

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität
Tübingen

Direktor: Professor Dr. H. Oßwald
Abteilung für Molekularpharmakologie
Abteilungsleiter: Professor Dr. U. Quast

Die Mutation Y1206S steigert die Affinität des
Sulfonylharnstoffrezeptors SUR2A für Glibenclamid und
unterstützt den Einfluß der Koexpression mit K_{IR}6.2

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Eva Stauß
aus
Albstadt

2006

Dekan: Herr Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Herr Professor Dr. U. Quast

2. Berichterstatter: Frau Privatdozentin Dr. I. Kötter

In Liebe und Dankbarkeit
meinen Eltern Edith und Hermann Stauß
und meiner Tochter Sophie gewidmet

1	EINLEITUNG	7
1.1	Die Plasmamembran	7
1.2	Ionenkanäle.....	7
1.3	Kaliumkanäle	9
1.3.1	Einwärtsgleichrichtende Kaliumkanäle (K_{IR}).....	11
1.3.2	Tandem-Kaliumkanäle (K_{2P}).....	12
1.3.3	Spannungsabhängige Kaliumkanäle (K_V)	13
1.4	Definition der K_{ATP} -Kanäle: Vorkommen und Funktion.....	14
1.5	Physiologische Rolle der K_{ATP} -Kanäle	15
1.5.1	Funktion der K_{ATP} -Kanäle unter physiologischen Bedingungen	15
1.5.2	Funktion der K_{ATP} -Kanäle in Ischämie und Hypoxie	17
1.6	K_{ATP} -Kanalkrankheiten	19
1.6.1	Persistierende hyperinsulinämische Hypoglykämie im Kindesalter.....	19
1.6.2	Rolle des K_{ATP} -Kanals bei nicht-insulinabhängigem Diabetes mellitus Typ 2 (NIDDM).....	20
1.6.3	K_{IR} - und K_V - assoziierte Kaliumkanalkrankheiten.....	21
1.7	Molekulare Struktur und Stöchiometrie der K_{ATP} -Kanäle.....	23
1.7.1	Die α -Untereinheit $K_{IR6.x}$	25
1.7.2	Die β -Untereinheit SUR	26
1.8	Die Gene von $K_{IR6.x}$ und SUR	27
1.8.1	Die Gene von $K_{IR6.x}$	27
1.8.2	Die Gene von SUR	29
1.9	Regulation der K_{ATP} -Kanäle.....	30
1.10	Wirkungsweise und therapeutisches Potential von K_{ATP} -Kanalmodulatoren.....	34
1.10.1	K_{ATP} -Kanalöffner	34
1.10.2	K_{ATP} -Kanalblocker.....	37
1.10.3	Überblick über die gewebespezifische Zusammensetzung, Verteilung und Pharmakologie der K_{ATP} -Kanäle	42
1.11	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	43
2	MATERIAL UND METHODEN	45
2.1	Chemikalien	45
2.2	Puffer und Medien	47
2.3	HEK-293-Zellen	52
2.3.1	Kultivierung der HEK-293-Zelllinie	52
2.3.2	Transfektion.....	53
2.3.3	Einfrieren von HEK-293-Zellen	53
2.3.4	Auftauen von HEK-293-Zellen.....	54
2.3.5	Herstellung einer mikrosomalen Membranfraktion aus HEK-293-Zellen	55
2.3.6	Präparation von ganzen HEK-293-Zellen.....	56
2.4	Proteinbestimmung.....	57

2.5	Radioligandenbindungsexperimente	59
2.5.1	Wahl des Radioliganden	60
2.5.2	Gewinnung von Rezeptormaterial.....	61
2.5.3	Inkubationsansätze und Inkubationsbedingungen.....	61
2.5.4	Trennung von gebundenem und freiem Radioliganden	63
2.5.5	Messung der Radioaktivität	64
2.6	Modell der Rezeptorbindungsstudien.....	65
2.6.1	Kompetitionsexperimente.....	66
2.6.2	Verallgemeinerung der Bindungsisotherme nach Hill.....	68
2.6.3	Sättigungsexperimente	70
2.7	Datenauswertung	71
2.7.1	Kompetitionsexperimente mit [³ H]-P1075	71
2.7.2	Kompetitionsexperimente mit [³ H]-GBC.....	71
2.7.3	Sättigungsexperimente	72
2.8	Statistik.....	72
3	ERGEBNISSE.....	74
3.1	Bindung von [³ H]-GBC an SUR2A(Y1206S) in HEK-293-Zellmembranen und in ganzen Zellen.....	74
3.1.1	Homologe Verdrängung der [³ H]-GBC-Bindung durch GBC an SUR2A(Y1206S) in HEK-293-Zellmembranen in An- und Abwesenheit von 1 mM ATP + 2.2 mM Mg ²⁺	74
3.1.2	Hemmung der [³ H]-GBC Bindung an SUR2A(Y1206S) durch GBC in ganzen Zellen	78
3.2	Sättigungsexperimente der [³ H]-GBC-Bindung an HEK-293-Zellmembranen transient transfiziert mit SUR2A(Y1206S)/K _{IR} 6.2 in Abwesenheit von MgATP	81
3.3	Hemmung der [³ H]-GBC-Bindung an SUR2A(Y1206S) in HEK-293-Zellmembranen durch P1075	84
3.4	[³ H]-P1075-Bindungsexperimente mit SUR2A(Y1206S) in Membranen aus HEK-293-Zellen, die den Rezeptor stabil exprimieren.....	86
3.4.1	Homologe Verdrängung der [³ H]-P1075-Bindung durch sein nicht-markiertes Analogon.....	86
3.4.2	Hemmung der [³ H]-P1075-Bindung durch Levromakalim.....	87
3.4.3	Hemmung der [³ H]-P1075-Bindung durch Glibenclamid	89
3.5	[³ H]-P1075-Bindungsexperimente an HEK-293-Zellmembranen transient transfiziert mit SUR2A/K _{IR} 6.2 - Effekt von Glibenclamid auf die [³ H]-P1075-Bindung	91
4	DISKUSSION.....	93
4.1	Tabellarische Zusammenstellung der Ergebnisse	94
4.1.1	Bindungsexperimente mit [³ H]-GBC an HEK293B-Zellmembranen und an intakten HEK293B-Zellen permanent transfiziert mit SUR2A(Y1206S)	94
4.1.2	Bindungsexperimente mit [³ H]-P1075 an HEK293B-Zellmembranen permanent transfiziert mit SUR2A(Y1206S) bzw. transient transfiziert mit SUR2A/K _{IR} 6.2	95
4.2	Effekt der Mutation auf die [³ H]-GBC Bindung.....	96
4.2.1	Effekt von MgATP	96
4.2.2	Effekt der Koexpression mit K _{IR} 6.2	98

4.3	Effekt der Mutation auf die Öffnerbindung ($[^3\text{H}]$ -P1075).....	99
4.4	Die allosterische Wechselwirkung zwischen GBC und P1075.....	101
4.4.1	$[^3\text{H}]$ -GBC – P1075 Verdrängungsmessung mit und ohne MgATP	101
4.4.2	$[^3\text{H}]$ -P1075 – GBC Verdrängungsmessungen mit MgATP.....	102
4.5	Bindungsverhalten von SUR2A und SUR2A(Y1206S) versus SUR2B und SUR2B(Y1206S).....	103
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	105
6	ABKÜRZUNGEN UND TRIVIALNAMEN	108
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	110

1 Einleitung

1.1 Die Plasmamembran

Der Grundbaustein biologischer Membranen, wie zum Beispiel die Plasmamembran eukaryotischer Zellen, ist die etwa 5 nm dicke Phospholipid-Doppelschicht.

Die primäre Funktion der Plasmamembran aller Zellen besteht in der Abtrennung des Inneren der Zelle von der Umgebung. Sie stellt eine Diffusionsbarriere zwischen Zytoplasma und Extrazellulärraum dar. Aufgrund aktiver Transportprozesse, vor allem der Na/K-ATPase kommt es zur Ausbildung außerordentlich großer Gradienten zwischen intra- und extrazellulärem Raum. Dies trifft insbesondere für Ionen (Na^{2+} , K^+ , Ca^{2+}), aber auch für niedermolekulare Verbindungen wie Glucose, Aminosäuren, für welche die Plasmamembran impermeabel ist, zu. Um dennoch den Austausch von geladenen Teilchen zu ermöglichen, befinden sich in der Plasmamembran integrale Transportproteine, wie zum Beispiel Ionenkanäle, die nach dem „fluid-membrane“-Konzept in der Doppellipidschicht "schwimmen".

1.2 Ionenkanäle

Ionenkanäle sind meist aus mehreren Untereinheiten bestehende integrale Membranproteine, die hydrophile Poren in der Lipiddoppelschicht der Zellmembran und in der Membran intrazellulär gelegener Zellorganellen ausbilden. Sie ermöglichen den Transport anorganischer Ionen, wie Na^{2+} , K^+ , Ca^{2+} oder Cl^- , zwischen Zytoplasma und Extrazellulärraum und besitzen die Fähigkeit hochfrequent zwischen offenem und geschlossenem Kanalzustand hin und her zu schalten.

Die Ionenbewegung erfolgt durch passive Diffusion entlang des elektrochemischen Gradienten und geht mit einer hohen Leitungsgeschwindigkeit von bis zu 10^9 Ionen/s pro Kanal einher. Dadurch

unterscheiden sie sich im Wesentlichen von Transportern oder Pumpen.

Die meisten Kanäle besitzen eine Ionenselektivität, die nur bestimmten Ionen den Durchtritt erlaubt (z.B. K^+ -Ionen bei Kalium-Kanälen). Die Selektivität wird auf der einen Seite durch die Größe des Ions mitsamt seiner Hydrathülle im Verhältnis zum Kanaldurchmesser, auf der anderen Seite von Interaktionen des Ions mit bestimmten Aminosäureresten der Pore bestimmt. Diese Engstellen wirken als Selektivitätsfilter. Um den Ionenkanal passieren zu können, muß das Ion einen Großteil seiner Hydrathülle durch schwache Bindung an die Pore ersetzen. Da der Verlust der Hydrathülle für das Ion energetisch ungünstig ist, wird es den Kanal nur dann durchqueren, wenn die Bindung dies energetisch kompensiert (Doyle et al., 1998).

Der Ionenstrom durch einen solchen Kanal hängt von der Leitfähigkeit des Kanals und dem elektrochemischen Gradienten für das durchgehende Ion ab.

Die Leitfähigkeit wird in Siemens $[S]$ angegeben und beschreibt die Anzahl der passierenden Ionen (in Coulomb) pro Zeiteinheit und pro Volt-Spannungsdifferenz. Die physiologische Leitfähigkeit der Ionenkanäle bewegt sich im Bereich von pico-Siemens ($1pS = 10^{-12}S$).

Die Selektivität und die Tatsache, dass Ionenkanäle sich nicht ständig in geöffnetem Zustand befinden, sondern dass ihre Aktivität gesteuert wird, unterscheidet sie von einfachen, wassergefüllten Poren in der Zellmembran.

Die Öffnung von Ionenkanälen wird über verschiedene Reize geregelt. Diese sind bei spannungsabhängigen Ionenkanälen Änderungen des Membranpotentials, bei mechanisch kontrollierten Ionenkanälen die mechanische Belastung und bei ligandengekoppelten Ionenkanälen die Bindung eines Signalmoleküls.

Im Falle der ligandgesteuerten Ionenkanäle wird durch die Bindung extrazellulärer Botenstoffe, wie Hormone oder Neurotransmitter, die Kanalaktivität direkt oder indirekt über intrazellulär aktive Transduktionssysteme, wie die second messenger IP_3 (Inositol-1,4,5-Triphosphat), Ca^{2+} , G-Proteine, Nukleotide oder PIP_2 (Phosphatidyl-Inositol-Bisphosphat), moduliert.

Zusätzlich kann die Aktivität von Ionenkanälen durch Protein-(De)-

Phosphorylierung geregelt sein (Hille, 1992; Süßbrich & Busch 1998).

Die Plasmamembran der meisten Zellen besitzt im Ruhezustand eine höhere Permeabilität für Kaliumionen als für andere Ionen, wie Na^{2+} , Ca^{2+} oder Cl^- . Kaliumkanäle nehmen hierdurch eine Schlüsselrolle in der Regulation bestimmter zellulärer Parameter, wie die Einstellung des Ruhemembranpotentials, die Erregbarkeit der Zelle oder das Zellvolumen, ein (Hille, 1992).

1.3 Kaliumkanäle

Kaliumkanäle sind ubiquitär, sowohl in erregbaren als auch unerregbaren Geweben, vorhanden. Mit ihrer hohen Leitfähigkeit für K^+ -Ionen obliegt ihnen eine bedeutende Rolle in der Regulation des Ruhemembranpotentials (RP) der Zellen.

Das Ruhemembranpotential entspricht im Idealfall dem K^+ -Gleichgewichtspotential (Äquilibriumpotential E_{K^+}), welches nach der Nernst'schen Gleichung

$$E = \frac{R \cdot T}{z \cdot F} \ln \frac{\text{extrazelluläre Konz. des Ions}}{\text{intrazelluläre Konz. des Ions}}$$

Gleichung 1

R = allg. Gaskonstante ($8.3\text{J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ bzw. $\text{V} \cdot \text{A} \cdot \text{s} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$)

T = absolute Temperatur (K; 273 + Grad Celsius)

z = Wertigkeit des Ions (negativer Wert bei Anionen)

F = Faradaysche Zahl ($96500 \text{C} \cdot \text{mol}^{-1}$ bzw. $\text{A} \cdot \text{s} \cdot \text{mol}^{-1}$)

bei etwa -90 mV liegt. Aufgrund geringer, aber kontinuierlich vorhandener Na^{2+} - und Ca^{2+} -Einströme, sowie Cl^- -Ausstrom entfernt sich das RP vom E_{K} und bewegt sich gewebeabhängig zwischen -80 mV und -30 mV (Hille, 1992).

Die Schließung von K^+ -Kanälen bewirkt eine Anreicherung von K^+ -Ionen in der Zelle. Daraus resultiert eine Depolarisation des RP auf -60 mV bis -40 mV und

führt in erregbaren Geweben (Neuronen, Herzmuskelzellen) zur Aktivierung spannungsabhängiger Na^{2+} - und Ca^{2+} -Kanäle, die ein Aktionspotential (AP) auslösen.

Durch einen vermehrten K^+ -Ausstrom aus der Zelle, wie er beim Öffnen von K^+ -Kanälen stattfindet, verschiebt sich das MP in Richtung K^+ -Gleichgewichtspotential E_K und bewirkt somit eine Re- oder Hyperpolarisation. Im Falle eines ausgelösten AP bewirkt der K^+ -Ausstrom über eine rasche Erregungsrückbildung den Wiederaufbau des MP und verhindert die Auslösung weiterer Aktionspotentiale (Repolarisation).

Kaliumkanäle bestehen aus homologen α -Untereinheiten, welche die Pore des Kanals ausbilden und in Form eines Di- oder Tetramers angeordnet sind (Hille, 1992 und Doyle et al., 1998).

Zu dieser Grundeinheit können häufig noch sog. β -Untereinheiten treten, die für die Regulation der Kanalaktivität eine wichtige Rolle spielen (Hille, 1992 und Quayle et al., 1997).

Die molekulare Struktur der Kaliumkanäle ermöglicht eine Einteilung in drei verschiedene Klassen. Dabei entscheidet die Anzahl der α -helikalen Transmembransegmente der α -Untereinheit über die Zugehörigkeit zu einer der Klassen:

K_{IR} -Kanäle enthalten zwei Transmembransegmente (M1 und M2), K_{V} -Kanäle sechs und Tandem-Kaliumkanäle bestehen aus 2×2 oder $6 + 2$ Transmembransegmenten.

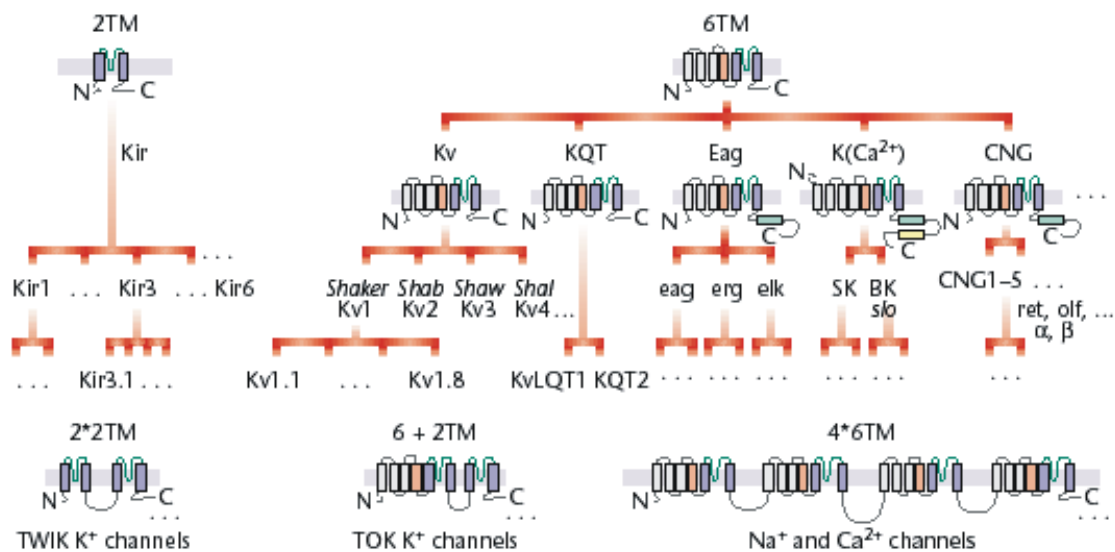


Abbildung 1: Überblick über die molekulare Struktur der porenbildenden α -Untereinheiten des Kaliumkanals. Ausgehend von der Anzahl der Transmembransegmente ist eine Einteilung in drei verschiedene Klassen möglich. Hauptstruktur der K_{IR} -Kanäle sind zwei Transmembransegmente mit einem intramembranär gelegenen H5-Segment. Dieser basale Baustein findet sich auch in den K_V -Kanälen wieder. Tandem-Kaliumkanäle (K_{2P}), wie z.B. TWIK1-(2*2TM) und TOK1-Kanäle (6+2TM), sind weitere kanalbildende Proteine, die vermutlich durch Genduplikation und Spleißen entstanden sind (Heinemann, 2001).

1.3.1 Einwärtsgleichrichtende Kaliumkanäle (K_{IR})

K_{IR} -Kanäle lassen sich in mehr als sieben verschiedene Kanal-Subtypen unterteilen und stellen aufgrund ihrer molekularen Struktur einen basalen Baustein der Kaliumkanäle dar.

Gene dieser Gruppe von Kaliumkanälen kodieren für Proteine, welche im Durchschnitt aus ~360-500 Aminosäuren bestehen. Allen K_{IR} -Kanälen ist die Hauptstruktur, bestehend aus zwei Transmembransegmenten (M1 und M2), die die Kanalpore mit einem intramembranär gelegenen H5-Segment flankieren, gemeinsam. Das H5-Segment bestimmt die K^+ -Selektivität und enthält in Abhängigkeit des Kanal-Subtyps die Signatursequenz Gly-Tyr-Gly (GYG) oder Gly-Phe-Gly (GFG) (Nichols & Lopatin, 1997; Doupnik et al., 1995). K_{IR} -Kanäle existieren in ihrer funktionellen Form als Tetramere und können sowohl aus vier identischen (homomer), als auch aus verschiedenen Untereinheiten aufgebaut sein. So treten zum Beispiel die α -Untereinheiten $K_{IR1.x}$, $K_{IR2.x}$ und $K_{IR6.x}$ in

vivo als Homotetramere auf. Im Gegensatz dazu existieren $K_{IR3.x}$ -Kanäle im Gehirn ($K_{IR3.1}+K_{IR3.2}$) und im Herzen ($K_{IR3.1}+K_{IR3.4}$) als Heterotetramere (Reimann & Ashcroft, 1999).

Die beiden Transmembransegmente M1 und M2 entsprechen den Segmenten S5 und S6 des K_V -Kanals und können somit als „funktionelles Fragment“ des K_V -Kanals verstanden werden.

K_{IR} -Kanäle werden ubiquitär auf der Zelloberfläche unterschiedlicher Gewebetypen exprimiert und spielen eine wichtige Rolle in der Regulation des Ruhemembranpotentials, der Aufrechterhaltung der K^+ -Hämostase, der Kontrolle der Herzfrequenz und der Hormonsekretion.

Ein wichtiges Charakteristikum einwärtsgerichteter K^+ -Kanäle (K_{IR} -Kanäle = inward rectifying potassium channel) ist deren Fähigkeit, K^+ -Ionen besser in die Zelle hinein, als herauszuleiten.

Bei einem Abfall des Membranpotentials auf etwa -70 mV wird der K_{IR} auswärtsleitend und durch positiv geladene Substanzen (Mg^{2+} , Polyamine), die sich von innen in die Kanalpore legen, verschlossen und inaktiviert (Doupnik et al., 1995).

Der K_{IR} ist als α -Untereinheit ein wichtiger Bestandteil des in den nachfolgenden Kapiteln beschriebenen ATP-abhängigen K^+ -Kanals.

1.3.2 Tandem-Kaliumkanäle (K_{2P})

Die Tandem-Kanäle (K_{2P}) gehören zu einer Klasse von Kaliumkanälen, bei denen in einer Untereinheit zwei Porenregionen hintereinander angeordnet sind, so dass für einen vollständigen Kanal nur zwei Untereinheiten erforderlich sind (Ketchum et al., 1995).

Als deren Vertreter seien die TOK1- (Two P-region-containing outwardly rectifying K⁺-channel) und die TWIK1-Kanäle (Tandem of P domains in a weak inward rectifying K⁺-channel) zu nennen.

Diese Kanäle sind in den verschiedensten Geweben verbreitet und erzeugen einen kontinuierlichen, spannungsunabhängigen, schwach gleichrichtenden

Kaliumstrom. Ihre biologische Bedeutung liegt in der Aufrechterhaltung einer Hintergrundleitfähigkeit.

1.3.3 Spannungsabhängige Kaliumkanäle (K_V)

Die spannungsabhängigen K^+ -Kanäle (K_V -Kanäle, voltage dependent) bilden die größte Gruppe der K^+ -Kanäle. In Zellen erregbarer Gewebe (Neuronen, Myozyten) bedingen sie nach Abschluß eines Aktionspotentials die Repolarisation der Zellen. Sie weisen eine ausgeprägte Auswärtsgleichrichtung der K^+ -Leitfähigkeit auf.

Die α -Untereinheit des K_V -Kanals besteht aus 6 α -heilkalen Transmembransegmenten. Das Transmembransegment S4 dient als Spannungssensor. Zwischen Transmembransegment S5 und S6 liegt die hoch konservierte H5-Domäne, welche zum einen die Kanalpore ausbildet (Jan & Jan, 1997) und zum anderen die Ionenselektivität des Kanals bestimmt. Dieser Selektivitätsfilter besteht aus einem Tripeptid –Gly-Tyr(Phe)-Gly-, das in allen Kaliumkanälen gleich ist.

Calcium-abhängige Kaliumkanäle (K_{Ca})

Ca^{2+} -abhängige Kaliumkanäle (K_{Ca}) zeigen eine strukturelle Verwandtschaft zu den K_V -Kanälen und sind in zahlreichen Zelltypen zu finden.

Die Kanalaktivität wird neben der Spannungsabhängigkeit dieser Kanäle durch die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration moduliert.

Hinsichtlich der Leitfähigkeit und Dauer der Aktivierung bzw. Inaktivierung lassen sich zwei Arten von K_{Ca} -Kanälen unterscheiden.

K_{Ca} -Kanäle mit hoher Leitfähigkeit, schneller Aktivierung (1-2 ms) und Inaktivierung (~10ms) (Rudy et al., 1988 und Butler et al., 1993) dienen der schnellen Re- bzw. Hyperpolarisation von depolarisierten Zellen mit dadurch bedingten hohen intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen.

K_{Ca} -Kanäle mit geringer Leitfähigkeit, langsamer Aktivierung und Inaktivierung (Rudy et al., 1988 und Köhler et al., 1996) verhindern durch die

Hyperpolarisation der Membran einen vermehrten Ca^{2+} -Influx über spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle. Dadurch wird die Zelle vor Übererregung und erhöhten intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen geschützt.

1.4 Definition der K_{ATP} -Kanäle: Vorkommen und Funktion

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

Sie wurden erstmals 1983 durch Noma (Noma, 1993 und Trube & Hescheler, 1984) mit Hilfe der Patch-clamp-Technik im Herzmuskel entdeckt. Nachfolgende Studien zeigten, dass dieser Kanaltyp in einer Vielzahl verschiedener Gewebe- und Zelltypen zu finden ist; so zum Beispiel in pankreatischen β -Zellen, Neuronen, Herz- und Skelettmuskelzellen, in Zellen glatter Muskulatur, im Nierenepithel und sogar in Mitochondrien (Quast, 1996). Charakteristische Eigenschaft dieser Kanäle ist die Fähigkeit, eine enge Verbindung, zwischen den sich fortlaufend ändernden metabolischen Zuständen, gegeben durch ATP und ADP, der Zelle auf der einen Seite und der elektrischen Aktivität der Zellmembran auf der anderen Seite, herzustellen (Ashcroft & Ashcroft, 1990; Edwards & Weston, 1993 und Aguilar-Bryan et al., 1998).

Ein Anstieg der intrazellulären ATP-Konzentration führt zur Hemmung ihrer Aktivität. Werden umgekehrt K_{ATP} -Kanäle in ATP-freies Medium gebracht, so gewinnen sie an Aktivität, was sich in einer höheren Offenwahrscheinlichkeit zeigt.

Neben ATP reagieren sie auch auf dessen Abbauprodukt MgADP, das zur Aktivierung bzw. Öffnung der K^+ -Kanäle führt. Im Zellgefüge wird die Aktivität von K_{ATP} -Kanälen maßgeblich durch das Verhältnis von ATP zu ADP, das häufig auch als Energieladung der Zelle bezeichnet wird, bestimmt.

Neben ihrer Nukleotidempfindlichkeit sind K_{ATP} -Kanäle, die spannungsunabhängig arbeiten, schwache Einwärtsgleichrichter für die K^+ -

Leitfähigkeit (Ashcroft & Ashcroft, 1990).

Aufgrund ihrer molekularen Struktur und ihrer vielfältigen Eigenschaften stellen K_{ATP} -Kanäle therapeutisch wichtige Angriffspunkte für Pharmaka dar.

Im Rahmen des insulinunabhängigen Diabetes mellitus Typ II (NIDDM) fördern orale Antidiabetika wie Sulfonylharnstoffe die Insulinsekretion aus pankreatischen β -Zellen durch Inhibition des Kanals. Der therapeutische Einsatz sogenannter K_{ATP} -Kanalöffner als Antihypertensiva bei refraktärem Hypertonus bewirkt durch die Öffnung von K_{ATP} -Kanälen in der glatten Gefäßmuskulatur eine starke Senkung des totalen peripheren Widerstandes.

Desweiteren wird die Aktivität der K_{ATP} -Kanäle durch Phospholipide wie PIP_2 (Baukrowitz et al., 1998) und Oleyl-CoA (Liu et al., 2001), durch Phosphorylierung (Béguin et al., 1999; Lin et al., 2000) und durch G-Proteine (Sánchez et al., 1998) moduliert.

1.5 Physiologische Rolle der K_{ATP} -Kanäle

1.5.1 Funktion der K_{ATP} -Kanäle unter physiologischen Bedingungen

ATP-abhängige Kaliumkanäle (K_{ATP} -Kanäle) spiegeln über ihren Aktivitätszustand intrazelluläre metabolische Veränderungen wieder. Daher spielen sie eine sehr wichtige Rolle unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen.

Während intrazelluläres ATP diese Kanäle schließt, werden sie durch dessen Abbauprodukt MgADP geöffnet.

Die Öffnung von Kaliumkanälen führt durch Ausstrom von K^+ zu einer Hyperpolarisation des Membranpotentials in Richtung des Kalium-Gleichgewichtspotentials von ca. -80 mV, wohingegen die Schließung zur Depolarisation des Ruhemembranpotentials (= K^+ - Gleichgewichtspotential) und nachfolgend zur Aktivierung anderer Ionenkanäle führt.

In pankreatischen β -Zellen ist die physiologische Rolle der K_{ATP} -Kanäle bisher am besten untersucht. Dort spielen sie eine Schlüsselrolle in der Regulation der Insulinfreisetzung.

Postprandial kommt es zu einem vorübergehenden Anstieg der Blutglucosekonzentration. Wie in Abbildung 2 dargestellt, wird dabei Glucose durch den Transporter GLUT2 (a) in die β -Zellen aufgenommen. Durch aerobe Glykolyse wird unter Verbrauch von ADP energiereiches ATP synthetisiert. Dies bewirkt eine Verschiebung des ADP/ATP-Verhältnisses (b) und dadurch eine Schließung der K_{ATP} -Kanäle. Daraus folgt eine Depolarisation (c) der β -Zellmembran, so dass sich spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle (VOCC = voltage operated calcium channel) öffnen und der resultierende Ca^{2+} -Einstrom mit nachfolgendem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (d) die Exozytose (e) von Insulinvesikeln auslöst (siehe Abbildung 2).

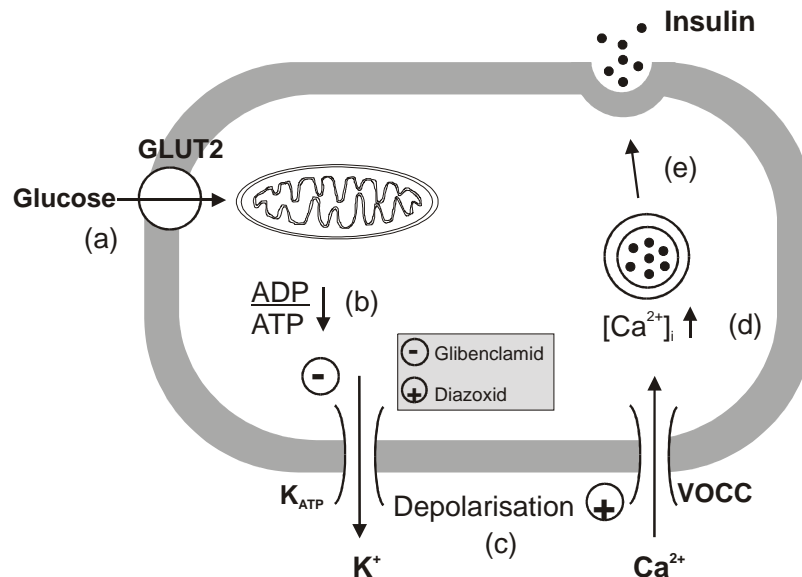


Abbildung 2: Modell der Insulinfreisetzung aus den β -Zellen des Pankreas. Nach Quast 2000 (freundlicherweise überlassen von Conny Walz)

1.5.2 Funktion der K_{ATP} -Kanäle in Ischämie und Hypoxie

Unter metabolisch ungünstigen Bedingungen, das Verhältnis von intrazellulärem ATP verschiebt sich zu Gunsten seines Abbauproduktes ADP, öffnen sich die K_{ATP} -Kanäle der Zelle. Dies führt zu einer Verschiebung des Ruhemembranpotentials (RP) in Richtung des K^+ -Gleichgewichtspotentials (E_K). Die Zelle wird hyperpolarisiert und entfernt sich von der Aktivierungsschwelle der spannungsabhängigen Ionenkanäle. Am Beispiel des Herzens äußert sich dies in einer Verkürzung der Dauer der Aktionspotentiale, so dass es über eine Verlangsamung des Ca^{2+} -Einstroms zu einer Abschwächung der Kontraktilität des Herzmuskels kommt und somit der Verbrauch an energiereichem ATP gesenkt wird.

Für das Myokard stellt dieser Mechanismus einen gewissen Schutz vor hypoxischen Schäden dar, da die K_{ATP} -Kanäle des Herzens (SUR2A/ $K_{IR}6.2$) unter normalen Bedingungen geschlossen sind (Nichols et al., 1991 und Cavero et al., 1995).

Die Öffnung kardialer K_{ATP} -Kanäle bei Ischämie und Hypoxie ist ein Teil des Schutzmechanismus` des Myokards, der als ischämische Präkonditionierung des Myokards, kurz IPC, bezeichnet wird. Durch vorangehende kurze Ischämiephasen, vorstellbar bei der Angina pectoris, wird dieser Mechanismus aktiviert und schützt so während längerer Perioden der Ischämie das Myokard vor Infarzierung (Murry et al., 1986; Gross & Fryer 1999 und Cohen et al., 2000).

Es gibt eine Reihe von Hinweisen, dass am Mechanismus der IPC auch die Öffnung von mito K_{ATP} -Kanälen beteiligt ist.

Die Existenz eines K_{ATP} -Kanals (mito K_{ATP}) in der Membran von Mitochondrien wurde erstmals von Inoue et al. (1991) mit Hilfe elektrophysiologischer Untersuchungen nachgewiesen. Außerdem zeigten sie, dass zwischen dem mito K_{ATP} -Kanal und dem Oberflächen- K_{ATP} -Kanal (sarco K_{ATP}) ähnliche Eigenschaften bestehen: beide Kanäle sind durch ATP und durch GBC inhibierbar. Die Funktion der mitochondrialen K_{ATP} -Kanäle scheint über den K^+ / H^+ -Antiport eng mit der Kontrolle des Zellvolumens verbunden zu sein

(Garlid, 1996), wohingegen sich die der Oberflächen- K_{ATP} -Kanäle in der Regulation der elektrischen Aktivität widerspiegelt.

Garlid et al. (1997) konnten zeigen, dass Diazoxid in der Lage war, den $mitoK_{ATP}$ -Kanal mit bis zu 2000-fach höherer Potenz zu öffnen, als den Oberflächen- K_{ATP} -Kanal ($sarck_{ATP}$). Im Gegensatz dazu gingen Jung et al. (2000) davon aus, dass der $sarck_{ATP}$ -Kanal bei der IPC von untergeordneter Bedeutung ist. Der Vergleich von HMR-1883, einem selektiven Blocker des Oberflächen- K_{ATP} -Kanals, und Glibenclamid, zeigte, dass HMR-1883 keinen negativen Einfluß auf die IPC hatte. Dagegen wurde der kardioprotektive Effekt der IPC durch GBC, eine Substanz, die sowohl ihre Wirkung an $sarck_{ATP}$, als auch an $mitoK_{ATP}$ entfaltet, vollständig aufgehoben. Diese Ergebnisse legen die Schlussfolgerung nahe, dass der protektive Effekt von Diazoxid und anderen K^+ -Kanalöffnern über deren Interaktion mit mitochondrialen K_{ATP} -Kanälen vermittelt wird.

Die Regulation der $mitoK_{ATP}$ -Kanäle erfolgt vermutlich durch verschiedene Substanzen, allen voran Adenosin, aber auch Bradykinin, Opioide und freie Radikale. Während der Ischämie werden sie von den Kardiomyozyten freigesetzt und binden an entsprechende Rezeptoren. Über G-Proteine wird eine komplexe Signaltransduktionskaskade, die zur Stimulation der Phospholipase C und/oder D führt und über die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) schließlich den $mitoK_{ATP}$ -Kanal aktiviert, in Gang gesetzt (Cohen et al., 2000).

Obwohl vieles darauf hindeutet, dass der $mitoK_{ATP}$ -Kanal der eigentliche Vermittler der IPC ist, sollte doch nicht vergessen werden, dass die Beeinflussung des Energiemetabolismus der Zelle durch $mitoK_{ATP}$ (z.B. durch in Mitochondrien entstehende ROS (= reactive oxygen species)) zu Sekundäreffekten an $sarck_{ATP}$ führen könnte. Umgekehrt könnte die Beeinflussung des Membranpotentials (z.B. durch $sarck_{ATP}$) zu einer Veränderung der Aktivität der $mitoK_{ATP}$ führen.

In Neuronen und Skelettmuskeln lässt sich unter hypoxischen, hypoglykämischen oder ischämischen Bedingungen ebenfalls eine zytoprotektive Wirkung durch Öffnung von K_{ATP} -Kanälen beobachten.

Die Öffnung von K_{ATP} -Kanälen in den Zellen der glatten Gefäßmuskulatur führt zu einer Vasorelaxation. Sie wird unter anderem durch Hypoxie, aber auch durch endogene Vasodilatoren, wie zum Beispiel die Neuropeptide VIP (vasoactive intestinal petide) und CGRP (calcitonin gene related peptide), sowie Adenosin und Prostazyklin vermittelt (Quayle et al., 1997). K_{ATP} -Kanäle sind wichtige Determinanten des Gefäßtonus und dienen als Angriffspunkt für einige Medikamente, die bei refraktärem Hypertonus und der hypertensiven Krise zum Einsatz kommen (z.B. Minoxidil, Diazoxid).

Die K_{ATP} -Kanäle der juxtaglomerulären Zellen der Niere (umgewandelte glatte Gefäßmuskelzellen) sind an der Regulation der Reninsekretion beteiligt. Im Tubulusepithel der Nieren spielen K_{ATP} -Kanäle eine wichtige Rolle bei der Ionenrückresorption (Quast, 1996).

1.6 K_{ATP} -Kanalkrankheiten

1.6.1 Persistierende hyperinsulinämische Hypoglykämie im Kindesalter

Pathophysiologische Relevanz erlangen K_{ATP} -Kanäle unter anderem bei der persistierenden hyperinsulinämischen Hypoglykämie im Kindesalter (PHHI= **P**ersistent **H**yperinsulinemic **H**ypoglycemia of **I**nfancy).

Hierbei führen Mutationen in den Genen, $K_{IR6.2}$ und/oder SUR1, welche für die beiden K_{ATP} -Kanaluntereinheiten kodieren (vgl. Kap. 1.7), zu einem Verlust der K_{ATP} -Kanalaktivität.

Dieser Funktionsverlust bewirkt das Öffnen spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle vom L-Typ, die zu einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration beitragen. Als Folge kommt es zu einer inadäquat erhöhten Insulinsekretion, die stark erniedrigte Glucosekonzentrationen im Blut bewirkt (Aguilar-Bryan & Bryan, 1999). Wird die Krankheit nicht rechtzeitig erkannt, drohen irreversible Gehirnschäden durch die persistierende Hypoglykämie.

Bisher wurden mehr als 40 verschiedene Mutationen im SUR1-Gen

beschrieben. Viele dieser Mutationen finden sich in einer der beiden NBFs (Thomas et al., 1995).

Mutationen in der α -Untereinheit $K_{IR6.2}$ wurden als Punktmutation im zweiten Transmembransegment (M2) oder als Mutation im Codon 12, welche zur Synthese eines verkürzten $K_{IR6.2}$ -Polypeptids führt, identifiziert. Bisher sind 3 Arten bekannt (Glaser et al., 2000).

Schätzungen bezüglich der Inzidenz dieser Erkrankung variieren zwischen 1:40000 Lebendgeburten in Nordeuropa und 1:2500 Lebendgeburten in Populationen mit gehäuften Auftreten von Verwandtenehen (z.B. in sunitischen Stammesgesellschaften).

Es wurden sowohl autosomal-dominante, als auch autosomal-rezessive Vererbungsformen beobachtet.

Gewöhnlich erleiden die Patienten bereits schon wenige Stunden nach der Geburt schwere Hypoglykämien mit neurologischen Ausfällen und/oder einem hypoglykämischen Schock.

Neben Glucoseinfusionen und einer Diät aus Kohlenhydraten, profitieren manche der Patienten von einer Therapie mit K_{ATP} -Kanalöffnern (z. B. Diazoxid) oder mit Somatostatin-Analoga, welche die Insulinsekretion reduzieren.

Bei ausbleibendem Therapieerfolg oder in besonders schweren Fällen wird eine subtotalen Pankreatektomie (Cook & Bryan, 1998), bei der etwa 95% des Pankreasgewebes entfernt werden, durchgeführt.

1.6.2 Rolle des K_{ATP} -Kanals bei nicht-insulinabhängigem Diabetes mellitus Typ 2 (NIDDM)

Der nicht-insulinabhängige Diabetes mellitus (NIDDM) Typ 2 ist eine polygene chronische Stoffwechselerkrankung, die durch angeborene Faktoren und durch Umwelteinflüsse hervorgerufen wird.

Pathogenetisch spielen zwei Störungen eine wichtige Rolle: eine gestörte Insulinsekretion der β -Zellen und eine herabgesetzte Insulinwirkung (Insulinresistenz), die Ursache eines Insulin- und Postrezeptordefektes ist. Die Folge ist eine gestörte Glucoseverwertung in der Zelle.

Wie in Kapitel 1.5.1 beschrieben, koppelt der K_{ATP} -Kanal die Insulinsekretion an den Blutzuckerspiegel. Folglich ist anzunehmen, dass Mutationen dieses Kanals existieren, die Diabetes verursachen können.

Im SUR1-Gen wurden bisher drei Variationen der Gensequenz, die mit Typ-2 Diabetes assoziiert sind, gefunden. Jedoch führen diese Mutationen nicht zu einer Veränderung der Kanalfunktion ('t Hart et al., 1999).

Polymorphismen in der α -Untereinheit $K_{IR6.2}$ können ebenfalls für das Auftreten von Typ-2 Diabetes prädisponieren. Der Polymorphismus $E^{23}K$, bei dem in Position 23 die Aminosäure Glutamat (E) durch Lysin (K) ersetzt ist, bewirkt eine spontane Überaktivierung der pankreatischen K_{ATP} -Kanäle und eine verminderte Sensitivität des $K_{IR6.2}$ gegenüber ATP (Schwanstecher et al., 2002). Darüberhinaus ist der mutierte Kanal empfindlicher für die öffnende Wirkung von Oleoyl-CoA (Riedel et al., 2003). Für die Insulinsekretion bedeutet dies, dass höhere Konzentrationen an ATP notwendig sind, um eine Inaktivierung des Kanals herbeizuführen.

Die Analyse des $E^{23}K$ Polymorphismus zeigte, dass zwischen dem Auftreten von Typ-2 Diabetes und der homozygoten Form (KK) dieser Gensequenzvariation eine deutliche Assoziation besteht (Gloyn et al., 2001 und Hani et al., 1998).

1.6.3 K_{IR} - und K_V - assoziierte Kaliumkanalkrankheiten

Apikale schwach einwärtsgerichtete Kaliumkanäle, K_{IR1} - bzw. ROMK-Kanäle, werden im Tubulusepithel der Nieren exprimiert. Dort sind sie im aufsteigenden Schenkel der Henle-Schleife und im distalen Nephron für die Rückführung von Kalium in die Zellen und für die Funktion des Natrium-, Kalium-, 2-Chlorid-Kotransporters verantwortlich (Quast, 1996).

Mutationen im K_{IR1} -Gen, welche autosomal-rezessiv vererbt werden, führen zu renalen Tubulusfunktionsstörungen mit den Symptomen hypokaliämischer Alkalose, Salzverlust und Hypotension, die mit einer Hyperkalzurie einhergeht (Karolyi et al., 1998 und Simon et al., 1998). Die Erkrankung ist unter der Bezeichnung Bartter-Syndrom II bekannt.

Ingesamt werden vier Bartter-Syndrome, welchen verschiedene Genmutationen zu Grunde liegen, unterschieden.

GIRK-Kanäle sind stark einwärtsgerichtete Kaliumkanäle der $K_{IR3.0}$ -Untergruppe, deren Kanalöffnung bzw. -schließung durch G-Proteine reguliert wird. Sie werden in erster Linie im Gehirn und im Herzen exprimiert, wo sie den Effekt des Vagus auf die Herzfrequenz vermitteln.

Untersuchungen an Mäusen (weaver mice) haben gezeigt, dass Mutationen im $K_{IR3.2}$ -Gen zum Verlust der Kaliumselektivität der Kanalpore und zu einer verminderten Kanalfunktion führen. Dies äußert sich in einer stark reduzierten Einwärtsgerichtetheit des Kanals und in einer Einschränkung der Aktivierung durch G-Proteine (Slesinger et al., 1996 und Navarro et al., 1996).

Über einen Anstieg der Na^{2+} - und gleichzeitigen Abfall der K^{+} -Leitfähigkeit kommt es zu einer Depolarisation der Membran mit Aktivierung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle. Dies führt zu einer Ca^{2+} -Überladung der Zellen mit nachfolgendem Zelltod (Surmeier et al., 1996).

Diese Erkrankung wird autosomal-rezessiv vererbt und geht mit schweren neuronalen Degenerationen (Sanguinetti et al., 1997), welche sich in schweren Ataxien, Tremor, neuronaler Übererregbarkeit und tonisch-klonischen Krämpfen äußern, einher.

Mutationen in der $K_{IR6.X}$ -Gruppe erlangen ebenfalls pathophysiologische Relevanz. Sie sind in erster Linie mit der persistierenden hyperinsulinämischen Hypoglykämie im Kindesalter (PHHI= **P**ersistent **H**yperinsulinemic **H**ypoglycemia of **I**nfancy) assoziiert. Hierbei führen Mutationen in den Genen, $K_{IR6.2}$ und/oder SUR1, welche für die beiden K_{ATP} -Kanaluntereinheiten kodieren, zu einem Verlust der K_{ATP} -Kanalaktivität (siehe Kapitel 1.6.1).

Das angeborene permanente Long QT-Syndrom (Romano-Ward-Syndrom) beruht auf Mutationen einzelner spannungsabhängiger Kaliumkanäle. Es handelt sich dabei um eine seltene genetische Erkrankung, die bereits im Kindesalter auftreten kann. Typisch für diese autosomal-dominant vererbte

Erkrankung ist, aufgrund eines verlangsamten Kaliumausstroms, eine verzögerte Repolarisation der Herzmuskelzelle mit im EKG nachweisbaren Verlängerungen des QT-Intervalls. Klinisch auffällig werden die Patienten durch häufig wiederkehrende Synkopen, infolge paroxysmalen Kammerflatterns, Arrhythmien und Kreislaufstillstands.

Verantwortlich für diese genetisch heterogene Gruppe von Erkrankungen sind vor allem zwei Typen von K_V -Kanälen:

- HERG- (human ether-a-go-go-related gene- K_V6) oder KCNH1-Kanal, der einen schnellen K^+ -Auswärtsstrom I_{K_r} (rapid) am Herzen erzeugt und damit zur Repolarisation nach dem Aktionspotential beiträgt (Sanguinetti et al., 1995).
- KVLQT (KCNQ1)-Kanal, der einen langsamen K^+ -Auswärtsstrom I_{K_s} (slow) erzeugt. Die Mutation dieses Kanals oder seiner β -Untereinheit MinK (KCNE1) verzögert ebenfalls die Repolarisation und verlängert damit das QT-Intervall (Splawski et al., 1997 und Sanguinetti et al., 1995).

1.7 Molekulare Struktur und Stöchiometrie der K_{ATP} -Kanäle

K_{ATP} -Kanäle sind Heteromultimere, bestehend aus zwei verschiedenen Untereinheiten. Die α -Untereinheit $K_{IR6.x}$, welche zur Familie der einwärtsgleichrichtenden Kaliumkanäle gehört, bildet die Kanalpore für das Kaliumion aus. Für das komplexe Regulationsverhalten des K_{ATP} -Kanals ist die sogenannte β -Untereinheit, welche durch den Sulfonylharnstoffrezeptor SUR repräsentiert wird, verantwortlich.

Zur Ausbildung eines aktiven K_{ATP} -Kanals müssen beide Untereinheiten exprimiert werden.

Clement et al. (1997) zeigte, daß die Expression von SUR1, nach Core-Glykolisierung im Endoplasmatischen Retikulum (ER), zur Ausbildung eines nicht "ausgereiften" Rezeptors, mit einem relativen Molekulargewicht von 140 kDa, führt, während die Koexpression mit der α -Untereinheit $K_{IR6.2}$ zur "Reifung" des Rezeptors beiträgt. Diese "Reifung" äußert sich in einem

erhöhten Glykolisierungsgrad von SUR1. SUR1 besitzt nunmehr eine Masse von 150-170 kDa und erscheint in dieser Form in der Plasmamembran (Clement IV et al., 1997 und Übersichtsartikel Aguilar-Bryan & Bryan, 1999). Interessant ist die Tatsache, dass bei alleiniger Expression SUR1 nur core-glykosyliert bleibt und nicht in die Plasmamembran weitertransportiert wird. Es verharrt vielmehr in intrazellulären Membranen (Ozanne et al., 1995).

Für die Weiterleitung von SUR1 vom ER in den Golgi-Apparat und von dort in die Plasmamembran ist also die Koexpression mit $K_{IR}6.2$ unabdingbar. Durch sie wird ein sowohl im SUR als auch im $K_{IR}6.x$ vorhandenes Retentionsmotiv "RKR" maskiert (Zerangue et al., 1999).

Beide Untereinheiten koppeln obligat in einer 4:4 Stöchiometrie (4 α - und 4 β -Untereinheiten) und formen so einen oktameren Kanalkomplex (SUR/ $K_{IR}6.x$).

Der Aufbau ist schematisch in Abbildung 3 dargestellt.

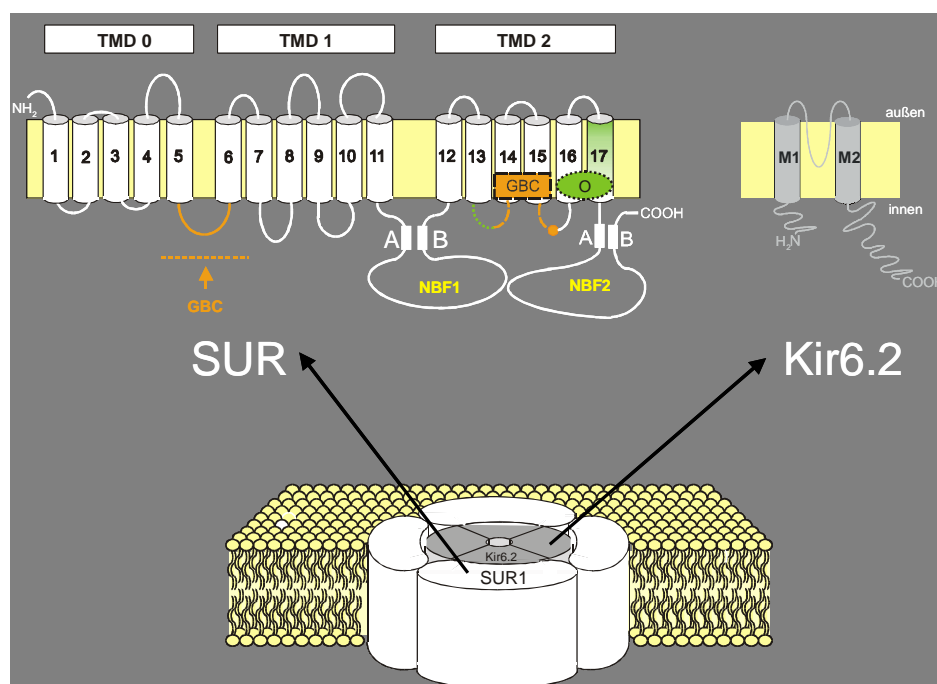


Abbildung 3: Aufbau und Stöchiometrie des ATP-abhängigen K^+ -Kanals (K_{ATP}). Der oktameren Kanalkomplex ist in einer 4:4 Stöchiometrie aus einem Sulfonylharnstoffrezeptor (SUR) und aus einer $K_{IR}6.1$ - oder einer $K_{IR}6.2$ -Untereinheit aufgebaut. TMD = Transmembrandomäne; 1-17 = Transmembranhelices des SUR1; M1,M2 = Transmembranhelices von $K_{IR}6.2$; GBC = Bindungsstelle von Glibenclamid; Ö = Öffnerbindungsstellen; NBF = Nukleotidbindungsfasen; A = Walker-A-Motiv; B = Walker-B-Motiv. Nach Quast 2000 (freundlicherweise überlassen von Conny Walz).

1.7.1 Die α -Untereinheit $K_{IR6.x}$

Die α -Untereinheit $K_{IR6.x}$, die zur Familie der einwärtsgerichtenden K^+ -Kanäle gehört und die Kanalpore für das K^+ -Ion ausbildet, besteht aus zwei Transmembran-Segmenten (M1 und M2), die durch eine intramembranär gelegene hoch konservierte H5-Domäne (P-loop) miteinander verbunden sind. Erstmals wurde diese H5-Domäne mit leicht veränderter Sequenz in spannungsabhängigen Kaliumkanälen (K_V) identifiziert (Jan et al., 1992 und Pongs, 1993). Sie ist für die K^+ -Selektivität der K_{ATP} -Kanäle und deren Leitfähigkeit entscheidend (Doupnik et al., 1995).

Die in den K_{ATP} -Kanälen anzutreffenden K_{IR} -Kanäle vom Typ $K_{IR6.1}$ und $K_{IR6.2}$ zeigen einen Selektivitätsfilter mit der Aminosäuresequenz –GlyPheGly- anstelle des häufiger in anderen K_{IR} -Kanälen vorkommenden -GlyTyrGly- (Inagaki et al., 1995).

K_{IR} -Kanäle sind einwärtsgerichtende Kanäle. Der Grad der Gleichrichtung des Ionenflusses hängt von den in der Pore des Kanals befindlichen Aminosäuren ab. So zum Beispiel führte die Mutation in einem Aminosäurerest im Transmembransegment M2 zur Umwandlung des schwach einwärtsgerichtenden ROMK1 Kanal in einen stark gleichrichtenden Kanal (Doi et al., 1995; Lu & MacKinnon, 1994 und Taglialatela et al., 1995).

Die Frage, welche Untereinheit für die Ausbildung der Kanalpore verantwortlich ist, wurde von Clement et al. (1997) und Shyng et al. (1997) geklärt. Sie zeigten anhand der $K_{IR6.2}$ Untereinheit, dass der Austausch von Asparagin gegen Aspartat an Position 160 einen stark gleichrichtenden Kanal hervorbrachte, wohingegen der Wildtyp schwächere Gleichrichtung erzeugte.

Beide α -Untereinheiten $K_{IR6.1}$ und $K_{IR6.2}$ zeigen darüberhinaus ein unterschiedliches ATP-Verhalten. Während für den rekombinanten K_{ATP} -Kanal aus SUR2B und $K_{IR6.2}$ eine ATP-Empfindlichkeit von 30-300 μ M beschrieben ist (Isomoto et al., 1996), erweist sich der Kanal aus SUR2B und $K_{IR6.1}$ als relativ unempfindlich gegenüber ATP (IC_{50} ~2-3 nM) (Yamada et al., 1997).

1.7.2 Die β -Untereinheit SUR

Die β -Untereinheit des K_{ATP} -Kanals wurde erstmals aus der β -Zelle des Pankreas kloniert (Aguilar-Bryan et al., 1995).

Die Sulfonylharnstoffrezeptoren (SUR) gehören zur Familie der ABC-(ATP-Bindungs-Kassette) Proteine, zu welcher auch der CFTR (cystic fibrosis transconductance regulator) und die MDR-Proteine (multi-drug resistance proteins) gezählt werden.

So können zum Beispiel Mutationen im Bereich der nucleotidbindenden Domäne des CFTR bei Patienten, welche für diese Mutation homozygot sind, zur Manifestation der schweren cystischen Fibrose führen.

MDR-Proteine treten im menschlichen Organismus ubiquitär auf und sind als membranständige Transportproteine unter anderem an der Ausschleusung von natürlichen Toxinen und Pharmaka, wie z.B. Cytostatika, aus dem Cytosol in den Extrazellulärraum beteiligt.

Der SUR spielt eine wichtige Rolle für die Regulation der Kanalaktivität. Er verleiht dem Kanalkomplex die Sensitivität gegenüber den Sulfonylharnstoffen (Sulfonylurea = SU), den Öffnern und den Nukleotiden und ist charakterisiert durch 3 Transmembrandomänen (TDM 0-2). Sie enthalten 5, 6 und 6 Transmembranhelices, zwei intrazellulär gelegene Nukleotidbindungsfalten (NBFs), sowie die Bindungsstellen für die K^+ -Kanalöffner und die Sulfonylharnstoffe. Der N-Terminus liegt extrazellulär, der C-Terminus intrazellulär.

Eine der Nukleotidbindungsfalten (NBF1) liegt innerhalb der intrazellulären Schleife zwischen den Transmembrandomänen 1 und 2, die zweite der Nukleotidbindungsfalten liegt nahe dem intrazellulären Carboxylende.

Zum charakteristischen Aufbau der NBFs gehören die nach ihrem Entdecker benannten, hoch konservierten Walker A- und B-Motive, sowie die Linker Region.

Das Walker A-Motiv umfasst die Sequenz -GlyXXGlyXGlyLysSer/Thr-, wobei X für eine beliebige Aminosäure (AS) steht und die negative Ladung des γ -Phosphates von ATP koordiniert. Das Walker B-Motiv weist die

Aminosäuresequenz –YYYYAsp- auf, wobei Y eine hydrophobe AS darstellt (Walker et al., 1982 und Aguilar-Bryan et al., 1998). Es koordiniert die positive Ladung von Mg^{2+} in MgATP bzw. MgADP.

Das hochkonservierte Walker A - Lysin und das Walker B - Aspartat sind für Bindung und/oder Hydrolyse der Nukleotide verantwortlich. Der Lysin-Rest interagiert mit dem β -Phosphat von ATP, wohingegen der Aspartat-Rest über Mg^{2+} -Ionen mit dem γ - und dem β -Phosphat von ATP interagiert (Hung et al., 1998).

Eine Linker Region, welche das sogenannte linker motif, -LeuSerGlyGlyGln- enthält, verbindet die beiden Walker Motive miteinander (Schwanstecher et al., 1998 und Aguilar-Bryan & Bryan, 1999).

Ein weiteres wichtiges Kennzeichen der ABC-Proteine ist deren ATPase-Aktivität, die beim SUR vor allem in der NBF 2 lokalisiert ist (Bienengraeber et al., 2000 und Matsuo et al., 2000) und an die, außer im SUR, häufig ein Transportvorgang gekoppelt ist.

1.8 Die Gene von $K_{IR6.x}$ und SUR

1.8.1 Die Gene von $K_{IR6.x}$

Mit Hilfe der Genanalyse konnten bisher zwei K_{IR} -Gene ($K_{IR6.1}$ und $K_{IR6.2}$), die für die α -Untereinheit des K_{ATP} -Kanals kodieren, identifiziert werden.

Die α -Untereinheit $K_{IR6.1}$ (uKATP-1; u steht für ubiquitous) ist in zahlreichen Geweben verbreitet. Weitere Untersuchungen zeigten jedoch, dass $K_{IR6.1}$ mit SUR1 (Ämmälä et al., 1996 und Clement IV et al., 1997) und SUR2B funktionelle K_{ATP} -Kanäle ausbildet, nicht aber mit SUR2A (Aguilar-Bryan et al., 1998).

Das menschliche Gen für $K_{IR6.1}$ umfasst 3 Exons und besitzt eine Länge von ca. 9.7 kb. Das daraus entstehende Genprodukt aus 424 Aminosäuren zeigt eine 98%ige Homologie zum murinen $K_{IR6.1}$.

Mit Hilfe der Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisation konnte der exakte Genlocus auf

Chromosom 12p11.23 bestimmt werden. Auffallend hierbei ist die Nähe zum Genort des SUR2-Gens auf Position 12p11.12 des Chromosoms 12.

Entgegen der Erfolge bei der PCR des $K_{IR6.2}$ - und SUR1-Gens, scheiterte beim $K_{IR6.1}$ - und SUR2-Gen der Versuch beide DNA-Abschnitte mittels PCR nachzuweisen. Es zeigte sich, daß der Abstand zwischen den zu amplifizierenden DNA-Abschnitten zu groß war.

Das intronlose $K_{IR6.2}$ -Gen liegt auf dem kurzen Arm von Chromosom 11 und befindet sich in unmittelbarer Nachbarschaft des SUR1-Gens, was für eine koordinierte Expression dieser beiden Proteine spricht. $K_{IR6.2}$ (BIR = β -cell inward rectifier) ist ein 390 Aminosäure umfassendes Protein, welches sowohl mit SUR1 (Inagaki et al., 1995), als auch mit SUR2A (Inagaki et al., 1996) und SUR2B (Isomoto et al., 1996) einen funktionellen K_{ATP} -Kanal ausbilden kann.

Die Aminosäuresequenz beider Isoformen, $K_{IR6.1}$ und $K_{IR6.2}$, weist eine 70%ige Homologie auf (Ashcroft & Gribble, 1998 und Gonoï & Seino, 2000).

Die Mutation im M2-Segment (L147P) von $K_{IR6.2}$, beschrieben von Thomas et al. (1996), verhinderte bei der Koexpression von $K_{IR6.2}$ mit SUR1 die Ausbildung eines funktionellen K_{ATP} -Kanals (Aguilar-Bryan et al., 1998). Dieses Ergebnis erbrachte den Beweis, dass die α -Untereinheit $K_{IR6.2}$ ein Teil des pankreatischen K_{ATP} -Kanals sein muß.

Die Koexpression von SUR2A/ $K_{IR6.2}$ und SUR2B/ $K_{IR6.2}$ brachte ebenfalls funktionelle K_{ATP} -Kanäle hervor. Die pharmakologischen Unterschiede zwischen beiden Subtypen SUR2A/ $K_{IR6.2}$ und SUR2B/ $K_{IR6.2}$ führten jedoch zu der Annahme, dass die Kombination aus SUR2A/ $K_{IR6.2}$ den kardialen K_{ATP} -Kanal (Inagaki et al., 1996 und Okuyama et al., 1998) und SUR2B/ $K_{IR6.2}$ den Kanal in der glatten nicht-vaskulären Muskulatur repräsentiert (Isomoto et al., 1996 und Yamada et al., 1997). Der vaskuläre K_{ATP} -Kanal wird aus $K_{IR6.1}$ und SUR2B gebildet (Yamada et al., 1997).

Überdies können Mutationen im $K_{IR6.2}$ -Gen ebenfalls Ursache für PHHI sein (Nestorowicz et al., 1996).

1.8.2 Die Gene von SUR

Es sind bisher zwei verwandte SUR-Gene, SUR1 und SUR2, welche für die β -Untereinheit der K_{ATP} -Kanäle kodieren, identifiziert worden (Aguilar-Bryan et al., 1995; Inagaki et al., 1996 und Isomoto et al., 1996).

Das menschliche SUR1-Gen umfasst 39 Exons und erreicht je Exon eine Länge von >100 kb. Es kodiert für die hochaffine Form der β -Untereinheit; bestehend aus 1581 oder 1582 Aminosäuren (Aguilar-Bryan et al., 1995). Es konnte auf dem kurzen Arm des Chromosoms 11 an der Position 11p15.1 (Thomas et al., 1995) lokalisiert werden.

Im SUR1-Gen konnten bislang über 50 Mutationen, die zu PHHI führen, aufgedeckt werden (Thomas et al., 1995). Die ursächliche Beteiligung von SUR1 (und auch von $K_{IR6.2}$) am PHHI zeigt, dass der pankreatische K_{ATP} -Kanal tatsächlich aus SUR1 und $K_{IR6.2}$ besteht.

Das menschliche SUR2-Gen besteht aus 38 Exons, das ebenfalls eine Länge von >100 kb aufweist. Der Genlocus befindet sich auf Chromosom 12 an der Position 12p11.12 (Chutkow et al., 1996).

Das SUR2-Gen kodiert für 2 Proteine, die aus jeweils 1549 Aminosäuren bestehen. Durch differentielles Spleißen werden nach der Transkription zwei mRNA-Moleküle gebildet, welche sich im letzten Exon (Exon 38A oder Exon 38B) unterscheiden. Beide Isoformen, SUR2A und SUR2B, weisen somit, bis auf die terminalen 42 Aminosäuren, eine identische Sequenz auf und stellen zwei unterschiedliche Formen eines für Glibenclamid niederaffinen Rezeptors dar. Untersuchungen an der kardialen Form des K_{ATP} -Kanals SUR2A/ $K_{IR6.2}$ führten zu der Annahme, dass Mutationen im SUR2A-Gen möglicherweise mit Erkrankungen wie der Herzinsuffizienz assoziiert sein könnten (Bienengraber et al., 2004).

1.9 Regulation der K_{ATP} -Kanäle

Die β -Untereinheit SUR vermittelt den stimulierenden Effekt von endogenen Kanalliganden, wie MgADP und ATP und ist Angriffspunkt vieler wichtiger Pharmaka wie Glibenclamid und Diazoxid (Aguilar-Bryan & Bryan, 1999).

Den Einfluß, den ATP und (Mg)ADP auf die K_{ATP} -Kanalaktivität ausüben, lässt sich in drei Kategorien unterteilen: neben der für die K_{ATP} -Kanäle charakteristischen Hemmung (Inhibition), bewirkt ATP ihre Reaktivierung (Refreshment) und MgADP ihre Stimulierung (stimulation) über die Untereinheiten SUR und K_{IR} .

Kurze Applikationen von ATP in millimolaren Konzentrationen, jedoch nur in Mg^{2+} - oder Mn^{2+} - gebundener Form, sind ausreichend, um die Kanalfunktion von inaktivierten (run-down) Kanälen wiederherzustellen. Nicht-hydrolysierbare ATP-Analoga oder hydrolysierbare Nukleotide ohne Mg^{2+} oder Mn^{2+} sind nicht in der Lage den Kanal zu reaktivieren.

1. $K_{IR6.2}$ – Hemmung durch ATP

Nukleosiddiphosphate, wie ADP, GDP oder UDP, können, als ein schwächeres Analogon zu ATP, in entsprechend hohen Konzentrationen (1-4 mM) K_{ATP} -Kanäle durch Bindung an $K_{IR6.2}$ hemmen. In Mg-gebundener Form entfalten Nukleosiddiphosphate durch ihre Bindung an SUR jedoch eine stimulatorische Wirkung, die bei Abwesenheit von ATP zu weiterer Kanalaktivität führen (Dunne et al., 1986 und Misler et al., 1986). ADP stellt, neben ATP, den wichtigsten Regulator des K_{ATP} -Kanals dar.

Studien mit $K_{IR6.2}\Delta C36$, einem, nach Entfernung von 36 C-terminalen Aminosäuren, verkürzten Protein, zeigten, dass die "primäre" ATP-Inhibition über direkte Bindung an die Untereinheit $K_{IR6.2}$ vermittelt wird (Tucker et al., 1997). Allerdings lagen die IC_{50} -Werte der ATP-Inhibition am $K_{IR6.2}\Delta C36$ 20 - 40 mal höher, als die für SUR1/ $K_{IR6.2}\Delta C36$. Dies führte zu der Annahme, dass die β -Untereinheit SUR1 die Affinität von ATP an die $K_{IR6.2}\Delta C36$ Untereinheit steigert.

Den direkten Beweis für die Existenz einer ATP-Bindungsstelle an $K_{IR6.2}$ lieferten Tanabe et al. (1999) mit Hilfe eines speziellen Photoradioliganden ([^{32}P]-8-azido-ATP).

Die hochaffine Bindungsstelle in $K_{IR6.2}$ vermittelt bereits bei mikromolaren Konzentrationen von ATP einen Kanalblock (Tucker et al., 1997), wohingegen K_{ATP} -Kanäle, die $K_{IR6.1}$ enthalten, nur bei ATP-Konzentrationen im millimolaren Bereich gehemmt werden (Yamada et al., 1997).

2. Stimulation von SUR durch MgADP und ATP

Um eine genauere Vorstellung davon zu bekommen, welche Rolle die NBFs im SUR1 bei der Regulation der K_{ATP} -Kanalaktivität spielen, führten Ueda et al. (1997) Bindungsstudien mit dem Photoaffinitätsligand [^{32}P]-8-azido-ATP am SUR1 durch. SUR enthält je eine Nukleotid-Bindungsstelle in NBF1 und NBF2. Mit der Einführung von Punktmutationen im Walker A- bzw. Walker B-Motiv einer jeden NBF konnte gezeigt werden, dass SUR1 den Photoaffinitätsliganden stark an die NBF1 bindet, wohingegen MgADP vornehmlich an die NBF2 gebunden wird. Desweiteren stellten sie im Falle einer Präinkubation von SUR1 mit MgADP eine Hemmung der hochaffinen ATP-Bindung an die NBF1 fest.

In späteren Photoaffinitätsligand-Studien an SUR1/ $K_{IR6.2}$ konnten Ueda et al. (1999) infolge veränderter Versuchsbedingungen zeigen, dass zwischen den beiden NBFs in SUR1 eine positive Kooperativität besteht. Dazu schlugen sie folgendes Modell vor: Der Aktivitätszustand des β -Zell- K_{ATP} -Kanals steht in direktem Zusammenhang mit der intrazellulären MgADP-Konzentration. Ist die Energieladung einer Zelle niedrig, d.h. der Quotient aus ATP/ADP ist klein, bindet ATP an die NBF1 und MgADP an die NBF2. Dabei induziert die Bindung von MgADP eine Konformationsänderung der NBF2. Dies wiederum führt zu einer Konformationsänderung in der NBF1, was zur Stabilisierung der ATP-Bindung beiträgt. In dieser Konstellation bindet $K_{IR6.2}$ das Substrat ATP mit niedriger Affinität. Folge ist die Öffnung des K_{ATP} -Kanals. Auf der anderen Seite führt die Abnahme der intrazellulären MgADP-Konzentration zu einer

Dissoziation von MgADP von NBF2, was zur Instabilität der ATP-Bindung an NBF1 führt. Daraus resultieren Konformationsänderungen an SUR1, die, infolge einer Affinitätserhöhung von $K_{IR6.2}$ für ATP, zur Schließung des Kanals führen. Mutationen in der NBF2 können zur Reduktion der stabilisierenden Wirkung von MgADP auf die hochaffine ATP-Bindung an die NBF1 führen.

Die β -Untereinheiten des K_{ATP} -Kanals SUR1, SUR2A und SUR2B zeigen wesentliche Unterschiede in ihrem Bindungsverhalten und ihrer Affinität gegenüber ATP und ADP. Im Gegensatz zu SUR2 ist die Nukleotidbindung an die NBF2 in SUR1 stark Mg^{2+} -abhängig. Desweiteren zeigt die NBF1 von SUR1 eine deutlich höhere Affinität für ATP, als die der SUR2-Isoformen. Die NBF2 von SUR2B weist, im Vergleich zu SUR2A, eine signifikant höhere Affinität für ATP auf (Matsuo et al., 2000).

3. Refreshment: MgATP hilft PIP_2 zu regenerieren

Neben der Regulation durch Nukleotide wird die Aktivität der K_{ATP} -Kanäle auch durch negativ geladene Lipide, wie z.B. PIP_2 (Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat) und Long-chain acyl-Coenzym A (LC acyl-CoA), moduliert.

Membranphospholipide, wie z.B. PIP_2 , sind ebenfalls an der Modulation der K_{ATP} -Kanäle beteiligt. Durch Interaktion mit dem K_{ATP} -Kanal steigern sie die Offenwahrscheinlichkeit (Baukrowitz & Fakler, 2000 und Hilgemann & Ball, 1996) und führen zu einer merklichen Reduktion der Nukleotidsensitivität (Baukrowitz & Fakler, 2000 und Shyng & Nichols, 1998). Versuche mit $K_{IR6.2}\Delta C36$ zeigten, dass PIP_2 an $K_{IR6.2}$ ansetzt. Zudem erklären verschiedene PIP_2 -Konzentrationen die stark varierende ATP-Empfindlichkeit von SURx/ $K_{IR6.2}$ in isolierten Patches. Mit Hilfe von MgATP ist PIP_2 in der Lage den Kanal wiederzubeleben (Refreshment).

LC-acyl-CoA Ester werden in den Zellen aus Fettsäuren synthetisiert. Bränström et al. (1998) demonstrierten am murinen β -Zell- K_{ATP} -Kanal SUR1/ $K_{IR6.2}$ den Einfluß von LC acyl-CoA auf die Modulation der Kanalaktivität. In elektrophysiologischen Untersuchungen zeigte sich, sowohl in Anwesenheit gesättigter, als auch ungesättigter LC acyl-CoA Ester, eine deutliche Zunahme

der Leitfähigkeit von $K_{IR6.2}$. LC acyl-CoA Ester waren außerdem in der Lage dem hemmenden Effekt von ATP auf die $K_{IR6.2}$ - Untereinheit entgegenzuwirken. Da die Koexpression mit SUR1 zu keiner weiteren Wirkungszunahme der LC acyl-CoA Ester, d.h. zu keiner Verlängerung der Dauer der Kanalöffnung führte, folgerten Bränström et al. (1998), dass die α -Untereinheit $K_{IR6.2}$ der primäre Angriffspunkt von LC acyl-CoA Estern sein muß (Gribble et al., 1998) und durch Induktion einer Konformationsänderung an $K_{IR6.2}$ eine langanhaltende Öffnung des Kanals möglich ist.

LC acyl-CoA Ester dienen den Herzmuskelzellen als Hauptstoffwechselsubstrat. Liu et al. (2001) fanden eine deutliche Aktivierung der K_{ATP} -Kanäle (SUR2A/ $K_{IR6.2}$) im Herzen durch LC acyl-CoA.

Da die LC acyl-CoA an der K_{IR} -Untereinheit ansetzen und diese in den beiden oben genannten Fällen identisch ist ($K_{IR6.2}$), muß man schließen, dass der SUR-Subtyp den Effekt der LC acyl-CoA auf den $K_{IR6.2}$ moduliert.

Auch G-Proteine spielen bei der Aktivierung mancher K_{ATP} -Kanäle eine Rolle (Sánchez et al., 1998). Untersuchungen an rekombinanten K_{ATP} -Kanälen in COS-7 Zellen bewiesen eine direkte Interaktion der G-Proteine mit der NBF (Wada et al., 2000). Allerdings haben sie nur einen schwachen Effekt.

Virsolvý-Vergine et al. (1992) führten Bindungsexperimente, in welchen Peptidfraktionen aus dem Gehirn hinsichtlich ihrer Fähigkeit [3 H]-GBC an Membranen aus Gehirn und β -Zellen zu ersetzen, untersucht wurden, durch. Diese Arbeit ermöglichte nachfolgend die Isolierung zweier Peptide: α - und β -Endosulfine.

Beide Peptide sind weit verbreitet, einschließlich im Gehirn, in Muskeln und in endokrinen Organen. Heron et al. (1998) nehmen an, dass α -Endosulfine als ein endogener Regulator der K_{ATP} -Kanäle in β -Zellen fungiert und bei der Kontrolle der Insulinsekretion mitwirkt.

Auch die Phosphorylierung des Kanals durch Proteinkinasen (Béguin et al., 1999) beeinflusst die Aktivität von K_{ATP} -Kanälen. Dabei aktiviert die Proteinkinase C SUR2A/ $K_{IR6.2}$ und hemmt SUR2B/ $K_{IR6.x}$. Die Proteinkinase A öffnet SUR2B/ $K_{IR6.1}$ (Quinn et al., 2004).

1.10 Wirkungsweise und therapeutisches Potential von K_{ATP} -Kanalmodulatoren

1.10.1 K_{ATP} -Kanalöffner

Die K_{ATP} -Kanal Öffner (KCO, K^+ channel opener) umfassen eine strukturell heterogene Stoffgruppe mit einem breiten therapeutischen Einsatzbereich, so z.B. die Therapie hypoglykämischer Zustände, die Therapie der Hypertension und der Angina pectoris und die Therapie der KHK (Nicorandil) (Lawson, 1996). Wichtige Vertreter der Öffner der ersten Generation sind Diazoxid und Minoxidilsulfat.

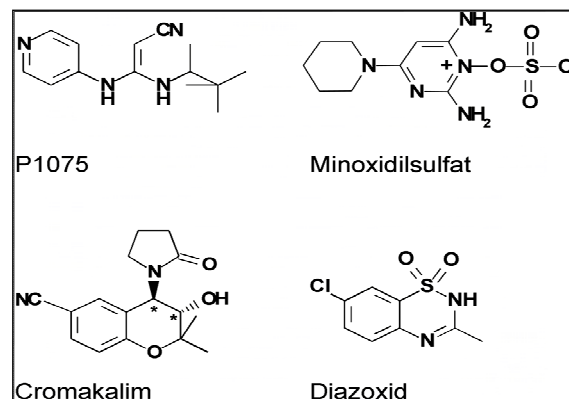


Abbildung 4: K_{ATP} -Kanal Öffner der ersten Generation, modifiziert aus Russ et al. (2003)

Die Zyanoguanidine Pinacidil und dessen Analogon P1075, die Benzopyrane (Lev-)Cromakalim, das Benzothiadiazin Diazoxid (chemisch verwandt mit Thiaziddiuretika) und das Pyrimidin Minoxidil, das als pro-drug in der Leber zum aktiven Minoxidilsulfat metabolisiert wird, haben bei physiologischen ATP-Konzentrationen eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Selektivität gegenüber dem vaskulären K_{ATP} -Kanal, bestehend aus SUR2B/ $K_{IR6.1}$.

Diazoxid, das früher als Reservepräparat bei hypertensiven Krisen eingesetzt wurde, ist als Antihypertensivum außer Handel. Es findet heute ausschließlich in der symptomatischen Hypoglykämiebehandlung bei Inselzelltumoren seine

Anwendung (Karow und Lang; Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 2004).

Aufgrund schwerer Nebenwirkungen kommt Minoxidil nur im Rahmen einer 3er-Kombinationstherapie, bestehend aus Diuretikum+Betablocker+Vasodilatator, zur Behandlung der therapieresistenten Hypertonie zum Einsatz.

Cromakalim und P1075 (= Analogon des potenten „kardiovaskulären“ KCO Pinacidil) sind vor allem von wissenschaftlicher Bedeutung (vergleiche Abb.4).

Die Öffner entfalten ihre Wirkung über Interaktion mit der β -Untereinheit SUR (Hambrock et al., 1998 und Schwanstecher et al., 1998). Aus den bisher durchgeführten Studien ergaben sich in Verbindung mit den SUR-Isoformen gewebsspezifische Unterschiede im Ausmaß der Aktivierung des K_{ATP} -Kanals.

Die meisten KCOs aktivieren die K_{ATP} -Kanäle vom SUR2-Typ und üben auf jene vom SUR1-Typ nur einen geringen Effekt aus (Ashcroft & Gribble, 2000; Reimann et al., 2001 und D'hahan et al., 1999).

Dabei erfordert die Bindung aller Öffner und die daraus resultierende Kanalöffnung die Anwesenheit von hydrolysiertem Mg^{2+} -gebundenem ATP oder MgADP (positiv allosterische Kopplung) (Quast et al., 1993; Dickinson et al., 1997; Löffler-Walz & Quast, 1998 und Schwanstecher et al., 1998).

Punktmutationen im Walker A-Motiv der NBFs heben die Aktivierung der Öffnerbindung durch MgATP auf. Dies verdeutlicht, dass beide NBFs im nativen SUR für die Bindung und Wirkung der Öffner erforderlich sind. Eine Erklärung dieses Phänomens ist, 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 $K_{IR6.2}$ unempfindlich macht. Möglicherweise spielen auch ATPase- Aktivitäten der NBFs eine Rolle (Schwanstecher et al., 1998; Bienengraeber et al., 2000 und Zingman et al., 2001).

Allerdings scheinen die Erkenntnisse bezüglich der Regulation der KCO-Bindung an SUR durch Nukleotide nicht eindeutig zu sein. Russ et al. (2003) zeigten, dass eine Kanalaktivierung bei entsprechend hohen Konzentrationen des jeweiligen K_{ATP} -Kanal-Öffners auch in Abwesenheit von MgATP möglich war.

Die C-Termini der β -Untereinheit beeinflussen in erheblichem Maße die Affinität der Öffnerbindungen, indem sie entweder die Interaktion zwischen den beiden NBFs oder deren Zusammenspiel mit den Bindungsplätzen, modifizieren (Gribble & Reimann, 2002). So bedingen Unterschiede in den 42 C-terminalen Aminosäuren 4-5 fach niedrigere Affinitäten für P1075, Pinacidil, Levromakalim und Diazoxid an SUR2A im Vergleich zur Bindung an SUR2B (Schwanstecher et al., 1998).

Diese Eigenschaften sind von großer therapeutischer Bedeutung. So wird zum Beispiel Nicorandil, ein K_{ATP} -Kanal Öffner und ein Guanylat-Cyclase Aktivator, als Vasodilatator in der Behandlung der Angina pectoris eingesetzt, führt aber gleichzeitig zu keiner wesentlichen Störung der Insulinsekretion aus den β -Zellen des Pankreas. Im Gegensatz dazu, bewirkt Diazoxid bei K_{ATP} -Kanälen, die SUR1, SUR2B und sogar SUR2A enthalten, eine Kanalöffnung.

Zwei Regionen in der TMD2, die Teil der zytosolischen Schleife zwischen TM13 und TM14 und zwischen TM16 und TM17 sind, sind von essentieller Bedeutung für die Bindung des KCO P1075 (Uhde et al., 1999).

Durch die Synthese von Chimären gelang es D'hahan et al. (1999) zu zeigen, daß die Bindungsstelle des Benzopyrans Levromakalim ebenfalls auf der TMD2 von SUR2A lokalisiert ist.

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 im Bereich von TMD6-11 und der NBF1 zu befinden (Babenko et al., 2000).

Am Beispiel von Minoxidilsulfat, das nur 68% der [³H]-P1075-Bindung verdrängt, zeigt sich die Heterogenität der Bindungsplätze für KCO (Löffler-Walz & Quast, 1998). Die Präparationen enthalten zwei Klassen von nicht miteinander interagierenden Bindungsplätzen im Verhältnis 2:1. Beide Klassen haben ähnliche Affinitäten gegenüber allen Öffnern, außer gegenüber Minoxidilsulfat, das nur an eine der beiden Klassen bindet.

Nicorandil und Diazoxid aktivieren den kardialen K_{ATP} -Kanal (SUR2A/ $K_{IR6.2}$) nur schwach; hingegen entfalten beide Öffner mit einer gewissen Selektivität

am mitoK_{ATP}- und nicht wie andere am sarcoK_{ATP}-Kanal ihre Wirkung (Liu et al., 1998). D`hahan et al. (1999) zeigten, dass die Voraussetzung für die Aktivierung des kardialen K_{ATP}-Kanals durch Diazoxid ein Anstieg der intrazellulären MgADP-Konzentration ist. Elektrophysiologische Untersuchungen an nativem und rekombinantem SUR2A/K_{IR}6.2 zeigten bei Konzentrationen zwischen 10 und 100 µM ADP eine deutliche Kanalaktivierung durch Diazoxid. Die freie ADP-Konzentration in ganzen Zellen bewegt sich, aufgrund ADP verbrauchender Prozesse, wie z.B. die Kreatinkinase-Reaktion, unterhalb der mikromolaren Schwellenkonzentration. Erst die Inhibition dieser Prozesse ließ eine Zunahme der K_{ATP}-Kanalaktivität beobachten.

Da das Myokard in der Ischämie durch einen Anstieg an zytosolischem ADP charakterisiert ist, könnte die ADP-abhängige Aktivierung des kardialen K_{ATP}-Kanals durch Diazoxid relevant für seine kardioprotektive Wirkung sein.

1.10.2 K_{ATP}-Kanalblocker

Die Sulfonylharnstoffe (SU), wie Tolbutamid und Glibenclamid (GBC), zählen zu den klassischen Blockern des K_{ATP}-Kanals. Eine weitere chemische Gruppe stellen die Glinide (z.B. Repaglinid, Meglitinid), eine Benzamidoverbindung, dar. Die Sulfonylharnstoffe werden in kurz-kettige Erst- (z.B. Tolbutamid), in lang-kettige Zweit- (z.B. Glibenclamid) und in Drittgenerationsabkömmlinge, die Glinide, eingeteilt. Dabei besitzen lang-kettige Zweitgenerationsabkömmlinge, neben der Sulfonylharnstoffgruppe auch eine Benzamidogruppe und stellen dadurch ein Bindeglied zwischen beiden chemischen Klassen der ersten und dritten Generation dar.

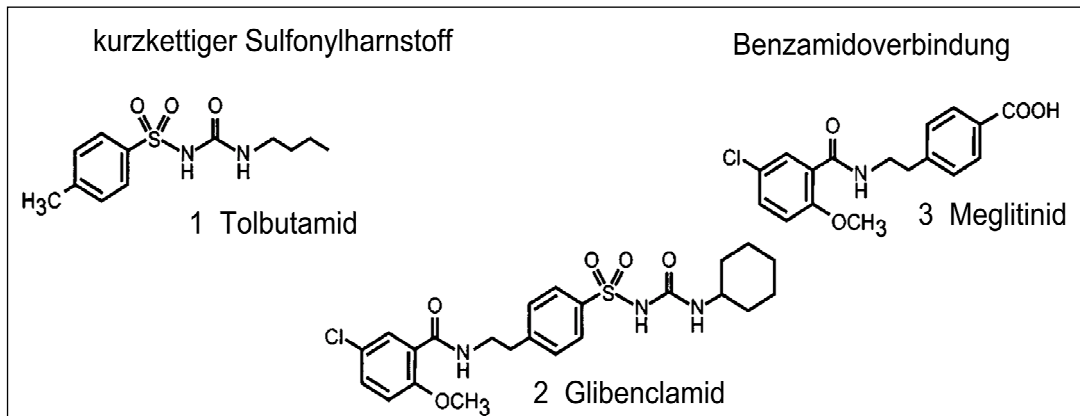


Abbildung 5: K_{ATP}-Kanal Blocker der ersten, zweiten und dritten Generation (modifiziert aus Coghlan et al. (Coghlan et al., 2001))

Sulfonylharnstoffe und Benzamidoverbindungen binden an die β -Untereinheit SUR. Durch die Blockade der pankreatischen K_{ATP}-Kanäle, beschrieben in Kapitel 1.5.1, induzieren sie über spannungsabhängige Ca²⁺-Kanäle die Freisetzung von Insulin aus den β -Zellen. Daher werden sie mit Erfolg bei der Therapie des Diabetes mellitus Typ-2a eingesetzt. Glibenclamid (Euglucon[®]) ist die am häufigsten eingesetzte Substanz und besitzt zusammen mit Glimepirid (Amaryl[®]) die stärkste blutzuckersenkende Wirkung unter den oralen Antidiabetika (Karow und Lang, 2004).

Die K_{ATP}-Kanalblocker zeigen neben unterschiedlicher Gewebeselektivität auch Unterschiede in der Reversibilität ihres Bindungsverhaltens.

Diese Sensitivitätsunterschiede von SUR1 und SUR2 gegenüber Tolbutamid und Gliclazid ermöglichten es, mit Hilfe von Punktmutationen und der Synthese von Chimären, die Region am SUR1, die für die Sulfonylharnstoffbindung von Bedeutung ist, zu identifizieren (Ashfield et al., 1999). Dabei konnte die Bindungsstelle für Tolbutamid den TM-Domänen 14-16 des SUR1 zugeordnet werden. Ein Serinrest an der Position 1237, der in der intrazellulären Schleife zwischen TM-Helix 15 und 16 liegt, ist in besonderem Maße an der Bindung beteiligt. Der Austausch dieses Aminosäurerestes gegen einen Tyrosinrest aus dem Wildtyp SUR2A (S1237Y) führte zur Aufhebung des hochaffinen Tolbutamidblocks (siehe auch Abb.3 dazu).

Desweiteren wird die hochaffine GBC-Bindung an SUR1 durch den Transfer der TMD2 aus SUR2B nicht vermindert. Dies verdeutlicht, dass die hohe Affinität für SUs und KCOs in ein und demselben SUR-Molekül koexistieren können (Uhde et al., 1999). Zwischen den beiden Öffnerbindungsstellen KCO1 und KCO2 liegt die Bindungsstelle für Sulfonylharnstoffe (Uhde et al., 1999 und Dörschner et al., 1999). Auf der anderen Seite spricht diese räumliche Nähe der SU- und der KCO-Bindungsregionen für eine negativ allosterische Kopplung der Bindungsplätze (Quast et al., 1993; Löffler & Quast, 1997; Hambrock et al., 1998; Schwanstecher et al., 1998 und Dörschner et al., 1999).

Mit Identifizierung des Serinrestes in SUR1 gelang es permanent transfizierte Zellen zu klonen, die stabil den Rezeptor SUR2A(Y1206S) bzw. SUR2B(Y1206S) exprimieren (Hambrock et al., 2001). Hierbei wird die in SUR2 an Position 1206 korrespondierende Aminosäure Tyrosin durch den Serinrest aus SUR1 an Position 1237 ersetzt.

[³H]-GBC-Bindungsexperimente an mit diesen Rezeptoren transfizierten HEK293B-Zellen zeigten, dass die Punktmutation SUR2B (Tyr¹²⁰⁶ → Ser), im Gegensatz zum Wildtyp SUR2B, zu einer 5-10 fach affineren Bindung und zu einem gleichermaßen stabilen Glibenclamidblock führt (Hambrock et al., 2001). Da die beiden SUR2-Splicevarianten ausschließlich in der C-terminalen Aminosäuresequenz differieren, war es von großem Interesse nachzuweisen, ob die identische Mutation in SUR2A ähnliche Ergebnisse hervorbringen würde. Stephan et al. (2005) konnten zeigen, dass sich SUR2A(Y1206S) weitestgehend ähnlich verhält, wie SUR2B(Y1206S). Auch in diesen Bindungsexperimenten ließ sich eine deutliche Zunahme der GBC-Affinität registrieren (siehe Kapitel 3 und 4).

Aufgrund der höheren Affinität zu SUR1 sind die Wirkungen von Tolbutamid und Glibenclamid hauptsächlich auf die β -Zellen beschränkt. Da Glibenclamid, wie nachfolgend beschrieben, auch andere K_{ATP}-Kanäle hemmen kann, sind Nebenwirkungen einer Therapie mit Glibenclamid durchaus vorstellbar.

Tolbutamid besitzt die Fähigkeit den K_{ATP}-Kanal SUR1/K_{IR}6.2 zu hemmen, zeigt aber am kardialen K_{ATP}-Kanal SUR2A/K_{IR}6.2 keine Wirkung. Dagegen bindet Meglitinid, als eine Benzamidoverbindung, sowohl an SUR1/K_{IR}6.2, als auch an

SUR2A/K_{IR}6.2. Dies untermauert die Annahme, dass SUR2A, im Vergleich zu SUR1, keine Hochaffinitätsbindungsstelle für Tolbutamid bzw. andere kurze Sulfonylharnstoffe besitzt (Venkatesh et al., 1991 und Gribble et al., 1998), wohl aber eine Bindungsstelle für Benzamidoverbindungen. Gribble et al. (1998) konnten zeigen, dass auch GBC, als Hybridsubstanz, hochaffin an beide β -Untereinheiten bindet, allerdings ist die durch GBC vermittelte Blockade nur im SUR2A/K_{IR}6.2 reversibel. Es wird daher vermutet, dass GBC am SUR1, neben der Bindungsstelle für die kurzen Sulfonylharnstoffe, auch an diejenige für Benzamidoverbindungen bindet (siehe dazu Abb.5 und Abb.6) und daher nur im Rahmen einer gleichzeitigen Verdrängung von beiden Bindungsstellen vom Rezeptor dissoziieren könnte (Ashcroft & Gribble, 1999).

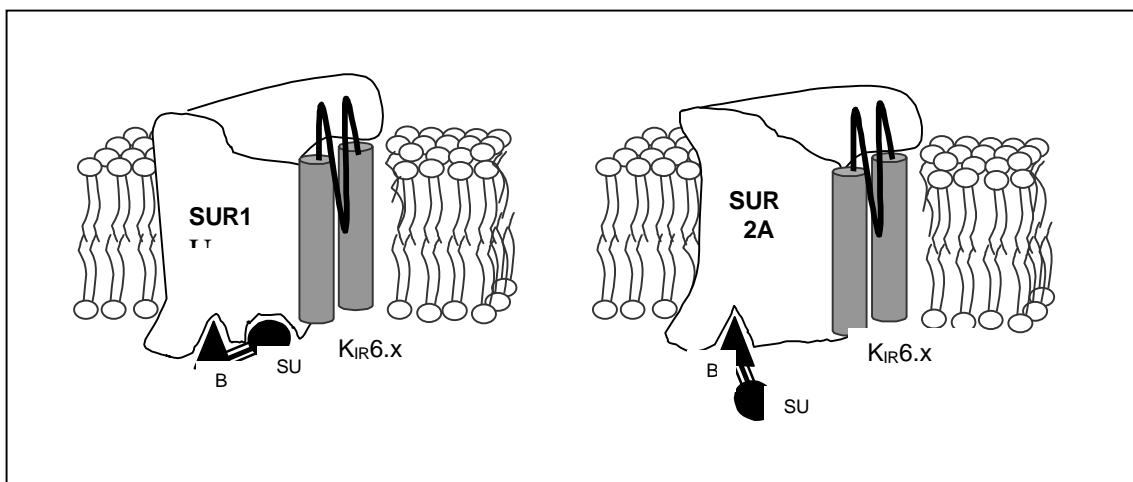


Abbildung 6: Modell der Bindungsstellen an SUR1 und SUR2A (nach Ashfield et al., 1999). Dargestellt ist das Bindungsverhalten der Hybridsubstanz GBC, dessen Benzamidogruppe durch ein Dreieck (\blacktriangle), und dessen Sulphonylharnstoffgruppe durch einen Kreis symbolisiert ist (\bullet). Zur Vereinfachung ist der K_{ATP}-Kanal unvollständig mit jeweils einer α - und einer β -Untereinheit abgebildet.

Die kanalhemmende Wirkung der Blocker wird somit in erster Linie über die Hochaffinitätsbindungsstelle der β -Untereinheit SUR vermittelt, zusätzlich existiert eine niederaffine Bindungsstelle auf der α -Untereinheit K_{IR}6.2 (Gribble et al., 1997 und Gribble et al., 1998).

Klinisch hat diese niederaffine Bindungsstelle keinerlei Bedeutung, da die im Patienten erreichten Plasmakonzentrationen nicht ausreichen, um einen Kanalblock über K_{IR}6.2 zu vermitteln.

Über die Anzahl der Sulfonylharnstoffmoleküle, die letztendlich notwendig sind, um eine Schließung des K_{ATP} -Kanals herbeizuführen, besteht Uneinigkeit. Dörschner et al. (1999) sind der Überzeugung, dass ein Molekül zur Besetzung einer SUR-Bindungsstelle pro K_{ATP} -Kanal ausreichend ist, um eine Kanalschließung zu induzieren. Grund für diese Schlussfolgerung war eine Linksverschiebung, die aus Bindungsexperimenten ermittelten $K_D \sim 300\text{nM}$ für GBC in elektrophysiologischen Experimenten. Hingegen ergab die Studie von Russ et al. (1999) an SUR2B/ $K_{IR}6.1$ in intakten Zellen, dass alle vier Bindungsstellen des K_{ATP} -Kanals besetzt sein müssen, um ihn zu schließen. Interessanterweise gilt dieser Modus auch bei Öffnern: es sind ebenfalls vier Moleküle erforderlich, um eine Kanalaktivierung herbeizuführen (Schwanstecher et al., 1998).

Zuverlässige Untersuchungen der [^3H]-GBC Bindung an SUR2 in Membranen waren aufgrund mangelnder Affinität und Selektivität sowie schneller Kinetik des Radioliganden nicht aussichtsreich (Dörschner et al., 1999 und Russ et al., 1999). Dagegen scheint bei [^3H]-P1075 Bindungsexperimenten ein intaktes Aktinzytoskelett nicht unbedingt erforderlich zu sein (Hambrock et al., 1998 und Dörschner et al., 1999).

Am pankreatischen K_{ATP} -Kanal bewirkt die Bindung von MgATP und MgADP eine Dissoziation der [^3H]-GBC Bindung (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 eher auszuschließen war (siehe auch Hambrock et al., 2002). Dies führt zu der Annahme, daß die Bindung von MgATP/MgADP an die NBF der SUR-Untereinheit die GBC- Bindungsstelle modifiziert.

Ueda et al. (1999) gelang es eben dies zu beweisen, dass die Bindungsstellen der Nukleotide mit denen für die GBC-Bindung kommunizieren. Sie demonstrierten die konzentrationsabhängige Dissoziation von vorher gebundenem 8-azido- $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ von SUR1 durch die Applikation von GBC in Abwesenheit von MgATP oder MgADP.

In neuerer Zeit wurden Substanzen entwickelt, die sich z.B. durch ihre Spezifität gegenüber bestimmten SUR-Subtypen auszeichnen und von deren

individuellen pharmakologischen Eigenschaften man sich ein erweitertes therapeutisches Potential verspricht.

Mit HMR-1883 (Gögelein et al., 2000 und Russ et al., 2001) beziehungsweise dessen Natriumsalz HMR-1098, gelang es einen selektiven K_{ATP} -Kanalblocker, der kaum Auswirkungen auf das kardiovaskuläre System hat (Gögelein et al., 1998), des kardialen K_{ATP} -Kanals zu schaffen. Zur Zeit wird diese Substanz in klinischen Studien untersucht. Die Hoffnung diese Substanz bei der Behandlung ventrikulärer Arrhythmien (Gögelein et al., 1999) und zur Vorbeugung des plötzlichen Herztodes einsetzen zu können, ist groß.

Fox et al. (2002) beobachteten, dass HMR-1098 am SUR2A/ $K_{IR}6.2$ eine 400-800 fach größere Wirkung entfalten kann, als an der Kanal-Isoform SUR1/ $K_{IR}6.2$ der β -Zelle und mit einer IC_{50} s von $\sim 1-2 \mu M$, im Gegensatz zu einer IC_{50} s von 720 und 860 μM bindet.

1.10.3 Überblick über die gewebespezifische Zusammensetzung, Verteilung und Pharmakologie der K_{ATP} -Kanäle

K_{ATP} -Kanal	Vorkommen	Pharmakologie	
		Öffner	Glibenclamid K_i (nM)
SUR1/ $K_{IR}6.2$	Pankreas, Gehirn	Diazoxid Pinacidil	~ 1 nM
SUR2A/ $K_{IR}6.2$	Kardiomyozyten, Skelettmuskulatur	Cromakalim Pinacidil Nicorandil	26 nM
SUR2B/ $K_{IR}6.1$	Gefäßmuskulatur	Pinacidil Nicorandil	42 nM
SUR2B/ $K_{IR}6.2$	Glatte Muskulatur	Diazoxid Pinacidil	27 nM

Tabelle 1: Gewebediversität und Pharmakologie der K_{ATP} -Kanäle nach Coghlan et al. 2002 (Coghlan et al., 2001).

1.11 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

ATP-abhängige K⁺-Kanäle bestehen aus der porenbildenden α -Untereinheit K_{IR6.X} und der β -Untereinheit SUR. Aufgrund ihrer Gewebediversität und Struktur obliegen ihnen verschiedenste Funktionen und sie sind Ziel zahlreicher Pharmaka.

Die Untereinheit SUR1, die in den β -Zellen des Pankreas und im Gehirn exprimiert wird (Aguilar-Bryan et al., 1995 und Sakura et al., 1995), besitzt gegenüber Sulfonylharnstoffen, wie z.B. GBC, eine hohe Affinität. Dagegen verhalten sich die beiden Isoformen SUR2A und SUR2B, die hauptsächlich in Skelettmuskel- und Herzmuskelzellen (SUR2A) und in der glatten Muskulatur (SUR2B) exprimiert werden (Inagaki et al., 1996 und Isomoto et al., 1996) relativ unempfindlich gegenüber GBC.

Bindungsstudien an den SUR2-Subtypen mit dem Radioliganden [³H]-GBC erwiesen sich als ungenau und schwer zu interpretieren, da die Affinität an den Rezeptor zu niedrig war und sowohl in HEK-Zellen, als auch in Membranpräparationen eine erhebliche Bindung des Radioliganden an vom SUR verschiedene endogene Bindungsplätze stattgefunden hatte (Russ et al., 1999 und Löffler-Walz et al., 2002).

Mit der Identifizierung eines Serinrestes an der Position 1237 (Ser 1237) in SUR1 (Ashfield et al., 1999) gelang es, die Ursache für die unterschiedlichen Affinitäten bezüglich der GBC-Bindung der SUR-Isoformen diesem Rest teilweise zuzuordnen. In SUR2A und SUR2B wird dieser korrespondierende Rest an Position 1206 durch Tyrosin ersetzt.

Toman et al. (2000) und Hambrock et al. (2001) gelang es zu beweisen, dass der Austausch dieser beiden korrespondierenden Aminosäureresten (Tyr 1206 → Ser 1237) eine 5-20 fache Zunahme der Affinität von SUR2B für GBC bedeutete.

Die Isoformen SUR2A und SUR2B entstehen durch differentielles Spleißen und unterscheiden sich daher nur im letzten Exon (Exon 38A oder Exon 38B), genauer gesagt in den letzten 42 Aminosäuren am Carboxylende (Isomoto et al., 1996).

Da der Genlocus der Mutation in einiger Entfernung zum Carboxylende liegt, war es von großem Interesse zu untersuchen, ob eine identische Mutation in SUR2A (Tyr 1206 → Ser 1237) ähnliche Ergebnisse, allen voran die Steigerung der Affinität gegenüber GBC, hervorbringen würde.

Ziel dieser Arbeit war die Grundcharakterisierung der SUR2A(Y1206S) Mutanten.

Die Bindungsplätze für SU, Öffner und Nukleotide sind im SUR-Molekül räumlich voneinander getrennt lokalisiert, liegen aber dennoch in unmittelbarer Nähe zueinander (Uhde et al., 1999; Babenko et al., 2000; Moreau et al., 2000 und Ueda et al., 1999). Diese strukturellen Merkmale bilden die Grundlage der allosterischen Interaktion, welche zwischen SU, KCO und Nukleotiden besteht.

Unter Verwendung der beiden Radioliganden [³H]-GBC und [³H]-P1075 wurde die Beziehung zwischen der P1075- und der GBC-Bindung an SUR2A(Y1206S) und SUR2A/K_R6.2 in Membranpräparationen aus HEK293-Zellen und an SUR2A(Y1206S) in ganzen Zellen, die mit dem Rezeptor permanent transfiziert waren, untersucht.

Wie bereits schon erwähnt, zeigt die Untereinheit SUR1 eine starke Affinität gegenüber SU und eine schwach ausgeprägte Affinität gegenüber Öffnern. Für die Untereinheit SUR2 gilt das Gegenteil. Untersuchungen an der Mutanten SUR2B(Y1206S) brachten neben dem Anstieg der Affinität für GBC auch eine unverändert hohe Affinität für Öffner hervor.

Um Aussagen über das Bindungsverhalten der Öffner an der Mutanten SUR2A(Y1206S) machen zu können, wurden ebenfalls entsprechende Bindungsexperimente unter Verwendung des Radioliganden [³H]-P1075 mit den Öffnern P1075 und Levromakalim durchgeführt.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Zur Herstellung von Konzentrationsreihen wurden von den Substanzen zunächst Stammlösungen in unterschiedlichen Konzentrationen hergestellt. Als Lösungsmittel wurden entweder Inkubationspuffer oder DMSO/Ethanol (1:1) verwendet. Für die weiteren Verdünnungen der jeweiligen Stammlösung wurden dieselben Lösungsmittel verwendet. Die Aufbewahrung der Stammlösungen erfolgte bei -30°C . Stammlösungen die älter, als 3 Monate waren, wurden durch neue Stammlösungen ersetzt.

ATP- Na_2	605.20	g/mol	Boehringer Mannheim
ADP	471.20	g/mol	Boehringer Mannheim
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	147.02	g/mol	Merck
CuSO_4	159.60	g/mol	Merck
DMSO (Dimethylsulfoxid)	1	L	Merck
EDTA- Na_2	372.24	g/mol	Fluka
EGTA	380.40	g/mol	Sigma
Ethanol 99% p.a.	500	ml	Merck
FBS (Fötale Rinderserum)	500	ml	GibcoBRL-Life Technologies
Folin-Ciocalteu-Reagenz (2M)	100	ml	Fluka
Geneticinsulfat	692.7	g/mol	GibcoBRL-Life Technologies
Gentamycin	50	mg/ml	GibcoBRL-Life Technologies
Glibenclamid	494.00	g/mol	Sigma
$[\text{}^3\text{H}]$ -Glibenclamid	SA 52	Ci/mmol	Dupont/NEN
D(+)-Glucose*1 H_2O	198.17	g/mol	Merck
HEPES	238.30	g/mol	Sigma
HCL	33	%	Merck

HCL	74.56	g/mol	Merck
KCL	74.56	g/mol	Merck
K ⁺ /Na ⁺ -Tartrat	282.23	g/mol	Merck
Levcromakalim	286.30	g/mol	SmithKline-Beecham
MEM+L-Gn+Earle`s Salze	500	ml	GibcoBRL-Life Technologies
MgCl ₂ *6H ₂ O	203.3	g/mol	Merck
NaCl	58.44	g/mol	Merck
Na ₂ CO ₃	105.99	g/mol	Merck
NaOH	40.00	g/mol	Merck
P1075	231.30	g/mol	LeoPharmaceuticals
[³ H]-P1075	117-121	Ci/mmol	Amersham Buchler
TRIS	121.14	g/mol	Fluka
Ultima Gold	2.5	L	Packard

2.2 Puffer und Medien

Alle Puffer wurden bei 6°C im Kühlraum gelagert.

Hypotoner Puffer für die Präparation von HEK-293- Zellmembranen

10 mM	HEPES
1 mM	EGTA

Die Substanzen wurden in Aqua demin. gelöst und die Lösung im Kühlraum (6°C) über Nacht abgekühlt. Danach wurde der pH-Wert mit NaOH auf 7.4 eingestellt. Die Lösung wurde während der pH-Einstellung mit Eis gekühlt.

Isotoner Inkubationspuffer für HEK-293-Zellmembranen

5 mM	HEPES
139 mM	NaCl
5mM	KCl

Die Substanzen wurden in Aqua demin. gelöst und die Lösung im Kühlraum (6°C) über Nacht abgekühlt. Der pH-Wert wurde anschließend mit NaOH auf 7.4 eingestellt. Die Lösung wurde während der pH-Einstellung mit Eis gekühlt.

Isotoner Inkubationspuffer für Bindungsversuche an HEK-293-Zellmembranen

5 mM	HEPES
139 mM	NaCl
5 mM	KCl

Die Substanzen wurden in Aqua demin. gelöst und die Lösung im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Im Anschluß daran wurde der pH-Wert mit NaOH auf 7.4

eingestellt.

Inkubationspuffer für die Bindung an ganzen Zellen

5 mM	HEPES
139 mM	NaCl
5 mM	KCl
1.2 mM	MgCl ₂

Die Substanzen wurden in Aqua demin. gelöst und die Lösung im Kühlraum (6°C) gelagert. Entsprechend der Anzahl der Ansätze wurde vor jedem Ganzzellversuch die benötigte Menge an Puffer entnommen und für 40 Minuten im Wasserbad bei 37°C mit Carbogen (95% O₂/ 5% CO₂) begast. Nach Ablauf der 40 Minuten wurde der pH-Wert auf 7.4 eingestellt und anschließend wurden

11 mM D(+)-Glucose

sowie

1.25 M CaCl₂

hinzugegeben. Die Begasung des Puffers wurde bis zum Beginn der Inkubation fortgesetzt.

Waschpuffer

Verdünnung der Bindungsansätze und Stoppen der Inkubation vor der Filtration und Waschen der Filter nach der Filtration

50 mM	TRIS
154 mM	NaCl

Als Lösungsmittel für die Substanzen diente Aqua demin. Es wurde eine zehnfach konzentrierte Stammlösung angesetzt. Zur Herstellung des

Waschpuffers erfolgte eine Verdünnung der Stammlösung im Verhältnis 1:10. Anschließend wurde die Lösung über Nacht im Kühlraum (6°C) abgekühlt. Unter Verwendung von HCl wurde der pH-Wert auf 7.4 eingestellt. Währenddessen wurde die Lösung mit Eis (0°C) gekühlt.

Kulturmedium für die HEK-293-Zelllinie

90 %	MEM (Minimum Essential Medium)
10 %	hitzeinaktives FBS
20 µg/ml	Gentamycin

Es wurde jeweils eine Flasche MEM (500 ml) frisch angesetzt und bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank aufbewahrt.

Das Antibiotikum Gentamycin wurde als Stammlösung mit einer Konzentration von 50 mg/ml geliefert.

Das Gentamycin wurde in 6 ml-Aliquots angesetzt ($c = 2\text{mg/ml}$), anschließend bei -20 °C aufbewahrt und dem Kulturmedium bei dessen Herstellung hinzugegeben (Endkonzentration $c = 20\text{ µg/ml}$).

Das Kulturmedium wurde vor der Verwendung im Wasserbad auf 37 °C erwärmt.

Hitzeinaktiviertes fötales Rinderserum (FBS)

Serumzusatz zum Zellkulturmedium

Für die Kultivierung der HEK-293-Zelllinien wurde dem Kulturmedium hitzeinaktiviertes FBS zugesetzt. Dieser Serumzusatz enthält zahlreiche Faktoren, die die Zellteilung und somit das gesamte Wachstum der Zellpopulation fördern. Um einer möglichen Restaktivität von Serumproteasen vorzubeugen, wurde eine Hitzeinaktivierung durchgeführt. Dazu wurde das FBS, welches bis dahin bei -30 °C aufbewahrt worden war, aufgetaut und im Wasserbad (55 °C) für 1.5 Stunden hitzeinaktiviert. Bis zur weiteren

Verwendung wurde das FBS im Kühlschrank gelagert.

Geneticin

Geneticin ist ein Aminoglykosid-Antibiotikum, dessen Toxizität, außer bei Bakterien, Hefen, Pflanzen, Protozoen, Helminthen, auch bei eukaryontischen Zellen zum Zelltod führen kann.

Zur Selektion der transfizierten HEK-293-Zellen wurde Geneticin in einer Endkonzentration von 300 µg/ml Geneticinsulfat hinzugefügt. Dadurch gelangen nur diejenigen Zellen zum Wachstum und zur Zellteilung, die das Plasmid mit dem Geneticin-Resistenzgen und der cDNA, die für die jeweilige Untereinheit (K_{IR}6.2, SUR2A, SUR2A(Y1206S), SUR2B) des K_{ATP}-Kanals kodiert, bei der Transfektion aufgenommen haben.

Die Substanz wurde in sterilem (1h bei 4 bar, 121 °C) Puffer (100 mM HEPES; pH=7.4 bei Raumtemperatur) gelöst, in 1 ml Eppendorf-Gefäße aliquotiert und im Kühlschrank bei -20 °C aufbewahrt.

Gefriermedium

Kryokonservierung von HEK-293-Zellen

Jeweils frisch angesetzt:

Gefriermedium A	MEM +	40 % (v/v) FBS
Gefriermedium B	MEM +	20 % (v/v) DMSO

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

Stammlösungen für die Proteinbestimmung

Lowry A:

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

Lowry B:

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

Lowry C:

2 % 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 als Fertiglösung erworben.

Proteinbestimmungslösungen

Lowry E:

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

Um Ausfällungen zu vermeiden, mußte genau diese Reihenfolge eingehalten werden.

Lowry F:

Lowry D	1 Teil
Aqua demin.	1 Teil

Lowry E und F wurden für jede Proteinbestimmung frisch angesetzt.

2.3 HEK-293-Zellen

Die HEK-293-Zelllinie stammt aus menschlichen embryonalen Nierenzellen (Human Embryonal Kidney Cells), die durch den DNA-haltigen Adenovirus-Typ 5 tumorös transformiert und dadurch immortalisiert wurden (Graham et al., 1977).

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

2.3.1 Kultivierung der HEK-293-Zelllinie

Die Zellen wurden in jeweils 10 ml Kulturmedium in einer Petrischale (Firma Greiner; Frickenhausen) aus Plastik, die einen Durchmesser von 9.4 cm hat, im Brutschrank kultiviert. Die Temperatur im Inkubator lag bei 37 °C und die Atmosphäre wies neben einer hohen Luftfeuchtigkeit, ein Luft/CO₂-Verhältnis von 95 %:5 % auf.

Bei einer Konfluenz von 70-80 % (7-10 Millionen Zellen pro Schale) wurden die Zellen in einem Verhältnis von 1:2 bis 1:4 passagiert. Die dazu benötigten neuen Schalen wurden beschriftet, falls nötig wurden jeweils 100 µl Geneticin in die Schalen vorpipettiert und mit 9 ml Kulturmedium aufgefüllt. Bei den zu passagierenden Schalen wurde zunächst das alte Medium abgesaugt und anschließend je nach Passage (1:2-1:4) die Zellen mit 2-4 ml frischem, erwärmtem Medium von der Schalenoberfläche abgelöst. In die zuvor vorbereiteten Schalen wurden je 1 ml Zellsuspension gegeben und durch vorsichtiges Schwenken die Zellen in den Schalen verteilt.

Die Zellen, die transfiziert wurden, können durch das zugegebene Geneticinsulfat von den nicht-transfizierten Zellen selektiert werden, da diese mit der bei der Transfektion aufgenommenen DNA, auch ein Geneticin-Resistenzgen erworben haben.

2.3.2 Transfektion

Die Transfektion der HEK-293-Zellen wurde freundlicherweise von Frau Dr. Hambrock und ihrer Assistentin Frau Müller durchgeführt.

Zur Transfektion wurden Schalen, die eine 70-80 %ige Konfluenz aufwiesen, verwendet. Diesen Schalen wurde der pcDNA 3.1-Vektor (Invitrogen), der die kodierende Sequenz für den jeweiligen SUR und Kir6.x enthält, zugesetzt. In der vorliegenden Dissertation enthielt der Vektor die Sequenz für murinen SUR2A oder SUR2A(Y1206S) und für K_{IR}6.2.

Unter Verwendung von LipofektAMINE und Opti-MEM (Life Technologies) wurde die Transfektion durchgeführt. Danach wurden die Zellen für 5 Stunden mit dem Transfektionsreagenz und der jeweiligen DNA im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde ein Gemisch aus 80 % MEM und 20 % FBS hergestellt und zum Transfektionsgemisch hinzugegeben. Die Schalen wurden wieder in den Brutschrank verbracht.

In den folgenden 48 Stunden exprimierten die Zellen die Fremd-DNA. Nach den ersten 24 Stunden post transfectionem wurde das gesamte Transfektionsgemisch abgesaugt und die Zellen mit frischem Medium (MEM + 10 % FBS + Gentamycin) vorsichtig überschichtet. Die Isolierung der stabil transfizierten Zellen wurde erreicht, indem die Zellen nach weiteren 24 Stunden mit frischem Medium abgelöst und die Zellsuspension 1:20 (v/v) in geneticinhaltigem Medium (700 µg/ml) verdünnt wurde.

Nach 2 Monaten wurde das Geneticin auf 450 µg/ml und weitere 2 Monate später auf 300 µg/ml reduziert.

2.3.3 Einfrieren von HEK-293-Zellen

Es wurden Zellen verwendet, die in den Schalen eine Konfluenz von 70-80 % (7 Millionen Zellen pro Schale) erreicht hatten. Die Schalen wurden dabei in einem Verhältnis von 1:1 auf Kryoröhrchen verteilt und anschließend eingefroren. Das alte Medium wurde abgesaugt und die Zellen in 4 ml Gefriermedium A pro Schale von der Schalenoberfläche abgespült und zentrifugiert (500 x g, 5 min).

Währenddessen wurden in die einzelnen Kryoröhrchen 500 µl Gefriermedium B vorgelegt. Nach erfolgter Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen in 500 µl/Schale Gefriermedium A resuspendiert. Von dieser Zellsuspension wurden jeweils 500 µl in die bereits vorbereiteten Kryoröhrchen pipettiert. Die folgenden 24 Stunden wurden die Zellen bei -80 °C aufbewahrt und anschließend in flüssigen Stickstoff überführt.

Die letzten Arbeitsschritte beim Einfrieren der HEK-293-Zellen erforderten ein besonders rasches Arbeiten, um die Kontaktzeit der Zellen mit dem Detergens DMSO möglichst gering zu halten, da es sonst zu Zellschädigungen oder gar Absterben der Zellen hätte kommen können.

2.3.4 Auftauen von HEK-293-Zellen

Um wiederum die Kontaktzeit der Zellen mit dem Detergens DMSO nach dem Auftauen möglichst gering zu halten, wurde der Auftauvorgang zügig durchgeführt. In ein 50 ml Falcon-Röhrchen wurden 20 ml Kulturmedium/Schale (37 °C) gefüllt. Ein aus dem flüssigen Stickstoff entnommenes Kryoröhrchen, das die Zellmenge von einer Schale enthielt, wurde im Wasserbad (37 °C) aufgetaut, so dass gerade noch ein Eiskern erkennbar war. Daraufhin wurde die Zellsuspension rasch aus dem Kryoröhrchen in das bereits vorbereitete Medium überführt, dadurch in Medium verdünnt und 2-3 Min. bei 200 x g zentrifugiert. Das so entstandene Pellet (aufgetaute HEK-293-Zellen) wurde in 10 ml Kulturmedium resuspendiert und in einer Petrischale (ø 9.4 cm) verteilt. Die Kultivierung nach dem Auftauen erfolgte zunächst noch ohne Geneticin, um ein gutes Anwachsen der Zellen zu gewährleisten. Nach einer Dauer von ungefähr 3 Tagen und unter der Voraussetzung, dass die Zellen eine Konfluenz von 60-80% aufwiesen, wurden sie unter Zugabe von 300 µg/ml Geneticin im Verhältnis 1:3 passagiert und anschließend im Brutschrank zur weiteren Kultivierung aufbewahrt.

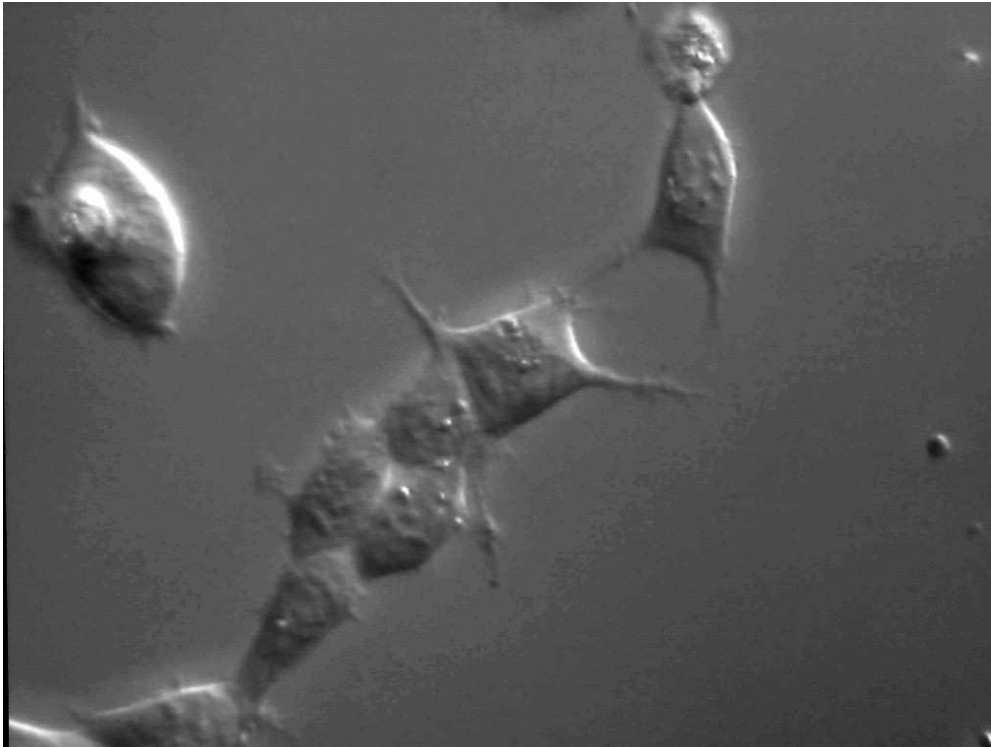


Abbildung 7: Lichtmikroskopische Darstellung von HEK-293-Zellen bei niedriger Konfluenz. Die Abbildung entstand in 40-facher Vergrößerung im Differenz-Interferenz-Kontrastmodus und lässt die für die Zellen typischen Zellausläufer schön erkennen.

2.3.5 Herstellung einer mikrosomalen Membranfraktion aus HEK-293-Zellen

Zur Aufarbeitung einer mikrosomalen Membranfraktion wurden HEK-293-Zellen mit einer Konfluenz von 60-80 % (7-10 Millionen Zellen pro Schale) verwendet. Die Zellen wurden mit dem in der Schale enthaltenen Medium (10 ml/Schale) abgelöst und in Falcon-Röhrchen überführt. Dabei war darauf zu achten, dass bei der Aufarbeitung von mehr als 10 Schalen die bereits abgelösten Zellen ins Wasserbad (37 °C) gestellt wurden, um den Zellmetabolismus möglichst stabil zu halten. Nach dem Ablösen wurden die Zellen bei Raumtemperatur zentrifugiert (500 x g, 5 Min.), anschließend das Medium abgesaugt, durch Resuspension des Bodensatzes (Zellen) in 4 ml/Schale hypotonem Puffer lysiert und bei 4 °C ultrazentrifugiert (100000 x g, 30 Min.). Nach der Zentrifugation wurden die Membranen in 1 ml / 3 Schalen isotonem

Inkubationspuffer resuspendiert, in 2 ml Eppendorf-Röhrchen zu je 1 ml Membransuspension aliquotiert und bei -80 °C eingefroren. Die Membranen wurden nach dem Auftauen vor jedem Versuch im Polytron-Homogenisator homogenisiert (5-8 Sek., 10000 x g).

2.3.6 Präparation von ganzen HEK-293-Zellen

Experimente an ganzen Zellen setzen deren Vitalität und Integrität während der gesamten Präparation und Inkubation mit dem Radioliganden voraus. Um diese Anforderungen gewährleisten zu können, wurde ein begaster O₂- und CO₂-gesättigter Puffer verwendet, der mit Glucose angereichert wurde.

Desweiteren sollten alle Arbeitsschritte möglichst bei 37 °C durchgeführt werden.

Vor jedem Versuch an ganzen Zellen wurde die entsprechend benötigte Menge an begastem Puffer frisch hergestellt. Die Begasung mit Carbogen (95 % O₂/5 % CO₂) erfolgte für 40 Min. im Wasserbad bei 37 °C. Nach Einstellung des pH-Wertes auf 7.4 wurden 11 mM Glucose und 1.25 mM CaCl₂ zugegeben. Der Puffer wurde während des gesamten Versuchs weiterbegast und auf 37 °C gehalten. Die Zellen (aus einer Kulturschale) wurden mit 5 ml begastem Puffer von der Schalenoberfläche abgelöst und in einem Volumen von höchstens 20 ml für 5 Min. bei 500 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt. Zur Entfernung von Medienresten, die die Proteinbestimmung und eventuell die Bindung beeinträchtigen könnten, wurde der Bodensatz in 20 ml begastem Puffer resuspendiert und nochmals für 5 Min. bei 500 x g zentrifugiert (Waschschritt). Nach erneutem Absaugen des Überstandes wurde das Pellet in begastem Puffer resuspendiert und während der anschließenden Inkubationsphase im Wasserbad bei 37 °C gehalten.

2.4 Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde nach Lowry et al. (1951) durchgeführt.

Um den Proteingehalt der Membranfraktion zu bestimmen, wurde die Suspension (Puffer und darin gelöstes Protein) nach Versuchsende in NaOH (0.1 M) verdünnt. Störungen der Extinktionsmessung im Photometer durch nicht gelöste Partikel konnten somit vermindert und die Proteinkonzentration im linearen Bereich der Standardmesskurve bestimmt werden (Verdünnung 1:10 oder 1:20).

Die Standardmesskurve wurde zuvor mit Rinderserumalbumin (BSA), das in verschiedenen Konzentrationen in NaOH (0.1 M) gelöst wurde, erstellt. Die Konzentrationsreihe mit BSA wurde als Eichgerade aufgetragen. Es wurde allerdings festgestellt, dass die Puffersubstanz HEPES mit der Proteinbestimmung erheblich interferiert. Aus diesem Grund wurde für HEPES eine zusätzliche Extinktionskurve bei verschiedenen Konzentrationen in NaOH (0.1 M) erstellt.

Die Proteinbestimmung erfolgte in Halbmikroküvetten. Um jeweils einen möglichst genauen Extinktionswert, sowohl für die Membranfraktion, als auch für den Puffer ermitteln zu können, wurde eine 3-fach Bestimmung der Werte durchgeführt. Zu 200 µl verdünntem Protein oder Puffer bzw. NaOH (0.1 M) als Leerwert wurden 1ml Lowry E gegeben und nach einer Inkubationsdauer von 5 Min. zusätzlich 100 µl Lowry F. Die fertigen Reaktionsansätze wurden gut durchmischt und bei Raumtemperatur für 20 Min. inkubiert. Danach wurde mittels Spektralphotometrie (Hitachi U-3.000) die Messung der Proteinkonzentration durchgeführt. Die Wellenlänge der Wolfram-Lampe betrug dabei 770 nm bei einer Spaltbreite von 5 nm. Die optische Dichte (OD_{770}) der jeweiligen Probe und des Puffers wurde gegen die des Leerwertes gemessen. Bis zu einer Proteinkonzentration von ca. 30 µg (in der Küvette) lag die OD_{770} unter 0.3 und zeigte eine lineare Abhängigkeit, wie auch der anfängliche Kurvenverlauf mit der Puffersubstanz HEPES. Die zur Berechnung der Proteinkonzentration gebildete Differenz zwischen der Extinktion des Proteins

und der des Puffers war somit ebenfalls linear.

Bei Proteinkonzentrationen unter 0.3 konnte die Funktion der Eichgeraden angewandt werden:

$$OD_{770} = 0.0132 \cdot m_{\text{Protein}} \quad \text{bzw.} \quad m_{\text{Protein}} = \frac{OD_{770}}{0.0132}$$

Gleichung 2

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

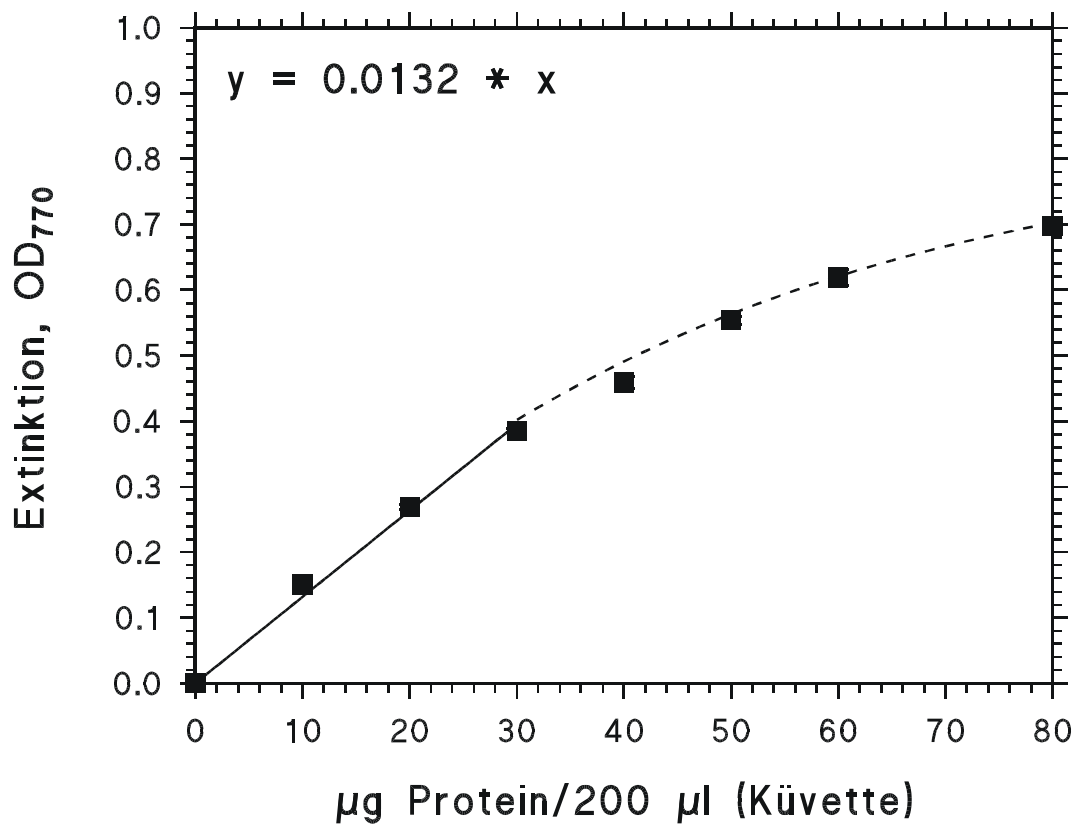


Abbildung 8: Eichkurve für die Proteinbestimmung nach Lowry. Die durchgezogene Linie gibt den linearen Bereich bis 30 μg Protein wieder. Bei Berücksichtigung aller Messpunkte erhält man eine Sättigungsfunktion (gestrichelt, ω).

2.5 Radioligandenbindungsexperimente

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

Die reversible und dem Massenwirkungsgesetz folgende Radioligandenbindung ist für eine Ligand-Rezeptor-Interaktion charakteristisch. Dabei liefert die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D ein Maß für die Stärke der Bindung.

Gleichgewichtsbindungsstudien können im Wesentlichen die Form eines Sättigungs- oder eines Konkurrenzexperimentes annehmen.

Sättigungsexperimente:

Diese technisch einfachen und am häufigsten durchgeführten Bindungsuntersuchungen ermöglichen eine genaue Bestimmung der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_D . Im Allgemeinen wird die Konzentration des Rezeptors konstant gehalten, während diejenige des Radioliganden in einem festgelegten Konzentrationsbereich variiert wird. Da ein Radioligand, je nach seinen chemischen und biologischen Eigenschaften (Bsp. Lipophilität, Affinität zum Rezeptor) eine gewisse Tendenz zur unspezifischen Bindung zeigt, ist es wichtig die eigentliche spezifische Rezeptorbindung davon zu unterscheiden. Eine zusätzliche Bindungskurve in Gegenwart eines ausreichend großen Überschusses an nicht-markiertem Liganden, die parallel zum eigentlichen Bindungsexperiment (totale Bindung) erstellt wird, soll helfen spezifische und nicht-spezifische Bindung voneinander abzugrenzen.

Konpetitionsexperimente:

Die Hemmung einer Radioligandenbindung durch einen nicht-markierten Liganden (Inhibitoren) ermöglicht die molekularpharmakologische Charakterisierung der jeweils untersuchten Bindungsstelle. Dabei treten nicht-markierter Ligand und Radioligand in Konkurrenz um den Bindungsplatz. Mit steigender Konzentration an nicht-markiertem Liganden kann somit die (spezifische) Bindung des Radioliganden vollständig verdrängt werden.

Diese Art von Bindungsuntersuchungen liefert wichtige Informationen über die Dissoziationskonstante K_D eines unmarkierten Liganden bzw. wichtige Hinweise bezüglich einer möglichen Heterogenität von Bindungsstellen. Die K_D eines unmarkierten Liganden kann jedoch nur ermittelt werden, falls die K_D des Radioliganden zuvor in einem Sättigungsexperiment bestimmt worden ist.

2.5.1 Wahl des Radioliganden

Der Radioligand muß bestimmten Anforderungen gerecht werden: er muß eine ausreichende Affinität zum Rezeptor besitzen, desweiteren sollte seine Dissoziationskonstante möglichst im nanomolaren oder sub-nanomolaren Bereich liegen, da Bindungsuntersuchungen mit K_D -Werten im mikromolaren Bereich, infolge rascher Dissoziation des Komplexes bei ungenügender Affinität, nicht vertrauenswürdig und aussagekräftig sind. Darüber hinaus ist es sehr wichtig zu wissen, ob die radioaktive Markierung des Liganden die biologische Wirkung verändert. Um diese Frage beantworten zu können, muß zunächst das unmarkierte Analogon zum Radioliganden synthetisiert und pharmakologisch getestet werden. Insbesondere bei mit Tritium markierten Ligandmolekülen sind, im Gegensatz zu jodierten, diesbezüglich kaum Veränderungen zu erwarten. Weiter sollte der Radioligand chemisch und radiochemisch stabil und rein sein, da Inhomogenitäten in der Stabilität und / oder bereits geringe Kontaminationen die Ergebnisse eines Bindungsexperimentes maßgeblich verfälschen können. Außerdem sollte die Reversibilität der Bindung des Radioliganden an den Rezeptor gegeben sein. Zuletzt sollte noch auf die unspezifische Bindung des radioaktiv markierten Liganden an Nicht-Rezeptor-Material hingewiesen werden. Ein zu hoher Anteil an unspezifischer Bindung, die wiederum stark von der Lipophilität des Liganden abhängt, im Vergleich zur spezifischen Bindung sollte möglichst vermieden werden, da wichtige Informationen verloren gehen könnten. Trotz gegebener Lipophilität kann dieses Problem günstig beeinflusst werden, wenn die Affinität des Liganden zum Rezeptor entsprechend hoch ist.

2.5.2 Gewinnung von Rezeptormaterial

Die Rezeptoren, die in dieser Arbeit untersucht wurden, befanden sich zum einen in den Membranen, die wie in Kap. 2.3.5 beschrieben, gewonnen worden waren und zum anderen in den Membranen ganzer Zellen (Ganzzellversuche: Beschreibung in Kap. 2.3.6).

2.5.3 Inkubationsansätze und Inkubationsbedingungen

Die Bindungsreaktion hat unter definierten Inkubationsbedingungen zu erfolgen. Dazu gehören Temperatur, Zeit, Zusammensetzung des Inkubationsmediums und mitunter die Wahl des Inkubationsgefäßes.

Im Allgemeinen wurde die Bindungsreaktion durch Zugabe des entsprechenden Rezeptormaterials zum Reaktionsgemisch gestartet.

Pipettierschema für Konkurrenzexperimente

Inkubationsansatz				
Rezeptormaterial	Membranen		Proteinmenge	~ 200µl
	Zellen			~ 500µl
Radioligand	[³ H]-P1075 ~2-3nM			100µl
	[³ H]-GBC ~2-4nM			25µl (10% Ethanol)
Inkubationspuffer (pH 7.4)	Membranen: 139mM NaCl, 5mM KCl, 5mM HEPES	bei [³ H]-P1075	+ 1mM ATP + 2.2mM Mg ²⁺ oder + 1mM EDTA	700µl
	<u>Zellen (zusätzlich):</u> + 1.2mM MgCl ₂ + 11mM Glucose + 1.25mM CaCl ₂ (Carbogen begast, Einstellung pH 7.4 bei 37°C)	bei [³ H]-GBC	+ 1mM ATP + 2.2mM Mg ²⁺ oder + 1mM EDTA	825µl

nicht-markierter Ligand	P1075			abhängig von Konz. 1-3µl vorpipettieren
	LRCK			
	GBC			
Gesamtvolumen pro Ansatz				1000 µl
<u>Inkubationsansatz:</u> Rezeptormaterial + Label ($[^3\text{H}]$ -P1075 / $[^3\text{H}]$ -GBC) + Inkubationspuffer (+1mM ATP + 2.2mM Mg^{2+} / + 1mM EDTA) + nicht-markierter Ligand				

Pipettierschema für Sättigungsexperimente

Inkubationsansatz				
Rezeptormaterial	Membranen		Proteinmenge	~ 50µl
Radioligand	$[^3\text{H}]$ -GBC	Konz. variabel→ 0.2-18nM		25µl (10% Ethanol)
Inkubationspuffer (pH7.4)	139mM NaCl, 5mM KCl, 5mM HEPES		+ 1mM ATP + 2.2mM Mg^{2+} / + 1mM EDTA	925 µl
Gesamtvolumen pro Ansatz				1000 µl
<u>Inkubationsansatz:</u> Rezeptormaterial + Label ($[^3\text{H}]$ -GBC) + Inkubationspuffer (+ 1mM ATP + 2.2mM Mg^{2+} / + 1mM EDTA)				

Inkubationstemperatur

Um unter möglichst physiologischen Bedingungen zu arbeiten, aber auch aus thermodynamischen Überlegungen, wird in den durchgeführten Bindungsuntersuchungen die Temperatur, ähnlich der Körpertemperatur, auf 37 °C festgelegt.

Inkubationszeit

Die Inkubationszeit wird mit Hilfe eines Assoziationsexperimentes ermittelt. Unter Berücksichtigung der Affinität des Radioligand-Rezeptor-Komplexes wird

die Zeit so gewählt, dass die Einstellung der Gleichgewichtslage erreicht ist.

Radioligand	Rezeptorsubtyp	Rezeptormaterial	Zeit
[³ H]-P1075	SUR2A	Membranen	13 Min.
	SUR2A(Y1206S)		13 Min.
	SUR2B		30 Min.
[³ H]-GBC	SUR2A	Membranen	13 Min.
	SUR2A(Y1206S)	Membranen/ganze Zellen	15 Min./ 30 Min.
	SUR2B	Membranen	30 Min.

Inkubationsmedium

Die Inkubationsmedien werden bei physiologischem pH gepuffert (pH-Wert 7.4). Dabei sollte darauf geachtet werden, dass der pH-Wert bei der Temperatur eingestellt wird, bei der später die Inkubation stattfindet.

2.5.4 Trennung von gebundenem und freiem Radioliganden

Am Ende der Inkubation muß der Radioligand-Rezeptor-Komplex vom freien Radioliganden getrennt werden. Dies geschieht mit Hilfe der Filtration. Das Ansatzvolumen von 1 ml wird zu einem Filtrationsvolumen von je 300 µl aliquotiert, in eiskaltem Waschpuffer verdünnt und unter Sog über Glasfaserfilter Whatman GF/B (Bindungsexperimente an Membranen) oder GF/C (Ganzzellversuche) in einer Multifunktionsanlage mit Hilfe einer Membranpumpe abgesaugt. Da das Fasergeflecht dieser Filter sehr eng ist, bleiben die festen Bestandteile des Präparates auf dem Filter zurück. Anschließend werden die Filter zweimal mit ca. 8 ml eiskaltem Waschpuffer gewaschen, um die im Präparat unspezifisch gebundene Radioaktivität zu entfernen.

2.5.5 Messung der Radioaktivität

Die quantitative Erfassung der Radioaktivität erfolgt je nach Art des Radioisotops mit einem β - oder γ -Scintillationscounter.

Das in diesen Bindungsstudien verwendete Radioisotop Tritium emittiert Betastrahlen, die mit Hilfe eines Flüssig-Scintillators in einem Betacounter erfasst werden. Um eine absolute Bestimmung vornehmen zu können, ist es notwendig die Zählzelle des Gerätes zu kennen. Die Experimente dieser Arbeit werden mittels TRI-CARB® Liquid Scintillation Analyzer 2000CA von PACKARD mit einer Zählzelle von ca. 54% erfasst, das heißt, dass der Zähler 54% der Zerfälle pro Minute detektiert:

$$f = 0.54 = \frac{\text{Im pulse / Min.}}{\text{Zerfälle / Min.}}$$

Gleichung 3

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

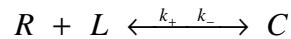
$$C = \frac{\text{gezählte dpm}}{2.2 \cdot 10^{12} \left(\frac{\text{dpm}}{\text{Ci}} \right) \cdot SA \left(\frac{\text{Ci}}{\text{mmol}} \right) \cdot V(\text{ml})} = \frac{\text{mol}}{\text{l}}$$

Gleichung 4

V	=	Volumen in ml
C	=	Konzentration in mol/l
SA	=	Spez. Aktivität in Ci/mmol
1Ci	=	$2.2 \cdot 10^{12}$ dpm/Min.

2.6 Modell der Rezeptorbindungsstudien

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



Gleichung 5

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

Im Gleichgewicht gilt das Massenwirkungsgesetz (MWG):

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

Gleichung 6

Dabei ist K_D die Gleichgewichtsdissoziationskonstante (mol/l).

Es gelten die Massenbilanzen:

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

Gleichung 7a und 6b

Der R_0 bedeutet totale Rezeptorkonzentration → also: total = frei + gebunden.

Die Experimente werden nach Möglichkeit so angelegt, dass die totale Ligandkonzentration viel größer, als die totale Rezeptorkonzentration ist.

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

Es sollte darauf geachtet werden, dass der gebundene Anteil des Radioliganden stets unter 5 % liegt.

Im Experiment wird die spezifische Bindung des Radioliganden an die Rezeptoren (B_S) immer durch die nichtspezifische Bindung (B_{NS}), die durch das

unspezifische Haften des Liganden am Protein und am Filter verursacht wird, überlagert. B_{NS} wird gemessen, nachdem die spezifische Bindung durch einen Überschuß an nicht-markiertem Liganden ($L \approx 1000 \cdot K_D$) blockiert wurde.

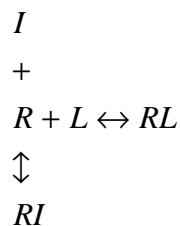
Experimentell bestimmt werden die totale Bindung (B_{TOT}) und die nicht-spezifische Bindung (B_{NS}). Aus diesen Werten wird die spezifische Bindung (B_S) berechnet:

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

Gleichung 8

2.6.1 Konkurrenzexperimente

Es wird von folgender Reaktion ausgegangen, in welcher L und I um R konkurrieren:



Gleichung 9

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

In der Präparation gibt es nur eine Klasse von Bindungsstellen (Rezeptoren). L und I versuchen sich gegenseitig von den Rezeptoren zu verdrängen. Gemessen wird die Abnahme von RL bei steigenden Konzentrationen von I. In den Experimenten wird zum Zeitpunkt $t = 0$ L und I gleichzeitig zur Rezeptorpräparation hinzugegeben und die Einstellung des Gleichgewichts abgewartet.

Ziel ist es die beobachtete Größe RL als Funktion des zugegebenen Inhibitors in einer Hemmkurve darzustellen.

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 10a und 10b

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

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

Gleichung 11

Der Mittelpunkt der Hemmkurve befindet sich bei einer Inhibitorkonzentration von $I = K_I (I + L/K_L)$ und wird mit IC_{50} bezeichnet. Die Beziehung zwischen dem Mittelpunkt der Hemmkurve (IC_{50}) und der Inhibitoraffinität (K_I) wird durch die Cheng-Prusoff-Gleichung beschrieben und erlaubt die Berechnung von K_I , wenn der Wert für K_L bekannt ist:

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

Gleichung 12

Cheng und Prusoff, 1973

Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_I , ebenfalls mit Hilfe der Cheng-Prusoff-Gleichung, besteht in der Auftragung der verschiedenen IC_{50} -Werte der einzelnen Experimente gegen die zugegebene Ligandenkonzentration L_0 . Durch einfache Umformung der Cheng-Prusoff-Gleichung erhält man eine Geradengleichung mit Ordinatenabschnitt K_I und Steigung (K_I/K_L):

$$IC_{50} = \frac{K_I}{K_L} \cdot L_0 + K_I$$

Gleichung 13

Im Falle der homologen Konkurrenz wird der Radioligand durch sein unmarkiertes Analogon verdrängt:

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

Gleichung 14

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

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

Gleichung 15

Dabei gilt: $px = -\log I$.

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

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

Gleichung 16

Hieraus lässt sich die maximale Bindungskapazität, d.h. die Gesamtrezeporenzahl $B_{Max} \equiv R_o$ berechnen:

$$B_{Max} = \frac{1}{y} \cdot B_s = \frac{L + K}{L} \cdot C$$

Gleichung 17

2.6.2 Verallgemeinerung der Bindungsisotherme nach Hill

Es kann vorkommen, dass die Bindungsisotherme steiler oder flacher, als es Gleichung 15 entspricht, ist. In diesem Fall wird Gleichung 15 durch einen

Exponenten n ($= n_H = Hill - Koeffizient$) verallgemeinert. Für die Inhibitionskurve gilt dann:

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

$$\text{logarithmiert } B_S = B_S(0) \cdot \left(1 + 10^{n(pIC_{50} - px)}\right)^{-1}$$

Gleichung 18a und Gleichung 18b

Für die Sättigungsisotherme gilt:

$$RL = R_o \cdot \frac{L^n}{L^n + K^n}$$

Gleichung 19

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

- $n = 1$: übliche Bindungsisotherme; nur eine Klasse von nicht miteinander wechselwirkenden Bindungsstellen sind vorhanden.
- $n > 1$: positive Kooperativität; mehrere Ligandmoleküle binden mit steigender Affinität an den Rezeptor.
- $n < 1$: negative Kooperativität; die Bindung des ersten Liganden erschwert die Bindung weiterer Ligandmoleküle, was in der Natur nur selten vorkommt. Häufig 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 nun nicht mehr deutlich voneinander getrennt sind, ergibt sich eine homogen flach abfallende Kurve.

2.6.3 Sättigungsexperimente

Gemessen werden B_{TOT} und B_{NS} als Funktion der freien Ligandkonzentration L . B_{NS} stellt eine schwache Bindung des Liganden an sehr viele Bindungsplätze dar, bei welcher eine Sättigung nicht erreicht wird. Deshalb wird von folgendem linearen Ansatz ausgegangen:

$$B_{NS} = a \cdot L$$

Gleichung 20

Die spezifische Bindung B_S wird aus Gl. 5 und GL. 7a bzw. 7b errechnet ($B_S \equiv C$):

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

Gleichung 21

mit $L = L_o - B_{TOT}$ (vgl. 7b)

Diese Gleichung lässt sich unter Bedingung (7b) umformen in

$$C \equiv R_o \cdot \frac{L}{L + K}$$

Gleichung 22

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

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

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

Gleichung 23

Nach Anpassung der Daten an Gl. 23 liefert der berechnete Graph $B_{Max} (= R_o)$ und $K_D (= K)$.

2.7 Datenauswertung

2.7.1 Konkurrenzexperimente mit [³H]-P1075

Alle Versuchsergebnisse wurden als Mittelwert ± Standardabweichung des Mittelwertes (standard error of the mean, SEM) angegeben. Für die einzelnen Experimente wurden die Daten an die Gl. 18a und 18b angepasst. Die Ergebnisse der Experimente einer Versuchsreihe wurden dann als %B_S gemittelt zusammengefasst, dabei wurde der Fehler durch leicht unterschiedliche Ligandkonzentrationen (Abweichung < 5%) vernachlässigt. Die so erhaltenen Werte wurden der logarithmierten Form der Gl. 18a und 18b angepasst.

$$\% B_S(I) = \frac{100}{1 + 10^{n \cdot (pIC_{50} - pI)}} \quad \text{bzw.} \quad \% B_S(I) = \frac{100}{1 + 10^{(pIC_{50} - pI)}}$$

Gleichung 24a und 24b

Für eine einfache, einstufige Verdrängung galt $n_H = 1$. Wurde diese Bedingung nach Anpassung der Daten an Gl. 18a und 18b erfüllt, so wurde zur Fehlerminimierung der verbleibenden Parameter der Hill-Koeffizient n_H in der Formel $n_H=1$ gesetzt.

2.7.2 Konkurrenzexperimente mit [³H]-GBC

Alle Ergebnisse wurden als Mittelwerte ± Standardabweichung des Mittelwertes

(standard error of the mean, SEM) ausgedrückt. Die K_D - bzw. die K_I -Werte wurden mit den jeweiligen 95% Konfidenzintervallen in Klammern angegeben. Für einstufige Verdrängungen gilt für die Berechnung der Versuchsergebnisse Gl.18a und 18b, für zweistufige Kurvenverläufe mußte die Gleichung erweitert werden:

$$B_{TOT}(I) = R_1 \cdot \frac{IC_{50.1}}{IC_{50.1} + I} + R_2 \cdot \frac{IC_{50.2}}{IC_{50.2} + I} + B_{NS}$$

Gleichung 25

R_1 und R_2 repräsentieren die beiden Rezeptorpopulationen im Präparat. Die zusammengefassten Werte wurden an folgende Gleichung angepasst:

$$\% B_{TOT}(I) = 100 - \frac{A_1}{1 + 10^{n(pI - pIC_{50})}} \quad \text{bzw.} \quad \% B_{TOT}(I) = 100 - \frac{A_1}{1 + 10^{pI - pIC_{50.1}}} - \frac{A_2}{1 + 10^{pI - pIC_{50.2}}}$$

Gleichung 26a und 26b

A_1 und A_2 stellen die Amplituden der Kurven dar. Für die zweistufige Gleichung wurden zur Vereinfachung die Hill-Koeffizienten $n_H=1$ gesetzt.

2.7.3 Sättigungsexperimente

In jedem Experiment wurden die totale Bindung (B_{TOT}), die nicht-spezifische Bindung (NSB) und die Labelkonzentration (L_0) gemessen. Zunächst wurde die Zunahme der nichtspezifischen Bindung bezogen auf die Labelkonzentration bestimmt. Die Steigung der so erhaltenen Gerade wurde in die Gleichung 23 eingefügt. Nach Anpassung der Daten an die Gleichung konnte direkt die zugehörige K_D abgelesen werden.

2.8 Statistik

Alle Ergebnisse wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung des Mittelwertes (standard error of the mean, SEM) angegeben. Die einzelnen Experimente, wie

auch die zusammengefassten Daten, wurden nach den oben angegebenen Gleichungen mit Hilfe von SigmaPlot ausgewertet.

Die Fehler der Parameter wurden unter der Voraussetzung, dass die Amplituden der Hemmkurven und die Logarithmen der IC₅₀-Werte (d.h. die pIC₅₀-Werte) normalverteilt sind, bestimmt.

Bei IC₅₀- oder K_D-Werten sind in Klammern die 95% Konfidenzintervalle angegeben. Die Konfidenzintervalle wurden nach folgender Formel

$$10^{-(pK \mp SEM)} \quad \text{mit} \quad SEM = \left[\frac{\sum_{i=1}^n (pK_i - \langle pK_i \rangle)^2}{n(n-1)} \right]^{1/2}$$

Gleichung 27

abgeschätzt, wobei n die Anzahl der ausgewerteten Einzelversuche angibt.

Nachdem geprüft wurde, dass die beiden Stichproben normalverteilt sind und aus der gleichen Grundgesamtheit stammen (d.h. die gleiche Varianz haben), wurde die statistische Signifikanz von Unterschieden zwischen zwei Meßserien mit Hilfe des student's t-test ermittelt.

Die Berechnung erfolgte mit SigmaStat und zur Anpassung diente SigmaPlot.

3 Ergebnisse

Die Aminosäuresequenzen der beiden Isoformen des Sulfonylharnstoffrezeptors SUR2, SUR2A und SUR2B, sind mit Ausnahme der letzten 42 Aminosäuren des C-Terminus identisch (Isomoto et al., 1996).

Bindungsexperimente an der Mutanten SUR2B (Y1206S) haben gezeigt, dass die Punktmutation Y1206S, bei welcher Tyrosin im SUR2 der Ratte durch die entsprechende Aminosäure (Serin) aus SUR1 ersetzt wurde, die Affinität des Rezeptors für GBC um einen Faktor 5-10 steigert (Hambrock et al., 2001).

Diese Ergebnisse warfen die Frage auf, ob die entsprechende Mutation (Y1206S) im SUR2A die pharmakologischen Eigenschaften des Rezeptors in ähnlicher Weise verändert, wie es in Bezug auf die Mutation in SUR2B(Y1206S) beobachtet wurde.

Zur Beantwortung dieser Frage wurden entsprechende Bindungsstudien an der Rezeptormutanten SUR2A(Y1206S) durchgeführt.

3.1 Bindung von [³H]-GBC an SUR2A(Y1206S) in HEK-293-Zellmembranen und in ganzen Zellen

3.1.1 Homologe Verdrängung der [³H]-GBC-Bindung durch GBC an SUR2A(Y1206S) in HEK-293-Zellmembranen in An- und Abwesenheit von 1 mM ATP + 2.2 mM Mg²⁺

In den folgenden Versuchsreihen wurde das Bindungsverhalten des tritiierten Kaliumkanalblockers [³H]-GBC durch homologe Competitionsexperimente untersucht.

Es wurden pro Versuchsreihe mit 0 mM Mg²⁺ und 1 mM EDTA bzw. 2.2 mM Mg²⁺ und 1 mM ATP im Ansatz je n=6 Experimente durchgeführt. In Verdrängungsmessungen mit [³H]-GBC wird die nicht-spezifische Bindung der SUR2-Rezeptoren mit 100 µM P1075 und nicht mit GBC bestimmt, da HEK-293-Zellmembranen, die SUR2-Rezeptoren exprimieren, für GBC endogene Bindungsstellen besitzen.

Die im Text aufgeführten Ergebnisse sind im Allgemeinen die Mittelwerte der Parameter aus der Auswertung der Einzelerperimente. Die in den Legenden der Abbildungen angegebenen Werte resultieren aus der Analyse der Mittelwertskurve und werden nicht weiterverwendet.

A) Hemmung der [³H]-GBC Bindung durch GBC in Anwesenheit von 0 mM Mg²⁺ und 1 mM EDTA

Abbildung 9 veranschaulicht den Kurvenverlauf der Konkurrenz durch GBC in Anwesenheit von 0 mM Mg²⁺ und 1 mM EDTA (Mittelwerte aus n=6 Versuchen).

Hambrock et al. (2002) zeigten in früheren Bindungsexperimenten, dass die Anwesenheit von MgATP im Versuchsansatz eine Reduktion der GBC-Bindung an alle SUR-Subtypen zur Folge hatte.

Um eine Restkontamination mit Mg²⁺-Ionen zu minimieren, wurde den Versuchsansätzen EDTA, das aufgrund seiner chemischen Struktur mit freien Mg²⁺-Ionen einen hochaffinen Chelatkomplex ausbildet, hinzugefügt. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte in %B_{TOT}.

Der Anteil der [³H]-GBC-Bindung an SUR2A(Y1206S) wurde durch den Anteil der durch P1075 (100 µM) verdrängbaren Bindung, d. h. 62±3 %B_{TOT}, bestimmt. Eine zweite niederaffine Komponente, die sich auf 19±3 %B_{TOT} belief, stellte einen ersten Anteil der [³H]-GBC-Bindung an HEK-zelleigene Proteine (nicht SUR) dar und sättigte bei einer Konzentration von 3 µM.

Die Auswertung erfolgte somit nach dem 2-Komponentenmodell (GL. 26b) mit $A_{1,GBC}=62\pm3\%B_{TOT}$. Die Hillkoeffizienten wurden auf $n_H=1$ festgesetzt.

Die Auswertung der einzelnen Versuche ergab für die beiden Komponenten einen pIC_{50,1}-Wert von 8.17±0.05 und 7.09±0.22 (n=6) und Amplituden von 62±3% und 19±3% der totalen Bindung (B_{TOT}). Die weitere nicht-spezifische Bindung, gemessen mit 3 µM GBC, ergab 20±3 %B_{TOT}.

Bei einer Radioligandkonzentration von $L_0=2.30\pm0.14$ nM ergab die Cheng-Prusoff Korrektur für die spezifische Bindung an die β-Untereinheit SUR einen pK_i-Wert von 8.37±0.08 ($K_{i,1}=4.3$ [3.0,6.2] nM) und für die Bindung an die

endogenen HEK-Zellproteine ein $pK_{I,2}$ -Wert von 7.11 ± 0.23 ($K_{I,2} = 78$ [27,135] nM).

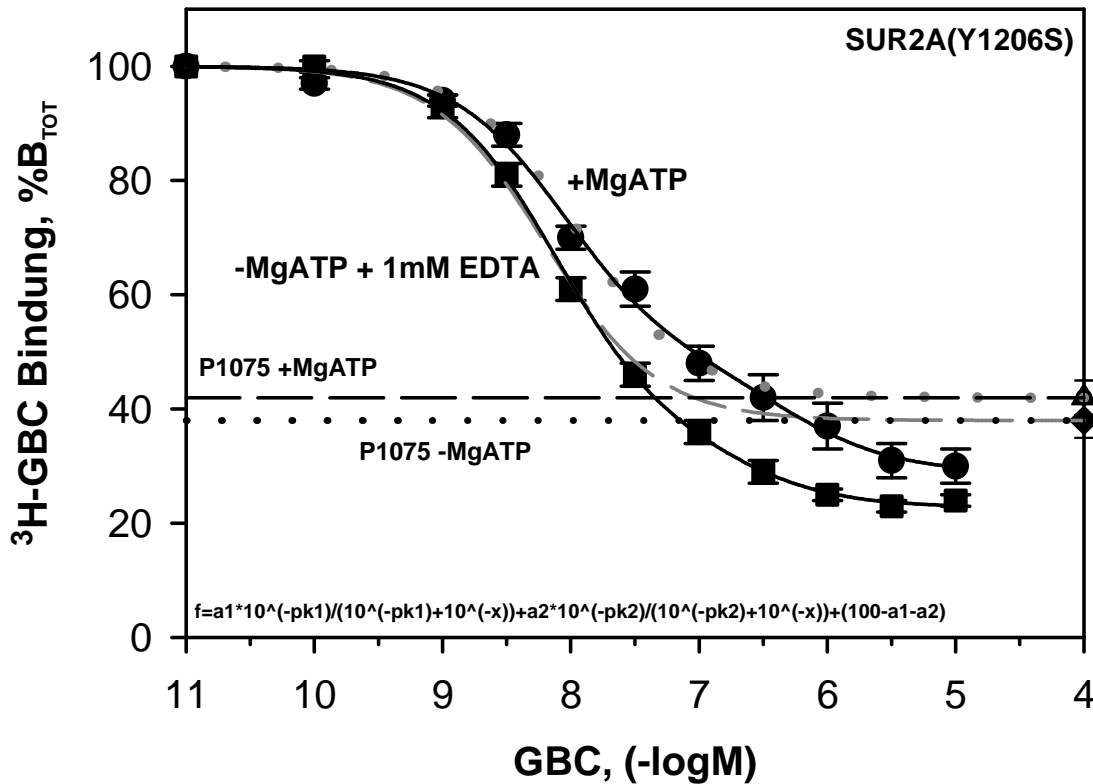


Abbildung 9: Homologe Verdrängung der [^3H]-GBC Bindung mit und ohne MgATP an HEK293-Zellmembranen permanent transfiziert mit SUR2A (Y1206S).

-MgATP: Mittelwerte aus $n=6$, $L_0 = 2.30 \pm 0.14$ nM, Proteinkonzentration = 0.206 ± 0.02 mg/ml. Inkubationszeit = 15 Min., Inkubationstemperatur = 37°C . $B_{\text{TOT}} = 310 \pm 38$ fmol/mg (=100%). Der Fit der Mittelwertkurve ergab folgende Parameter: $A_1 = 62 \pm 3$ % B_{TOT} (P1075 verdrängbarer Anteil), $A_2 = 15 \pm 0.6$ % B_{TOT} ; $pIC_{50,1} = 8.16 \pm 0.02$, $pIC_{50,2} = 6.87 \pm 0.09$, $n_H = 1$ (fix). Diese Werte weichen im Allgemeinen etwas von denen der Einzelauswertung und der aus der Mittelwertbildung erhaltenen Werte im Text ab. Die Korrektur nach Cheng-Prusoff ergab $K_{I,1} = 4.3$ [3.0,6.2] nM und $K_{I,2} = 78$ [27,135].

+MgATP: Mittelwerte aus $n=6$, $L_0 = 2.32 \pm 0.05$ nM, Proteinkonz. = 0.283 ± 0.06 mg/ml. $B_{\text{TOT}} = 184 \pm 20$ fmol/mg (=100%). Der Fit der Mittelwertkurve ergab folgende Parameter: $A_1 = 58$ % B_{TOT} (P1075 verdrängbarer Anteil), $A_2 = 15 \pm 3$ % B_{TOT} ; $pIC_{50,1} = 7.93 \pm 0.04$, $pIC_{50,2} = 5.81 \pm 0.30$, $n_H = 1$ (fix). Diese Werte weichen, wie oben beschrieben, etwas von denen aus der Einzelauswertung ab. Die Korrektur nach Cheng-Prusoff ergab $K_{I,1} = 11$ [7,18] nM und $K_{I,2} = 1.4$ [0.6,3.5] μM .

B) Hemmung der [³H]-GBC Bindung durch GBC in Anwesenheit von 2.2 mM Mg²⁺ und 1 mM ATP

Der Verlauf der Hemmkurve ist ebenfalls in Abbildung 9 dargestellt. Die Auswertung der Ergebnisse wurde, wie in den vorangegangenen Abschnitten beschrieben, durchgeführt.

Die Hemmkurve zeigt einen klar biphasischen Verlauf. Die erste hochaffine Komponente entspricht wiederum der [³H]-GBC Bindung an SUR2A(Y1206S). Ihr Anteil ist gleich dem durch P1075 (100 µM) verdrängbaren Anteil und wurde zu $A_{1,GBC}=58\pm3\%B_{TOT}$ bestimmt. Eine zweite niederaffine Komponente umfasste $A_{2,GBC}=14\pm2\%$ der totalen Bindung. Die Auswertung der nicht-spezifische Bindung ergab $28\pm2\%B_{TOT}$.

Die Auswertung der Einzelversuche erfolgte ebenfalls nach dem 2-Komponentenmodell (Gl. 26b) mit $A_{1,GBC}=58\%$. Die Hill-Koeffizienten wurden auf $n_H=1$ festgesetzt.

Bei einer Radioligandkonzentration von $L_0=2.32\pm0.05$ nM errechnete sich aus $pIC_{50.1}=7.89\pm0.1$ ein $pK_{i,1}$ -Wert von 7.98 ± 0.11 ($K_{i,1}=11$ [6.3,17] nM) für die spezifische Bindung an die β -Untereinheit SUR. Für die Bindung an die endogenen HEK-Zellproteine ließ sich aus $pIC_{50.2}=5.86\pm0.2$ unter Einbeziehung der Labelkonzentration von $L_0=2.32$ nM ein $pK_{i,2}$ -Wert von 5.86 ± 0.20 ($K_{i,2}=1.4$ µM [0.6,3.5] µM) bestimmen.

Mit $p<0.018$ ergab sich im t-test für unpaarige Stichproben ein signifikanter Unterschied der $pK_{i,1}$ -Werte für die spezifische Bindung an SUR in den beiden Versuchsreihen von 0.385, d.h. MgATP erniedrigte die Affinität (erhöhte die K_D) um einen Faktor $100^{0.385} = 2.4$.

Normality Test:	Passed	(P > 0,200)			
Equal Variance Test:	Passed	(P = 0,572)			
Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
MgATP	6	0	7,980	0,272	0,111
-MgATP	6	0	8,365	0,194	0,0794
Difference			-0,385		
t = -2,818 with 10 degrees of freedom. (P = 0,018)					
95 percent confidence interval for difference of means: -0,689 to -0,0805					

t-Test 1: Auswertung der pK_i -Werte der Einzelexperimente mit einem t-Test für unpaarige Stichproben (verwendetes Statistikprogramm: SigmaStat 2.03). Die pK_i -Werte aus den Einzelexperimenten der beiden Gruppen waren normal verteilt und stammten aus der gleichen Grundgesamtheit, so dass die Anwendung eines t-Testes gerechtfertigt war.

In Anwesenheit von MgATP wurden nicht alle zur Verfügung stehenden Bindungsstellen besetzt. MgATP reduzierte die Anzahl der Bindungsplätze ($=B_{MAX}$) um nahezu 50%, damit wurden die bereits von Hambrock et al. (Hambrock et al., 2002) gemachten Beobachtungen auch in dieser Versuchsreihe bestätigt.

3.1.2 Hemmung der [3 H]-GBC Bindung an SUR2A(Y1206S) durch GBC in ganzen Zellen

In dieser Versuchsreihe, bestehend aus homologen Konkurrenzexperimenten an ganzen Zellen, wurde untersucht, inwiefern sich das Bindungsverhalten von [3 H]-GBC am SUR2A(Y1206S) in Membranen von dem in ganzen Zellen unterscheidet.

Die im Text aufgeführten Ergebnisse sind im Allgemeinen die Mittelwerte der Parameter aus der Auswertung der Einzelexperimente. Die in den Legenden der Abbildungen angegebenen Werte resultieren aus der Analyse der Mittelwertskurve und werden nicht weiterverwendet.

Die Berechnung der Affinitätskonstanten K_D erfolgte durch Einsetzen der IC_{50} -Werte in die Gl.14 (Kap. 2.6.1).

Die Versuchsvorbereitung und Präparation der ganzen Zellen wurde, wie unter Kap. 2.3.6 beschrieben, durchgeführt.

Zur Durchführung der Experimente wurden je Versuch drei Schalen, deren Zellen eine Konfluenz von 70-80 % (~7-10 Millionen Zellen pro Schale) erreicht hatten, verwendet. Nach der Präparation der Zellen (siehe Kap. 2.3.6) wurde das Pellet in 8 ml Inkubationspuffer (37°C; begast; pH7.4) aufgenommen und für den Versuch verwendet.

Es wurden, bei n=4 Experimenten, jeweils 10 Ansätze mit Konzentrationen von 0.1 nM bis 10 µM des nicht-markierten Liganden GBC vorbereitet. Durch Zugabe des Proteins zum Zeitpunkt t=0 wurde die Reaktion gestartet. Nach Ablauf der Inkubationszeit von 13 Min. (37°C) wurde die Reaktion durch Entnahme von 0.3 ml-Aliquots und anschließender Filtration über GF-C Filter beendet.

Abbildung 10 veranschaulicht den Kurvenverlauf der homologen Verdrängung durch GBC an ganzen Zellen. Die Auswertung der Experimente erfolgte in %B_{TOT}. Die gemittelten Werte wurden nach dem 2-Komponentenmodell gefittet, wobei die Hill-Koeffizienten zur Vereinfachung mit n_H=1 festgesetzt wurden.

Die erste Komponente A_{1,GBC} entspricht der [³H]-GBC-Bindung an SUR2A(Y1206S) und wurde durch den Anteil der durch P1075 (100µM) verdrängbaren Bindung, d.h. 68±1% B_{TOT} bestimmt. Die Amplitude A_{2,GBC} der niederaffinen Komponente umfasst 15±2 % der totalen Bindung. Die nicht-spezifische Bindung wurde mit 3 µM GBC bestimmt.

Die Auswertung ergab einen pIC_{50.1}-Wert von 8.11±0.05 und einen pIC_{50.2}-Wert von 6.91±0.18. Unter Berücksichtigung der Radioligandkonzentration von L₀=2.69 nM errechnete sich für die spezifische Bindung an SUR2A(Y1206S) ein pK_{i,1}=8.31±0.08 (K_{i,1}=4.9 [4.1,5.5] nM) und für die Bindung an die endogenen HEK-Zellproteine ein pK_{i,2}=6.92±0.18 (K_{i,2}=120 [50,270] nM).

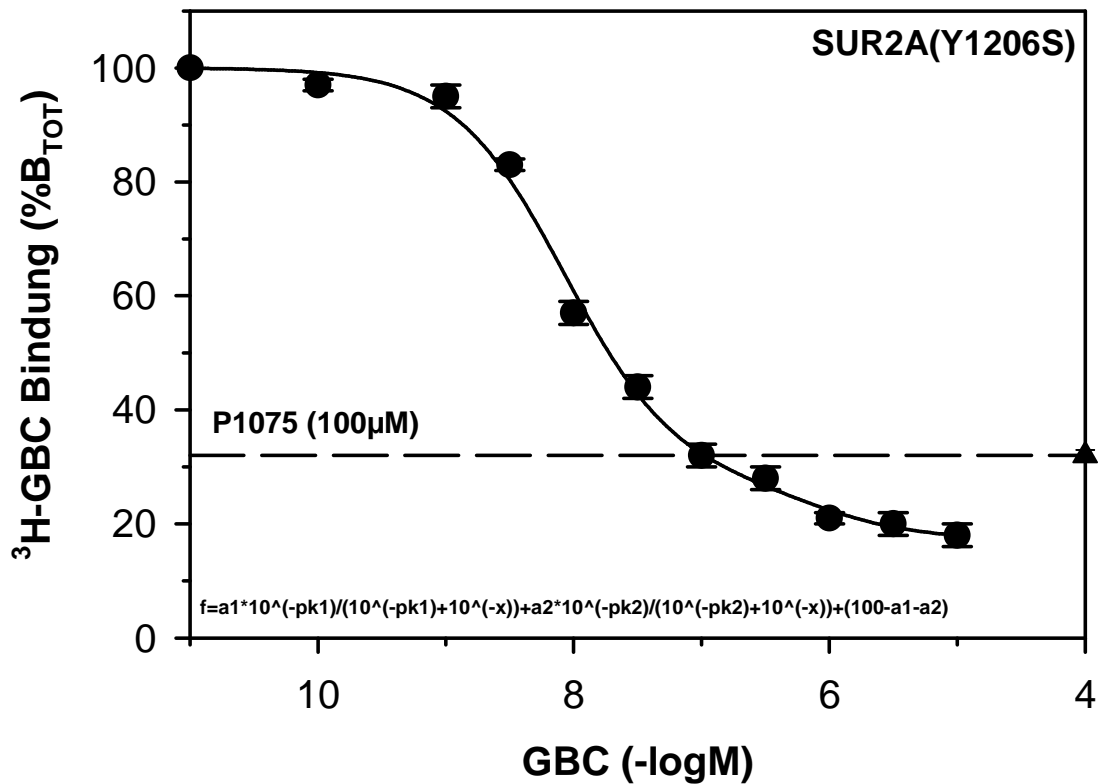


Abbildung 10: Homologe Verdrängung der [³H]-GBC Bindung an ganzen Zellen, permanent transfiziert mit SUR2A(Y1206S). n=4, L₀=2.69±0.09 nM, Proteinkonzentration=0.285±0.08 mg/ml, Inkubationszeit=15 Min., Inkubationstemperatur=37°C. B_{TOT}=652±140 fmol/mg (=100%), B_{NS}=106±15 fmol/mg (=17±2 %B_{TOT}). Der Fit der Mittelwertskurve ergab folgende Parameter: A₁=69±0 %B_{TOT}, A₂=13±2 %B_{TOT}, A_{P1075}=68±1 %B_{TOT}, pIC_{50,1}=8.11±0.04, pIC_{50,2}=6.43±0.28, n_H=1 (fix). Diese Werte weichen im Allgemeinen etwas von denen der Einzelauswertung und der aus der Mittelwertbildung erhaltenen Werte im Text ab. Die Korrektur nach Cheng-Prusoff ergab K_{i,1}=4.9 [4.1,5.9] und K_{i,2}=120 [52,275] nM.

3.2 Sättigungsexperimente der [³H]-GBC-Bindung an HEK-293-Zellmembranen transient transfiziert mit SUR2A(Y1206S)/K_{IR}6.2 in Abwesenheit von MgATP

Sättigungsexperimente ermöglichen eine genaue Bestimmung der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_D und der Konzentration der Rezeptoren (B_{MAX}) in der Präparation. Bei dieser Art von Experiment wurde die Konzentration des Rezeptors konstant gehalten, während die Konzentration des Radioliganden L_o variiert wurde.

Die unspezifische Bindung B_{NS} und die totale Bindung B_{TOT} wurden als Funktion der freien Ligandkonzentration L_o gemessen, wobei für jede Konzentration L_o experimentell ein B_{TOT} -Wert, nicht aber für jede Konzentration L_o ein B_{NS} -Wert, bestimmt wurde.

Die nicht-spezifische Bindung stellt eine schwache Bindung des Liganden an sehr viele Bindungsplätze dar, bei welcher eine Sättigung nicht erreicht werden kann. Es wurde deshalb von einem linearen Verlauf der nicht-spezifischen Bindung ausgegangen.

Aufgrund des linearen Ansatzes kann über die ermittelte Steigung dieser Geraden für jede Konzentration L_o ein B_{NS} -Wert bestimmt werden. Die Differenz aus B_{TOT} und B_{NS} entspricht der spezifischen Bindung B_S .

In $n=4$ Experimenten wurden die Abstände im nieder-nM Bereich zwischen den Radioligandkonzentrationen L_o möglichst gering gehalten, da die K_D in diesem Bereich vermutet wurde. Ab einer Konzentration von 4 nM wurden die Abstände zwischen den Konzentrationen und der damit verbundenen Bestimmung der Messpunkte größer gewählt. Die Konzentrationen L_o in den einzelnen Ansätzen lagen bei 0.3, 0.6, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0, 13.0 und 16.0 nM.

Die nicht-spezifische Bindung wurde nach Blockade der spezifischen Bindung durch einen Überschuß des nicht-markierten Liganden (100 μ M P1075) gemessen. Die Proteinkonzentration lag bei ca. 0.093 ± 0.02 mg/ml. Die experimentellen Werte wurden in Anwesenheit von 1mM EDTA je Ansatz und ohne Zusatz von MgATP bestimmt. Die Inkubationszeit betrug entsprechend vorangegangener Experimente mit [³H]-GBC an Membranen 15 Min (37°C).

Abbildungen 11 und 12 zeigen für $n=4$ Experimente zusammenfassend B_{TOT} , B_{NS} und $B_S=B_{TOT}-B_{NS}$ als Funktion der freien Ligandkonzentration $L_{frei}=L_o-B_{TOT}$. Die Abbildungen zeigen, dass die Experimente nicht gut zusammenpassen. Eine mögliche Erklärung dieses Umstandes ist die Verwendung unterschiedlicher Membranpräparationen.

Die Auftragung der spezifischen Bindung B_S gegen L_{frei} zeigt zunächst einen steilen Anstieg bis $L_{frei}=4-5$ nM. Danach fällt B_S wieder ab. Die Anpassung des Massenwirkungsgesetzes an diese Daten, ergab aus $n=4$ Experimenten einen pK_D -Wert von 9.38 ± 0.03 . Dies entspricht einem K_D -Wert von $0.417 [0.36,0.48]$ nM. Die maximale Bindungskapazität B_{MAX} belief sich auf 610 ± 110 fmol/mg.

Die Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_D der [3H]-GBC Bindung an HEK-Zellmembranen permanent transfiziert mit SUR2A(Y1206S) wurden bereits durch Frau Löffler-Walz in Sättigungsexperimenten ermittelt. Dabei lag die K_D in Anwesenheit von 2.2 mM Mg^{2+} und 1 mM ATP bei $6.6 [4.5,10.2]$ nM und die maximale Bindungskapazität B_{MAX} nahm einen Wert von 626 ± 107 fmol/mg an. In Abwesenheit von MgATP zeigte die K_D eine leichte Verschiebung nach links. Sie lag bei $5.6 [3.9,8.1]$ nM. Die B_{MAX} belief sich auf 1144 ± 128 fmol/mg. Die Ergebnisse dieser Sättigungsexperimente sind nicht dargestellt, werden aber für die weitere Diskussion benutzt.

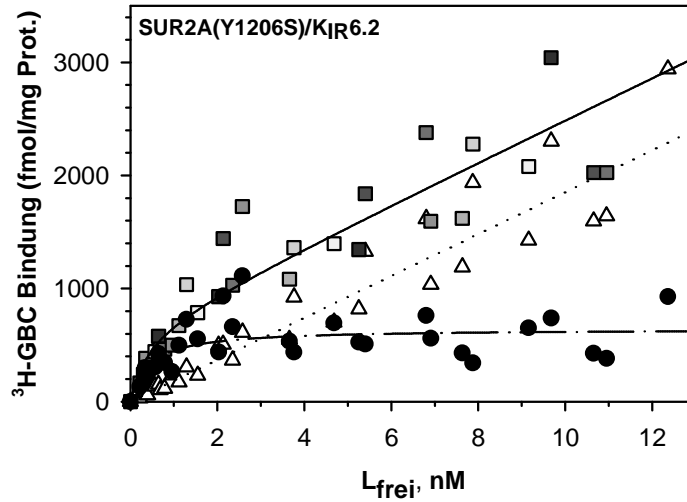


Abbildung 11: [³H]-GBC Sättigungsexperiment an HEK-293-Zellmembranen transient transfiziert mit SUR2A(Y1206S)/K_{IR}6.2 in Abwesenheit von 2.2mM Mg²⁺ und 1mM ATP. n=4, L₀ ist variabel, B_{TOT} (■), B_{NS} (Δ) und B_S (●) berechnet aus B_{TOT} und B_{NS} sind dargestellt. K_D liegt bei B_{MAX}/2 und beträgt 0.417 nM, B_{MAX}=640±110 fmol/mg. Ist B_{MAX} erreicht verläuft der Graph der totalen Bindung (■) parallel zur Geraden der nicht-spezifischen Bindung (●).

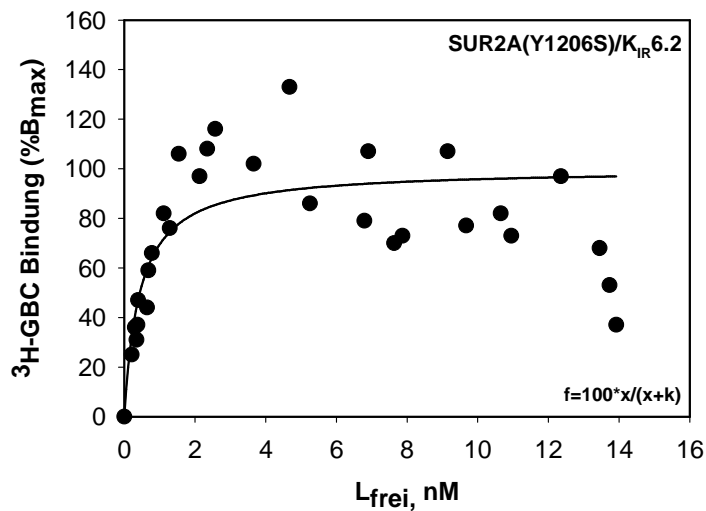


Abbildung 12: [³H]-GBC Sättigungsexperiment an HEK-293-Zellmembranen transient transfiziert mit SUR2A(Y1206S)/K_{IR}6.2 in Abwesenheit von 2.2mM Mg²⁺ und 1mM ATP. n=4, L₀ ist variabel, K_D= 0.417 nM, B_{MAX}=640±110 fmol/mg.

3.3 Hemmung der [³H]-GBC-Bindung an SUR2A(Y1206S) in HEK-293-Zellmembranen durch P1075

Um weitere Aussagen über die Interaktion der Bindungsstellen von GBC und P1075 am SUR2A(Y1206S) machen zu können, wurde die Hemmung der [³H]-GBC-Bindung durch den Öffner P1075 in Membranen in Anwesenheit von 2.2 mM Mg²⁺ und 1mM ATP untersucht.

Die im Text aufgeführten Ergebnisse sind im Allgemeinen die Mittelwerte der Parameter aus der Auswertung der Einzalexperimente. Die in den Legenden der Abbildungen angegebenen Werte resultieren aus der Analyse der Mittelwertskurve und werden nicht weiterverwendet.

Es wurden 10 Ansätze mit Konzentrationen von 1 nM bis 30 µM P1075 vorbereitet. Die nicht-spezifische Bindung wurde, wie bereits in vorangegangenen Versuchen, mit 100 µM P1075 bestimmt. Zusätzlich wurde zur Orientierung bei einer Konzentration von 3 µM GBC die Bindung gemessen. Da die gesamte durch P1075 hemmbare [³H]-GBC Bindung die Bindung an SUR darstellt, erfolgte die Auswertung in %B_S.

Die Hemmkurve zeigt einen klar biphasischen Verlauf. Die gemittelten Werte wurden nach dem 2-Komponenten-Modell gefittet, wobei der Hill-Koeffizient n_H in der Gleichung mit 1 festgesetzt wurde. Die Amplituden A_{1,P1075} und A_{2,P1075} sind durch die Bedingung A_{2,P1075}=100-A_{1,P1075} miteinander verknüpft.

Aus n=4 Experimenten ergab die Hemmung der [³H]-GBC Bindung mit nicht-markiertem P1075 bei einer Labelkonzentration von L₀=2.51 nM einen pK_{I,1}-Wert von 7.72±0.07 und einen pK_{I,2}-Wert von 5.82±0.15. Dies entspricht einem K_{I,1}-Wert von 19 [14,26] nM und einem K_{I,2}-Wert von 1.5 [0.8,3.0] µM, berechnet durch Gl.12. Die spezifische Bindung B_S liegt bei 94±6 fmol/mg. Die Amplitude A_{1,P1075} der hochaffinen Komponente umfasst nahezu ⅔ (63±2%) der totalen Hemmung. Die Amplitude A_{2,P1075} der niederaffinen Komponente beträgt 37±2% der spezifischen Bindung von [³H]-GBC am SUR2A(Y1206S). Der K_{I,2}-Wert von 1.5 µM dieser Komponente lässt sich gut in Übereinstimmung mit jenem, der in Abwesenheit von MgATP ermittelt wurde (K_I=2.2 µM), bringen (Stephan et al., 2005).

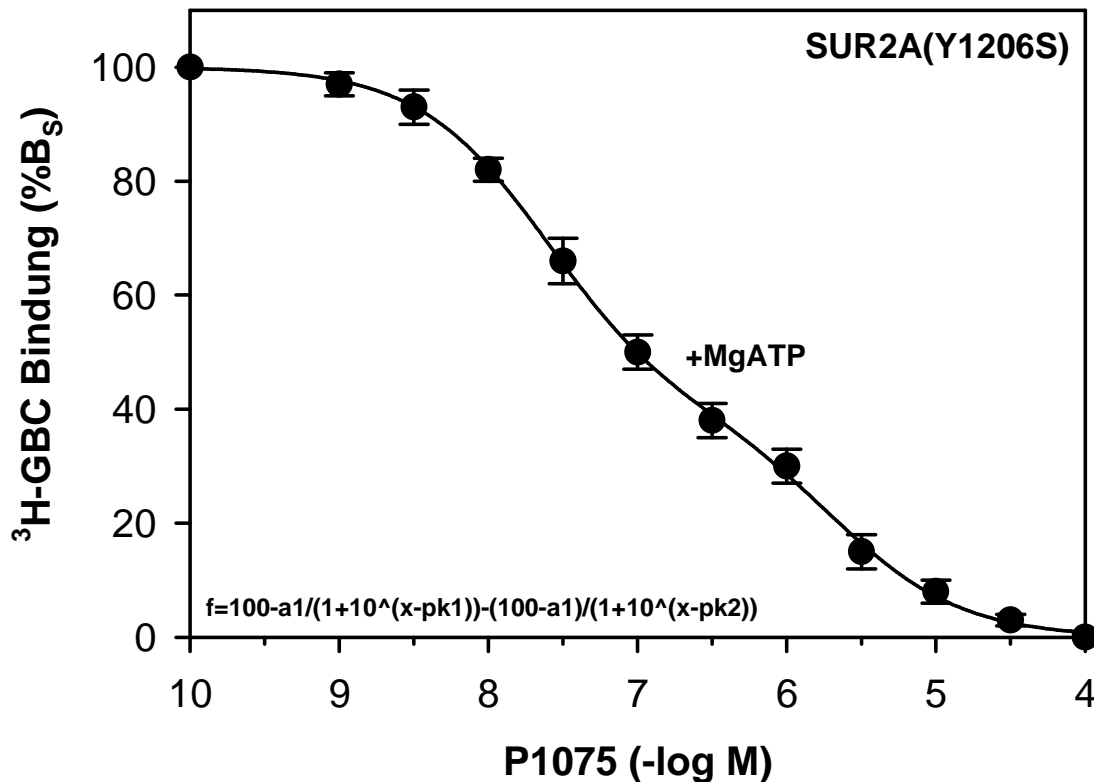


Abbildung 13: Hemmung der [³H]-GBC Bindung an HEK-293-Zellmembranen, permanent transfiziert mit SUR2A(Y1206S) durch P1075. Mittelwerte aus n=4, L₀=2.51±0.11 nM, Proteinkonzentration=0.323±0.03 mg/ml, Inkubationszeit=15Min., Inkubationstemperatur=37°C. B_{TOT}=197±10 fmol/mg, B_S=94±6 fmol/mg (=100%). Der Fit der Mittelwertskurve ergab folgende Parameter: A₁ =60±2 %B_S, A₂ =40±2 %B_S, pIC_{50.1}=7.61±0.03, pIC_{50.2}=5.67±0.05, n_H=1 (fix). Diese Werte weichen im Allgemeinen etwas von denen der Einzelauswertung und der aus der Mittelwertbildung erhaltenen Werte im Text ab. Unter Einbeziehung der aus den Sättigungsexperimenten ermittelten K_D(GBC)=6.6 nM ließ sich nach Cheng Prusoff ein K_{i,1}=19 [14,26] nM und K_{i,2}=1.5 [0.8,3.0] μM berechnen.

3.4 [³H]-P1075-Bindungsexperimente mit SUR2A(Y1206S) in Membranen aus HEK-293-Zellen, die den Rezeptor stabil exprimieren

3.4.1 Homologe Verdrängung der [³H]-P1075-Bindung durch sein nicht-markiertes Analogon

Zur Charakterisierung des Bindungsverhaltens von [³H]-P1075, eines radioaktiv-markierten K_{ATP}-Kanalöffners, am SUR2A(Y1206S) in HEK-293-Zellmembranen wurden zunächst homologe Competitionsexperimente mit dem nicht-markierten Analogon P1075 in Gegenwart von MgATP (1mM ATP + 2.2mM Mg²⁺) durchgeführt. Um die β -Untereinheit SUR in die Hochaffinitätsform für Öffner zu versetzen, ist die Anwesenheit von hydrolysierbarem Mg²⁺-gebundenem ATP oder MgADP (positiv allosterische Kopplung) unabdingbar (Quast et al., 1993, Schwanstecher et al., 1992, Hambrock et al., 1998).

Die aus den Einzelexperimenten ermittelten IC₅₀-Werte ermöglichten die Bestimmung der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_D, welche ein Maß für die Affinität der Bindung ist. Die K_D wurde durch Einsetzen der IC₅₀-Werte in die Gleichung 14 (Kap. 2.6.1) ermittelt.

Abbildung 14 zeigt die Hemmkurve der spezifischen [³H]-P1075-Bindung an SUR2A(Y1206S) durch P1075 (Mittelwerte aus n=9 Experimenten).

Der Fit der Mittelwertskurve ergab einen pIC₅₀-Wert von 7.47±0.01 und einen Hill-Koeffizienten von n_H=0.95±0.02.

Für die weiterführenden Beobachtungen und die tabellarische Zusammenfassung im Kapitel 4 wurden die Mittelwerte der Parameter aus der Auswertung der Einzelkurven benutzt. Aus diesen ergab sich ein K_D-Wert von 28 [22,35] nM.

Der Hill-Koeffizient aus der Auswertung der Einzelexperimente von 1.00±0.03 läßt auf eine einfache Verdrängungskurve mit nur einer Klasse von nicht miteinander wechselwirkenden Bindungsstellen schließen.

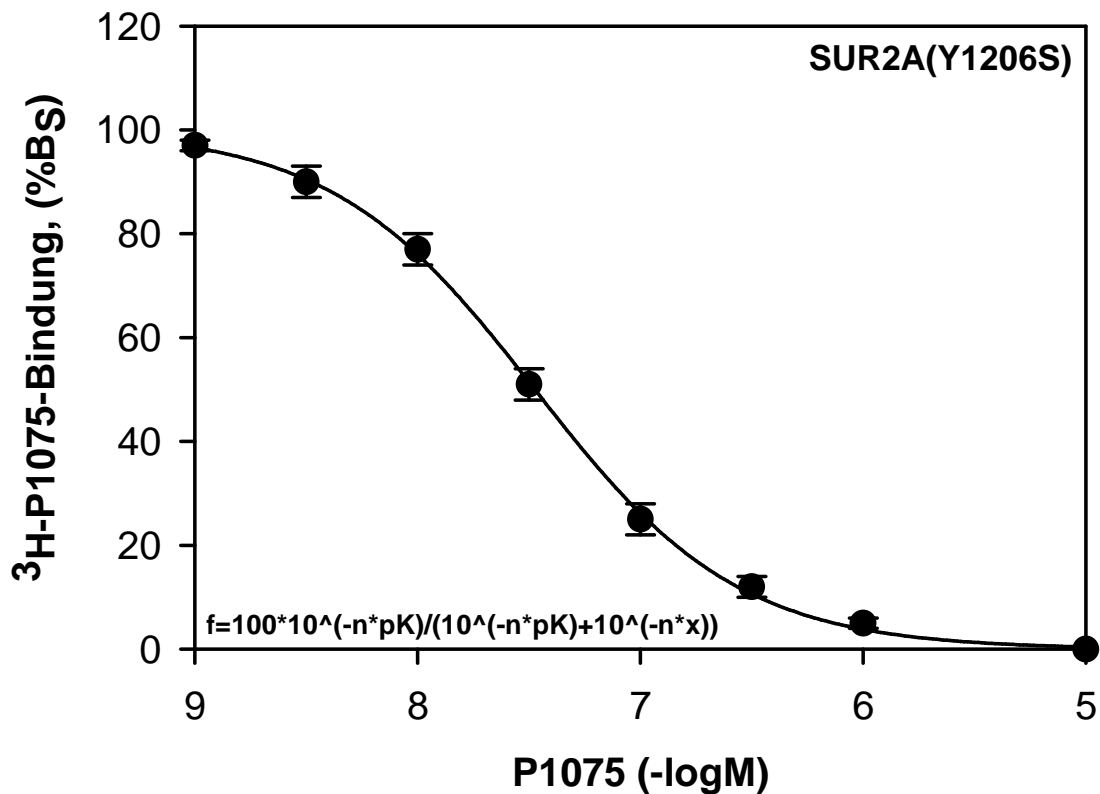


Abbildung 14: Homologe Verdrängung der [³H]-P1075-Bindung an SUR2A(Y1206S). Mittelwerte aus n=9, L₀=3.27±0.27 nM, Proteinkonzentration=0.295±0.06mg/ml, Inkubationszeit =13 Min., Inkubationstemperatur=37°C. B_{TOT}=233±143 fmol/mg, B_S=137±75 fmol/mg (=100%). Der Fit der Mittelwertskurve ergab folgende Parameter: pIC₅₀=7.47±0.01, n_H=0.95±0.02. Diese Werte weichen im Allgemeinen etwas von denen der Einzelauswertung ab. Die Korrektur nach Cheng-Prusoff ergab K_D=28 [22,35].

3.4.2 Hemmung der [³H]-P1075-Bindung durch Levcromakalim

In der folgenden Versuchsreihe wurde unter Verwendung des Radioliganden [³H]-P1075 das Bindungsverhalten des K_{ATP}-Kanalöffners Levcromakalim am SUR2A(Y1206S) genauer beleuchtet.

Kaliumkanalöffner oder Kaliumkanalaktivatoren umfassen eine chemisch heterogene Gruppe, denen die Fähigkeit gemeinsam ist, die Öffnungswahrscheinlichkeit der ATP-empfindlichen Kaliumkanäle zu erhöhen. Cromakalim (bzw. sein aktiveres Enantiomer Levcromakalim) gehört zu der Substanzgruppe der Benzopyrane, die wohl die größte Gruppe der Kaliumkanalöffner darstellen (Coghlan et al., 2001).

Die im Text aufgeführten Ergebnisse sind im Allgemeinen die Mittelwerte der Parameter aus der Auswertung der Einzelerperimente. Die in den Legende der Abbildung angegebenen Werte resultieren aus der Analyse der Mittelwertskurve und werden nicht weiterverwendet.

Es wurden n=4 Experimente in Anwesenheit von 1mM ATP und 2.2mM Mg²⁺ durchgeführt.

Abbildung 15 zeigt die Hemmung der [³H]-P1075-Bindung durch Levcromakalim aus n=4 Experimenten.

Die Auswertungen der vier Einzelkurven ergaben folgende Parameter: K_i=910 [660,1300] nM und n_H=0.97±0.14.

Die spezifische Bindung B_S, welche der Öffner Levcromakalim mit steigender Konzentration nahezu vollständig verdrängt, beträgt 56±3 fmol/mg. Der Hill-Koeffizient von 0.97±014 weist auf eine Bindungsstelle im Bindungsprozeß hin.

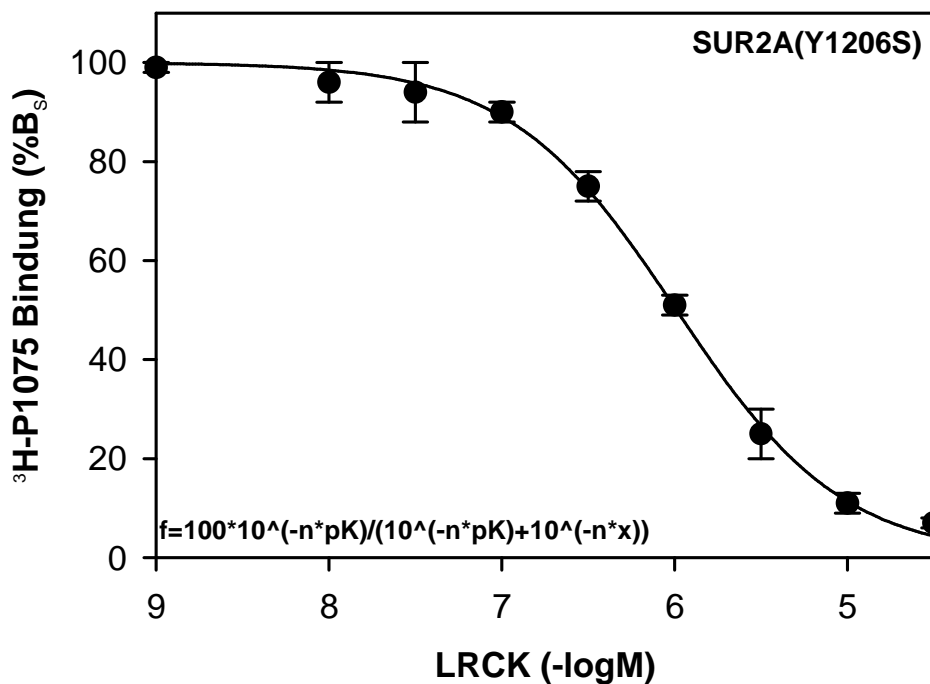


Abbildung 15: Hemmung der [³H]-P1075-Bindung durch Levcromakalim an SUR2A(Y1206S). Mittelwerte aus n=4, L₀=2.85±0.10 nM, Proteinkonzentration=0.44±0.04 mg/ml, Inkubationszeit =13 Min., Inkubationstemperatur=37°C. B_{TOT}=70±3 fmol/mg, B_S=56±3 fmol/mg (=100%). Der Fit der Mittelwertskurve ergab folgende Parameter: pIC₅₀=5.99±0.02, n_H=0.90±0.03. Diese Werte weichen im Allgemeinen etwas von denen der Einzelauswertung und der aus der Mittelwertbildung erhaltenen Werte im Text ab. Die Berechnung der K_i nach Cheng Prusoff erfolgte mit K_D(P1075)=28 nM und ergab einen K_i-Wert von 910 [660,1300] nM.

3.4.3 Hemmung der [³H]-P1075-Bindung durch Glibenclamid

Sulfonylharnstoffe (SH) wie Glibenclamid zählen zu den klassischen Blockern des K_{ATP} -Kanals. Über eine hochaffine Bindungsstelle auf der β -Untereinheit des SUR, die in Abhängigkeit der Isoformen des Rezeptors in ihrer Affinität variiert, sind sie in der Lage ihre kanalhemmende Wirkung zu entfalten.

In früheren Bindungsstudien hat sich gezeigt, dass die Bindungsstellen für P1075 und Glibenclamid räumlich voneinander getrennt und miteinander negativ allosterisch gekoppelt sind (siehe dazu auch Kapitel 1.10.1 und 1.10.2.). Die Bindung des SH Glibenclamid interferiert mit der Bindung des Radioliganden [³H]-P1075 an den Rezeptor SUR2 über allosterische Hemmung (Bray & Quast, 1992 und Hambrock et al., 1998). Dies bedeutet, daß im Gleichgewicht an einem SUR nur eine der beiden Bindungsstellen besetzt sein kann. Die aus Konkurrenzexperimenten mit [³H]-P1075 und Glibenclamid ermittelten K_I -Werte spiegeln nicht die tatsächliche Affinität von Glibenclamid an den Rezeptor wieder (Russ et al., 1999, Hambrock et al., 2001 und Hambrock et al., 2002).

In den folgenden Bindungsexperimenten wird der Effekt von Glibenclamid auf die [³H]-P1075-Bindung in Anwesenheit von 1mM ATP und 2.2mM Mg^{2+} gemessen.

Die im Text aufgeführten Ergebnisse sind im Allgemeinen die Mittelwerte der Parameter aus der Auswertung der Einzelexperimente. Die in den Legenden der Abbildungen angegebenen Werte resultieren aus der Analyse der Mittelwertskurve und werden nicht weiterverwendet.

Abbildung 16 zeigt den ermittelten Kurvenverlauf am SUR2A(Y1206S) aus n=3 Experimenten. Die spezifische Bindung, die durch den Blocker Glibenclamid vollständig verdrängt wird, beläuft sich auf 50 ± 1 fmol/mg. Bei einer Radioligandkonzentration von $L_0 = 2.70 \pm 0.11$ nM ergab die Auswertung der Einzelexperimente einen pIC_{50} -Mittelwert von 6.84 ± 0.03 .

Daraus läßt sich nach Gleichung 12 ein pK_I -Wert von 6.89 ± 0.03 , entsprechend einem K_I -Wert von 130 [110,150] nM, bestimmen. Der Hill-Koeffizient der Hemmkurve, welche einen monophasischen Verlauf zeigt, beträgt 0.99 ± 0.06 .

Dies lässt im Bindungsprozeß auf eine Bindungsstelle schließen.

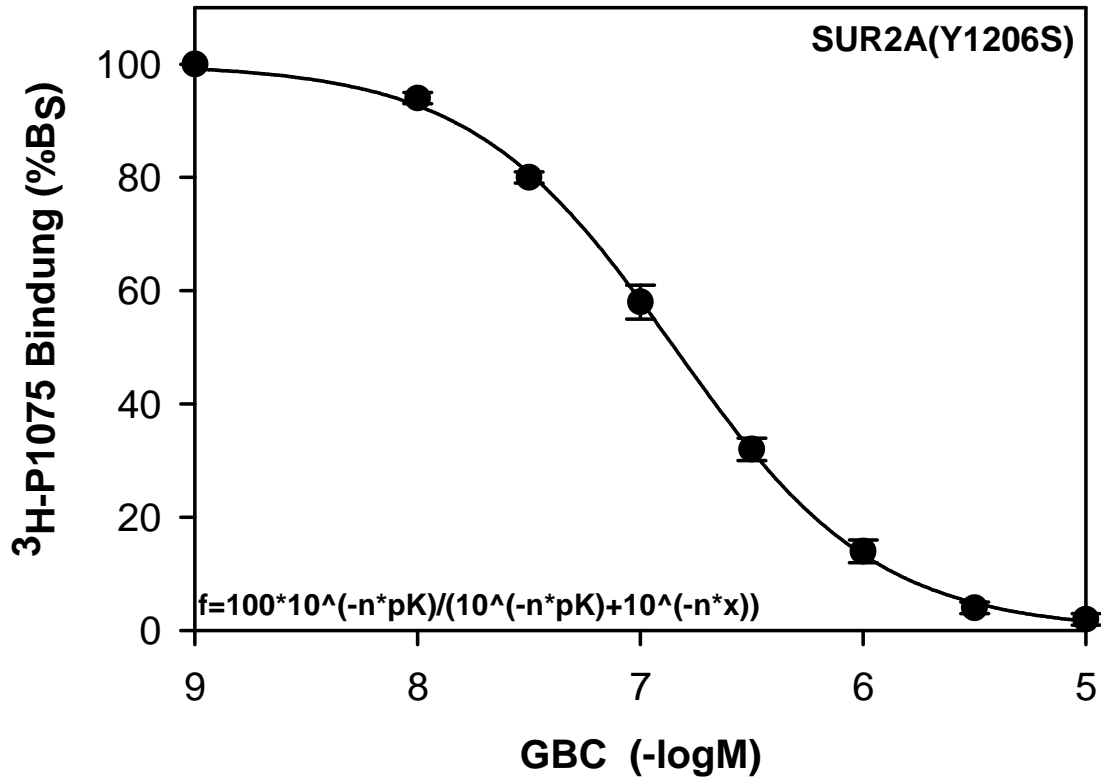


Abbildung 16: Hemmung der [³H]-P1075-Bindung durch Glibenclamid an SUR2A(Y1206S). Mittelwerte aus n=3, L₀=2.70±0.11 nM, Proteinkonzentration=0.48±0.01 mg/ml, Inkubationszeit =13 Min, Inkubationstemperatur=37°C. B_{TOT}=59±1 fmol/mg, B_S=50±1 fmol/mg (=100%). Der Fit der Mittelwertskurve ergab folgende Parameter: pIC₅₀=6.84±0.03, n_H=0.96±0.02. Diese Werte weichen im Allgemeinen etwas von denen der Einzelauswertung und der aus der Mittelwertbildung erhaltenen Werte im Text ab. Die Berechnung der K_i nach Cheng-Prusoff erfolgte mit K_D(P1075)=28 nM und ergab einen K_i-Wert von 130 [110,150] nM.

3.5 [³H]-P1075-Bindungsexperimente an HEK-293-Zellmembranen transient transfiziert mit SUR2A/K_{IR}6.2 - Effekt von Glibenclamid auf die [³H]-P1075-Bindung

Die α -Untereinheit der ATP-empfindlichen K⁺-Kanäle K_{IR}6.2 ist in der Lage mit allen drei Isoformen der β -Untereinheit SUR funktionelle K_{ATP}-Kanäle auszubilden (Inagaki et al., 1995; Inagaki et al., 1996 und Isomoto et al. 1996). In diesem Zusammenhang ist der kardiale K_{ATP}-Kanal als eine Kombination aus SUR2A und K_{IR}6.2 identifiziert worden (Inagaki et al., 1996, Babenko et al., 1998 und Okuyama et al., 1998).

Die Hemmkurve aus n=4 Experimenten mit 1mM ATP und 2.2mM Mg²⁺ im Ansatz zeigt die Abbildung 17.

Die Koexpression Wildtyp SUR2A und K_{IR}6.2 führte im Vergleich zur alleinigen Expression Wildtyp SUR2A zu einer Linksverschiebung und Abflachung der [³H]-P1075-GBC Hemmkurve. Der Hill-Koeffizient lag bei $n_H=0.71\pm 0.03$. Dies deutet auf eine Heterogenität der Bindungsstellen hin.

Die weitere Auswertung erfolgte nach dem 2-Komponenten-Modell, wobei der Hill-Koeffizient der beiden Komponenten auf $n_H=1$ festgesetzt wurde.

Die spezifische Bindung B_S des Radioliganden P1075 an den Rezeptor, die durch den Inhibitor GBC vollständig verdrängt wurde, lag bei 27 ± 1 fmol/mg.

In diesem Falle wurde die Mittelwertskurve ausgewertet. Die Anpassung des 2-Komponenten-Modells ergab eine hochaffine Komponente mit $pIC_{50,1}=7.83\pm 0.14$, die 35 ± 5 % zur spezifischen Bindung beitrug und eine niederaffine Komponente mit $pIC_{50,2}=6.47\pm 0.06$, welche 65 ± 5 % der spezifischen Bindung umfasste.

Unter Einbeziehung der Cheng-Prusoff-Gleichung ließen sich bei einer Radioligandkonzentration von $L_0= 3.75\pm 0.14$ nM $pK_{i,1}$ - und $pK_{i,2}$ -Werte von 7.64 ± 0.12 ($K_{i,1}=23$ [13,40] nM) und 6.57 ± 0.01 ($K_{i,2}=270$ [260,280] nM) bestimmen.

Die Varianzanalyse zeigte, dass der 2-Komponenten-Fit dem Hill-Fit leicht überlegen ist.

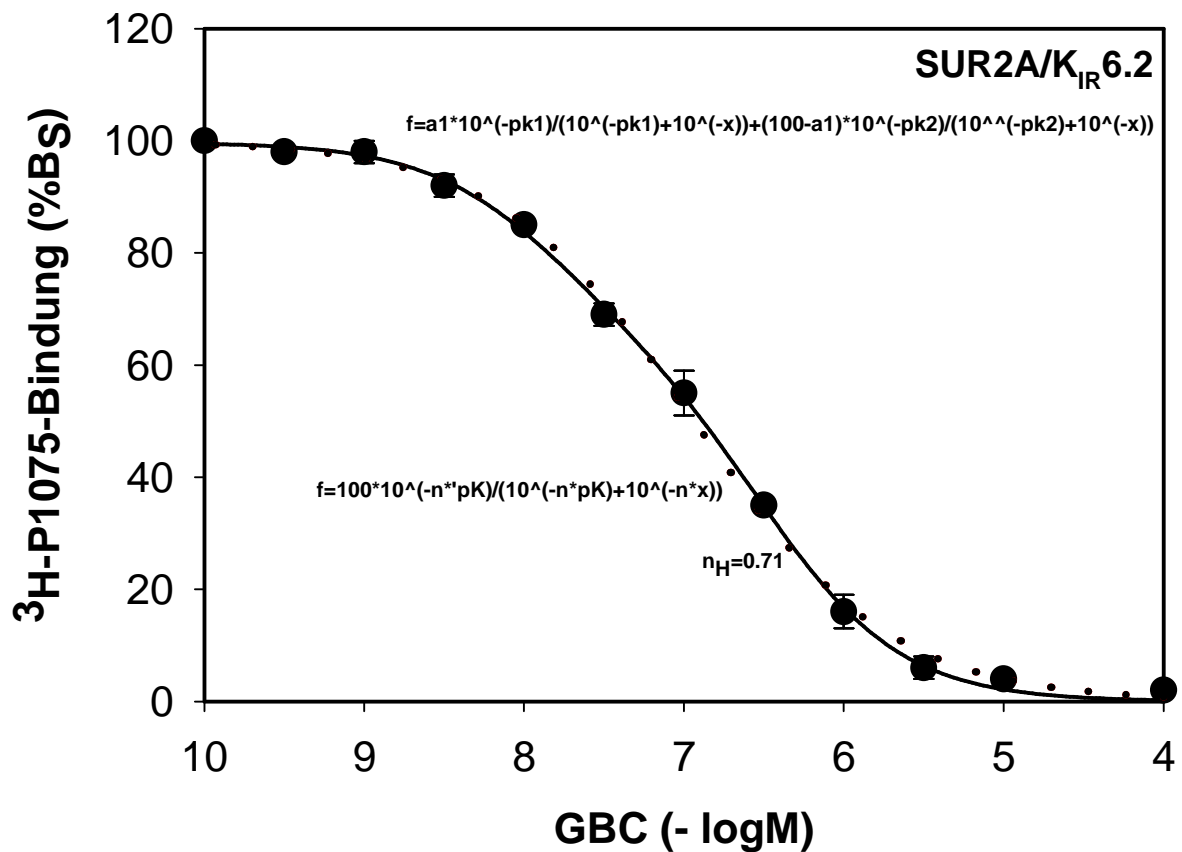


Abbildung 17: Hemmung der [³H]-P1075 Bindung an SUR2A/K_{IR}6.2 durch GBC. Mittelwerte aus n=4, L₀=3.75±0.14 nM, Proteinkonzentration=0.90±0.06 mg/ml, Inkubationszeit=13 Min., Inkubationstemperatur=37°C. B_{TOT}=38±2 fmol/mg, B_S=27±1 fmol/mg (=100%). Der Fit der Mittelwertskurve nach zwei Komponenten mit n_H=1 (durchgezogene Linie) ergab folgende Parameter: A₁ =35±5 %B_S, A₂ =65±5 %B_S, pIC_{50,1}=7.83±0.12 u. pIC_{50,2}=6.47±0.06. Der Hill-Fit mit einer Komponente (gepunktete Linie) ergab: n_H=0.71±0.03 und pIC₅₀=6.93±0.02. Die Berechnung der K_{i,1} und K_{i,2} nach Cheng-Prusoff erfolgte mit K_D(P1075)=15.1 nM und ergab K_{i,1}=23 [13,40]nM und K_{i,2}=270 [260,280]nM.

4 Diskussion

ATP-abhängige Kaliumkanäle (K_{ATP} -Kanäle) sind Heteromultimere aus zwei verschiedenen Untereinheiten.

Die α -Untereinheit $K_{IR6.x}$, welche die Kanalpore ausbildet, gehört zur Familie der einwärtsgleichrichtenden Kaliumkanäle.

Die β -Untereinheit, welche für das Regulationsverhalten des K_{ATP} -Kanals verantwortlich ist, entspricht dem Rezeptor für Sulfonylharnstoffe (SUR). Die molekulare Struktur der Isoformen SUR2A und SUR2B zeigt bis auf die letzten 42 Aminosäuren keine Unterschiede.

Mit der Identifizierung des für die GBC-Empfindlichkeit verantwortlichen Aminosäurerestes in SUR1, **Serin 1237**, (Ashfield et al., 1999) gelang es Toman et al. (2000) und Hambrock et al. (2001) zu beweisen, dass der singuläre Austausch der in SUR2B korrespondierenden Aminosäure **Tyrosin 1206** mit Serin eine 5-20 fache Zunahme der Affinität von SUR2B für GBC zur Folge hatte.

Neben dem Anstieg der Affinität für GBC zeigten entsprechende Untersuchungen an der Mutanten SUR2B(Y1206S) eine unverändert hohe Affinität für Kaliumkanalöffner.

Da der Genlocus der Mutation in SUR2B in einiger Entfernung zum Carboxylende liegt, stellten wir uns die Frage, ob die identische Mutation (Y1206S) in SUR2A vergleichbare Ergebnisse, wie im Falle von SUR2B, hervorbringen würde und welchen Einfluß Nukleotide und Koexpression mit $K_{IR6.2}$ auf das Bindungsverhalten haben würden.

Da wesentliche Teile der Bindungsstellen für P1075 und GBC in unmittelbarer Nähe zueinander im Bereich der letzten Transmembrandomäne des SURs lokalisiert sind, wurden mit Interesse die Ergebnisse bezüglich der allosterischen Wechselwirkung beider Bindungsplätze zueinander verfolgt.

Darüberhinaus stellte sich die Frage nach dem Einfluß der unterschiedlichen Carboxylenden der beiden SUR2-Isoformen auf die beobachteten Effekte.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind in den Tabellen des Kapitels 4.1 zusammengestellt.

4.1 Tabellarische Zusammenstellung der Ergebnisse

4.1.1 Bindungsexperimente mit [³H]-GBC an HEK293B-Zellmembranen und an intakten HEK293B-Zellen permanent transfiziert mit SUR2A(Y1206S)

Rezeptor	SUR2A(Y1206S)			
Präparation	Membranen		Zellen	
Ligand	[³ H]-GBC			
Kompetitor	GBC		P1075	GBC
	+MgATP	-MgATP	+MgATP	
K _D /K _I (nM)	11 [6.3,17]	4.3 [3.0,6.2]	19 [14,26]	4.9 [4.1,5.9]
	P1075-unempf. 1.4 μM [0.6,3.5]	P1075-unempf. 78 nM [27,135]	1.5 μM [0.8,3.0]	P1075-unempf. 120 nM [50,270]
pK _D / pK _I (-logM)	7.98±0.11	8.37±0.08	7.72±0.07	8.31±0.08
	P1075-unempf. 5.86±0.20	P1075-unempf. 7.11±0.23	5.82±0.15	P1075-unempf. 6.92±0.18
A ₁ bzw. A ₂ (%B _{TOT}) [%B _S]	(58±3) [100]	(62±3) [100]	[63±2] [37±2]	(68±1) [100]
	P1075-unempf. (14±2)	P1075-unempf. (19±3)		P1075-unempf. (15±2)

Tabelle 2: Verdrängung der [³H]-GBC-Bindung an SUR2A(Y1206S) in Membranen und Zellen in Anwesenheit und Abwesenheit von 1mM ATP und 2.2mM Mg²⁺. pK_D bzw. pK_I beschreibt den negativen Logarithmus von K_D bzw. K_I. A₁ bzw. A₂ beschreibt die Verdrängungsamplitude durch den jeweiligen Kompetitor in %B_{TOT} oder %B_S.

4.1.2 Bindungsexperimente mit [³H]-P1075 an HEK293B-Zellmembranen permanent transfiziert mit SUR2A(Y1206S) bzw. transient transfiziert mit SUR2A/K_{IR}6.2

Rezeptor	SUR2A(Y1206S)			SUR2A/K _{IR} 6.2
Präparation	Membranen			Membranen
Ligand	[³ H]-P1075; in Anwesenheit von 1mM ATP + 2.2mM Mg ²⁺			
Kompetitor	P1075	LCRK	GBC	GBC
K _D /K _I (nM)	28 [22,35]	910 [660,1300]	130 [110,150]	K _{I,1} =23 [13,40] K _{I,2} =270 [260,280]
pK _D / pK _I (-logM)	7.56±0.05	6.04±0.07	6.89±0.03	pK _{I,1} =7.85±0.11 pK _{I,2} =6.48±0.06
A ₁ [%B _S]	100 %	100 %	100 %	A ₁ =35±5
A ₂ [%B _S]				A ₂ =65±5

Tabelle 3: Verdrängung der [³H]-P1075-Bindung an SUR2A(Y1206S) und SUR2A/K_{IR}6.2 in Anwesenheit von 1mM ATP und 2.2mM Mg²⁺. pK_D bzw. pK_I beschreibt den negativen Logarithmus von K_D bzw. K_I. A₁ bzw. A₂ beschreibt die Verdrängungsamplitude durch den jeweiligen Kompetitor in %B_S.

4.2 Effekt der Mutation auf die [³H]-GBC Bindung

4.2.1 Effekt von MgATP

Die tabellarische Darstellung der Ergebnisse der [³H]-GBC-Bindung in Abhängigkeit von MgATP an SUR2A(Y1206S) in Membranen und Zellen sind im Kapitel 4.1.1 aufgeführt.

Zunächst wurden Bindungsexperimente in Abwesenheit von MgATP durchgeführt. Grund dafür waren Untersuchungen von Hambrock et al. (2002), welche belegen konnten, dass die Rezeptorbindung des hypoglykämisch wirkenden Sulfonylharnstoffes Glibenclamid in entscheidender Weise durch die Anwesenheit von Mg²⁺-Salzen hydrolysierbarer Nukleotide negativ allosterisch beeinflusst wurde. Das heißt, es wurde eine deutliche Zunahme der GBC-Bindung unter MgATP freien Versuchsbedingungen wahrgenommen.

Dieser Umstand betrifft die beiden SUR2-Subtypen gleichermaßen und lässt daher [³H]-GBC-Bindungsexperimente an SUR2A- und SUR2B-Wildtyp auf Grund der geringen spezifischen Bindung in Gegenwart von MgATP als nicht durchführbar bzw. sinnvoll erscheinen.

In Abwesenheit von MgATP zeigten die in dieser Arbeit durchgeführten Versuchsreihen der [³H]-GBC-Bindung an SUR2A(Y1206S) biphasische Kurvenverläufe mit einer ersten hochaffinen und einer zweiten niederaffinen Komponente. Die hochaffine Komponente umfasste 62 ± 3 %B_{TOT} und wurde durch den Anteil der durch P1075 (Sättigungskonzentration von 100µM) verdrängbaren Bindung bestimmt. Dies beruht auf der Annahme, dass die hochaffine Komponente die tatsächliche GBC-Bindung an SUR2A(Y1206S) repräsentiert. Hingegen stellt die niederaffine Komponente die GBC-Bindung an intrinsische, nicht dem Rezeptor entsprechende GBC-Bindungsplätze an HEK293B-Zellmembranen dar.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Punktmutation Y1206S in SUR2A, wie bereits bei SUR2B(Y1206S) festgestellt, zum einen einen Anstieg der Affinität von SUR2A für GBC um etwa das 5-fache im Vergleich zum Wildtyp bewirkt und zum anderen eine ca. 3x größer Amplitude der hochaffinen Komponente

hervorbringt (Vgl. Abb. 9 in Kapitel 3.1.1). Erklärbar ist dieses Phänomen durch die Zunahme der Affinität, welche ihrerseits zu einer besseren Ausschöpfung der Rezeptorbindung durch den Radioliganden beiträgt. In Abwesenheit von MgATP ergab sich aus der hochaffinen Komponente eine K_D für GBC von 4.3 nM.

Unter gleichen Versuchsbedingungen bewirkt die Anwesenheit von MgATP ebenfalls einen biphasischen Kurvenverlauf mit einem K_D -Wert von 11 nM für die hochaffine Komponente. MgATP erhöht hier die K_D um etwa das 2-fache ($p < 0.05$). Vergleicht man dazu aber die Versuchsergebnisse in ganzen Zellen, in welchen unter physiologischen Bedingungen eine ATP-Regeneration stattfindet, mit einem ebenfalls biphasischen Kurvenverlauf und einem K_D -Wert von 4.9 nM für die hochaffine Komponente, so scheint dies ein störender Befund zu sein.

Eine genauere Bestimmung der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_D und der Konzentration der Rezeptoren (B_{MAX}) in der Präparation ist mit Hilfe von Sättigungsexperimenten möglich. Die Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_D der [3H]-GBC Bindung an SUR2A(Y1206S) wurden bereits durch Frau Löffler-Walz in Sättigungsexperimenten ermittelt. Dabei lag die K_D in Anwesenheit von MgATP bei 6.6 [4.5,10.2] nM und die maximale Bindungskapazität B_{MAX} nahm einen Wert von 626 ± 107 fmol/mg an. In Abwesenheit von MgATP zeigte die K_D eine leichte Verschiebung nach links. Sie lag bei 5.6 [3.9,8.1] nM. Die B_{MAX} belief sich auf 1144 ± 128 fmol/mg.

Die Ergebnisse zeigen, dass unter diesen Versuchsbedingungen der K_D -Wert für die [3H]-GBC-Bindung unverändert bleibt, wohingegen die Anzahl der Bindungsplätze durch den hemmenden Effekt von MgATP um über die Hälfte reduziert wird.

Dies stimmt qualitativ mit den Ergebnissen für SUR2B (Y1206S) überein, die zeigten, dass MgATP die Affinität für GBC unverändert lässt, aber die Zahl der Bindungsstellen auf $\frac{1}{4}$ reduziert (Hambrock et al., 2001 und Löffler-Walz et al., 2002).

4.2.2 Effekt der Koexpression mit K_{IR}6.2

Da funktionstüchtige K_{ATP}-Kanäle Heteromultimere, bestehend aus α - und β -Untereinheiten, sind, stellte sich die Frage, wie sich das GBC-Bindungsverhalten in einem rekombinanten Kanal aus SUR2A(Y1206S) und K_{IR}6.2 verändert.

Zur Beantwortung dieser Frage wurden Sättigungsexperimente in Abwesenheit von MgATP durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind nicht in den Tabellen der Kapitel 4.1.1 und 4.1.2 aufgeführt.

Mit einem K_D-Wert von 0.417 nM konnte zwar die Vermutung einer Affinitätssteigerung für GBC bei Koexpression unterstützt werden, dennoch zeigte sich, dass dieser Wert, im Vergleich zu später durchgeführten Experimenten unter gleichen Versuchsbedingungen, zu niedrig war.

Bei den zur Membran- bzw. Rezeptoraufarbeitung verwendeten Zellen handelte es sich um mit SUR2A(Y1206S)/K_{IR}6.2 transient transfizierte Zellen. Eine zu geringe Proteinkonzentration und das Label [³H]-GBC, welches dazu neigt auch an glatte Oberflächen unspezifisch zu binden, könnten eine Erklärung für den zu niedrigen K_D-Wert und die große Streuung der Messwerte sein.

Dennoch können zwei Dinge festgehalten werden:

Sowohl beim Wildtyp, als auch bei der Mutanten des SUR2A-Rezeptors führt die Koexpression mit K_{IR}6.2 zu einer Affinitätszunahme für GBC und schwächt gleichzeitig den inhibitorischen Einfluß der hydrolysierbaren Nukleotide auf die GBC-Bindung. Im Fall von Sättigungsexperimenten mit [³H]-GBC an SUR2A(Y1206S)/K_{IR}6.2 in Anwesenheit von MgATP bedeutete dies sogar eine weitere Steigerung der Affinität von 1.9 nM auf 1.2 nM (Ergebnisse aus Stephan et al., 2005).

Eine mögliche Erklärung dieser Ergebnisse könnten Konformationsänderungen im Bereich der Bindungstaschen von SUR2A, die durch die Koexpression mit K_{IR}6.2 bedingt werden, sein. Darüberhinaus könnte die Mutation in SUR2A zu einer weiteren Konformationsänderung der Bindungstaschen führen, die wiederum zu einer verbesserten Koppelung der beiden Untereinheiten führen könnte.

Die Reduktion der GBC-Bindungsplätze in Anwesenheit von MgATP, welche bei Sättigungsexperimenten des rekombinanten Kanals aus SUR2A(Y1206S)/K_{IR}6.2 weniger ausgeprägt sind, als im Vergleich zu SUR2A(Y1206S), können auf der Grundlage des Tetramer-Modells erklärt werden.

Dieses Modell geht davon aus, dass SUR2 sich aus vier gleichen Einheiten zu einem Tetramer formiert. In Abwesenheit von MgATP besitzt dieses Tetramer vier gleiche und voneinander unabhängige hochaffine Bindungsplätze für SU. In Gegenwart von MgATP verbleiben nur ein SU-Bindungsplatz (SUR2B) bzw. zwei SU-Bindungsplätze (SUR2A) in einem hochaffinen Zustand für Sulfonylharnstoffe. Die anderen drei bzw. zwei Bindungsplätze werden durch negativ allosterische Wechselwirkungen zwischen den Einheiten in einen niederaffinen Zustand überführt.

Die Koexpression mit K_{IR}6.2 ihrerseits schwächt die negativ allosterischen Wechselwirkungen zwischen den SUR2-Einheiten im Tetramer, so dass trotz der Anwesenheit von MgATP mehr Moleküle des K_{ATP}-Kanalblockers GBC pro Kanal binden können (Löffler-Walz et al., 2002 und Stephan et al., 2005)

4.3 Effekt der Mutation auf die Öffnerbindung [³H]-P1075

Die Auswirkungen der Mutation von SUR2A auf das Verhalten der Öffnerbindung wurden mit Hilfe des Radioliganden [³H]-P1075 in Anwesenheit von MgATP untersucht.

MgATP unterstützt die Öffnerbindung, wobei in früheren Versuchen gezeigt werden konnte, dass bei einer ausreichend hohen Konzentration des Öffners, dieser auch ohne Nukleotide an den Rezeptor binden konnte.

In beiden Versuchsreihen mit unmarkiertem P1075 und Levromakalim zeigten sich monophasische Verdrängungskurven mit nur einer Klasse von nicht miteinander wechselwirkenden Bindungsstellen.

Die Anwesenheit von MgATP führt zu einer positiven allosterischen Interaktion zwischen K_{ATP}-Kanalöffnern und Nukleotiden.

Diese Beobachtungen lassen sich ebenfalls mit Hilfe des Tetramer-Modells erklären. In Abwesenheit der Nukleotide befinden sich, wie bereits unter 4.2.2

beschrieben, die SU-Bindungsstellen der vier SUR-Einheiten des Tetramers in einem hochaffinen Zustand. Die Bindungsstellen für den K_{ATP} -Kanalöffner verharren in einem niederaffinen Zustand. In Anwesenheit von MgATP werden die SU-Bindungsstellen durch negativ allosterische Wechselwirkungen der SUR-Einheiten untereinander in einen niederaffinen Zustand überführt. Für die Öffnerbindungsstellen bedeutet dies einen Wechsel in den hochaffinen Zustand.

Das Bindungsverhalten gegenüber Öffnern wurde sowohl beim Wildtyp als auch bei der Mutanten mit Hilfe des radioaktiv-markierten Öffners P1075 bestimmt.

Der Vergleich mit den entsprechenden Werten für SUR2A zeigte, dass die Bindungskurven für P1075 und Levromakalim auch bei SUR2A(Y1206S) monophasisch verliefen und dass die Mutation keinen wesentlichen Einfluß auf die Affinität von SUR2A für P1075 hatte, d.h. die Mutation bringt für P1075 einen unverändert stabilen K_D -Wert hervor. Bei der heterologen Verdrängung durch Levromakalim kam es im Vergleich zum Wildtyp zu einer Abnahme der Affinität um einen Faktor 2 mit einem K_I -Wert von 910 nM. Die Mutation reduziert somit die Potenz von Levromakalim, mit welcher der Öffner den Radioliganden [3 H]-P1075 vom Rezeptor verdrängt (siehe dazu Ergebnisse in Kapitel 3.4).

In weiteren Untersuchungen konnten Stephan et al. (2005) zeigen, dass sich der rekombinante K_{ATP} -Kanal aus SUR2A(Y1206S)/ $K_{IR}6.2$ und jener aus SUR2A/ $K_{IR}6.2$ im Bindungsverhalten gegenüber Öffnern ähnlich verhalten. Beide Versuchsreihen erbrachten im Vergleich zur alleinigen Expression der β -Untereinheiten, SUR2A(Y1206S) bzw. SUR2A, eine signifikante ($p < 0.05$) Rechtsverschiebung der K_D -Werte. Die Koexpression mit $K_{IR}6.2$ führte zu einer leichten, aber dennoch signifikanten Abnahme der Affinität für den Öffner P1075, sowohl beim Wildtyp, als auch bei der Mutanten von SUR2A.

Fazit: Koexpression schwächt die Öffnerbindung.

Eine mögliche Erklärung hierfür könnten Konformationsänderungen im Bereich der Bindungsstellen am SUR sein, die durch die Bindung von $K_{IR}6.2$ an SUR2A(Y1206S) bzw. SUR2A möglicherweise entstehen.

4.4 Die allosterische Wechselwirkung zwischen GBC und P1075

Wesentliche Teile der Bindungsstellen für P1075 und GBC sind in unmittelbarer Nähe zueinander im Bereich der letzten Transmembrandomäne des SURs lokalisiert (Ashfield et al., 1999; Uhde et al., 1999; Babenko et al., 2000; Moreau et al., 2000 und Mikhailov et al., 2001). Diese strukturellen Merkmale sind die Grundlage allosterischer Wechselwirkungen zwischen der Nukleotid-, SU- und Öffnerbindung an den SUR-Isoformen.

Die allosterischen Wechselwirkungen zwischen den SUR-Bindungsstellen für GBC und P1075 zeigen sich am deutlichsten in Gegenwart von MgATP. Unter diesen Bindungen befindet sich der SUR in einem stark affinen Zustand gegenüber Kaliumkanalöffnern. Man spricht in diesem Zusammenhang auch von positiver allosterischer Kopplung (Quast et al., 1993).

4.4.1 [³H]-GBC – P1075 Verdrängungsmessung mit und ohne MgATP

Kaliumkanalöffner, wie beispielsweise P1075, hemmen die Bindung des Radioliganden [³H]-GBC durch negativ allosterische Wechselwirkung. Darüberhinaus wird die Bindung aber auch durch hydrolysierbare Nukleotide, wie beispielsweise MgATP, beeinflusst.

In heterologen Verdrängungsexperimenten mit [³H]-GBC und P1075 an SUR2A(Y1206S) zeigte sich in Anwesenheit von MgATP ein deutlich biphasischer Kurvenverlauf. Dabei umfasste die Amplitude der hochaffinen Komponente nahezu $\frac{2}{3}$ der spezifischen Bindung und entsprach mit einem $K_{i,1}$ -Wert von 19 nM der wahren Affinität für den Öffner P1075. Die niederaffine Komponente entsprach einem $K_{i,2}$ -Wert von 1.5 μ M und lässt sich gut in Übereinstimmung bringen mit jenem, der in Abwesenheit von MgATP ermittelt wurde ($K_i=2.2 \mu$ M) (Stephan et al., 2005).

Dieses Prinzip, das ebenfalls von vielen anderen Öffnern geteilt wird (Russ et al., 2003), lässt sich wieder mit Hilfe des Tetramer-Modells erklären.

Die hochaffine Komponente spiegelt die Öffnerbindung an die SUR-Einheiten, die nicht durch den Radioliganden [³H]-GBC besetzt sind, wieder. Die

Besetzung der Öffnerbindungsstellen durch P1075 auf den nicht von [³H]-GBC besetzten Untereinheiten des Tetramers führt über allosterische Interaktionen zwischen den Untereinheiten im Tetramer zu einer Schwächung der Radioligandbindung. Mit steigender Konzentration des Öffners wird im zweiten Schritt die [³H]-GBC-Bindung von den noch besetzten SU-Bindungsstellen verdrängt. Es handelt sich dabei um die niederaffine Komponente der P1075-Bindung.

Vergleicht man dazu den Wildtyp, so waren Versuche dieser Art nur in Abwesenheit von MgATP möglich. Sowohl beim Wildtyp, als auch bei der Mutanten zeigten sich bei den Bindungsexperimenten ohne MgATP monophasische Kurvenverläufe und ähnliche K_i-Werte. Daraus lässt sich schließen, dass die Mutation die Interaktion zwischen P1075 und SUR2A in Abwesenheit von MgATP nicht wesentlich beeinflusst.

Rezeptor	P1075		
	MgATP (mM)	K _i (nM)	A (%B _{TOT} /%B _S)
SUR2A	0	1500	22±2 / 100
SUR2A(Y1206S)	0	2200	56±4 / 100
	1	19 (14,26) 1500 (800,3000)	30±1 / 63±2 17±1 / 37±2

Tabelle 4: Allosterische Interaktion zwischen [³H]-GBC-Bindung und P1075 und Einfluß von MgATP in HEK293B-Zellmembranen von SUR2A und SUR2A(Y1206S).

4.4.2 [³H]-P1075 – GBC Verdrängungsmessungen mit MgATP

Das Verhalten der Öffner- und SU-Rezeptorbindung zueinander und in Abhängigkeit von MgATP wurde zusätzlich mit Hilfe des Radioliganden [³H]-P1075 untersucht. In heterologen Verdrängungsexperimenten an SUR2A(Y1206S) in Anwesenheit von MgATP wurde für die GBC-Bindung ein K_i-Wert von 130 nM gemessen.

Unter diesen Versuchsbedingungen wurde die wahre Affinität von GBC an SUR2A(Y1206S) stark unterschätzt. Andererseits konnte durch die mutationsbedingte Affinitätszunahme für GBC die Potenz von GBC mit P1075 in allosterische Wechselwirkungen zutreten um den Faktor 4 gesteigert werden.

4.5 Bindungsverhalten von SUR2A und SUR2A(Y1206S) versus SUR2B und SUR2B(Y1206S)

Die in dieser Arbeit aufgeführten Ergebnisse konnten zeigen, dass die Mutation Y1206S an SUR2A einen Anstieg der Affinität für GBC bewirkt und die Potenz von GBC, die [³H]-P1075-Bindung zu hemmen, wesentlich verbessert, aber dabei die Affinität von SUR2A gegenüber Öffnern nicht beeinflusst.

Gleiches wurde bei der Mutanten SUR2B beobachtet (Hambrock et al., 2001). Beim Vergleich beider Isoformen wird deutlich, dass die Unterschiede in den letzten 42 Aminosäuren von SUR2A und SUR2B keinen Einfluß auf die Mutation bezüglich ihrer Ligandenbindung hat, sofern SUR2 allein auf der Oberfläche exprimiert wird.

Betrachtet man die Auswirkungen der Koexpression von K_{IR}6.2 mit SUR2A und SUR2A(Y1206S), so können zwei Dinge festgestellt werden: Koexpression steigert die Affinität des Rezeptors für GBC und sie schwächt den inhibitorischen Effekt von MgATP auf die GBC-Bindung.

Im Falle der Mutanten SUR2A zeigte sich eine deutliche Zunahme der Affinität für GBC in Membranen. Darüberhinaus kam es in Anwesenheit von MgATP zu einer weiteren Steigerung der GBC-Affinität.

Dagegen zeigte sich beim rekombinanten Kanal aus K_{IR}6.X mit SUR2B bzw. SUR2B(Y1206S) ausschließlich eine Steigerung der Affinität für GBC in intakten Zellen, nicht aber in Zellmembranen, ungeachtet der Anwesenheit von MgATP (Russ et al. 1999 und Hambrock et al., 2001).

Eine Erklärung für dieses unterschiedliche Bindungsverhalten könnte in den letzten 42 Aminosäuren der SUR2-Isoformen begründet liegen. Dieser Aminosäurerest scheint eine wichtige Rolle bezüglich der Koppelung der α -

Untereinheit $K_{IR6.2}$ an die β -Untereinheit SUR2A zu spielen und damit das GBC-Bindungsverhalten des rekombinanten K_{ATP} -Kanals zu verändern (Stephan et al., 2005).

5 Zusammenfassung

ATP-empfindliche Kaliumkanäle (K_{ATP} -Kanäle) kommen in allen erregbaren Zellen vor und sind vor allem 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 sind Oktamere aus vier schwach einwärtsgerichtenden Kaliumkanaluntereinheiten der Familie $K_{IR6.x}$ und vier Sulfonylharnstoffrezeptoren (SUR). SUR übernimmt die Steuerung der Kanalaktivität und enthält die Bindungsstellen der Sulfonylharnstoffe und der K_{ATP} -Kanalöffner.

Die $K_{IR6.x}$ -Familie besteht aus zwei Mitgliedern: $K_{IR6.1}$ kommt in Gefäßmuskelzellen und $K_{IR6.2}$ in allen anderen erregbaren Zellen vor.

Die SUR-Subtypen umfassen unter anderem SUR1 (B-Zelle, Gehirn), SUR2A (Herz- und Skelettmuskel) und SUR2B (glatte Muskelzellen).

Die Isoformen SUR2A und SUR2B entstehen durch alternatives Spleißen des SUR2 Gens (ABCC9) und unterscheiden sich ausschließlich in den letzten 42 Aminosäuren des Carboxyterminus.

Beide Isoformen zeigen im Vergleich zu SUR1 eine geringere Affinität gegenüber Glibenclamid (GBC), dem bekanntesten Sulfonylharnstoff.

In SUR1 wurde der Aminosäurerest **Serin 1237** als wichtig für die GBC-Affinität erkannt, bei SUR2 ist dieser Rest durch **Tyrosin 1206** ersetzt.

Die Punktmutation **Y1206S** in SUR2B, bei welcher Tyrosin im SUR2B der Ratte durch Serin aus SUR1 ersetzt wurde, erhöht die Affinität des Rezeptors für GBC um einen Faktor 5-10 (Hambrock et al., 2001).

In dieser Arbeit wurde die Frage untersucht, ob die identische Mutation in SUR2A das Bindungsverhalten gegenüber GBC in ähnlicher Weise verändert, wie es bereits bei SUR2B beobachtet wurde.

Da die Mutation in dem Teil des Proteins liegt, in dem SUR2A und SUR2B übereinstimmen, lassen die Ergebnisse Rückschlüsse auf die funktionelle Bedeutung des Carboxyterminus zu, dem einzigen Teil, in dem die beiden Isoformen sich unterscheiden.

Zur Untersuchung des SUR2A Wildtyps und der Mutanten standen HEK-Zelllinien zur Verfügung, die diese Proteine stabil exprimierten; die Effekte der Koexpression mit $K_{IR6.2}$ wurden in transienter Expression durchgeführt.

Zur Untersuchung der Ligandbindungseigenschaften von SUR2A und der Mutanten wurden Radioligandbindungsstudien mit tritiummarkiertem GBC und P1075 (einem K_{ATP} -Kanalöffner) durchgeführt. Insbesondere wurde der Einfluß der Mutation auf die Affinitäten zu GBC und P1075, auf die negativ allosterische Wechselwirkung zwischen MgATP und GBC und auf den Effekt der Koexpression mit $K_{IR6.2}$ untersucht.

Die Untersuchungen zeigten, dass die Mutation Y1206S in SUR2A die Affinität für GBC in HEK293B-Zellmembranen und in intakten Zellen um den Faktor 5 erhöht (von $K_D = 20$ nM bei SUR2A auf 4.3 nM bei SUR2A(Y1206S)). Die Verringerung der Bindung in Anwesenheit von MgATP beruht im Wesentlichen auf einer Abnahme der Anzahl der verfügbaren Bindungsstellen. Die Affinität der Mutanten zu P1075 war gegenüber der des Wildtyps unverändert.

Die Koexpression mit $K_{IR6.2}$ erhöhte die Affinität der Mutanten für GBC signifikant mehr, als die des Wildtyps und dieser Effekt wurde durch MgATP verstärkt; hingegen wurde die Affinität für den Öffner P1075 leicht erniedrigt.

Die negativ allosterische Wechselwirkung zwischen GBC und P1075 konnte durch die hohe Affinität der Mutanten für GBC in [3 H]GBC-P1075-Verdrängungsexperimenten genau ausgemessen werden. Es zeigte sich eine biphasische Verdrängungskurve, deren Hochaffinitätskomponente die Affinität des Öffners zu SUR2A(Y1206S) wiedergibt.

[3 H]P1075-GBC-Verdrängungskurven waren hingegen monophasisch und unterschätzten die Affinität von GBC zur Mutanten deutlich.

Diese Ergebnisse stimmen fast quantitativ mit den Beobachtungen überein die bei SUR2B(Y1206S) gemacht wurden. Dies zeigt, dass der Carboxyterminus von SUR2 eine relativ geringe Rolle bei der Bindung von Glibenclamid und P1075 sowie deren Modulation durch MgATP spielt und dass die Mutation Y1206S nicht auf den Carboxyterminus ausstrahlt.

Anmerkung:

Eine Veröffentlichung, welche wesentlich auf den Ergebnissen dieser Arbeit beruht, ist im British Journal of Pharmacology (2005) erschienen.

Stephan, D., Stauß, E., Lange, U., Felsch, H., Löffler-Walz, C., Hambrock, A., Russ, U. and Quast, U. (2005):

The mutation Y1206S increases the affinity of the sulfonylurea receptor SUR2A for glibenclamide and enhances the effects of coexpression with K_{IR}6.2; *British Journal of Pharmacology* **144**, 1078-1088

6 Abkürzungen und Trivialnamen

a. demin.	demineralisiertes Wasser
ABC	ATP-Bindungs-Kassette (ATP-binding cassette)
ADP	Adenosindiphosphat
AP	Aktionspotential
ATP	Adenosintriphosphat
B _S	Spezifische Bindung
B _{TOT}	Totale Bindung
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator
cpm	Zerfälle pro Minute (counts per minute)
DMSO	Dimethylsulfoxid
dpm	Zerfälle pro Minute (decays per minute)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykol-bis(2-amino-ethylether)-N,N,N',N',-tetraacetat
FBS	Fötales Rinderserum
GBC	Glibenclamid
HEK293-Zellen	Menschliche embryonale Nierenzelllinie (Human Embryonal Kidney Cells)
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-(2-ethansulfonsäure)
K _{ATP} -Kanal	ATP-abhängiger Kaliumkanal
KCO	Kaliumkanalöffner (K-channel opener)
K _{IR} -Kanäle	einwärtsgleichrichtende Kaliumkanäle (inward rectifying)
KV-Kanäle	spannungsabhängige Kaliumkanäle (voltage dependent)
MDR	Multi-drug resistance
MEM	Minimum Essential Medium
MWG	Massenwirkungsgesetz
NBF	Nukleotidbindungsfalte
NSB	nichtspezifische Bindung
OD ₇₇₀	Optische Dichte (Extinktion) bei einer Wellenlänge von 770 nm
pcDNA	Plasmidvektor der Firma Invitrogen (San Diego), der die cDNA des zu exprimierenden Proteins enthält

RMP	Ruhemembranpotential
rmp	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
SA	Spezifische Aktivität
SU	Sulfonylharnstoffe (sulfonyl ureas)
SUR	Sulfonylharnstoffrezeptor
TMD	Transmembrandomäne
TMS	Transmembransegment
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
VOOC	Spannungsabhängiger Calciumkanal (voltage operated calcium channel)
x g	mal Gravitationsbeschleunigung (9.81 m/s ²)

7 Literaturverzeichnis

Aguilar-Bryan, L., Nichols, C.G., Wechsler, S.W., Clement IV, J.P., Boyd III, A.E., Gonzales, G., Herrera-Soza, H., Nguy, K., Bryan, J. and Nelson, D.A. (1995): Cloning of the β cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. *Science* **268**, 423-426

Aguilar-Bryan, L., Clement IV, J.P., Gonzalez, G., Kunjilwar, K., Babenko, A. and Bryan, J. (1998): Toward understanding the assembly and structure of K_{ATP} channels. *Physiological Reviews* **78**, 227-245

Aguilar-Bryan, L. and Bryan, J. (1999): Molecular biology of adenosine triphosphate-sensitive potassium channel. *Endocrine Reviews* **20**, 101-135

Ämmälä, C., Moorhouse, A., Gribble, F., Ashfield, R., Proks, P., Smith, P.A., Sakura, H., Coles, B., Ashcroft, S.J.H. and Ashcroft, F.M. (1996): Promiscuous coupling between the sulfonylurea receptor and inwardly rectifying potassium channels. *Nature* **379**, 545-548

Ashcroft, S.J.H and Ashcroft, F.M. (1990): Properties and functions of ATP-sensitive K-channels. *Cellular Signalling* **2**, 197-214

Ashcroft, F.M. and Gribble, F.M. (1996): Correlating structure and function in ATP-sensitive K^+ channels. *Trends in Neurosciences* **21**, 288-294

Ashcroft, F.M. and Gribble, F.M. (1999): ATP-sensitive K^+ channels and insulin secretion: their role in health and disease. *Diabetologia* **42**, 903-919

Ashcroft, F.M. and Gribble, F.M. (2000): New windows on the mechanism of action of K_{ATP} channel openers. *Trends in Pharmacological Sciences* **21**, 439-445

Ashfield, R., Gribble, F.M., Ashcroft, S.J.H. and Ashcroft, F.M. (1999): Identification of the high-affinity tolbutamide site on the SUR1 subunit of the K_{ATP} channel. *Diabetes* **48**, 1341-1347

Babenko, A.P., Gonzalez, G., Aguilar-Bryan, L. and Bryan, J. (1998): Reconstituted human cardiac K_{ATP} channels – Functional identity with the native channels from the sarcolemma of human ventricular cells. *Circulation Research* **83**, 1132-1143

Babenko, A.P., Gonzalez, G. and Bryan, J. (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., Schulte, U., Oliver, D., Herlitze, S., Krauter, T., Tucker, S.J., Ruppersberg, J.P. und Fakler, B. (1998): PIP₂ and PIP as determinants for ATP inhibition of K_{ATP} channels. *Science* **282**, 1141-1144

Baukrowitz, T. and Fakler, B. (2000): K-ATP channels gated by intracellular nucleotides and phospholipids. *European Journal of Biochemistry* **267**, 5842-5848

Beguín, P., Nagashima, K., Nishimura, M., Gonoï, T. and Seino, S. (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

Bevington, P.R. (1969): Data reduction and error analysis for the physical sciences. 55-65 and 92-118

Bienengräber, M., Olson, T.M., Selivanov, V.A., Kathmann, E.C., O'Coilain, F., Gao, F., Karger, A.B., Ballew, J.D., Hodgson, D.M., Zingman, L.V., Pang, Y.P., Alekseev, A.E. and Terzic, A. (2004): ABCC9 mutations identified in human dilated cardiomyopathy disrupt catalytic KATP channel gating. *Nat. Genet.* **36**, 382-387

Bienengräber, M., Alekseev, A.E., Abraham, M.R., Carrasco, A.J., Moreau, C., Vivaudou, M., Dzeja, P.P. and Terzic, A. (2000): ATPase activity of the sulfonylurea receptor: a catalytic function for the K_{ATP} channel complex. *FASEB Journal* **14**, 1943-1952

Bränström, R., Leibiger, I.B., Leibiger, B., Corkey, B.E., Berggren, P.-O. and Larsson, O. (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

Bray, K.M. and Quast, U. (1992): A specific binding site for K⁺ channel openers in rat aorta. *The Journal of Biological Chemistry* **267**, 11689-11692

Butler, A., Tsunoda, S., McCobb, D.P., Wei, A. and Salkoff, L. (1993): mSlo, a complex mouse gene encoding "maxi" calcium-activated potassium channels. *Science* **261**, 221-224

Cavero, I., Djellas, Y. and Guillon, J.M. (1995): Ischemic myocardial cell protection conferred by the opening of ATP-sensitive potassium channels. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **9**, 245-255

Chutkow, W.A., Simon, M.C., Le Beau, M.M. and Burant, C.F. (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., Gonzalez, G., Schwanstecher, M., Panten, U., Aguilar-Bryan, L. and Bryan, J. (1997): Association and stoichiometry of K_{ATP} channel subunits. *Neuron* **18**, 827-838

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

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

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

D`hahan, N., Moreau, C., Prost, A.-L., Jacquet, H., Alekseev, A.E., Terzic, A. and Vivaudou, M. (1999) : Pharmacological plasticity of cardiac ATP-sensitive potassium channels toward diazoxide revealed by ADP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 12162-12167

D`hahan, N., Jacquet, H., Moreau, C., Catty, P. and Vivaudou, M. (1999) : A transmembrane domain of the sulfonylurea receptor mediates activation of the ATP-sensitive K⁺ channels by K⁺ channel openers. *Molecular Pharmacology* **56**, 308-315

Dickinson, K.E.J., Bryson, C.C., Cohen, R.B., Rogers, L., Green, D.W. and Atwal, K.S. (1997): Nucleotide regulation and characteristics of potassium channel opener binding to skeletal muscle membranes. *Molecular Pharmacology* **52**, 473-481

Dörschner, H., Brekardin, E., Uhde, I., Schwanstecher, C. and Schwanstecher, M. (1999): Stoichiometry of sulfonylurea-induced ATP-sensitive potassium channel closure. *Molecular Pharmacology* **55**, 1060-1066

Doi, T., Fakler, B., Schultz, J.H., Ehmke, H., Brändle, U., Zenner, H.P., Süßbrich, H., Lang, F., Ruppersberg, J.P. and Busch, A.E. (1995): Subunit-specific inhibition of inward-rectifier K⁺ channels by quinidine. *FEBS Letters* **375**, 193-196

Doupnik, C.A., Davidson, N. and Lester, H.A. (1995): The inward rectifier potassium channel family. *Curr. Op. Neurobiol.* **5**, 268-277

Doyle, D.A., Cabral, J.M., Pfuetzner, R.A., Kuo, A., Gulbis, J.M., Cohen, S.L., Chait, B.T. and MacKinnon (1998): The structure of the potassium channel: Molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* **280**, 69-77

Dunne, M.J. and Petersen, O.H. (1986): Intracellular ADP activates K⁺ channels that are inhibited by ATP in an insulin-secreting cell line. *FEBS Lett.* **208**, 59-62

Edwards, G. and Weston, A.H. (1993): The pharmacology of ATP-sensitive potassium channels. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **33**, 597-637

Fox, J.E.M., Kanji, H.D., French, R.J. and Light P.E. (2002): Cardiosensitivity of the sulfonylurea HMR 1098: studies on native and recombinant cardiac and pancreatic K_{ATP} channels. *British Journal of Pharmacology* **135**, 480-488

Garlid, K.D. (1996): Cation transport in mitochondria – The potassium cycle. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1275**, 123-126

Garlid, K.D., Paucek, P., Yarov-Yarovoy, V., Murray, H.N., Darbenzio, R.B., D'Alonzo, A.J., Lodge, N.J., Smith, M.A. and Grover, G.J. (1997): Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels. Possible mechanism of cardioprotection. *Circulation Research* **81**, 1072-1082

Glaser, B., Thorton, P., Otonkoski, T. and Junien, C. (2000): Genetics of neonatal hyperinsulinism. *Arch. Dis. Child Fetal Neonatal Ed* **82**, F79-F86

Gloyn, A.L., Hashim, Y., Ashcroft, S.J.H., Ashfield, R., Wiltshire, S. and Turner, R.C. (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

Gögelein, H., Hartung, J., Englert, H.C. and Schölkens, B.A. (1998): HMR 1883, a novel cardiosensitive inhibitor of the ATP-sensitive potassium channel. Part I: Effects on cardiomyocytes, coronary flow and pancreatic β -cells. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **286**, 1453-1464

Gögelein, H., Hartung, J. and Englert, H.C. (1999): Molecular basis, pharmacology and physiological role of cardiac K_{ATP} channels. *Cellular Physiology and Biochemistry* **9**, 227-241

Gögelein, H., Englert, H.C., Kotzan, A., Hack, R., Lehr, K.-H., Seiz, W., Becker, R.H.A., Sultan, E., Schölkens, B.A. and Busch, A.E. (2000): HMR 1098: An inhibitor of cardiac ATP-sensitive potassium channels. *Cardiovascular Drug Reviews* **18**, 157-174

Gonoi, T. and Seino, S. (2000): Structure and functions of ATP-sensitive K⁺ channels. in "Pharmacology of Ionic Channel Function: Activators and Inhibitors"; Endo, M., Kurachi, Y. and Mishina, eds. *Springer Verlag, New York*

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., Tucker, S.J. and Ashcroft, F.M. (1997): 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., Proks, P., Corkey, B.E. and Ashcroft, F.M. (1998): 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., Seino, S. and Ashcroft, F.M. (1998): Tissue specificity of sulfonylureas: Studies on cloned cardiac and β -cell K_{ATP} channels. *Diabetes* **47**, 1412-1418

Gribble, F.M. and Reimann, F. (2002): Pharmacological modulation of K_{ATP} channels. *Biochemical Society Transactions* **30**, 333-339

Gross, G.J. and Fryer, R.M. (1999): Sarcolemmal versus mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels and myocardial preconditioning. *Circulation Research* **84**, 973-979

Hambrock, A., Löffler-Walz, C., Kurachi, Y. and Quast, U. (1998): Mg²⁺ and ATP dependence of K_{ATP} channel modulator binding to the recombinant sulfonylurea receptor, SUR2B. *British Journal of Pharmacology* **125**, 577-583

Hambrock, A., Löffler-Walz, C., Russ, U., Lange, U. and Quast, U. (2001): Characterization of a mutant sulfonylurea receptor SUR2B with high affinity for sulfonylureas and openers: Differences in the coupling to Kir6.x subtypes. *Molecular Pharmacology* **60**, 190-199

Hambrock, A., Löffler-Walz, C. and Quast, U. (2002): Glibenclamide binding to sulfonylurea receptor subtypes: dependence on adenine nucleotides. *British Journal of Pharmacology* **136**, 995-1004

Hani, E.H., Boutin, P., Durand, E., Inoue, H., Permutt, M.A., Velho, G. und Froguel, P. (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 I Diabetes in Caucasians. *Diabetologia* **41**, 1511-1515

t'Hart, L.M., de Knijff, P., Dekker, J.M., Stolk, R.P., Nijpels, G., van der Does, F.E.E., Ruige, J.B., Grobbee, D.E., Heine, R.J. and Maassen, J.A. (1999): Variants in the sulfonylurea receptor gene: association of the exon 16-3t variant with Type II diabetes mellitus in Dutch Caucasians. *Diabetologia* **42**, 617-620

Heinemann, S.H. (2001): Sodium, Calcium and potassium channels. *Encyclopedia of Life Sciences, Nature Publishing Group*

Heron, L., Virsolvy, A., Peyrollier, K., Gribble, F.M., LeCam, A., Ashcroft, F.M. and Bataille, D. (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. and Ball, R. (1996): Regulation of cardiac Na^+ , Ca^{2+} exchange and K_{ATP} potassium channels by PIP_2 . *Science* **273**, 956-959

Hille, B. (1992): "Ionic channels of excitable membranes", 2 Ed. *Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts*

Hung, L.-W., Wang, I.X., Nikaido, K., Liu, P.-Q., Ames, G.F.-L. and Kim, S.-H. (1998): Crystal structure of the ATP-binding subunit of an ABC transporter. *Nature* **396**, 703-707

Inagaki, N., Tsuura, Y., Namba, N., Masuda, K., Gono, T., Horie, M., Seino, Y., Minuta, M. and Seino, S. (1995): Cloning and functional characterization of a novel ATP-sensitive potassium channel ubiquitously expressed in rat tissues, including pancreatic islets, pituitary, skeletal muscle, and heart. *The Journal of Biological Chemistry* **270**, 5691-5694

Inagaki, N., Gono, T., Clement IV, J.P., Namba, N., Inazawa, J., Gonzalez, G., Aguilar-Bryan, L., Seino, S. and Bryan, J. (1995): Reconstitution of I_{KATP} : an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science* **270**, 1166-1170

Inagaki, N., Gono, T., Clement IV, J.P., Wang, C.Z., Aguilar-Bryan, L., Bryan, J. and Seino, S. (1996): A family of sulfonylurea receptors determines the pharmacological properties of ATP-sensitive K^+ -channels. *Neuron* **16**, 1011-1017

Inoue, I., Nagase, H., Kishi, K. and Higuti, T. (1991): ATP-sensitive K^+ channel in the mitochondrial inner membrane. *Nature* **352**, 244-247

Isomoto, S., Kondo, C., Yamada, M., Matsumoto, S., Higashiguchi, O., Horio, Y., Matsuzawa, Y. and Kurachi, Y. (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. and Jan, Y.N. (1992): Tracing the roots of ion channels. *Cell*. **69**, 715-718

Jan, L.Y. and Jan, Y.N. (1997): Voltage-gated and inwardly rectifying potassium channels. *Journal of Physiology-London* **505**, 267-282

Jung, O., Englert, H.C., Jung, W., Gögelein, H., Schölkens, B.A., Busch, A.E. and Linz, W. (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

Karolyi, L., Ziegler, A., Pollak, M., Fischbach, M., Grzeschik, K.H., Koch, M.C. and Seyberth, H.W. (1998): Gitelman's syndrome is genetically distinct from other forms of Bartter's syndrome. *Pediatr. Nephrol.* **10**, 551-554

Karow, T. und Lang-Roth, R. (2004): Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie: Vasodilatoren. 68-70

Ketchum, K.A., Joiner, W.J., Sellers, A.J., Kaczmarek, L.K. and Goldstein, S.A. (1995): A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem. *Nature* **376**, 690-705

Köhler, M., Hirschberg, B., Bond, C.T., Kinzie, J.M., Marrion, N.V., Maylie, J. and Adelman, J.P. (1996): Small-conductance, calcium-activated potassium channels from mammalian brain. *Science* **273**, 1709-1714

Lawson, K. (1996): Potassium channel activation: A potential therapeutic approach? *Pharmacology and Therapeutics* **70**, 39-63

Lin, Y.-F., Jan, Y.N. and Jan, L.Y. (2000): Regulation of ATP-sensitive potassium channel function by protein kinase A-mediated phosphorylation in transfected HEK293 cells. *The EMBO Journal* **19**, 942-955

Liu, Y., Sato, T., O'Rourke, B. and Marban, E. (1998): Mitochondrial ATP-dependent potassium channels: novel effectors of cardioprotection? *Circulation* **97**, 2463-2469

Liu, G.X., Hanley, J., Ray, J. and Daut, J. (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

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

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

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

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

Lu, Z. and MacKinnon, R. (1994): Electrostatic tuning of Mg²⁺ affinity in an inward-rectifier K⁺ channel. *Nature* **371**, 243-246

Matsuo, M., Tanabe, K., Kioka, N., Amachi, T. and Ueda, K. (2000): Different binding properties and affinities for ATP and ADP among sulfonylurea receptor subtypes, SUR1, SUR2A, and SUR2B. *The Journal of Biological Chemistry* **275**, 28757-28763

Mikhailov, M.V., Mikhailova, E.A. and Ashcroft, S.J.H. (2001): Molecular structure of the glibenclamide binding site of the β -cell K_{ATP} channel. *FBES Letters* **499**, 154-160

Misler, S., Falke, L.C., Gillis, K. and McDaniel, M.L. (1986): A metabolite-regulated potassium channel in rat pancreatic B cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **83**, 7119-7123

Moreau, C., Jacquet, H., Prost, A.-L., D'ahan, N. and Vivaudou, M. (2000) : The molecular basis of the specificity of action of the K_{ATP} channel openers. *The EMBO Journal* **19**, 6644-6651

Murry, C.E., Jennings, R.B. and Reimer, K.A. (1986): Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* **74**, 1124-1136

Navarro, B., Kennedy, M.E., Velimirović, B., Bhat, D., Peterson, A.S. and Clapham, D.E. (1996): Nonselective and G $\beta\gamma$ -insensitive weaver K⁺ channels. *Science* **272**, 1950-1953

Nestorowicz, A., Wilson, B.A., Schoor, K.P., Inoue H., Glaser, B., Landau, H., Stanley, C.A., Thornton, P.S., Clement, J.P. 4th, Bryan, J., Aguilar-Bryan, L. and Permutt, M.A. (1996): Mutations in the sulfonylurea receptor gene are associated with familial hyperinsulinism in Ashkenazi Jews. *Hum. Mol. Genet.* **5(11)**, 1813-1822

Nichols, C.G., Ripoll, C. and Lederer, W.J. (1991): ATP-sensitive potassium channel modulation of the guinea pig ventricular action potential and contraction. *Circulation Research* **68**, 280-287

Nichols, C.G. and Lopatin, A.N. (1997): Inward rectifier potassium channels. *Annual Review of Physiology* **59**, 171-191

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

Okuyama, Y., Yamada, M., Kondo, C., Satoh, E., Isomoto, S., Scindo, T., Horio, Y., Kitakaze, M., Hori, M. and Kurachi, Y. (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

Ozanne, S.E., Guest, P.C., Hutton, J.C. and Hales, C.N. (1995): Intracellular localization and molecular heterogeneity of the sulfonylurea receptor in insulin-secreting cells. *Diabetologia* **38**, 277-282

Pongs, O. (1993): Structure-function studies on the pore of potassium channels. *The Journal of Membrane Biology* **136**, 1-8

Quast, U., Bray, K.M., Andres, H., Manley, P.W., Baumlin, Y. and Dosogne, J. (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. (1996): ATP-sensitive K⁺ channels in the kidney. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **354**, 213-225

Quayle, J.M., Nelson, M.T. and Standen, N.B. (1997): ATP-sensitive and inwardly rectifying potassium channels in smooth muscle. *Physiological Reviews* **77**, 1165-1232

Quinn, K.V., Giblin, J.P. and Tinker, A. (2004): Multisite phosphorylation mechanism for protein kinase A activation of the smooth muscle ATP-sensitive K⁺ channel. *Circ. Res.* **94**, 1359-1366

Reimann, F. and Ashcroft, F.M. (1999): Inwardly rectifying potassium channels. *Current Opinion in Cell Biology* **11**, 503-508

Reimann, F., Ashcroft, F.M. and Gribble, F.M. (2001): Structural basis for the interference between nicorandil and sulfonylurea action. *Diabetes* **50**, 2253-2259

Riedel, M.J., Boora, P., Steckley, D., de Vries, G. and Light, P.E. (2003): Kir6.2 polymorphisms sensitize beta-cell ATP-sensitive potassium channels to activation by acyl CoAs: a possible cellular mechanism for increased susceptibility to type 2 diabetes? *Diabetes* **52**, 2630-2635

Russ, U., Hambrock, A., Artunc, F., Löffler-Walz, C., Horio, Y., Kurachi, Y. and Quast, U. (1999): Coexpression with the inward rectifier K(+) channel Kir6.1 increases the affinity of the vascular sulfonylurea receptor SUR2B for glibenclamide. *Molecular Pharmacology* **56**, 955-951

Russ, U., Lange, U., Löffler-Walz, C., Hambrock, A. and Quast, U. (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., Löffler-Walz, C., Hambrock, A. and Quast, U. (2003): Binding and effect of K_{ATP} channel openers in the absence of Mg²⁺. *British Journal of Pharmacology* **139**, 368-380

Sakura, H., Ämmälä, C., Smith, P.A., Gribble, F.M. and Ashcroft, F.M. (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

Sanchez, J.A., Gonoï, T., Inagaki, N., Katada, T. and Seino, S. (1998): Modulation of reconstituted ATP-sensitive K⁺ channels by GTP-binding proteins in a mammalian cell line. *Journal of Physiology-London* **507**, 315-324

Sanguinetti, M.C., Jiang, C., Curran, M.E. and Keating, M.T. (1995): A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the I_{Kr} potassium channel. *Cell* **81**, 299-307

Sanguinetti, M.C. and Spector, P.S. (1997): Potassium channelopathies. *Neuropharmacology* **36**, 755-762

Schwanstecher, M., Brandt, C., Behrends, S., Schaupp, U. and Panten, U. (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., Sieverding, C., Dörschner, H., Gross, I., Aguilar-Bryan, L., Schwanstecher, C. and Bryan, J. (1998): Potassium channel openers require ATP to bind and act through sulfonylurea receptors. *The EMBO Journal* **17**, 5529-5535

Schwanstecher, C., Meyer, U. und Schwanstecher, M. (2002): Kir6.2 polymorphism predisposes to type 2 diabetes by inducing overactivity of pancreatic β -cell ATP-sensitive K(+) channels. *Diabetes* **51**, 875-879

Shyng, S.-L., Ferrigni, T. and Nichols, C.G. (1997): Control of rectification and gating of cloned K_{ATP} channels by the Kir6.2 subunit. *Journal of General Physiology* **110**, 141-153

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

- Slesinger, P.A., Patil, N., Liao, Y.J., Jan, Y.N., Jan, L.Y., Cox, D.R. (1996): Functional effects of the mouse weaver mutation on G protein-gated inwardly rectifying K⁺ channels. *Neuron* **16**, 321-331
- Splawski, I., Timothy, K.W., Vincent, G.M., Atkinson, D.L. and Keating, M.T. (1997): Molecular basis of the long-QT syndrome associated with deafness. *N. Engl. J. Med.* **336**, 1562-1567
- Stephan, D., Stauß, E., Lange, U., Felsch, H., Löffler-Walz, C., Hambrock, A., Russ, U. and Quast, U. (2005): The mutation Y1206S increases the affinity of the sulfonylurea receptor SUR2A for glibenclamide and enhances the effects of coexpression with K_{IR6.2}. *British Journal of Pharmacology* **144**, 1078-1088
- Süßbrich, H. and Busch, A.E. (1998): Kaliumkanäle. *Deutsche Apotheker Zeitung* **138**, 1139-1148
- Surmeier, D.J., Mermelstein, P.G. and Goldowitz, D. (1996): The weaver mutation of GIRK2 results in a loss of inwardly rectifying K⁺ current in cerebellar granule cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **93**, 10541-10542
- Tagliatela, M., Ficker, E., Wible, B. and Brown, A.M. (1995): C-terminus determinants for Mg²⁺ and polyamine block of the inward rectifier K⁺ channel IRK1. *The EMBO Journal* **14** (22), 5532-5541
- Tanabe, K., Tucker, S.J., Matsuo, M., Proks, P., Ashcroft, F.M., Seino, S., Amachi, T. and Ueda, K. (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
- Thomas, P.M., Cote, G.J., Wohlk, N., Haddad, B., Matthew, P.M., Rabl, W., Aguilar-Bryan, L., Gagel, R.F. and Bryan, J. (1995): Mutations in the sulfonylurea receptor gene in familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Science* **268**, 426-429
- Thomas, P., Ye, Y. and Lightner, E. (1996): Mutation of the pancreatic islet inward rectifier Kir6.2 also leads to familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Hum. Mol. Genet.* **5**, 1809-1812
- Toman, A., Uhde, I. and Schwanstecher, M. (2000): A single residue in SURs is essential for sulfonylurea binding. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **361** (Supplement), R75 (Abstract)
- Trube, G. and 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., Zhao, C., Trapp, S. and Ashcroft, F.M. (1997): Truncation of Kir6.2 produces ATP-sensitive K⁺ channels in the absence of the sulfonylurea receptor. *Nature* **387**, 179-183

Ueda, K., Inagaki, N. and Seino, S. (1997): MgADP antagonism to Mg²⁺-independent ATP binding of the sulfonylurea receptor SUR1. *The Journal of Biological Chemistry* **272**, 22983-22986

Ueda, K., Komine, J., Matsuo, M., Seino, S. and Amachi, T. (1999): Cooperative binding of ATP and MgADP in the sulfonylurea receptor is modulated by glibenclamide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 1268-1272

Uhde, I., Toman, A., Gross, I., Schwanstecher, C. and Schwanstecher, M. (1999): Identification of the potassium channel opener site on sulfonylurea receptors. *The Journal of Biological Chemistry* **274**, 28079-28082

Venkatesh, N., Lamp, S.T. and Weiss, J.N. (1991): Sulfonylureas, ATP-sensitive K⁺ channels, and cellular K⁺ loss during hypoxia, ischemia, and metabolic inhibition in mammalian ventricle. *Circulation Research* **69**, 623-637

Virsolvyy-Vergine, A., Leray, H. and Kuroki, S. (1992): Endosulfine, an endogenous peptidic ligand for the sulfonylurea receptor: purification and partial characterization from ovine brain. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **89**, 6629-6633

Wada, Y., Yamashita, T., Imai, K., Miura, R., Takao, K., Nishi, M., Takeshima, H., Asano, T., Morishita, R., Nishizawa, K., Kokubun, S. and Nukada, T. (2000): A region of the sulfonylurea receptor critical for a modulation of the ATP-sensitive K⁺ channels by G-protein $\beta\gamma$ -subunits. *The EMBO Journal* **19**, 4915-4925

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., Matsumoto, S., Kondo, C., Scindo, T., Horio, Y. and Kurachi, Y. (1997): Sulfonylurea receptor 2B and Kir6.1 form a sulfonylurea-sensitive but ATP-insensitive K⁺ channel. *Journal of Physiology-London* **499**, 715-720

Zingman, L.V., Alekseev, A.E., Bienengraber, M, Hodgson, D., Karger, A.B., Dzeja, P.P. and Terzic, A. (2001): Signaling in channel/enzyme multimers: ATPase transitions in SUR module gate ATP-sensitive K⁺ conductance. *Neuron* **31**, 233-245

Zerangue, N., Schwappach, B., Jan, Y.N. and Jan, L.Y. (1999): A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane K_{ATP} channels. *Neuron* **22**, 537-548

Herrn **Prof. Dr. Ulrich Quast** möchte ich für die Bereitstellung des Themas für diese Dissertation und besonders für die freundliche und sehr gute Betreuung bei der Durchführung sowohl der Versuche als auch der schriftlichen Ausfertigung dieser Arbeit danken.

Desweiteren gilt mein Dank **Frau Cornelia Löffler-Walz** für die gute Einführung in die Versuchstechniken und für die nette und äußerst hilfreiche Zusammenarbeit.

Frau Dr. Annette Hambrock und **Frau Claudia Müller** möchte ich für die Bereitstellung der transfizierten Zellen danken.

Zuletzt möchte ich meinen Dank der **Arbeitsgruppe** (Herrn Dr. Uli Ruß, Herrn Ulf Lange, Frau Julia Laske), die mich freundlich und unterstützend in ihren Kreis aufgenommen hat, aussprechen.

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Eva Stauß

geboren 02. Januar 1976 in Albstadt

ledig, 1 Tochter, 7 Jahre

Schulbildung

1982-1986

Grundschule Stiegel, Albstadt

1986-1992

Progymnasium Tailfingen, Albstadt

1992-1995

Allgemeinbildendes Gymnasium,
Albstadt

Abschluß: Abitur, Note 1,8

Ausbildung

1995-1996

Diplomverwaltungswirtin

im gehobenen Verwaltungsdienst,
vorzeitige Beendigung des

Ausbildungsverhältnisse im März
1996, da Aufnahme eines

Hochschulstudiums

Hochschulausbildung

1996-2004

Studium der Humanmedizin an der
Eberhard-Karls Universität Tübingen

28.08.1998

Physikum,

Gesamtnote »befriedigend«

23.03.2000

1. Staatsexamen, Note »gut«

16.09.2002

2. Staatsexamen, Gesamtnote
»befriedigend«

2003-2004

Praktisches Jahr in den Fächern
Chirurgie, Innere und Gynäkologie
an der Universitätsklinik Tübingen

19.05.2004

3. Staatsexamen, Note »gut«

2001-2006

Experimentelle Doktorarbeit in der
Abteilung für

Molekularpharmakologie, Tübingen:

		»Grundcharakterisierung einer Mutanten des Sulfonylharnstoffrezeptors«
Arbeitsverhältnis	Seit 15.11.2004	Assistenzärztin in der Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe des Zollernalbkrankenhauses gGmbH, Chefarzt Dr. Tibor Horvath
Praktische Tätigkeiten	2003-2004	Dokumentationsassistentin im Rahmen von Arzneimittelstudien in der Abteilung Klinische Pharmakologie, Prof. Dr. med. Gleiter, in Tübingen
	2003-2004	Nachwachen auf der Probandenstation der Abteilung Klinische Pharmakologie, Tübingen
	2000-2001	Tutor am Anatomischen Institut im Rahmen des Kursus der Makroskopischen Anatomie für Mediziner
Sprachkenntnisse	Englisch	gut in Wort und Schrift, Kursus »English in Medicine« am Deutsch-Amerikanischen Institut Tübingen
	Französisch	gute Kenntnisse
Interessen		Gesang
Hobbys		Malen/Zeichnen Nordic walking

