewandt, der Stichproben mit unterschiedlicher Standardabweichung voraussetzt. Dabei ergab sich ein signifikanter Unterschied der B_{MAX} -Werte an SUR2B(Y1206S) mit bzw. ohne MgATP. Tab. 13 gibt eine Übersicht über die gemittelten Werte aus den Einzelexperimenten.

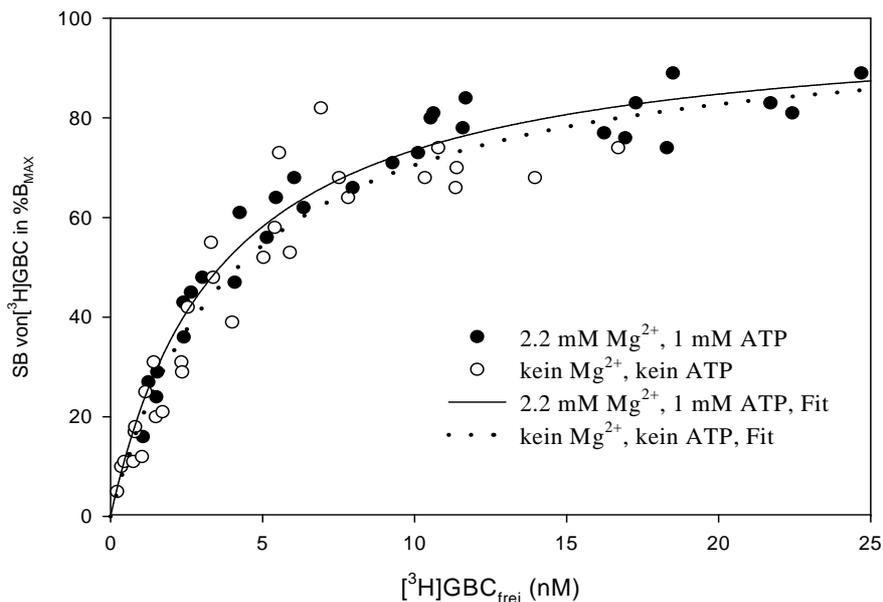


Abb. 26 ^3H -GBC Sättigungsexperimente an HEK 293-Zellmembranen permanent transfiziert mit SUR2B(Y1206S)

Die Regressionskurven repräsentieren den Fit der Gleichung 9 an die zusammengefassten Daten der Einzelerperimente. Die Bedingungen waren: 2,2 mM Mg^{2+} , 1 mM ATP (a) und Abwesenheit von Mg^{2+} und ATP (b): (a/b); $n = 4 / 4$; $B_{\text{MAX}} = 350 \pm 29 / 1150 \pm 176$ fmol/mg; $\text{PK} = 0.22 \pm 0.03 / 0.21 \pm 0.01$; NSB (P1075 100 μM) = $37 \pm 2 / 60 \pm 7$ fmol/mg $\cdot x$. Bei $L_0 = 10$ nM betrug die NSB $\sim 57\% / 43\%$ von B_{TOT} , bei $L_0 = 20$ nM wurde eine NSB von $\sim 69\% / 56\%$ der B_{TOT} ermittelt. Die Versuche wurden von Cornelia Löffler-Walz durchgeführt und sind hier der systematischen Vollständigkeit halber aufgeführt.

Tab. 13 ^3H -GBC Sättigungsexperimente an HEK 293-Zellmembranen permanent transfiziert mit SUR2B(Y1206S)

SUR	Radio-ligand	MgATP, μM	K_D , nM	$\text{p}K_D$	B_{MAX} , fmol/mg
SUR2B(Y1206S)	^3H -GBC	1000	3.9 [3.0, 4.8]	8.42 ± 0.05	350 ± 29
SUR2B(Y1206S)	^3H -GBC	0	4.1 [3.0, 5.6]	8.39 ± 0.07	1150 ± 176

Parametertabelle (Mittelwerte \pm SEM aus Einzelfits an das Massenwirkungsgesetz (Gleichung 9)); [x, y], 95% Konfidenzintervall

3.5.2 Heterologe Verdrängung der ^3H -GBC-Bindung von SUR2B(Y1206S) mit P1075

Die Darstellung in Abb. 27 zeigt, dass die Hemmung der ^3H -GBC Bindung an SUR2B(Y1206S) durch P1075 in Anwesenheit von 1 mM ATP einen biphasischen Kurvenverlauf mit $\text{p}K_{i,1} = 8.23 \pm 0.11$ ($K_{i,1} = 5.9$ [3.5, 9.8] nM) und $\text{p}K_{i,2} = 6.15 \pm 0.08$ ($K_{i,2} = 710$ [490, 1000] nM) aufweist. Dabei überstreicht die

3 Ergebnisse

Hochaffinitätskomponente $46 \pm 4 \%$, die niederaffine Komponente $55 \pm 4\%$ der Kurvenamplitude. In Abwesenheit von MgATP zeigt die nun monophasische Bindungskurve einen $pK_i = 5.92 \pm 0.02$ ($K_i = 1.2 [1.1, 1.3] \mu\text{M}$) mit $n_H = 1.12 \pm 0.1$ bei kompletter Inhibition ($A = 100\%$) der spezifischen $^3\text{H-GBC}$ Bindung. Der $pK_{i,2}$ der niederaffinen Bindungsstelle ist statistisch vom pK_i der monophasischen Bindungskurve an SUR2B(Y1206S) bei Abwesenheit von MgATP nicht verschieden. Es fand sich dabei ein $\Delta pK_i = 2.3 \pm 0.11$ und ein f-Wert von 200 [120, 340]. Die Bindungskurve bei Anwesenheit von MgATP würde in absoluten Einheiten (fmol/mg) $\sim 21\%$ tiefer beginnen als die Kurve ohne Mg^{2+} und ATP. Die geringe Differenz zwischen der totalen Bindung mit bzw. ohne MgATP erklärt sich dabei aus dem deutlichen Unterschied der gewählten $^3\text{H-GBC}$ Konzentrationen (vergleiche Legende Abb. 27).

Eine Zusammenfassung der ermittelten Werte zeigt Tab. 14.

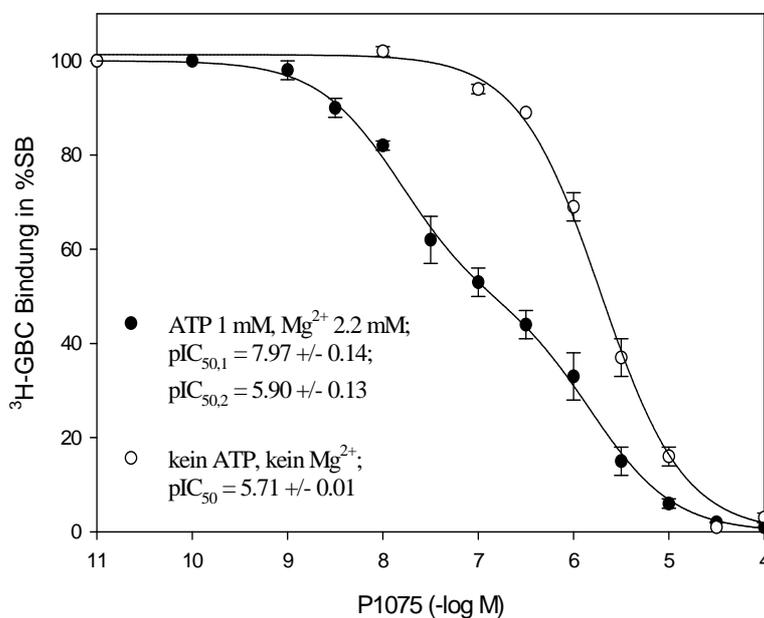


Abb. 27 Heterologe Verdrängung der $^3\text{H-GBC}$ Bindung durch P1075 an mit SUR2B (Y1206S) permanent transfizierten HEK-Zellen.

Bedingungen: 2,2 mM Mg^{2+} , 1 mM ATP (a) und 1 mM EDTA, 0 Mg^{2+} , 0 ATP (b): (a/b); $n = 6 / 3$; $L_0 = 3.46 \pm 1.1 / 2.47 \pm 0.15$ nM; $PK = 0.2 \pm 0.04 / 0.17 \pm 0.09$; $B_{TOT} = 434 \pm 55 / 506 \pm 13$ fmol/mg; $SB = 236 \pm 36 / 300 \pm 23$ fmol/mg; $NSB \sim 46\% / \sim 41\%$ von B_{TOT} , wobei die NSB bei $100\mu\text{M}$ P1075 bestimmt wurde. Entsprechend dem mono- bzw. biphasischen Kurvenverlauf erfolgte der Fit nach Gleichung 21 bzw. Gleichung 22. Die Versuche wurden von Cornelia Löffler-Walz durchgeführt.

Tab. 14 Heterologe Verdrängung der ³H-GBC Bindung durch P1075 an mit SUR2B(Y1206S) permanent transfizierten HEK-Zellen.

SUR	n _H	Mg ATP, μM	pIC _{50,1} , -log M	pIC _{50,2} , -log M	pK _{i,1} , -log M	K _{i,1} , nM	pK _{i,2} , -log M	K _{i,2} , μM	A ₁ , %SB	A ₂ , %SB	f
SUR2B (Y1206S)	--	1000	7.97±0.14	5.90±0.13	8.23±0.11	5.9 [3.5, 9.8]	6.15±0.08	0.71 [0.49, 1]	46±4	55±4	200 [120, 340]
SUR2B (Y1206S)	1.12±0.10	0	--	5.71±0.01	--	--	5.92±0.02	1.2 [1.1, 1.3]	0	100	
Radioligand: ³ H-GBC											

Parametertabelle (Mittelwerte aus Einzelfits der logistischen Gleichung (Gleichung 21 bzw. Gleichung 22)); [x, y], 95% Konfidenzintervall; f = 10 exp ΔpK_D

3.5.3 Heterologe Verdrängung der ³H-GBC-Bindung an SUR2B(Y1206S) mit A-312110

In Gegenwart von MgATP war auch die A-312110 Hemmkurve biphasisch

Die Hochaffinitätskomponente der normierten Bindungskurve schloss 42% der totalen Inhibition mit einem pK_{i,1}-Wert von 7.39 ± 0.05 ein (K_{i,1} = 12 [9, 15] nM). Die niederaffine Komponente (55%) wies einen pK_{i,2}-Wert von 6.07 ± 0.08 (K_{i,2} = 850 [600, 1200] nM) auf. In Abwesenheit von MgATP ergab sich eine Rechtsverschiebung der Bindungskurve (Abb. 28). Nach Anpassung der Versuchsdaten an Gleichung 21 (Modell mit einer Bindungsstelle) fand man einen pK_i von 6.08 ± 0.04 (K_i = 830 [690, 1000] nM) bei einem n_H von 0.92 ± 0.05 und einer Amplitude von 100%. Der pK_{i,2} der niederaffinen Bindungsstelle war statistisch vom pK_i der monophasischen Bindungskurve an SUR2B(Y1206S) bei Abwesenheit von MgATP nicht verschieden. Der ΔpK_i-Wert betrug 1.9 ± 0.06, sein korrespondierender f-Wert ergab sich zu 71 [54, 93]. Die Bindungskurve bei Anwesenheit von MgATP würde in absoluten Einheiten (fmol/mg) ~66% tiefer beginnen als die Kurve ohne MgATP.

Tab. 15 bietet eine Übersicht über die gemittelten Werte der Einzelerperimente.

3 Ergebnisse

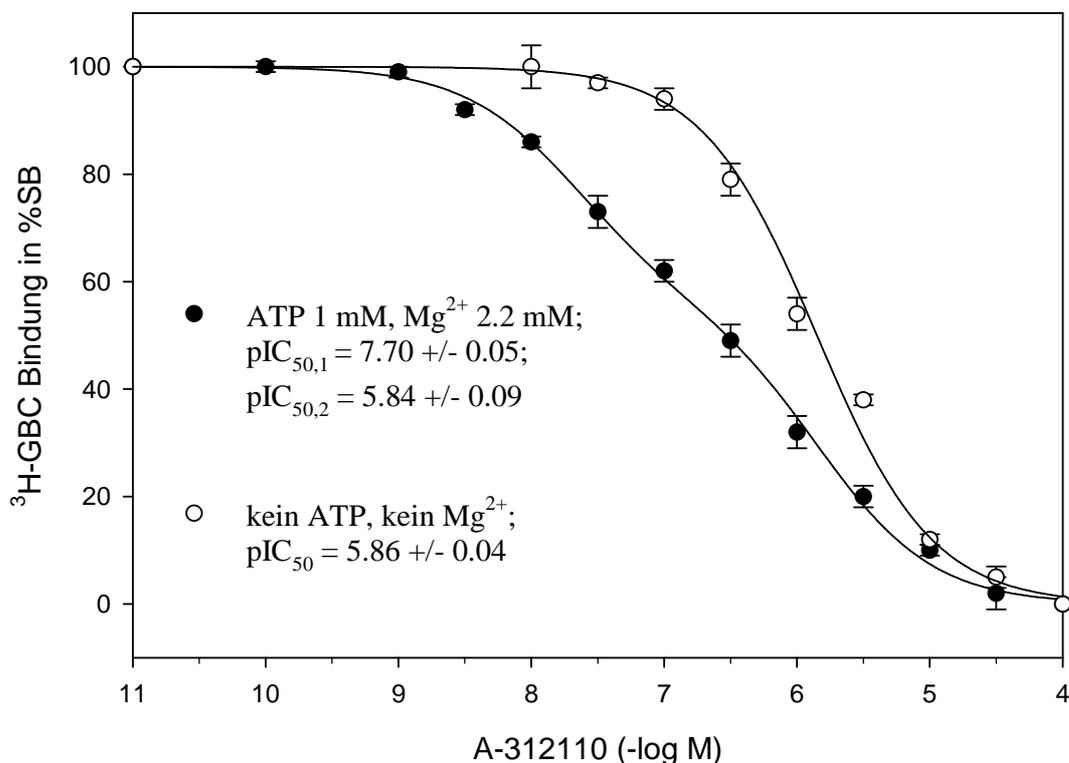


Abb. 28 Heterologe Verdrängung der $^3\text{H-GBC}$ Bindung durch A-312110 an mit SUR2B(Y1206S) permanent transfizierten HEK-Zellen.

Konzentrationen: 2,2 mM Mg^{2+} , 1 mM ATP (a) und 1 mM EDTA, 0 Mg^{2+} , 0 ATP (b); (a/b); $n = 5 / 4$; $L_0 = 2.72 \pm 0.07 / 2.72 \pm 0.11$ nM; $\text{PK} = 0.38 \pm 0.02 / 0.19 \pm 0.01$; $B_{\text{TOT}} = 220 \pm 17 / 552 \pm 25$ fmol/mg; $\text{SB} = 127 \pm 14 / 370 \pm 15$ fmol/mg; $\text{NSB} \sim 42\% / \sim 33\%$ von B_{TOT} , wobei die NSB bei 100 μM P1075 bestimmt wurde. Entsprechend dem mono- bzw. biphasischen Kurvenverlauf erfolgte der Fit nach Gleichung 21 bzw. Gleichung 22

Tab. 15 Heterologe Verdrängung der $^3\text{H-GBC}$ Bindung durch A-312110 an mit SUR2B(Y1206S) permanent transfizierten HEK-Zellen.

SUR	n_H	Mg-ATP, μM	$\text{pIC}_{50,1}$, -log M	$\text{pIC}_{50,2}$, -log M	$\text{pK}_{i,1}$, -log M	$K_{i,1}$, nM	$\text{pK}_{i,2}$, -log M	$K_{i,2}$, nM	A_1 , %SB	A_2 , %SB	f
SUR2B (Y1206S)	--	1000	7.70 ± 0.05	5.84 ± 0.09	7.93 ± 0.05	12 [9, 15]	6.07 ± 0.08	850 [600, 1200]	42 ± 5	55 ± 6	71 [54, 93]
SUR2B (Y1206S)	0.92 ± 0.05	0	--	5.86 ± 0.04	--	--	6.08 ± 0.04	830 [690, 1000]	0	100	
Radioligand: $^3\text{H-GBC}$											

Parametertabelle (Mittelwerte aus Einzelfits der logistischen Gleichung (Gleichung 21 bzw. Gleichung 22)); [x, y], 95% Konfidenzintervall; $f = 10 \exp \Delta \text{pK}_D$

3.6 ^3H -GBC-Messungen an mit SUR1w.t. transfizierten HEK-Zellmembranen

Der SUR1w.t. zeigt eine hohe Affinität für Sulfonylharnstoffe wie GBC, seine Affinität für K^+ -Kanalöffner ist jedoch gering (Schwanstecher et al., 1998; Dörschner et al., 1999; Hambrock et al., 1999; Russ et al., 2001). ATP bindet am SUR1 an eine andere Bindungsstelle als GBC und verringert dadurch, anders als beim SUR2, die Affinität des Rezeptors für Glibenclamid (Schwanstecher et al., 1991; Schwanstecher et al., 1992; Miyamura et al., 2000; Hambrock et al., 2002). Wie in den vorhergehenden Kapiteln zum SUR2A-Rezeptor wurden zunächst Sättigungsexperimente mit ^3H -GBC durchgeführt, danach folgten Konkurrenzexperimente mit den Öffnern P1075 und A-312110.

3.6.1 Sättigung der ^3H -GBC Bindung an HEK-Zellmembranen permanent transfiziert mit SUR1w.t.

Die normierten und dann gemittelten Werte der Einzelversuche sind in Abb. 29 dargestellt (SB in $\%B_{\text{MAX}}$). In Anwesenheit von 1mM ATP und 2.2mM Mg^{2+} konnte eine K_{D} von 5.2 [3.6, 7.6] nM ($\text{p}K_{\text{D}} = 8.28 \pm 0.08$) ermittelt werden. Bei Abwesenheit von Mg^{2+} und ATP verringerte sich die K_{D} auf 880 [740, 1100] pM ($\text{p}K_{\text{D}} = 9.05 \pm 0.04$). Der zweiseitige t-test für unpaarige Stichproben (mit / ohne MgATP) ergab einen hochsignifikanten Unterschied der beiden $\text{p}K_{\text{D}}$ -Werte ($p < 0.0001$) während die B_{MAX} -Werte nicht verschieden waren. Die Standardabweichungen der jeweiligen Stichproben waren nicht voneinander verschieden (F-Test). Der Test nach Kolmogorov und Smirnov ergab eine Gaußsche Verteilung der Werte. Tab. 16 fasst die Ergebnisse der Sättigungsexperimente an SUR1w.t. zusammen.

3 Ergebnisse

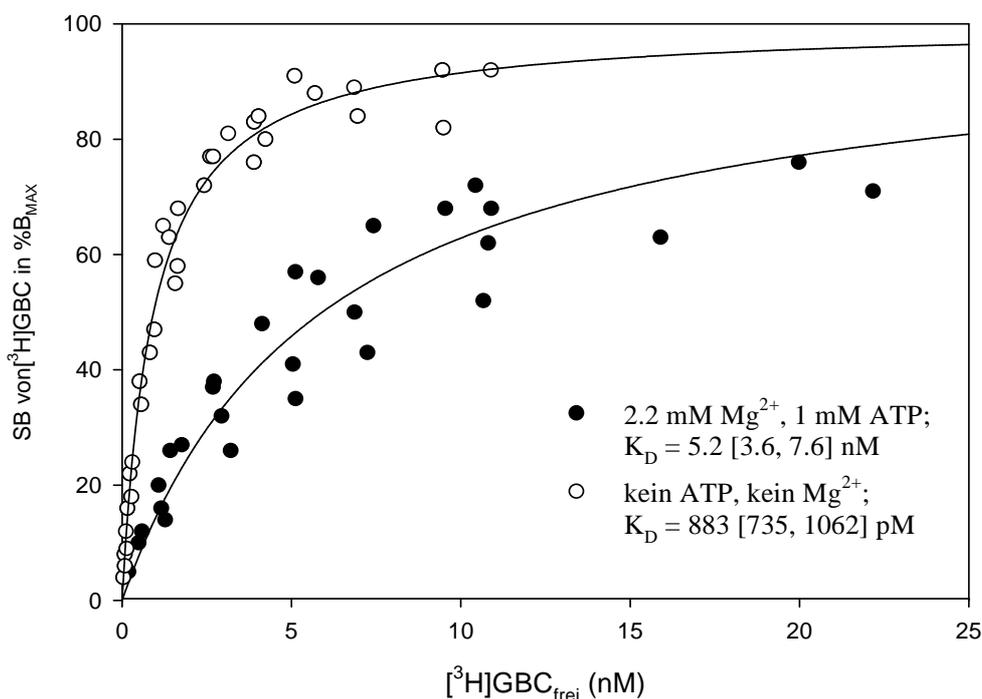


Abb. 29 ³H-GBC Sättigungsexperimente an HEK 293-Zellmembranen permanent transfiziert mit SUR1w.t.

Die Regressionskurven repräsentieren den Fit der Gleichung 9 an die zusammengefassten Daten der Einzelerperimente. Die Bedingungen waren: 2,2 mM Mg²⁺, 1 mM ATP (a) und Abwesenheit von Mg²⁺ und ATP (b): (a/b); n = 5 / 5; B_{MAX} = 2521 ± 156 / 2915 ± 341 fmol/mg; PK = 0.15 ± 0.02 / 0.1 ± 0.01; NSB (P1075 100µM) = 34 ± 4 / 57 ± 10 fmol/mg*x. Bei L₀ = 5 nM betrug die NSB ~13% / 11% von B_{TOT}, bei L₀ = 10 nM wurde eine NSB von ~18% / 18% der B_{TOT} bei L₀ = 20 nM eine NSB von ~27% / 30% ermittelt. Die Versuche wurden von Cornelia Löffler-Walz durchgeführt.

Tab. 16 ³H-GBC Sättigungsexperimente an HEK 293-Zellmembranen permanent transfiziert mit SUR1w.t.

SUR	Radio-ligand	MgATP, µM	K _D , nM	pK _D	B _{MAX} , fmol/mg
SUR1w.t.	³ H-GBC	1000	5.2 [3.6, 7.6]	8.28±0.08	2521±156
SUR1w.t.	³ H-GBC	0	0.88 [0.74, 1.1]	9.05±0.04	2915±341

Parametertabelle (Mittelwerte aus Einzelfits an das Massenwirkungsgesetz (Gleichung 9)) [x, y], 95% Konfidenzintervall

3.6.2 Heterologe Verdrängung der ³H-GBC-Bindung an SUR 1w.t. mit P1075

P1075 war in der Lage bei einer Konzentration von 300 µM unter Anwesenheit von MgATP ~32% der spezifischen Bindung von ³H-GBC an SUR1w.t. zu

verdrängen, bei Abwesenheit von Mg^{2+} und ATP waren es nur 7% der SB (Abb. 30). Höhere Konzentrationen an P1075 konnten nicht untersucht werden, da der Ligand bei $c > 300\mu M$ seine Löslichkeitsgrenze erreichte und begann auszuflocken. Aus diesem Grund ist es mit dieser Versuchsanordnung unmöglich eine Dissoziationskonstante für P1075 an SUR1w.t. zu ermitteln. Allerdings ist offensichtlich, dass die Affinität des Öffners P1075 zum SUR1w.t. sehr gering sein muss.

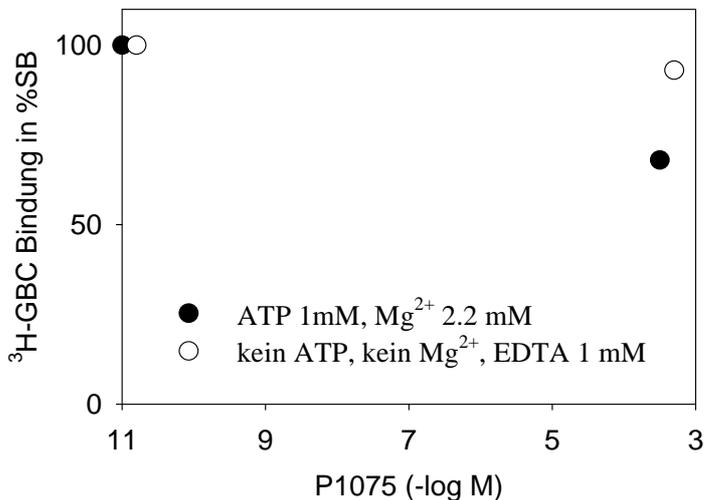


Abb. 30 Heterologe Verdrängung der 3H -GBC Bindung durch P1075 an mit SUR1w.t. permanent transfizierten HEK-Zellen.

.Die Bedingungen waren: 2,2 mM Mg^{2+} , 1 mM ATP (a) und Abwesenheit von Mg^{2+} und ATP (b): (a/b); $n = 2 / 1$; Konzentration des Radioliganden (L_0) = 1.22 / 1.30 nM; Proteinkonzentration (PK) = 0.06 / 0.03 mg/ml; Totale Bindung (B_{TOT}) = 781 / 2248 fmol/mg; SB = 675 / 2044 fmol/mg; Nichtspezifische Bindung (NSB) = ~14% / 9% von B_{TOT} . Die Messpunkte wurden jeweils (mit / ohne Mg^{2+}) bei 0 bzw. 300 μM P1075 bestimmt und sind zur besseren Darstellung leicht versetzt.

3.6.3 Heterologe Verdrängung der 3H -GBC-Bindung an SUR1w.t. mit A-312110

Auch A-312110 ließ einen erwähnenswerten Verdrängungseffekt an SUR1w.t. vermissen. Bei Anwesenheit von Magnesium und ATP betrug die Verdrängung bei 300 μM A-312110 ~16% der spezifischen Bindung, während ohne Mg^{2+} überhaupt kein Verdrängungseffekt zu beobachten war (Abb. 31). Höhere Konzentrationen A-312110 konnten, wie bei P1075, wegen des Überschreitens

3 Ergebnisse

der Löslichkeitsgrenze nicht untersucht werden. Überraschenderweise fand sich bei einer 300µM Konzentration von A-312110 ein Anstieg der NSB (P1075, 100µM) um ~34% von B_{TOT} mit MgATP bzw. um ~20% von B_{TOT} ohne MgATP im Vergleich zum NSB ohne A-312110 im Versuchsansatz.

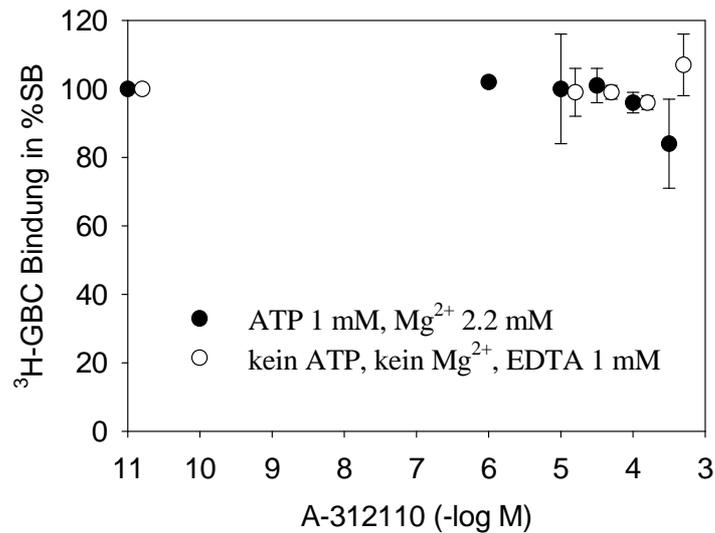


Abb. 31 Heterologe Verdrängung der ³H-GBC Bindung durch A-312110 an mit SUR1w.t. permanent transfizierten HEK-Zellen.

Bedingungen : 2,2 mM Mg²⁺, 1 mM ATP (a) und Abwesenheit von Mg²⁺ und ATP (b): (a/b); n = 3 / 3; Konzentration des Radioliganden (L_0) = 1.07 ± 0.03 / 0.52 ± 0.01 nM; PK = 0.06 / 0.03 mg/ml; B_{TOT} = 448 ± 33 / 720 ± 36 fmol/mg; SB = 360 ± 29 / 610 ± 36 fmol/mg; NSB (100 µM P1075) ~20% / 16% von B_{TOT} ; NSB (100µM P1075 in 300µM A-312110) ~54% / ~36% von B_{TOT} . Die Messpunkte (mit / ohne MgATP) sind der Darstellung halber leicht versetzt, wurden aber bei jeweils gleichen Konzentrationen von A-312110 gemessen

3.7 Zusammenfassung der Ergebnisse

Übersichtstabelle I: Sättigungsexperimente mit ^3H -Glibenclamid an den SUR-Subtypen.

Rezeptor	Mg^{2+} 2.2 mM, ATP 1mM		kein ATP, kein Mg^{2+} , EDTA 1 mM	
	K_D , nM	B_{MAX} , fmol / mg	K_D , nM	B_{MAX} , fmol / mg
SUR1	5.2 [3.6, 7.6]	2521 \pm 156	0.88 [0.74, 1.1]	2915 \pm 341
SUR2A(YS)	6.6 [4.5, 10] ¹	626 \pm 107	5.6 [3.9, 8.1] ²	1144 \pm 128
SUR2A(YS) / Kir6.2	1.18 [0.86, 1.48] ¹	569 \pm 48	1.85 [1.05, 2.65] ²	772 \pm 102
SUR2B(YS)	3.9 [3.0, 4.8]	350 \pm 29	4.1 [3.0, 5.6]	1150 \pm 176

Die grau unterlegten Felder weisen auf einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Parametern mit und ohne MgATP, gemessen an demselben SUR-Subtyp, hin.

^{1,2} Statistisch signifikanter Unterschied der K_D -Werte der Koexpression im Vergleich zu SUR2A(Y1206S) allein. Diese Werte stehen im Gegensatz zu früheren Beobachtungen an SUR2B(Y1206S) (Hambrock et al., 2001).

Übersichtstabelle II: **Kompetitionsexperimente mit P1075 und A-312110 an den SUR Subtypen**

SUR	Radiolig.	MgATP (μ M)	A-312110			P1075		
			K_i (nM)	A (%) ^a	f ^b	K_D / K_i (nM)	A (%) ^a	f ^b
SUR2A	³ H-P1075	1000 3	14 [12, 15] 30 [28,33] [*]	100 100	2.2 [2.0,2.6] ^{*,1}	16 [14,18] 20 [16,25]	100 100	1.3 [0.83,1.7]
SUR2A(YS)	³ H-GBC	1000 0	8.0 [7.0,10] ^{*,2} 3000 [1800,3900] 1200 [1100,1300] ^c $n_H = 0.75 \pm 0.04$	69 \pm 2 31 \pm 2 91 \pm 6	140 [100,190]	19 [14,26] 1500 [800,3000] 2200 [1700,2800] ($n_H = 0.89 \pm 0.05$)	63 \pm 2 37 \pm 2 100	110 [76,170]
Kir6.2/2A(YS)	³ H-GBC	1000 0	32 [25,40] ² 2800 [1400,5600,] 1500 [1300,1700]	71 \pm 6 29 \pm 6 100	47 [35,62]	not done		
SUR2B	³ H-P1075	1000 3	18 [16,20] [*] 22 [20,25]	100 100	1.3 [1.0,1.6] ^{*,1}	9.1 [7.1,11] 18 [16,20]	100 100	2.0 [1.6,2.3] ¹
SUR2B(YS)	³ H-GBC	1000 0	12 [9,15] [*] 850 [600,1200] 830 [690,1000]	42 \pm 5 55 \pm 6 100	71 [54,93] [*]	5.9 [3.5,9.8] 710 [490,1000] 1200 [1100,1300]	46 \pm 4 54 \pm 4 100	200 [120,340]
SUR1	³ H-GBC	1000 0	at 300 μ M SB ~ 84 % at 300 μ M SB ~ 100 %			at 300 μ M B _S ~ 70 % at 300 μ M B _S ~ 100 %		

^a Amplitude (Ausmaß) der Inhibition in %SB; im Falle biphasischer Konkurrenzkurven, $A_2 = 100 - A_1$

^b f kennzeichnet den MgATP shift, berechnet als: $f = 10 \exp [pK_i (1 \text{ mM Mg}^{2+}) - pK_i (\text{niedriges Mg}^{2+})]$. Im Falle biphasischer Kurven wurde, bei Konzentrationen von 1mM MgATP, die hochaffine Komponente zur Berechnung verwendet.

^c Ein Fit nach dem Modell mit zwei Komponenten ergab die Werte $K_{i,1} = 360$ (190,680), $K_{i,2} = 6200$ (3400,11000) , $A_1 = 58 \pm 5\%$ und $A_2 = 42 \pm 5\%$. Statistisch (Akaike-Kriterium) war es dem Modell mit einer Bindungsstelle überlegen.

^{*} kennzeichnet einen statistisch signifikanten Unterschied ($P < 0.05$) zwischen den jeweiligen Parametern für A-312110 und P1075.

¹ kennzeichnet eine signifikante ($P < 0.05$) Rechtsverschiebung (MgATP-shift) der Bindungskurve bei 3 μ M MgATP.

² signifikanter Unterschied des $pK_{i,1}$ von A-312110 an SUR2A(Y1206S) zum $pK_{i,1}$ der Koexpression SUR2A(YS) / Kir6.2

4 Diskussion

Der von der Firma Abbot (Illinois) entwickelte KCO mit Dihydropyridin-Struktur, [¹²⁵I]A-312110, soll als Werkzeug dienen um molekulare und funktionelle Eigenschaften von K_{ATP}-Kanälen zu untersuchen und um neue K_{ATP}-Kanal Öffner bzw. Blocker zu identifizieren und zu charakterisieren. Die Bindungseigenschaften von [¹²⁵I]A-312110 wurden bereits von Davis-Taber et al., 2003 an Membranpräparationen der Herzmuskulatur und der glatten Muskulatur der Blase des Meerschweinchens untersucht. Die Ergebnisse dieser Studie sollen hier mit den Resultaten der vorliegenden Arbeit, die die Bindung der unmarkierten Liganden A-312110 und P1075 an die rekombinant exprimierten SUR-Subtypen in HEK-293 Zellen untersucht, verglichen werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind in den Tabellen des Kapitel 3.7 zusammengestellt. Sie erlauben insbesondere den Vergleich der beiden strukturell verschiedenen Öffner bezüglich ihrer allosterischen Wechselwirkung mit GBC und MgATP sowie bezüglich des Effekts der Koexpression von SUR2A mit Kir 6.2 auf die Bindung der beiden Öffner.

4.1 Bindung von A-312110 und P1075 an die nativen SUR2-Subtypen unter Verwendung von ³H-P1075 als Radioligand

[¹²⁵I]A-312110 erreicht die höchste spezifische Bindung am kardialen K_{ATP}-Kanal des Meerschweinchens bei Konzentrationen von MgATP um 1mM (Davis-Taber et al., 2003), für die ³H-P1075-Bindung am SUR2B sind bei Konzentrationen von ATP um 1 mM ATP alle Bindungsstellen für ATP abgesättigt (Hambrock et al., 1998). Für die in diesem Kapitel besprochenen Messungen wurde daher sowohl für P1075 als auch für A-312110 diese Sättigungsdosis (MgATP, 1mM) in den Inkubationsansätzen verwendet.

Bei Verwendung von ^3H -P1075 als Radioligand, waren die Bindungskurven des A-312110 und des P1075 an SUR2A und SUR2B monophasisch und konnten die gesamte SB des ^3H -P1075 verdrängen.

Der statistische Vergleich der pK_i -Werte der Einzelversuche der heterologen Kompetition von A-312110 gegen ^3H -P1075, an SUR2A ($\text{pK}_i = 7.87 \pm 0.02$; $K_i = 14$ [12, 15] nM) und SUR2B ($\text{pK}_i = 7.75 \pm 0.02$; $K_i = 18$ [16, 20] nM), ergab im zweiseitigen t-test mit $p < 0.01$ einen sehr signifikanten Unterschied der Parameter. Betrachtet man allerdings die K_i -Werte von A-312110 an den beiden SUR2-Splicevarianten erkennt man dass die Selektivität von A-312110 für SUR2A nur einen Faktor von ~ 1.3 beträgt. Wie Erfahrungen in unserem Labor gezeigt haben, sind Schwankungen der Messergebnisse von Einzelversuchen um einen Faktor von ~ 1.5 bei der von uns verwendeten Versuchsanordnung keine Seltenheit. Daher kann von einer Selektivität des A-312110 für SUR2A gegenüber SUR2B nur unter großem Vorbehalt gesprochen werden, welche wohl auch keinerlei physiologische Bedeutung hat.

Davis-Taber et al., 2003 konnten keine Selektivität des Iodierten Liganden [^{125}I]A-312110 für Membranen aus Hezmuskelgewebe (SUR2A / Kir6.2; $K_D = 5.8$ nM) bzw. glattem Muskelgewebe der Blase (SUR2B / Kir6.x) von Meerschweinchen feststellen.

Zwei Gründe können für diese leichte Diskrepanz der Ergebnisse herangezogen werden: Zunächst wurden in der Studie von Davis-Taber et al., 2003 native Membranen mit SUR / Kir-Kombinationen getestet, während in der vorliegenden Arbeit mit rekombinant exprimierten β -Untereinheiten gearbeitet wurde. Des weiteren wurden die Untersuchungen von Davis-Taber et al. (2003) an Membranpräparationen nativer Gewebe des Meerschweinchens durchgeführt, welche durchaus verschiedene SUR-Subtypen enthalten können. So fand man Beispielsweise bei der Untersuchung von Herzmuskelgewebe sowohl mRNA von SUR2A (aus Herzmuskelzellen) als auch SUR2B (aus Endothelzellen) (Isomoto et al., 1996; Schnitzler et al., 2000). Vergleicht man die ermittelten K_D - bzw. K_i -Werte der beiden Studien erkennt man das die Werte von Davis-Taber et al. (2003) ungefähr um den Faktor 3 kleiner sind, als die in dieser Arbeit ermittelten. Dieser Umstand ist besonders in

4 Diskussion

Bezug auf den Rezeptor der Herzmuskelzelle (SUR2A / Kir6.2) erstaunlich, da in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, dass die Koexpression des SUR2A(Y1206S) mit Kir6.2 in Membranen die Affinität des A-312110 zum Rezeptor etwa um den Faktor 4 (im Vergleich zu SUR2A(Y1206S) allein) vermindert (vgl. Kapitel 4.5.2).

Aus diesem Grund müssen andere Unterschiede in den experimentellen Bedingungen für die nicht übereinstimmenden Resultate verantwortlich sein.

Tab. 17 fasst die wichtigsten Unterschiede zusammen:

Davis-Taber et. al., 2003	vorliegende Arbeit
ATP – regenerierendes System	-
Spezies: Meerschweinchen	Spezies: Maus SUR2A / B
Membranpräparationen aus nativem Gewebe	Membranpräparationen aus in HEK-293 Zellen rekombinant exprimierten Rezeptoren
Radioligand: [¹²⁵ I]A-312110	Radioliganden: ³ H-GBC, ³ H-P1075
Inkubationszeit: 90 min.	Inkubationszeit: SUR2B 30 min., sonst 15 min.

Tab. 17 Wichtige Unterschiede der experimentellen Bedingungen zwischen der vorliegenden Arbeit und der Studie von Davis-Taber et al., 2003

Im Gegensatz zu A-312110 zeigte der statistische Vergleich der pK_D -Werte von P1075, bei Sättigung mit MgATP eine hochsignifikante Selektivität ($p < 0.001$) des P1075 für SUR2B ($K_D = 9.1 [7.1, 11] \text{ nM}$, $pK_D = 8.04 \pm 0.03$) gegenüber SUR2A ($K_D = 16 [14, 18] \text{ nM}$, $pK_D = 7.81 \pm 0.03$). Bildet man den Quotienten der beiden K_D -Werte von P1075 für SUR2A und SUR2B, so zeigt sich eine, ebenfalls eher geringfügige, ~ 2 – fache Selektivität des P1075 für SUR2B gegenüber SUR2A. Die hier ermittelte Selektivität des P1075 für SUR2B bestätigt frühere Untersuchungen an rekombinanten Systemen (Schwanstecher

et al., 1998; Hambrock et al., 1999) und an Membranpräparationen von nativen Geweben (Bray and Quast, 1992; Löffler-Walz and Quast, 1998b).

Insgesamt zeigt der direkte Vergleich der beiden Öffner P1075 und A-312110, trotz der ermittelten statistischen Signifikanzen, nur geringe Unterschiede bezüglich der Affinität zum SUR2-Rezeptor.

4.2 Bindung von A-312110 und P1075 an SUR2A(Y1206S) und SUR2B(Y1206S) unter Verwendung von ³H-GBC als Radioligand

Die beiden Mutanten SUR2A(Y1206S) und SUR2B(Y1206S) können sowohl GBC als auch K_{ATP} -Kanal Öffner hochaffin binden. Durch die Mutation erhöht sich die Affinität des SUR2B, exprimiert in Membranen, für ³H-GBC etwa um den Faktor 7 (Hambrock et al., 2001), während die Affinität für Öffner sich um einen Faktor < 2 erniedrigt (Russ et al., 2003).

Die Hemmkurven der ³H-GBC Bindung durch die beiden KCO P1075 und A-312110 zeigten, bei Sättigungskonzentrationen von MgATP (1mM), ein biphasisches Bild mit zwei Klassen von Bindungsstellen, einer hochaffinen im nanomolaren und einer niederaffinen im micromolaren Bereich. Die $K_{i,1}$ -Werte der hochaffinen Komponenten von SUR2A(Y1206S) ($K_{i,1} = 8.0 [7.0, 10]$ nM für A-312110; $K_{i,1} = 19 [14, 26]$ nM für P1075) und SUR2B(Y1206S) ($K_{i,1} = 12 [9.0, 15]$ nM für A-312110; $K_{i,1} = 5.9 [3.5, 9.8]$ nM für P1075) lagen dicht bei den Werten, die mit den nativen Rezeptoren SUR2A / SUR2B und dem Radioliganden ³H-P1075 erzielt wurden.

Im statistischen Vergleich des ermittelten $pK_{i,1}$ -Wertes an SUR2A(Y1206S) unter Verwendung von A-312110, mit dem pK_i -Wert der heterologen Konkurrenz von ³H-P1075 gegen A-312110 an SUR2A ergab sich ein sehr signifikanter Unterschied ($p < 0.005$) der Stichproben. Damit verschiebt sich die hochaffine Bindungsstelle von A-312110 an SUR2A bei SUR2A(Y1206S) geringfügig, etwa um den Faktor 1.7 nach links.

4 Diskussion

Ebenso wurde ein signifikanter Unterschied ($p < 0.05$) zwischen dem pK_i von A-312110 an SUR2B und dem $pK_{i,1}$ von A-312110 an SUR2B(Y1206S)

festgestellt. Hier würde sich die hochaffine Bindungsstelle bei SUR2B(Y1206S) um ~ 1.5 nach links verschieben.

Kein signifikanter Unterschied ließ sich unter Verwendung von P1075 als unmarkiertem Liganden zwischen den pK_i -Werten an SUR2A bzw. SUR2B und deren korrespondierenden $pK_{i,1}$ -Werten an SUR2A(Y1206S) bzw. SUR2B(Y1206S) feststellen.

Somit belegt die vorliegende Arbeit die These (Hambrock et al., 2001; Löffler-Walz et al., 2002; Russ et al., 2003), dass die $pK_{i,1}$ -Werte der heterologen Konkurrenz von P1075 mit ^3H -GBC an den SUR-Mutanten die wahre Affinität von P1075 zu den SUR2-Subtypen widerspiegelt. Bei A-312110 gilt dies eingeschränkt, unter Vernachlässigung einer geringfügigen, aber signifikanten Linksverschiebung des $pK_{i,1}$ bei SUR2(Y1206S), ebenfalls.

Die $K_{i,2}$ -Werte der niederaffinen Komponenten der Bindungskurven der beiden KCO waren mit den Werten vergleichbar, die mit ^3H -GBC unter Abwesenheit von MgATP erzielt wurden (Hambrock et al., 2001; Hambrock et al., 2002; Löffler-Walz et al., 2002; Russ et al., 2003). Unter Berücksichtigung dieser Vergleichbarkeit der Werte könnte man spekulieren, dass die niederaffine Bindungsstelle keiner allosterischen Kontrolle durch Nukleotide unterliegt, da sie sowohl mit als auch ohne MgATP vorhanden ist (Löffler-Walz et al., 2002).

Im statistischen Vergleich der $pK_{i,1}$ -Werte von A-312110 an SUR2A(Y1206S) und SUR2B(Y1206S), ist der $pK_{i,1}$ an SUR2A(Y1206S) mit $p < 0.05$ signifikant kleiner als an SUR2B(Y1206S). Dies bestätigt die Ergebnisse, die unter Verwendung von ^3H -P1075 als Radioligand am nativen SUR2 gewonnen wurden und untermauert die Hypothese, dass A-312110 eine geringfügig höhere Selektivität gegenüber SUR2A im Vergleich zu SUR2B aufweist.

Wiederum in Bestätigung der zuvor mit ^3H -P1075 an SUR2 gewonnenen Ergebnisse zeigte P1075, im Gegensatz zu A-312110, eine schwache Selektivität für SUR2B(Y1206S) gegenüber SUR2A(Y1206S) ($p < 0.01$).

Interessant ist des weiteren die Beobachtung, dass die Anteile der Amplitudenabschnitte A_1 und A_2 an der Gesamtamplitude unabhängig vom Öffner (P1075 bzw. A-312110) bei SUR2A(Y1206S) $\sim 70 / 30$ % (hochaffine Komponente / niederaffine Komponente), bei SUR2B(Y1206S) $\sim 45 / 55$ % betragen. Eine mögliche Erklärung für diesen Unterschied könnte im Verhältnis der Anzahl der Bindungsstellen für KCO (hochaffin / niederaffin) liegen, welches im Falle von SUR2A(Y1206S) im Vergleich zu SUR2B(Y1206S) zu den hochaffinen Bindungsstellen hin verschoben wäre.

(Russ et al., 2003) untersuchten das Bindungsverhalten von verschiedenen KCO an SUR2B(Y1206S), dabei zeigten KCO verschiedenster chemischer Strukturklassen (Cyanoguanidine, Benzopyrane, Aprikalim) ein biphasisches Bindungsverhalten. Diese KCO wurden als typische KCO bezeichnet. Ausnahmen waren der Guanylat-Cyclase-Aktivator Nicorandil, das Pyrimidin Minoxidilsulfat und des Benzothiadiazin Diazoxid. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass das Dihydropyridin A-312110 ebenfalls zu der Klasse der typischen KCO zu zählen ist. Desweiteren konnte die vorliegende Studie nachweisen, dass die biphasischen Inhibitionskurven der heterologen Konkurrenz von ^3H -GBC gegen typische KCO, die bisher nur an SUR2B(Y1206S) beobachtet worden waren (Hambrock et al., 2001; Hambrock et al., 2002), auch an SUR2A(Y1206S) vorzufinden sind (Stauß et al., in Vorbereitung).

Es bleibt die Frage, wie die offensichtliche Heterogenität der ^3H -GBC-Öffner-Hemmkurven molekular zu verstehen ist. Nach den vorliegenden Erkenntnissen existiert jeweils nur eine (hochaffine) Bindungsstelle für GBC und die Öffner (vgl. Einleitung, Kapitel 1.7). Daraus ergibt sich, dass ^3H -GBC-Öffner-Hemmkurven monophasisch sein müssten. Zur Lösung des Widerspruchs haben wir vorgeschlagen, dass SUR, auch wenn er alleine exprimiert wird, Multimere (z.B. Tetramere) bildet (Löffler-Walz et al., 2002). In der Gegenwart von MgATP

4 Diskussion

sind die SUR-Untereinheiten innerhalb des Tetramers gekoppelt. Im Falle der biphasischen ^3H -GBC-Öffner-Verdrängungskurve bindet der Öffner zunächst an die Untereinheiten des Tetramers, die nicht von ^3H -GBC besetzt sind. Durch eine negative allosterische Koppelung zwischen den Untereinheiten schwächt dies die ^3H -GBC-Bindung. In der Tat schwächt P1075 in einer Konzentrationen von 100 nM (bei dieser Konzentration ist die Hochaffinitätskomponente der biphasischen Bindungskurve abgeschlossen), die GBC-Affinität am SUR2B(Y1206S) um einen Faktor ~ 2.4 . Dies erklärt quantitativ die Amplitude der Hochaffinitätskomponente ($A_1 \sim 46\%$; Löffler-Walz et al., 2002). Die grössere Amplitude der Hemmkurve im Falle von SUR2A(Y1206S) deutet daher auf eine stärkere negativ allosterische Kopplung der SUR2A(Y1206S) Untereinheiten im Tetramer hin. Die Niederaffinitätskomponente beschreibt dann die Verdrängung des restlichen gebundenen ^3H -GBC vom SUR durch den Öffner an den Untereinheiten, die noch von ^3H -GBC besetzt waren.

In der Abwesenheit von MgATP gibt es keine hochaffine Öffnerbindung (siehe auch Kapitel 1.7.2) und die Untereinheiten sind nicht gekoppelt (Löffler-Walz et al., 2002). Folglich entfällt die Hochaffinitätsphase und man sieht nur die Bindung des Öffners an die Untereinheiten, die ^3H -GBC gebunden hatten. Dieser Prozeß geschieht in gleicher Weise, unabhängig von der Gegenwart von MgATP. Dies deutet darauf hin, dass die Bindung von GBC die betreffende Untereinheit stark refraktär für die Bindung eines Öffners macht und dass dies nicht durch MgATP aufgehoben werden kann.

4.3 Bindung von A-312110 und P1075 an SUR1w.t unter Verwendung von ^3H -GBC als Radioligand

SUR1 weist eine hohe Affinität für Sulfonylharnstoffe und eine niedrige Affinität für die meisten K_{ATP} -Kanal Öffner (mit Ausnahme von Diazoxid) auf (Schwanstecher et al., 1998; Dörschner et al., 1999; Hambrock et al., 2002). A-312110 konnte an Membranpräparationen, gewonnen aus dem Hirngewebe

von Ratten keine signifikante Verdrängung von ^3H -GBC bewirken (Davis-Taber et al., 2003). Ergebnisse von Konkurrenzexperimenten mit ^3H -GBC als Radioligand an Membranpräparationen gewonnen aus Hirngewebe von Ratten sind mit Resultaten, die mithilfe von rekombinanten SUR1-Untereinheiten erzielt wurden, vergleichbar (Gopalakrishnan et al., 2000).

Die Resultate der vorliegenden Arbeit bestätigen dies. In Anwesenheit von MgATP (1mM) konnte A-312110 bei einer Konzentration von $300\mu\text{M}$ ~ 16% des spezifisch gebundenen ^3H -GBC verdrängen, P1075 verdrängte bei der gleichen Konzentration ~ 30% der SB von ^3H -GBC. Höhere Konzentrationen an unmarkiertem Liganden (P1075, A312110) konnten nicht gewählt werden, da ihre Löslichkeitsgrenze damit überschritten worden wäre. Somit ist die Bestimmung einer Dissoziationskonstante der Öffner P1075 und A-312110 unter den hier angewandten experimentellen Bedingungen nicht möglich.

Bemerkenswert war die Beobachtung, dass bei einer Konzentration des A-312110 von $300\mu\text{M}$, ein Anstieg der NSB erfolgte (siehe Kap). Ursächlich für diesen Anstieg der NSB könnte eine Komplexierung des ^3H -GBC mit A-312110 bei sehr hohen Konzentrationen von A-312110 sein. Die daraus entstehenden Ligandenkomplexe wären dann zu gross, um bei der Filtration noch durch die Filterporen zu gelangen und würden somit unspezifisch am Filter haften bleiben.

4.4 Allosterische Koppelung an Nukleotide

Die Abhängigkeit der Öffnerbindung von der MgATP-Konzentration wurde sowohl unter Verwendung von ^3H -P1075 am nativen SUR als auch mithilfe des Radioliganden ^3H -GBC an SUR2(Y1206S) untersucht.

4.4.1 Koppelung an Nukleotide bei Bindungsexperimenten mit ^3H -P1075 als Radioligand

4 Diskussion

Es wurde das Bindungsverhalten des ^3H -P1075 an den nativen SUR2 bei Sättigungs-konzentrationen von MgATP (1 mM) verglichen mit demjenigen bei einer Konzentration von 3 μM MgATP im Inkubationsansatz. Die Verminderung des MgATP von 1 mM auf 3 μM verringerte die spezifische Bindung des ^3H -P1075 ($c \sim 3\text{nM}$) an SUR2A, und SUR2B um $\sim 70 - 80 \%$. Außerdem führte sie zu geringfügigen, aber dennoch teilweise signifikanten Rechtsverschiebungen (shifts) der K_D bzw. K_i -Werte, die in der Tab. 18 als f-Werte (= MgATP shift, siehe auch Kap. 3.1) angegeben sind. Nach dem Massenwirkungsgesetz trägt die hier nur geringfügige Rechtsverschiebung der K_D bzw. K_i -Werte ($f < 2.5$, für beide KCO) nur wenig zu dem massiven Verlust an spezifischer Bindung, induziert durch die Reduktion von MgATP, bei. Somit ist dieser Verlust an spezifischer Bindung fast ausschließlich als Ausdruck einer Verminderung der Anzahl der hochaffinen Bindungsstellen zu verstehen.

Betrachtet man die f-Werte (Tab. 18) an SUR2A, findet man einen größeren MgATP shift für A-312110 (2.2 [2.0, 2.6]) als für P1075 (1.3 [0.83, 1.7]), an SUR2B waren die Verhältnisse genau umgekehrt. Die Berechnung der Signifikanz der f-Werte (Tab. 18) bestätigt dies: die MgATP-Verschiebung der A-312110 Bindung an SUR2A war im Gegensatz zur Rechtsverschiebung der Bindungskurve von P1075, signifikant.

An SUR2B sind beide MgATP shifts (A-312110 und P1075) signifikant. Vergleicht man allerdings die beiden ΔpK_i – Mittelwerte von A-312110 ($\Delta pK_i = 0.1 \pm 0.03$; 8 Freiheitsgrade) und P1075 ($\Delta pK_i = 0.29 \pm 0.04$; 7 Freiheitsgrade), ergibt sich im zweiseitigen t-test für unpaare Stichproben mit $p < 0.005$ ein sehr signifikanter Unterschied. Der MgATP shift ist also mit P1075 als unmarkiertem Liganden an SUR2B signifikant grösser als der shift von A-312110.

Man kann vermuten, dass die Grösse der MgATP-Verschiebung (ebenso wie die Reduktion der Bindungsstellen) ein quantitatives Maß für die Kopplung zwischen MgATP- und Öffnerbindung ist. In Umkehrung der Arbeiten von Bienengraeber et al., 2000 und Zingman et al., 2001, die zeigen, wie die Öffner die MgATP-Hydrolyse durch SUR und die Kanalöffnung beeinflussen, kann man weiterhin vermuten, dass der MgATP-shift ein Maß für die intrinsische

Effizienz des Öffners darstellt. Das heisst, A-312110 sollte eine höhere Effizienz am SUR2A / Kir6.2 Kanal, P1075 am SUR2B / Kir 6.2 Kanal haben. Der Test dieser Hypothese erfordert elektrophysiologische Untersuchungen, die inzwischen in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt wurden und die Hypothese ansatzweise bestätigen. (Felsch et al., eingereicht).

Am SUR2B liegen die Verhältnisse wiederum genau entgegengesetzt (Verlust der SB bei 3 μ M MgATP bei P1075 ~ 80 %, bei A-312110 ~ 70 %).

³ H-P1075	A-312110	P1075
SUR2A	f = 2.2 [2.0, 2.6] [*] $\Delta pK_i = 0.35 \pm 0.03$	f = 1.3[0.83, 1.7] $\Delta pK_D = 0.1 \pm 0.06$
SUR2B	f = 1.3 [1.0, 1.6] [*] $\Delta pK_i = 0.1 \pm 0.03^1$	f = 2.0 [1.6, 2.3] [*] $\Delta pK_D = 0.29 \pm 0.04^1$

Tab. 18 Vergleich der MgATP-Verschiebung, mit A-312110 und P1075 , am nativen SUR2 unter Verwendung von ³H-P1075 als Radioligand

[x, y] Konfidenzintervall; Fehler der ΔpK_i – Werte, berechnet nach Gleichung 24.

f kennzeichnet den MgATP shift als: $f = 10 \exp [pK_i (1\text{mM MgATP}) - pK_i (3\mu\text{M MgATP})]$

¹ Signifikanter Unterschied der ΔpK_i - Mittelwerte

^{*} Statistisch signifikanter shift bei Reduktion des MgATP von 1mM auf 3 μ M

4.4.2 Koppelung an Nukleotide bei Bindungsexperimenten mit ³H-GBC als Radioligand

Die Verwendung von ³H-GBC als Radioligand ermöglicht die Untersuchung der Öffnerbindung an SUR2(Y1206S) in völliger Abwesenheit von MgATP, da ³H-GBC in Abwesenheit von MgATP im Gegensatz zu ³H-P1075 mit hoher Affinität an SUR2A(Y1206S) bindet. Allerdings wird die Interpretation der erzielten Resultate durch die negativ allosterische Koppelung zwischen Sulfonylharnstoff- und K_{ATP} -Kanal Öffner-Bindung erschwert. Es ist daher möglich, dass die Affinität des untersuchten KCO bei Studien mit ³H-GBC unterschätzt wird (Hambrock et al., 2001; Russ et al., 2003). Dieser Umstand sollte bei der Interpretation der nachfolgenden Ergebnisse nicht vergessen werden:

4 Diskussion

Die K_i -Werte von A-312110 und P1075, bei Bindung an SUR2(Y1206S), in Abwesenheit von MgATP, lagen im micromolaren Bereich (siehe Übersichtstabelle).

Russ et al. (2003) fanden bei der Untersuchung des Bindungs-verhaltens von typischen KCO, dass sich der Anstieg der Affinität des ^3H -GBC für SUR2B(Y1206S) durch die Abwesenheit von MgATP, in einer Verminderung der K_D um den Faktor ~ 200 (f-Wert) widerspiegelt. A-312110 zeigte an SUR2B(Y1206S) eine Rechtsverschiebung der K_i , um den Faktor ~ 70 , von 12 [9, 15] nM mit MgATP nach 830 [690,1000] nM ohne MgATP (siehe auch Übersicht). Dieser shift ist signifikant niedriger als derjenige von P1075 an SUR2B(Y1206S) (f ~ 200). Der Vergleich mit den Experimenten an SUR2B, unter Verwendung von ^3H -P1075 als Radioligand, bestätigt die Beobachtungen an SUR2B(Y1206S): Der MgATP shift von A-312110 (f = 1.3 [1.0, 1.6]) war dort signifikant geringer als derjenige von P1075 (f = 2.0 [1.6, 2.3]).

Nach dem Akaike Kriterium war überraschend das Modell mit zwei Komponenten bei der heterologen Konkurrenz von ^3H -GBC gegen A-312110 an SUR2A(Y1206S), in Abwesenheit von MgATP, demjenigen mit einer Komponente vorzuziehen. Eine solche Heterogenität der Bindungsstellen wurde, in Abwesenheit von MgATP, weder bei den Konkurrenzexperimenten mit den beiden Öffnern A-312110 und P1075 gegen ^3H -GBC an SUR2B(Y1206S) noch bei Versuchen an SUR2A(Y1206S), mit P1075 als unmarkiertem Liganden (siehe unten) beobachtet.

Verglich man die beiden Modelle mit zwei Bindungsstellen (mit bzw. ohne MgATP) an SUR2A(Y1206S) miteinander, fand man eine Rechtsverschiebung des $pK_{i,1}$ um den Faktor ~ 45 bei Abwesenheit von MgATP, während die beiden $pK_{i,2}$ -Werte statistisch nicht verschieden waren. Man kann hieraus nur auf komplexere Regulationsmechanismen in der Interaktion zwischen Nukleotiden, ^3H -GBC und der Bindung von A-312110 an SUR2A(Y1206S) schließen, die noch einer genaueren Untersuchung bedürfen.

Betrachtet man das statistisch unterlegene Modell mit nur einer Bindungsstelle, findet man bei den Versuchen mit A-312110 eine Rechtsverschiebung der pK_i -

Werte von $K_i = 8 [7, 10]$ nM ,bei Anwesenheit von MgATP, um den Faktor $f = 140 [100, 190]$, bei Abwesenheit von MgATP ($K_i = 1200 [1100, 1300]$ nM). Dieser f-Wert ist vom f-Wert ($110 [76, 170]$) der heterologen Konkurrenz von $^3\text{H-GBC}$ mit P1075 an SUR2A(Y1206S) statistisch nicht verschieden. Damit stünden die Resultate der Experimente zur heterologen Konkurrenz von $^3\text{H-GBC}$ und A-312110 an SUR2A(Y1206S) im Widerspruch zu den zuvor gewonnen Erkenntnissen an SUR2A unter Verwendung des Radioliganden $^3\text{H-P1075}$. Dort war der shift von A-312110 ($f = 2.2 [2.0, 2.6]$) signifikant grösser als derjenige von P1075 ($f = 1.3 [0.83, 1.7]$, vgl. Kapitel 4.4.1).

Wegen der statistischen Unterlegenheit des Modells mit einer Bindungsstelle einerseits und den Schwierigkeiten bei der Interpretation des Modells mit zwei Bindungsstellen andererseits, können zur Erörterung der allosterischen Koppelung von A-312110 und MgATP an SUR2A nur die Ergebnisse mit, $^3\text{H-P1075}$ als Radioligand, am nativen SUR2A herangezogen werden.

Somit wurde durch die Experimente an SUR2(Y1206S) bestätigt, dass am SUR2B eine engere allosterische Koppelung zwischen MgATP und P1075 als zwischen MgATP und A-312110 besteht. Die in Experimenten am nativen SUR2A gezeigte engere allosterische Koppelung zwischen MgATP und A-312110 im Vergleich zu P1075 konnte in den Versuchen an SUR2A(Y1206S) nicht bestätigt, aber auch nicht widerlegt werden. Zur vermuteten physiologischen Bedeutung der MgATP-Verschiebung vgl. Kapitel 4.4.1.

4.5 Effekte der Koexpression mit Kir 6.2 auf die Bindungseigenschaften von SUR2A(Y1206S)

4.5.1 $^3\text{H-GBC}$ Bindung und allosterische Kopplung an MgATP

Vergleicht man die Sättigungsexperimente mit $^3\text{H-GBC}$ an SUR2A(Y1206S) ($K_D = 6.6 [4.5, 10]$ nM mit MgATP, $K_D = 5.6 [3.9, 8.1]$ nM ohne MgATP) allein mit denen an SUR2A(Y1206S) / Kir6.2 ($K_D = 1.18 [0.86, 1.48]$ nM mit MgATP, $K_D = 1.85 [1.05, 2.65]$ nM ohne MgATP), führt die Koexpression zu einer signifikanten Erhöhung der Affinität für $^3\text{H-GBC}$, sowohl mit, als auch ohne

4 Diskussion

MgATP. Dabei war der Unterschied zwischen den ermittelten pK_D -Werten an SUR2A(Y1206S) und SUR2A(Y1206S) / Kir6.2 in Anwesenheit von MgATP mit $p < 0.0005$ hochsignifikant, derjenige zwischen den pK_D -Werten an SUR2A(Y1206S) und SUR2A(Y1206S) / Kir6.2 in Abwesenheit von MgATP mit $p < 0.05$ signifikant. Diese Linksverschiebung der K_D des $^3\text{H-GBC}$, um den Faktor ~ 5.6 mit MgATP bzw. um den Faktor ~ 3.0 ohne MgATP durch die Koexpression wurde beim statistischen Vergleich von Sättigungsexperimenten an SUR2B(Y1206S) und SUR2B(Y1206S) / Kir6.x nicht beobachtet. Dort wurde die Affinität des Rezeptors für $^3\text{H-GBC}$ durch die Koexpression in Bindungsexperimenten in Membranen nicht beeinflusst (Hambrock et al., 2001). Auffällig ist dabei, dass die Linksverschiebung unter Anwesenheit von MgATP knapp doppelt so gross ist, als diejenige ohne MgATP.

Die Betrachtung der B_{MAX} -Werte zeigt, mit $B_{\text{MAX}} (+\text{MgATP}) = 569 \pm 48 \text{ fmol / mg}$ und $B_{\text{MAX}} (-\text{MgATP}) = 772 \pm 102 \text{ fmol / mg}$, im Gegensatz zu SUR2A(Y1206S) allein, keinen signifikanten Unterschied mehr. Somit führt die Koexpression von SUR2A(Y1206S) mit Kir6.2 zu einem Verlust der Rezeptormodulation durch Nukleotide.

In ähnlicher Weise wurde die negativ allosterische Inhibition der GBC-Bindung an SUR1 und SUR2B(Y1206S) durch Koexpression mit Kir6.2 geschwächt (Hambrock et al., 2002).

4.5.2 Effekt der Koexpression mit Kir 6.2 auf die Hemmung der $^3\text{H-GBC}$ -Bindung an SUR2A(Y1206S) durch A-312110

Die $pK_{i,2}$ -Werte der heterologen Konkurrenz von $^3\text{H-GBC}$ mit A-312110 an SUR2A(Y1206S) und SUR2A(Y1206S) / Kir6.2, bei Anwesenheit von MgATP, waren statistisch nicht verschieden. Allerdings ergab sich mit $p < 0.0001$ ein hochsignifikanter Unterschied der $pK_{i,1}$ -Werte. Somit führte die Koexpression von SUR2A(Y1206S) mit Kir6.2, zu einer verminderten Heterogenität der biphasischen Bindungskurve von A-312110. Die Hochaffinitätskomponente ($K_{i,1} = 32 [25, 40] \text{ nM}$) wurde im Vergleich zu SUR2A(Y1206S) allein ($K_{i,1} = 8 [7, 10]$

nM) um den Faktor ~ 4 nach rechts verschoben, während die niederaffine Komponente der Bindungskurve ($K_{i,2} = 3000$ [1800, 3900] bei SUR2A(Y1206S); $K_{i,2} = 2800$ [1400, 5600] nM bei SUR2A(Y1206S) / Kir6.2) statistisch unverändert blieb. Insgesamt führt also die Koexpression von SUR2A(Y1206S) und Kir6.2 zu einer verminderten Affinität des Rezeptors für den Öffner A-312110. Interessanterweise wurde ein solcher Effekt bei der heterologen Kompetition von $^3\text{H-GBC}$ gegen P1075 an Membranen aus mit SUR2B(Y1206S) / Kir6.x transfizierten Zellen nicht beobachtet (Hambrock et al., 2001). Betrachtet man hingegen das Verhältnis der Amplitudenanteile (hochaffine Komponente / niederaffine Komponente $\sim 70 / 30$ %) im Vergleich zu SUR2A(Y1206S) allein, zeigt sich dass die Koexpression von SUR2A(Y1206S) mit Kir6.2 die Amplitudenanteile unverändert lässt. Dies steht wiederum im Gegensatz zu früheren Beobachtungen an SUR2B(Y1206S), bei dem der hochaffine Anteil (A_1) der Amplitude durch die Koexpression mit Kir6.x von $\sim 45\%$ auf $\sim 75\%$ der SB anstieg, während der niederaffine Anteil (A_2) nur noch $\sim 25\%$ der Gesamtamplitude überstrich (A_2 von SUR2B(Y1206S) allein $\sim 55\%$) (Hambrock et al., 2001). In diesem Zusammenhang wäre es von Interesse, ob und in welcher Art und Weise das Bindungsverhalten von P1075 durch die Koexpression von SUR2A(Y1206S) mit Kir6.x moduliert wird (Stauß et al., in Vorbereitung). Auf jeden Fall ist die hier beobachtete Rechtsverschiebung der hochaffinen Komponente der A-312110 Bindungskurve ein weiteres Beispiel für die Beeinflussung allosterischer Interaktionen von K_{ATP} -Kanal Öffnern und Blockern durch die Koexpression von SUR und Kir6.x.

5 Zusammenfassung der Arbeit

Der ATP-empfindliche Kaliumkanal (K_{ATP} -Kanal) ist v.a. bekannt als Ansatzpunkt der Sulfonylharnstoffe (und Glinide), die durch Hemmung der Aktivität des Kanals in der β -Zelle des Pankreas die Insulinsekretion fördern. K_{ATP} -Kanäle kommen in allen erregbaren Zellen vor und sind Oktamere aus vier einwärtsgerichteten Kaliumkanaluntereinheiten der Familie Kir6.x und vier Sulfonylharnstoffrezeptoren, SUR. Die Kir6.x Familie hat zwei Mitglieder, Kir6.1 (Gefäßmuskelzelle) und Kir6.2 (alle anderen Myozyten, B-Zellen usw.); von den SUR Subtypen gibt es SUR1 (B-Zelle, Gehirn), SUR2A (Herz- und Skelettmuskel) und SUR2B (glatte Muskelzellen). SUR2A und 2B entstehen aus alternativem Spleißen desselben Gens und unterscheiden sich nur in den letzten 42 Aminosäuren des Carboxyterminus.

Öffner des K_{ATP} -Kanals werden für verschiedene therapeutische Anwendungen entwickelt, in neuerer Zeit v.a. zur Senkung der Hyperreaktivität der Bronchien bei Asthmatikern und der Harninkontinenz. Die Öffner sind strukturell außerordentlich heterogen. Dabei ist neuen Öffnern vom Dihydropyridintyp eine gewisse (in vivo) Selektivität für die Muskulatur der Harnwege (Kir6.2/6.1 + SUR2B) zugeschrieben worden; diese Dihydropyridine haben keine Affinität mehr zu spannungsabhängigen Kalziumkanälen. In dieser Arbeit haben wir die Bindung eines neuen K_{ATP} -Kanalöffner vom Dihydropyridintyp, A-312110, an die verschiedenen SUR-Subtypen gemessen, da die Erfassung der Bindungseigenschaften eines Dihydropyridins im rekombinanten System noch nicht vorgenommen wurde. Dazu wurden Konkurrenzexperimente mit den Radioliganden ^3H -P1075 (tritiiertes Öffner) und ^3H -Glibenclamid in Membranen von HEK-Zellen durchgeführt, in denen der entsprechende SUR-Subtyp exprimiert war. Besonderes Gewicht wurde auf die Erfassung der allosterischen Kopplungen der A-31210 Bindung an die Bindung von Glibenclamid und MgATP gelegt und auf die Modulation dieser Effekte durch Koexpression von SUR mit Kir6.2.

In Gegenwart von MgATP erwies sich A-312110 als potenter Ligand mit einer minimalen Selektivität für SUR2A ($K_i = 14 \text{ nM}$ gegen ^3H -P1075 als Radioligand)

über SUR2B (18 nM); dabei war die Bindung von A-312110 an SUR2A signifikant stärker an die Bindung von MgATP gekoppelt als die an SUR2B. Die Hemmkurven der ³H-Glibenclamid Bindung an SUR2A und 2B durch den Öffner wurde an Punktmutanten der SURs mit erhöhter Glibenclamidaffinität gemessen. Die Hemmkurven waren deutlich biphasisch mit einer charakteristischen Aufteilung der beiden Komponenten, wie wir sie zuvor auch bei anderen "typischen" Öffnern beobachtet haben (Russ et al., 2003); damit gehört auch A-312110 in die Kategorie der "typischen Öffner". In der Abwesenheit von MgATP war die Bindung des Öffners an SUR2A um einen Faktor 140, and SUR2B um 70 geschwächt. Der Faktor 70 am SUR2B ist dabei deutlich schwächer als für die meisten anderen Öffner, bei denen er im Mittel 200 beträgt (Russ et al., 2003). In Gegenwart von MgATP schwächte Koexpression mit Kir6.2 die Affinität von SUR2A für A-312110 um einen Faktor ~2 und erhöhte die für Glibenclamid um einen Faktor 5; zudem wurde durch die Koexpression die Biphasizität der ³H-Glibenclamid - A-312110-Hemmkurve an (mutierten) SUR2A herabgesetzt. Die Wechselwirkung mit SUR1 war vernachlässigbar ($K_i > 300$ nM).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß das Bindungsprofil von A-312110 zwar in einigen charakteristischen Details von dem des P1075 abweicht (z.B. in der bevorzugten Kopplung an SUR2A), aber doch im Großen und Ganzen dem P1075 ähnelt.

In Anbetracht der strukturellen Verschiedenheit der beiden Öffner ((Dihydropyridin vs. Cyanoguanidin/Pyridin) ist diese Übereinstimmung erstaunlich und läßt vermuten, daß beiden Öffnern ein gemeinsames Pharmakophor zur Kopplung an den SUR zugrunde liegt. Eine *in vitro* Selektivität für die glatte Muskulatur der Harnbase läßt sich nicht feststellen.

Ein Manuskript das im wesentlichen auf den Ergebnissen dieser Arbeit beruht,
wurde inzwischen zur Veröffentlichung eingereicht:

H. Felsch, U. Lange, C. Löffler-Walz, A. Hambrock U. Russ, W.A. Carrol, M.
Gopalakrishnan and U. Quast

INTERACTION OF A NOVEL DIHYDROPYRIDINE WITH SULPHONYLUREA
RECEPTORS AND K_{ATP} CHANNELS, 2003 submitted.

6 Literaturverzeichnis

- Aguilar-Bryan, L., Bryan, J. (1999) : Molecular biology of adenosine triphosphate-sensitive potassium channels. *Endocrine Reviews* **20**, 101-135
- Aguilar-Bryan, L., Nichols, C. G., et al. (1995) : Cloning of the β cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. *Science* **268**, 423-426
- Akaike, H. (1974) : *I.R.E. Trans autom control* **19**, 716
- Alberts, B., Bray, D., et al. (1990) : Molekularbiologie der Zelle. **2**.
- Altschul, S. F., Lipman, D. J. (1990) : Protein database searches for multiple alignments. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **87**, 5509-5513
- Ashcroft, F. M., Gribble, F. M. (1999) : ATP-sensitive K^+ channels and insulin secretion: their role in health and disease. *Diabetologia* **42**, 903-919
- Ashcroft, F. M., Rorsman, P. (1989) : Electrophysiology of the pancreatic beta-cell. *Prog.Biophys.Mol.Biol.* **54**, 87-143
- Ashcroft, S. J., Ashcroft, F. M. (1990a) : Properties and functions of ATP-sensitive K-channels. *Cell Signal.* **2**, 197-214
- Ashcroft, S. J. H. (2000) : The β -cell K_{ATP} channel. *The Journal of Membrane Biology* **176**, 187-206
- Ashcroft, S. J. H., Ashcroft, F. M. (1990b) : Properties and functions of ATP-sensitive K-channels. *Cellular Signalling* **2**, 197-214
- Atwal, K. S., Grover, G. J., et al. (1993) : Cardioselective anti-ischemic ATP-sensitive potassium channel openers. *Journal of Medicinal Chemistry* **36**, 3971-3974
- Babenko, A. P., Gonzalez, G., et al. (2000) : Pharmaco-topology of sulfonylurea receptors. Separate domains of the regulatory subunits of K(ATP) channel isoforms are required for selective interaction with K(+) channel openers. *The Journal of Biological Chemistry* **275**, 717-720
- Baukrowitz, T., Fakler, B. (2000) : K-ATP channels gated by intracellular nucleotides and phospholipids. *European Journal Of Biochemistry* **267**, 5842-5848
- Baukrowitz, T., Schulte, U., et al. (1998) : PIP_2 and PIP as determinants for ATP inhibition of K_{ATP} channels. *Science* **282**, 1141-1144

- Bevington, P. R. (1969) : Data reduction and error analysis for the physical sciences. 55-65 and 92-118
- Béguin, P., Nagashima, K., et al. (1999) : PKA-mediated phosphorylation of the human K_{ATP} channel: separate roles of Kir6.2 and SUR1 subunit phosphorylation. *The EMBO Journal* **18**, 4722-4732
- Bienengraeber, M., Alekseev, A. E., et al. (2000) : ATPase activity of the sulfonylurea receptor: a catalytic function for the K_{ATP} channel complex. *FASEB Journal* **14**, 1943-1952
- Birincioglu, M., Yang, X. M., et al. (1999) : S-T segment voltage during sequential coronary occlusions is an unreliable marker of preconditioning. *Am.J.Physiol* **277**, H2435-H2441
- Bray, K. M., Quast, U. (1992) : A specific binding site for K⁺ channel openers in rat aorta. *The Journal of Biological Chemistry* **267**, 11689-11692
- Bränström, R., Corkey, B. E., et al. (1997) : 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* **272**, 17390-17394
- Bränström, R., Leibiger, I. B., et al. (1998) : Long chain coenzyme A esters activate the pore-forming subunit (Kir6.2) of the ATP-regulated potassium channel. *The Journal of Biological Chemistry* **273**, 31395-31400
- Bryan, J., Aguilar-Bryan, L. (1999) : Sulfonylurea receptors: ABC transporters that regulate ATP-sensitive K⁺ channels. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1461**, 285-303
- Buchheit, K. H., Fozard, J. R. (1999) : KATP channel openers for the treatment of airways hyperreactivity. *Pulm.Pharmacol.Ther.* **12**, 103-105
- Butera, J. A. A. M. M., Antane, S. A., et al. (2000) : Design and SAR of Novel Potassium Channel Openers Targeted for Urge Urinary Incontinence I. N-Cyanoguanidine Bioisosteres Possessing in Vivo Bladder Selectivity. *J.Med.Chem.2000* **43**, 1187-1202
- Butler, A., Tsunoda, S., et al. (1993) : mSlo, a complex mouse gene encoding "maxi" calcium-activated potassium channels. *Science* **261**, 221-224
- Cavero, I., Djellas, Y., et al. (1995) : Ischemic myocardial cell protection conferred by the opening of ATP-sensitive potassium channels. *Cardiovasc.Drugs Ther.* **9**, 245-255
- Challinor-Rogers, J. L., McPherson, G. A. (1994) : Potassium channel openers and other regulators of KATP channels. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol.* **21(8)**, 583-597

Chavez, R. A., Gray, A. T., et al. (1999) : TWIK-2, a new weak inward rectifying member of the tandem pore domain potassium channel family. *The Journal of Biological Chemistry* **274**, 7887-7892

Cheng, Y., Prusoff, W. H. (1973) : Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 % inhibition (IC_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochemical Pharmacology* **22**, 3099-3108

Christopoulos, A. (1998) : Assessing the distribution of parameters in models of ligand-receptor interaction: to log or not to log. *Trends in Pharmacological Sciences* **19**, 351-357

Chutkow, W. A., Simon, M. C., et al. (1996) : Cloning, tissue expression, and chromosomal localization of SUR2, the putative drug-binding subunit of cardiac, skeletal muscle, and vascular K_{ATP} channels. *Diabetes* **45**, 1439-1445

Clement IV, J. P., Kunjilwar, K., et al. (1997) : Association and stoichiometry of K_{ATP} channel subunits. *Neuron* **18**, 827-838

Coghlan, M. J., Carroll, W. A., et al. (2001) : Recent developments in the biology and medicinal chemistry of potassium channel modulators: Update from a decade of progress. *Journal of Medicinal Chemistry* **44**, 1627-1653

Cohen, M. V., Baines, C. P., et al. (2000) : Ischemic preconditioning: From adenosine receptor to K_{ATP} channel. *Annual Review of Physiology* **62**, 79-109

Cook, D. L., Hales, C. N. (1984) : Intracellular ATP directly blocks K^+ channels in pancreatic B-cells. *Nature* **311**, 271-273

Cook, D. L., Bryan, J. (1998) : ATP-sensitive K^+ channels come of age. *Trends in Pharmacological Sciences* **19**, 477-478

Cui, Y., GIBLIN, J. P., et al. (2001) : 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* **98**, 729-734

Curran, M. E., Splawski, I., et al. (1995) : A molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long QT syndrome. *Cell* **80**, 795-803

D'hahan, N., Jacquet, H., et al. (1999) : A transmembrane domain of the sulfonylurea receptor mediates activation of ATP-sensitive $K(+)$ channels by $K(+)$ channel openers. *Molecular Pharmacology* **56**, 308-315

Dascal, N., Schreibmayer, W., et al. (1993) : Atrial G protein-activated $K+$ channel: expression cloning and molecular properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 10235-10239

- Davis-Taber, R., Molinari, E. J., et al. (2003) : [125I]A-312110, a novel high-affinity 1,4-dihydropyridine ATP-sensitive K⁺ channel opener: characterization and pharmacology of binding. *Molecular Pharmacology* **64**, 143-153
- Dhein, S., Pejman, P., et al. (2000) : Effects of the I(K_{ATP}) blockers glibenclamide and HMR1883 on cardiac electrophysiology during ischemia and reperfusion. *European Journal of Pharmacology* **398**, 273-284
- Dickinson, K. E. J., Bryson, C. C., et al. (1997) : Nucleotide regulation and characteristics of potassium channel opener binding to skeletal muscle membranes. *Molecular Pharmacology* **52**, 473-481
- Doupnik, C. A., Davidson, N., et al. (1995) : The inward rectifier potassium channel family. *Curr.Op.Neurobiol.* **5**, 268-277
- Doyle, D. A., Cabral, J. M., et al. (1998) : The structure of the potassium channel: Molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* **280**, 69-77
- Dörschner, H., Brekardin, E., et al. (1999) : Stoichiometry of sulfonylurea-induced ATP-sensitive potassium channel closure. *Molecular Pharmacology* **55**, 1060-1066
- Dunne, M. J., Kane, C., et al. (1997) : Familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy and mutations in the sulfonylurea receptor. *N.Engl.J.Med.* **336**, 703-706
- Duprat, F., Lesage, F., et al. (1997) : TASK, a human background K⁺ channel to sense external pH variations near physiological pH. *The EMBO Journal* **16**, 5464-5471
- Faurschou, P., Mikkelsen, K. L., et al. (1994) : The lack of bronchodilator effect and the short-term safety of cumulative single doses of an inhaled potassium channel opener (bimakalim) in adult patients with mild to moderate bronchial asthma. *Pulm.Pharmacol.* **7**, 293-297
- Fink, M., Duprat, F., et al. (1996) : Cloning, functional expression and brain localization of a novel unconventional outward rectifier K⁺ channel. *The EMBO Journal* **15**, 6854-6862
- Fink, M., Lesage, F., et al. (1998) : A neuronal two P domain K⁺ channel stimulated by arachidonic acid and polyunsaturated fatty acids. *The EMBO Journal* **17**, 3297-3308
- Garlid, K. D., Paucek, P., et al. (1997) : Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels. Possible mechanism of cardioprotection. *Circulation Research* **81**, 1072-1082
- Gillis, K. D., Gee, W. M., et al. (1989) : Effects of sulfonamides on a metabolite-regulated ATPi-sensitive K⁺ channel in rat pancreatic B-cells. *Am.J.Physiol* **257**, C1119-C1127

- Glaser, B., Thornton, P., et al. (2000) : Genetics of neonatal hyperinsulinism. *Arch.Dis.Child Fetal Neonatal Ed* **82**, F79-F86
- Gloyn, A. L., Hashim, Y., et al. (2001) : 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* **18**, 206-212
- Gopalakrishnan, M., Molinari, E. J., et al. (2000) : Pharmacology of human sulphonylurea receptor SUR1 and inward rectifier K⁺ channel Kir6.2 combination expressed in HEK-293 cells. *British Journal of Pharmacology* **129**, 1323-1332
- Gögelein, H., Englert, H. C., et al. (2000) : HMR 1098: An inhibitor of cardiac ATP-sensitive potassium channels. *Cardiovascular Drug Reviews* **18**, 157-174
- Gögelein, H., Hartung, J., et al. (1999) : Molecular basis, pharmacology and physiological role of cardiac K_{ATP} channels. *Cellular Physiology And Biochemistry* **9**, 227-241
- Graham, F. L., Smiley, J., et al. (1977) : Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J.Gen. Virol.* **36**, 59-74
- Gribble, F. M., Reimann, F. (2002) : Pharmacological modulation of K_{ATP} channels. *Biochemical Society Transactions* **30**, 333-339
- Gribble, F. M., Ashfield, R., et al. (1997a) : Properties of cloned ATP-sensitive K⁺ currents expressed in *Xenopus* oocytes. *Journal of Physiology-London* **498**, 87-98
- Gribble, F. M., Proks, P., et al. (1998a) : Mechanism of cloned ATP-sensitive potassium channel activation by oleoyl-CoA. *The Journal of Biological Chemistry* **273**, 26383-26387
- Gribble, F. M., Tucker, S. J., et al. (1997b) : 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* **504**, 35-45
- Gribble, F. M., Tucker, S. J., et al. (1998b) : Tissue specificity of sulfonylureas: Studies on cloned cardiac and β -cell K_{ATP} channels. *Diabetes* **47**, 1412-1418
- Gross, G. J., Fryer, R. M. (1999) : Sarcolemmal versus mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels and myocardial preconditioning. *Circulation Research* **84**, 973-979
- Grover, G. J., D'Alonzo, A. J., et al. (1995a) : Glyburide-reversible cardioprotective effect of BMS-180448 is independent of action potential shortening. *Cardiovascular Research* **30**, 731-738

- Grover, G. J., D'Alonzo, A. J., et al. (1995b) : Cardioprotection with the K_{ATP} opener cromakalim is not correlated with ischemic myocardial action potential duration. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* **26(1)**, 145-152
- Grover, G. J., McCullough, J. R., et al. (1995c) : Cardioprotective profile of the cardiac-selective ATP-sensitive potassium channel opener BMS-180448. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* **25(1)**, 40-50
- Hambrock, A., Löffler-Walz, C., et al. (1999) : ATP-Sensitive K⁺ channel modulator binding to sulfonylurea receptors SUR2A and SUR2B: opposite effects of MgADP. *Molecular Pharmacology* **55**, 832-840
- Hambrock, A., Löffler-Walz, C., et al. (1998) : Mg²⁺ and ATP dependence of K_{ATP} channel modulator binding to the recombinant sulphonylurea receptor, SUR2B. *British Journal of Pharmacology* **125**, 577-583
- Hambrock, A., Löffler-Walz, C., et al. (2002) : Glibenclamide binding to sulphonylurea receptor subtypes: dependence on adenine nucleotides. *British Journal of Pharmacology* **136**, 995-1004
- Hambrock, A., Löffler-Walz, C., et al. (2001) : Characterization of a mutant sulfonylurea receptor SUR2B with high affinity for sulfonylureas and openers: Differences in the coupling to Kir6.x subtypes. *Molecular Pharmacology* **60**, 190-199
- Hani, E. H., Boutin, P., et al. (1998) : Missense mutations in the pancreatic islet beta cell inwardly rectifying K⁺ channel gene (KIR6.2/BIR): a meta-analysis suggests a role in the polygenic basis of Type II diabetes mellitus in Caucasians. *Diabetologia* **41**, 1511-1515
- Hani, E. H., Clement, K., et al. (1997) : Genetic studies of the sulfonylurea receptor gene locus in NIDDM and in morbid obesity among French Caucasians. *Diabetes* **46**, 688-694
- Hansen, L., Echwald, S. M., et al. (1997) : 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* **46**, 508-512
- Hart, L. M., de Knijff, P., et al. (1999) : Variants in the sulphonylurea receptor gene: association of the exon 16- 3t variant with Type II diabetes mellitus in Dutch Caucasians. *Diabetologia* **42**, 617-620
- Heginbotham, L., Lu, Z., et al. (1994) : Mutations in the K⁺ channel signature sequence. *Biophysical Journal* **66**, 1061-1067
- Heron, L., Virsolvy, A., et al. (1998) : Human alpha-endosulfine, a possible regulator of sulfonylurea-sensitive K_{ATP} channel: Molecular cloning, expression and biological properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 8387-8391

- Hilgemann, D. W., Ball, R. (1996) : Regulation of cardiac Na⁺, Ca²⁺ exchange and K_{ATP} potassium channels by PIP₂. *Science* **273**, 956-959
- Hilgenfeld, R. (1995) : Regulatory GTPases. *Curr.Opin.Struct.Biol.* **5**, 810-817
- Hille, B. (1992a) : G-protein-coupled mechanisms and nervous signaling. *Neuron* **9**, 187-195
- Hille, B. (1992b) : Ionic channels of excitable membranes. **2**
- Horie, M., Watanuki, M., et al. (2000) : Blockade of cardiac ATP-sensitive K⁺ channel by cibandoline targets its pore-forming subunit. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*
- Howe, B. B., Halterman, T. J., et al. (1995) : ZENECA ZD6169: a novel KATP channel opener with in vivo selectivity for urinary bladder. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **274**, 884-890
- Humphrey, S. J., Ludens, J. H. (1998) : K-ATP-blocking diuretic PNU-37883A reduces plasma renin activity in dogs. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* **31**, 894-903
- Humphrey, S. J., Smith, M. P., et al. (1996) : Cardiovascular effects of the K-ATP channel blocker U-37883A and structurally related morpholinoguanidines. *Methods Find.Exp.Clin.Pharmacol.* **18**, 247-260
- Inagaki, N., Gono, T., et al. (1995a) : Reconstitution of I_{KATP}: an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science* **270**, 1166-1170
- Inagaki, N., Gono, T., et al. (1996) : A family of sulfonylurea receptors determines the pharmacological properties of ATP-sensitive K⁺ channels. *Neuron* **16**, 1011-1017
- Inagaki, N., Gono, T., et al. (1997) : Subunit stoichiometry of the pancreatic beta-cell ATP-sensitive K⁺ channel. *FEBS Letters* **409**, 232-236
- Inagaki, N., Tsuura, Y., et al. (1995b) : Cloning and functional characterization of a novel ATP-sensitive potassium channel ubiquitously expressed in rat tissues, including pancreatic islets, pituitary, skeletal muscle, and heart. *The Journal of Biological Chemistry* **270**, 5691-5694
- Inoue, H., Ferrer, J., et al. (1997) : Sequence variants in the pancreatic islet beta-cell inwardly rectifying K⁺ channel Kir6.2 (Bir) gene: identification and lack of role in Caucasian patients with NIDDM. *Diabetes* **46**, 502-507
- Inoue, H., Ferrer, J., et al. (1996) : Sequence variants in the sulfonylurea receptor (SUR) gene are associated with NIDDM in Caucasians. *Diabetes* **45**, 825-831

- Inoue, I., Nagase, H., et al. (1991) : ATP-sensitive K⁺ channel in the mitochondrial inner membrane. *Nature* **352**, 244-247
- Isacoff, E. Y., Jan, Y. N., et al. (1991) : Putative receptor for the cytoplasmic inactivation gate in the Shaker K⁺ channel. *Nature* **353**, 86-90
- Isomoto, S., Kondo, C., et al. (1996) : A novel sulfonylurea receptor forms with BIR (KIR6.2) a smooth muscle type ATP-sensitive K⁺ channel. *The Journal of Biological Chemistry* **271**, 24321-24324
- Jan, L. Y., Jan, Y. N. (1997) : Voltage-gated and inwardly rectifying potassium channels. *Journal of Physiology-London* **505**, 267-282
- Jung, O., Englert, H. C., et al. (2000) : The K_{ATP} channel blocker HMR 1883 does not abolish the benefit of ischemic preconditioning on myocardial infarct mass in anesthetized rabbits. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **361**, 445-451
- Takei, M., Noma, A. (1984) : Adenosine-5'-triphosphate-sensitive single potassium channel in the atrioventricular node cell of the rabbit heart. *J.Physiol* **352**, 265-284
- Kane, C., Lindley, K. J., et al. (1997) : Therapy for persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. Understanding the responsiveness of beta cells to diazoxide and somatostatin. *J.Clin.Invest* **100**, 1888-1893
- Karow, T., Lang, R. (2002) : Vasodilatoren. 68-70
- Ketchum, K. A., Joiner, W. J., et al. (1995) : A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem. *Nature* **376**, 690-695
- Khan, S. A., Higdon, N. R., et al. (1997) : Pharmacological characterization of novel cyanoguanidines as vascular K_{ATP} channel blockers. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **283**, 1207-1213
- Kozlowski, R. Z., Hales, C. N., et al. (1989) : Dual effects of diazoxide on ATP-K⁺ currents recorded from an insulin-secreting cell line. *British Journal of Pharmacology* **97**, 1039-1050
- Köhler, M., Hirschberg, B., et al. (1996) : Small-conductance, calcium-activated potassium channels from mammalian brain. *Science* **273**, 1709-1714
- Kubo, Y., Baldwin, T. J., et al. (1993) : Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel. *Nature* **362**, 127-133
- Lange, U., Löffler-Walz, C., et al. (2002) : The Stereoisomers of a Pinacidil Analog Open or Close Cloned ATP-sensitive K⁺ Channels. *The Journal of Biological Chemistry* **277**, 40196-40205

Läuger, P. (1985) : Ionic channels with conformational substates. *Biophysical Journal* **47**, 581-590

Leibowitz, G., Cerasi, E. (1996) : Sulphonylurea treatment of NIDDM patients with cardiovascular disease: a mixed blessing? *Diabetologia* **39**, 503-514

Leicher, T., Roeper, J., et al. (1996) : Structural and functional characterization of human potassium channel subunit beta 1 (KCNA1B). *Neuropharmacology* **35**, 787-795

Lesage, F., Guillemare, E., et al. (1996) : TWIK-1, a ubiquitous human weakly inward rectifying K⁺ channel with a novel structure. *The EMBO Journal* **15**, 1004-1011

Li, J. H. (1997) : Pharmacology of ZM244085: A Novel Bladder-Selective Dihydropyridine K_{ATP} Channel Activator. *Cardiovasc. Drug Rev.* **15**, 220-231

Liu, G. X., Hanley, P. J., et al. (2001) : Long-chain acyl-coenzyme A esters and fatty acids directly link metabolism to K_{ATP} channels in the heart. *Circulation Research* **88**, 918-924

Liu, Y., Jurman, M. E., et al. (1996) : Dynamic rearrangement of the outer mouth of a K⁺ channel during gating. *Neuron* **16**, 859-867

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., et al. (1951) : Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* **193**, 265-275

Löffler-Walz, C., Quast, U. (1998a) : Interaction of the diuretics torasemide and U-37883A with the K(ATP) channel in rat isolated aorta. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **358**, 230-237

Löffler-Walz, C., Hambrock, A., et al. (2002) : Interaction of K_{ATP} channel modulators with sulphonylurea receptor SUR2B: implication for tetramer formation and allosteric coupling of subunits. *Molecular Pharmacology* **61**, 407-414

Löffler-Walz, C., Quast, U. (1998b) : Binding of K_{ATP} channel modulators in rat cardiac membranes. *British Journal of Pharmacology* **123**, 1395-1402

Löffler, C., Quast, U. (1997) : Pharmacological characterization of the sulphonylurea receptor in rat isolated aorta. *British Journal of Pharmacology* **120**, 476-480

Maingret, F., Patel, A. J., et al. (1999) : Mechano- or acid stimulation, two interactive modes of activation of the TREK-1 potassium channel. *The Journal of Biological Chemistry* **274**, 26691-26696

Manley, P. W., Löffler-Walz, C., et al. (2001) : Synthesis and characterization of a novel tritiated K_{ATP} channel opener with a benzopyran structure. *British Journal of Pharmacology* **133**, 275-285

- Matsuo, M., Tanabe, K., et al. (2000) : Different binding properties and affinities for ATP and ADP among sulfonylurea receptor subtypes, SUR1, SUR2A, and SUR2B. *The Journal of Biological Chemistry* **275**, 28757-28763
- McPherson, G. A., Bell, K. L., et al. (1999) : Functional and electrophysiological effects of a novel imidazoline-based K_{ATP} channel blocker, IMID-4F. *British Journal of Pharmacology* **128**, 1636-1642
- Miyamura, A., Kakei, M., et al. (2000) : On the mechanism of ADP-induced alteration of sulphonylurea sensitivity in cardiac ATP-sensitive K^+ channels. *British Journal of Pharmacology* **130**, 1411-1417
- Moreau, C., Jacquet, H., et al. (2000) : The molecular basis of the specificity of action of K_{ATP} channel openers. *The EMBO Journal* **19**, 6644-6651
- Murry, C. E., Jennings, R. B., et al. (1986) : Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* **74**, 1124-1136
- Nichols, C. G., Lederer, W. J. (1991) : Adenosine triphosphate-sensitive potassium channels in the cardiovascular system. *American Journal of Physiology* **261**, H1675-H1686
- Nichols, C. G., Ripoll, C., et al. (1991) : ATP-sensitive potassium channel modulation of the guinea pig ventricular action potential and contraction. *Circulation Research* **68**, 280-287
- Nichols, C. G., Shyng, S.-L., et al. (1996) : Adenosine diphosphate as an intracellular regulator of insulin secretion. *Science* **272**, 1785-1787
- Niki, I., Nicks, J. L., et al. (1990) : The beta-cell glibenclamide receptor is an ADP-binding protein. *Biochemical Journal* **268**, 713-718
- Noma, A. (1983) : ATP-regulated K^+ channels in cardiac muscle. *Nature* **305**, 147-148
- O'Rourke, B. (2000) : Myocardial K_{ATP} channels in preconditioning. *Circulation Research* **87**, 845-855
- Okuyama, Y., Yamada, M., et al. (1998) : 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* **435**, 595-603
- Otonkoski, T., Ammala, C., et al. (1999) : A point mutation inactivating the sulfonylurea receptor causes the severe form of persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy in Finland. *Diabetes* **48**, 408-415
- Pfaffinger, P. J., Martin, J. M., et al. (1985) : GTP-binding proteins couple cardiac muscarinic receptors to a K channel. *Nature* **317**, 536-538

- Pountney, D. J., Sun, Z.-Q., et al. (2001) : Is the molecular composition of K_{ATP} channels more complex than originally thought? *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **33**, 1541-1546
- Quast, U., Mählmann, H. (1982) : Interaction of [³H]flunitrazepam with the benzodiazepine receptor: evidence for a ligand-induced conformation change. *Biochemical Pharmacology* **31**, 2761-2768
- Quast, U. (1996a) : ATP-sensitive K⁺ channels in the kidney. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **354**, 213-225
- Quast, U. (1996b) : Effects of potassium channel activators in isolated blood vessels. 173-195
- Quast, U., Bray, K. M., et al. (1993) : Binding of the K⁺ channel opener [³H]P1075 in rat isolated aorta: relationship to functional effects of openers and blockers. *Molecular Pharmacology* **43**, 474-481
- Quast, U., Mählmann, H. (1982) : Interaction of [³H]flunitrazepam with the benzodiazepine receptor: evidence for a ligand-induced conformation change. *Biochemical Pharmacology* **31**, 2761-2768
- Rajan, S., Wischmeyer, E., et al. (2000) : TASK-3, a novel tandem pore domain acid-sensitive K⁺ channel. An extracellular histidine as pH sensor. *The Journal of Biological Chemistry* **275**, 16650-16657
- Ramboer, I., Boeynaems, J. M. (1989) : Pharmacological modulation of 86Rb efflux from aortic endothelial cells. *European Journal of Pharmacology* **171**, 251-254
- Reimann, F., Ashcroft, F. M. (1999) : Inwardly rectifying potassium channels. *Current Opinion in Cell Biology* **11**, 503-508
- Reyes, R., Duprat, F., et al. (1998) : Cloning and expression of a novel pH-sensitive two pore domain K⁺ channel from human kidney. *The Journal of Biological Chemistry* **273**, 30863-30869
- Rissanen, J., Markkanen, A., et al. (2000) : Sulfonylurea receptor 1 gene variants are associated with gestational diabetes and type 2 diabetes but not with altered secretion of insulin. *Diabetes Care* **23**, 70-73
- Rovnyak, G. C., Ahmed, S. Z., et al. (1997) : Cardioselective antiischemic ATP-sensitive potassium channel (K_{ATP}) openers. 5. Identification of 4-(N-aryl)-substituted benzopyran derivatives with high selectivity. *Journal of Medicinal Chemistry* **40**, 24-34
- Rudy, B. (1988) : Diversity and ubiquity of K channels. *Neuroscience* **25**, 729-749

Russ, U., Hambrock, A., et al. (1999) : Coexpression with the inward rectifier K⁺ channel Kir6.1 increases the affinity of the vascular sulfonylurea receptor SUR2B for glibenclamide. *Molecular Pharmacology* **56**, 955-961

Russ, U., Lange, U., et al. (2001) : Interaction of the sulfonylthiourea HMR 1883 with sulfonylurea receptors and recombinant ATP-sensitive K⁺ channels: Comparison with glibenclamide. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **299**, 1049-1055

Russ, U., Lange, U., et al. (2003) : Binding and effect of K(ATP) channel openers in the absence of Mg(2+). *British Journal of Pharmacology* **139**, 368-380

Sakura, H., Wat, N., et al. (1996) : Sequence variations in the human Kir6.2 gene, a subunit of the beta- cell ATP-sensitive K-channel: no association with NIDDM in white Caucasian subjects or evidence of abnormal function when expressed in vitro. *Diabetologia* **39**, 1233-1236

Sakura, H., Ämmälä, C., et al. (1995) : 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* **377**, 338-344

Salinas, M., Reyes, R., et al. (1999) : Cloning of a new mouse two-P domain channel subunit and a human homologue with a unique pore structure. *The Journal of Biological Chemistry* **274**, 11751-11760

Salkoff, L., Jegla, T. (1995) : Surfing the DNA databases for K⁺ channels nets yet more diversity. *Neuron* **15**, 489-492

Sanguinetti, M. C., Jiang, C., et al. (1995) : A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the IKr potassium channel. *Cell* **81**, 299-307

Sato, T., O'Rourke, B., et al. (1998) : Modulation of mitochondrial ATP-dependent K⁺ channels by protein kinase C. *Circulation Research* **83**, 110-114

Sánchez, J. A., Gonoï, T., et al. (1998) : Modulation of reconstituted ATP-sensitive K⁺ channels by GTP-binding proteins in a mammalian cell line. *Journal of Physiology-London* **507**, 315-324

Schnitzler, M. M., Derst, C., et al. (2000) : ATP-sensitive potassium channels in capillaries isolated from guinea-pig heart. *J.Physiol* **525 Pt 2**, 307-317

Schwanstecher, C., Meyer, U., et al. (2002) : K_{IR}6.2 polymorphism predisposes to type 2 diabetes by inducing overactivity of pancreatic β -cell ATP-sensitive K⁺ channels. *Diabetes* **51**, 875-879

Schwanstecher, M., Brandt, C., et al. (1992) : Effect of MgATP on pinacidil-induced displacement of glibenclamide from the sulfonylurea receptor in a

pancreatic β -cell line and rat cerebral cortex. *British Journal of Pharmacology* **106**, 295-301

Schwanstecher, M., Löser, S., et al. (1991) : Phosphate and thiophosphate group donating adenine and guanine nucleotides inhibit glibenclamide binding to membranes from pancreatic islets. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **343**, 83-89

Schwanstecher, M., Schwanstecher, C., et al. (1994a) : Location of the sulphonylurea receptor at the cytoplasmic face of the beta-cell membrane. *British Journal of Pharmacology* **113**, 903-911

Schwanstecher, M., Löser, S., et al. (1994b) : Identification of a 38-kDa high affinity sulfonylurea-binding peptide in insulin-secreting cells and cerebral cortex. *The Journal of Biological Chemistry* **269**, 17768-17771

Schwanstecher, M., Sieverding, C., et al. (1998) : Potassium channel openers require ATP to bind to and act through sulfonylurea receptors. *The EMBO Journal* **17**, 5529-5535

Shyng, S.-L., Nichols, C. G. (1998) : Membrane phospholipid control of nucleotide sensitivity of K_{ATP} channels. *Science* **282**, 1138-1141

Shyng, S. L., Ferrigni, T., et al. (1998) : Functional analyses of novel mutations in the sulfonylurea receptor 1 associated with persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Diabetes* **47**, 1145-1151

Smits, P., Thien, T. (1995) : Cardiovascular effects of sulphonylurea derivatives - Implication for the treatment of NIDDM. *Diabetologia* **38**, 116-121

Splawski, I., Timothy, K. W., et al. (1997) : Molecular basis of the long-QT syndrome associated with deafness. *N.Engl.J.Med.* **336**, 1562-1567

Süßbrich, H., Busch, A. E. (1998) : Kaliumkanäle. *Deutsche Apotheker Zeitung* **138**, 1139-1148

Tanabe, K., Tucker, S. J., et al. (1999) : Direct photoaffinity labeling of the Kir6.2 subunit of the ATP-sensitive K^+ channel by 8-azido-ATP. *The Journal of Biological Chemistry* **274**, 3931-3933

Triggle, D. J. (1994) : Molecular pharmacology of voltage-gated calcium channels. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **747**, 267-281

Trube, G., Hescheler, J. (1984) : Inward-rectifying channels in isolated patches of the heart cell membrane: ATP-dependence and comparison with cell-attached patches. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology* **401**, 178-184

- Tucker, S. J., Gribble, F. M., et al. (1997) : Truncation of Kir6.2 produces ATP-sensitive K⁺ channels in the absence of the sulphonylurea receptor. *Nature* **387**, 179-183
- Tusnády, G. E., Bakos, E., et al. (1997) : Membrane topology distinguishes a subfamily of the ATP-binding cassette (ABC) transporters. *FEBS Letters* **402**, 1-3
- Ueda, K., Inagaki, N., et al. (1997) : MgADP antagonism to Mg²⁺-independent ATP binding of the sulphonylurea receptor SUR1. *The Journal of Biological Chemistry* **272** , 22983-22986
- Ueda, K., Matsuo, M., et al. (1999) : Comparative aspects of the function and mechanism of SUR1 and MDR1 proteins. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1461**, 305-313
- Uhde, I., Toman, A., et al. (1999) : Identification of the potassium channel opener site on sulphonylurea receptors. *The Journal of Biological Chemistry* **274**, 28079-28082
- Venkatesh, N., Lamp, S. T., et al. (1991) : Sulphonylureas, ATP-sensitive K⁺ channels, and cellular K⁺ loss during hypoxia, ischemia, and metabolic inhibition in mammalian ventricle. *Circulation Research* **69**, 623-637
- Walker, J. E., Saraste, M., et al. (1982) : Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *The EMBO Journal* **1**, 945-951
- Yamada, M., Isomoto, S., et al. (1997) : Sulphonylurea receptor 2B and Kir6.1 form a sulphonylurea-sensitive but ATP-insensitive K⁺ channel. *Journal of Physiology-London* **499**, 715-720
- Yatani, A., Okabe, K., et al. (1990) : Heart rate regulation by G proteins acting on the cardiac pacemaker channel. *Science* **249**, 1163-1166
- Yu, Y., de Groat, W. C. (1998) : Effects of ZD6169, a KATP channel opener, on bladder hyperactivity and spinal c-fos expression evoked by bladder irritation in rats. *Brain Research* **807**, 11-18
- Zerangue, N., Schwappach, B., et al. (1999) : A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane K_{ATP} channels. *Neuron* **22**, 537-548
- Zingman, L. V., Alekseev, A. E., et al. (2001) : Signaling in channel/enzyme multimers: ATPase transitions in SUR module gate ATP-sensitive K⁺ conductance. *Neuron* **31**, 233-245

Danksagungen:

Ich möchte an dieser Stelle meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Ulrich Quast für die Bereitstellung des Themas und für die hervorragende Betreuung während der Anfertigung dieser Arbeit danken.

Danken möchte ich auch den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Quast, die durch ihre Freundlichkeit und Hilfsbereitschaft für eine sehr angenehme Arbeitsatmosphäre sorgten. Insbesondere gilt mein Dank Frau Cornelia Löffler-Walz für ihre kompetente Betreuung im Labor. Frau Eva Stauß, Herrn Alexander Klein, Herrn Ulf Lange und Herrn Dr. Ulrich Ruß danke ich für die nette, freundschaftliche Zusammenarbeit. Frau Dr. Annette Hambrock und Frau Claudia Müller bin ich für die Bereitstellung der transient transfizierten Zellen sehr verbunden.

Herrn Murali Gopalakrishnan und den Abbot Laboratories danke ich für die Bereitstellung des Liganden A-312110.

Zuletzt möchte ich meiner Mutter meinen größten Dank aussprechen für ihre stetige und großzügige Unterstützung, ohne die mein Studium in dieser Form nicht möglich gewesen wäre. Ihr widme ich diese Arbeit.

H O L G E R F E L S C H

PERSÖNLICHE DATEN

- Geburtsdatum: 30.04.1970
- Geburtsort: Stuttgart , Deutschland

SCHULBILDUNG

1977 - 1981 Grundschule

1981 - 1990 Gymnasium in Korntal, Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

ERSATZDIENST

6.1990 – 8.1991 Zivildienst bei der Evangelischen Altenheimat, Stuttgart - Stammheim

BERUFSAUSBILDUNG

4.1993 – 3.1996 Ausbildung zum Krankenpfleger am Katharinenhospital, Stuttgart

BERUFSTÄTIGKEIT

4.1996 – 3.1998 Beschäftigung als Krankenpfleger am Katharinenhospital, Stuttgart

STUDIUM

10.91 – 3.92	Studium der Informatik in Karlsruhe
April 1998	Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls Universität in Tübingen
März 2000	Ärztliche Vorprüfung
März 2001	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
September 2001	Beginn der Promotionsarbeit am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Tübingen
März 2003	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Oktober 2003	Beginn des Praktischen Jahres
9.11.2004	Abschluss des 3. Staatsexamens

FAMULATUREN

- August 2000 Hämatologische Abteilung des Universitätsklinikum Tübingen
- September 2001 Toledo Hospital und Toledo Children's Hospital, Ohio USA in der Abteilung für Emergency Medicine
- Juli 2002 Abteilung für Allgemeine Innere Medizin an der Filderklinik, Filderstadt - Bonlanden