

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität  
Tübingen

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. med. H. Oßwald

Abteilung für Molekularpharmakologie

Abteilungsleiter: Professor Dr. U. Quast

Der Einfluß der porenbildenden Untereinheit des  $K_{ATP}$ -  
Kanals auf die pharmakologischen Eigenschaften der  
Sulfonylharnstoffrezeptoren SUR1 und SUR2A(Y1206S)

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard/Karls/Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von  
Susanne Bieger

aus  
Hechingen

2006

Dekan: Professor Dr. I.B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. U. Quast

2. Berichterstatter: Professor Dr. M. Schwarz

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>7</b>
1.1	Die Zellmembran	7
1.2	Ionenkanäle	7
1.3	<b>Kaliumkanäle</b>	<b>9</b>
1.3.1	Spannungsabhängige Kaliumkanäle (K <sub>v</sub> )	9
1.3.2	Kalziumabhängige Kaliumkanäle (K <sub>Ca</sub> )	11
1.3.3	Einwärtsgleichrichtende Kaliumkanäle (Kir(inward rectifying))	12
1.3.4	Tandem-Kaliumkanäle (K <sub>2P</sub> )	13
1.4	<b>ATP-abhängige Kaliumkanäle</b>	<b>13</b>
1.4.1	Der Aufbau von K <sub>ATP</sub> -Kanälen	15
1.4.2	Die $\alpha$ -Untereinheit Kir6.x des K <sub>ATP</sub> -Kanals	17
1.4.3	Die $\beta$ -Untereinheit SUR des K <sub>ATP</sub> -Kanals	19
1.4.4	Die gewebespezifische Verteilung der K <sub>ATP</sub> -Kanaluntereinheit	21
1.4.5	Die Regulation des K <sub>ATP</sub> -Kanals	22
1.5	<b>Physiologische und pathophysiologische Rolle von K<sub>ATP</sub>-Kanälen</b>	<b>24</b>
1.6	<b>K<sub>ATP</sub>-Kanal-verursachte Krankheiten des Menschen</b>	<b>26</b>
1.6.1	Persistierende hyperinsulinämische Hypoglykämie (Persistent hyperinsulinaemic hypoglycaemia of infancy=PHHI)	26
1.6.2	Diabetes mellitus Typ2 (Typ2 Diabetes mellitus=NIDDM=Nichtinsulinabhängiger Diabetes mellitus)	28
1.7	<b>Die Pharmakologie der ATP-abhängigen Kaliumkanäle</b>	<b>30</b>
1.7.1	K <sub>ATP</sub> -Kanalblocker	30
1.7.1.1	Übersicht über die verschiedenen Substanzen	38
1.7.2	Synthetische Öffner der K <sub>ATP</sub> -Kanäle	40
1.8	<b>Fragestellung der Arbeit</b>	<b>44</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>47</b>
2.1	<b>Geräte und Chemikalien</b>	<b>47</b>
2.2	<b>Puffer und Medien</b>	<b>49</b>
2.3	<b>HEK293 - Zellen</b>	<b>53</b>
2.3.1	Kultivierung von HEK293 – Zellen	53
2.3.2	Transfektion von HEK293-Zellen mit Lipofektamin™ 2000 Reagent	55
2.3.3	Einfrieren von HEK293-Zellen	56

2.3.4	Auftauen von HEK293-Zellen	56
<b>2.4</b>	<b>Proteinbestimmung nach Lowry</b>	<b>57</b>
<b>2.5</b>	<b>Radioligand-Bindungsexperimente</b>	<b>59</b>
2.5.1	Die Wahl des Radioliganden	59
2.5.2	Die Gewinnung von Rezeptormaterial	61
2.5.3	Die Inkubation	61
2.5.4	Die Trennung von gebundenem und freiem Radioliganden durch die Filtration	63
2.5.5	Die Messung der Radioaktivität	63
<b>2.6</b>	<b>Modell der Rezeptorbindungsstudien</b>	<b>64</b>
2.6.1	Kompetitionsexperiment	67
2.6.2	Verallgemeinerung der Bindungsisotherme nach Hill	70
<b>2.7</b>	<b>Datenauswertung und Statistik</b>	<b>71</b>
2.7.1	Die Analyse der Bindungskurven	71
2.7.2	Statistik	72
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>74</b>
<b>3.1</b>	<b>Bindung von Sulfonylharnstoffen und Gliniden an SUR1 und Kir6.2/SUR1</b>	<b>74</b>
3.1.1	Bindung von langkettigen Sulfonylharnstoffen (Liganden vom Typ A+B) an SUR1 und Kir6.2/SUR1: GBC und Glimipirid	75
3.1.1.1	Verdrängung von $^3\text{H}$ -GBC durch GBC	75
3.1.1.2	Verdrängung von $^3\text{H}$ -GBC durch Glimipirid	77
3.1.2	Bindung von Typ A Liganden an SUR1 und Kir6.2/SUR1: Glibornurid und Nateglinid	79
3.1.2.1	Verdrängung von $^3\text{H}$ -GBC durch Glibornurid	79
3.1.2.2	Verdrängung von $^3\text{H}$ -GBC durch Nateglinid	81
3.1.3	Bindung von Typ B Liganden an SUR1 und Kir6.2/SUR1: Meglitinid, UL-DF 9, (-)-AZ-DF 265 und Repaglinid	83
3.1.3.1	Verdrängung von $^3\text{H}$ -GBC durch Meglitinid	83
3.1.3.2	Verdrängung von $^3\text{H}$ -GBC durch UL-DF 9	85
3.1.3.3	Verdrängung von $^3\text{H}$ -GBC durch (-)-AZ-DF 265	87
3.1.3.4	Verdrängung von $^3\text{H}$ -GBC durch Repaglinid	89
<b>3.2</b>	<b>Bindung von Sulfonylharnstoffen und Gliniden an SUR2A(Y1206S) und Kir6.2/SUR2A(Y1206S)</b>	<b>91</b>
3.2.1	Bindung von langkettigen Sulfonylharnstoffen (Liganden vom Typ A+B) an SUR2A(Y1206S) und Kir6.2/SUR2A(Y1206S): Glibenclamid	93
3.2.1.1	Verdrängung von $^3\text{H}$ -GBC durch Glibenclamid (GBC)	93
3.2.2	Bindung von Typ A Liganden an SUR2A(Y1206S) und Kir6.2/SUR2A(Y1206S): Glibornurid und Nateglinid	96
3.2.2.1	Verdrängung von $^3\text{H}$ -GBC durch Glibornurid	96
3.2.2.2	Verdrängung von $^3\text{H}$ -GBC durch Nateglinid	98

3.2.3	Bindung von Typ B Liganden an SUR2A(Y1206S) und Kir6.2(Y1206S): Meglitinid, (-)-AZ-DF 265 und Repaglinid	100
3.2.3.1	Verdrängung von <sup>3</sup> H-GBC durch Meglitinid	100
3.2.3.2	Verdrängung von <sup>3</sup> H-GBC durch (-)-AZ-DF 265	102
3.2.3.3	Verdrängung von <sup>3</sup> H-GBC durch Repaglinid	104
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>107</b>
4.1	Vorbemerkungen	107
4.2	Vergleich der Affinität von SUR1 und SUR2A(Y1206S) für Sulfonylharnstoffe und Glinide	109
4.3	Vergleich der Affinität von Kir6.2/SUR1 und Kir6.2/SUR2A(Y1206S) für Sulfonylharnstoffe und Glinide	112
4.4	Effekt der Koexpression mit Kir6.2 auf die Affinität von SUR1 für Sulfonylharnstoffe und Glinide	115
4.5	Effekt der Koexpression mit Kir 6.2 auf die Affinität von SUR2A(Y1206S) für Sulfonylharnstoffe und Glinide	117
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG DER ARBEIT</b>	<b>122</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>125</b>



## Verzeichnis der Abkürzungen

### **A:**

A / a	<u>A</u> mplitude der spezifischen Bindung bzw. Verdrängung in % Bs
ABC-Proteine	<u>A</u> TP- <u>B</u> inding- <u>C</u> assette-Proteins bzw. ATP-Bindungs- Kassette
ADP	<u>A</u> denosin <u>d</u> iphosphat
AMP	<u>A</u> denosin <u>m</u> onophosphat
AP	<u>A</u> ktionspotential
Aqua demin.	demineralisiertes Wasser
As	<u>A</u> minosäure
ATP	<u>A</u> denosin <u>t</u> riphosphat

### **B:**

B <sub>MAX</sub>	<u>m</u> aximale <u>B</u> indungskapazität
Bs	<u>s</u> pezifische <u>B</u> indung
BSA	Rinderserumalbumin ( <u>B</u> ovine <u>S</u> erum <u>A</u> lbumine)
Btot	<u>t</u> otale <u>B</u> indung

### **C:**

c	Konzentration in mol/l
C	Rezeptor-Ligand-Komplex
cDNA	<u>c</u> omplementary <u>D</u> NA, DNA-Kopie eines RNA Stückes mit Hilfe der Reversen Transkriptase
CFTR	<u>C</u> ystic <u>F</u> ibrosis <u>T</u> ransmembran <u>R</u> egulator
Ci	<u>C</u> urie, Einheit der spezifischen Aktivität eines radioaktiven Stoffes
cpm	<u>c</u> ounts <u>p</u> er <u>m</u> inute, Impulse pro Minute

**D:**

Da	Dalton, relative Molekülmasse
DAG	<u>D</u> iacylglycerol
$\Delta pK$	pKi (SURx/Kir6.2) – pKi (SURx)
DMSO	<u>D</u> imethylsulfoxid
dpm	<u>d</u> ecays <u>p</u> er <u>m</u> inute, Zerfälle pro Minute

**E:**

EDTA	<u>E</u> thylen- <u>d</u> iamin- <u>t</u> etra <u>a</u> cetat
EGTA	<u>E</u> thylenglycol-bis (2-amino-ethylether)-N,N,N',N',- <u>t</u> etra <u>a</u> cetat
ERG	Eppendorf-Reaktionsgefäße

**F:**

f	= Ki (-) / Ki (+) = $10^{\Delta}$
FCS (FBS)	fötales Kälberserum bzw. Rinderserum

**G:**

g	<u>G</u> ravitationsbeschleunigung (9.81 m/s <sup>2</sup> )
x g	multipliziert mit der <u>G</u> ravitationsbeschleunigung (9.81 m/s <sup>2</sup> )
GBC	<u>G</u> libenclamid
GIRK	<u>G</u> -protein-linked <u>I</u> nward <u>R</u> ectifying <u>K</u> <sup>+</sup> -channel
GK	<u>G</u> lukose <u>k</u> inase
GLUT2	<u>G</u> lutamat- <u>2</u> -Rezeptor

**H:**

HCl	Salzsäure
HEK-293-Zellen	menschliche embryonale Nierenzelllinie ( <u>H</u> uman <u>E</u> mryonal <u>K</u> idney cells)
HEPES	N-(2- <u>H</u> ydroxyethyl)piperazin-N-(2- <u>e</u> thansulfonsäure)
HERG	<u>H</u> uman <u>E</u> ther-a-go-go- <u>R</u> elated <u>G</u> ene
<sup>3</sup> H	Tritium (Isotop des Wasserstoffs)



$^3\text{H}$ -GBC mit Tritium markiertes Glibenclamid  
 $^3\text{H}$ -P1075 mit Tritium markiertes P1075

**I:**

$\text{IC}_{50}$  Konzentration des kalten Liganden, welche die halbmaximale Bindung bewirkt [M], (Mittelpunkt bzw. Wendepunkt der Hemmkurve).

$\text{IP}_3$  Inositol-1,4,5-trisphosphat

**K:**

$k^-$  Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante

$k^+$  Assoziationsgeschwindigkeitskonstante

$\text{K}^+$  Kaliumion bzw. Kaliumkation

$\text{K}_{2\text{P}}$  Tandem Kaliumkanal (für vollständigen Kanal sind nur zwei Untereinheiten notwendig)

$\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanal ATP-empfindlicher Kaliumkanal

$\text{kb}$  Kilobasenpaar der DNS

$\text{K}_{\text{ca}}$  Kalziumabhängiger Kaliumkanal

KCO Kaliumkanalöffner (K<sup>+</sup>-channel opener)

$\text{K}_\text{D}$  Gleichgewichtsdissoziationskonstante

kDa kilo-Dalton (relative Molekülmasse)

$\text{K}_\text{i}$  Dissoziationskonstante des heterologen Inhibitors

$\text{K}_\text{ir}$  einwärtsgerichteter Kaliumkanal (inward rectifying K<sup>+</sup>-channel)

Komp. Kompetitor

$\text{K}_\text{v}$  spannungsabhängiger Kaliumkanal (voltage dependent K<sup>+</sup>-channel)

**L:**

LC-Acyl-CoA Langkettige Acyl-Coenzym-A-Ester

$\text{L}_{\text{kalt}}$  kalter Ligand, Ligand ist nicht radioaktiv markiert

$L_0$	totale Konzentration des Radioliganden im Inkubationsansatz [M]
$L_{vocc}$	<u>v</u> oltage <u>o</u> perated <u>c</u> alcium <u>c</u> hannel bzw. spannungsgesteuerter Kalziumkanal
<b>M:</b>	
M	<u>M</u> olarität (mol/l)
m	Meter (Längeneinheit)
MDR	<u>M</u> ulti- <u>D</u> rug- <u>R</u> esistance
MEM	<u>M</u> inimal <u>E</u> ssential <u>M</u> edium
MgADP	<u>m</u> agnesiumgebundenes <u>A</u> DP
MgATP	<u>m</u> agnesiumgebundenes <u>A</u> TP
MIDD	<u>M</u> aturity- <u>I</u> nherited- <u>D</u> iabetes with <u>D</u> eafness
min.	<u>M</u> inute
$mitoK_{ATP}$	<u>A</u> TP-empfindlicher <u>K</u> aliumkanal der inneren Mitochondrienmembran
mM	<u>m</u> illimolar ( $10^{-3}$ M)
MODY	<u>M</u> aturity <u>O</u> nset <u>D</u> iabetes of the <u>Y</u> oung
$m_{Prot}$	<u>M</u> asse des <u>P</u> roteins in der Messküvette bei der Proteinbestimmung nach Lowry
MWG	<u>M</u> assen <u>w</u> irkung <u>g</u> esetz
$\mu$	mikromolar ( $10^{-6}$ M)
<b>N:</b>	
n	Anzahl der Einzelversuche
NBF	<u>N</u> ukleotid- <u>B</u> indungs <u>f</u> alte eines ABC-Proteins
$n_H$	Hill-Koeffizient
NIDDM	<u>N</u> ot <u>I</u> nsulin <u>D</u> ependant <u>D</u> iabetes <u>M</u> ellitus (Typ 2)
nM	<u>n</u> anomolar ( $10^{-9}$ M)
nm	nanometer ( $10^{-9}$ m)
NSB	<u>n</u> icht <u>s</u> pezifische <u>B</u> indung

**O:**

OD <sub>770</sub>	<u>O</u> ptische <u>D</u> ichte (Extinktion) bei einer Wellenlänge des Lichts von <u>770</u> nm
Oleoyl-CoA	Oleoyl-Coenzym A

**P:**

P1075	N-Cyano-N´-(1,1-Dimethylpropyl)-N´´-3-pyridylguanidin
pcDNA	Plasmidvektor, der die cDNA des zu exprimierenden Proteins enthält (Firma Invitrogen, San Diego)
pH	-log (H <sub>3</sub> O <sup>+</sup> ), negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PHHI	<u>P</u> ersistent <u>H</u> yperinsulinaemic <u>H</u> ypoglycaemia of <u>I</u> nfancy, Persistierende hyperinsulinämische Hypoglykämie des Kindesalters
pl	-logI (wobei I die Konzentration des homologen bzw. die Konzentration des heterologen Inhibitors darstellt).
pIC <sub>50</sub>	-log IC <sub>50</sub> , negativer dekadischer Logarithmus der halbmaximalen Bindung eines Liganden, [-log M]
PIP <sub>2</sub>	(C <sub>47</sub> H <sub>94</sub> N <sub>3</sub> O <sub>19</sub> P <sub>3</sub> )-L-α- <u>P</u> hosphatidyl <u>i</u> nositol-4,5-bis <u>p</u> hosphat
PK	<u>P</u> rotein <u>k</u> onzentration
pK <sub>D</sub>	negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstante
PLC	Proteinaktivierte <u>P</u> hosphol <u>i</u> pase <u>C</u>

**R:**

RMP	<u>R</u> uhem <u>e</u> mbranpotential [V]
rpm	<u>r</u> ounds <u>p</u> er <u>m</u> inute, Umdrehungen pro Minute
RT	<u>R</u> aum <u>t</u> emperatur (22 °C)

**S:**

S bzw. pS	<u>S</u> iemens, 1pS= 1 p <u>i</u> co <u>s</u> iemens= $10^{-12}$ S, Einheit der Leitfähigkeit von Ionenkanälen
SA	<u>s</u> pezifische <u>A</u> ktivität
SEM	<u>s</u> tandard <u>e</u> rror of the <u>m</u> ean, Standardabweichung des Mittelwertes
SH	Sulfonylharnstoff
SU/ SUs	Sulfonylharnstoff ( <u>s</u> ulfonyl <u>u</u> rea)/ Sulfonylharnstoffe ( <u>s</u> ulfonyl <u>u</u> reas)
SUR	Sulfonylharnstoffrezeptor ( <u>s</u> ulfonyl <u>u</u> rea <u>r</u> eceptor)

**T:**

TM	<u>T</u> rans <u>m</u> embran <u>h</u> elix bzw. Transmembransegment
TMD	<u>T</u> rans <u>m</u> embran- <u>D</u> omäne
TOK1	<u>T</u> wo P-region-containing <u>O</u> utwardly rectifying <u>K</u> <sup>+</sup> -channel
TRIS	<u>T</u> ris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TWIK1	<u>T</u> andem of P domains in a <u>W</u> eak <u>I</u> nward rectifying <u>K</u> <sup>+</sup> - channel

**W:**

w.t.	wild type
------	-----------

**Y:**

y	%Bs (% der spezifischen Bindung), Sättigungsgrad
---	--

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Zellmembran

Die Zellmembran besteht aus einer kontinuierlichen und ca. 5 nm ( $5 * 10^{-9}$  m) dicken Lipiddoppelschicht mit eingelagerten Proteinen. Die Lipide sind amphiphile Moleküle, d.h. sie besitzen einen geladenen/polaren Kopfteil sowie einen ungeladenen/apolaren Schwanzteil. Der hydrophile Kopfteil der Moleküle zeigt dabei nach außen (in Richtung Zelläußeres bzw. zytosolwärts), während sich die zwei hydrophoben Schwanzteile gegenüber stehen und im Inneren der Doppelschicht eine nichtwässrige Phase bilden. Durch diesen Aufbau der Membran lassen sich ihre Eigenschaften größtenteils erklären. So ist die Plasmamembran aufgrund ihrer Ladungsverhältnisse für geladene Teilchen, wie z.B.  $\text{Na}^+$ -,  $\text{K}^+$ -,  $\text{Ca}^{2+}$ -Kationen oder Anionen wie  $\text{Cl}^-$ , impermeabel. Ionen können die Membran aber über geeignete in die Lipiddoppelschichtmembran eingebaute, Transportsysteme bzw. Transportproteine, wie z.B. Ionenkanäle passieren.

## 1.2 Ionenkanäle

Sie bestehen als integrale Membranproteinen häufig aus mehreren Untereinheiten. Viele Kanäle schalten im schnellen Wechsel zwischen offenem und geschlossenem Zustand hin und her, wobei die mittlere Öffnungsdauer gerade mal wenige Millisekunden beträgt. Die Ionenbewegung zwischen intra- und extrazellulärem Raum wird durch den, für das jeweilige Ion vorliegenden, elektrochemischen Gradienten, welcher der Triebkraft der jeweiligen Ionen entspricht, bedingt. Die Teilchen bewegen sich somit durch passive Diffusion durch den Kanal hin und her. Wichtig ist jedoch, dass Ionenkanäle meistens selektiv sind, d.h. sie lassen nur ein bestimmtes Ion passieren. Es werden z.B.  $\text{Na}^+$ -,  $\text{K}^+$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle unterschieden, die durch Bindungsstellen oder

Ladungen an der Kanalwand ein Durchtreten für das/die kanalspezifische/kanalspezifischen Ion/Ionen ermöglicht/ermöglichen, gleichzeitig den Durchtritt für alle anderen Teilchen unmöglich machen können (Alberts et al.,1990; Hille,1992b). Für die Selektivität sind die Teilchengröße, die Hydrathülle und die Ladung eines Ions entscheidend. Um den Selektivitätsfilter zu passieren muß das Ion i.d.R. den größten Teil der Hydrathülle ablegen, was für das Ion allerdings einen energetisch ungünstigeren Zustand darstellt. Dieser Prozess findet statt um die Energie für schwache Bindungen an den geladenen Gruppen der Aminosäuren entlang des Ionenkanals aufbringen zu können. Die Passage ist nur dann möglich, wenn der Energieverlust des Ions durch die schwache Bindung an die Kanalwand kompensiert wird (Doyle et al.,1998; Hille,1992b). Diese schwankenden Energieverhältnisse lassen sich anhand von Energieprofilen des Ionenkanals veranschaulichen. Es sind zum einen Energiegipfel, die Permeabilitätsschranken darstellen könnten, zum anderen Energieabfälle, die man eventuell als solche schwachen Bindungen interpretieren könnte, zu erkennen. Das Energieprofil des Kanals verschiebt sich mit der Zeit in zyklischer Art und Weise und das Ion kann dann plötzlich auf der anderen Seite eines Energieprofils liegen und den Kanal passieren (Läuger,1985). Je nach Art des Ions unterscheiden sich die Energieprofile des Kanals. Auch diese Eigenschaft könnte für die Selektivität der einzelnen Ionenkanäle von entscheidender Bedeutung sein. Die Leitfähigkeit ( $[pS]=10^{-12}$  ((Cb/s)/V)= $10^{-12}$  S) des Ionenkanals und der elektrochemische Gradient bestimmen den Ionenstrom durch den offenen Kanal. Aufgrund des Aktivierungsmechanismus der Ionenkanäle lassen sich diese einteilen in:

- 1.) spannungsabhängige (voltage-gated) Kanäle, die durch das Membranpotential gesteuert werden.
- 2.) mechanisch kontrollierte Kanäle.
- 3.) ligandengesteuerte Ionenkanäle (ligand-gated). Modulation dieser Kanäle kann zum einen durch Liganden, die innerhalb der Zelle aktiv werden (z.B. G-Proteine, Nukleotide, second messenger, wie  $Ca^{2+}$  oder  $IP_3$  (Inositol-1,4,5-triphosphat) und  $PIP_2$  (L- $\alpha$ -Phosphatidyl-Inositol-4,5-Bisphosphat), zum anderen durch extrazelluläre Botenstoffe (z.B. Acetylcholin, Nukleotide, Serotonin

steuern als Neurotransmitter schnelle Kationenkanäle, GABA<sub>A</sub>-Rezeptor einen Cl<sup>-</sup>-Kanal) stattfinden.

4.) durch Proteinkinasen vollzogene Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung von Proteinen gesteuerte Ionenkanäle (Hille,1992a; Süßbrich and Busch,1998).

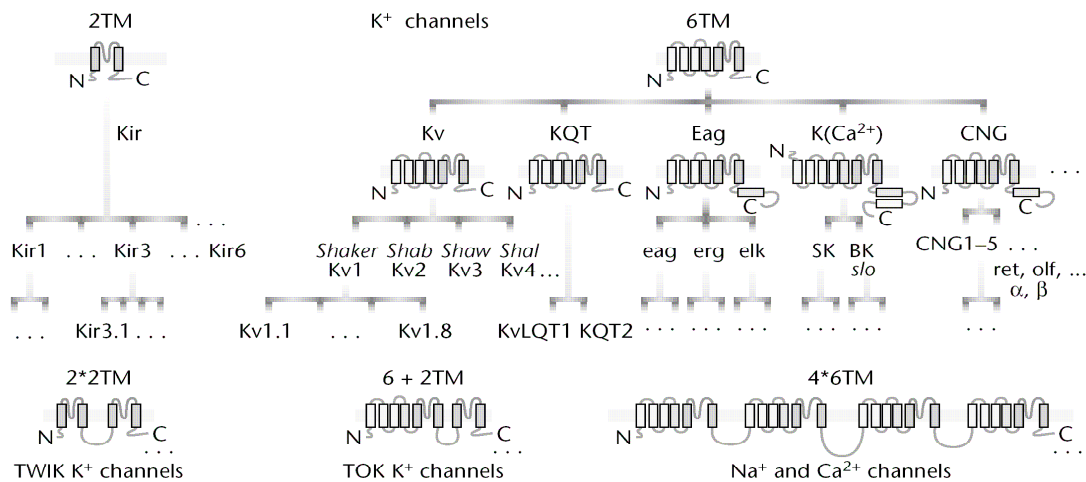
### **1.3 Kaliumkanäle**

Bis jetzt wurden mehr als 50 verschiedene Kaliumkanäle (K<sup>+</sup>-Kanäle) identifiziert. Diese können in vier verschiedene Klassen eingeteilt werden (Salkoff and Jegla,1995). Der Kanal im eigentlichen Sinn wird aus einem Tetramer oder auch Dimer, welcher meist aus homologen  $\alpha$ -Untereinheiten besteht, geformt. In vielen Fällen treten  $\beta$ -Untereinheiten zu den  $\alpha$ -Untereinheiten hinzu, die eine wichtige Rolle für die Regulation der K<sup>+</sup>-Kanalaktivität spielen (Leicher et al.,1996).

#### **1.3.1 Spannungsabhängige Kaliumkanäle (Kv)**

Diese Art des K<sup>+</sup>-Kanals dient v.a. der Repolarisation von Zellen erregbarer Gewebetypen, wie z.B. Myozyten oder Neurone zur Beendigung des Aktionspotentials. Der Kv-Kanal wird von  $\alpha$ -Untereinheiten, die sechs  $\alpha$  helikale Transmembransegmente besitzen gebildet (Jan and Jan,1997, vgl. Abb.1). Die hoch konservierte H5-Domäne, die sich zwischen den transmembransegmenten S5 und S6 befindet, bildet die Pore des Kanals. Diese Domäne ist somit für die Kaliumselektivität des Kanals entscheidend und kommt folglich bei allen Kaliumkanälen vor (Heginbotham et al.,1994). Dieses Wissen macht man sich bei der Identifikation von Kanälen oder von neu entdeckten Klonen zunutze um diese den K<sup>+</sup>-Kanälen zuordnen zu können. Kv-Kanäle zeigen Auswärtsgleichrichtung der K<sup>+</sup>-Leitfähigkeit. Jeder einzelne Kv-Kanaltyp besitzt eine für ihn spezifische Schwellenspannung. Wird diese z.B. durch Erregung der Zelle überschritten erhöht sich die Offenwahrscheinlichkeit

des Kanals rapide. Um diese Aktivierung des Kanals auszulösen wird eine durch ein Aktionspotential induzierte Ladungsverschiebung im S4-Transmembransegment verantwortlich gemacht. Es kommt dadurch zu einer Konformationsänderung im Kanal und zur  $K^+$  Passage. Bleibt die Zelle für längere Zeit im depolarisiertem Zustand geht der Kv-Kanal in einen inaktivierten Zustand über, wobei es eine schnelle und eine langsame Form der Inaktivierung gibt. Die schnelle Form der Inaktivierung kann am Besten durch das "Ball and Chain -Modell" erklärt werden. Dabei hat der im Zellinneren gelegene Amino (N)-Terminus mit positiv geladenen Aminosäuren auf einer Seite in etwa die Form eines Balls, der an einer Kette angebracht ist. Kommt es nun zur Depolarisation wird der Ball durch negative Kanalproteinladungen angezogen und verschließt somit den Kanal (Isacoff et al.,1991; Hille et al.,2001). Die langsame Inaktivierung des Kanals führt zu einer Verengung des Kanaleingangs an der Membranseite, die, wie es scheint, durch den Carboxyl (C)-terminus durch Proteinremodifikation induziert wird (Liu et al.,1996).



**Abb.1 Übersicht der Genfamilie der kaliumkanalformenden Proteinuntereinheiten und damit verwandte Proteine.**

Abgebildet sind nur die wichtigsten Mitglieder. Das Schema basiert auf Kaliumkanälen mit 2 und 6 Transmembransegmenten (2TM und 6TM), die weiteren kanalformenden Proteine haben sich wahrscheinlich durch Genduplikation oder Splicing entwickelt: 2\*2TM (TWIK Kanäle), 6\*2TM (TOK Kanäle) und 4\*6TM (Natrium- und Kalziumkanäle). Es sind mehrere Vertreter der 2TM- und 6TM-Familie dargestellt. Die Punkte zeigen die Vielzahl der, durch den raschen Fortschritt im Klonieren von Kanalgenen zu erwartenden und bereits vorhandenen, Vertretern (Heinemann,2001).



Die Relevanz der Existenz und Funktion dieser spannungsabhängigen  $K^+$ -Kanälen zeigt sich darin, dass es Erkrankungen des Menschen gibt, die aus einem Kanaldefekt resultieren. Zu nennen ist das angeborene Long QT-Syndrom (familiäres QT-Syndrom, Pseudohypokaliämie-Syndrom), auch Romano-Ward-Syndrom genannt. Dabei handelt es sich um eine seltene, autosomal-dominant vererbte Erkrankung, bei der Symptome, wie Synkopen, Arrhythmien und schlimmstenfalls sogar plötzlicher Herztod auftreten können, da die Herzmuskelzellen verzögert repolarisieren, was sich im verlängerten QT-Intervall im EKG zeigt. Zwei Typen von Kv-Kanälen sind dafür verantwortlich. Der nach der neuen Nomenklatur KCNH1, früher "human ether-a-go-go-related gene-Kv6" (HERG) der einen schnellen Kaliumauswärtsstrom am Herz erzeugt und so zur Repolarisation der Zellen beiträgt (Sanguinetti et al.,1995, Barhanin et al.,1995). Sechs vererbare HERG-Gen-Mutationen wurden entdeckt, die alle zu einer starken Reduktion des  $K^+$ -Auswärtsstroms führen (Curran et al.,1995). Der andere Typ ist der KCNQ1 (früher: KVLQT1) der zusammen mit KCNE1 (min K) einen langsamen  $K^+$ -Auswärtsstrom erzeugt und dessen Mutation ebenfalls die Dauer der Repolarisation und damit das QT-Intervall verlängert (Splawski et al.,1997). Eine andere damit verwandte Erkrankung ist das Jervell-Lange-Nielsen-Syndrom. Diese wird autosomal-rezessiv vererbt und es kommt zu den Symptomen des Long QT-Syndroms noch eine Innenohrschwerhörigkeit hinzu.

### **1.3.2 Kalziumabhängige Kaliumkanäle ( $K_{Ca}$ )**

In der Struktur sind sie den Kv-Kanälen sehr ähnlich (vgl. Abb.1) und kommen in fast allen Typen von Zellen vor. Auffallend ist ein verlängerter Carboxylterminus, dessen Funktion in der Bestimmung der intrazellulären Kalziumkonzentration und der Modulation der Kanalaktivität liegt. Durch Erhöhung der  $Ca^{2+}$ -Konzentration in der Zelle im Zuge einer Depolarisation werden die Kanäle durch Erniedrigung des Schwellenpotentials der spannungsabhängigen Komponenten aktiviert (Köhler et al.,1996). Unterschieden werden  $K_{Ca}$ -Kanäle mit geringer Leitfähigkeit (10-14 pS) mit

langsamer Aktivierung (10-1000 ms) und Schließung nach wenigen Sekunden (Rudy,1988; Köhler et al.,1996),  $K_{Ca}$ -Kanäle mit hoher Leitfähigkeit (150-250 pS) mit schneller Aktivierung (1-2 ms) und fast ebenso schneller Inaktivierung (ca. 10 ms) (Rudy,1988; Butler et al.,1993) und  $K_{Ca}$ -Kanäle mit mittlerer Leitfähigkeit (ca. 18-50 pS) (Ramboer and Boeynaems, 1989).

### **1.3.3 Einwärtsgleichrichtende Kaliumkanäle (Kir(inward rectifying))**

Sie können als "funktionelles Fragment" des spannungsabhängigen  $K^+$ -Kanals gesehen werden, wobei hier die H5-Domäne nur die zwei Transmembransegmente M1 und M2, die den Segmenten S5 und S6 des Kv-Kanals entsprechen, miteinander verbindet (Kubo et al.,1993, vgl. Abb.1). Der Kir-Kanal spielt eine wichtige Rolle bei der Erregbarkeit von Zellen und bei der Stabilisierung des Ruhepotentials (Doupnik et al.,1995). Je nach der Art des Gewebes liegt das Ruhepotential der Zelle bei -80 bis -30 mV (Hille,1992b), wobei das Nernstsche Gleichgewichtspotential für Kalium bei ca. -90 mV liegt. Daraus ergibt sich, dass bei den Gewebearten mit hohem Ruhepotential die Leitfähigkeit der ruhenden Membran für Kalium weitaus größer als für die anderen Ionen ( $Na^+$  und  $Ca^{2+}$ ) ist. Dabei bildet das Skelettmuskelruhepotential  $E_{Cl} = -80$  mV, welches wesentlich durch  $Cl^-$  bestimmt ist, eine Ausnahme. Wie der Name des Kir-Kanals schon sagt können die Ionen sehr viel leichter ins Zellinnere übertreten als aus der Zelle heraus in den Extrazellularraum. Es zeigt sich also ein physiologischer  $K^+$ -Einwärtsstrom, der jedoch nur in der Nähe des Ruhemembranpotentials funktioniert. Der Auswärtsstrom kommt ab einem Potential von ca. -70 mV durch Verschluss von innen durch positive Substanzen ( $Mg^{2+}$ , Polyamine) zum Erliegen (Doupnik et al.,1995). Eine besondere Art stellt der G-protein-linked Inward Rectifying  $K^+$ -channel (GIRK) dar (Dascal et al.,1993). Dieser G-Protein gekoppelte Kir-Kanaltyp wird am Herz über einen muscarinischen Acetylcholinrezeptor (Typ M2) durch den Parasympathikus gesteuert (Pfaffinger et al.,1985;Yatani et al.,1990). Durch Aktivierung wird die Membran hyperpolarisiert und die Zeit bis die Herzschrümmacherzelle das Schwellenpotential, welches zur Auslösung eines

Aktionspotentials überschritten werden muss, erreicht, wird verlängert und folglich nimmt die Herzfrequenz ab. Der im Kapitel 1.4 beschriebene ATP-abhängige  $K^+$ -Kanal ist ebenfalls ein besonderer Typ der Kir-Kanäle.

#### **1.3.4 Tandem-Kaliumkanäle ( $K_{2P}$ )**

Zur Bildung eines  $K_{2P}$ -Kanals sind nur zwei Untereinheiten nötig, da bei ihnen zwei Kirs auf einer Polypeptidkette liegen (Ketchum et al.,1995). Den ersten  $K_{2P}$ -Kanal "Two P-region-containing Outwardly rectifying  $K^+$  channel" (TOK1) entdeckte man in Hefezellen. Darüber hinaus wurden acht weitere  $K_{2P}$ -Kanäle, KCNK1-8, bei Säugetieren gefunden, die in verschiedenen Gewebearten vorkommen und einen kontinuierlichen, spannungsunabhängigen, schwach gleichrichtenden Kaliumstrom bedingen (Lesage et al.,1996; Fink et al.,1996; Duprat et al.,1997;Fink et al.,1998; Reyer et al.,1998; Chavez et al.,1999; Salinas et al.,1999). Sie scheinen eine wichtige Rolle bei der Erhaltung des Membranpotentials nahe dem  $K^+$ -Gleichgewichtspotential zu spielen. KCNK2 (TREK-1) und KCNK4 (TRAAK) sind mechanosensitive Kanäle und werden durch Arachidonsäure und andere ungesättigte Fettsäuren moduliert (Maingret et al.,1999). KCNK1 (TWIK-1) und KCNK6 (TWIK-2) sind schwach einwärtsgleichrichtende Kaliumkanäle, die durch Proteinkinase C und Ansäuerung der Zelle gehemmt werden können (Lesage et al.,1996; Chavez et al.,1999). KCNK3 (TASK-1) und KCNK5 (TASK-2) reagieren auf extrazelluläre pH-Wertveränderungen (Duprat et al.,1997; Reyes et al.,1998). TASK-3 wird ausschließlich im Gehirn exprimiert (Rajan et al.,2000). Es wird vermutet, dass die  $K_{2P}$ -Kanäle unter allen  $K^+$ -Kanälen die am Häufigsten vorkommenden sind.

#### **1.4 ATP-abhängige Kaliumkanäle**

Entdeckt wurden ATP-abhängige Kaliumkanäle ( $K_{ATP}$ -Kanäle) im Herzmuskel (Noma,1983; Trube and Hescheler,1984). Einige Zeit später stellte sich heraus, dass dieser  $K^+$ -Kanaltyp, der eine Sonderform der Kir-Kanäle darstellt, auch in

vielen anderen Gewebearten, wie z.B. im Pankreas (Ashcroft et al.,1984; Cook and Hales,1984; Rorsman und Trube,1985), in Skelett- (Spruce et al.,1985) und glatter Muskulatur (Standen et al.,1989), im Gehirn (Ashcroft et al.,1988; Amoroso et al.,1990; Bernardi et al.,1993) in Neuronen, in Hypocampusneuronen (Fujimura et al., 1997), in Gliazellen (Zawar et al.,1999), in dorsalen Vagusneuronen (Trapp und Ballanyi,1995), in Hypothalamusneuronen (Ashford et al.,1990a,b; Dunn-Meynell et al.,1997), in der Substantia nigra (Liss et al.,1999) und im Nierenepithel (Quast,1996) vertreten ist. Typisch für den  $K_{ATP}$ -Kanal ist, dass er durch intrazelluläres ATP geschlossen und durch MgATP geöffnet wird (Noma,1983; Ashcroft,1988; Ashcroft and Ashcroft,1990b). So gelingt es der Zelle ihren metabolischen Zustand an die Zellmembranaktivität zu koppeln, d.h. ist der Energiezustand der Zelle gut und folglich der Quotient (ATP/ADP) hoch, schließen sich die  $K_{ATP}$ -Kanäle und die Zelle wird aufgrund der Depolarisation leichter erregbar. Im anderen Fall, d.h. bei schlechtem Energiezustand und niedrigem Quotienten (ATP/ADP) öffnen sich die  $K_{ATP}$ -Kanäle und die Zelle wird hyperpolarisiert. Auch andere Magnesiumnukleosiddiphosphate, wie MgNDP, MgGDP und MgUDP wechselwirken mit den  $K_{ATP}$ -Kanälen und führen zu ihrer Öffnung.

Es existieren, laut einem allosterischen Modell, drei Kanalzustände in Abwesenheit eines Liganden. Das ist zum einen ein langlebiger geschlossener Zustand ( $C_0$ ), ein offener Zustand (O), der für kurze Zeit in die dritte Zustandsform, einen vorübergehend geschlossenen Zustand ( $C_1$ ) übergehen kann (Kakei and Noma,1984). ATP und Sulfonylharnstoffe binden bevorzugt an  $C_0$ . Dieser Zustand wird dadurch stabilisiert, und die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals verringert sich (Gillis et al.,1989). MgADP und das Antihypertensivum Diazoxid binden vorzugsweise an O und führen so zu seiner Aktivierung (Kozlowski et al.,1989). Folglich wird durch den Liganden immer der Zustand stabilisiert an den er selbst am Besten bindet, d.h. zu dem er die höchste Affinität hat. Eine Modulation der Kanäle erfolgt auch durch das Phospholipid  $PIP_2$  (Baukrowitz et al.,1998), durch G-Proteine (Sánchez et al.,1998) oder durch Oleyl-CoA (Lui et al.,2001). Der  $K_{ATP}$ -Kanal stellt den therapeutischen Angriffspunkt einer Vielzahl von Diabetes mellitus Typ2- und

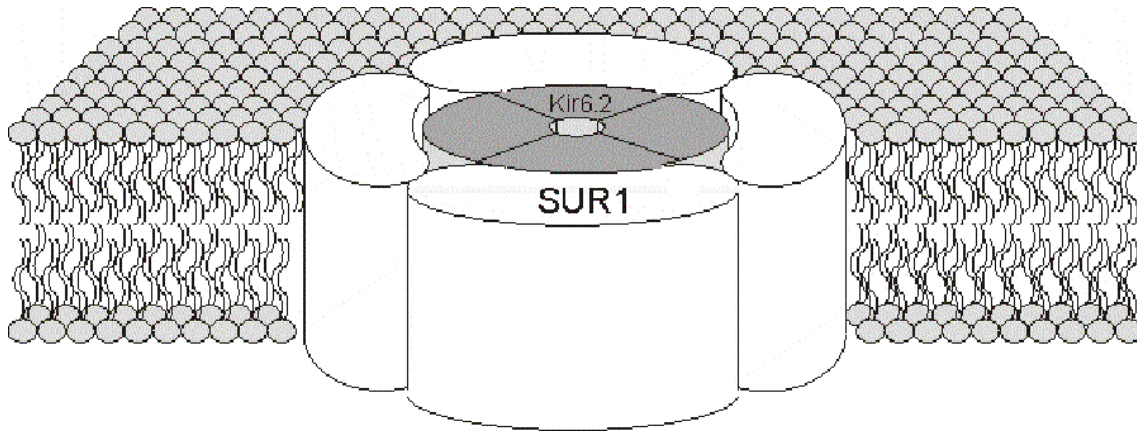
Hypertoniemedikamenten dar. Orale Antidiabetika (z.B. Sulfonylharnstoffe wie Tolbutamid oder Glibenclamid) führen zum Verschluss des Kanals und fördern so die Insulinsekretion der  $\beta$ -Zellen der Bauchspeicheldrüse (Sturgess et al.,1985; Trube et al.,1986; Dunne et al.,1987). Antihypertensiva (z.B.  $K^+$ -Kanalöffner) führen durch Kanalöffnung in der glatten Gefäßmuskulatur zu einer starken Vasodilatation und der Blutdruck fällt ab. Im Gegensatz dazu verhindern Kaliumkanalöffner (KCOs, z.B. Diazoxid) die Insulinsekretion durch Öffnen der  $K_{ATP}$ -Kanälen (Trube et al.,1986; Dunne et al.,1987; Sturgess et al.,1988). Im Tierexperiment zeigte sich, dass  $K^+$ -Kanalöffner das Myokard vor Ischämie schützen können (Szewczyk and Marbán,1999).

#### **1.4.1 Der Aufbau von $K_{ATP}$ –Kanälen**

$K_{ATP}$ -Kanäle sind Heterooktamere, die sich aus zwei Typen von Untereinheiten zusammensetzen. Diese sind die Untereinheiten des Kir-Kanals Kir6.x, welche die  $\alpha$ -Untereinheit bildet, und die  $\beta$ -Untereinheit, welche dem Sulfonylharnstoffrezeptor SURx entspricht.  $K_{ATP}$ -Kanäle sind demnach aus  $\alpha$ - und  $\beta$ - Untereinheiten zusammengesetzte Kanäle (Aguilar-Braxen et al.,1995; Inagaki et al.,1995a; Sakura et al.,1995; Clement IV et al.,1997). Mit einer Stöchiometrie von 4:4, d.h. vier  $\alpha$ - und vier  $\beta$ - Untereinheiten wird ein  $K_{ATP}$ -Kanal aufgebaut  $(Kir6.x/SURx)_4$ , dessen relative Molekülmasse ca. 950 kDa beträgt (Clement IV et al.,1997). Es gibt zwei Subtypen der Kir6.x-Familie (Kir6.1 und Kir6.2) und zwei SURx-typen (SUR1, SUR2). Aus dem SUR2-Gen entstehen durch alternatives Spleißen die physiologisch wichtigen Isoformen SUR2A (Inagaki et al.,1996) und SUR2B (Isomoto et al.,1996).

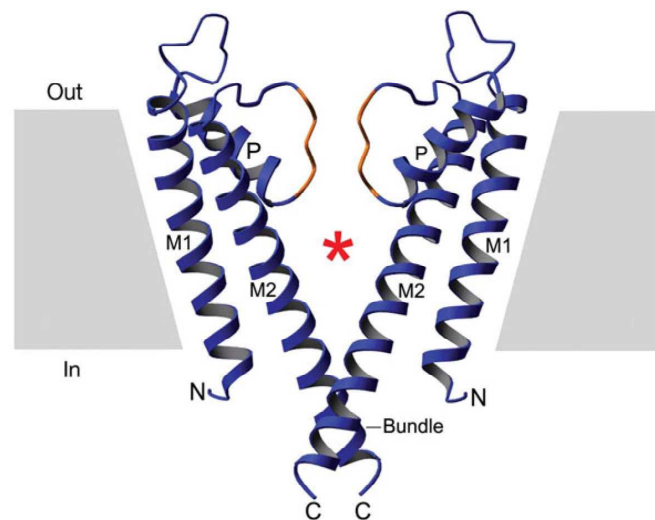
Je nach Gewebeart kann der Kir6.1 (Inagaki et al.,1995b) oder Kir6.2 (Sakura et al.,1995; Inagaki et al.,1995a) kombiniert sein. In der insulinproduzierenden -Zelle des Pankreas werden  $K_{ATP}$ -Kanäle der Kombination Kir6.2/SUR1 exprimiert. Der alleinige Einbau der Kir6.x Untereinheiten in die Membran wird durch ein Retentionsmotiv verhindert (Zerangue et al.,1999). Die Assoziation mit SUR1 konnte in Experimenten mit Kir6.2 spezifischen Antikörpern (Graham

et al.,1977) und dem Photoradioliganden  $^{125}\text{I}$ -Azido-GBC (Schwanstecher et al.,1994b; Clement IV et al.,1997) nachgewiesen werden (vgl. Abb1).



**Abb.2 Modell des K<sub>ATP</sub>-Kanals in der  $\beta$ -Zelle des Pankreas.**

Erstaunlich war die 1997 erworbene Kenntnis, dass Kir6.2 $\Delta$ C36-Kanäle (d.h. Kir-Kanäle bei denen die 36 C-terminalen Aminosäuren entfernt waren) trotzdem in der Lage waren K<sup>+</sup>-Ströme bei alleiniger Expression zu erzeugen (Tucker et al.,1997). Die Ursache liegt darin, dass bei diesem Rumpfkanal das Retentionsmotiv R-K-R mit abgeschnitten wurde. Das Gleiche gilt auch für Kir $\Delta$ C26. Anhand dieser Tatsache versucht die Forschung durch verschiedene Experimente neues Wissen über den Kanal und dessen Funktionsweise zu gewinnen. Es konnte gezeigt werden, dass der Block der Kir6.2/SUR-Kanäle durch ATP an der Bindung von ATP an Kir6.2 liegt (Tucker et al.,1997b).



**Abb.3 KcsA Kanal von *Streptomyces lividans*.**

Gezeigt werden zwei der vier Untereinheiten. Jede Untereinheit besteht aus einer äußeren Helix (M1), der H5-Domäne (P) und einer inneren Helix (M2). Nach Eintritt in das Zellinnere formen die Helices ein Bündel, welches das physikalische „Gate“ des Kanals bildet. Der Stern zeigt den Zugang zur Pore (Doyle et al., 1998).

#### 1.4.2 Die $\alpha$ -Untereinheit Kir6.x des $K_{ATP}$ -Kanals

Die  $\alpha$ -Untereinheit Kir6.x gehört zur Superfamilie der bereits in Kapitel 1.3.3 beschriebenen Kir-Kanäle und hat eine Molekülmasse von ca. 45 kDa. Sie bildet die porenbildende Untereinheit des  $K^+$ -Kanals, der die Membranpassage für Kaliumionen ermöglicht. Kir6.x verfügt über zwei Transmembransegmente (siehe Kapitel 1.3.3) M1 und M2, die durch eine intramembranär gelegene Schleife, eine hoch konservierte H5-Domäne (P-loop), verbunden sind, welche die eigentliche Pore bildet und die  $K^+$ -Selektivität bestimmt. Die H5-Domäne ist dabei in der Nähe der Außenseite des Kanals gelegen und dient als Selektivitätsfilter, bei dem die Carbonylgruppen der Sequenz Gly-Tyr-Gly eine zentrale Rolle spielen. Der unterhalb des Selektivitätsfilters gelegene Vorraum mit einem Durchmesser von ca. 10 Å ist über einen wassergefüllten Tunnel aus hydrophoben Aminosäuren mit dem Zellinneren verbunden. Die Struktur der Pore wurde an dem verwandten KcsA-Kanal des Bakteriums *Streptomyces lividans* untersucht (Doyle et al., 1998, vgl. Abb.3). Der KcsA-Kanal ist ein Tetramer aus vier identischen Untereinheiten, die sich um die zentrale Pore

gruppieren. Vier M2-Helices sind dabei trichterförmig konvergierend angeordnet und bilden so ein Tor, welches sich öffnen und wieder schließen kann. Im Gegensatz zum KcsA-Kanal zeigen Kir6.1 und Kir6.2, welche in ihrer Aminosäuresequenz zu 70% übereinstimmen (Sakura et al.,1995; Inagaki et al.,1997), einen Selektivitätsfilter mit der Sequenz Gly-Phe-Gly (Inagaki et al.,1995a). Allerdings gibt es trotz der großen Strukturähnlichkeit des Kir-Kanals mit dem KcsA-Kanal auch einige Unterschiede (Reimann and Ashcroft,1999). Der KcsA-Kanal kann somit nicht zu der genaueren Beschreibung bzw. Vorstellung der Kir6.x Struktur herangezogen werden.

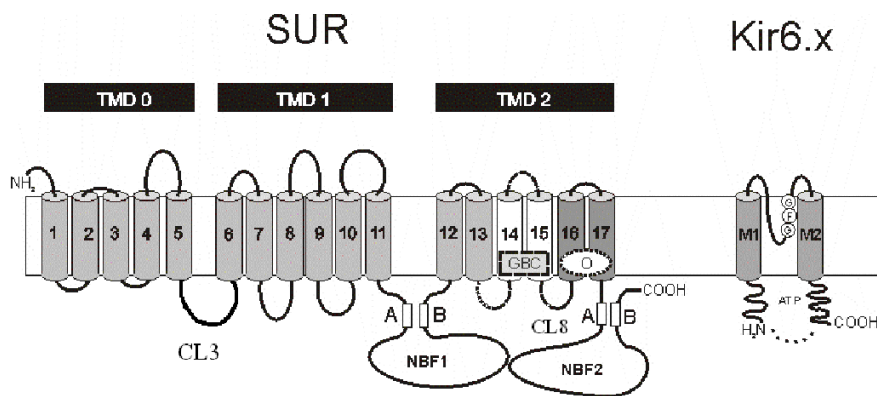
Das humane Gen für Kir6.1 (KCNJ8) wurde auf dem Chromosom 12, Position 12p11.23 lokalisiert. Es liegt somit nahe bei dem Gen für SUR2. Es ist etwa 9.7 kb lang und enthält drei Exons. Das bei der Translation dieses Gens entstehende Protein aus 424 Aminosäuren hat eine Molekülmasse von ca 38 kDa und zeigt eine 98 % Homologie zu murinem Kir6.1. Kir6.1 kann mit der  $\beta$ -Untereinheit SUR1 (Ämmälä et al.,1996) und SUR2B (Aguilar-Bryan et al.,1998) funktionelle Kanäle ausbilden. Auch die Kombination von Kir6.1 und SUR2A ergibt funktionelle Kanäle (Liu et al.,2001b; Lange et al. unveröffentlicht (AG Quast)). Kir6.1 enthaltende Kanäle sind nur schwach ATP empfindlich ( $K_i$ -mM) und haben eine unitäre Leitfähigkeit von ca. 30 pS.

Das humane Gen von Kir6.2, oder BIR ( $\beta$ -cell inward rectifier) liegt auf dem kurzen Arm des Chromosoms 11. Es ist ein aus 390 Aminosäuren bestehendes, intronloses Gen, das in der Nähe von SUR1 liegt und eine relative Molekülmasse von 43.5 kDa besitzt. Kir6.2 kann mit allen SUR-Isoformen funktionelle Kanäle ausbilden (Inagaki et al.,1996; Isomoto et al.,1996). Kanäle, die Kir6.2 enthalten sind sehr ATP-sensitiv ( $K_i$ -10-30  $\mu$ M) und verfügen über eine unitäre Leitfähigkeit von ca. 80 pS (140 mM  $K^+$ ) (Seino und Miki,2003). Bei Kir6.2-enthaltenden Kanälen wird die ATP-Inhibition durch die Bindung von ATP an Kir6.2, bei Aktivierung des Kanals durch die Wechselwirkung von MgADP mit der SUR-Untereinheit, hervorgerufen (Aguilar-Bryan und Bryan,1999; Proks et al.,2002; Seino und Miki,2003; Gribble und Reimann,2003).



### 1.4.3 Die $\beta$ -Untereinheit SUR des $K_{ATP}$ -Kanals

Die  $\beta$ -Untereinheit stellt der Sulfonylharnstoffrezeptor (SUR) dar, welcher für das komplexe Regulationsverhalten der  $K^+$ -Kanäle verantwortlich ist. Die Untereinheit wurde zum ersten mal aus der pankreatischen  $\beta$ -Zelle kloniert (Aguilar-Bryan et al.,1995). Es existieren mindestens zwei Subtypen der  $\beta$ -Untereinheit SUR des  $K_{ATP}$ -Kanals, nämlich SUR1 und SUR2 (Inagaki et al.,1996; Isomoto et al.,1996), deren Gene auf dem Chromosomen 11 (p15.1) bzw. Chromosom 12 (11.23) liegen (Chutkow et al.,1996). Das Exon 38 des SUR2 kann durch alternatives Spleißen bei der DNA-Transkription die Variante SUR2A (Exon 38a) und die Variante SUR2B (Exon 38b) (Inagaki et al.,1996; Isomoto et al.,1996) hervorbringen. Dabei unterscheidet sich SUR2A nur in den 42 C-terminalen Aminosäuren von SUR2B (Inagaki et al.,1996; Isomoto et al.,1996). Für SUR1, welcher aus 1581 Aminosäuren aufgebaut ist und die relative Molekülmasse von ca. 176 kDa besitzt, kodieren 39 Exons. Die 38 Exons des SUR2-Gens bestehen aus 1549 Aminosäuren (Bryan und Aguilar-Bryan,1999). Durch Hydropathie-Analysen (Tusnády et al.,1997) wurde die korrekte Struktur des SUR vorgeschlagen und durch Andere später bestätigt. SUR1 weist einen extrazellulär gelegenen N-Terminus auf. Darauf folgen fünf Transmembranhelices (TM), welche die Transmembrandomäne 0 (TMD0) bilden (siehe Abb.4). Diese TMD0 ist über eine kurze intrazellulär gelegene Schleife mit der aus sechs TM bestehenden TMD1 verbunden. Auf die TMD1 folgt eine große intrazellulär gelegene Domäne mit ca. 40 kDa, welche die Nukleotid-Bindungs-Falte 1 (NBF1) enthält. Anschließend kommt die aus sechs TM bestehende TMD2. Zwischen dem intrazellulär gelegenen C-Terminus der NBF1 und TMD2 befindet sich eine ca. 38 kDa große Domäne, welche die NBF2 enthält (Tusnády et al.,1997).



**Abb.4 Struktur der Bestandteile des K<sub>ATP</sub>-Kanals.**

SUR= Sulfonylharnstoffrezeptor.  
TMD= Transmembrandomäne.  
NBF= Nukleotidbindungstasche.

Kir6.x = Einwärtsgerichteter K<sup>+</sup>-Kanal 6.x.  
GFG = Glycin-Phenylalanin-Glycin.  
A,B = Walkerregionen für die Bindung von Nukleotiden.

M = Transmembranbereich  
CL3 = zytosolische Schleife 3 (Bindungsstelle B der Sulfonylharnstoffe und Glinide)  
CL8 = zytosolische Schleife 8 (Bindungsstelle A der Sulfonylharnstoffe und Glinide)

In diesen NBF sind hoch konservierte Walker A- und B- Motive enthalten, die ATP binden können. Jede NBF enthält ein Walker A-Motiv, das die Aminosäuresequenz (As-sequenz) Gly-X-X-Gly-X-Gly-Lys-Ser/Thr- umfasst, wobei X eine beliebige Aminosäure (As) darstellt, sowie ein Walker B-Motiv mit der As-sequenz -Y-Y-Y-Y-Asp-, wobei Y eine hydrophobe As darstellt (Walker et al.,1982). Die As Lys im Walker A-Motiv ist wichtig für die Koordination der negativen Ladung am  $\gamma$ -Phosphat des ATPs. Beim Walker B-Motiv koordiniert die As Asp das Mg<sup>2+</sup> im Mg<sup>2+</sup>-Nukleotidkomplex. Man nimmt somit an, dass das Walker A-Motiv mit PO<sup>4-</sup>-Ionen, das Walker B-Motiv mit Mg<sup>2+</sup>-Ionen interagiert (Hilgenfeld,1995). Die beiden Motive sind in NBF1 über die Linkersequenz -Leu-Ser-Gly-Gly-Gln- bei NBF2 über -Phe-Ser-Gln-Gly-Gln- miteinander verbunden. Beim SUR2 enthält die NBF2 eine veränderte Linkersequenz, nämlich -Phe-Ser-Val-Gly-Gln-. Anhand dieser Struktur lässt sich SUR den ATP-Binding-Cassette-Proteinen (ABC-proteins) zuordnen (Altschul und Lipman,1990), zu denen auch der cystic-fibrosis-transmembrane-regulator (CFTR), der canalicular multispecific-organic-anion-transporter (cMOAT), das

multi-drug-resistance-protein (MRP bzw MDR-Protein) und das yeast-cadmium-factor-protein (YCF1) gehören. Andere Proteine, die ebenfalls zu dieser Gruppe von Proteinen gehören sind z.B. Malk, Hsl, OppD, HlyB und viele andere mehr. Charakteristisch ist für die ABC-Proteine ihre ATP-ase Aktivität, an die in vielen Fällen ein Transportvorgang gekoppelt ist. Es wurde auch eine schwache ATP-ase Aktivität für die SUR-Subtypen nachgewiesen, welche v.a. in der NBF2 lokalisiert ist (Bienengraeber et al.,2000; Matsuo et al.,2000) und die Kanalaktivitätssteuerung kontrolliert (Zingman et al.,2001).

Radioligandenmessungen haben gezeigt, dass die Bindungsstellen für Sulfonylharnstoffe und KCO auf SUR liegen (genaue Lokalisation: vgl. Abb.4 und Kapitel 1.7.1).

Generell kann man sagen, dass SUR1 eine höhere Affinität als die SUR2-Isoformen zu Sulfonylharnstoffen und Gliniden hat; SUR2-Isoformen jedoch eine höhere Affinität zu den  $K_{ATP}$ -Kanal-Öffnern besitzen (Aquilar-Bryan und Bryan,1999; Seino und Miki,2003). Die Sensitivität der Sulfonylharnstoffe und der Glinide, sowie der  $K_{ATP}$ -Kanal-Öffner ist an den verschiedenen  $K_{ATP}$ -Kanälen unterschiedlich. Diazoxid z.B. beeinflusst bei bestimmter Konzentration gleichzeitig die  $K_{ATP}$ -Kanäle der  $\beta$ -Zellen als auch die der Gefäßmyozyten (Aquilar-Bryan und Bryan,1999). Es wurden auch Öffner mit exzellenter SUR1-Selektivität synthetisiert (Nielson et al.,2002 ).

#### **1.4.4 Die gewebespezifische Verteilung der $K_{ATP}$ -Kanaluntereinheit**

Durch elektrophysiologische Messungen fand man heraus, dass Kir6.1 und Kir6.2 sich mit den unterschiedlichen Subtypen des SUR zu ganz verschiedenen Kanalstrukturen koppeln. Dies ist die Grundlage der Gewebediversität der  $K_{ATP}$ -Kanäle und erklärt zugleich deren verschiedene Eigenschaften in den einzelnen Geweben. Mischkanäle der Form  $(Kir6.1)_x$ ,  $(Kir6.2)_{4-x}$  und  $(SUR2)_4$  wurden für die SUR2-Subtypen nachgewiesen (Cui et al.,2001; Pountney et al.,2001).

Aufgrund der Funktion und der Geschichte der Entdeckung beginnt die Auflistung der verschiedenen Kanäle in der Tabelle 1 mit Kir6.2/SUR1 und es folgen dann Kir6.2/SUR2A, Kir6.1/SUR2B und zum Schluss Kir6.2/SUR2B.

Kanaltyp	GBC Ki (nM)	Öffner	Vorkommen	Referenzen
Kir6.2/SUR1	~1 nM	Diazoxid Pinacidil	$\beta$ -Zellen, Pankreas, Neurone	Inagaki et al., 1995a; Gribble et al., 1997a; Sakura et al., 1995
Kir6.2/SUR2A	26 nM	Cromakalim Pinacidil Nicorandil	Herz- und Skelettmuskel	Russ et al., 2001; Inagaki et al., 1996; Okuyama et al., 1998
Kir6.1/SUR2B	42 nM	Pinacidil Nicorandil	Gefäßmuskulatur	Russ et al., 1999; Yamada et al., 1997
Kir6.2/SUR2B	27 nM	Diazoxid Pinacidil	glatte Muskulatur	Russ et al., 2001; Isomoto et al., 1996

**Tab.1 Kombinationen der Untereinheiten und deren Vorkommen.**  
Die GBC-Konzentration wurde in inside-out patches (22 °C) gemessen.

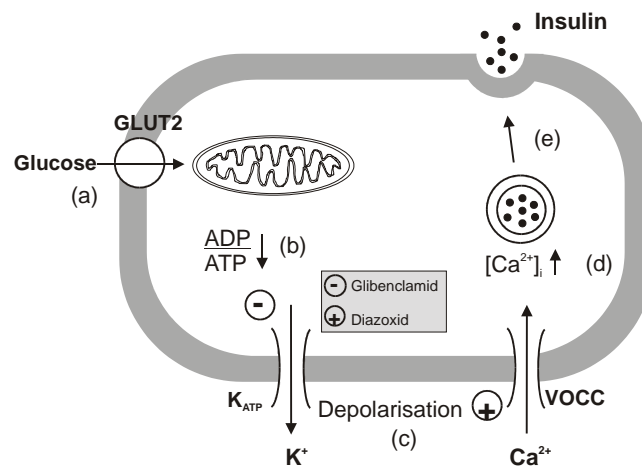
#### 1.4.5 Die Regulation des $K_{ATP}$ -Kanals

Wie bereits erwähnt (Kapitel 1.4.1), können aus Kir6.2 $\Delta$ C ohne SUR gebildete Kanäle durch ATP in ihrer Aktivität gehemmt werden, während MgATP keinen Einfluss hatte (Tucker et al., 1997). Die ATP-Sensitivität ist allerdings bei Kir6.2 alleine geringer, nämlich Ki ~100  $\mu$ M, als bei der Koexpression mit SUR1 mit Ki ~10  $\mu$ M. Der direkten Beweis für die Existenz einer ATP-Bindungsstelle an Kir6.2 wurde durch Versuche mit speziell markiertem ATP ( $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-}8\text{-azido-ATP}$ ) geliefert (Tanabe et al., 1999). Die Untereinheit SUR besitzt je eine Nukleotid-Bindungsstelle in NBF1 und NBF2 (Ueda et al., 1997; Matsuo et al., 2000). Ueda versuchte sich die Eigenschaften des  $\beta$ -Zell- $K_{ATP}$ -Kanals anhand eines Modells zu erklären, bei dem ATP an die NBF1 und MgADP an die NBF2 bindet, wenn der [ATP/ADP]-Quotient klein ist, d.h. bei niedrigem bzw. schlechtem Energiezustand der  $\beta$ -Zelle (Ueda et al., 1999). In diesem

Zustand bindet Kir6.2 das ATP mit niedriger Affinität und der  $K_{ATP}$ -Kanal bleibt offen. Steigt nun aber der [ATP/ADP]-Quotient in der pankreatischen  $\beta$ -Zelle an (Energiezustand der Zelle wird immer besser), kommt es zu einer Dissoziation von MgADP von NBF2 und anschließend zu einer reduzierten ATP-Bindung an NBF1. Beide Mechanismen resultieren aus der Verminderung der MgADP-Konzentration. Es kommt zu einer Konformationsänderung von SUR1, die zu einer Affinitätserhöhung von Kir6.2 für ATP führt und den Kanal schließen lässt. Die Nukleotidbindungseigenschaften der SUR-Subtypen sind sehr unterschiedlich, z.B. zeigt SUR1 eine starke  $Mg^{2+}$ -Abhängigkeit bei der MgATP-Bindung an NBF2 (im Gegensatz zu SUR2). Darüber hinaus ist die ATP-Affinität an NBF1 bei SUR1 deutlich höher als bei SUR2. Des Weiteren ist die ADP-Affinität an NBF2 von SUR2B gegenüber SUR2A deutlich erhöht (Matsuo et al., 2000).

Negativ geladene Lipide, z.B. langkettiges-Acyl-Coenzym A (LC-Acyl-CoA) und L- $\alpha$ -Phosphatidyl-Inositol-4,5-Bisphosphat ( $PIP_2$ ), bestimmen die Aktivität der  $K_{ATP}$ -Kanäle ganz wesentlich. Die aus Fettsäuren synthetisierten LC-Acyl-CoA-Ester dienen z.B. dem Herzen als Hauptstoffwechselsubstrate. LC-Acyl-CoA aktiviert deutlich die  $K_{ATP}$ -Kanäle im Herzen (Liu et al., 2001), die in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas lokalisierten  $K_{ATP}$ -Kanäle nur sehr gering (Bränström et al., 1997). Da die LC-Acyl-CoA an der Kir-Untereinheit ansetzen (Bränström et al., 1998; Gribble et al., 1998a) und diese in beiden Fällen Kir6.2 ist, kann davon ausgegangen werden, dass der unterschiedliche SUR-Subtyp den Effekt der LC-Acyl-CoA auf den Kir6.2 moduliert.  $PIP_2$  ist ebenfalls an der  $K_{ATP}$ -Kanalmodulation beteiligt, indem es die ATP-Sensitivität erniedrigt (Baukrowitz et al., 1998; Shyng und Nichols, 1998; Baukrowitz und Fakler, 2000) und gleichzeitig die Offenwahrscheinlichkeit erhöht (Hilgemann und Ball, 1996; (Fan & Makielski 2650/id). Hinweise bestehen bezüglich der Beeinflussung der  $K_{ATP}$ -Kanal-Aktivität auch durch Endosulfine (Heron et al., 1998), G-Proteine (Sánchez et al., 1998) und durch Phosphorylierung des  $K_{ATP}$ -Kanals durch Proteinkinase A (Béguin et al., 1999). Über die Phosphorylierung des  $K_{ATP}$ -Kanals durch die Proteinkinase A gibt es neue wichtige Erkenntnisse der Arbeitsgruppe von Tinker (Quinn, Giblin, Tinker et al., Circ. Res., 2004).

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



**Abb.5 Mechanismus der intrazellulären Signaltransduktion.**

Modell der Insulinfreisetzung aus der  $\beta$ -Zelle des Pankreas (Konsensusmodell nach Cook und Hales, 1984). Aus Quast et al., Dtsch. Med. Wochenschr., 2001. In der  $\beta$ -Zelle wird das Ruhemembranpotential durch die Aktivität der  $K_{ATP}$ -Kanäle bestimmt und liegt bei  $\sim -70$  mV. In diesem Zustand der Zelle sind die spannungsgesteuerten  $Ca^{2+}$ -Kanäle, die L-VOCC (voltage operated calcium channel) noch geschlossen. Der postprandiale Blutglucoseanstieg führt, nach der Aufnahme durch den GLUT2-Transporter (a), zu einer gesteigerten intrazellulären ATP-Synthese aus ADP, wobei das ADP/ATP-Verhältnis in Richtung ATP verschoben wird (b). Es folgt dadurch die Blockierung des  $K_{ATP}$ -Kanals und die Zelle depolarisiert (c) und die spannungsabhängigen  $Ca^{2+}$ -Kanäle öffnen (d). Es resultiert ein  $Ca^{2+}$ -Einstrom in die Zelle und die Exozytose der Insulinvesikel wird ausgelöst (e).

Infolge der ATP- bzw. ADP-Empfindlichkeit der  $K_{ATP}$ -Kanäle stellen diese Kanäle eine Verbindung zwischen dem metabolischen Zustand der Zelle und dem Membranpotential her. Die  $K_{ATP}$ -Kanäle der  $\beta$ -Zelle des Pankreas regeln so die Insulinsekretion (siehe Abb.5).

Befindet sich die Zelle in einem Energiemangelzustand, dann werden die intrazellulären ATP-Reserven verbraucht und das ATP/ADP-Verhältnis wird in Richtung ADP verschoben. Nun öffnen die  $K_{ATP}$ -Kanäle. Das Ruhemembranpotential der Zelle wird somit in Richtung des Nernstschen Gleichgewichtspotential für Kalium (ca.  $-90$  mV) getrieben, wobei die Zelle hyperpolarisiert wird und sich das Potential folglich weiter von dem Schwellenpotential, welches für die Aktivierung der spannungsabhängigen Ionenkanäle notwendig ist, entfernt. Die Zelle verliert potentiell an Erregbarkeit und spart so Energie ein. Durch diesen Mechanismus wird z.B. das Myokard

vor hypoxischen Schäden geschützt (die Kanalöffnung unter Hypoxie und wirkt somit negativ inotrop), ebenso werden Neurone (Heurteaux et al.,1995; Blondeau et al.,2000) und Skelettmuskulatur vor Ischämie bzw. Hypoxie geschützt. Im Gehirn beispielsweise sind  $K_{ATP}$ -Kanäle in diverse Kontrollmechanismen der Homöostase von Glukose und bei Ischämiezuständen integriert (Seino und Miki,2003). Jedoch gelingt es den Sulfonylharnstoffen bei normalen therapeutischen Blutkonzentrationen nicht, die Blut-Hirn-Schranke in dem Maß zu überqueren, dass sie die  $K_{ATP}$ -Kanäle merklich beeinflussen können (Hasselblatt,1996).

$K_{ATP}$ -Kanäle regulieren durch ihre Aktivität den Gefäßtonus in der glatten Muskel entscheidend mit, da die  $K_{ATP}$ -Kanalöffnung zur Vasorelaxation führt (Edwards und Weston,1993; Quast,1993). Sie spielen demnach eine wichtige Rolle bei der Regulation des Blutdrucks (Edwards und Weston,1993; Nelson und Quayle,1995; Quayle et al.,1997). Diese Tatsache macht sich die Pharmakologie durch die Anwendung verschiedener Kaliumkanalöffner bei der refraktären Hypertonustherapie zunutze. KCOs sind Antihypertensiva der 3.Wahl. Minoxidil und Diazoxid werden bei hypertensiver Krise etc. eingesetzt.  $K_{ATP}$ -Kanäle der juxtaglomerulären Zellen in der Niere, die umgewandelten glatten Muskelzellen entsprechen, sind an der Regulation der Reninsekretion beteiligt, während sie im Tubulusepithel, gekoppelt an die  $Na^+/K^+$ -ATP-ase-Aktivität, eine wichtige Rolle bei der Rückresorption der Ionen besitzen (Quast,1996a). Darüber hinaus enthält die innere Membran der Mitochondrien (ATP-Produktionsstelle bzw. Energielieferant der Zellen) ebenfalls  $K_{ATP}$ -Kanäle (mito $K_{ATP}$ ). Sie wurden in patch-clamp-Studien entdeckt und zeigten Eigenschaften wie die Oberflächen- $K_{ATP}$ -Kanäle, denn auch sie konnten durch ATP inhibiert und durch GBC blockiert werden (Inoue et al.,1991). Diese sollen an der Homöostase des Kaliums mit beteiligt sein, welche das Volumen und den Protonengradienten der Mitochondrien aufrecht erhält (Szewczyk et al.,1997). Diese mito $K_{ATP}$ -Kanäle werden bei kardialer Ischämie durch das von den Kardiomyozyten freigesetzte Adenosin mit Hilfe der Proteinkinase C aktiviert (Cohen et al.,2000) und sind somit wichtige Mediatoren des kardialen Preconditioning, d.h. die Kardiomyozyten werden durch kurze ischämische

Perioden für eine nachfolgende, längerandauernde Hypoxie resistent gemacht (Szewczyk und Marbán,1999). Es gilt auch andere Stoffe, die die Phospholipase C aktivieren (z.B. Acetylcholin) und die so die Öffnung von mitoK<sub>ATP</sub>-Kanälen vermitteln können.

## **1.6 K<sub>ATP</sub>-Kanal-verursachte Krankheiten des Menschen**

### **1.6.1 Persistierende hyperinsulinämische Hypoglykämie (Persistent hyperinsulinaemic hypoglycaemia of infancy=PHHI)**

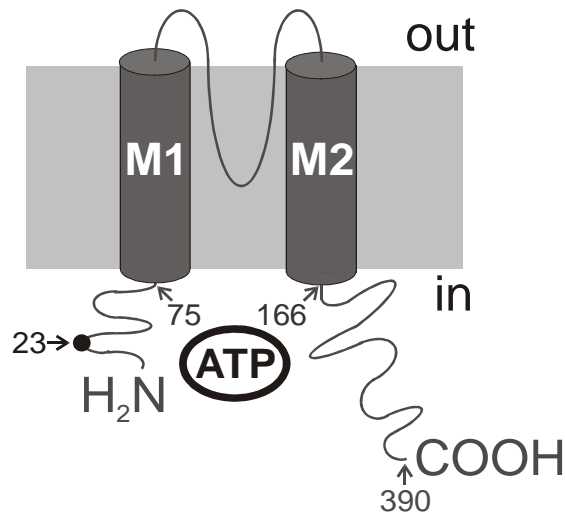
Die Ursache liegt in rezessiv vererbaren Mutationen des K<sub>ATP</sub>-Kanals der  $\beta$ -Zelle der Bauchspeicheldrüse, die den Verlust der Kanalöffnungsfähigkeit durch MgADP bewirken. Das Ruhemembranpotential der  $\beta$ -Zellen liegt bei ca. -35 mV, d.h. die Zellen sind ständig depolarisiert. Durch eine gesteigerte Aktivität der L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanäle wird die Insulinsekretion erhöht und folglich die Blutglukosekonzentration reduziert (Aguilar-Bryan und Bryan,1996). Es wurden familiär vererbte als auch sporadisch auftretende Formen dieser Krankheit nachgewiesen. Die Inzidenz der PHHI in der Normalbevölkerung beträgt etwa 1:30000-1:50000 der Lebendgeborenen (Seino et al.,2003). Die familiär vererbte Form kommt in Nordeuropa nur in ca. 1:50000 Fällen vor, während die Prävalenz in bestimmten Regionen Finnlands weit höher liegt oder sogar in Saudi Arabien bei ca. 1 zu 2700 der Geborenen auftritt (Aguilar-Bryan und Bryan,1999). Die an der PHHI leidenden Patienten zeigen schon kurze Zeit nach der Geburt schwere Hypoglykämien, die durch die konstant erhöhte Insulinfreisetzung (selbst bei niedrigem Blutglukosespiegel) verursacht wird. Durch die Hypoglykämie wird das Gehirn, welches seinen Energiebedarf hauptsächlich über die Glukose deckt, irreversibel geschädigt. Therapie der Wahl ist bis heute die subtotale Pankreatektomie (Cook und Bryan,1998). Dabei werden etwa 95% des Pankreasgewebes entfernt. Das für die Krankheit verantwortliche Gen liegt auf Chromosom 11p14-15.1 (Thomas et al.,1995). Auf diesem Chromosom sind auch die Gene für SUR1, SUR2 und für Kir6.2



lokalisiert. Es gibt viele Mutationen der beiden Untereinheiten, die diese Erkrankung hervorrufen können. Thomas et al.,1995 identifizierte ursprünglich drei genetische Mutationen des SUR1-Gens bei PHHI-Patienten. Am häufigsten sind Mutationen im SUR1-Gen, von denen man heute mehr als 40 verschiedene Arten unterscheiden kann. Die meisten durch SUR1-Genmutationen verursachten PHHI-Erkrankungen zeigen einen autosomal-rezessiven Vererbungsmodus (Aguilar-Bryan und Bryan,1999), jedoch konnte auch eine dominante Form der PHHI-Erkrankung einer Mutation im SUR1-Gen zugeordnet werden (Huopio et al.,2000). Einerseits kann es zur Regulationsbeeinträchtigung der Kanalaktivität kommen, andererseits zu einem vollständigen Kanalaktivitätsverlust. Der totale Aktivitätsverlust des Kanals findet sich bei Wegfall eines Phenylalanins bei SUR1 an der Position 1388 ( $\Delta F1388$ ) und bei einer V187N-Mutation in der finnischen Abstammung (Shyng et al.,1998; {Shyng & Nichols,1998, 1867/id}; Otonkoski et al.,1999). Bei der beeinträchtigten Regulation der Kanalaktivität ist der inhibitorisch Effekt des ATP erhalten (Nichols et al.,1996; Dunne et al.,1997; Kane et al.,1997; Shyng et al.,1998; Huopio et al.,2000). Durch diese Mutation verliert der Kanal die Möglichkeit auf metabolische Veränderungen adäquat reagieren zu können und es kommt somit zu einer dauerhaften Kanalschließung in den pankreatischen  $\beta$ -Zellen (Ashcroft und Gribble,1999; Aguilar-Bryan und Bryan,1999). Etwas weniger häufig sind Mutationen im Kir6.2-Gen identifiziert worden (Thomas et al.,1996; Nestorowicz et al.,1997; Glaser et al.,2000). Bis jetzt sind mehr als 50 Mutationen im SUR1- und Kir6.2-Gen bei Patienten mit einer rezessiven Form bekannt (Seino et al.,2003). Darüber hinaus kennt man nun zwei weitere Genmutationen, die die PHHI-Erkrankung beim Menschen auslösen. Dies ist zum einen das Glukokinasegen (Glaser et al.,1998) und zum anderen das Glutamatdehydrogenasegen (Stanley et al.,1998).

### **1.6.2 Diabetes mellitus Typ2 (Typ2 Diabetes mellitus=NIDDM=Nichtinsulinabhängiger Diabetes mellitus)**

Die Ursachen dieser Erkrankung sind multifaktoriell, d.h. ihre Entstehung ist zum Teil durch angeborene Faktoren und zugleich durch Umwelteinflüsse bedingt. Darüber hinaus spielt auch der individuelle genetische Code eine Rolle für die Erkrankung des jeweiligen Menschen. Entscheidend sind beim Typ 2 Diabetes die herabgesetzte Insulinwirkung, auch Insulinresistenz genannt, sowie die gestörte Insulinsekretion der  $\beta$ -Zellen des Pankreas. Da die Insulinsekretion über die  $K_{ATP}$ -Kanäle an den Blutzuckerspiegel gekoppelt ist, können Mutationen der  $K_{ATP}$ -Kanäle zur Prädisposition für Diabetes mellitus beitragen. Es wurden z.B. im SUR1-Gen drei Polymorphismen beschrieben (Exon 16-3c  $\rightarrow$  t, Exon 18 ACC  $\rightarrow$  ACT und Exon 31 AGA  $\rightarrow$  AGG) die eine Assoziation zum NIDDM zeigen. Bei diesen Mutationen ist die Kanalfunktion jedoch unverändert (Inoue et al.,1996; Hani et al.,1997; Hart et al.,1999; Rissanen et al.,2000; Meirhaeghe et al.,2001). Eine spezielle Form der Mutation in SUR1-Gen (SUR1-E<sup>1506</sup>K), die eine dominant vererbte PHHI-Erkrankung verursacht, zeigte in höherem Lebensalter auch einen Diabetes mellitus zu verursachen (Huopio et al.,2000). Dies dürfte an der fehlenden Möglichkeit der  $\beta$ -Zellen liegen, richtig zu reagieren oder an der zunehmenden Apoptose der  $\beta$ -Zellen (Kassem et al.,2000). Auch im Kir6.2-Gen wurde ein Polymorphismus entdeckt, bei dem im Codon 23 Glutamat (E) durch Lysin (K) ersetzt ist (E<sup>23</sup>K) (Hansen et al.,1997) (siehe Abbildung 6).



**Abb.6 Lage der E<sup>23</sup>K-Mutation in der Nähe des Amino (N)-terminus von Kir6.2.**

Die Häufigkeit unter europäischen Kaukasiern liegt bei Homozygoten bei etwa 13% bei Heterozygoten bei 45% (Sakura et al.,1996; Inoue et al.,1997; Gloyn et al.,2001). Eine deutliche Assoziation besteht zwischen der homozygoten Form des E<sup>23</sup>K-Polymorphismus und dem Auftreten des Diabetes Typ2 (Hani et al.,1998; Gloyn et al.,2001). Die Assoziationswahrscheinlichkeit wurde mit  $p < 4 \cdot 10^{-6}$  bestimmt (Schwanstecher et al.,2002). Der E<sup>23</sup>K-Polymorphismus erhöht die spontane Offenwahrscheinlichkeit und verringert die Sensitivität des Kir6.2 für ATP, sodass sich dieser schlechter durch ATP schließen lässt. Die geringere Empfindlichkeit für das blockierende ATP (Faktor 2.3) erhöht die für die Insulinsekretion notwendige Schwellenkonzentration. Z.B. werden beim E/K-Polymorphismus etwa die 1.5-fache ATP-Konzentration für die adäquate Insulinsekretion, beim K/K-Polymorphismus etwa die 3.1-fache ATP-Konzentration benötigt (Schwanstecher et al.,2002). Zusätzlich erhöht diese Mutation die Empfindlichkeit des Kir6.2/SUR1-Kanals für die öffnende Wirkung von Oleyl-CoA (Riedel et al.,2003).

## 1.7 Die Pharmakologie der ATP-abhängigen Kaliumkanäle

### 1.7.1 $K_{ATP}$ -Kanalblocker

Zu den  $K_{ATP}$ -Kanalblockern gehören die Sulfonylharnstoffe und die Glinide. Sie binden an die SUR-Untereinheit und erhöhen die Insulinausschüttung durch die Schließung des ATP-abhängigen Kaliumkanals in der  $\beta$ -Zellmembran des menschlichen Pankreas (Kir6.2/SUR1) und werden deshalb erfolgreich bei der Behandlung des Typ2 Diabetes mellitus eingesetzt. Durch die Kanalschließung wird die Zelle depolarisiert und so die Insulinsekretion getriggert.  $K_{ATP}$ -Kanäle beeinflussen auch wichtige Funktionen in anderen Gewebearten, wie z.B. im menschlichen Herzen (Kir6.2/SUR2A) und den Blutgefäßen (Kir6.1/SUR2B). SUR1 hat gegenüber den SUR2-Isoformen eine höhere Affinität für Sulfonylharnstoffe und Glinide. Hingegen hat SUR2 eine höhere Affinität für die  $K_{ATP}$ -Kanal-Öffner. Bei den Öffnern stellt Diazoxid in der Weise eine Ausnahme dar, dass es den  $K_{ATP}$ -Kanal in der  $\beta$ -Zellmembran als auch den der Gefäßmyozyten bei gleicher Konzentration beeinflusst. In letzter Zeit wurden auch Öffner mit hoher Selektivität für SUR1 gegenüber SUR2 synthetisiert.

Die klassischen Blocker des  $K_{ATP}$ -Kanals sind die Sulfonylharnstoffe (z.B. das zuerst entwickelte Tolbutamid (1955) oder das später entwickelte Glibenclamid (1969)). Bei den Sulfonylharnstoffen ist der Stickstoff neben der Sulfoxidgruppe sauer mit  $pK_A$ -Werten zwischen 5.3 (Glibenclamid und Tolbutamid) und 6.3 (Glimepirid, 1997). Da die Sulfonylharnstoffe von der zytosolischen Seite an den Rezeptor binden und somit ihre Wirkung erst im Inneren der Zelle zeigen, müssen sie zuerst die lipophile Plasmamembran der  $\beta$ -Zellen passieren. Das Durchqueren der Membran ist jedoch nur im undissoziierten Zustand möglich. In der Zelle angelangt müssen die Sulfonylharnstoffe, um an den Rezeptor zu binden, aber in der dissoziierten Form vorliegen, da die negative Ladungsform des Sulfonylharnstoffmoleküls an SUR bindet (Schwanstecher et al., 1994, Formeln siehe Kapitel 1.7.1.1, Seite 39). Das Sulfonylharnstoff-bindende

Protein wurde Sulfonylharnstoffrezeptor (SUR) genannt und inzwischen als  $\beta$ -Untereinheit des  $K_{ATP}$ -Kanals erkannt (siehe Abb.4).

Bei den Sulfonylharnstoffen unterscheidet man zwischen Blockern der ersten Generation, welche den kurzkettigen Sulfonylharnstoffen (wie z.B. Tolbutamid, Glibornurid, Gliclazid und Nateglinid (2001)) entsprechen und bei denen man auch von Liganden der Gruppe A sprechen kann. Die Sulfonylharnstoffgruppe ist sauer mit  $pK_A$ -Werten zwischen 6.3-6.8, je nach dem ankondensierten aromatischen Ring (vgl. Formeln Kapitel 1.7.1.1, Seite 39).

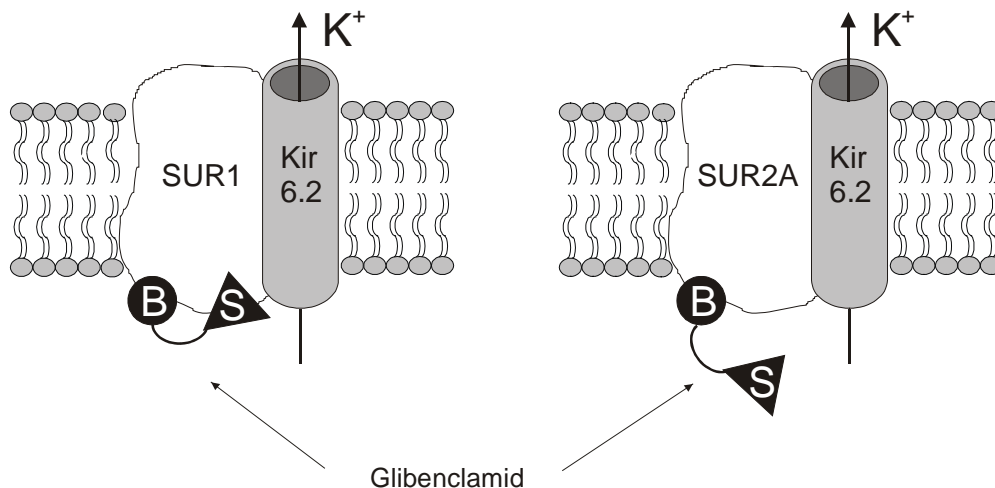
Sulfonylharnstoffe der zweiten Generation, sogenannte langkettige Sulfonylharnstoffe, wie z.B. Glibenclamid oder Glimepirid, werden auch Liganden der Gruppe A+B genannt und besitzen einen über eine Carboxamidogruppe (-CONH- oder -NHCO-) an die kurze Kette gebundenen substituierten aromatischen Ring (siehe Formeln Kapitel 1.7.1.1, Seite 39). Diese Verbindungen binden mit  $\sim 1,000X$  höherer Affinität an SUR1 als die Kurzkettigen. Daraus entstand die Hypothese, dass die Glibenclamid-Bindungstasche aus zwei unterschiedlichen Teilen bzw. Seiten besteht, zum einen aus der A-Seite, an welche der alte Teil der Verbindung (d.h. die kurzkettigen Sulfonylharnstoffe) bindet, zum anderen aus der B-Seite, an die der neue Carboxamid-Teil der langkettigen Sulfonylharnstoffe bindet (Brown et al.,1984). Diese "Zwei-Seiten-Hypothese" der GBC-Bindung wurde durch Bindungsexperimente mit Meglitinid weiter unterstützt. Hier fand man, dass Meglitinid, welches den Carboxamid-Teil des GBC enthält (siehe Formeln Kapitel 1.7.1.1, Seite 39) und die negative Ladung über die dissoziierte Form der Benzoesäure bereitstellt, den Kanal ebenfalls blockiert, jedoch mit niedrigerer Potenz. Meglitinid stellt folglich eine Teilstruktur von GBC und einen "Neuen Teil" bereit. Neue Glinide (siehe Formeln Kapitel 1.7.1.1, Seite 39), die bereits in klinischem Gebrauch sind oder in der Forschung Anwendung finden, sind Repaglinid (1998, ein Benzoesäurederivat), Nateglinid (ein D-Phenylalaninderivat) und Mitiglinid (ein 3-Phenylpropionsäurederivat).

Die dritte Generation, die Glinide wie z.B. Meglitinid (1978), Repaglinid (1998), (-)-AZ-DF265 (1988) und UL-DF 9 stellen die Gruppe der Liganden der Gruppe B. Bei Ihnen kommt ein neu aromatisierter Ring und der zentrale Phenylring

hinzu. Die notwendige negative Ladung wird durch die Carboxylfunktion gegeben. Repaglinid besitzt eine hohe Potenz für den Block des Kir6.2/SUR1- $K_{ATP}$ -Kanals, jedoch benötigt es die Glukoseanwesenheit für einen erfolgreichen Kanalblock (Coghan et al.,2001). An den Strukturformeln der Sulfonylharnstoffe und Glinide zeigt sich, dass ihre Gemeinsamkeit in einer negativen Ladung und einem zentralgelegenen Phenylring liegt. Diese Tatsache läßt daran denken, dass die Bindungsstellen für Typ A Liganden, wie z.B. Tolbutamid, und für Typ B Liganden, wie z.B. Meglitinid, überlappen müssen, damit sich der jeweilige Ligandtyp an seine Seite anpassen und binden kann (Brown et al.,1984).

Die "Zwei-Seiten-Hypothese" der GBC-Bindung an SUR1 wird nun durch Struktur-Funktion-Analysen an klonierten SURs unterstützt. Ashfield et al,1999 zeigte, dass die Transmembransegmente 14-16 (siehe Abb.4, Seite 20) für einen hochaffinen Kanalblock wichtig sind, indem sie die Potenzunterschiede beim Kanalblock durch Tolbutamid an Kir6.2/SUR1 und Kir6.2/SUR2A verwertete. Die Tolbutamid- bzw. die Sulfonylharnstoffbindungsstelle liegt innerhalb der TMD2 auf den TM14 und TM15 und auf dem halben zytoplasmatischen Scheife zwischen TM13 und TM14 sowie der halb zytoplasmatischen Schleife zwischen TM15 und TM16 (siehe Abb.4, S.20). Speziell die Region zwischen TM15 und TM16 (CL8 auf Abb.4, S.20) ist wesentlich für die Sulfonylharnstoffbindung (Babenko et al.,1999; Ashfield et al.,1999) und hier speziell die Aminosäure Ser (Serin) an Stelle 1237. Der Austausch dieser Aminosäure (Ser1237, zytoplasmatischen Schleife zwischen TM15 und TM16) durch Tyr (Tyrosin), welche der korrespondierenden As in SUR2 entspricht, verhindert den hoch-affinen Kanalblock durch Tolbutamid (Ashfield et al.,1991). Darüber hinaus wurde der Kanalblock durch GBC sofort reversibel (d.h. Block des mutierten Kanals durch GBC jetzt reversibel) und eine hoch-affine  $^3\text{H}$ -GBC-Bindung an SUR1(S1237Y) trat nicht mehr auf ( $K_D \gg 10$  nM). Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass folglich die kurzkettigen Sulfonylharnstoffe an die Region um S1237 an SUR1 binden, sogenannte A-Seite, und dass durch das in SUR2 gelegen Tyr eine sterische Hemmung für die Bindung an dieser Seite erfolgt.

Für die Meglitinid-Bindungsstelle wurde eine andere Region im SUR angenommen (Ashfield et al.,1999). An beide  $K_{ATP}$ -Kanäle ( $\beta$ -Zellen und Herzzellen) löst Meglitinid (Teilstruktur von GBC; neu ankondensierter aromatischer Ring und zentraler Phenylring, Formel siehe Kapitel 1.7.1.1, Seite 39) mit der gleichen Affinität den elektrophysiologischen Kanalblock aus (Gribble et al.,1997b) und auch bei der Mutanten SUR1(S1237Y) blieb der Kanalblock unverändert (Ashfield et al.,1999). Daraus wurde der Schluß gezogen, dass sowohl SUR1 als auch SUR2A eine Benzamidbindungsstelle besitzt. Diese Meglitinid- bzw. Benzamidobindungsstelle liegt auf der intrazellulär gelegenen Schleife zwischen TM5 und TM6 der TMD0 und wird mit CL3 bezeichnet (Gribble und Reimann, 2002; siehe Abb.4, S.20). GBC bindet ebenfalls mit hoher Affinität an beide  $K_{ATP}$ -Kanaltypen, wobei die Blockierung des  $\beta$ -Zell- $K_{ATP}$ -Kanals kaum reversibel ist. Folglich scheint GBC an die Sulfonylharnstoff- und an die Benzamidobindungsstelle von SUR1 zu binden (Ashcroft und Gribble, 2000a) und nur dann vom Rezeptor zu dissoziieren, wenn gleichzeitig eine Verdrängung von beiden genannten Bindungsstellen stattfinden würde (Ashcroft und Gribble,1999; siehe Abb.7). Dies erklärt den langanhaltenden Block der Kir6.2/SUR1-Kanäle durch GBC (Ashfield et al.,1999). Tolbutamid hingegen bindet aufgrund der fehlenden Benzamidogruppe nur an einer Seite des SUR1, nämlich der Tolbutamid - bzw. Sulfonylharnstoff- oder auch A-Bindungsstelle (Gribble et al.,1998).



**Abb.7 Bindungsstellenmodell an SUR1 und SUR2A (Ascroft und Gribble,1999).**

Bindungsverhalten von GBC an SUR1 und im Vergleich an SUR2A. Der  $K_{ATP}$ -Kanal ist zur Vereinfachung nur mit je einer  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit dargestellt. Der Kreis symbolisiert die Benzamidogruppe (B), das Dreieck (S) die Sulfonylharnstoffgruppe, deren genaue Bindungsstellen im Text beschrieben sind (nach Ashfield et al.,1999).

Man vermutet, dass sowohl SUR1 als auch SUR2A eine Benzamidobindungsstelle besitzen (siehe Abb.7), während SUR2 die Sulfonylharnstoffbindungsstelle verloren hat (Ashfield et al.,1999). Isomoto et al.,1996 fand allerdings heraus, dass auch SUR2B- enthaltende Kanäle durch Tolbutamid geblockt wurden. Vielleicht sind daher die 42 C-terminalen Aminosäuren von SUR1 und SUR2B in die Sulfonylharnstoffbindung involviert.

Bei Photoaffinitätsstudien, die zur Klonierung von SUR1 führte, fand man heraus, dass  $^3I$ -GBC den  $NH_2$ -terminalen Anteil von SUR markiert (Aguilar-Bryan und Bryan,1999). Man beobachtete, dass für die  $^3H$ -GBC-Bindung an SUR1 die dritte zytosolische Schleife CL3 (siehe Abb.4, S.20), die die TMD0 und TMD1 verbindet, von wesentlicher Bedeutung ist (Mikhailov et al.,2001). Dies ließ vermuten, dass CL3 eine wesentliche Rolle bei der Bindung der neuen Kette von GBC spielt bzw. die Bindungsregion (B-Seite) sein müsste (Proks et al.,2002; Gribble et al.,2003). Die Bindungsstelle für die negative Ladung der Substanz blieb unbekannt.

Durch den Vergleich des durch die Sulfonylharnstoffe und Glinide ausgelösten Kanalblocks am Wildtyp (Kir6.2/SUR1) und an der Mutante (Kir6.2/SUR1(S1237Y)) wurde die Einteilung in Seite A-, B-, und A+B-Liganden



eingeführt. Dabei ist besonders interessant, dass die Glinide bei dieser Klassifizierung in zwei Gruppen aufgeteilt werden können. Meglitinid und Repaglinid (Struktur siehe Kapitel 1.7.1.1, Seite 39) stellen Typ B-Liganden (Dabrowski et al.,2001; Hansen et al.,2002), Nateglinid (Hansen et al.,2002; Chachin et al.,2003) und Mitiglinid (Reimann et al.,2001) Typ A-Liganden dar. "Molecular modeling" zeigte die Ähnlichkeit zwischen Nateglinid und Tolbutamid und dass Repaglinid Ähnlichkeit mit dem Carboxamid-Teil des GBC besitzt. Jedoch ragt der Piperidinoring von Repaglinid aus der gemeinsamen Tasche heraus (Hansen et al.,2002). Dieser heraushängende restliche Molekülteil kann möglicherweise einen weiteren Kontakt mit SUR oder sogar mit Kir6.2 herstellen, der von GBC oder anderen Verbindungen nicht erzeugt werden kann. Auf diesem Gebiet ist noch Vieles zu erforschen.

Im Gegensatz zu den Typ A-Liganden findet sich in der Strukturformel des Gruppe A+B-Liganden GBC zusätzlich zu der Sulfonylharnstoffgruppe eine über die Benzamidogruppe ankondensierte aromatische Funktion. Beide Gruppen entfalten ihre kanalhemmende Wirkung über hochaffine Bindungsstellen auf der SUR-Untereinheit. Aufgrund der hohen Affinität zu SUR1 bleibt die Wirkung von Tolbutamid und GBC hauptsächlich auf die pankreatischen  $\beta$ -Zellen beschränkt (Gribble et al.,1998b). Ungeklärt ist jedoch, ob es bei einer Langzeitbehandlung mit GBC nicht doch etwa zur Schädigung des Herzens kommen kann (Smiths und Thien,1995; Leibowitz und Cerasi,1996; Quast et al.,2004). Man kann aber sagen, dass sehr große Studien, wie z.B. die UKPDS-Studie, keine Hinweise auf eine vermutete Herzschädigung lieferten (Quast et al.,2004). Zu den unerwünschten Wirkungen auf das Herz könnte die Hemmung der kardioprotektiven Öffnung von  $K_{ATP}$ -Kanälen in der frühen Ischämie, aber auch die Erhöhung des Koronarwiderstands durch Hemmung der  $K_{ATP}$ -Kanäle der glatten Muskulatur beitragen. Allerdings ist an dieser Stelle darauf hinzuweisen, dass der therapeutische Blutspiegel von GBC zwischen 1-10 nM liegt (Matsuda et al.,1983; Coppack et al.,1990; Leibowitz und Cerasi,1996) und damit unterhalb der veröffentlichten  $IC_{50}$ -Werte von 27 nM für Kir6.2/SUR2A-Kanäle (Gribble et

al.,1998a; Russ et al.,2001) und unterhalb der  $IC_{50}$ -Werte von 40-100 nM für NDP-abhängige  $K_{ATP}$ -Kanäle in Gefäßen liegt (Quast,1989; Beech et al.,1993; Russ et al.,1997). Eine Ausnahme stellen hier die Glinide dar (z.B. Repaglinid), bei denen eine Wirkung auf das Herz nicht ausgeschlossen werden kann, wie elektrophysiologische Experimente an rekombinanten  $K_{ATP}$  zeigten (Dabrowski et al.,2001). Genau auf diese Problematik der Selektivität von Repaglinid an den  $K^+$ -Kanal wird in dieser Arbeit noch näher eingegangen werden. Tolbutamid hingegen führt zur Schließung der  $K_{ATP}$ -Kanäle im Pankreas, jedoch nicht der  $K_{ATP}$ -Kanäle im Herz (Kir6.2/SUR2A). Diese Tatsache legt nahe, dass SUR2A keine Bindungsstelle hoher Affinität für Tolbutamid und somit für Sulfonylharnstoffe der Gruppe A hat (Venkatesh et al.,1991; Gribble et al.,1998b). Die Unterschiede zwischen SUR1 und SUR2A wurden und werden bis heute noch weiter untersucht (Gribble et al.,1998, Gribble und Ashcroft,1999; Babenko et al.,1999; Quast et al.,2004).

Es existiert auch eine Bindungsstelle der Sulfonylharnstoffe an Kir6.2 (Gribble et al.,1997b; Gribble et al.,1998b), jedoch mit nur so geringer Affinität ( $\sim 50 \mu M$ ), dass die Konzentration der Blocker im Patientenplasma nicht ausreicht, um einen  $K_{ATP}$ -Kanal-Block über Kir6.2 zu vermitteln (Gros et al.,1999). Dieser Bindung kommt somit klinisch keine Bedeutung zu und nur die Bindungsstellen hoher Affinität am SUR sind für die therapeutischen Effekte verantwortlich.

Bei der Mutante SUR2A(Y1206S), die für diese Arbeit eine große Rolle spielt, wurde analog zu der bereits weiter oben erwähnten Mutante SUR1(S1237Y) nur eine Aminosäure durch eine andere ersetzt. Bei SUR2A(Y1206S) wurde die As Tyrosin (Tyr) an der Stelle 1206 der Aminosäuresequenz durch Serin (Ser) ersetzt, welche der korrespondierenden As im SUR1 entspricht. Da der Wildtyp SUR2A nur über die Benzamidbindungsstelle bzw. die Seite B verfügt wurde durch die Mutation eine Sulfonylharnstoffbindungsstelle bzw die Seite A ergänzt. Ashcroft et al. behauptet, dass SUR2A durch diese Mutation (SUR2A(Y1206S)) zu einem SUR1 gemacht wird und ähnliche Bindungseigenschaften wie SUR1 zeigt, da SUR1 ebenfalls über eine A- und B-Seite verfügt. Die Mutante SUR2A(Y1206S) zeigt gegenüber dem Wildtyp

SUR2A ( $K_D \sim 30$  nM) einen 5-10x höhere Affinität für GBC (Stephan et al., British Journal of Pharmacology in press).

Früher wurde die Empfindlichkeit für die Sulfonylharnstoffe zur Einteilung der SUR-Typen verwendet. Es existierten somit Hochaffinitäts- und Niedrigaffinitäts-SUR-typen. SUR1 gehörte zu den Hochaffinitäts-SURs. Die SUR2-Isoformen werden als Niederaffinitäts-SUR-Typen bezeichnet. Jedoch wurden in Radioligandenbindungs- Studien für GBC an SUR2A und an SUR2B eine  $K_D \sim 30$  nM ermittelt (Löffler-Walz et al., 2002; Stephan et al., British Journal of Pharmacology in press). GBC hemmt mit  $IC_{50}$ -Werten von  $\sim 30$  nM die Kir6.2/SUR2x-Kanäle in elektrophysiologischen Experimenten, wobei die Bedingungen unter denen die Versuche durchgeführt werden (z.B. die Anwesenheit von Nukleodiden usw.) auch andere Ergebnisse liefern (Beech et al., 1993; Okuyama et al., 1998; Gribble et al., 1998b; Russ et al., 1999; Russ et al., 2001; Lange, Dr. Arbeit).

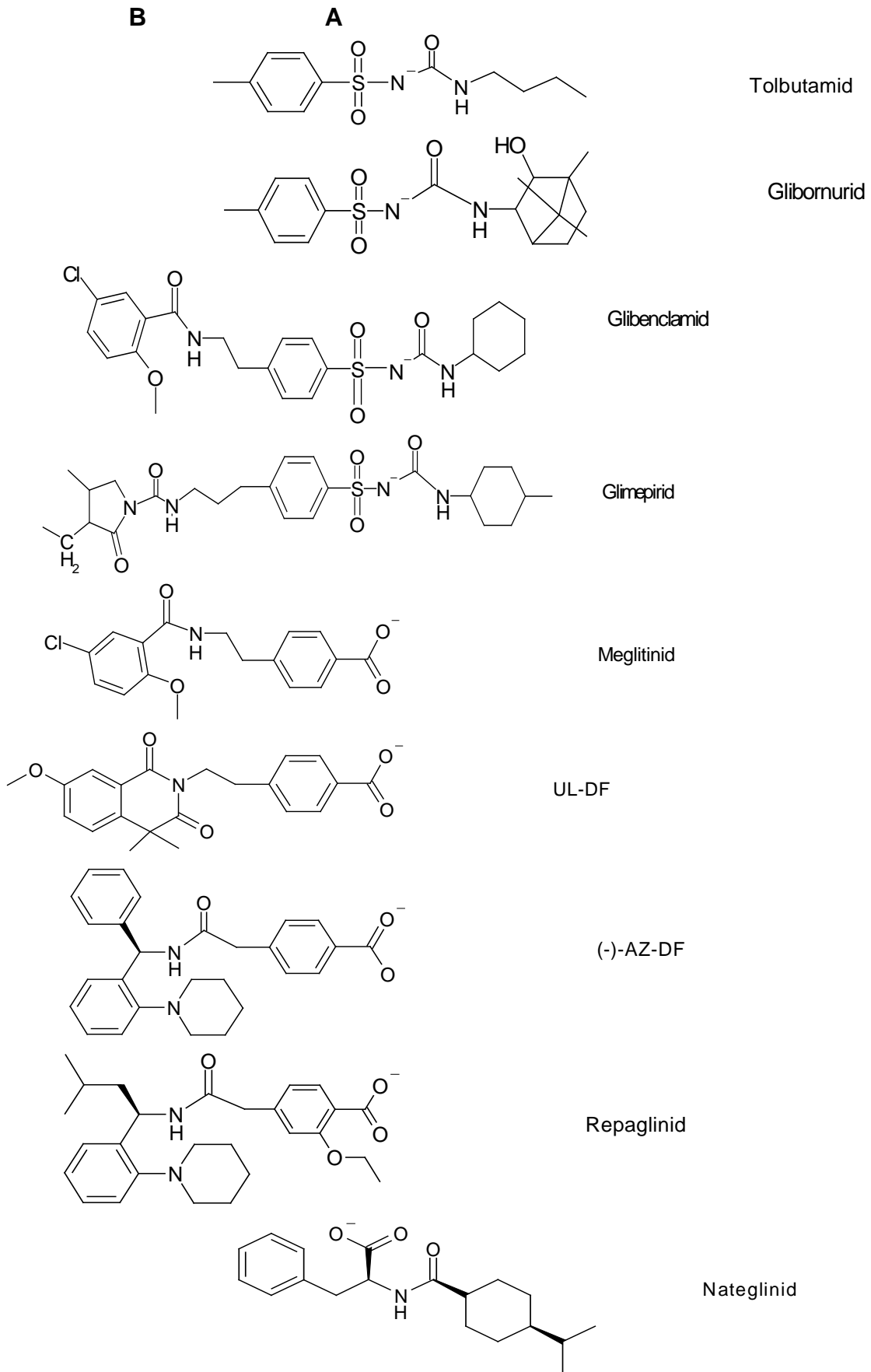
Die Stöchiometrie des Kanalblocks durch Sulfonylharnstoffe ist umstritten und es gibt verschiedene Modelle, ob die Bindung von einem (Dörschner et al., 1999) oder von vier (Russ et al., 1999) Molekülen GBC nötig ist, um den Kanal zu inhibieren. Man ist sich bis heute nicht einig, wie die  $K_{ATP}$ -Kanäle durch die Bindung der Sulfonylharnstoffe gehemmt werden. Plausibel scheint eine Wechselwirkung mit der Aktion von ATP und MgADP an den NBFs zu sein. Bei physiologischer MgADP-Konzentration wird z.B. die Hemmung des Kanals durch ATP von den Sulfonylharnstoffen an rekombinante Kir6.2/SUR1-Kanäle verstärkt. Gribble und Ashcroft sagen, dass die Bindung des Sulfonylharnstoffe die positive kooperative Wechselwirkung zwischen ATP (an NBF1) und MgADP (NBF2) unterbricht. Dadurch wird die öffnende Wirkung von MgADP aufgehoben. Die unterschiedliche Wirkung der Nukleotide auf die Bindung von GBC an die verschiedenen SUR-Typen wurde von Hambrook et al., 2002a und der Kanalblock der Kir6.2/SURx-Kanäle von Reimann et al., 2003 aufgeklärt.

MgATP und MgADP führen an  $K_{ATP}$ -Kanälen der  $\beta$ -Zellen zur Dissoziation der  $^3H$ -GBC -Bindung (Niki et al., 1990), wobei die scheinbare  $K_D$  des GBC keine lineare Funktion von der MgATP-Konzentration darstellte und eine kompetitive

Inhibition nicht zu vermuten war (Schwanstecher et al.,1992; Hambrock et al.,2002). Durch die MgATP- bzw. die MgADP-Bindung an die NBFs muß die GBC-Bindungsstelle modifiziert werden. Eine konzentrationsabhängige Dissoziation von gebundenem 8-azido-[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-ATP von SUR1 durch GBC in MgATP- bzw. MgADP-Anwesenheit wurde von Ueda et al.,1999 nachgewiesen und folglich der Beweis für die Kommunikation zwischen den NBFs und den GBC-Bindungsstellen erbracht.

#### 1.7.1.1 Übersicht über die verschiedenen Substanzen

Um einen besseren Überblick von den verschiedenen Typ A-, B- und A+B-Liganden zu bekommen sind auf der folgenden Seite nochmals alle Sulfonylharnstoffe und Glinide, mit denen gearbeitet wurde, aufgeführt. Dabei wurde eine chronologische Reihenfolge gewählt. Die Auflistung der Strukturformeln beginnt mit dem zuerst entwickelten Tolbutamid (1955), dann folgen die anderen Substanzen, Glibornurid, GBC (1969), Glimepirid, Meglitinid (1978), UL-Df 9, (-)-AZ-DF265 (1988), Repaglinid (1998) und Nateglinid (2001). Von den Typ A-Liganden sind Tolbutamid, Glibornurid und Nateglinid von den Typ A+B-Liganden GBC und Glimepirid und von den B-Liganden Meglitinid, UL-Df 9, (-)-AZ-DF265, und Repaglinid dargestellt. Die Strukturformeln aller verwendeten Verbindungen sind nach der negativen Ladung zentriert auf der folgenden Seite untereinander angeordnet dargestellt und lassen so leicht die zwei Seiten der Bindung erkennen. Dies ist zum einen die A-Seite, die der Sulfonylharnstoffseite entspricht und zum anderen die Benzamidobindungsstelle bzw. die B-Seite, die bereits vorab im Text (siehe 1.7.1) beschrieben wurden.



### 1.7.2 Synthetische Öffner der $K_{ATP}$ -Kanäle

Zu den synthetischen Öffnern der  $K_{ATP}$ -Kanäle (KCO,  $K^+$  channel opener) gehören eine Vielzahl ganz unterschiedlicher Substanzen. Sie lassen sich grob in die folgenden Strukturklassen einteilen:

STRUKTURKLASSE	WIRKSTOFF
1) Zyanoguanidine	Pinacidil, P1075, WAY-133537
2) Benzopyrane	Levcromakalim, BMS-180448, BMS-191095, SDZ-217-744
3) Benzothiadiazine	Diazoxid
4) Pyrimidin	Minoxidilsulfat
5) Tertiäre Carbinole	ZD-6169
6) Dihydropyridine	ZM-244085, A-312110, A-310110

**Tab. 2 Wichtige chemische Strukturklassen von KCO und deren typische Vertreter.**

Alle KCOs führen zur Hyperpolarisation der Plasmamembran und reduzieren die elektrische Aktivität der Zelle (Edward and Weston,1993; Quast,1993 und 1996; Ashcroft und Gribble,2000b). Es stellte sich heraus, dass die verschiedenen SUR-Isoformen unterschiedliche Sensitivitäten für die KCOs besitzen. Zum Beispiel wird der Kir6.2/SUR1-Kanal durch Diazoxid stark aktiviert, jedoch nicht durch Pinacidil. Kir6.2/SUR2A werden durch Pinacidil und Cromakalim aktiviert, durch Diazoxid aber nur sehr schwach. Kir6.2/SUR2B hingegen wird von allen Dreien aktiviert (Inagaki et al.,1995a,1996; Isomoto et al.,1996; Gribble et al.,1998; Babenko et al.,1998b; D´hahan et al.,1999a,b). Die Sensitivität der Kir6.2/SUR2A-Kanäle gegenüber Diazoxid kann durch die Anwesenheit von MgADP gesteigert werden (D´hahan et al.,1999b). Zusätzlich wurde in früheren Studien gezeigt, dass KCOs, wie z.B. Pinacidil, die ATP-Hydrolyse an NBF2 stimulieren und den durch Mg-Nukleotide erzeugten offenen Zustand des Kanals stabilisieren (Bienengraeber et al.,2000; Zingman et al.,2001).

KCO der ersten Generation sind Diazoxid und Minoxidilsulfat (wird als Pro-Drug=Minoxidil verabreicht, das im Organismus sulfatiert wird). Sie werden wegen schweren Nebenwirkungen nur in ganz speziellen Fällen eingesetzt. Diazoxid wird zur Therapie der hypertensiven Krise und bei Hyperinsulinämie bei Insulinom eingesetzt. Minoxidilsulfat wird zur Behandlung von therapierefraktärer Hypertonie und Nicorandil, welches KCO und Guanylat-Cyclase-Aktivator zugleich ist, zur Angina Pectoris Therapie verwendet (Karow und Lang,2002; Quast,1996b). Die Pharmaindustrie versucht gezielt Substanzen zu entwickeln, die durch Hemmung der Übererregbarkeit der Bronchialmuskulatur (z.B. Benzopyrane, wie SDZ-217-744) als Therapeutika zur Asthma bronchiale Behandlung geeignet sind oder durch Synthese von KCO mit Selektivität für den Urogenitaltrakt (v.a. Carbinole, wie ZD-6169 und Dihydropyridine, wie ZM-244085 und A-310110) Therapeutika gegen die Inkontinenz zu entwickeln (Buchheit et al.,2002; Coghlan et al.,2001). Durch Benzopyrane, wie BMS-191095 oder BMS-180448 wird eine kardioprotektive Wirkung angestrebt, die klinisch getestet wird.

Die KCO binden ebenfalls an die  $\beta$ -Untereinheit (SUR) des  $K_{ATP}$ -Kanals (Hambrock et al.,1998; Schwanstecher et al.,1998). Somit ist die SUR-Untereinheit auch für die in unterschiedlichen Gewebearten unterschiedliche  $K_{ATP}$ -Kanal-Aktivierung durch die KCO verantwortlich (Gribble et al.,1997a). Zur Bindung an den Rezeptor und zur hochaffinen  $K_{ATP}$ -Kanal-Öffnung benötigen die KCOs hydrolysierbares MgATP oder MgADP (positiv allosterische Kopplung) (Schwanstecher et al.,1992; Quast et al.,1993; Dickinson et al.,1997; Löffler und Quast,1997; Schwanstecher et al.,1998; Hambrock et al.,1998,1999). Wie die KCO-Bindung an SUR durch Nukleotide reguliert wird ist noch weitgehend unbekannt (Ashcroft,2000; Russ et al.,2003). Das gängigste Modell schlägt vor, dass die MgATP-Bindung an die NBF2 und die KCO-Bindung zusammen eine Kanalkonformation stabilisiert, die den  $K_{ATP}$ -Kanal für die inhibitorische ATP-Wirkung am Kir6.2 unempfindlich macht. Offensichtlich spielen ATPase-Aktivitäten der NBFs, v.a. der NBF2, (Bienengraeber et al.,2000) eine zusätzliche Rolle (Schwanstecher et al.,1998; Zingman et al.,2001).

Durch Punktmutationen im Walker A-Motiv oder im Verbindungsbereich zwischen den Walker A und B Motive ("Linker")(vgl. Seite 20, Abb.4) zeigte sich, dass die Aktivierung der KCO-Bindung durch das MgATP aufgehoben wird. Demnach sind beide NBFs im nativen SUR für die hochaffine Bindung und Wirkung der KCOs erforderlich.

Die ATP-Abhängigkeit der Öffnerbindung zeigt sich in Verdrängungsversuchen mit  $^3\text{H}$ -GBC am SUR, bei denen die Öffner in Abwesenheit von MgATP die  $^3\text{H}$ -GBC-Bindung nur sehr schwach hemmen können, bei MgATP-Zugabe jedoch eine starke Verdrängung beobachtet werden kann (SUR1: Schwanstecher et al.,1992,1998; SUR2B: Löffler-Walz et al.,2002; Russ et al.,2003). Die Unterschiede in den letzten 42 C-terminalen Aminosäuren bewirken eine vier- bis fünffach niedrigere Affinität für die Öffnerbindung zwischen SUR2A und SUR2B (Hambrock et al.,1999). Daraus folgt, dass neben dem C-Terminus auch der restliche SUR-Anteil die Affinität beeinflusst (Schwanstecher et al.,1998).

Durch Herstellung von Chimären aus SUR1 und SUR2A wurde gezeigt, dass die TMD2 an der Bindungstasche des Chromakalim an SUR2A beteiligt ist (D´hahan et al.,1999a,b). Bei der hochaffinen Bindung von P1075 an SUR2B sind zwei Regionen innerhalb der TMD2 von essentieller Bedeutung. Die erste Region liegt auf einer intrazelluläre gelegenen Schleife zwischen M13 und M14 (Tyr1059-Leu1087), die zweite liegt im Bereich von M16 und M17 (Arg1218-Asn1320) (Uhde et al.,1999; vgl. Abb.4, Seite 20). Werden auf SUR1 die korrespondierenden Aminosäuren ausgetauscht steigert sich die P1075-Affinität bis in den submikromolaren Bereich (Hambrock et al.,2003). Die Bindungsstelle des Levchromakalim, einem Benzopyran, wurde ebenfalls auf der TMD2 von SUR2A lokalisiert (D´hahan et al.,1999,2001). Durch den Austausch dieser Transmembrandomäne durch den entsprechenden Bereich von SUR1 wurde die Wirkung von Levchromakalim aufgehoben. Man erkannte, dass zwei Aminosäuren innerhalb der Transmembranhelix 17 von SUR2A, nämlich Thr an Stelle 1253 und Lys an Stelle 1249, Determinanten für die Öffnersensitivität der Benzopyrane und Zyanoguanidine darstellen (Moreau et al.,2000). Bei Diazoxid konnte keine bestimmte TMD ermittelt werden, die für Interaktion verantwortlich

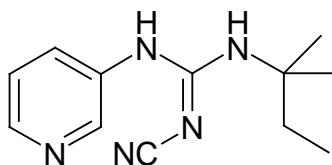


zu sein scheint. Die Bindungsstelle liegt sehr wahrscheinlich im Bereich von TMD6-11 und der NBF1 (Babenko et al.,2000). Unterschiede in der Wirkung von Diazoxid an  $K_{ATP}$ -Kanälen mit verschiedenen  $\beta$ -Untereinheiten (SUR1 oder SUR2A) könnten auf unterschiedlicher Signaltransduktion von der Bindung hin bis zur Kanalöffnung beruhen, was durch Bindungsstudien an rekombinanten SUR1 und SUR2A unterstützt wird, da sich hier für Diazoxid ähnliche  $K_i$ -Werte ergab (Schwanstecher et al.,1998; Hambrock et al.,1999; Russ et al.,2003). Diazoxid bindet an alle SUR-Subtypen (SUR1, SUR2A, SUR2B), wobei es Kir6.2/SUR1, Kir6.2/SUR2A (in Anwesenheit von MgADP) und Kir6.2/SUR2B (in Anwesenheit von MgATP) aktiviert (Seino und Miki,2003).

Die erste  $K_{ATP}$ -Kanal-Öffner-Bindungstasche liegt vermutlich intrazellulär (Uhde et al.,1999) und setzt somit für die Bindung der Öffner deren Durchtritt durch die Plasmamembran voraus um, wie die Sulfonylharnstoffe, an ihren Wirkort zu gelangen (Schwanstecher et al.,1994a). Die Sulfonylharnstoffbindungsstelle liegt zwischen der beiden Bindungsstellen für die Öffner (Dörschner et al.,1999; Uhde et al.,1999) und unterliegt einer allosterischen Kopplung mit der Öffnerbindungsstelle, was in verschiedenen Bindungsstudien gezeigt werden konnte (Bray und Quast,1992; Schwanstecher et al.,1992).

Da die Substanz P1075 bei einigen Bindungsversuchen zur Bestimmung der nicht-spezifischen Bindung (NSB) verwendet wurde wird hier deren Strukturformel angeführt. Die übrigen KCOs sind für das Verständnis dieser Arbeit weniger wichtig und fanden keine Anwendung. Deren Strukturformeln werden deshalb nicht gezeigt.

P1075:



## 1.8 Fragestellung der Arbeit

Die Untersuchung der Bindung der Sulfonylharnstoffe und Glinide an die SUR-Subtypen des Kanalblocks hängen stark von den Untersuchungsparametern ab, v.a. von der Gegenwart von Nukleotiden, der Badtemperatur und der Präparation (intakte Zellen vs. Membranen bzw. isolierte Patches (Gopalakrishnan et al.,1998; Schwanstecher et al.,1999; Stephan et al.,eingereicht 2004, Br. J. Pharm., in press; Lange,Dr. Arbeit,2004). Bei der Bindung muß zudem berücksichtigt werden, ob mit isoliertem SUR alleine oder unter Bedingungen der Koexpression mit Kir6.x gearbeitet wurde (Russ et al.,1999; Hambrock et al.,2001). Für die Untersuchung des Kanalblocks gibt es für einige Substanzen homogenen Datensätze (Gruppe Ashcroft: i/o Patch, Expression des Kanals in Xenopus Oozyten; Ruß et al., Expression in HEK293-Zellen; intakte Zellen vs. I/o Patch). Bezüglich der Bindung gibt es keine homologen Datensätze.

In dieser Arbeit sollte die Bindung der Sulfonylharnstoffe und Glinide an die SUR-Subtypen SUR1 und SUR2A(Y1206S) vergleichend unter möglichst physiologischen Bedingungen gemessen werden, d.h. in intakten Zellen in glukosehaltigem Puffer und bei 37°C. Zudem sollte der Effekt der Koexpression mit Kir6.2 untersucht werden.

Dazu wurden <sup>3</sup>H-GBC-Verdrängungsmessungen durchgeführt. Wegen der relativ geringen Aktivität des Radioliganden für SUR2A ( $K_D \sim 30\text{nM}$ , Stephan et al., Br. J. Pharm., in press) wurde statt des Wildtyps die Mutante SUR2A(Y1206S) untersucht, die einen 5-10x höhere Affinität für GBC zeigt (Stephan, British Journal of Pharmacology, in press). Kir6.2/SUR1 entspricht bekannter Weise dem Kanal in der  $\beta$ -Zelle der menschlichen Pankreas (siehe Kapitel 1.4.4) und ist deshalb besonders interessant.

Die Bindungsexperimente an SUR1 und Kir6.2/SUR1 sollten mit den folgenden Substanzen durchgeführt werden:

1.) Typ A-Liganden:

- Glibornurid
- Nateglinid

2.) Typ A+B-Liganden:

- GBC
- Glimepirid

3.) Typ B-Liganden:

- Meglitinid
- UL-DF 9
- (-)-AZ-DF265
- Repaglinid

Die Bindungsversuche an SUR2A(Y1206S) und Kir6.2 /SUR2A(Y1206S) sollten mit den Substanzen:

1.) Typ A-Liganden:

- Glibornurid
- Nateglinid

2.) Typ A+B-Liganden:

- GBC

3.) Typ B-Liganden:

- Meglitinid
- (-)-AZ-DF265
- Repaglinid

durchgeführt werden.

Die Experimente sollten Rückschlüsse auf die Selektivität der Verbindungen für den pankreatischen (Kir6.2/SUR1) über den kardialen Kanal (Kir6.2/SUR2A) ergeben; auf letzterer beruht ein Teil des kardiovaskulären Risikopotentials der Substanzen. Da chemisch durchaus verschiedenartige Substanzen untersucht werden, werden zugleich die Bindungsstellen A und B an den beiden SUR-Subtypen abgetastet ("Rezeptor mapping"). Dies ist von Interesse, da v.a. über die B-Seite nur wenig über die Tatsache hinaus bekannt ist, dass die zytosolische Schleife 3 (siehe Abb.4, Kapitel 1.4.3) für die Bindung an dieser Stelle wesentlich ist. Der Effekt der Koexpression erlaubt Rückschlüsse auf die Kopplung zwischen Kir und SUR. Hier weiß man, dass auf Kir6.2-Seite die ersten 10-20 Aminosäuren des Aminoterminus für den Sulfonylharnstoff-induzierten Kanalblock eine Rolle spielen (Reimann et al.,1999).

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Geräte und Chemikalien

Autoklav	2540 MK Tuttnauer, Wesel, D
Brutschrank	B5060EC/CO <sub>2</sub> Heraeus Instruments GmbH, Stuttgart, D
Tiefkühltruhe	GFL 6384 GFL GmbH, Burgwedel, D
Laminar Flow	Hera Safe, Heraeus Instruments GmbH, Stuttgart, D
Photometer	Bio Photometer Eppendorf, Hamburg, D
Stickstofftank	XLC 511-FD Chart Europe GmbH, Solingen, D
Wasserbad	W12 P-D Industriegesellschaft GmbH, Dresden, D
Zentrifuge	Biofuge Primo, Heraeus Instruments GmbH, Osterode, D

**Tab.3 Tabelle der verwendeten Geräte**

Die für die Versuche notwendigen Konzentrationsreihen wurden wie folgt hergestellt: Zuerst wurde aus den Substanzen Stammlösungen in verschiedenen Konzentrationen hergestellt, wobei man als Lösungsmittel Inkubationspuffer, Äthanol/DMSO (1:1), oder DMSO verwendete. Diese Stammlösungen wurden dann erneut mit den oben genannten Lösungsmitteln zu der benötigten Konzentrationsreihen verdünnt. Die Aufbewahrung der Stammlösungen erfolgte bei  $-30^{\circ}\text{C}$ .

Reagenzien:	Einheiten:		Hersteller:
ATP-Na <sub>2</sub>	605.20	g/mol	Boehringer, Mannheim, (Deutschland)

Äthanol 99% p.a.	500	ml	Merck, (USA)
BSA	~67 000	g/mol	Fluka, Buchs, (Schweiz)
CaSO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	203.30	g/mol	
CuSO <sub>4</sub>	159.60	g/mol	Merck, (USA)
DMSO	1	l	Merck, (USA)
EDTA-Na <sub>2</sub>	372.24	g/mol	Fluka, Buchs, (Schweiz)
EGTA	380.40	g/mol	Sigma, (Deutschland)
FBS	500	ml	GibcoBRL–Life Technologies, (USA)
Folin-Ciocalteu-Reagenz (2 M)	100	ml	Fluka, Buchs, (Schweiz)
Geneticinsulfat	692.70	g/mol	GibcoBRL–Life Technologies, (USA)
Gentamycin	50	mg/ml	GibcoBRL–Life Technologies, (USA)
Glibenclamid	494.00	g/mol	Sigma, (Deutschland)
Glucose * H <sub>2</sub> O	198.17	g/mol	Carl Roth GmbH & Co
HCl	25	%	Fluka, Buchs, (Schweiz)
HEPES	238.30	g/mol	Sigma, (Deutschland)
<sup>3</sup> H–Glibenclamid	47-52	Ci/mmol	PerkinElmer Life Science
<sup>3</sup> H-P1075	117-121	Ci/mmol	Amersham Buchler, (Deutschland)
K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> -Tartrat	282.23	g/mol	Merck, (USA)
KCl	74.56	g/mol	Merck, (USA)
Lipofektamin 2000			Invitrogen
MEM+L-Gln+Earle´s Salze	500	ml	GibcoBRL–Life Technologies, (USA)

MgCl <sub>2</sub> E * 6 H <sub>2</sub> O	203.30	g/mol	Merck, (USA)
NaCl	58.44	g/mol	Merck, (USA)
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	105.99	g/mol	Merck, (USA)
NaOH	40.00	g/mol	Merck, (USA)
Optimem 1			Life Technologies
P1075	231.30	g/mol	Leo Pharmaceuticals, (Dänemark)
TRIS	121.14	g/mol	Fluka, Buchs, (Schweiz)
Ultima Gold	2.50	l	Packard Instruments, (USA)

**Tab. 4 Tabelle der verwendeten Reagenzien**

## 2.2 Puffer und Medien

Alle Puffer wurden im Kühlraum bei 6°C gelagert.

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

HEPES      10 mM

EGTA        1 mM

Beide Substanzen wurden in Aqua demin. gelöst und die Lösung im Kühlraum bei 6°C über Nacht gelagert. Der pH-Wert wurde danach auf Eis mit NaOH auf den Wert 7.4 eingestellt.

Puffer 2: Isotoner Puffer für HEK293-Zellmembranen.

HEPES      5 mM

NaCl        139 mM

KCl         5 mM

Von diesem Puffer wurden zwei Lösungen hergestellt, eine mit dem pH-Wert 7.4 bei 0°C und eine mit dem pH-Wert 7.4 bei 37°C. Die Substanzen wurden in Aqua demin. gelöst, entweder im Kühlraum (6°C) über Nacht gekühlt oder im

Wasserbad (37°C) erwärmt und der pH-Wert bei 0°C (auf Eis) bzw. bei 37°C mit NaOH (1 M) auf 7.4 eingestellt.

Puffer 3: Puffer zur Herstellung von Geneticin-Alliquots.

HEPES 100 nM

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

Waschpuffer: Zur Entfernung bzw. Auswaschung nicht gebundener Radioaktivität aus dem Filter und zum Stoppen der Inkubation.

TRIS 50 mM

NaCl 154 mM

Das Lösungsmittel für die Substanzen war Aqua demin.. Es wurde eine zehnfach konzentrierte Stammlösung angesetzt, die 1:10 zur Herstellung des Waschpuffers verdünnt wurde. Vor der Einstellung des pH-Wertes, wurde die Lösung über Nacht im Kühlraum bei 6°C abgekühlt. Der pH-Wert wurde bei 4°C (auf Eis) mit HCl auf 7.4 eingestellt.

Inkubationspuffer (100 ml): 300 µl werden beim Versuch in die Inkubationsansätze pipettiert.

<b><u>Substanz:</u></b>	<b><u>M:</u></b>	<b><u>in 200 ml:</u></b>
NaCl	139 mM	1.391 g
KCl	5 mM	0.074 g
HEPES	5 mM	0.238 g
MgCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	1.2 mM	240 µl (1M Lösung)
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	20 mM	0.336 g

---

CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	1.25 µM	250 µl (1M Lösung)
Glucose * H <sub>2</sub> O	11 mM	0.436 g



NaCl, KCl, HEPES, NaCO<sub>3</sub> und MgCl<sub>2</sub> \* 6 H<sub>2</sub>O werden mit Aqua demin. gelöst. Nachdem der Puffer 30 min bei 37°C mit Carbogen begast wurde, wird der pH-Wert bei 37°C auf 7.4 eingestellt. Nun erst wird Glucose \* H<sub>2</sub>O und CaCl<sub>2</sub> \* 2 H<sub>2</sub>O zugegeben. Der fertige Puffer wird für die gesamte Versuchszeit weiterhin mit Carbogen bei 37°C begast.

Hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum (FCS): Serumzusatz zum Zellkulturmedium.

Das hitzeinaktivierte fötale Kälberserum (FCS) enthält für die Kultivierung von HEK293-Zellen wichtige mitogene Faktoren. Um eine eventuelle Restaktivität von Serumproteasen zu stoppen wurde das bei -30°C gelagerte FCS aufgetaut und im Wasserbad bei 55°C für 1-2 Stunden unter gelegentlichem Schütteln hitzeinaktiviert. Danach wurde es bis zum weiterem Gebrauch im Kühlschrank bei 6°C aufbewahrt.

Kulturmedium für die HEK293-Zelllinie:

MEM ( <u>M</u> inimum <u>E</u> ssential <u>M</u> edium)	90% (v/v)
hitzeinaktiviertes FCS	10% (v/v)
Gentamycin	20 µg/ml

Die mit Aqua demin. hergestellte 6 ml-Gentamycinstammlösungen (c=2 mg/ml) wurden bei -20°C aufbewahrt und beim Herstellen des Kulturmediums aufgetaut und diesem zur Schutz vor bakterieller Besiedlung zugegeben (Endkonzentration c=0.04 µg/ml). Die Kulturmediumflaschen wurden bis zu ihrem nächsten Gebrauch stets im Kühlschrank bei 6°C gelagert. Aufgrund eines vom Hersteller zugesetzten Indikators konnte man problemlos erkennen, ob das Medium noch zu verwenden war, da eine Blaufärbung des Mediums den Umschlag ins Basische anzeigte und dieses somit für die Zellkultivierung nicht mehr verwendbar war.

Geneticin/Geneticinsulfat:

Die Substanz wurde in sterilem Puffer 3 gelöst in 1 ml Eppendorfgefäßen aliquotiert und im Kühlschrank bei -20°C aufbewahrt. Der pcDNA 3.1 Vektor

enthält neben der cDNA-Sequenz, die für die jeweilige SUR-Untereinheit des  $K_{ATP}$ -Kanals (SUR1, SUR2A oder SUR2B) kodiert, auch ein Resistenzgen für das Aminoglykosidantibiotikum Geneticin. Dieses Aminoglykosid-Antibiotikum wirkt auch auf eukaryontische Zellen toxisch. Somit werden durch die Gabe von Geneticin während der Zellkultivierung diejenigen HEK293-Zellen abgetötet werden, bei denen der Einbau der cDNA für die Untereinheit des  $K_{ATP}$ -Kanals nicht erfolgreich war. So erfolgt die notwendige Selektion der Zellen.

Gefriermedium: Kryokonservierung von HEK293-Zellen.

Es wurden jeweils beim Einfrieren von HEK293-Zellen frisch angesetzt:

Gefriermedium A:	MEM mit 40% (v/v) FCS
Gefriermedium B:	MEM mit 20% (v/v) DMSO

Nach Zugabe von Anteilen aus Gefriermedium A und B wurden die Zellen in einer Endkonzentration von 20% FCS und 10% DMSO eingefroren, wie in Kapitel 2.3.3 beschrieben.

Stammlösungen für die Proteinbestimmung:

LOWRY A:  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2% (w/v) in 0.1 M NaOH

LOWRY B:  $\text{CuSO}_4$  1% (w/v) in Aqua bidest.

LOWRY C:  $\text{K}^+/\text{Na}^+$ -Tartrat 2% (w/v) in Aqua bidest.

LOWRY D: Folin-Ciocalteu-Reagenz (2 M)

LOWRY A-C wurden als Stammlösungen hergestellt und bei Raumtemperatur aufbewahrt. LOWRY D wurde von dem Hersteller Fluka erworben.

LOWRY E:           LOWRY A: 98 Anteile  
                      LOWRY C: 1 Anteil  
                      LOWRY B: 1 Anteil

(die Reihenfolge A-C-B der LOWRY-Lösungen musste streng eingehalten werden um ein Ausflocken zu vermeiden).

LOWRY F:           LOWRY D:           1 Anteil  
                      Aqua. demin.:       1 Anteil

LOWRY E und F wurden für jede Proteinbestimmung frisch angesetzt.

### **2.3 HEK293 - Zellen**

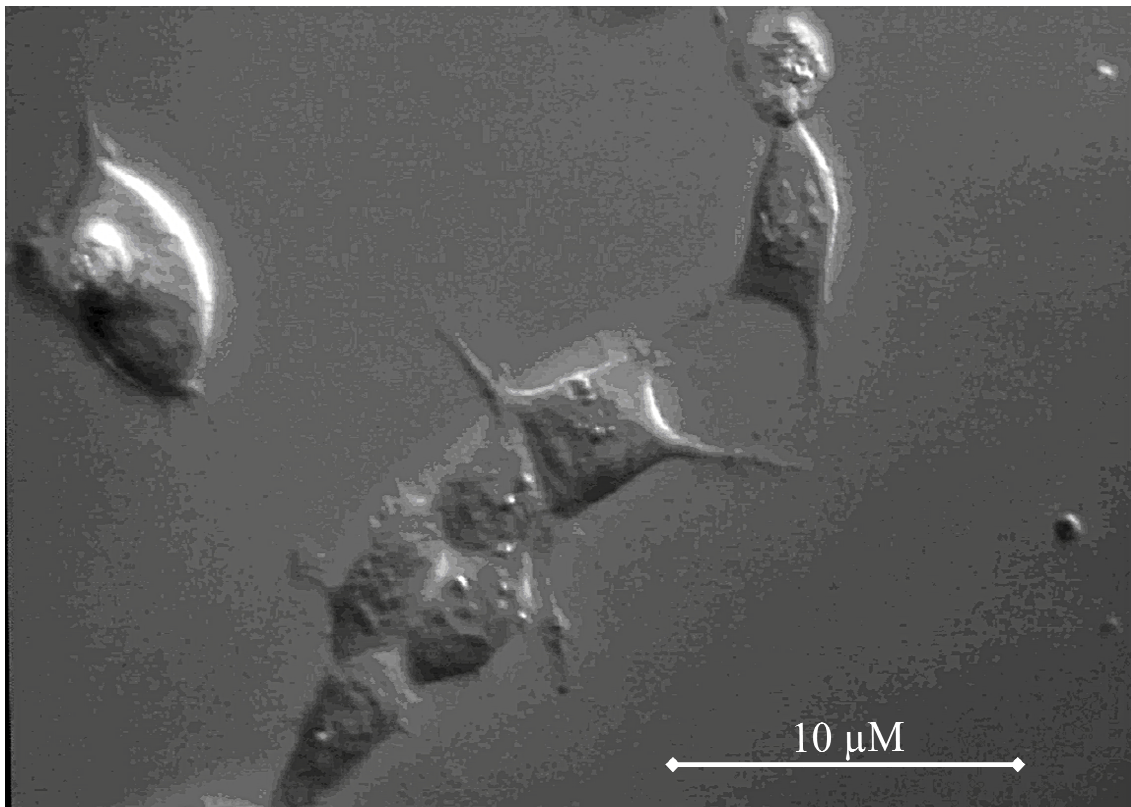
Die HEK293-Zellen stammen aus humanen, embryonalen Nierenzellen, die durch den DNA-haltigen Adenovirus Typ 5 tumorös transfiziert und so immortalisiert wurden (Graham et al.,1977).

Die HEK-Zelllinie wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) in Braunschweig (Deutschland), (Kat.-Nr. DSMACC305) bezogen.

#### **2.3.1 Kultivierung von HEK293 – Zellen**

Die Zellen wurden jeweils in 10 ml Kulturmedien in Petrischalen (Fa. Greiner, Frickenhausen) aus Plastik mit 9.4 cm Durchmesser bei einer Temperatur von 37°C im Brutschrank (Heraeus Instruments, Deutschland) kultiviert. Die Atmosphäre hatte ein Luft-CO<sub>2</sub>-Verhältnis von ~5% und war befeuchtet. Sobald die Zellen eine Konfluenz von 70-80% erreicht hatten (7-10 Millionen Zellen pro Schale), wurden die Zellen 1:2 bis 1:4 passagiert. Die Passage der Zellen ereignete sich wie folgt:

Zuerst wurde das alte verbrauchte Medium abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen zum Beispiel mit 3 ml bzw. 4 ml frischem erwärmten Medium abgespült und auf 3 bzw. 4 neue Kulturschalen verteilt (1:3) bzw. (1:4). Zu diesem 1 ml Zellprotein wurden 9 ml Medium und 100  $\mu$ l Geneticin pro Kulturschale hinzugefügt. Die Endkonzentration von Geneticinsulfat im Kulturansatz betrug 300  $\mu$ g/ml. Alle Arbeiten mit lebendigen Zellen wurden unter sterilen Bedingungen an einer Sterilbank mit laminar-air-flow (Hera Safe, Heraeus Instruments, Deutschland) durchgeführt.



**Abb.8 HEK293-Zellen niedriger Konfluenz im lichtmikroskopischen Bild.**

Die typischen Zellausläufer der HEK293-Zellen sind zu erkennen. Das Bild wurde im Differenz-Interferenz-Kontrastmodus bei 400-facher Vergrößerung aufgenommen ( $\mu$ M= $\mu$ m= $10^{-6}$  m)

### **2.3.2 Transfektion von HEK293-Zellen mit Lipofektamin™ 2000 Reagent**

Einen Tag vor der Transfektion wird bei einer Konfluenz von 70-80% das Medium gewechselt, indem man das alte Medium absaugt und dieses durch 10 ml Inkubationsmedium (MEM mit 10% FBS ohne Antibiotikum) ersetzt.

Zuallererst wurde das Optimem 1 im Wasserbad bei 37°C temperiert, die Sterilbank eingeschaltet und diese ca. 30 min. laufen gelassen. Die Petrischalen mit den zu transfizierenden Zellen wurden dann unter dem Mikroskop angeschaut und ihre Konfluenz bestimmt. Diese sollte 90-95% betragen und es sollte keine Kontamination durch Pilze oder Bakterien vorliegen.

Für die Transfektion wurden Petrischalen (mit 90-95% Konfluenz) verwendet, denen der pcDNA 3.1-Vektor (von Invitrogen) zugesetzt wurde, der die für murinen SUR2A (Genbank-Bestellnummer D86037) oder SUR2B (D86038) (Isomoto et al.,1996), Kir6.1 (D88159) (Yamada et al.,1997), oder Kir6.2 (D50581), (Inagaki et al.,1996) kodierende Sequenz enthielt.

Im Labor wurde die von Petra Kühner (Technische Assistentin der Abteilung für Molekularpharmakologie) extrahierte DNA (-20°C) für die Transfektion der HEK293-Zellen verwendet. Je nach Versuch wurde die entsprechende DNA vor der Transfektion aufgetaut. Pro Transfektion wurden je zwei Eppendorf-Reaktionsgefäße (ERG 2.0 ml) mit je 750 µl Optimem 1 vorbereitet. Im ersten ERG wird nun die DNA verdünnt (Standardmenge: SUR 6.4 µg DNA; Kir 4.0 µg DNA) und durch mehrmaliges auf- und abpipettieren gemischt. Im zweiten ERG wird das Lipofektamin 2000 (Cat.No.11668-027; Size: 0.75 ml; Cat.No.11668-019; Size: 1.50 ml) verdünnt (Standardmenge 37.5 µl Lipofektamin 2000). Das Lipofektamin schließt die Fremd-DNA in Liposomen, die von den Zellen aufgenommen wird. Die beiden Ansätze werden nun 5 min. inkubiert. Jetzt wird die DNA-Verdünnung zu der Lipofektamin-Verdünnung gegeben und ebenfalls durch auf- und abpipettieren gemischt. Das Gemisch wird bei Raumtemperatur 20 min. unter der Sterilbank inkubiert. Kurz vor Ende der Inkubationszeit werden die zu transfizierenden Zellen aus dem Brutschrank genommen und pro

Schale 4 ml Medium abgesaugt. Nach Ende der Inkubationszeit wird das DNA-Lipofektamin-Gemisch vorsichtig auf die Zellkulturplatte getropft. Durch sehr vorsichtiges Schwenken der Petrischale verteilt sich das Gemisch gleichmäßig auf der Platte. Die transfizierten Zellkulturen werden nun zwei Tage im CO<sub>2</sub>-Brutschrank bei 37°C inkubiert. Erst nach diesen 48 Stunden sind die Zellen für einen Versuch zu verwenden.

Die stabil exprimierenden Zelllinien (Hambrock et al.,1998) wurden wie unter 2.3.4 geschrieben aufgetaut und kultiviert.

### **2.3.3 Einfrieren von HEK293-Zellen**

Eingefroren werden konnten nur Zellkulturplatten, die eine Konfluenz von 70-80% erreicht hatten (7-10 Millionen Zellen pro Schale). Das alte Medium wurde zunächst von den Petrischalen abgesaugt und die Zellen mit 4 ml Gefriermedium A von der Zellkulturplatte abgelöst und anschließend bei 500×g, 5 min. zentrifugiert. In der Zwischenzeit wurden die einzelnen Kryoröhrchen mit 500 µl Gefriermedium B gefüllt (vgl. 2.2 "Gefriermedium", Seite 52). Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen mit 500 µl Gefriermedium A pro Schale resuspendiert. Nach der Zugabe von 500µl Zellsuspension zu den Kryoröhrchen (Cryo´s, Greiner Labortechnik), musste man schnellst möglich arbeiten, da DMSO zwar eine Zerstörung der Zellen durch das Einfrieren bzw. Auftauen verhindert, bei Raumtemperatur jedoch zytotoxisch für die Zellen ist. Über Nacht wurden die Zellen bei -80°C in der Tiefkühltruhe gelagert und am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff (-180°C) überführt.

### **2.3.4 Auftauen von HEK293-Zellen**

Um den Kontakt der Zellen mit der äußerst schädlichen Detergenz DMSO möglichst kurz zu halten wurde das Auftauen relativ rasch durchgeführt.

Es wurden ca. 30 ml Kulturmedium (37°C) in ein 50 ml-Falcon-Tube (Becton Dickinson, NJ, USA) vorgelegt. Ein aus dem flüssigen Stickstoff (-180°C) entnommenes Kryoröhrchen wurde schnell im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, bei dem gerade noch ein Eisstift erkennbar war. Die Zellsuspension wurde dann rasch aus dem Röhrchen in das bereits vorbereitete 50 ml-Falcon-Tube überführt und somit im Kulturmedium verdünnt und bei 200xg, 2-3 min. zentrifugiert. Der entstandene Bodensatz aus aufgetauten HEK293-Zellen wurde in 10 ml Kulturmedium erneut resuspendiert und auf eine Petrischale mit 9.4 cm Durchmesser geimpft. Die erste Kultivierung erfolgt dann ohne Geneticin, um ein gutes Anwachsen der Zellen zu erreichen. Nach etwa 3 Tagen Bebrütung der Zellen im Brutschrank (37°C; Luft-CO<sub>2</sub>-Gemisch) können die Zellen dann 1:3 bzw. 1:4 passagiert werden (je nach Zelldichte und Aussehen) und unter Zugabe von 300 µg/ml Geneticin im Brutschrank kultiviert werden.

#### **2.4 Proteinbestimmung nach Lowry**

Die Grundlage der Proteinbestimmung nach Lowry (Lowry et al., 1951) stellt eine mit Rinderserumalbumin (BSA) erstellte Standardmesskurve dar, wobei das BSA in verschiedenen Konzentrationen in NaOH (0.1 M) gelöst wurde. Diese Konzentrationsreihe mit BSA wurde als Eichgerade aufgetragen (Abb.9). Es stellte sich heraus, dass die sich im Inkubationspuffer befindende Substanz HEPES mit der Proteinbestimmung erheblich interferiert. Der Grund dafür bilden freie Stickstoffgruppen in der Strukturformel dieser Substanz. Es wurde ebenfalls eine Extinktionskurve für verschiedene HEPES-Konzentrationen angefertigt. Die Konzentrationsreihe wurde ebenfalls mit 0.1 M NaOH hergestellt. Es wurde bei jedem Versuch 70 µl Zellprotein und 70 µl Inkubationspuffer in je ein Eppendorfgefäß (2.0 ml) pipettiert und mit 0.1 M NaOH-Lösung 1:10 verdünnt, so dass die Proteinkonzentration und die Pufferkonzentration im linearen Bereich der Standardmesskurven bestimmt werden konnten. Die Proteinbestimmung wurde in Halbmikroküvetten vorgenommen. Zu 200 µl der verdünnten Protein- bzw. Pufferlösung wurden 1 ml Lowry E zugegeben und 5 min. inkubiert. Dann gab man 100 µl Lowry F zu.

Die gefüllten Küvetten wurden mit Parafilm abgedichtet, gut durchgemischt und bei Raumtemperatur 20 min. inkubiert. Als Leerwert diente 200 µl einer 0.1 M NaOH-Lösung mit der gleich verfahren wurde. In einem Spektralphotometer (Hitachi U-3.000) wurde die Proteinkonzentrationsmessung durchgeführt. Die Wellenlänge der Wolframlampe beträgt dabei 770 nm bei einer Spaltbreite von 5 nm. Die jeweilige optische Dichte ( $OD_{770}$ ) des Proteins bzw. 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 lag somit im linearen Bereich der Kurve, wie auch der Anfang der Kurve bei der Puffersubstanz HEPES. Die zur Berechnung der Proteinkonzentration gebildete Differenz zwischen der Proteinextinktion und Pufferextinktion ist somit ebenfalls linear. Die Funktion der Eichgeraden, die unter der Proteinextinktion von 0.3 angewendet werden konnte lautet:

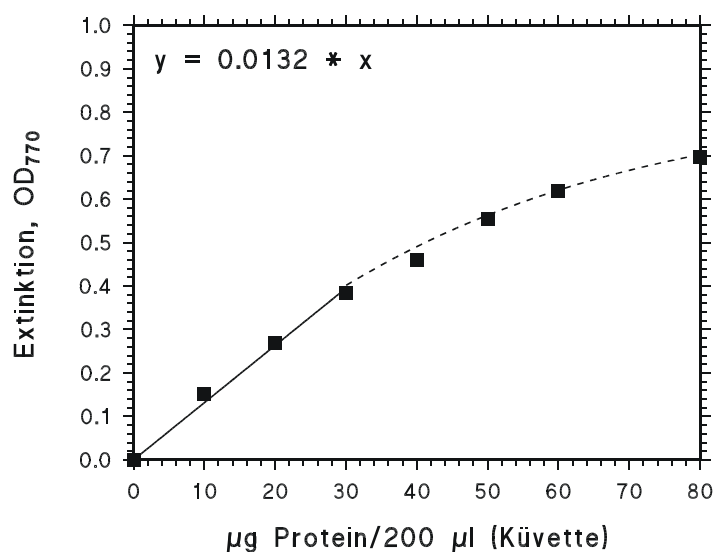
$$OD_{770} = 0,0132 \cdot c_{\text{Prot}} \quad \text{bzw.} \quad m_{\text{Prot}} = \frac{OD_{770}}{0,0132}$$

**Gleichung a bzw. b**

$c_{\text{Prot}}$  = Proteinkonzentration in der Küvette in µg/200 µl

$OD_{770}$  = Extinktionsdifferenz Protein-Puffer.

Bei evtl. zu hohen Proteinkonzentrationen wurde stärker verdünnt.



**Abb. 9** Eichkurve für die Proteinbestimmung nach Lowry.



Die im Anfangsbereich durchgezogene Kurve (siehe Abb.9) zeigt den linearen Bereich bei 30 µg Protein/200 µl. Berücksichtigt man alle Messpunkte, so erhält man eine Sättigungsfunktion, wie die gestrichelte Linie erkennen lässt.

## **2.5 Radioligand-Bindungsexperimente**

Rezeptorenanzahl und Affinität zwischen Rezeptor und Radioligand bzw. zwischen Rezeptor und nicht radioaktiv markiertem Liganden lassen sich experimentell durch Gleichgewichtsexperimente bestimmen. Darüber hinaus lässt sich die Assoziation und die Dissoziation als zeitlicher Bindungsverlauf des Radioliganden-Rezeptor-Komplexes durch die spezielle Ligand-Rezeptor-Kinetik ebenfalls durch Experimente zur graphischen Darstellung bringen.

Ganz allgemein unterscheidet man zwischen folgenden Ligand-Rezeptor-Interaktionen:

### **1.) Kompetitiver Ligand:**

Der nicht markierte Ligand tritt mit dem Radioligand in Konkurrenz um die Bindungsstelle. Die (spezifische) Bindung des Radioliganden kann dadurch vollständig verdrängt werden.

### **2.) Allosterischer Modulator:**

Ein allosterischer Aktivator (z.B. MgATP) der an den NBF ansetzt, erhöht die Bindung eines Öffners (z.B. <sup>3</sup>H-P1075) (Hambrock et al.,1998). Für <sup>3</sup>H-GBC wird eine Hemmung beobachtet (Hambrock et al.,2001; 2002). Dieser Wechselwirkung zwischen Öffnern und Sulfonylharnstoffen am SUR liegt ein allosterischer Effekt zugrunde (Bray and Quast,1992; Schwanstecher et al.,1992).

### **2.5.1 Die Wahl des Radioliganden**

Zum einen muss der Radioligand eine ausreichende Affinität zum Rezeptor besitzen, zum anderen sollte seine Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) im nano-(n-) oder subnanomolaren Bereich liegen. Die biologische Wirkung sollte sich durch

die radioaktive Markierung nicht verändern, da sonst ein Vergleich mit der Ausgangssubstanz unmöglich ist. Diesen Vorteil machen sich die Tritium markierten Liganden zunutze, da mit Tritium markierte Liganden, im Gegensatz zu jodierten Liganden, kaum Veränderungen in den chemischen Eigenschaften zeigen. Darüber hinaus sollte der Anteil der unspezifischen Bindung an der spezifischen gering sein. Durch die sehr lange Halbwertszeit (12.26 Jahre) von Tritium ( $^3\text{H}$ ) ändert sich die spezifische Aktivität des Radioliganden im Versuchszeitraum so gut wie nicht; daher eignen sich  $^3\text{H}$ -markierte Liganden für Bindungsstudien besonders gut. Andererseits bringt ein  $^3\text{H}$ -Atom nur einen spezifische Aktivität von  $\sim 30$  Ci/mmol ein. Für die Bindungsmessungen an den SUR-Typen wurden zwei Radioliganden verwendet, die beide mit  $^3\text{H}$ , den Radioisotop Tritium markiert waren, verwendet. Das war zum einen:

### **1.) $^3\text{H}$ -GBC:**

Der  $K_{\text{ATP}}$ -Kanalblocker Glibenclamid (GBC) bindet mit deutlich höherer Affinität an SUR1 ( $K_{\text{D}} \sim 1$  nM) als an SUR2 ( $K_{\text{D}} \sim 30$  nM) (Hambrock et al., 1998). Das in den Versuchen verwendete  $^3\text{H}$ -GBC hatte eine spezifische Aktivität (SA) von 47-52 Ci/mmol.

$^3\text{H}$ -GBC hat starke amphiphile Eigenschaften, deshalb sollte darauf geachtet werden, dass die Aliquots zur Bestimmung der totalen (absoluten) Radioaktivität stets kurz vor dem Filtrieren entnommen werden, da dieser Radioligand sehr stark an der Wand der Reaktionsgefäßes haftet und sich dann erst nach gewisser Zeit nach und nach aus der Wand löst. Dies führt zu einer Verfälschung der Konzentrationswerte, da im Rest des Ansatzes so eine erhöhte Radioaktivitätskonzentration gemessen wird. Aus demselben Grund ist bei der Labelstammlösung darauf zu achten, dass diese immer 10% EtOH enthält. Zu jedem Ansatz (10  $\mu\text{l}$  zu untersuchende Substanz + 475  $\mu\text{l}$  Puffer + 500  $\mu\text{l}$  Zellprotein) werden dann jeweils 25  $\mu\text{l}$  Radioligandstammlösung pipettiert, so dass jeder Ansatz 0.25% EtOH enthält. Bei dieser Konzentration an EtOH sind konstante Konzentrationen an  $^3\text{H}$ -GBC zu erwarten. Die nichtspezifische Bindung wird bei Glibenclamid (im Gegensatz zu Messungen mit P1075) mit 100  $\mu\text{M}$  P1075 und nicht homolog mit GBC bestimmt, da in den HEK-Zellen endogene Bindungsstellen für GBC vorhanden sind, die jedoch

keine Öffnerempfindlichkeit besitzen und somit für diese Untersuchungen nicht relevant sind (Hambrock et al.,2001).

## **2.) <sup>3</sup>H-P1075:**

Der  $K_{ATP}$ -Kanalöffner bindet mit guter Affinität an SUR2B ( $K_D \sim 5-10$  nM) (Bray and Quast,1992), kaum dagegen an SUR1 ( $K_D >100$   $\mu$ M). Das bei den Versuchen verwendete P1075 hatte eine SA von  $\sim 117-121$  Ci/mmol und eine Konzentration von  $\sim 5$   $\mu$ M. Durch die sehr geringe nichtspezifische Bindung ist P1075 ein sehr gut geeigneter Ligand für Bindungsstudien. Die nichtspezifische Bindung wurde in den Versuchen dieser Arbeit mit 100  $\mu$ M P1075 bestimmt.

### **2.5.2 Die Gewinnung von Rezeptormaterial**

In dieser Arbeit wurden Versuche an ganzen, intakten Zellen gemacht. Diese Zellen stammten zum Teil aus Zelllinien, die permanent transfiziert waren (z.B. SUR1-Zelllinie oder SUR2A(Y1206S)-Zelllinie) oder transient transfizierte Zellen. So mussten die Zellen je nach Gebrauch aufgetaut (2.3.4), passagiert (2.3.1), eingefroren (2.3.3) oder transfiziert (2.3.2) werden, um das Ausführen von Versuchen zu ermöglichen. Die jeweiligen Prozeduren sind in den jeweiligen Kapiteln erläutert.

### **2.5.3 Die Inkubation**

Die Bindungsreaktionen wurden durch Zugabe der Zellen bzw. des Zellproteins in 500  $\mu$ l zum Reaktionsgemisch-Ansatz (475  $\mu$ l Inkubationspuffer (vgl. 2.2, Inkubationspuffer) + 10  $\mu$ l der zu untersuchenden Substanz in der jeweiligen Konzentration + 25  $\mu$ l der Radioligandenstammlösung) gestartet. Bei der Inkubation müssen bestimmte Bedingungen, je nach Versuch, erfüllt sein. Dazu gehört eine bestimmte Temperatur, eine genau festgelegte Inkubationszeit und eine spezielle Zusammensetzung des Inkubationsmediums.

### **1.) Inkubationstemperatur:**

Die Temperatur während der Versuche sollte der physiologischen Körpertemperatur des Menschen entsprechen. Deshalb wurde die Temperatur auf 37°C im Wasserbad festgelegt.

### **2.) Inkubationszeit:**

Bei Gleichgewichtsexperimenten wird vorausgelegt, dass gemäß dem Massenwirkungsgesetz (MWG) die Gleichgewichtslage im Versuch erreicht wird. Die Einstellungsgeschwindigkeit des Gleichgewichtes ist nicht nur von den kinetischen Konstanten, sondern auch von der Konzentration der verschiedenen Teilnehmer an der Reaktion abhängig. Daraus folgt, dass die kleinsten Konzentrationen des Rezeptors bzw. des Liganden, die im Versuch vorkommen, entscheidend für die Festlegung der Inkubationszeit sind.

Die Inkubationszeit wurde durch ein Assoziationsexperiment ermittelt. Dabei wurde die Zeit so gewählt, dass der Radioligand-Rezeptor-Komplex die Gleichgewichtslage erreicht hatte. Dies war bei SUR2A nach 13 min. und SUR2B nach 30 min., mit P1075 bestimmt, der Fall. Mit <sup>3</sup>H-GBC bei SUR2A(Y1206S) und SUR2B(Y1206S) nach 15 min. und bei SUR1 ebenfalls nach 15 min. Wird längere Zeit inkubiert, so fällt die spezifische Bindung mit der Zeit ab und es liegt ein negativer Zeittrend vor, der mit Hilfe einer rechnerischen Korrektur in Form einer linearen Interpolation verbessert werden muss.

### **3.) Inkubationsmedium:**

Der verwendete Inkubationspuffer (Zusammensetzung siehe 2.2) wurde vor Beginn des Versuchs auf den physiologischen pH-Wert des Körpers (pH=7.4) eingestellt. Dies wurde durch Zugabe unterschiedlicher Mengen von zuvor hergestellten HCl- bzw. NaOH-Verdünnungsreihen (0.06 mM, 0.6 mM, 6 mM) erreicht. Es ist jedoch von immenser Wichtigkeit, dass der pH-Wert bei der Temperatur, bei der anschließend inkubiert wird, eingestellt wird, da der pH-Wert bekannterweise von der Temperatur abhängig ist.

#### **2.5.4 Die Trennung von gebundenem und freiem Radioliganden durch die Filtration**

Am Ende der Inkubationszeit muss der Radioligand-Rezeptor-Komplex vom freiem Radioliganden getrennt werden. Dies wird durch die Filtration erreicht. Aus den Ansätzen, die 1.01 ml enthielten wurden drei Aliquots ( $V=0.3$  ml) in je 8 ml eiskaltem Waschpuffer verdünnt und unter Vakuum über Glasfaserfilter (Whatman GF/C) in einer Filtrationsapparatur mit Hilfe einer Vakuumpumpe abgesaugt. Der Waschpuffer muss dabei eiskalt ( $\sim 4^{\circ}\text{C}$ ) sein, um die Reaktion zu stoppen und das sich bei der Inkubation bei  $37^{\circ}\text{C}$  eingestellte Gleichgewicht (siehe Kapitel 2.6) zu fixieren. Die Poren dieses Filters sind enger als die festen Bestandteile des Präparats und halten diese somit zurück. Um die unspezifisch im Präparat gebundene Radioaktivität zu entfernen wurde schnell zwei mal hintereinander mit 8 ml eiskaltem Waschpuffer nachgespült.

#### **2.5.5 Die Messung der Radioaktivität**

Da Tritium ( $^3\text{H}$ ) Betastrahlen emittiert, erfolgt die quantitative Erfassung der Radioaktivität der einzelnen Filter mittels eines Flüssigszintillators in einem Szintillator mit Szintillationszähler. Um eine absolute Bestimmung vorzunehmen ist es notwendig die Zählhausbeute des Gerätes zu wissen. Alle Versuche dieser Arbeit wurden mit einem TRI-CARB® Liquid Scintillation Analyser 2000CA von PACKARD mit einer Zählhausbeute von ca. 54% durchgeführt, d.h. der Zähler detektiert 54% der Zerfälle pro Minute (dpm). Jeder Messpunkt wurde in den einzelnen Versuchen drei mal bestimmt und daraus das arithmetische Mittel berechnet.

$$f = 0.54 = (\text{gemessene Impulse/min.}) / (\text{Zerfälle/min.}) = \text{cpm} / \text{dpm}$$

Da die Auswertung von Bindungsexperimenten in Konzentrationseinheiten erfolgt, ist die Umrechnung von dpm in molare und submolare Einheiten erforderlich:

$$c[\text{mol/l}] = \frac{\text{gezählte dpm}}{(2.2 * 10^{12} \text{ (dpm/Ci)} * \text{SA (Ci/mmol)} * V \text{ (ml)})} = \text{mol/l}$$

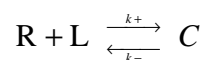
**Gleichung 1**

- V = Volumen in ml
- c = Konzentration in mol/l
- SA = Spez. Aktivität in Ci/mmol
- 1 Ci =  $2.2 * 10^{12}$  dpm/min

## 2.6 Modell der Rezeptorbindungsstudien

Im einfachsten Fall bindet, gemäß dem zum erstmal von den Norwegern C.M. Gouldberg und P. Waage (1867) formulierten Massenwirkungsgesetz (MWG) ein Ligand an eine Bindungsstelle am Rezeptor; die Rezeptorpopulation in der Präparation sei homogen. Diese Komplexbildung ist grundsätzlich reversibel, wobei die Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) ein Maß für die Stärke der Bindung ist.

Es wird die Bindung eines Radioliganden L an eine Klasse von nicht miteinander wechselwirkenden Bindungsstellen angenommen. So lautet das einfachste Modell für die Bindung eines Liganden (L) an einen Rezeptor (R):



### **Gleichung 2**

- L = freie Ligandkonzentration
- C = Rezeptor-Ligand-Komplex
- $k^+$  = Assoziationsgeschwindigkeitskonstante ( $M^{-1}s^{-1}$ )
- $k^-$  = Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante ( $s^{-1}$ )

Die Hin- und die Rückreaktionen sind durch die kinetischen Konstanten  $k_+$  und  $k_-$  gegeben. Gemäß Definition ist das dynamische Gleichgewicht dann erreicht, falls pro Zeiteinheit gleichviel Komplex C zerfällt, wie gebildet wird.

Nach den bereits erwähnten Persönlichkeiten gilt das MWG:

$$K_D = k_- / k_+ = (R \cdot L) / C \quad \text{Gleichung 3}$$

$K_D$ =Gleichgewichtsdissoziationskonstante in mol/l

Weiterhin gelten die folgenden Gleichungen:

$$R_o = R + C \quad \text{daraus folgt: } R = R_o - C \quad \text{Gleichung 4.1}$$

$$L_o = L + C \quad \text{daraus folgt: } L = L_o - C \quad \text{Gleichung 4.2}$$

$R_o$  = totale Rezeptorkonzentration(=frei + gebunden)

$L_o$  = totale Ligandkonzentration(=freier + gebundener Ligand)

Gleichung (4.1 und 4.2) werden in (3) eingesetzt; so erhält man:

$$K_D = ((R_o - C) \cdot (L_o - C)) / C$$

Die Experimente werden unter solchen Bedingungen gemacht, dass näherungsweise anzunehmen ist:

$$L_o \gg R_o \Rightarrow L_o \sim L \quad \text{Gleichung 4.3}$$

Die totale Ligandenkonzentration ist also viel größer als die totale Rezeptorkonzentration, so dass der an die Rezeptoren gebundene Teil des Radioliganden dabei nicht über 5% betragen sollte.

Die spezifische Bindung des Radioliganden wird im Versuch durch die nicht-spezifische Bindung (=NSB=unspezifisches Haftenbleiben des Radioliganden am Protein und am Filter selbst) überlagert.

Die NSB wurde in den Versuchen bestimmt nachdem die spezifische Bindung durch Überschuss an kaltem Liganden ( $L_{\text{kalt}}=1000 \cdot K_D$ ) blockiert wurde. Im Experiment werden jeweils NSB und  $B_{\text{tot}}$  bestimmt (jeweils

Dreifachbestimmungen aus denen das arithmetisch Mittel gebildet wird). Daraus lässt sich folglich die spezifische Bindung ( $B_s$ ) berechnen:

$$B_s = B_{tot} - NSB; \quad B_s \equiv C \quad \text{Gleichung 5}$$

Wenn 4.1-4.3 angenommen und in die Gleichung 3 eingesetzt werden ergibt sich:

$$K_D = ((R_o - C) * L_o) / C$$

aufgelöst nach C errechnet sich die Funktion:

$$C = (R_o * L_o) / (L_o + K_D) \quad \text{Gleichung 6}$$

Gleichung 6 stellt die Abhängigkeit der Komplexkonzentration im Gleichgewicht als Funktion der zugegebenen Ligandkonzentration dar. Aus dieser hyperbolischen Beziehung lassen sich  $K_D$  und  $R_o$  durch nichtlineare Regression berechnen.

Bei jedem Versuch stellt sich die Frage wieviel % des Labels gebunden sind. Man spricht auch vom sog. Sättigungsgrad,  $y$ :

$$y = C / R_o; \quad \text{wobei gilt: } 0 < y < 1 \quad \text{Gleichung 7}$$

Bei Konkurrenzexperimenten sollte der Sättigungsgrad möglichst klein sein, um die notwendige Vereinfachung in der Gleichung 4.3 durchführen zu dürfen. Einsetzen von Gleichung 6 in 7 ergibt:

$$y = (R_o * L_o) / ((L_o + K_D) * R_o)$$

Daraus folgt:

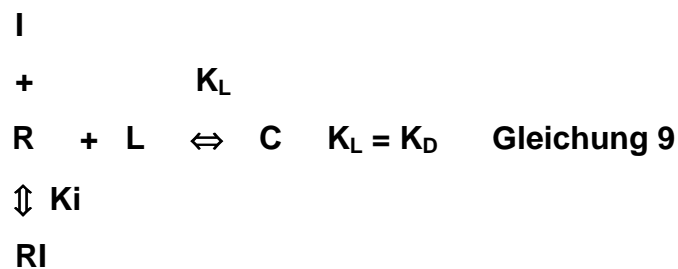
$$y = L_o / (L_o + K_D) \quad \text{Gleichung 8}$$



### 2.6.1 Konkurrenzexperiment

Bei dieser Art eines Experimentes konkurrieren ein radioaktiv markierter und ein nicht markierter Ligand um dieselbe Rezeptorbindungsstelle. Bei der homologen Konkurrenz konkurrieren radioaktiv markierte und unmarkierte Liganden der selben Substanz miteinander (z.B.  $^3\text{H}$ -GBC gg. GBC). Heterologe Konkurrenz bzw. Verdrängung bedeutet, dass zwei verschiedene Substanzen miteinander im Wettbewerb um die Bindungsstelle am Rezeptor stehen. Durch diese Art Versuch lässt sich der  $\text{IC}_{50}$ -Wert (Konzentration des Kompetitors, welche dessen halbmaximale Bindung bewirkt bzw. die  $B_s$  des Radioliganden um 50% erniedrigt) des unmarkierten Kompetitors und zusätzlich wichtige Hinweise bezüglich möglicher Heterogenität von Bindungsstellen herausfinden. Aus dem ermittelten  $\text{IC}_{50}$ -Wert einer Substanz lässt sich bei der homologen Verdrängung/Konkurrenz die  $K_D$  bzw. bei heterologer Konkurrenz durch Anwendung der Cheng-Prusoff-Korrektur die  $K_i$  (Gleichgewichts-Dissoziations-Konstante des unmarkierten Inhibitors) berechnen. Jedoch kann die  $K_i$  nur ermittelt werden, wenn zuvor mittels eines Sättigungsexperimentes die  $K_D$  des Radioliganden bestimmt wurde.

Man setzt folgenden Reaktionsmechanismus voraus:



- I = Inhibitor
- R = Rezeptor
- RI = Rezeptor-Inhibitor-Komplex (reversibel)
- L = Radioligand
- C = Rezeptor-Radioligand-Komplex (reversibel)
- $K_L$  = Dissoziationskonstante des Radioliganden
- $K_i$  = Dissoziationskonstante des unmarkierten Inhibitors

Voraussetzungen sind:

- 1.) Es gibt nur eine Klasse von Rezeptoren bzw. Bindungsstellen in der Präparation.
- 2.) Es herrscht Konkurrenz zwischen I und L um R.
- 3.) C ist die beobachtbare Größe. Man misst die Abnahme von C bei steigenden Konzentrationen von I. Es ergibt sich somit eine Hemmungskurve.

Die Experimente sollten so durchgeführt werden, dass  $R_0 \ll L_0, I_0$  [Das Suffix 0 beschreibt die totale (zugegebene) Konzentration].

Im Gleichgewicht gelten nach dem MWG:

$$K_L = (R \cdot L) / C \qquad \text{Gleichung 10.1}$$

$$K_i = (R \cdot I) / RI \qquad \text{Gleichung 10.2}$$

Unter Beachtung der Bedingungen  $R_0 \ll L_0, I_0$  und  $R_0 = R + C + RI$  folgt:

$$C / R_0 = C / (R + C + RI)$$

Einsetzen der MWG (10.1 und 10.2) und Kürzen von R ergibt:

$$C / R_0 = (L / K_L) / (1 + L / K_L + I / K_i) = (L / K_L) \cdot K_i / [K_i (1 + L / K_L) + I] \qquad \text{Gleichung 11}$$

Erweiterung des Bruches mit  $1 + L / K_L$  ergibt:

$$C = R_0 \cdot L / K_L \cdot (1 + L / K_L)^{-1} \cdot K_i (1 + L / K_L) \cdot (K_i (1 + L / K_L) + I)^{-1}$$

$$C = \qquad \qquad \qquad C(0) \qquad \qquad \qquad \text{Für } I \rightarrow 0 \rightarrow 1 \qquad \qquad \qquad \text{Gleichung 12}$$

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

Die Beziehung zwischen  $IC_{50}$  und  $K_i$  wird Cheng -Prusoff-Gleichung (Cheng and Prusoff,1973) genannt und erlaubt die Berechnung von  $K_i$ :

$$IC_{50} = K_i * ( 1 + L / K_L ) \quad \text{Gleichung 13}$$

Dabei muss  $K_L$  bekannt sein.

Für die homologe Konkurrenz, d.h. Verdrängung des Radioliganden durch sein unmarkiertes ("kaltes") Analogon gilt:

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

**Gleichung 14**

Logarithmiert:

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

**Gleichung 15.1 und 15.2**

Wenn man nun die Cheng-Prusoff-Gleichung einbringt lässt sich die Hemmkurve beschreiben als:

$$C = C(0) * IC_{50} / ( IC_{50} + I )$$

**Gleichung 16.1**

Logarithmiert man und setzt Gleichung 15.1 und 15.2 ein, so erhält man die Gleichung 16.2 :

$$C = C(0) / ( 1 + 10^{(pIC_{50} - pI)} )$$

**Gleichung 16.2**

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

$$y \equiv C / R_0 = L / ( L + K ) = ( 1 + K / L )^{-1}$$

**Gleichung 17**

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

$$B_{MAX} = C / y = ((L + K) / L) * C = C (1 + K / L)$$

**Gleichung 18**

### 2.6.2 Verallgemeinerung der Bindungsisotherme nach Hill

Wenn der nichtmarkierte Ligand nicht mit dem Radioliganden kompetitiv ist oder der Radioligand ein kompliziertes Bindungsverhalten zeigt, ist die Bindungsisotherme steiler oder flacher als es der Gleichung 16.1 und 16.2 entspricht. In diesem Fall werden diese beiden Gleichungen durch die Einführung eines Exponenten (sog. Hill-Koeffizient= $n=n_H$ ) verallgemeinert. Für die Inhibitionskurve gilt somit:

$$B_s = B_s(0) / (1 + 10^{n(pIC_{50} - pI)})$$

**Gleichung 19**

Dabei gilt:  $B_s(0) = B_s$  zum Zeitpunkt  $t=0$ , d.h. in Abwesenheit des nichtmarkierten Liganden. Es lassen sich für Bindungsstudien durch  $n_H$  folgende Schlussfolgerungen ziehen.

Die verschiedenen Hill-Koeffizienten lassen bzw. jeder beliebige Hill-Koeffizient lässt sich in eine der auf der nächsten Seite erklärten drei Gruppen ( $n_H=1$ ;  $n_H<1$ ;  $n_H>1$ ) einteilen.

Bei:

$n_H = 1$ :	<b>Übliche Bindungsisotherme.</b> Es existiert nur einer Klasse von nicht miteinander in Wechselwirkung stehenden Bindungsstellen.
$n_H > 1$ :	<b>Positive Kooperativität.</b> Es binden mehrere Ligandenmoleküle mit steigender Affinität an den Rezeptor und führen durch allosterische Modulation zu einer erhöhten Radioligandenbindung.
$n_H < 1$ :	<b>Negative Kooperativität.</b> Durch die Bindung des ersten Liganden wird die Bindung weiterer Liganden erschwert. Dieses Prinzip der negativen Kooperativität kommt in der Natur nur sehr selten vor. Meist sind in der Präparation mehrere Klassen von Bindungsstellen enthalten, die sich in ihrer Affinität für den Liganden um weniger als einen Faktor 10-30 unterscheiden. Da die einzelnen Komponenten dann nicht mehr deutlich voneinander getrennt sind, ergibt sich eine flach abfallende Kurve.

Im Falle einer unvollständigen Hemmung gilt die Gleichung 20 (siehe 2.7.1)

## 2.7 Datenauswertung und Statistik

### 2.7.1 Die Analyse der Bindungskurven

Die einzelnen Bindungsexperimente wurden durch eine Anpassung der logarithmierten Hill-Gleichung an die Daten ausgewertet: (**1-Komponenten-Modell**; siehe Gleichung 19 und 20).

Im Falle, dass die Bindungsversuche darauf hinwiesen, dass  $A \sim 100\%$  und der Hill-Koeffizient  $n_H \sim 1$  waren, wurden diese beiden Parameter als Konstanten in die Anpassung eingegeben, um die Fehler der verbleibenden Parameter zu verringern.

Die Anpassung erfolgte nach der Methode der kleinsten Fehlerquadranten mit dem Programm Sigma Plot 6.1/ Sigma Plot 2000 ( SPSS Science, Chicago, USA).

Dabei gilt:

$$y = [ A / ( 1 + 10^{(n * (pIC_{50} - pl))} ) ] + ( 100 - A )$$

**Gleichung 20**

y = %Bs (% der spezifischen Bindung)

A = Amplitude (maximale Hemmung); A=100 → vollständige Hemmung

pl = -logI (wobei I die Konzentration des homologen bzw. die Konzentration des heterologen Inhibitors darstellt).

pIC<sub>50</sub> = -log IC<sub>50</sub>. Der IC<sub>50</sub>-Wert ist der Mittelpunkt bzw Wendepunkt der Hemmkurve.

n = n<sub>H</sub> = Hill-Koeffizient

### 2.7.2 Statistik

Die Amplituden A und die pIC<sub>50</sub>- bzw. die pKi-Werte sind normalverteilt (Christopoulos,1998). Daher wurden aus den experimentell ermittelten Daten durch Angleichung an die Gleichung 16, 19 bzw. 20 zunächst die pIC<sub>50</sub>-Werte ermittelt. Danach wurde bei heterologer Verdrängung mit der Cheng-Prusoff-Korrektur (siehe Gleichung 13) bzw. bei homologer Kompetition (siehe Gleichung 14) die Ki- bzw. die K<sub>D</sub>-Werte errechnet. Daraus wurden die pKi- bzw. die pK<sub>D</sub>-Werte als negativer dekadischer Logarithmus der Ki- bzw. K<sub>D</sub>-Werte errechnet. Anschließend wurden die arithmetischen Mittel der pK<sub>D</sub>- bzw. der pKi-Werte aus den Einzelversuchen gebildet und deren Standardabweichung des Mittelwertes, sog. SEM (standard error of the mean), errechnet. Die Konfidenzintervalle der entsprechenden K<sub>D</sub>- bzw. Ki-Werte wurden wie folgt berechnet:

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

**Gleichung 21**

Die so gewonnenen Parameter sind in die Ergebnistabellen eingetragen.

Unter der Voraussetzung der Normalverteilung und der Voraussetzung, dass die beiden zu vergleichenden Stichproben der gleichen Grundgesamtheit entstammen, lassen sich der student's t-test, sowie andere parametrische Tests anwenden.

Zum Vergleich von Messserien wurden die Amplituden und die  $pIC_{50}$ -Werte als normalverteilte Variablen (Smirnow-Kolmogorow Test) einer einfachen Varianzanalyse unterzogen und eventuelle Unterschiede mit geeigneten Tests (z.B. mit dem student's t-test) auf ihr Signifikanzniveau untersucht (SigmaPlot, SPSS Inc.).

Die Einzelexperimente wurden ausgerechnet und die erhaltenen Parameter (A,  $pK_D$ ) anschließend gemittelt.

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

Bei der Ermittlung des Fehlers der  $\Delta pK_D$ - bzw. der  $\Delta pK_i$ -Werte wurden die Regeln der Fehlerrechnung angewandt (Bevington, 1969). Bei zwei Parametern mit Fehlern  $a \pm \sigma_a$ ,  $b \pm \sigma_b$  ( $\sigma = \text{SEM}$ ) wurden die Fehler wie folgt berechnet:

Summen- und Differenzbildung:

$$y = a \pm b \quad \rightarrow \quad \sigma_y = [ (\sigma_a^2 + \sigma_b^2) ]^{1/2} \quad \text{(absolute Fehlerquadrate)}$$

**Gleichung 22**

Produkt und Quotient:

$$y = a * b$$

bzw.  $\rightarrow \sigma_y / y = [ (\sigma_a^2 / a^2) + (\sigma_b^2 / b^2) ]^{1/2}$  (relative Fehlerquadrate)

$$y = a / b$$

**Gleichung 23**

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Bindung von Sulfonylharnstoffen und Gliniden an SUR1 und Kir6.2/SUR1

In dieser Serie wurde der Effekt der Koexpression mit Kir6.2 auf die Bindung der Sulfonylharnstoffe und Glinide an SUR1 untersucht.

Für die Experimente mit SUR1 wurde eine HEK-Zelllinie, die rSUR1 stabil exprimiert, verwendet. Pro Versuch wurden dabei zwei Schalen mit 60-75%iger Konfluenz der Zellen oder zum Teil nur eine Schale mit 80-90%iger Konfluenz verwendet und mit  $\sim 2$  nM  $^3\text{H}$ -GBC (spezifische Aktivität=SA=50 Ci/mmol) inkubiert. In den Experimenten mit Kir6.2/SUR1 wurden HEK-Zellen benutzt, die beide Proteine transient exprimierten. Aufgrund der höheren Affinität von Kir6.2/SUR1 für GBC wurde die Konzentration des Radioliganden bei den meisten Experimenten auf  $\sim 0,8$  nM erniedrigt, und es wurde nur eine Schale mit Zellen, deren Konfluenz bei etwa 90-100% lag, genommen. Unter diesen Bedingungen konnte der Prozentsatz der radioaktiv markierten Kanäle unter 5% gehalten werden, so dass die Gleichungen aus Kapitel zwei angewendet werden konnten. Die Inkubationszeit betrug 30 Minuten bei 37°C. Die Werte für die nicht-spezifische Bindung (NSB) und die spezifische Bindung (Bs) wurden jeweils drei Mal bestimmt, am Anfang, in der Mitte und am Ende jeden Experiments, um für Änderungen in der Bs mit der Zeit ("Zeittrend") durch lineare Interpolation eine Korrektur durchführen zu können.

Die Messungen mit SUR1 alleine wurden ausschließlich von mir, die mit Kir6.2/SUR1 überwiegend von Herrn Apotheker Damian Stephan in unserer Abteilung, aber auch teilweise von mir durchgeführt. Nur so ließ sich dieses Projekt im Rahmen einer medizinischen Doktorarbeit durchführen, da dieses Projekt aus zeitlichen Gründen von einer Person alleine nicht zu realisieren gewesen wäre.



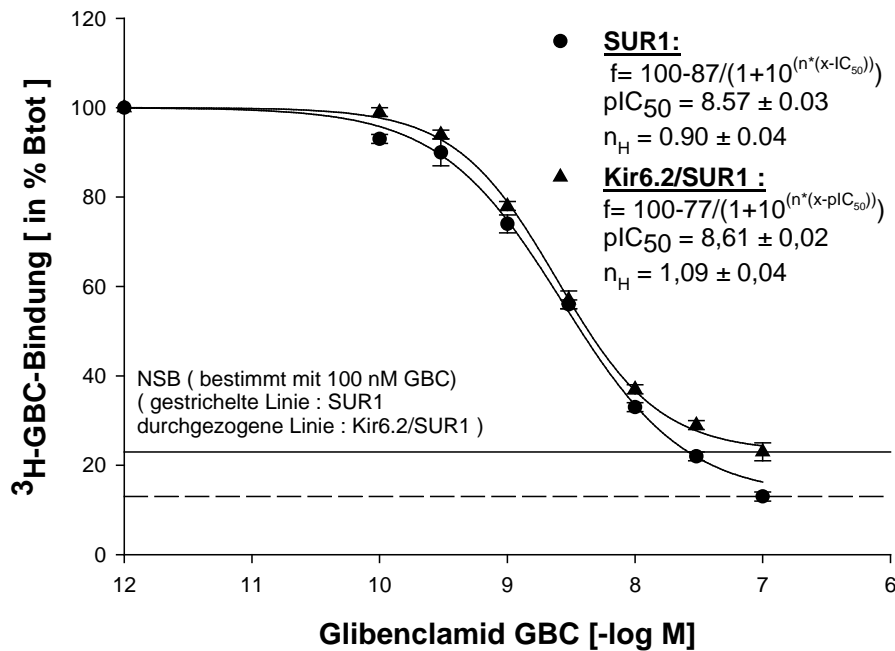
### **3.1.1 Bindung von langkettigen Sulfonylharnstoffen (Liganden vom Typ A+B) an SUR1 und Kir6.2/SUR1: GBC und Glimipirid**

#### **3.1.1.1 Verdrängung von $^3\text{H}$ -GBC durch GBC**

Es gingen vier Versuch (n=4) an SUR1-Zellen und eben so viele Bindungsversuche an Kir6.2/SUR1-Zellen (n=4) in die Auswertung mit ein. Diese Versuche der homologen Verdrängung an SUR1 und Kir6.2/SUR1 wurden mit Zellen von jeweils einer Petrischale durchgeführt, damit der Prozentsatz der radioaktiv markierten Rezeptoren unter 5% blieb und somit, wie bereits in 3.1 erwähnt wurde, die jeweiligen Gleichungen aus Kapitel zwei angewendet werden konnten. Im Übrigen wurde wie bereits in 3.1 beschrieben vorgegangen. Die NSB wurde in beiden Fällen mit 100 nM GBC bestimmt .

Die folgende Abbildung (Abb.10) zeigt die Verdrängung von  $^3\text{H}$ -GBC von SUR1 und Kir6.2/SUR1 durch (nicht-markiertes) GBC (Fit durch die Mittelwerte).

Für die weiterführenden Überlegungen wurden jedoch nicht die Parameter der Mittelwert-Fits (Abb.10) sondern die Mittelwerte der Parameter aus den Fits der Einzelexperimente zugrunde gelegt. Diese sind in der folgenden Tabelle (Tab.5) zusammengefasst.



**Abb.10 Hemmung der  $^3\text{H}$ -GBC-Bindung an SUR1 und an Kir6.2/SUR1 durch GBC.**

Die Regressionskurven repräsentieren den Fit der Gleichung 25 an die Mittelwerte der Einzelexperimente. Die durch die Punkte dargestellte Kurve entspricht SUR1: Mittelwerte  $\pm$  SEM aus  $n=4$ . Die durch die Dreiecke dargestellte Diagramm entspricht Kir6.2/SUR1: Mittelwerte  $\pm$  SEM aus  $n=4$ .  $L_0$  [nM]-;  $pK_i$  [-logM]-;  $n_H$ -; NSB [bestimmt mit 100 nM GBC]-Werte siehe Tabelle. 100% Btot=810 fmol/mg für SUR1 und 200 fmol/mg für Kir6.2/SUR1.

SUR	$L_0$ [nM]	Btot (fmol/mg) NSB (%Btot)	$pK_D$ [-logM]	$n_H$
SUR1	$1,50 \pm 0,0$	810 fmol/mg $13 \pm 1\%$	$8,84 \pm 0,02$	$1,00 \pm 0,00$
Kir6.2/SUR1	$1,92 \pm 0,05$	200 fmol/mg $23 \pm 2\%$	$9,35 \pm 0,08$	$1,07 \pm 0,03$

**Tab.5 Hemmung der  $^3\text{H}$ -GBC von SUR1 und Kir6.2/SUR1 durch GBC.**

Parametertabelle (Mittelwerte  $\pm$  SEM der Einzelfits aus 4/4 Experimenten).

Die Tabelle ergibt bei SUR1 einen  $pK_D$ -Wert= $8,84 \pm 0,02$  und somit  $K_D$ -Wert von 1,5 (1,3; 1,6) nM. Die Werte aus dem Mittelwertsfit (Abb.10) liegen bei

$pK_{D(\text{gefittet})}=8,92$ , was einer  $K_{D(\text{gefittet})}=1,2$  nM entspricht. Bei homologer Verdrängung wird die  $K_D$  dadurch bestimmt, dass von der  $IC_{50}$  [nM] die im Versuch vorliegende Radioligandkonzentration ( $L_0$  [nM]) subtrahiert wird (siehe Kapitel 2, Gleichungen 14).

Bei Kir6.2/SUR1 ist die  $pK_{D(\text{errechnet})}=9,35 \pm 0,08$ , d.h.  $K_{D(\text{errechnet})}=0,45$  (0,31; 0,65) nM und die  $pK_{D(\text{gefittet})}$  liegt bei 9,27, was der  $K_{D(\text{gefittet})}=0,54$  nM entspricht.

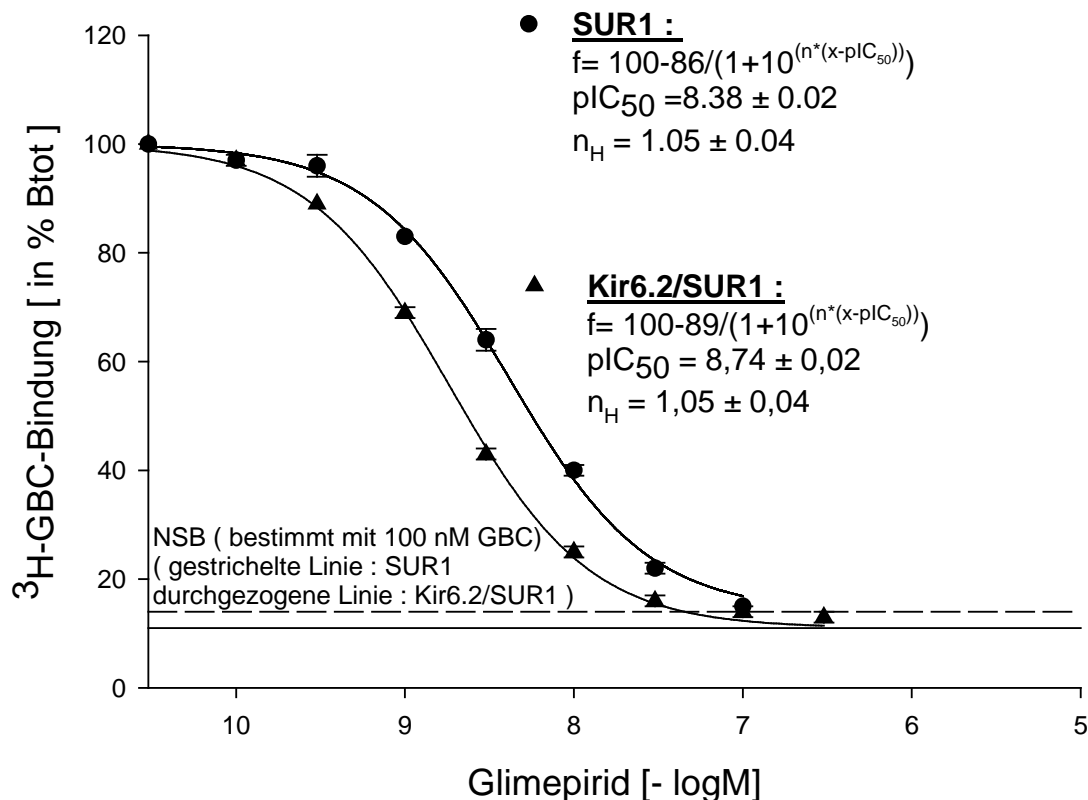
Im Allgemeinen stimmen die beiden Parametersätze gut überein, wie man an diesem Beispiel erkennen kann.

#### 3.1.1.2 Verdrängung von $^3\text{H-GBC}$ durch Glimepirid

Die Versuchsreihe mit SUR1 enthielt vier Versuche ( $n=4$ ), wobei in jedem Einzelversuch eine Schale permanent transfizierter Zellen (Konfluenz  $\sim 70\%$ ) zur Durchführung des Experiments benötigt wurde. Alle vier Bindungsversuche an Kir6.2/SUR1 ( $n=4$ ) wurden mit einer Schale transient transfizierter Zellen (Konfluenz 90-100%) gemacht, wobei zwei der Versuche parallel durch unsere Laborassistentin Petra Kühner ausgeführt wurden. Wie bei allen Versuchen an SUR1- Zellen verwendeten wir zur NSB-Bestimmung 100 nM GBC.

Das folgende Diagramm zeigt die Verdrängung der  $^3\text{H-GBC}$ -Bindung an SUR1 und an Kir6.2/SUR1 durch Glimepirid [-logM] (Fit durch die Mittelwerte).

In der Tabelle sind die Mittelwerte der Parameter aus den Anpassungen der Einzelexperimente zusammengefasst.



**Abb.11 Hemmung der <sup>3</sup>H-GBC-Bindung an SUR1 und an Kir6.2/SUR1 durch Glibenclamide.**

Die Regressionskurven repräsentieren den Fit der Gleichung 25 an die Mittelwerte der Einzelexperimente. Die durch die Punkte dargestellte Kurve entspricht SUR1: Mittelwerte  $\pm$  SEM aus  $n=4$ . Das durch die Dreiecke dargestellte Diagramm entspricht Kir6.2/SUR1: Mittelwerte  $\pm$  SEM aus  $n=4$ .  $L_0$  [nM];  $pK_i$  [-logM];  $n_H$ ; NSB [bestimmt mit 100 nM GBC]-Werte siehe Tabelle. 100% Btot=530 fmol/mg für SUR1 und 300 fmol/mg für Kir6.2/SUR1.

SUR	$L_0$ [nM]	Btot (fmol/mg) NSB (%Btot)	$pK_i$ [-logM]	$n_H$
SUR1	$1,52 \pm 0,01$	530 fmol/mg $14 \pm 0\%$	$8,67 \pm 0,03$	$1,07 \pm 0,03$
Kir6.2/SUR1	$0,87 \pm 0,00$	300 fmol/mg $11 \pm 1\%$	$9,24 \pm 0,02$	$1,02 \pm 0,01$

**Tab.6 Hemmung der <sup>3</sup>H-GBC-Bindung an SUR1 und an Kir6.2/SUR1 durch Glibenclamide.**

Parametertabelle (Mittelwerte  $\pm$  SEM der Einzelfits aus 4/4 Experimenten).

Die Tabelle ergibt für  $pK_i$  [-logM] bzw. für  $K_i$  [nM] bei SUR1 einen  $pK_i$ -

Wert= $8,67 \pm 0,03$  und somit  $K_i$ -Wert von 2,1 (1,9; 2,5) nM. Die Anpassung an die Mittelwerte (Abb.11) ergibt  $pK_{i(\text{gefittet})}=8,68$  ( $K_{i(\text{gefittet})}=2,1$  nM) und liegt somit in Bereich des Konfidenzintervalls des errechneten  $pK_i$ -Wertes.

Bei Kir6.2/SUR1 ist die  $pK_{i(\text{errechnet})}=9,24 \pm 0,02$ , d.h.  $K_{i(\text{errechnet})}=0,58$  (0,52; 0,63) nM, die  $pK_{i(\text{gefittet})}=9,20$ , was der  $K_{i(\text{gefittet})}=0,63$  nM entspricht. Der gefittete  $pK_i$ -Wert liegt also minimal vom errechneten Konfidenzintervall entfernt.

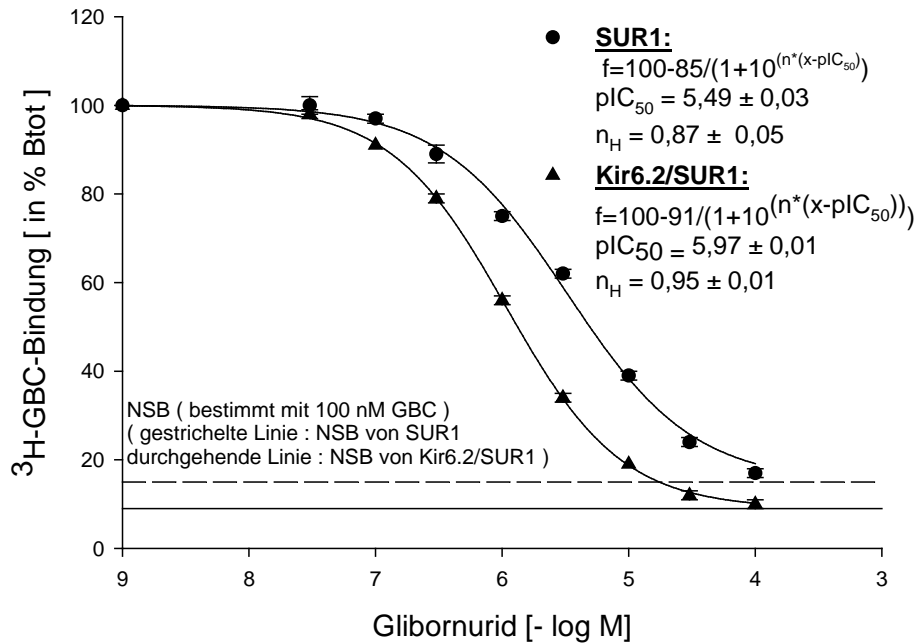
Die Cheng-Prusoff-Korrektur wurde bei SUR1 mit  $K_{D(\text{GBC an SUR1})}=1,50$  nM und bei Kir6.2/SUR1 mit  $K_{D(\text{GBC an Kir6.2/SUR1})}=0,45$  nM durchgeführt.

### **3.1.2 Bindung von Typ A Liganden an SUR1 und Kir6.2/SUR1: Glibornurid und Nateglinid**

#### **3.1.2.1 Verdrängung von $^3\text{H-GBC}$ durch Glibornurid**

Auch hier wurden bei den vier Versuchen an SUR1 (n=4) und bei den drei Experimenten an Kir6.2/SUR1 (n=3) jeweils eine Petrischale verwendet.

Das angeführte Diagramm und die folgende Tabelle zeigen die gewonnenen Ergebnisse der Verdrängung von  $^3\text{H-GBC}$  an SUR1 und Kir6.2/SUR1 durch Glibornurid.



**Abb.12 Hemmung der <sup>3</sup>H-GBC-Bindung an SUR1 und an Kir6.2/SUR1 durch Glibornurid.**

Die Regressionskurven repräsentieren den Fit der Gleichung 25 an die Mittelwerte der Einzelexperimente. Die durch die Punkte dargestellte Kurve entspricht SUR1: Mittelwerte  $\pm$  SEM aus  $n=4$ . Das durch die Dreiecke dargestellte Diagramm entspricht Kir6.2/SUR1: Mittelwerte  $\pm$  SEM aus  $n=3$ .  $L_0$  [nM]-;  $pK_i$  [-logM]-;  $n_H$ -; NSB [bestimmt mit 100 nM GBC]-Werte siehe Tabellenwerte. 100% Btot=410 fmol/mg für SUR1 und 590 fmol/mg für Kir6.2/SUR1.

Die Tabelle zeigt die Parametermittelwerte aus den Fits der Einzelexperimente.

SUR	$L_0$ [nM]	Btot (fmol/mg) NSB (%Btot)	$pK_i$ [-logM]	$n_H$
SUR1	$1,47 \pm 0,02$	410 fmol/mg $15 \pm 0\%$	$5,80 \pm 0,07$	$0,87 \pm 0,02$
Kir6.2/SUR1	$0,84 \pm 0,02$	590 fmol/mg $9 \pm 1\%$	$6,44 \pm 0,02$	$0,95 \pm 0,03$

**Tab.7 Verdrängung der <sup>3</sup>H-GBC-Bindung an SUR1 und an Kir6.2/SUR1 durch Glibornurid.**

Parametertabelle ( Mittelwerte  $\pm$  SEM aus Einzelfits aus 4/3 Experimenten der logistischen Gleichung(siehe Kapitel zwei)).

Vergleicht man die Tabellenwerte (Tab.7) für pKi [-logM] bzw. für Ki [nM] mit dem Wert, der sich aus der Anpassung an die Mittelwerte ergibt, so erkennt man eine nur geringfügige Abweichung. Man erhält bei SUR1 den aus den Versuchen errechneten pKi-Wert von  $5,80 \pm 0,07$  und laut Graph eine pKi von 5,78, was den Werten  $Ki_{(errechnet)}=1,6$  (1,1; 2,2)  $\mu\text{M}$  und  $Ki_{(gefittet)}= 1,7$  (1700 nM)  $\mu\text{M}$  entspricht.

Bei Kir6.2/SUR1 ist die  $pKi_{(errechnet)}=6,44 \pm 0,02$ , d.h.  $Ki_{(errechnet)}=0,36$  (0,33; 0,40)  $\mu\text{M}$ , die  $pKi_{(gefittet)}=6,46$ , was der  $Ki_{(gefittet)}=0,35$   $\mu\text{M}$  entspricht.

### 3.1.2.2 Verdrängung von $^3\text{H-GBC}$ durch Nateglinid

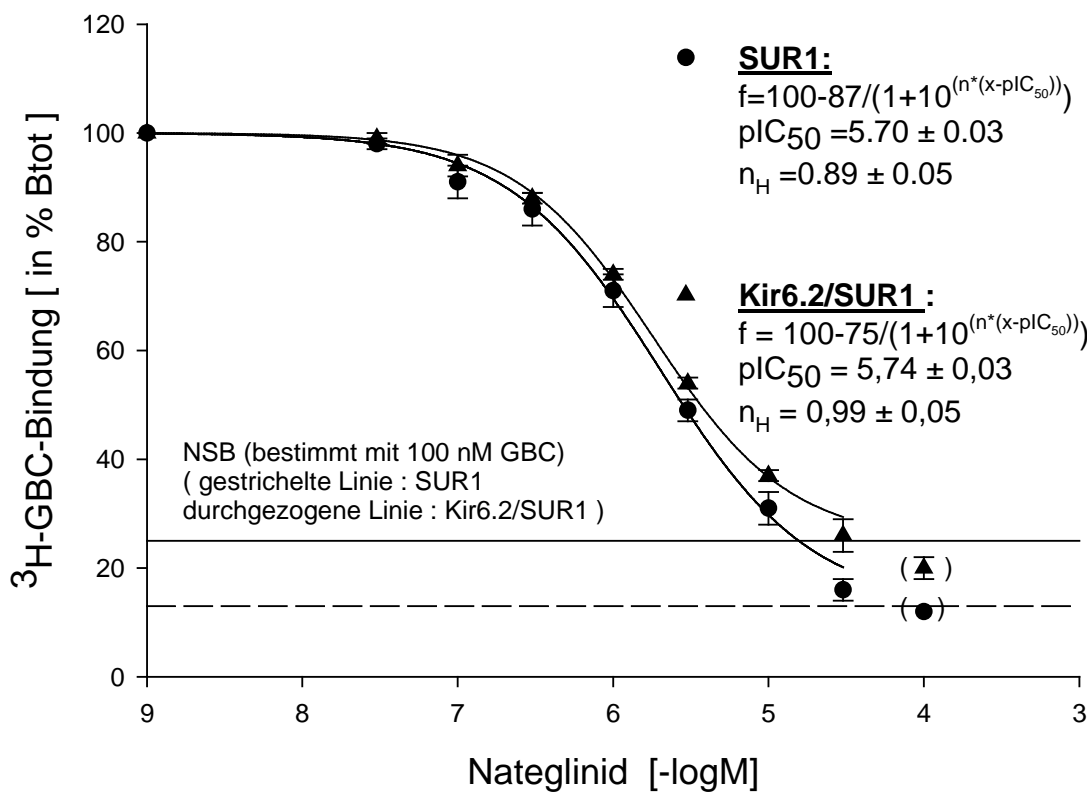
Diese Experimentereihe lief in gleicher Art und Weise wie die Versuche mit Glibornurid ab, und es wurde somit die selbe Anzahl an Schalen pro Versuch verwendet.

Die heterologe Verdrängung von Nateglinid gegen  $^3\text{H-GBC}$  an SUR1-Zellen wurde durch vier Bindungsversuche ( $n= 4$ ) ermittelt , die an Kir6.2/SUR1 durch drei Versuche ( $n=3$ ).

Die Labelsollkonzentration wurde hier ausnahmsweise bei den Versuchen an Kir6.2/SUR1 ebenfalls mit 2 nM angesetzt.

Das Diagramm (Abb.13) und die folgende Tabelle (Tab.8) zeigen die ermittelten Ergebnisse der Verdrängung von  $^3\text{H-GBC}$  an SUR1 und Kir6.2/SUR1 durch Nateglinid.

Für die weiterführenden Überlegungen wurden jedoch nicht die Parameter der Mittelwert-Fits (Abb.13) sondern die Mittelwerte der Parameter aus den Fits der Einzelexperimente zugrunde gelegt. Diese sind in der folgenden Tabelle (Tab.8) zusammengefasst.



**Abb.13 Hemmung der <sup>3</sup>H-GBC-Bindung an SUR1 und an Kir6.2/SUR1 durch Nateglinid.**

Die Regressionskurven repräsentieren den Fit der Gleichung 25 an die Mittelwerte der Einzelexperimente. Die durch die Punkte dargestellte Kurve entspricht SUR1: Mittelwerte  $\pm$  SEM aus  $n=4$ . Das durch die Dreiecke dargestellte Diagramm entspricht Kir6.2/SUR1: Mittelwerte  $\pm$  SEM aus  $n=3$ .  $L_0$  [nM];  $pKi$  [-logM];  $n_H$ ; NSB [bestimmt mit 100 nM GBC]-Werte siehe Tabelle. 100% Btot=800 fmol/mg für SUR1 und 260 fmol/mg für Kir6.2/SUR1.

SUR	$L_0$ [nM]	Btot (fmol/mg) NSB (%Btot)	$pKi$ [-logM]	$n_H$
SUR1	$1,53 \pm 0,05$	800 fmol/mg $13,2 \pm 1\%$	$5,98 \pm 0,03$	$1,00 \pm 0,09$
Kir6.2/SUR1	$2,02 \pm 0,06$	260 fmol/mg $25 \pm 2\%$	$6,46 \pm 0,01$	$1,02 \pm 0,03$

**Tab.8 Hemmung der <sup>3</sup>H-GBC-Bindung an SUR1 und an Kir6.2/SUR1 durch Nateglinid.**

Parametertabelle (Mittelwerte  $\pm$  SEM der Einzelfits aus 4/3 Experimenten).



Der Tabellenwert für pKi [-logM] bzw. für Ki [nM] ist bei SUR1 pKi-Wert=5,98 ± 0,03 und somit Ki =1,0 (0,91; 1,2) µM. Die Anpassung an die Mittelwerte liegt bei pKi<sub>(gefittet)</sub>=6,00 und Ki<sub>(gefittet)</sub>=1,00 µM (995 nM) entspricht.

Bei Kir6.2/SUR1 ist die pKi<sub>(errechnet)</sub>=6,46 ± 0,01, d.h. Ki<sub>(errechnet)</sub>=350 (330; 360) nM, die pKi<sub>(gefittet)</sub>=6,48, was der Ki<sub>(gefittet)</sub>=330 nM entspricht. Beide Ki-Werte aus den Mittelwertfits liegen somit gerade noch im Konfidenzintervall der Werte aus den Einzelfits.

### **3.1.3 Bindung von Typ B Liganden an SUR1 und Kir6.2/SUR1: Meglitinid, UL-DF 9, (-)-AZ-DF 265 und Repaglinid**

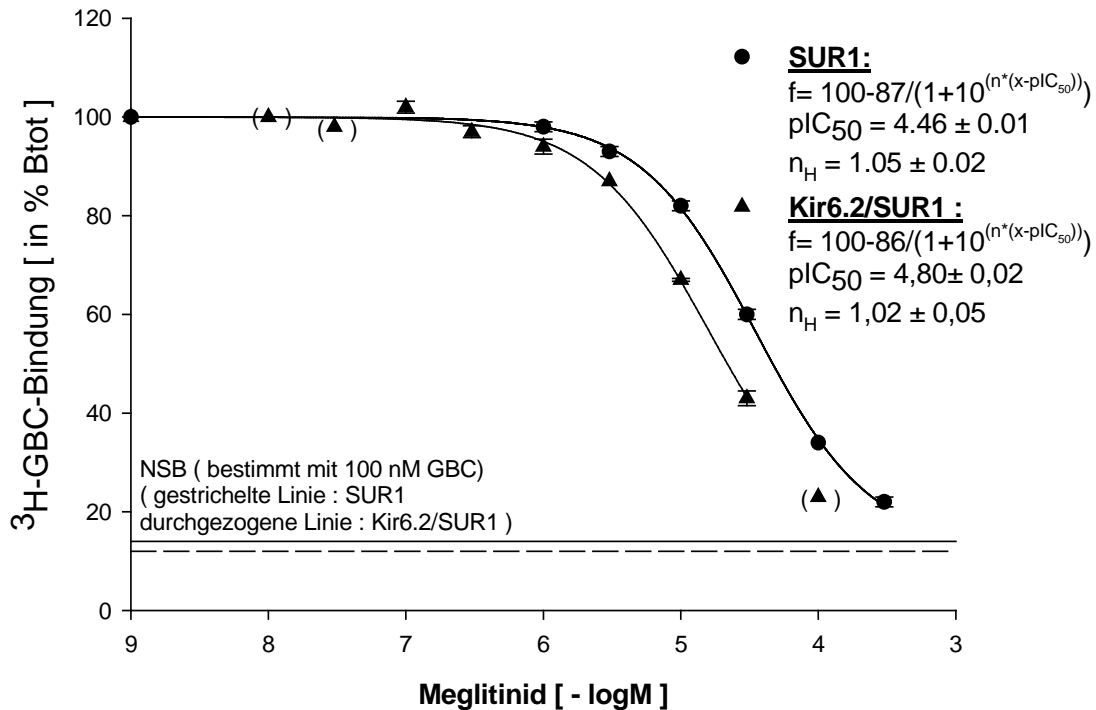
#### **3.1.3.1 Verdrängung von <sup>3</sup>H-GBC durch Meglitinid**

Vier Bindungsversuche von Meglitinid an SUR1 (n=4) gingen in die Gesamtauswertung mit ein. Es zeigte sich jedoch beim Vergleich der Einzelversuche, dass eine Korrelation zwischen dem Prozentsatz des gebundenen Labels und dem Hill-Koeffizienten vorlag. Mit steigenden Prozentwerten fiel der n<sub>H</sub> ab.

Alle drei Bindungsversuche an Kir6.2/SUR1 (n=3) wurden mit einer Schale transient transfizierter Zellen (Konfluenz 90-100%) gemacht. Wie bei allen Versuchen an SUR1- Zellen verwendete wir zur NSB-Bestimmung 100 nM GBC.

Die Abbildung (Abb.14) beschreibt die heterologe Verdrängung der Bindung von <sup>3</sup>H-GBC an SUR1 und Kir6.2/SUR1 durch Meglitinid.

Der aufgeführten Tabelle (Tab.9) liegen die Mittelwerte der Parameter aus den Einzelexperimentfits zugrunde.



**Abb.14 Hemmung der  $^3\text{H}$ -GBC-Bindung an SUR1 und an Kir6.2/SUR1 durch Meglitinid.**

Die Regressionskurven repräsentieren den Fit der Gleichung 25 an die Mittelwerte der Einzelexperimente. Die durch die Punkte dargestellte Kurve entspricht SUR1: Mittelwerte  $\pm$  SEM aus  $n=4$ . Das durch die Dreiecke dargestellte Diagramm entspricht Kir6.2/SUR1: Mittelwerte  $\pm$  SEM aus  $n=3$ .  $L_0$  [nM];  $pK_i$  [-logM];  $n_H$ ; NSB [bestimmt mit 100 nM GBC]-Werte siehe Tabelle. 100% Btot=800 fmol/mg für SUR1 und 620 fmol/mg für Kir6.2/SUR1.

SUR	$L_0$ [nM]	Btot (fmol/mg) NSB (%Btot)	$pK_i$ [-logM]	$n_H$
SUR1	$1,62 \pm 0,04$	800 fmol/mg $12 \pm 0\%$	$4,75 \pm 0,03$	$0,98 \pm 0,02$
Kir6.2/SUR1	$1,72 \pm 0,04$	620 fmol/mg $14 \pm 2\%$	$5,50 \pm 0,03$	$0,99 \pm 0,06$

**Tab.9 Hemmung der  $^3\text{H}$ -GBC-Bindung an SUR1 und an Kir6.2/SUR1 durch Meglitinid.**

Parametertabelle (Mittelwerte  $\pm$  SEM der Einzelfits aus 4/3 Experimenten).

Die Tabelle ergibt für  $pK_i$  [-logM] bzw. für  $K_i$  [nM] bei SUR1 einen  $pK_i$ -Wert  $=4,75 \pm 0,03$  und somit  $K_i$ -Wert von 18 (15; 20)  $\mu\text{M}$ . Die Anpassung an die Mittelwerte liegt bei  $pK_{i(\text{gefittet})}=4,77$  ( $K_{i(\text{gefittet})}=17 \mu\text{M}$ ). Der gefittete Wert liegt somit in Bereich des Konfidenzintervalls des errechneten  $pK_i$ -Wertes.

Bei Kir6.2/SUR1 ist die  $pK_{i(\text{errechnet})}=5,50 \pm 0,03$ , d.h.  $K_{i(\text{errechnet})}=3,2$  (2,8; 3,6)  $\mu\text{M}$ , die  $pK_{i(\text{gefittet})}=5,49$ , was der  $K_{i(\text{gefittet})}=3,2 \mu\text{M}$  entspricht. Der gefittete  $pK_i$ -Wert liegt also minimal vom errechneten Konfidenzintervall entfernt.

Die Cheng-Prusoff-Korrektur wurde bei SUR1 mit  $K_{D(\text{GBC an SUR1})}=1,50 \text{ nM}$  und bei Kir6.2/SUR1 mit  $K_{D(\text{GBC an Kir6.2/SUR1})}=0,45 \text{ nM}$  durchgeführt.

### 3.1.3.2 Verdrängung von $^3\text{H-GBC}$ durch UL-DF 9

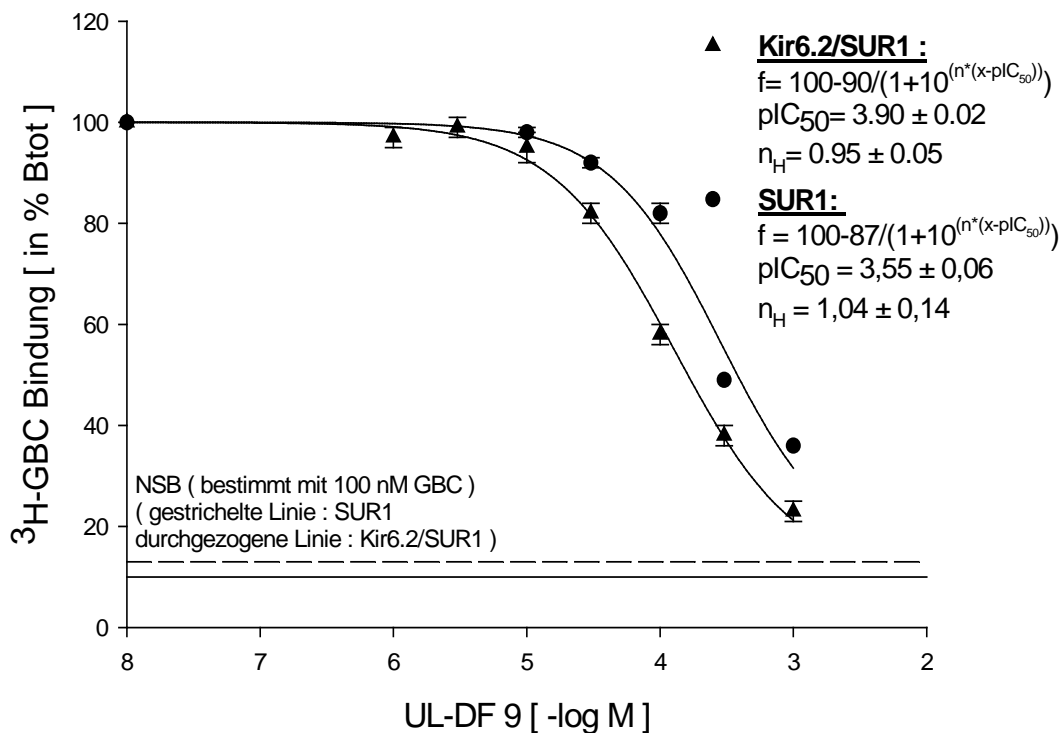
Die Versuchsreihe an SUR1 alleine bestand aus  $n=4$  und die an Kir6.2/SUR1 aus  $n=3$  Einzelversuchen. Wie bei allen Versuchen an SUR1-Zellen verwendete wir zur NSB-Bestimmung 100 nM GBC.

Die folgende Abbildung (Abb.15) zeigt die Verdrängung von  $^3\text{H-GBC}$  von SUR1 und von Kir6.2/SUR1 durch UL-DF 9 (Fit durch die Mittelwerte).

Die Tabelle 10 (siehe nächste Seite) ergibt für  $pK_i$  [-logM] bzw. für  $K_i$  [nM] bei SUR1 einen  $pK_i$ -Wert  $=3,95 \pm 0,04$  und somit  $K_i$ -Wert von 110 (93; 130)  $\mu\text{M}$ . Die Anpassung an die Mittelwerte ergibt einen  $pK_{i(\text{gefittet})}=3,90$  ( $K_{i(\text{gefittet})}=130 \mu\text{M}$ ) und liegt somit in Bereich des Konfidenzintervalls des errechneten  $pK_i$ -Wertes.

Bei Kir6.2/SUR1 ist die  $pK_{i(\text{errechnet})}=4,38 \pm 0,01$ , d.h.  $K_{i(\text{errechnet})}=42$  (40; 44)  $\mu\text{M}$ , die  $pK_{i(\text{gefittet})}=4,37$ , was der  $K_{i(\text{gefittet})}=43 \mu\text{M}$  entspricht. Die Anpassung an die Mittelwerte liegt somit auch in diesem Fall im errechneten Konfidenzintervall.

Die Cheng-Prusoff-Korrektur wurde bei SUR1 mit  $K_{D(\text{GBC an SUR1})}=1,50 \text{ nM}$  und bei Kir6.2/SUR1 mit  $K_{D(\text{GBC an Kir6.2/SUR1})}=0,45 \text{ nM}$  durchgeführt.



**Abb.15 Hemmung der <sup>3</sup>H-GBC-Bindung an SUR1 und an Kir6.2/SUR1 durch UL-DF 9.**

Die Regressionskurven repräsentieren den Fit der Gleichung 25 an die Mittelwerte der Einzelerperimente. Die durch die Punkte dargestellte Kurve entspricht SUR1: Mittelwerte  $\pm$  SEM aus  $n=4$ . Das durch die Dreiecke dargestellte Diagramm entspricht Kir6.2/SUR1: Mittelwerte  $\pm$  SEM aus  $n=3$ .  $L_0$  [nM];  $pK_i$  [-logM];  $n_H$ ; NSB [bestimmt mit 100 nM GBC]-Werte siehe Tabelle. 100% Btot=400 fmol/mg für SUR1 und 610 fmol/mg für Kir6.2/SUR1.

Die weiterführenden Überlegungen wurden allerdings nicht mit den Parametern der Mittelwert-Fits (siehe Abb.15), sondern mit den Mittelwerten der Parameter aus den Fits der Einzelerperimente angestellt. Diese Werte sind in der anschließenden Tabelle (Tab.10) aufgeführt.

SUR	$L_0$ [nM]	Btot (fmol/mg) NSB (%Btot)	$pK_i$ [-logM]	$n_H$
SUR1	$1,88 \pm 0,00$	400 fmol/mg $13 \pm 0\%$	$3,95 \pm 0,04$	$1,14 \pm 0,01$
Kir6.2/SUR1	$0,90 \pm 0,01$	610 fmol/mg $10 \pm 1\%$	$4,38 \pm 0,01$	$0,94 \pm 0.10$

**Tab.10 Hemmung der <sup>3</sup>H-GBC-Bindung an SUR1 und an Kir6.2/SUR1 durch UL-DF 9.**

Parametertabelle (Mittelwerte  $\pm$  SEM der Einzelfits aus 4/3 Einzelerperimenten).

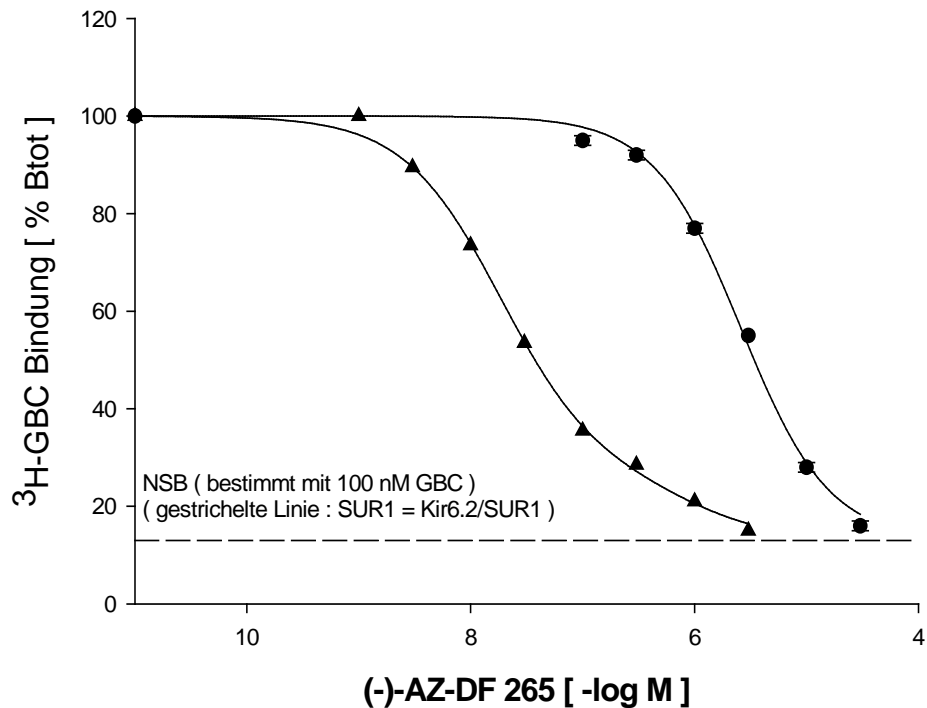
### 3.1.3.3 Verdrängung von $^3\text{H-GBC}$ durch (-)-AZ-DF 265

Es wurden vier Versuche (n=4) an SUR1 unter den selben Bedingungen wie die bisher genannten Versuche gemacht.

An Kir6.2/SUR1 wurden vier Einzelversuche (n=4) durchgeführt. Versuch V.W-1 und V.W-4 wurden mit je einer Schale transient transfizierter Zellen, die mit der Lipofektamin-Transfektionsmethode hergestellt wurden gemacht. Bei den beiden Versuche V.W-2 und -3 verwendeten wir transient transfizierte Zellen, die mit Lipofektamin 2000 transfiziert wurden. Da bei allen anderen Versuchen zur Koexpression ebenfalls mit Zellen, die mit der Lipofektamin 2000-Transfektions-Methode transfiziert wurden, gearbeitet wurde, gehen nur V.W-2 und -3 in die Gesamtwertung mit ein um die Vergleichbarkeit der Experimente untereinander zu gewährleisten. Berücksichtigt man die Versuche V.W-1 und -4 bei der Gesamtauswertung, so ergibt sich ein  $pK_{i,1}$ -Wert von  $8,43 \pm 0,06$  und ein  $pK_{i,2}$ -Wert von  $6,57 \pm 0,11$  (Amplitude  $A_1=74 \pm 4\%$  Bs). Wie im Diagramm zu sehen ist, ist die Hemmkurve leicht biphasisch und es wurde ein Fit nach zwei Komponenten aus V.W-2 und -3 gewählt. Es zeigt sich, dass das Verhältnis der Amplituden abhängig von der Transfektionsmethode zu sein scheint.

Wie bei allen Versuchen an SUR1-Zellen verwendete wir zur NSB-Bestimmung 100 nM GBC. Zusätzliche Untersuchungen von Herrn Damian Stephan haben gezeigt, dass die erste Komponente der Hemmung die Bindung von (-)-AZ-DF 265 an Kir6.2/SUR1 widerspiegelt und die zweite die Bindung an SUR1 ohne Kir6.2.

Der Graph (Abb.16) beschreibt den Verlauf der heterologen Verdrängung der  $^3\text{H-GBC}$ -Bindung an SUR1 und an Kir6.2/SUR1 durch (-)-AZ-DF 265 (Fit durch die entsprechenden Mittelwerte der Einzelwerte).



▲ **Kir6.2/SUR1( Fit nach 2 Komponenten mit Lipofectamin 2000 ) :**

$$f = 100 \cdot a1 / (1 + 10^{(x - pk1)}) - (87 - a1) / (1 + 10^{(x - pk2)})$$

$$A1 = 74 \pm 4$$

$$pKi_{,1} = 7,74 \pm 0,06$$

$$pKi_{,2} = 6,06 \pm 0,33$$

● **SUR1 :**

$$f = 100 - 87 / (1 + 10^{(n \cdot (x - pIC_{50}))})$$

$$pIC_{50} = 5,58 \pm 0,02$$

$$n_H = 1,11 \pm 0,06$$

**Abb.16 Hemmung der <sup>3</sup>H-GBC-Bindung an SUR1 und an Kir6.2/SUR1 durch (-)-AZ-DF265.**

Die Regressionskurven repräsentieren den Fit der Gleichung 25 an die Mittelwerte der Einzelexperimente. Die durch die Punkte dargestellte Kurve entspricht SUR1: Mittelwerte  $\pm$  SEM aus n=4. Das durch die Dreiecke dargestellte Diagramm entspricht Kir6.2/SUR1: Mittelwerte  $\pm$  SEM aus n=2. L<sub>0</sub> [nM]-; pKi [-logM]-; n<sub>H</sub>-; NSB [bestimmt mit 100 nM GBC]-Werte siehe Tabelle. 100% Btot=550 fmol/mg für SUR1 und 410 fmol/mg für Kir6.2/SUR1.

Tabelle (Tab.11) gibt die Mittelwerte der Parameter aus den Einzelexperiment-Fits wieder.

SUR	$L_0$ [nM]	Btot (fmol/mg) NSB(%Btot)	pK <sub>i</sub> [-logM]		n <sub>H</sub>
SUR1	1,58 ± 0,05	550 fmol/mg 13 ± 0%	5,86 ± 0,03		1,12 ± 0,04
Kir6.2/SUR1 ( V.W-2 +3 )	1,72 ± 0,04	410 fmol/mg 13 ± 1%	pK <sub>i,1</sub> : * 8,43 ± 0,06	pK <sub>i,2</sub> : 6,81 ± 0,00	-

**Tab.11 Hemmung der <sup>3</sup>H-GBC-Bindung an SUR1 und Kir6.2/SUR1 durch (-)-AZ-DF 265.**

\*: Die Amplitude der Hochaffinitätskomponenten beträgt  $A_1=74 \pm 4\%$  Bs.  
Parametertabelle (Mittelwerte ± SEM der Einzelfits aus 4/2 Einzelexperimenten).

Die Tabelle ergibt für pK<sub>i</sub> [-logM] bzw. für K<sub>i</sub> [nM] bei SUR1 einen pK<sub>i</sub>-Wert=5,86 ± 0,03 und somit K<sub>i</sub>-Wert von 1,4 (1,2; 1,6) μM. Die Anpassung an die Mittelwerte liegt bei pK<sub>i(gefittet)</sub>5,90, was einer K<sub>i(gefittet)</sub>=1,3 μM entspricht.

Bei Kir6.2/SUR1 ist die pK<sub>i,1(errechnet)</sub>=8,43 ± 0,06, d.h. K<sub>i,1(errechnet)</sub>=3,7 (2,8 ; 4,9) nM, die pK<sub>i,1(gefittet)</sub>=8,42, was der K<sub>i,1(gefittet)</sub>=3,7 nM entspricht. Die pK<sub>i,2(errechnet)</sub> beträgt 6,81 ± 0,00, d.h. K<sub>i,2(errechnet)</sub>=160 nM und die pK<sub>i,2(gefittet)</sub>=6,74, was der K<sub>i(gefittet)</sub>=180 nM entspricht. Der pK<sub>i</sub>-Wert aus der Anpassung an die Mittelwerte und der Tabellenwert stimmen somit gut überein und liegen in dessen Konfidenzintervall.

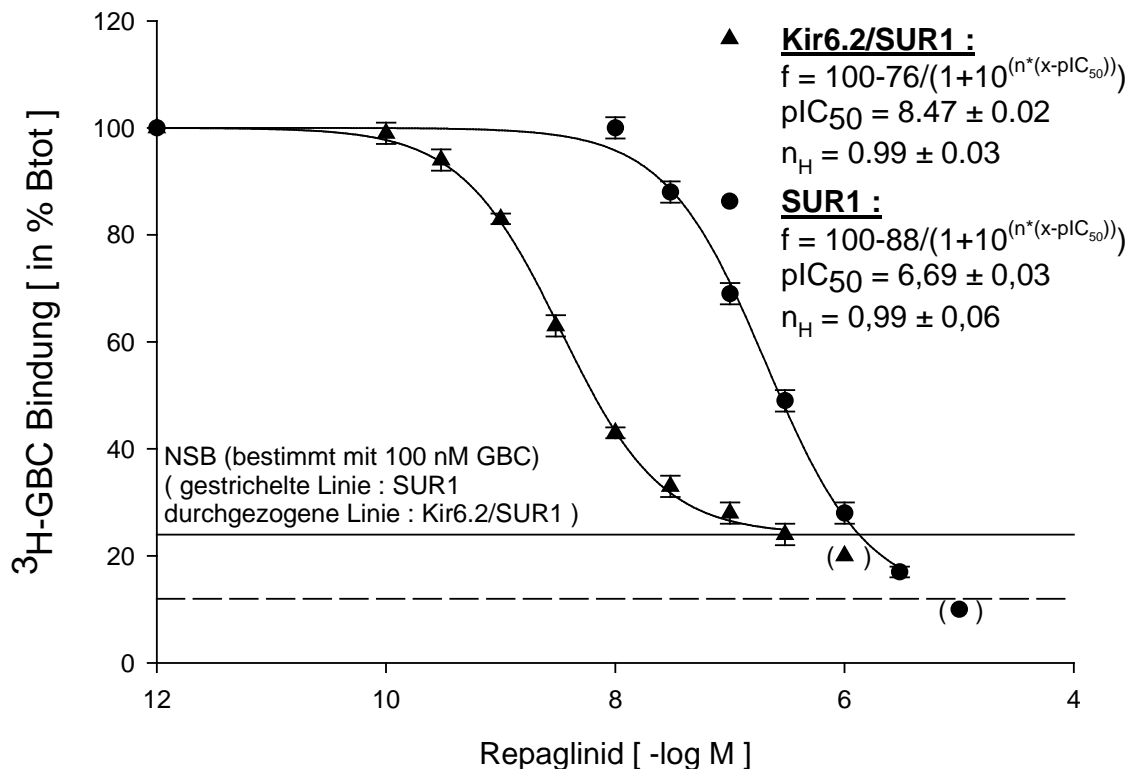
Die Cheng-Prusoff-Korrektur wurde, wie bereits öfters erwähnt, bei SUR1 mit  $K_{D(GBC \text{ an SUR1})}=1,50$  nM und bei Kir6.2/SUR1 mit  $K_{D(GBC \text{ an Kir6.2/SUR1})}=0,45$  nM durchgeführt.

### 3.1.3.4 Verdrängung von <sup>3</sup>H-GBC durch Repaglinid

Die Versuchsreihe bestand aus n=4 Einzelversuchen, wobei jeder Versuch mit einer Schale permanent transfizierter SUR1-Zellen (Konfluenz ~75-80%) durchgeführt wurde.

Alle vier Bindungsversuche an Kir6.2/SUR1 (n=4) wurden mit einer Schale transient transfizierter Zellen (Konfluenz 90-100%) gemacht. Auch bei diesen Versuchen an SUR1-Zellen verwendete wir zur NSB-Bestimmung 100 nM GBC.

Die Abbildung (Abb.17) veranschaulicht die heterologe Verdrängung von  $^3\text{H}$ -GBC an SUR1 und Kir6.2/SUR1 durch Repaglinid.



**Abb.17 Hemmung der  $^3\text{H}$ -GBC-Bindung an SUR1 und an Kir6.2/SUR1 durch Repaglinid.**

Die Regressionskurven repräsentieren den Fit der Gleichung 25 an die Mittelwerte der Einzelexperimente. Die durch die Punkte dargestellte Kurve entspricht SUR1: Mittelwerte  $\pm$  SEM aus  $n=4$ . Das durch die Dreiecke dargestellte Diagramm entspricht Kir6.2/SUR1: Mittelwerte  $\pm$  SEM aus  $n=4$ .  $L_0$  [nM]-;  $pKi$  [-logM]-;  $n_H$ -; NSB [bestimmt mit 100 nM GBC]-Werte siehe Tabelle. 100% Btot=510 fmol/mg für SUR1 und 230 fmol/mg für Kir6.2/SUR1.

Die Werte in der folgenden Tabelle (Tab.12) zeigen die Zusammenfassung der Parametermittelwerte, die aus den Fits der Einzelexperimente hervorgegangen sind.



SUR	L <sub>0</sub> [nM]	B <sub>tot</sub> (fmol/mg) NSB (%B <sub>tot</sub> )	pK <sub>i</sub> [-logM]	n <sub>H</sub>
SUR1	1,53 ± 0,05	510 fmol/mg 12 ± 0%	7,04 ± 0,04	1,05 ± 0,09
Kir6.2/SUR1	1,78 ± 0,04	230 fmol/mg 21 ± 3%	9,14 ± 0,04	0,95 ± 0,01

**Tab.12 Hemmung der <sup>3</sup>H-GBC-Bindung an SUR1 und an Kir6.2/SUR1 durch Repaglinid.**

Parametertabelle (Mittelwerte ± SEM der Einzelfits aus 4/4 Einzelexperimenten).

Die Tabelle ergibt für pK<sub>i</sub> [-logM] bzw. für K<sub>i</sub> [nM] bei SUR1 einen pK<sub>i</sub>-Wert=7,04 ± 0,04 und somit K<sub>i</sub>-Wert von 91 (76; 110)nM. Die Anpassung an die Mittelwerte liegt bei pK<sub>i(gefittet)</sub>=6,99 und K<sub>i(gefittet)</sub>=100 nM entspricht.

Bei Kir6.2/SUR1 ist die pK<sub>i(errechnet)</sub>=9,14 ± 0,04, d.h. K<sub>i(errechnet)</sub>=0,72 (0,60; 0,87) nM, die pK<sub>i(gefittet)</sub>=9,17, was der K<sub>i(gefittet)</sub>=0,68 nM entspricht. Der gefittete pK<sub>i</sub>-Wert liegt somit im errechneten Konfidenzintervall.

Die Cheng-Prusoff-Korrektur wurde bei SUR1 mit K<sub>D(GBC an SUR1)</sub>=1,50 nM und bei Kir6.2/SUR1 mit K<sub>D(GBC an Kir6.2/SUR1)</sub>=0,45 nM durchgeführt.

### **3.2 Bindung von Sulfonylharnstoffen und Gliniden an SUR2A(Y1206S) und Kir6.2/SUR2A(Y1206S)**

In dieser Reihe von Experimenten wurde der Effekt auf die Bindung der Sulfonylharnstoffe und Glinide an SUR2A(Y1206S), sowie der Effekt der Koexpression mit Kir6.2 untersucht. Die Messungen wurden analog zu denen an SUR1 bzw. Kir6.2/SUR1 durchgeführt. Für diese Experimente wurde die Mutante SUR2A(Y1206S) gewählt, da sie eine ~10 mal höhere Affinität für Glibenclamid hat als der Wildtyp SUR2A. Die K<sub>D</sub> der GBC-Bindung an SUR2A beträgt ~20 nM und ist für präzise Messungen zu gering (Damian Stephan et al.,2004).

Bei den Experimenten mit SUR2A(Y1206S) wurde etwa je die Hälfte der Versuche an permanent oder transient transfizierten Zellen durchgeführt (Kennzeichnung in den jeweiligen Kapiteln). Die Versuche an Kir6.2/SUR2A(Y1206S) wurden ausschließlich an transient transfizierten HEK-Zellen vorgenommen.

Die Labelkonzentration wurde vor den Versuchen so berechnet, dass der Sollwert der Labelkonzentration bei den Versuchen an SUR2A(Y1206S) ~2 nM und bei den Versuchen an Kir6.2/SUR2A(Y1206S) ~0,8 nM betragen sollte. Durch Einhaltung dieser Bedingungen ließ sich der Prozentsatz der radioaktiv markierten Kanäle unter der notwendigen 5% Grenze halten und es konnten die Gleichungen aus Kapitel zwei angewendet werden.

Als Label wurde mit Tritium markiertes Glibenclamid ( $^3\text{H}$ -GBC) mit einer spezifischen Aktivität (SA) von 50 Ci/mmol verwendet. Die nicht-spezifischen Bindung (NSB) wurde mit 100  $\mu\text{M}$  P1075 bestimmt. Die Inkubationszeit betrug 30 min bei 37 °C. Die Werte für NSB und  $B_s$  wurden jeweils drei Mal, am Anfang, in der Mitte und am Ende von jedem Versuch, bestimmt. So konnten eventuelle Änderungen der  $B_s$  mit der Zeit ("Zeittrend") durch lineare Interpolation korrigiert werden.

Alle Experimente an SUR2A(Y1206S) wurden ausschließlich von mir durchgeführt, ebenso die Versuche an Kir6.2/SUR2A(Y1206S) mit Ausnahme der Experimente mit der Substanz Meglitinid (Ergebnisse von Herrn Apotheker Damian Stephan).

Bei der Berechnung der  $K_i$ -Werte (bzw.  $pK_i$ -Werte) aus den experimentell bestimmten  $IC_{50}$ - bzw.  $pIC_{50}$ -Werten wurde bei heterologer Verdrängung an SUR2A(Y1206S) ein  $K_L$ -Wert von 9,8 nM ( $K_{L(\text{GBC})} = K_{D(\text{GBC an SUR2A(Y1206S)})} = 9,80$  nM) bzw.  $pK_{L(\text{GBC an SUR2A(Y1206S)})} = 8,01$  verwendet, der sich in der Versuchsreihe der homologen Verdrängung von GBC gegen  $^3\text{H}$ -GBC an SUR2A(Y1206S) ergab. Bei Kir6.2/SUR2A(Y1206S) rechnete ich mit einem  $K_L$ -Wert von 0,53 nM ( $K_{L(\text{GBC an Kir6.2/SUR2A(Y1206S)})} = 0,53$  nM) bzw.  $pK_L = 9,28$  ( $pK_{L(\text{GBC an Kir6.2/SUR2A(Y1206S)})} = 9,28$ ), da sich in den Versuchen eine positive Kooperativität zeigte. Dieser  $K_L$ -Werte wurden im Sättigungsversuch von Herrn Apotheker Damian Stephan ermittelt.

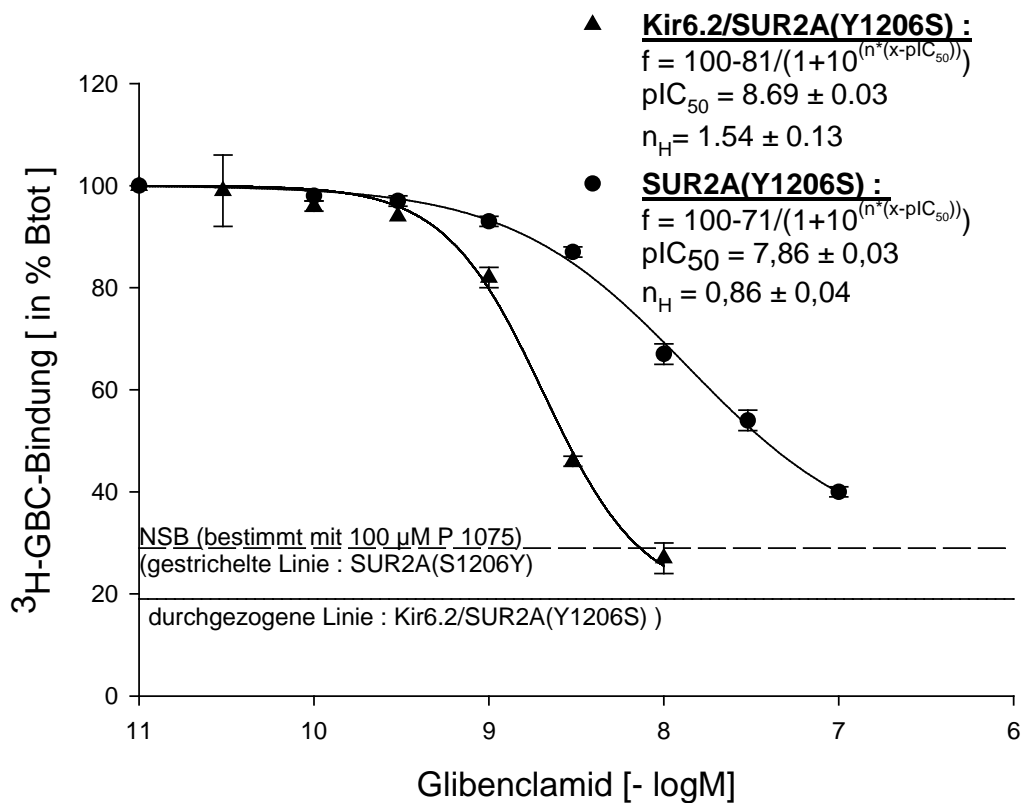
### 3.2.1 Bindung von langkettigen Sulfonylharnstoffen (Liganden vom Typ A+B) an SUR2A(Y1206S) und Kir6.2/SUR2A(Y1206S): Glibenclamid

#### 3.2.1.1 Verdrängung von <sup>3</sup>H-GBC durch Glibenclamid (GBC)

Bei den SUR2A(Y1206S)-Versuchen wurde bei den ersten beiden Versuchen (N1 und N2) jeweils eine Petrischale mit transient transfizierten SUR2A(Y1206S)-Zellen und bei N3 und N4 jeweils drei Schalen permanent transfizierte Zellen verwendet. Die Konfluenz lag bei der transienten Transfektion bei 90-100% und bei der permanenten Zelllinie bei etwa 70-80%. Die Versuchsreihe bestand somit aus vier Versuchen (n=4).

Die Kir6.2/SUR2A(Y1206S)-Experimente wurden mit einer Schale transient transfizierten Zellen, deren Konfluenz 85-95% betrug, durchgeführt. Diese Versuchsreihe beinhaltete n=3 Versuche, wobei einer durch Petra Kühner (V22) durchgeführt wurde. Für die NSB-Bestimmung wurde jeweils 100 µM P1075 verwendet. Das folgende Diagramm (Abb.18) und die Tabelle (Tab.13) zeigen die ermittelten Ergebnisse der homologen Verdrängung von <sup>3</sup>H-GBC an SUR2A(Y1206S) und Kir6.2/SUR2A(Y1206S) durch (nicht-markiertes) GBC.

Der Graph zeigt den Fit durch die Mittelwerte. Die Abbildung zeigt für die homologe Verdrängung mit Kir6.2/SUR2A(Y1206S) einen Hill-Koeffizienten  $n_H = 1,5 \pm 0,13$ , der signifikant  $>1$  ist. Dies deutet auf eine positive Kooperation der GBC-Bindung an den Kanal hin. In weiterführenden Untersuchungen (z.B. Sättigungsexperimente), die von Damian Stephan durchgeführt wurden, konnte die positive Kooperation der Bindung jedoch nicht bestätigt werden.



**Abb.18 Hemmung der  $^3$ H-GBC-Bindung an SUR2A(Y1206S) und an Kir6.2/SUR2A(Y1206S) durch (nicht-markiertes) GBC.**

Die Regressionskurven repräsentieren den Fit der Gleichung 25 an die Mittelwerte der Einzelerperimente. Die durch die Punkte dargestellte Kurve entspricht SUR2A(Y1206S): Mittelwerte  $\pm$  SEM aus  $n=4$ . Das durch die Dreiecke dargestellte Diagramm entspricht Kir6.2/SUR2A(Y1206S): Mittelwerte  $\pm$  SEM aus  $n=3$ .  $L_0$  [nM]-;  $pKi$  [-logM]-;  $n_H$ -; NSB [bestimmt mit 100  $\mu$ M P1075]-Werte siehe Tabelle. 100% Btot=250 fmol/mg für SUR2A(Y1206S) und 410 fmol/mg für Kir6.2/SUR2A(Y1206S).

In der Tabelle (Tab.13) sind die Parametermittelwerte aus den Fits der Einzelerperimenten zusammengefasst, welche für die weiterführenden Überlegungen benutzt werden.

SUR	$L_0$ [nM]	Btot (fmol/mg) NSB (%Btot)	$pK_D$ [-logM]	$n_H$
SUR2A(Y1206S)	$1,74 \pm 0,03$	250 fmol/mg $29 \pm 4\%$	$8,01 \pm 0,03$	$1,00 \pm 0,03$
Kir6.2/SUR2A(Y1206S)	$0,81 \pm 0,02$	410 fmol/mg $19 \pm 2\%$	$9,08 \pm 0,03$ ( $9,28 \pm 0,12$ )*	$1,63 \pm 0,08$

**Tab.13 Hemmung der  $^3H$ -GBC-Bindung an SUR2A(Y1206S) und an Kir6.2/SUR2A(Y1206S) durch GBC.**

\*:  $pK$ -Wert aus den Sättigungsversuch von Damian Stephan.

Parametertabelle (Mittelwerte  $\pm$  SEM der Einzelfits aus 4/3 Einzelexperimenten).

Die Tabelle ergibt für  $pK_D$  [-logM] bzw. für  $K_D$  [nM] bei SUR2A(Y1206S) einen  $pK_D$ -Wert= $8,01 \pm 0,03$  und somit  $K_D$ -Wert von 9,8 (8,5; 11) nM. Die Anpassung an die Mittelwerte liegt bei  $pK_{D(\text{gefittet})}=7,9$  was der  $K_{D(\text{gefittet})}=13$  nM entspricht. Bei homologer Verdrängung wird die  $K_D$  dadurch bestimmt, dass von der  $IC_{50}$  [nM] die im Versuch vorliegende Labelkonzentration ( $L_0$  [nM]) subtrahiert wird (siehe Kapitel 2 bei den entsprechenden Gleichungen).

Bei Kir6.2/SUR2A(Y1206S) ist die  $pK_{D(\text{errechnet})}=9,08 \pm 0,03$ , d.h.  $K_{D(\text{errechnet})}=0,83$  (0,72; 0,95) nM und die  $pK_{D(\text{gefittet})}$  liegt bei 8,91, was der  $K_{D(\text{gefittet})}=1,2$  nM entspricht. Auffallend ist der Hill-Koeffizient von 1.6, der nicht erklärt werden kann.

Es zeigt sich eine geringe Abweichung der Werte aus dem Mittelwertsfit (Abb.18) von den errechneten Werten, wobei die gefitteten  $pK_D$ -Werte bzw.  $K_D$ -Werte außerhalb des jeweiligen errechneten Konfidenzintervall liegen.

### **3.2.2 Bindung von Typ A Liganden an SUR2A(Y1206S) und Kir6.2/SUR2A(Y1206S): Glibornurid und Nateglinid**

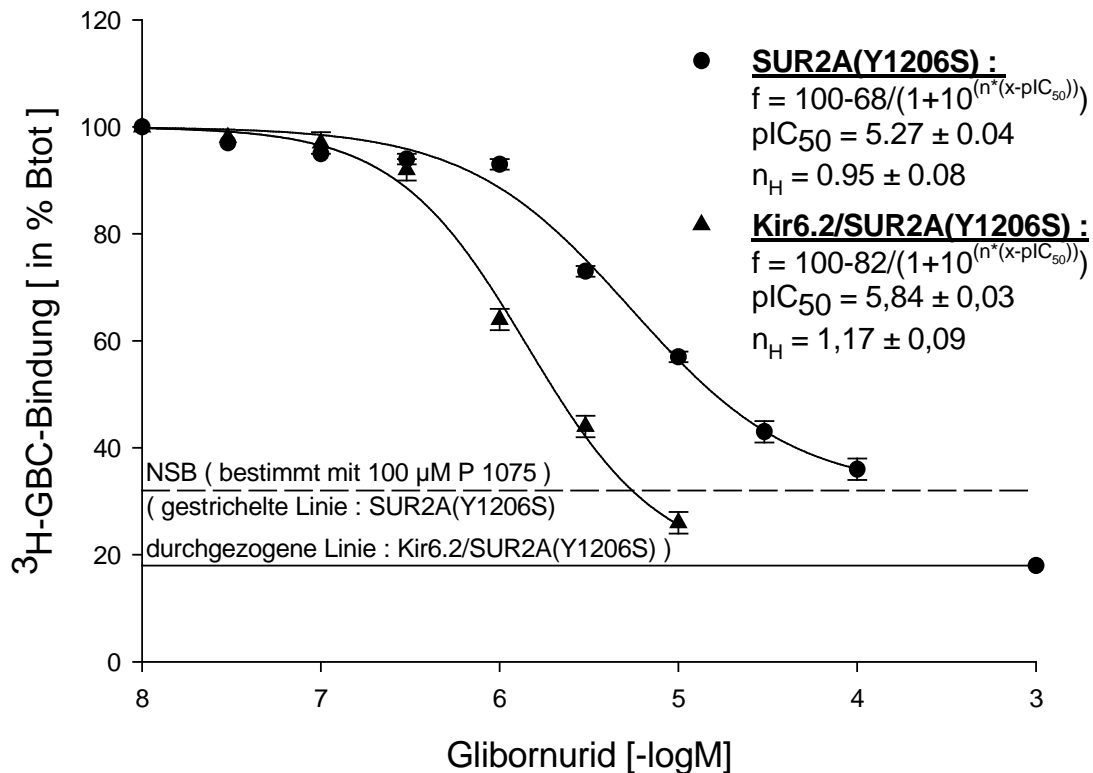
#### **3.2.2.1 Verdrängung von <sup>3</sup>H-GBC durch Glibornurid**

Bei den SUR2A(Y1206S)-Versuchen wurde jeweils eine Petrischale mit transient transfizierten SUR2A(Y1260S)-Zellen, deren Konfluenz zwischen 90-100% lag verwendet. Die Kir6.2/SUR2A(Y1260S)-Experimente wurden ebenfalls mit einer Schale transient transfizierten Zellen, deren Konfluenz 85-95% betrug durchgeführt.

Die heterologe Verdrängung von Glibornurid gegen <sup>3</sup>H-GBC an SUR2A(Y1260S)-Zellen und an Kir6.2/SUR2A(Y1260S)-Zellen wurde jeweils durch drei Bindungsversuche (n=3) ermittelt. Für die NSB-Bestimmung wurde jeweils 100 µM P1075 verwendet.

Das Diagramm (Abb.19) zeigt die Verdrängung von <sup>3</sup>H-GBC von SUR2A(Y1206S) und Kir6.2/SUR2A(Y1206S) durch Glibornurid als Fit durch die Mittelwerte.

Die Mittelwerte der Parameter aus den Fits der Einzelerperimente sind in der nachfolgenden Tabelle (Tab.14) angegeben.



**Abb.19 Hemmung der <sup>3</sup>H-GBC-Bindung an SUR2A(Y1206S) und an Kir6.2/SUR2A(Y1206S) durch Glibornurid.**

Die Regressionskurven repräsentieren den Fit der Gleichung 25 an die Mittelwerte der Einzelerperimente. Die durch die Punkte dargestellte Kurve entspricht SUR2A(Y1206S): Mittelwerte  $\pm$  SEM aus n=3. Das durch die Dreiecke dargestellte Diagramm entspricht Kir6.2/SUR2A(Y1206S): Mittelwerte  $\pm$  SEM aus n=3.  $L_0$  [nM];  $pK_i$  [-logM];  $n_H$ ; NSB [bestimmt mit 100 µM P1075]-Werte siehe Tabelle. 100% Btot=250 fmol/mg für SUR2A(Y1206S) und 410 fmol/mg für Kir6.2/SUR2A(Y1206S).

SUR	$L_0$ [nM]	Btot (fmol/mg) NSB (%Btot)	$pK_i$ [-logM]	$n_H$
SUR2A(Y1206S)	$2,53 \pm 0,08$	260 fmol/mg $32 \pm 1\%$	$5,33 \pm 0,01$	$0,98 \pm 0,01$
Kir6.2/SUR2A(Y1206S)	$0,86 \pm 0,01$	230 fmol/mg $18 \pm 0\%$	$6,28 \pm 0,04$	$1,08 \pm 0,08$

**Tab.14 Hemmung der <sup>3</sup>H-GBC-Bindung an SUR2A(Y1206S) und Kir6.2/SUR2A(Y1206S) durch Glibornurid.**

Parametertabelle (Mittelwerte  $\pm$  SEM der Einzelfits aus 3/3 Einzelerperimenten).

Der Tabellenwert für pKi [-logM] bzw. für Ki [nM] ist bei SUR2A(Y1206S) pKi-Wert=5,33 ± 0,01 und somit Ki=4,7 (4,5; 4,9) µM. Die Anpassung an die Mittelwerte liegt bei pKi<sub>(gefittet)</sub>=5,36, was der Ki<sub>(gefittet)</sub>=4,4 µM (4400 nM) entspricht.

Bei Kir6.2/SUR2A(Y1206S) ist die pKi<sub>(errechnet)</sub>=6,28 ± 0,04, d.h. Ki<sub>(errechnet)</sub>=530 (440; 630) nM, die pKi<sub>(gefittet)</sub>=6,26, was der Ki<sub>(gefittet)</sub>=550 nM entspricht.

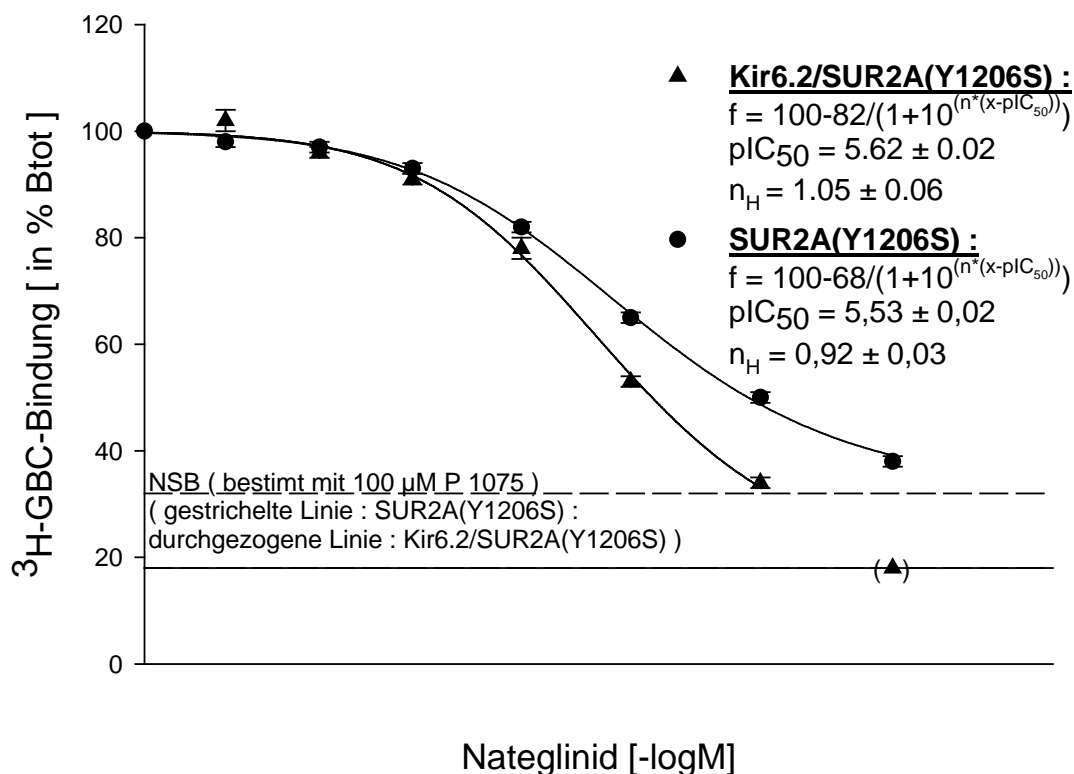
### 3.2.2.2 Verdrängung von <sup>3</sup>H-GBC durch Nateglinid

Bei den SUR2A(Y1206S)-Versuchen wurde bei den ersten beiden Bindungsversuchen S1 und S2 jeweils eine Petrischale mit transient transfizierten SUR2A(Y1206S)-Zellen, deren Konfluenz zwischen 90-100% lag verwendet. Die Versuche S3 und S4 wurden je mit drei Schalen permanent transfizierten Zellen mit ~80% Konfluenz durchgeführt. Die Kir6.2/SUR2A(Y1206S)-Experimente wurden ebenfalls mit einer Schale transient transfizierten Zellen, deren Konfluenz 90-100% betrug, durchgeführt. Die heterologe Verdrängung von Nateglinid gegen <sup>3</sup>H-GBC an SUR2A(Y1206S) bestand aus vier (n=4) Versuchen und an Kir6.2/SUR2A(Y1206S) aus drei Bindungsversuchen (n=3). Für die NSB-Bestimmung wurde jeweils 100 µM P1075 verwendet.

Das folgende Diagramm (Abb.20) und die Tabelle (Tab.15) zeigen die ermittelten Ergebnisse der Verdrängung von <sup>3</sup>H-GBC an SUR2A(Y1206S) und Kir6.2/SUR2A(Y1206S) durch Nateglinid.

Die Abbildung liegt dabei den Werten der Fits durch die Mittelwerte zugrunde und die Tabelle beinhaltet die Mittelwerte der Parameter aus den Fits der Einzelexperimente.





**Abb.20 Hemmung der <sup>3</sup>H-GBC-Bindung an SUR2A(Y1206S) und an Kir6.2/SUR2A(Y1206S) durch Nateglinid.**

Die Regressionskurven repräsentieren den Fit der Gleichung 25 an die Mittelwerte der Einzelerperimente. Die durch die Punkte dargestellte Kurve entspricht SUR2A(Y1206S): Mittelwerte  $\pm$  SEM aus n=4. Das durch die Dreiecke dargestellte Diagramm entspricht Kir6.2/SUR2A(Y1206S): Mittelwerte  $\pm$  SEM aus n=3.  $L_0$  [nM];  $pK_i$  [-logM];  $n_H$ ; NSB [bestimmt mit 100  $\mu$ M P1075]-Werte siehe Tabelle. 100% Btot=230 fmol/mg für SUR2A(Y1206S) und 220 fmol/mg für Kir6.2/SUR2A(Y1206S).

SUR	$L_0$ [nM]	Btot (fmol/mg) NSB (%Btot)	$pK_i$ [-logM]	$n_H$
SUR2A(Y1206S)	1,73 $\pm$ 0,09	230 fmol/mg 32 $\pm$ 1%	5,61 $\pm$ 0,02	0,91 $\pm$ 0,03
Kir6.2/SUR2A(Y1206S)	0,87 $\pm$ 0,04	220 fmol/mg 18 $\pm$ 1%	6,04 $\pm$ 0,02	1,11 $\pm$ 0,10

**Tab.15 Hemmung der <sup>3</sup>H-GBC-Bindung an SUR2A(Y1206S) und an Kir6.2/SUR2A(Y1206S) durch Nateglinid.**

Parametertabelle (Mittelwerte  $\pm$  SEM der Einzelfits aus 4/3 Einzelerperimenten).

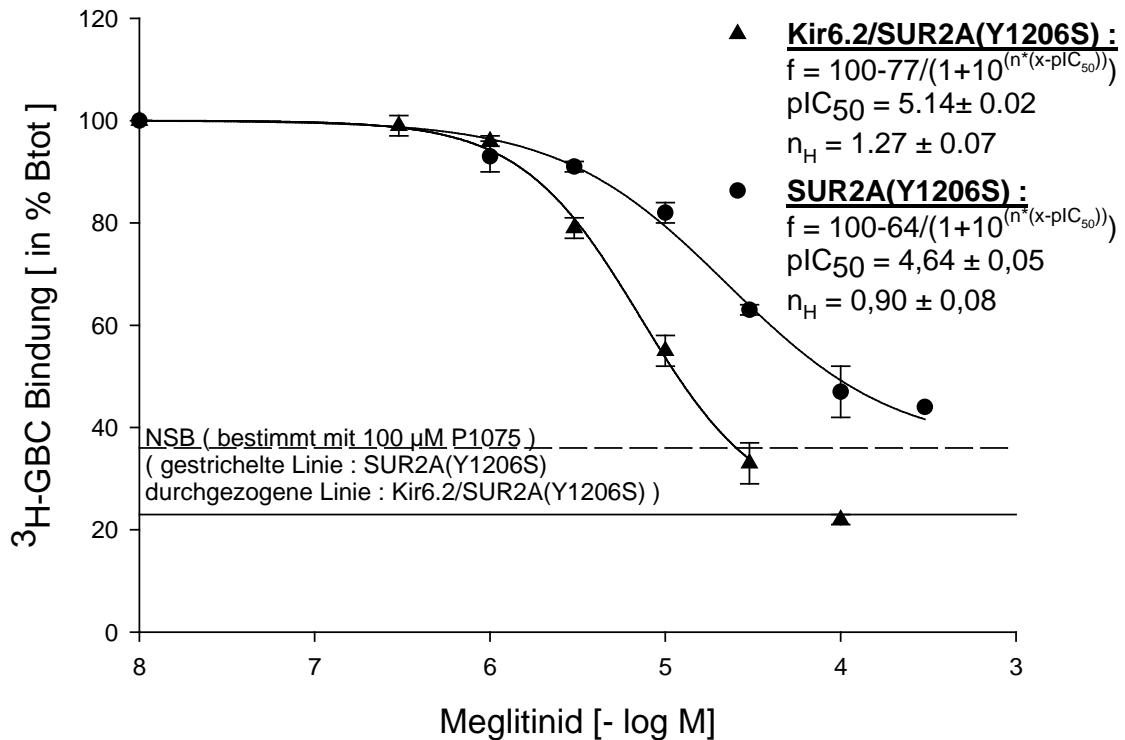
Der Tabellenwert für  $pK_i$  [-logM ] bzw. für  $K_i$  [nM] ist bei SUR2A(Y1206S)  $pK_i$ -Wert= $5,61 \pm 0,02$  und somit  $K_i = 2,5$  (2,2; 2,7)  $\mu\text{M}$ . Die Anpassung an die Mittelwerte liegt bei  $pK_{i(\text{gefittet})} = 5,60$  und  $K_{i(\text{gefittet})} = 2,5 \mu\text{M}$  (2500 nM) entspricht. Bei Kir6.2/SUR2A(Y1206S) ist die  $pK_{i(\text{errechnet})} = 6,04 \pm 0,02$ , d.h.  $K_{i(\text{errechnet})} = 910$  (830; 1000) nM, die  $pK_{i(\text{gefittet})} = 6,04$ , was der  $K_{i(\text{gefittet})} = 910$  nM entspricht. Es zeigt sich hier eine sehr genaue Übereinstimmung von experimentell ermittelten und gefitteten Wert.

### **3.2.3 Bindung von Typ B Liganden an SUR2A(Y1206S) und Kir6.2(Y1206S): Meglitinid, (-)-AZ-DF 265 und Repaglinid**

#### **3.2.3.1 Verdrängung von $^3\text{H}$ -GBC durch Meglitinid**

Die ersten beiden Experimente wurden mit jeweils eine Petrischale transient transfizierter SUR2A(Y1206S)-Zellen, deren Konfluenz zwischen 90-95% lag, und R3 mit drei Schalen der permanenten Zelllinie (Konfluenz ~75-80%) durchgeführt. Die Kir6.2/SUR2A(Y1206S)-Experimente wurden mit einer Schale transient transfizierten Zellen der Konfluenz 85-95% durchgeführt, wobei zwei Versuche von Herrn Apotheker Damian Stephan und ein Versuch von Petra Kühner gemacht wurden. Die heterologe Verdrängung von Meglitinid gegen  $^3\text{H}$ -GBC an SUR2A(Y1206S) und an Kir6.2/SUR2A(Y1206S) wurde jeweils durch drei Bindungsversuche ( $n=3$ ) ermittelt. Für die NSB-Bestimmung wurde jeweils 100  $\mu\text{M}$  P1075 verwendet.

Das folgende Diagramm (Abb.21) und die Tabelle (Tab.16) zeigen die ermittelten Ergebnisse der Hemmung der  $^3\text{H}$ -GBC-Bindung an SUR2A(Y1206S) und an Kir6.2/SUR2A(Y1206S) durch Meglitinid. Die Abbildung zeigt wieder die Tendenz zu einer positiven Kooperation der Bindung von Meglitinid an den Kir6.2/SUR2A(Y1206S) Kanal ( $n_H = 1,27 \pm 0,07 > 1$ ).



**Abb.21 Hemmung der  $^3$ H-GBC-Bindung an SUR2A(Y1206S) und an Kir6.2/SUR2A(Y1206S) durch Meglitinid.**

Die Regressionskurven repräsentieren den Fit der Gleichung 25 an die Mittelwerte der Einzelerperimente. Die durch die Punkte dargestellte Kurve entspricht SUR2A(Y1206S): Mittelwerte  $\pm$  SEM aus  $n=3$ . Das durch die Dreiecke dargestellte Diagramm entspricht Kir6.2/SUR2A(Y1206S): Mittelwerte  $\pm$  SEM aus  $n=3$ .  $L_0$  [nM]-;  $pKi$  [-logM]-;  $n_H$ -; NSB [bestimmt mit 100  $\mu$ M P1075]-Werte siehe Tabelle. 100% Btot=270 fmol/mg für SUR2A(Y1206S) und 630 fmol/mg für Kir6.2/SUR2A(Y1206S).

In der Tabelle (Tab.16) sind die Parametermittelwerte aus den Fits der Einzelerperimenten zusammengefasst, welche für die weiterführenden Überlegungen benutzt werden.

SUR	$L_0$ [nM]	Btot (fmol/mg) NSB (%Btot)	$pK_i$ [-logM]	$n_H$
SUR2A(Y1206S)	$1,93 \pm 0,13$	270 fmol/mg $36 \pm 2\%$	$4,70 \pm 0,04$	$1,05 \pm 0,07$
Kir6.2/SUR2A(Y1206S)	$0,82 \pm 0,01$	630 fmol/mg $23 \pm 1\%$	$5,53 \pm 0,05$	$1,15 \pm 0,03$

**Tab.16 Hemmung der  $^3\text{H}$ -GBC-Bindung an SUR2A(Y1206S) und an Kir6.2/SUR2A(Y1206S) durch Meglitinid.**

Parametertabelle (Mittelwerte  $\pm$  SEM der Einzelfits aus 3/3 Einzelerperimenten).

Der Tabellenwert für  $pK_i$  [-logM] bzw. für  $K_i$  [nM] ist bei SUR2A(Y1206S)  $pK_i$ -Wert  $=4,70 \pm 0,04$  und somit  $K_i = 20$  (17; 24)  $\mu\text{M}$ . Die Anpassung an die Mittelwerte liegt bei  $pK_{i(\text{gefittet})} = 4,72$  und  $K_{i(\text{gefittet})} = 19$   $\mu\text{M}$  entspricht. Die Cheng-Prusoff-Korrektur wurde mit  $K_{L(\text{GBC})} = K_{D(\text{GBC an SUR2A(Y1206S)})} = 9,8$  nM (siehe Kapitel 3.2.1.1 ) durchgeführt.

Bei Kir6.2/SUR2A(Y1206S) ist die  $pK_{i(\text{errechnet})} = 5,53 \pm 0,05$ , d.h.  $K_{i(\text{errechnet})} = 3,0$  (2,3; 3,7)  $\mu\text{M}$ , die  $pK_{i(\text{gefittet})} = 5,54$ , was der  $K_{i(\text{gefittet})} = 2,9$   $\mu\text{M}$  entspricht. Eine Cheng-Prusoff-Korrektur mit  $K_{L(\text{GBC})} = K_{D(\text{GBC an SUR2A(Y1206S)})} = 0,53$  nM wurde vorgenommen.

Man kann erkennen, dass sowohl bei SUR2A(Y1206S) alleine, als auch bei der Koexpression die Werte aus der Anpassung an die Mittelwerte im Konfidenzintervall liegen.

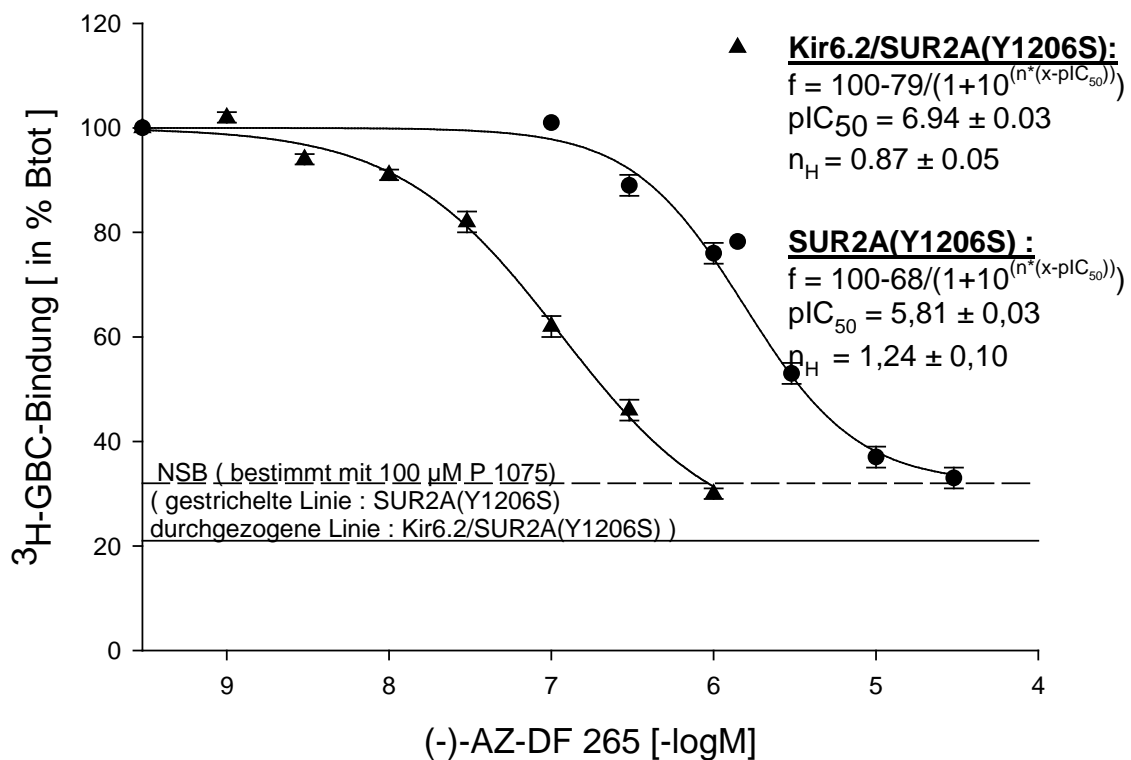
### 3.2.3.2 Verdrängung von $^3\text{H}$ -GBC durch (-)-AZ-DF 265

Bei den SUR2A(Y1206S)Versuchen wurde bei Versuch 1 und 2 jeweils eine Petrischale mit transient transfizierten SUR2A(Y1206S)-Zellen, deren Konfluenz zwischen 90-100% lag, und bei Q3 drei Schalen der permanenten Zelllinie (Konfluenz  $\sim 80\%$ ) verwendet. Die Kir6.2/SUR2A(Y1206S)-Experimente wurden mit einer Schale transient transfizierten Zellen der Konfluenz 90-95% durchgeführt, wobei zwei Experimente von mir und ein Versuch von Petra

Kühner gemacht wurden. Auch hier erfolgte die NSB-Bestimmung mit 100  $\mu$ M P1075.

Bei dieser Experimenteserie konnte kein Hinweis auf eine positive Kooperation in der Bindung von (-)-AZ-DF 265 an Kir6.2/SUR2A(Y1206S) gefunden werden ( $n_H=0,87 \pm 0,05 \leq 1$ ).

Die folgende Abbildung (Abb.22) zeigt die Hemmung der  $^3$ H-GBC-Bindung an SUR2A(Y1206S) und an Kir6.2/SUR2A(Y1206S) durch die Substanz (-)-AZ-DF.



**Abb.22 Hemmung der  $^3$ H-GBC-Bindung an SUR2A(Y1206S) und an Kir6.2/SUR2A(Y1206S) durch (-)AZ-DF265.**

Die Regressionskurven repräsentieren den Fit der Gleichung 25 an die Mittelwerte der Einzelexperimente. Die durch die Punkte dargestellte Kurve entspricht SUR2A(Y1206S): Mittelwerte  $\pm$  SEM aus  $n=3$ . Das durch die Dreiecke dargestellte Diagramm entspricht Kir6.2/SUR2A(Y1206S): Mittelwerte  $\pm$  SEM aus  $n=3$ .  $L_0$  [nM]-;  $pKi$  [-logM]-;  $n_H$ -; NSB [bestimmt mit 100  $\mu$ M P1075]-Werte siehe Tabelle. 100% Btot=220 fmol/mg für SUR2A(Y1206S) und 270 fmol/mg für Kir6.2/SUR2A(Y1206S).

Die folgende Tabelle (Tab.17) listet die Mittelwerte der Parameter aus den Fits der Einzelversuchen (Kir6.2/SUR2A(Y1206S) und SUR2A(Y1206S) alleine) auf.

SUR	$L_0$ [nM]	$B_{tot}$ (fmol/mg) NSB (% $B_{tot}$ )	$pK_i$ [-logM]	$n_H$
SUR2A(Y1206S)	$1,65 \pm 0,06$	220 fmol/mg $32 \pm 2\%$	$5,90 \pm 0,05$	$1,23 \pm 0,03$
Kir6.2/SUR2A(Y1206S)	$0,88 \pm 0,00$	270 fmol/mg $21 \pm 0\%$	$7,37 \pm 0,05$	$0,88 \pm 0,03$

**Tab.17 Hemmung der  $^3\text{H}$ -GBC-Bindung an SUR2A(Y1206S) und an Kir6.2/SUR2A(Y1206S) durch (-)-AZ-DF 265.**

Parametertabelle (Mittelwerte  $\pm$  SEM der Einzelfits aus 3/3 Einzelversuchen).

Der Tabellenwert für  $pK_i$  [-logM] bzw. für  $K_i$  [nM] ist bei SUR2A(Y1206S)  $pK_i$ -Wert= $5,90 \pm 0,05$  und somit  $K_i=1,3$  (1,0; 1,6)  $\mu\text{M}$ . Die Anpassung an die Mittelwerte liegt bei  $pK_{i(\text{gefittet})}=5,88$ , was der  $K_{i(\text{gefittet})}=1,3$   $\mu\text{M}$  entspricht. Die Cheng-Prusoff-Korrektur wurde mit  $K_{L(\text{GBC})}=K_{D(\text{GBC an SUR2A(Y1206S)})}=9,8$  nM durchgeführt.

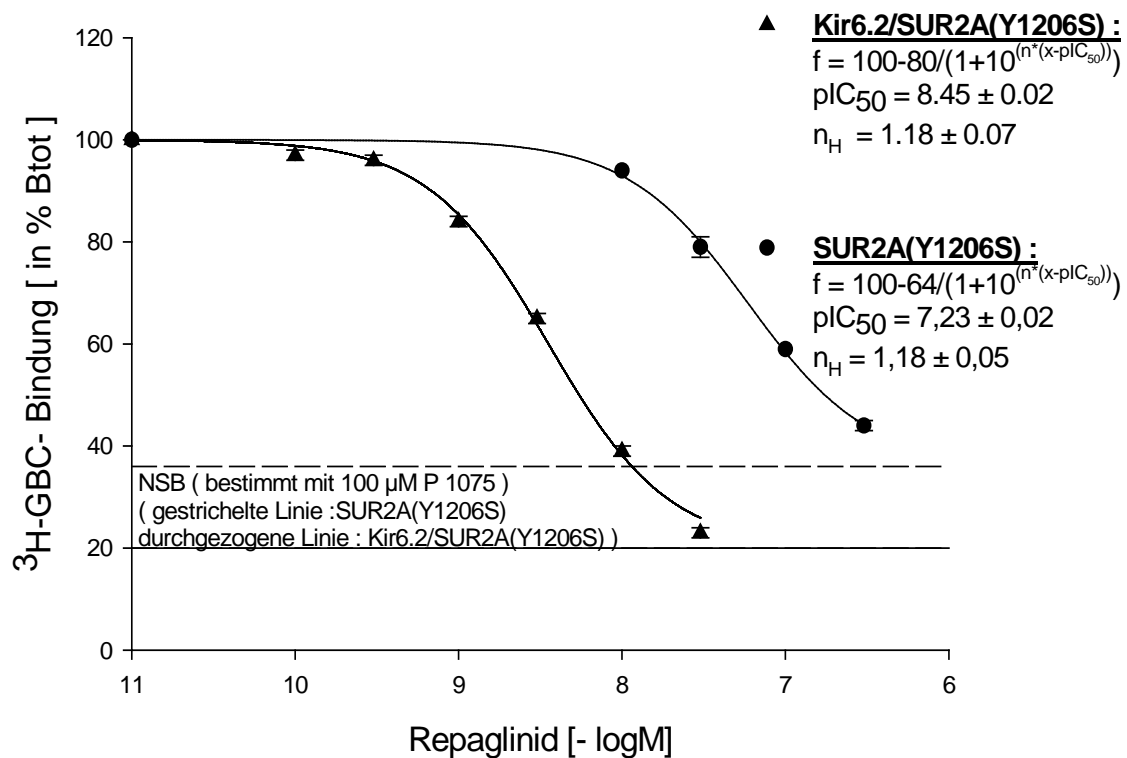
Bei Kir6.2/SUR2A(Y1206S) ist die  $pK_{i(\text{errechnet})}=7,37 \pm 0,05$ , d.h.  $K_{i(\text{errechnet})}=43$  (34; 54) nM, die  $pK_{i(\text{gefittet})}=7,37$  und entspricht somit einer  $K_{i(\text{gefittet})}=43$  nM. Eine Cheng-Prusoff-Korrektur mit  $K_{L(\text{GBC})}=K_{D(\text{GBC an SUR2A(Y1206S)})}=0,53$  nM wurde vorgenommen.

Man kann erkennen, dass sowohl bei SUR2A(Y1206S) alleine, als auch bei der Koexpression die gefitteten Werte im Konfidenzintervall liegen und nur eine geringe Abweichung zeigen.

### 3.2.3.3 Verdrängung von $^3\text{H}$ -GBC durch Repaglinid

Von den vier Experimenten ( $n=4$ ) an SUR2A(Y1206S) wurde beim ersten und zweiten Versuch jeweils eine Petrischale mit transient transfizierten SUR2A(Y1206S)-Zellen (Konfluenz zwischen 90-95%) und beim dritten Experiment eine Schale der permanenten Zelllinie (Konfluenz  $\sim 70\%$ ) verwendet. Die Gesamtauswertung dieser Versuchsreihe stützt sich somit auf  $n=3$  Experimenten. Die Kir6.2/SUR2A(Y1206S)-Experimente ( $n=4$ ) wurden mit

einer Schale transient transfizierten Zellen, deren Konfluenz 90-95% betrug, durchgeführt. Drei der vier Experimente wurden von mir ausgeführt und einer (V24) von Petra Kühner. Auch hier erfolgte die NSB-Bestimmung mit 100  $\mu$ M P1075.



**Abb.23 Hemmung der  $^3$ H-GBC-Bindung an SUR2A(Y1206S) und an Kir6.2/SUR2A(Y1206S) durch Repaglinid.**

Die Regressionskurven repräsentieren den Fit der Gleichung 25 an die Mittelwerte der Einzelerperimente. Die durch die Punkte dargestellte Kurve entspricht SUR2A(Y1206S): Mittelwerte  $\pm$  SEM aus  $n=3$ . Das durch die Dreiecke dargestellte Diagramm entspricht Kir6.2/SUR2A(Y1206S): Mittelwerte  $\pm$  SEM aus  $n=3$ .  $L_0$  [nM]-;  $pKi$  [-logM]-;  $n_H$ -; NSB [bestimmt mit 100  $\mu$ M P1075]-Werte siehe Tabelle. 100% Btot=200 fmol/mg für SUR2A(Y1206S) und 220 fmol/mg für Kir6.2/SUR2A(Y1206S).

SUR	$L_0$ [nM]	Btot(fmol/mg) NSB (%Btot)	$pK_i$ [-logM]	$n_H$
SUR2A(Y1206S)	$1,73 \pm 0,04$	200 fmol/mg $36 \pm 2\%$	$7,33 \pm 0,06$	$1,18 \pm 0,03$
Kir6.2/SUR2A(Y1206S)	$0,87 \pm 0,02$	220 fmol/mg $20 \pm 1\%$	$8,88 \pm 0,02$	$1,22 \pm 0,06$

**Tab.18 Hemmung der  $^3\text{H}$ -GBC-Bindung an SUR2A(Y1206S) und an Kir6.2/SUR2A(Y1206S) durch Repaglinid.**

Parametertabelle (Mittelwerte  $\pm$  SEM der Einzelfits aus 3/3 Einzelerperimenten).

Der Tabellenwert für  $pK_i$  [-logM] bzw. für  $K_i$  [nM] ist bei SUR2A(Y1206S)  $pK_i$ -Wert= $7,33 \pm 0,06$  und somit  $K_i=47$  (35; 62) nM. Die Anpassung an die Mittelwerte liegt bei  $pK_{i(\text{gefittet})}=7,30$  und entspricht einer  $K_{i(\text{gefittet})}=50$  nM. Die Cheng-Prusoff-Korrektur wurde mit  $K_{L(\text{GBC})}=K_{D(\text{GBC an SUR2A(Y1206S)})}=9,8$  nM durchgeführt.

Bei Kir6.2/SUR2A(Y1206S) ist die  $pK_{i(\text{errechnet})}=8,88 \pm 0,02$ , d.h.  $K_{i(\text{errechnet})}=1,3$  (1,2; 1,5) nM, die  $pK_{i(\text{gefittet})}=8,87$ , was der  $K_{i(\text{gefittet})}=1,3$  nM entspricht. Eine Cheng-Prusoff-Korrektur mit  $K_{L(\text{GBC})}=K_{D(\text{GBC an SUR2A(Y1206S)})}=0,53$  nM wurde vorgenommen.

Auch hier erkennt man, dass sowohl bei SUR2A(Y1206S) alleine, als auch bei der Koexpression die Werte aus der Anpassung an die Mittelwerte im Konfidenzintervall liegen und nur gering von den experimentell ermittelten Werten abweichen.



## 4 Diskussion

### 4.1 Vorbemerkungen

Der ATP-empfindliche Kaliumkanal ( $K_{ATP}$ -Kanal) ist v.a. bekannt als Ansatzpunkt der Sulfonylharnstoffe und Glinide, die durch Hemmung der Aktivität des Kanals in der  $\beta$ -Zelle des Pankreas die Insulinsekretion fördern. Die  $K_{ATP}$ -Kanäle kommen in allen erregbaren Zellen vor und sind Oktamere aus vier einwärtsgerichtenden Untereinheiten der Familie Kir6.x und vier Sulfonylharnstoffrezeptoren (SUR). Kir6.1 (Gefäßmuskelzelle) und Kir6.2 (alle anderen Myozyten, B-Zellen, Neurone usw.) sind die beiden existierenden Subtypen der Kir6.x Familie und von den SUR-Subtypen gibt es SUR1 ( $\beta$ -Zelle, Gehirn), SUR2A (Herz- und Skelettmuskel) und SUR2B (glatte Muskelzellen). SUR2A und 2B entstehen aus alternativem Spleißen desselben Gens und unterscheiden sich nur in den letzten 42 Aminosäuren des Carboxyterminus. Darüber hinaus gibt es vielerlei Mutanten, wobei für diese Arbeit die künstliche Mutante SUR2A(Y1206S) bzw. Kir6.2/SUR2A(Y1206S) eine wichtige Rolle spielt.

Diese Experimente sind Teil eines größeren Projektes der Arbeitsgruppe, in der die Bindung der Sulfonylharnstoffe und Glinide an die Sulfonylharnstoffrezeptoren untersucht wird bezüglich:

- ihrer Selektivität für die SUR-Subtypen.
- der Effekte der Koexpression mit Kir6.x (hier Kir6.2). Dies erlaubt die Bestimmung der Selektivität der Sulfonylharnstoff- und Glinid-Bindung an die physiologisch wichtigen Kanaltypen Kir6.2/SUR1, Kir6.2/SUR2A, Kir6.1/SUR2B und Kir6.2/SUR2B.
- den Einflüssen der Mutation Y1206S bei den SUR2-Isoformen mit und ohne Koexpression.

In dieser Arbeit wurden SUR1 und SUR2A(Y1206S) untersucht.

Die folgenden zwei Tabellen stellen die in den Bindungsversuchen (Kapitel 3) ermittelten Ergebnisse für die verwendeten Substanzen der jeweiligen Ligandentypen zusammengestellt dar. Es werden für SUR1 bzw. für Kir6.2/SUR1 (Tab.19) und für SUR2A(Y1206S) bzw. Kir6.2/SUR2A(Y1206S) (Tab.20) jeweils die pKi- bzw. die Ki-Werte angegeben. Zusätzlich beinhalten die beiden Tabellen die Differenzen zwischen den pKi-Werten von SUR alleine und den pKi-Werten der Koexpression mit Kir6.2. Die Thermodynamik verknüpft die Änderung der Gibbs'schen freien Enthalpie  $\Delta G$  mit der Gleichgewichtskonstanten  $K_D$  nach der Formel:

$$\Delta G = R \cdot T \cdot \ln K_D = -2.3 \cdot R \cdot T \cdot pK_D.$$

Damit ist die Differenz  $\Delta$  in den pKi-Werten der Änderung der freien Enthalpie proportional und man errechnet, dass  $\Delta=1$  (d.h.  $f \equiv 10^\Delta = 10$ ) eine Zunahme der freien Enthalpie um  $\sim 1.4$  kcal/mol entspricht. Somit geben diese Werte wichtige Informationen inwiefern die Affinität von SUR1 bzw SUR2A(Y1206S) für die Sulfonylharnstoffe und Glinide (an intakten HEK-Zellen) durch die Koexpression mit Kir6.2 beeinflusst werden.

Substanzen (Ligandentyp)	SUR1		Kir6.2/SUR1		$\Delta =$ pKi (SUR1/Kir6.2) - pKi (SUR1)	$f =$ Ki (-)/Ki (+) = $10^\Delta$
	pKi	Ki (nM)	pKi	Ki (nM)		
Glibenclamid: (A+B)	8.84 ± 0.02	1.5 (1.3, 1.6)	9.35 ± 0.08	0,45 (0.31, 0.65)	0.51 ± 0.08	3.2 (2.2, 4.7)
Glimepirid: (A+B)	8.67 ± 0.03	2.1 (1.9, 2.5)	9.24 ± 0.02	0.58 (0.52, 0.63)	0.57 ± 0.03	3.7 (3.2, 4.3)
Glibornurid: (A)	5.80 ± 0.07	1600 (1100, 2200)	6.44 ± 0.02	360 (330, 400)	0.64 ± 0.04	4.4 (3.6, 5.2)
Nateglinid: (A)	5.98 ± 0.03	1000 (910, 1200)	6.46 ± 0.01	350 (330, 360)	0.48 ± 0.03	3.0 ( 2.6, 3.5)
Meglitinid: (B)	4.75 ± 0.03	18000 (15000, 20000)	5.50 ± 0.03	3200 (2800, 3600)	0.75 ± 0.08	5.6 (3.9, 8.1)
UL-DF: (B)	3.95 ± 0.04	110000 (93000, 130000)	4.38 ±0.01	42000 (40000, 44000)	0.43 ± 0.03	2.7 (2.3, 3.1)
(-)-AZ-DF: (B)	5.86 ± 0.03	1400 (1200, 1600)	8.43 ± 0.06	3,7 (2.8, 4.9)	2.57 ± 0.06	370 (280, 490)
Repaglinid: (B)	7.04 ± 0.04	91 (76, 110)	9.14 ± 0.04	0,72 (0.60, 0.87)	2.10 ± 0.06	130 (95, 170)

**Tab. 19 Effekte der Koexpression mit Kir6.2 auf die Affinität von SUR1 für Sulfonylharnstoffe und Glinide in intakten HEK-Zellen.**

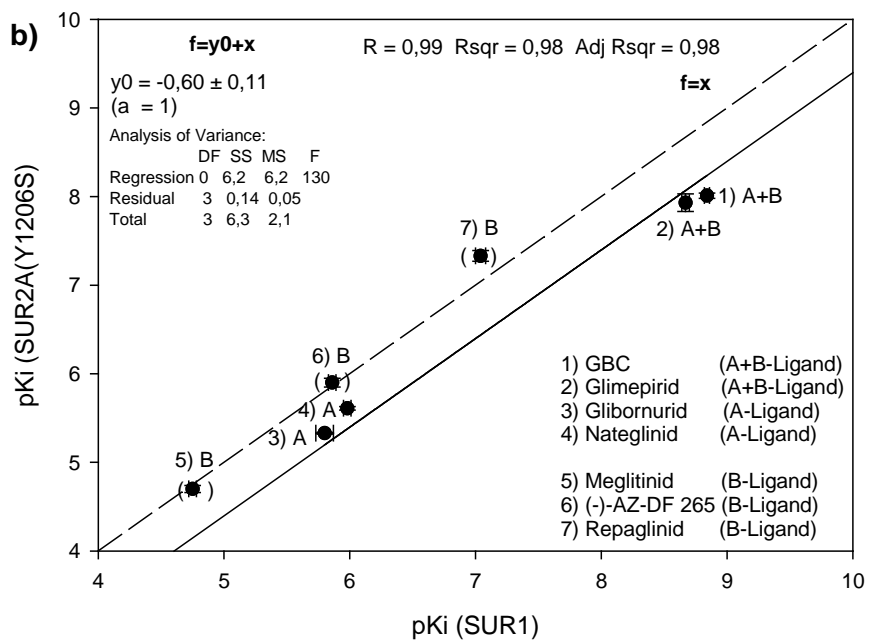
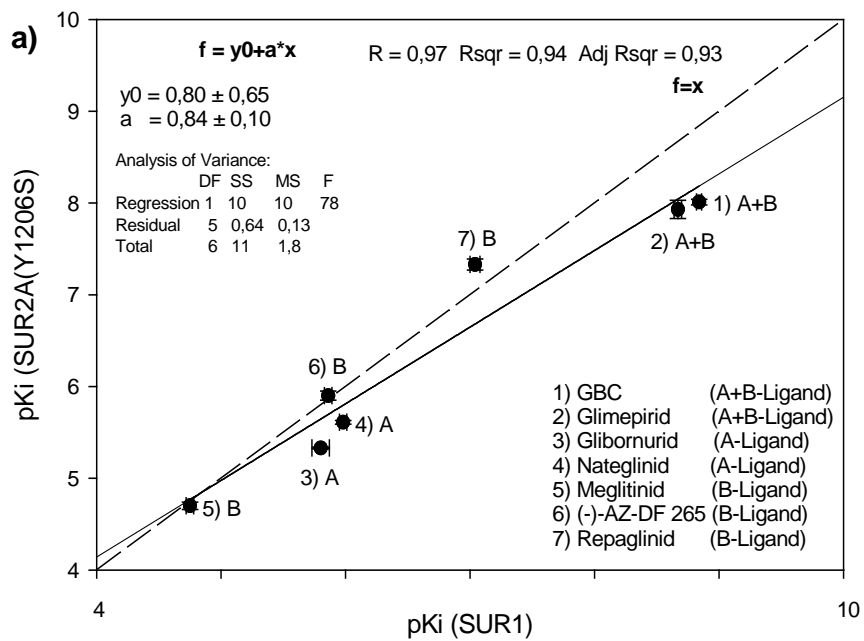
Substanzen (Ligandentyp)	SUR2A(YS)		Kir6.2/SUR2A(YS)		$\Delta =$ $pK_i(\text{SUR2A(YS)/Kir6.2}) -$ $pK_i(\text{SUR2A(YS)})$	$f =$ $K_i(-) / K_i(+)=10^{\Delta}$
	pKi	Ki (nM)	pKi	Ki (nM)		
Glibenclamid: (A+B)	8.01 ± 0.03	9.8 (8.5, 11)	9.08 ± 0.03 *	0.83 (0.72, 0.95) *	1.07 ± 0.08	12 (8.1, 17)
Glimepirid: (A+B)	7.93 ± 0.10	12 (7.4, 19)	9.16 ± 0.05	0.69 (0.55, 0.87)	1.23 ± 0.10	17 (11, 27)
Glibornurid: (A)	5.33 ± 0.01	4700 (4500, 4900)	6.28 ± 0.04	520 (440, 630)	0.95 ± 0.03	8.9 (7.8, 10)
Nateglinid: (A)	5.61 ± 0.02	2500 (2200, 2700)	6.04 ± 0.02	910 (830, 1000)	0.43 ± 0.03	2.7 (2.3, 3.1)
Meglitinid: (B)	4.70 ± 0.04	20000 (17000, 24000)	5.53 ± 0.05	3000 (2300, 3700)	0.83 ± 0.04	6.8 (5.6, 8.1)
(-)-AZ-DF: (B)	5.90 ± 0.05	1300 (1000, 1600)	7.37 ± 0.05	43 (34, 54)	1.47 ± 0.05	30 (23, 37)
Repaglinid: (B)	7.33 ± 0,06	47 (35, 62)	8.88 ± 0.02	1.3 (1.2, 1.4)	1.55 ± 0.04	35 (30, 43)

\* : pK-Wert: 9.28 ± 0.12 bzw. Ki (nM): 0.52 (0.30, 0.91) aus den Sättigungsversuchen von Herrn Damian Stephan.

**Tab.20 Effekt der Koexpression mit Kir6.2 auf die Affinität von SUR2A(Y1206S) für Sulfonylharnstoffe und Glinide in intakten HEK-Zellen.**

**4.2 Vergleich der Affinität von SUR1 und SUR2A(Y1206S) für Sulfonylharnstoffe und Glinide**

Um die Affinität von SUR1 für die jeweiligen Sulfonylharnstoffe und Glinide mit der von der Mutanten SUR2A(Y1206S) zu vergleichen, wurden die entsprechenden pKi-Werte der Tabelle 19 und 20 entnommen und die Punkte gegeneinander aufgetragen (Abb.24).



**Abb.24 Vergleich der Affinitäten (gegeben durch die pKi-Werte) von SUR1 und SUR2A(Y1206S) für Sulfonylharnstoffe und Glinide; (gestrichelte Gerade=Identitätslinie:  $f=x$ ).**

- a)** alle Substanzen, Steigung frei  
**b)** Gerade ohne die Typ B-Liganden, Steigung  $a=1$

Bevor die Einzelheiten der Korrelation diskutiert werden sei zunächst noch einmal betont, dass in dieser Arbeit der Vergleich zwischen SUR1 und der Mutanten von SUR2A, SUR2A(Y1206S) diskutiert wird. Andere Arbeiten in unserer Arbeitsgruppe (Stephan et al., BJP 2005, im Druck) haben gezeigt, dass die Mutation Y1206S die Affinität von SUR2 für Typ A- und Typ A+B-Liganden um einen Faktor  $\sim 8$  erhöht. Bei den Typ B- Liganden wirkt sich die Mutation jedoch kaum oder sogar negativ auf die Affinität aus. Aus diesem Grund lassen diese Messungen keinen oder nur einen sehr begrenzten Rückschluss auf die Selektivität der untersuchten Substanzen für den pankreatischen (SUR1) gegenüber dem kardialen SUR (SUR2A) zu. Sie erlauben hingegen Rückschlüsse auf die Bindungstasche der beiden SURs für Sulfonylharnstoffe und Glinide.

Schaut man sich nun die Identitätslinie (Ursprungsgerade mit Steigung  $a=1$ :  $f=x$  in Abb.24) genau an, so erkennt man, dass die drei Typ B-Liganden mit den Zahlen 5-7 (5)=Meglitinid, 6)=(-)-AZ-DF265, 7)=Repaglinid) relativ gut auf der Geraden zu liegen kommen. Aus dieser Tatsache läßt sich schließen, dass der B-Teil der Bindungstasche in den beiden SUR-Typen, SUR1 und SUR2A(Y1206S) ähnlich sein muß. Die einzelnen Werte zeigen für die drei B-Liganden nur eine geringe Abweichung, z.B. lauten die  $pK_i$ -Werte für Meglitinid (4,75/4,70) anstatt  $x=y$ . Für (-)-AZ-DF265 ergibt sich (5,86/5,90) und für Repaglinid (7,04/7,33). Da darüber hinaus die Mutation von SUR2A, nämlich SUR2A(Y1206S), nur wenig an der Affinität der B-Liganden ändert bedeutet dies eine nur geringe Selektivität der B-Liganden für die SUR-Subtypen.

Die Punkte der A- und A+B-Liganden liegen unter der Identitätslinie. Vergleicht man die  $pK_i$ -Werte der Tabelle 19 und 20, zeigt sich bei GBC eine Differenz zwischen dem Wert der Abszisse und der Ordinate von 0,83. D.h. der y-Wert von GBC liegt um 0,83 unterhalb der Identitätslinie ( $x=y$ ). Für Glimepirid errechnet sich eine Differenz des y-Werts ( $pK_i(\text{SUR2A(Y1206S)})=7,93$ ) zum fiktiven Punkt auf der Ursprungsgeraden ( $pK_i(\text{SUR1})=x=8,67=pK_i(\text{SUR2A(Y1206S)})=y$ ) von 0,74. Für die beiden A+B-Liganden ergibt sich bei Glibornurid eine Differenz von 0,47 und bei Nateglinid von 0,37. Bildet man die Durchschnittswerte für die Abweichung der A-Liganden

errechnet sich ein Wert von 0,42 und bei den A+B-Liganden 0,79. Die Typ A- und A+B- Liganden haben folglich eine höhere Affinität zu SUR1 gegenüber SUR2A(Y1206S), wohingegen die Typ B-Liganden an SUR1 und an SUR2A(Y1206S) eine ähnliche Affinität zeigen. Die Bindung der A- und der A+B-Liganden wird durch die Mutation beeinflusst, wobei man evtl. eine Strukturveränderung der Bindungsstelle als mögliche Ursache sehen könnte.

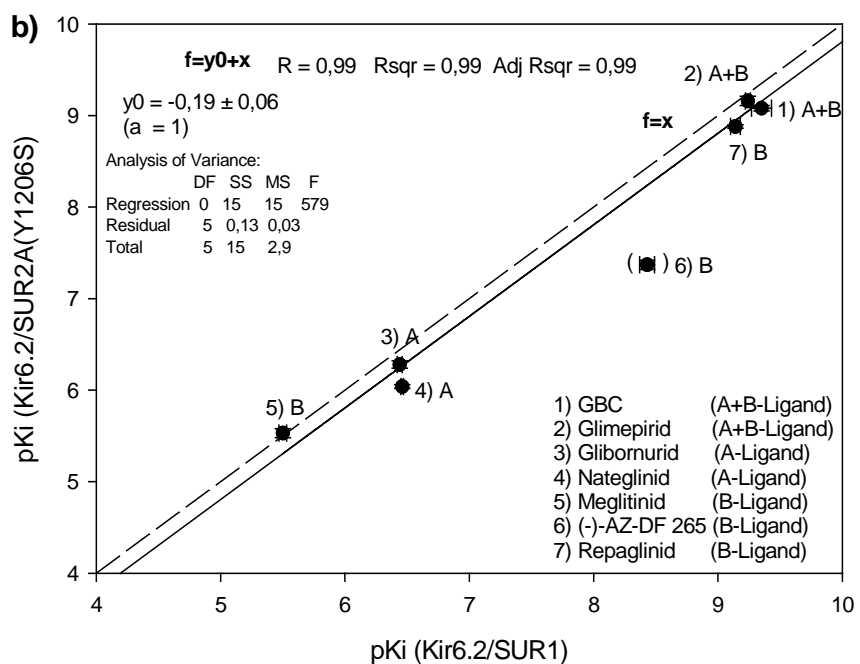
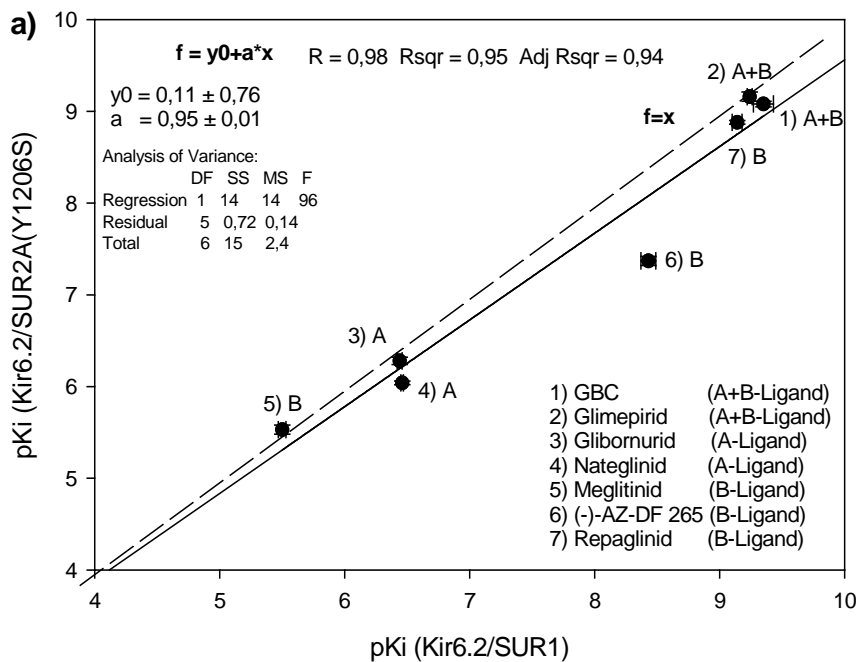
Bei der Korrelation in Abb.24 a) sind alle Verbindungen berücksichtigt und es zeigt sich dennoch eine gute Korrelation mit einem Korrelationskoeffizienten  $r=0,97$ . Es lassen sich keine starken "Abweichler" von der Geraden  $y=0,80(\pm 0,65)+0,84(\pm 0,10)*x$  erkennen mit einer Ausnahme, der Verbindung Repaglinid. Der pKi-Wert für SUR1 beträgt 7,04 und für SUR2A(Y1206S) 7,33. D.h. Repaglinid bindet signifikant besser an SUR2A(Y1206S) als an SUR1.

Die Steigung der Geraden in Abb.24 a) ist mit  $a=0,84 \pm 0,10 < 1,00$  nur schwierig zu beurteilen. Rein mathematisch lässt sich daraus ablesen, dass sich ein Anstieg der Affinität um den Faktor 10 bei SUR1 sich bei SUR2A(Y1206S) als  $10^{0,81}=6.4$ -fach auswirkt. Bei niedriger Affinität der Verbindungen fällt die Korrelationsgerade mit der Identitätsgeraden zusammen, bei hoher Affinität, wie z.B. bei GBC und Glimperid, liegt die Korrelationsgerade unter der  $y=x$ -Linie. Diese Typ A+B-Liganden sind für SUR1 optimiert und SUR1 selektiv.

In der Korrelation in Abb.24 b) sind nur die Typ A- und A+B-Liganden berücksichtigt und eine Steigung von  $a=1,00$  erzwungen worden. Es zeigt sich eine sehr gute Korrelation mit  $r=0,99$ . Statistisch gesehen binden diese Liganden mit  $10^{0,60}=4.0$  (2.4, 6.6) -fach besser an SUR1 als an die SUR2A-Mutante.

#### **4.3 Vergleich der Affinität von Kir6.2/SUR1 und Kir6.2/SUR2A(Y1206S) für Sulfonylharnstoffe und Glinide**

Um die Affinität von Kir6.2/SUR1 und Kir6.2/SUR2A(Y1206S) darzustellen wurde gleich verfahren wie bei SUR1 und SUR2A(Y1206S) alleine (vgl. 4.1). Die folgende Abbildung 25 zeigt die experimentell ermittelten Ergebnisse.



**Abb. 25** Vergleich der Affinitäten (gegeben durch die pKi-Werte) von Kir6.2/SUR1 und Kir6.2/SUR2A(Y1206S) für Sulfonylharnstoffe und Glinide; (gestrichelte Gerade=Identitätslinie:f=x).

**a)** alle Substanzen, Steigung frei

**b)** Gerade ohne (-)-AZ-DF265, Steigung a=1

In der Abb.25 a) sind alle Verbindungen berücksichtigt und die Steigung frei gewählt worden. Die sich daraus ergebende Gerade hat sich im Vergleich zu 4.2 der Identitätslinie weiter genähert. Auch hier zeigt sich eine sehr gute, glatte Korrelation der einzelnen Verbindung mit  $r=0,98$ . Eine Ausnahme bildet die Ausreißerverbindung (-)-AZ-DF265 (Punkt 6) in FigB a)), der weit unterhalb beider Geraden liegt. Der pKi-Wert von (-)-AZ-DF265 an Kir6.2/SUR1 beträgt 2,57, der an Kir6.2/SUR2A(Y1206S) 1,47. Als Differenz der pKi-Werte errechnet sich 1,1. (-)-AZ-DF265 bindet signifikant besser an Kir6.2/SUR1 als an Kir6.2/SUR2A(Y1206S) und ist somit selektiv für das Pankreas.

Die Steigung in Abb.25 a) ist durch  $a=0,95 \pm 0,01$  gegeben und damit beinahe 1,00. Jedoch ist sie minimal kleiner als 1 und der Ordinatenabschnitt  $y_0=0,11 \pm 0,76$  somit unbrauchbar.

Die Abb.25 b) beschreibt die Gerade unter Berücksichtigung aller Verbindungen ohne (-)-AZ-DF265 und mit erzwungener Steigung  $a=1,00$ . Auch in diesem Fall verringert sich der Abstand der parallel verlaufenden Geraden. Alle Verbindungen mit Ausnahme von (-)-AZ-DF265 sind um den Faktor  $10^{0,19 \pm 0,06}=1.5$  (1.2, 2.0) selektiv für das Pankreas gegenüber der Herzmutanten. Die Sonderstellung für (-)-AZ-DF265 rührt daher, dass die Mutation im SUR2A die Affinität für (-)-AZ-DF265 eher schwächt als erhöht.

Vergleicht man die jeweiligen Werte in den Tabellen 19 und 20, fällt zuerst auf, dass die Koexpression mit Kir6.2 sowohl bei SUR1 als auch bei SUR2A(Y1206S) zu einer deutlichen Erhöhung der pKi-Werte der Sulfonylharnstoffe und Glinide führt (genauere Darstellung siehe 4.4). Zudem wird die Korrelation (Abb.25) durch die Koexpression mit Kir6.2 besser.

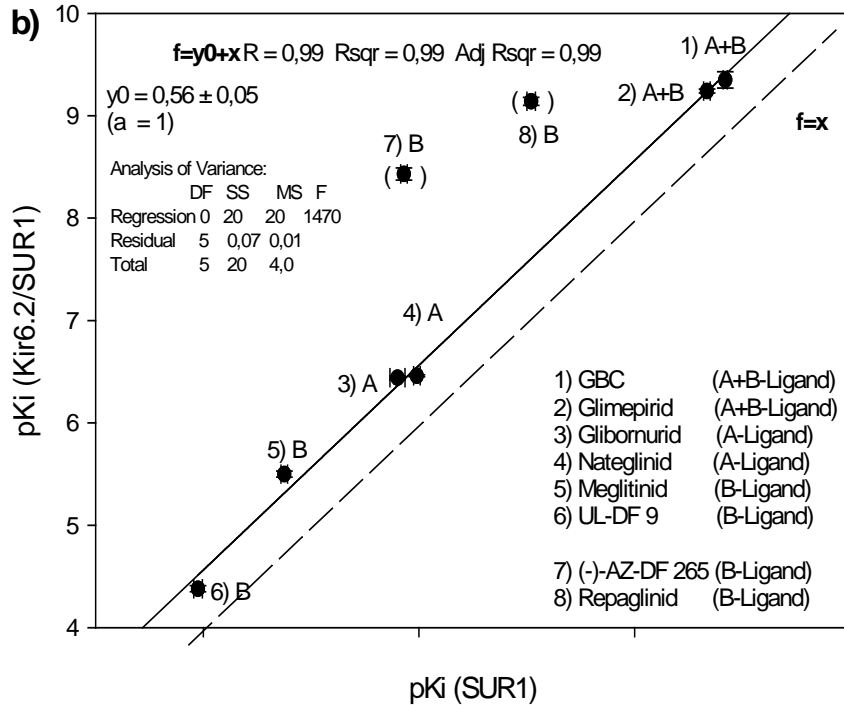
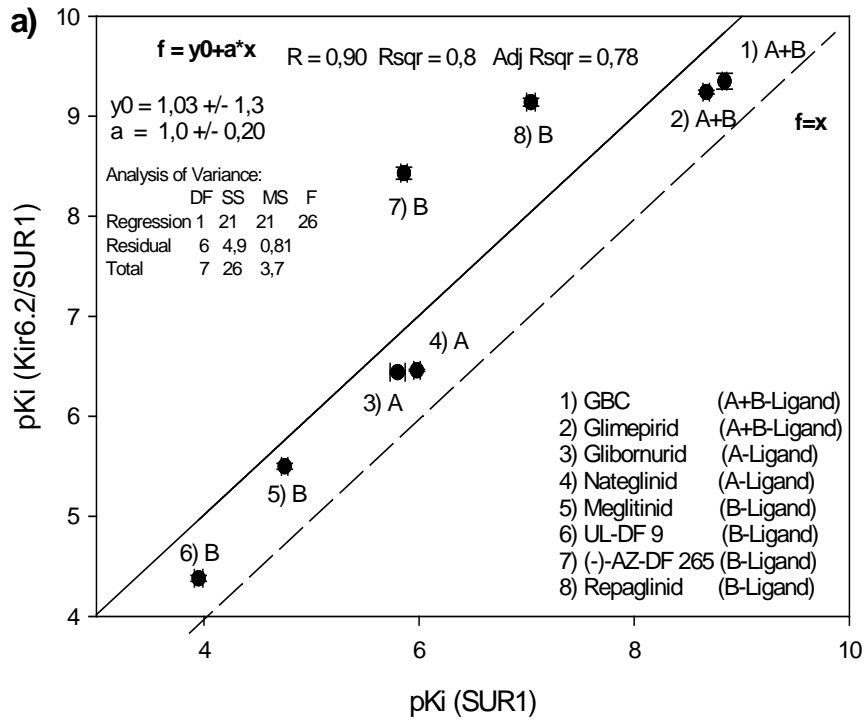
Bei der Koexpression unterscheiden sich die Werte (für Kir6.2/SUR1 und Kir6.2/SUR2A(Y1206S)) allerdings nicht in gleicher Weise wie bei SUR1 und SUR2A(Y1206S) alleine. Auch hier ist die Affinität der A- und A+B-Liganden von Kir6.2/SUR1 höher als von Kir6.2/SUR2A(Y1206S). Bei den Typ B-Liganden verhalten sich die Ki-Werte in etwa gleich wie bei SUR1 und SUR2A(Y1206S), bei Repaglinid lässt sich ein leichter Anstieg auf das 1,8x erkennen und (-)-AZ-DF265 fällt dabei vollkommen aus dem Rahmen, weil sich hier die Ki-Werte Kir6.2/SUR1 : Kir.2/SUR2A(Y1206S)=1:12 verhalten. Die



Koexpression bringt eine extreme Affinitätssteigerung mit sich. Es ist nötig, die B-Liganden zu differenzieren. Der Vergleich mit der Korrelation in Abb.24 (ohne Kir6.2) zeigt den Effekt der Koexpression mit Kir6.2: Die Koexpression mit Kir6.2 erhöht die Affinität für die Piperidino-Verbindungen am SUR1 mehr als die am SUR2A(Y1206S). Weiteres dazu folgt im nächsten Kapitel (4.4), in dem auf den Effekt der Koexpression näher eingegangen wird.

#### **4.4 Effekt der Koexpression mit Kir6.2 auf die Affinität von SUR1 für Sulfonylharnstoffe und Glinide**

In diesem Teil soll genauer auf den Effekt der Koexpression am SUR1 eingegangen werden. Die Abb.26 a) beschreibt die entstehende Kurve bei Berücksichtigung aller Verbindungen und Steigung. Erstaunlich ist dabei, dass die freie Steigung  $a=1,0 \pm 0,20$  beträgt. Der Korrelationskoeffizient  $r=0,90$  lässt eine gute Korrelation der beiden Parameter erkennen. Es ist zu sehen, dass hierbei alle Punkte oberhalb der Identitätslinie  $y=x$  liegen, wobei bemerkenswerter Weise sich die Piperidino-Verbindungen als Ausreißer bei der Steigung  $a=1,0$  zu erkennen geben. Sie binden signifikant besser an Kir6.2/SUR1 als an SUR1 alleine. Der pKi-Wert für (-)-AZ-DF265 liegt mit  $\Delta=2,57$  und Repaglinid  $\Delta=2,10$  deutlich über der Identitätslinie. Auch bei den anderen Verbindungen führt die Koexpression mit Kir6.2 zum Anstieg der pKi-Werte, jedoch nicht in dem Ausmaß wie die Piperidino-Verbindungen.



**Abb. 26 Effekt der Koexpression mit Kir6.2 auf die Affinität von SUR1 für Sulfonylharnstoffe und Glinide; (gestrichelte Gerade=Identitätslinie:  $f=x$ ).**

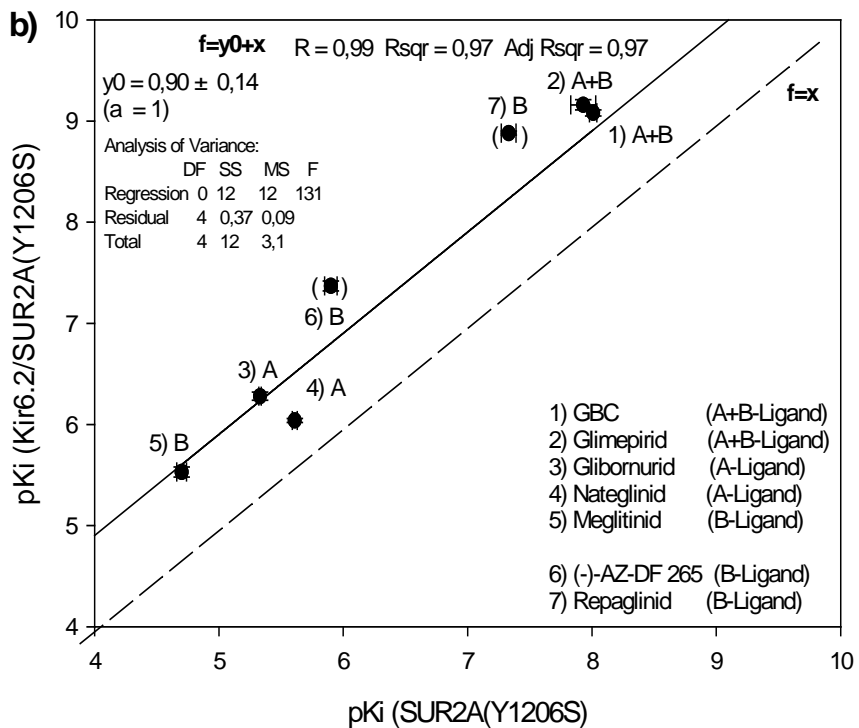
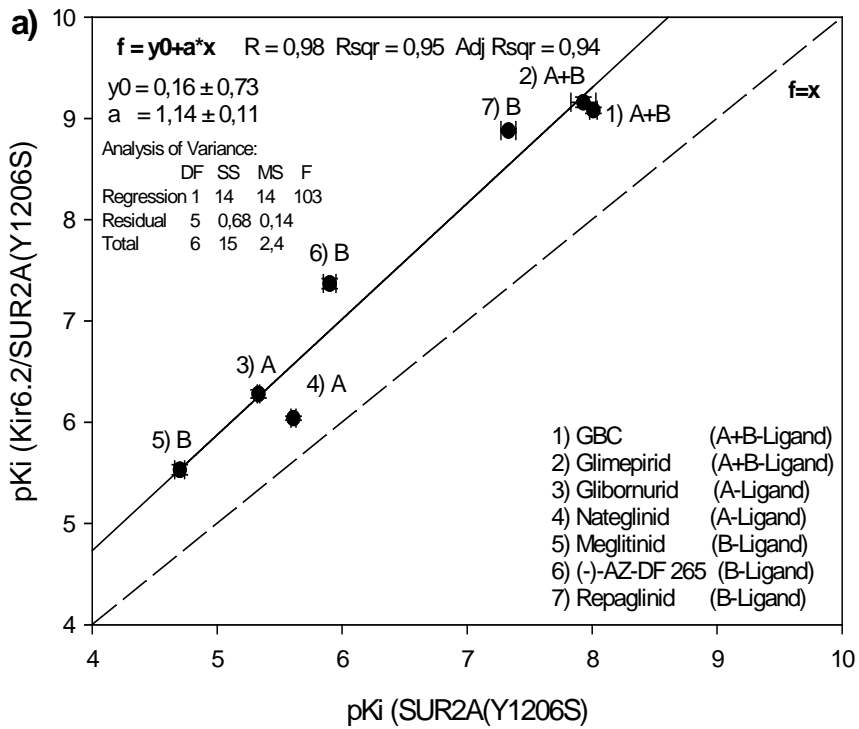
**a)** alle Substanzen, Steigung frei **b)** Gerade ohne (-)-AZ-DF265 und Repaglinid, Steigung  $a=1$

Folglich wurde in der Abb.26 b) die Gerade ohne die Ausreißer (-)-AZ-DF265 und Repaglinid und mit fixer Steigung  $a=1,00$  gezeichnet. Die Gerade ohne die Piperidino-Verbindungen hat noch besseren Korrelationskoeffizienten mit  $r=0,99$ . Der Ordinatenabschnitt ist  $0,56 \pm 0,05$ , d.h. die mittlere Affinitätszunahme aller Sulfonylharnstoffe und Glinide ohne die Piperidine entspricht dem Wert  $10^{0,56 \pm 0,05} = 3.6$  (2.9, 4.6) -fachen bei Koexpression mit Kir6.2. Für (-)-AZ-DF265 bringt die Koexpression mit Kir6.2 eine Steigerung des pKi-Wertes von 5,86 auf 8,43 und bei Repaglinid von 7,04 auf 9,14, dass heißt im Mittel einen Anstieg von 2,34. Unter Berücksichtigung der Korrelationsgeraden profitieren die Piperidino-Verbindungen von der Koexpression mit Kir6.2 im statistischen Mittel um einen Faktor 80 mehr als die anderen Verbindungen.

Diese Tatsache könnte daher rühren, dass die Piperidine in dem Teil zu liegen kommen, der für die Interaktion mit Kir6.2 nötig ist. Für die Bildung des Kanalkomplexes und dessen Regulation sind Wechselwirkungen zwischen TMD0 und CL3 (SUR) und M1 und der N-Terminus (Kir6.x) entscheidend (Babenko and Bryan, JBC 2003; Chan et al., EMBO 2003).

#### **4.5 Effekt der Koexpression mit Kir 6.2 auf die Affinität von SUR2A(Y1206S) für Sulfonylharnstoffe und Glinide**

Die Abbildung 27 auf der folgenden Seite beschreibt den Effekt der Koexpression mit Kir6.2 auf die Affinität von SUR2A(Y1206S) für die verschiedenen Sulfonylharnstoffe und Glinide.



**Abb.27 Effekt der Koexpression mit Kir6.2 auf die Affinität von SUR2A(Y1206S) für Sulfonylharnstoffe und Glinide; (gestrichelte Gerade=Identitätslinie:f=x).**

**a)** alle Substanzen, Steigung frei **b)** Gerade ohne (-)-AZ-DF265 und Repaglinid, Steigung a=1

Analog zu 4.4 wird in diesem Unterkapitel der sich in den Experimenten zeigende Effekt der Koexpression mit Kir6.2 auf die Affinität von SUR2A(Y1206S) für Sulfonylharnstoffe und Glinide dargestellt. Die Abb.27 a) beschreibt den Geradenverlauf bei Berücksichtigung aller Verbindungen und variabler Steigung. Dabei ergibt sich ein Korrelationskoeffizient von  $r=0,98$ , was für eine sehr gute Korrelation der beiden Werte spricht. Auch im Falle der Koexpression mit Kir.6.2 mit SUR2A(Y1206S) liegt die Korrelationsgerade ( $f=0,16 \pm 0,73 + (1,14 \pm 0,11) \cdot x$ ) oberhalb der Identitätslinie ( $f=x$ ). Bereits bei kurzer Betrachtung der Abb.27 a) erkennt man, dass im Unterschied zu Abb.26 a) nun die Piperidino-Verbindungen (-)-AZ-DF265 und Repaglinid zwar ebenfalls überhalb der Korrelationsgeraden befinden allerdings deren Abstand zu dieser sich deutlich verringert hat. Auch die anderen Verbindungen kommen nicht wie bei SUR1 (Abb.26 a)) alle unterhalb der Korrelationsgeraden zu liegen sondern liegen ziemlich genau auf dieser mit Ausnahme von Nateglinid. Da die Steigung mit  $a=1,14 \pm 0,11 > 1,00$  ist, ist der extrapolierte Ordinatenabschnitt  $y_0$  nur schlecht zu beurteilen.

Zeichnet man allerdings die Gerade neu ohne (-)-AZ-DF265 und Repaglinid zu berücksichtigen und setzt die Steigung  $a=1,00$  fest, so ergibt sich Abb.27 b) und die Werte lassen sich interpretieren. Hierbei verbessert sich auch der Korrelationskoeffizient auf  $r=0,99$ . Der Abstand der beiden Geraden zeigt der Effekt der Koexpression mit Kir6.2 auf die berücksichtigten Verbindungen. Die Koexpression erhöht die Affinität von SUR2A(Y1206S) für Sulfonylharnstoffe und Glinide um der Faktor  $10^{0,90 \pm 0,14}=7.9$  (4.2, 15.1). Der Effekt der Koexpression auf die Affinität ist bei SUR2A(Y1206S) für diese Verbindungen folglich deutlich größer, als bei SUR1. Im Vergleich zu 4.4 liegen auch hier die Piperidino-Verbindungen (6)=(-)-AZ-DF265 und 7)=Repaglinid) über der Korrelationsgeraden ( $f=0,90 + x$ ), jedoch innerhalb des 95%-Konfidenzintervalls. Die Piperidino-Verbindungen haben im Mittel eine ~4.1-fach höhere Affinität als die Korrelationsgerade anzeigt, d.h. die Koexpression bringt hier eine Steigerung um den Faktor ~33. Bei SUR1 ergab sich eine deutlich größere Steigerung um 220. Die Sonderstellung der Piperidino-Verbindungen bezüglich der Affinitätserhöhung durch Koexpression, die bei SUR1 so groß

war, ist hier noch in geringem Masse erhalten. Sie profitieren von der Koexpression um einen Faktor von ~4.1-fachen mehr als die anderen. Damit scheint klar, dass die Mutation von SUR2A in SUR2A(Y1206S) nicht die Umwandlung in ein SUR1 bewirkt, was von Ashfield et al., 1999 bereits vermutet wurde. SUR1 und SUR2 sind in der Tat verschiedene Rezeptoren, die sich in mehr als einer Aminosäure unterscheiden.

Bemerkenswert ist, dass Nateglinid (4) in Abb.27 b)) einen Ausreißer darstellt und unter der Korrelationsgeraden zu liegen kommt. Nateglinid profitiert im Vergleich von der Koexpression weniger als die anderen Verbindungen.

Zusammenfassend lassen sich in Kürze die Wichtigsten, nun folgende Ergebnisse festhalten:

1.) Als Wichtigstes ergab sich, dass die Koexpression mit Kir6.2 die Affinität von SUR1 und SUR2A(Y1206S) für Sulfonylharnstoffe und Glinide (ohne die Piperidino-Verbindungen) um einen Faktor 3.6 bzw. 7.9 erhöht.

Der Unterschied ist statistisch signifikant und zeigt, dass die Komplexierung mit Kir6.2 die Bindungstasche des SUR2A(Y1206S) für die Sulfonylharnstoffe und Glinide mehr verändert als die des SUR1.

2.) Die Piperidino-Verbindungen reagieren auf die Koexpression am Stärksten und der Effekt ist bei SUR1 wesentlich deutlicher als bei SUR2A(Y1206S). Der Piperidinrest ragt aus dem gemeinsamen Pharmakophor des B-Teils von Meglitinid heraus (Hansen et al., 2002) und macht Kontakt mit einer Region des Kir6.2/SUR-Komplexes, den alle anderen Verbindungen nicht machen.

3.) Die reinen Typ B-Verbindungen (Meglitinid, Repaglinid, (-)-AZ-DF265) binden an SUR1 und SUR2A(Y1206S) jeweils mit derselben Affinität. Dies gilt auch noch nach Koexpression mit Kir6.2, außer für (-)-AZ-DF265, das deutlich pankreasselektiv wird.

Teile der in dieser Arbeit beschriebenen Erkenntnisse wurden bereits in Diabetes (Quast et al., 2004: The impact of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel subtype

selectivity of insulin secretagogues for the coronary vasculature and the myocardium, Vol.53, Supplement 3:S.156-164) veröffentlicht.

## 5 Zusammenfassung der Arbeit

Der  $K_{ATP}$ -Kanal ist v.a. als Ansatzpunkt der Sulfonylharnstoffe und Glinide bekannt. Diese fördern durch Hemmung der Aktivität des Kanals in der  $\beta$ -Zelle des Pankreas (Kir6.2/SUR1) die Insulinsekretion. Die  $K_{ATP}$ -Kanäle kommen in allen erregbaren Zellen vor und sind Oktamere aus vier einwärtsgleichrichtenden Untereinheiten der Familie Kir6.x (Kir6.1 oder Kir6.2) und vier Sulfonylharnstoffrezeptoren (SUR1, SUR2A, SUR2B).

In dieser Arbeit sollte die Bindung der Sulfonylharnstoffe und Glinide an die SUR-Subtypen SUR1 und SUR2A(Y1206S) vergleichend unter möglichst physiologischen Bedingungen gemessen werden, d.h. in intakten Zellen in glukosehaltigem Puffer und bei 37°C. Zudem sollte der Effekt der Koexpression mit Kir6.2 untersucht werden. Dies erlaubt die Bestimmung der Selektivität der Sulfonylharnstoff- und Glinid-Bindung an die physiologisch wichtigen Kanaltypen Kir6.2/SUR1 ( $\beta$ -Zellen, Pankreas, Neurone, ZNS) Kir6.2/SUR2A (Herz- und Skelettmuskel, etc.), Kir6.1/SUR2B (Gefäßmuskulatur), Kir6.2/SUR2B (glatte Muskulatur).

Dazu wurden  $^3\text{H}$ -GBC-Verdrängungsmessungen durchgeführt. Wegen der relativ geringen Aktivität des Radioliganden für SUR2A ( $K_D \sim 30\text{nM}$ , Stephan et al., 2004 eingereicht, British Journal of Pharmacologie, in press) wurde statt des Wildtyps die Mutante SUR2A(Y1206S) mit und ohne Koexpression untersucht, die einen 5-10x höhere Affinität für GBC zeigt (Stephan et al., British Journal of Pharmacology, in press). Kir6.2/SUR1 entspricht dem Kanal in der  $\beta$ -Zelle der menschlichen Pankreas und ist deshalb besonders interessant.

Die Experimente sollten Rückschlüsse auf die Selektivität der Verbindungen für den pankreatischen (Kir6.2/SUR1) über den kardialen Kanal (Kir6.2/SUR2A) ergeben; auf letzterer beruht ein Teil des kardiovaskulären Risikopotentials der Substanzen. Da chemisch durchaus verschiedenartige Substanzen untersucht werden, werden zugleich die Bindungsstellen A und B an den beiden SUR-Subtypen abgetastet ("Rezeptor mapping"). Dies ist von Interesse, da v.a. über



die B-Seite nur wenig über die Tatsache hinaus bekannt ist, dass die zytosolische Schleife 3 des SUR für die Bindung an dieser Stelle wesentlich ist. Der Effekt der Koexpression erlaubt Rückschlüsse auf die Kopplung zwischen Kir und SUR. Hier weiß man, dass auf Kir6.2-Seite die ersten 10-20 Aminosäuren des Aminoterminus für den sulfonylharnstoff-induzierten Kanalblock eine Rolle spielen (Reimann et al.,1999); über einen Einfluß ist nichts bekannt.

Die Wichtigsten Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen.

Als Wichtigstes ergab sich, dass die Koexpression mit Kir6.2 die Affinität von SUR1 und SUR2A(Y1206S) für Sulfonylharnstoffe und Glinide (ohne die Piperidino-Verbindungen) um einen Faktor 3.6 bzw. 7.9 erhöht.

Der Unterschied ist statistisch signifikant und zeigt, dass die Komplexierung mit Kir6.2 die Bindungstasche des SUR2A(Y1206S) für die Sulfonylharnstoffe und Glinide mehr verändert als die des SUR1.

Weiterhin stellte sich heraus, dass die Piperidino-Verbindungen am Stärksten auf die Koexpression reagieren. Der Effekt ist bei SUR1 wesentlich deutlicher als bei SUR2A(Y1206S). Der Piperidinrest ragt aus dem gemeinsamen Pharmakophor des B-Teils von Meglitinid heraus (Hansen et al.,2002) und macht Kontakt mit einer Region des Kir6.2/SUR-Komplexes. Alle anderen Verbindungen machen diesen Kontakt nicht.

Die reinen Typ B-Verbindungen, wie z.B. Meglitinid, Repaglinid und (-)-AZ-DF265 binden an SUR1 und SUR2A(Y1206S) jeweils mit derselben Affinität. Dies gilt auch noch nach Koexpression mit Kir6.2, mit einer Ausnahme, die (-)-AZ-DF265 darstellt, welches deutlich pankreasselektiv wird.

Ein Teil der in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse wurde bereits im Dezember 2004 in Diabetes veröffentlicht (Quast et al., Diabetes 2004: The impact of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel subtype selectivity of insulin secretagogues for the coronary vasculature and the myocardium, Vol.53, Supplement 3:S.156-164). Diese Veröffentlichung zeigt erstmalig die Bedeutung der Koexpression mit

Kir6.2 auf die Affinität des SUR für Sulfonylharnstoffe und Glinide und zeigt, dass dieser Effekt vom SUR-Subtyp abhängt.

## 6 Literaturverzeichnis

### A

Aguilar-Bryan,L.,Nichols,C.G., et al.(1995):cloning of the  $\beta$  - cell high-affinity sulfonylurea receptor:a regulator of insulin secretion. *Science* **268**,423-426

Aguilar-Bryan,L.,Bryan,J.(1996):ATP-sensitive potassium channels,sulfonylurea receptors and persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Diabetes Reviews* **4**,336-346

Aguilar-Bryan,Lydia,Clement IV,J.P.,Gonzalez,G.,Kunjilwar,K.,Babenko,A.,Bryan,T.(1998):Toward understanding the assembly and structure of  $K_{ATP}$  channels. *Physiological Reviews* **78**(1),227-245

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

Altschul,S.F.,Lipman,D.J.(1990):Protein database searches for multiple alignments. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **87**,5509-5513

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

Ämmälä,C.,Moorhouse,A.,Ashcroft,F.M.(1996b):The sulfonylurea receptor confers diazoxide sensitivity on the inward rectifying  $K^+$  channel Kir6.1 expressed in human embryonic kidney cels. *Journal of Physiology-London* **494**(3),709-714

Amoroso,S.,Schmid-Antomarchi,H.,Fosset,M.(1990):Glucose, sulfonylureas, and neurotransmitter release: role of ATP-sensitive  $K^+$  channels. *Science* **247**,852-854

Ashcroft,F.M.,Harrison,D.E.,Ashcroft,S.J.(1984):Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic beta-cells. *Nature* **312**,446-448

Ashcroft,F.M.(1988):Adenosine 5'-triphosphate-sensitive potassium channels. *Annu.Rev.Neurosci.* **11**,97-118

Ashcroft,F.M.,Rorsman,P.(1989):Electrophysiology of the pancreatic beta-cell. *Prog.Biophys.Mol.Biol.* **54**,87-143

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

Ashcroft,S.J.H.,Ashcroft,F.M.,(1992):The Sulfonylurea Receptor. Biochimica et Biophysica Acta **1175**,45-59

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

Ashcroft,F.M.,Gribble,F.M.(2000a):Tissue-specific effects of sulfonylureas: lessons from studies of cloned K<sub>ATP</sub> channels. J.Diabetes Complications **14**,192-196

Ashcroft,F.M.,Gribble,F.M.(2000b):New windows on the mechanism of action of K<sub>ATP</sub> channel openers. Trends Pharmacol.Sci. **21**,439-445

Ashcroft,S.J.H.(2000):The β-cell K<sub>ATP</sub> channel. The Journal of Membrane Biology **176**,18-206

Ashfield,R.,Gribble,F.M.,Ashcroft,S.J.H.,Ashcroft,F.M.(1999):Identification of the high-affinity tolbutamide site on the SUR1 subunit of the K<sub>ATP</sub> channel. Diabetes **48**,1341-1347

Ashford,M.L.,Sturgess,N.C.,Trout,N.J.,Gardner,N.J.,Hales,C.N.(1988):Adenosin e-5'-triphosphate-sensitive ion channels in neonatal rat cultured central neurones. Pflugers Arch. **412**,297-304

Ashford,M.L.,Boden,P.R.,Treherne,J.M.(1990a):Glucose-induced excitation of hypothalamic neurones is mediated by ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. Pflugers.Arch. **415**,479-483

Ashford,M.L.,Boden,P.R.,Treherne,J.M.(1990b):Tolbutamid excites rat glucoreceptive ventromedial hypothalamic neurons by indirect inhibition of ATP-K<sup>+</sup> channels. Br.J.Pharmacol. **101**,531-540

## **B**

Babenko,A.P.,Aguilar-Bryan,L.,Bryan,J.A.(1998a):A view of SUR/Kir6.x, K<sub>ATP</sub> channels. Annual Review of Physiology **60**,667-687

Babenko,A.P.,Gonzalez,G.,Aguilar-Bryan,L.,Bryan,J.(1998b):Reconstituted human cardiac K<sub>ATP</sub> channels: functional identity with the native channels from the sarcolemma of human ventricular cells. Circ.Res. **83**,1132-1143

Babenko,A.P.,Gonzalez,G.,Bryan,J.(1999):Two regions of sulfonylurea receptor specify the spontaneous bursting and ATP inhibition of K<sub>ATP</sub> channel isoforms. J.Biol.Chem. **274**,11587-11592

Babenko,A.P.,Gonzalez,G., et al.(2000):Pharmaco-topology of sulfonylurea receptors. Separate domains of the regulatory subunits of  $K_{ATP}$  channel isoforms are required for selective interaction with  $K^+$  channel openers. The Journal of Biological Chemistry **275**,717-720

Baukowitz,T.,Sculte,U. Et al.(1998):PIP2 and PIP as determinants for ATP inhibition of  $K_{ATP}$  channels. Science **282**,1141-1144

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

Beech,D.J.,Zhang,H.,Nakao,K.,Bolton,T.B.(1993): $K^+$  channel activation by nucleotide diphosphates and its inhibition by glibenclamide in vascular smooth muscle cells. British Journal of Pharmacology **110**,573-582

Béguin,P.,Nagashima,K., et al.(1999):PKA-mediated phosphorylation of the human  $K_{ATP}$  channel:separate roles of Kir6.2 and SUR1 subunit phosphorylation. The EMBO Journal **18**,4722-4732

Bernardi,H.,DeWeille,J.R.,Epelbaum,J.,Mourre,C.,Amoroso,S.,Slama,A.,Fosset,M.,Lazdunski,M.(1993):ATP-modulated  $K^+$  channels sensitive to antidiabetic sulfonylureas are present in adenohypophysis and are involved in growth hormone release. Proc.Natl.Acad.Sci.USA **90**,1340-1344

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

Blondeau,N.,Plamondon,H.,Richelme,C.,Heurteaux,C.,Lazdunski,M.(2000): $K_{ATP}$  channel openers, adenosine agonists and epileptic preconditioning are stress signals inducing hippocampal neuroprotection. Neuroscience **100**,465-474

Bränström,R.,Corkey,B.E., et al.(1997):Evidence for a unique long chain acyl-CoA ester binding site on the ATP-regulated potassium channel in mouse pancreatic beta cells. The Journal of Biological Chemistry **272**,17390-17394

Bränström,R.,Leibiger,I.B., et al.(1998):Long chain coenzyme A esters activate the pore-forming subunit ( Kir6.2 ) of the ATP-regulated potassium channel. The Journal of Biological Chemistry **273**,31395-31400

Brown,G.R.,Foubister,A.J.(1984):Receptor binding sites of hypoglycemic sulfonylureas and related [(acylamino)alkyl]benzoic acids. J. Med. Chem. **27**,79-81

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

Bryan, J., Aguilar-Bryan, L. (1999): Sulfonylurea receptors: ABC transporters that regulate ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1461**, 285-303

Buchheit, K., Manley, P. W., Quast, U., Russ, U., Mazzoni, L., Fozard, J. R. (2002): KCO 912: a potent and selective opener of ATP-dependent potassium (K<sub>ATP</sub>) channels which suppresses airways hyperreactivity at doses devoid of cardiovascular effects. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **365**, 220-230

Butler, A., Tsunoda, S., et al. (1993): mSlo, a complex mouse gene encoding 'maxi' calcium-activated potassium channels. *Science* **261**, 221-224

## C

Chachin, M., Yamada, M., Fujita, A., Matsuoka, K., Kurachi, Y. (2003): Nateglinide, a D-phenylalanine derivative lacking either a sulfonylurea or benzamido moiety, specifically inhibits pancreatic  $\beta$ -cell-type K<sub>ATP</sub> channels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **304**, 1025-1032

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

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

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

Clement IV, J. P., Kunjilwar, K., et al. (1997): Association and stoichiometry of K<sub>ATP</sub> channel subunits. *Neuron* **18**, 827-838

Cohen, M. V., Baines, C. P., et al. (2000): Ischemic preconditioning: From adenosine receptor to K<sub>ATP</sub> channel. *Annual Review of Physiology* **62**, 79-109

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

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

Coppack, S. W., Lant, A. F., McIntosh, C. S., Rodgers, A. V. (1990): Pharmacokinetic and pharmacodynamic studies of glibenclamide in non-insulin dependent Diabetes Mellitus. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **29**, 673-84

Cui, Yi, Giblin, J.P., Clapp, L.H., Tinker, A. (2001): A mechanism for ATP-sensitive potassium channel diversity: Functional coassembly of two pore-forming subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 729-734

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

## D

Dabrowski, M., Wahl, P., Holmes, W.E., Ashcroft, F.M. (2001): Effect of repaglinide on cloned beta cell, cardiac and smooth muscle types of ATP-sensitive potassium channels. *Diabetologia* **44**, 747-756

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

D'ahan, N., Moreau, C., Prost, A.L., Jacquet, H., Alekseev, A.E., Terzic, A., Vivaudou, M. (1999b): Pharmacological plasticity of cardiac ATP-sensitive potassium channels toward diazoxide revealed by ADP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 12162-12167

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

Dickinson, K.E.J., Bryson, C.C., et al. (1997): Nucleotide regulation and characteristics of potassium channel openers binding to skeletal muscle membranes. *Molecular Pharmacology* **52**, 473-481

Dörschner, H., Brekard, E., et al. (1999): Stoichiometry of sulfonylurea-induced ATP-sensitive potassium channel closure. *Molekular Pharmakology* **55**, 1060-1066

Doyle, D.A., Cabral, J.M., et al. (1998): The structure of the potassium channel: Molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science* **280**, 69-77

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

Dunn-Meynell, A.A., Routh, V.H., McArdle, J.J., Levin, B.E. (1997): Low-affinity sulfonylurea binding sites reside on neuronal cell bodies in the brain. *Brain Res.* **745**, 1-9

Dunne, M.J., Illot, M.C., Peterson, O.H. (1987): Interaction of diazoxide, tolbutamide and ATP<sub>4</sub> - on nucleotide-dependent K<sup>+</sup> channels in an insulin-secreting cell line. *J. Membr. Biol.* **99**, 215-224

Dunne, M.J., Kane, C., et al. (1997): Familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy and mutations in the sulfonylurea receptor. *N. Engl. J. Med.* **336**, 703-706

Duprat, F., Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Hugnot, J.P., Bigay, J., Lazdunski, M., Romey, G., Barhanin, J. (1995): Heterologous multimeric assembly is essential for K<sup>+</sup> channel activity of neuronal and cardiac G-protein-activated inward rectifiers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **212**, 657-63

Duprat, F., Lesage, F., et al. (1997): TASK, a human background K<sup>+</sup> channel to sense external pH variations near physiological pH. *The EMBO Journal* **16**, 5464-5471

## E

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

Edwards, G., Weston, A.H. (1994): Effect of potassium channel modulating drugs on isolated smooth muscle. Szekeres, L.J., Papp, G. *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 111. Heidelberg: Springer; 1994. pp. 469-531

## F

Fink, M., Duprat, F., et al. (1996): Cloning, functional expression and brain localization of a novel unconventional outward rectifier K<sup>+</sup> channel. *The EMBO Journal* **15**, 6854-6862

Fink, M., Duprat, F., et al. (1998): A neuronal two P domain K<sup>+</sup> channel stimulated by arachidonic acid and polyunsaturated fatty acids. *The EMBO Journal* **17**, 3297-3308

Fujimura, N., Tanaka, E., Yamamoto, S., Shigemori, M., Higashi, H. (1997): Contribution of ATP-sensitive potassium channels to hypoxic hyperpolarization in rat hippocampal CA1 neurons in vitro. *J. Neurophysiol.* **77**, 378-385

## G

Gillis, K.D., Gee, W.M., et al. (1989): Effects of sulfonamides on a metabolite-regulated ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel in rat pancreatic B-cells. *Am. J. Physiol.* **257**, C1119-C1127

Glaser, B., Kesavan, P., Heyman, M., Davis, E., Cuesta, A., Buchs, A., Stanley, C.A., Thornton, P.S., Permutt, M.A., Matschinsky, F.M., Herold, K.C. (1998): Familial hyperinsulinism caused by an activating glucokinase mutation. *N. Engl. J. Med.* **338**, 226-230



Glaser,B.,Thornton,P.,et al.(2000):Genetics of neonatal hyperinsulinism. Arch. Dis. Child. Fetal. Neonatal. Ed. **82**,F79-F86

Gloyn,A.L.,Hashim,Y.(2001):Genetics of neonatal hyperinsulinism. Arch. Dis. Child. Fetal. Neonatal. Ed **82**,F79-F86

Gribble,F.M.,Ashfield,R., et al.(1997a):Properties of cloned ATP-sensitive K<sup>+</sup> currents expressed in Xenopus oocytes. Journal of Physiology-London **498**,87-98

Gribble,F.M.,Tucker,S.J., et al.(1997b):The interaction of nucleotides with the tolbutamide block of cloned ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel currents expressed in Xenopus oocytes: a reinterpretation. Journal of Physiology-London **504**,35-45

Gribble,F.M.,Proks,P., et al.(1998a):Mechanism of the cloned ATP-sensitive potassium channel activation by oleoyl-CoA. The Journal of Biological Chemistry **273**,26383-26387

Gribble,F.M.,Tucker,S.J., et al.(1998b):Tissue specificity of sulfonylureas:Studies on cloned cardiac and  $\beta$ -cell K<sub>ATP</sub> channels. Diabetes **47**,1412-1418

Gribble,F.M.,Ashcroft,F.M.(1999):Differential sensitivity of beta-cell and extrapancreatic K<sub>ATP</sub> channels to gliclazide. Diabetologia **42**,845-848

Gribble.F.M.,Reimann,F.(2002):Pharmacological modulation of K<sub>ATP</sub> channels. Biochemical Society Transactions **30**,333-339

Gribble,F.M.,Reimann,F.(2003):Sulphonylurea action revisited: the post-cloning era. Diabetologia **46**,875-891

Giblin,J.P.,Quinn,K.,Tinker,A.(2002):The cytoplasmic C-terminus of the sulfonylurea receptor is important for K<sub>ATP</sub> channel functions but is not key for complex assembly or trafficking. Eur.J.Biochem. **269**,5303-13

Gros,L.,Virsolvy,A.,Salazar,G.,Bataille,D.,Blache,P.(1999):Characterization of low-affinity binding sites for glibenclamide on the Kir6.2 subunit of the beta-cell K<sub>ATP</sub> channel. Biochem. Biophys. Res. Comm. **257**

## H

Hambrock,A.,Löffler-Walz,C., et al.(1998):Mg<sup>2+</sup> and ATP dependence of K<sub>ATP</sub> channel modulator binding to the recombinant sulfonylurea receptor, SUR2B. British Journal of Pharmacology **125**,577-583

Hambrock,A.,Löffler-Walz,C., et al.(1999):ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel modulator binding to sulfonylurea receptors SUR2A and SUR2B:opposite effects of MgADP. Molecular Pharmacology **55**,832-840

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

Hambrock,A.,Preisig,Müller,R.,Russ,U.,Piehl,A.,Hanley,P.J.,Ray,J.,Daut,J., Quast,U.,Derst,C.(2002b):Four novel splice variants of Sulfonylurea receptor 1. *American Journal of Physiology Cell Physiology* **283**,C587-C598

Hani,E.H.,Clement,K.(1997):Genetic studies of the sulfonylurea receptor gene locus in NIDDM and in morbid obesity among French Caucasians. *Diabetes* **46**,688-694

Hani,E.H.,Boutin,P.(1998):Missense mutation in the pancreatic islet beta cell inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel gene ( KIR6.2/BIR ): a meta-analysis suggests a role in the polygenic basis of Type 2 Diabetes Mellitus in Caucasians *Diabetologia* **41**,1511-1515

Hart,L.M.,de Knijff,P.(1999):Variants in the sulfonylurea receptor gene: association of the exon 16 - 3' variant with Type 2 diabetes mellitus in Dutch Caucasians. *Diabetologia* **42**,617-620

Hansen,L.,Echwald,S.M.(1997):Amino acid polymorphisms in the ATP-regulated inward rectifier Kir6.2 and their relationships to glucose- and tolbutamide-induced insulin secretion, the insulin sensitivity index, and NIDDM. *Diabetes* **46**,508-512

Hansen,A.M.,Christensen,I.T.,Hansen,J.B.,Carr,R.D.,Ashcroft,F.M.,Wahl,P. (2002):Differential interactions of nateglinide and repaglinide on the human beta-cell sulfonylurea receptor 1. *Diabetes* **51**,2789-2795

Hasselblatt,A.,Kuhlmann,J.,Puls,W.(1996):Sulfonylureas:Pharmacokinetics in animal experiments. In *Handbook of experimental pharmacology* **119**:Oral Antidiabetics,Berlin/Heidelberg,Springer Verlag

Heginbotham,L.,Lu,Z. et al.(1994):Mutations in the K<sup>+</sup> channel signature sequence. *Biophysical Journal* **66**, 1061-1067

Heinemann,S.H.(2001):Sodium, Calcium and Potassium Channels. *Encyclopedia of Life Science/* & 2001 Nature Publishing Group/www.els.net 1-7.

Heron,L.,Virsolvy,A., et al.(1998):Human alpha-endosulfine, a possible regulator of sulfonylurea-sensitive K<sub>ATP</sub> channel:Molecular cloning, expression and biological properties. *Proceeding of the National Academy of Science of The United States of America* **95**,8387-8391

Heurteaux,C.,Lauritzen,I.,Widmann,C.,Lazdunski,M.(1995)Essential role of adenosine, adenosine A1 receptors, and ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in cerebral ischemic preconditioning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**,4666-4670

Hilgemann,D.W.,Ball,R.(1996):Regulation of cardiac Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> exchange and K<sub>ATP</sub> potassium channels by PIP<sub>2</sub>. *Science* **273**,956-959

Hilgenfeld,R.(1995):Regulatory GTPases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **5**,810-817

Hille,B.(1992):Ionic channels of excitable membranes, 2nd edition Sinauer Associates Inc. Sunderland, Massachussetts

Hunter,M.,Giebisch,G.(1988):Calcium-activated K-channels of Amphiuma early distal tubule: inhibition by ATP. *Pflugers Arch.* **412**,331-333

Huopio,H.,Reimann,F.,Ashcroft,R.,Komulainen,J.,Lenko,H.L.,Rahier,J., Vauhkonen,I.,Kere,J.,Laakso,M.,Ashcroft.,F.,Otonkoski,T.(2000):Dominantly inherited hyperinsulinism caused by a mutation in the sulfonylurea receptor type 1. *J. Clin. Invest.* **106**,897-906

## I

Inagaki,N.,Gonoi,T., et al.(1996):A family of supphonylurea receptors determines the pharmacological properties of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels . *Neuron* **16**,1011-1017

Inagaki,N.,Gonoi,T., et al.(1995a):Reconstitution of I<sub>KATP</sub>: an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science* **270**,1166-1170

Inagaki,N.,Tsuura,Y., et al.(1995b):Cloning and functionyl characterization of a novel ATP-sensitive potassium channel ubiquitously expressed in rat tissues, including pancreatic islets, pitui piuitary, skeletal muscle, and heart. *The Journal of Biological Chemistry* **270**,5691-5694

Inoue,I.,Nagase,H.,et al.(1991):ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel in the mitochondrial inner membrane. *Nature* **352**,244-247

Inoue,H.,Ferrer,J.(1996):Sequence variants in the sulfonylurea receptor (SUR) gene are associated with NIDDM in Caucasians. *Diabetes* **45**,825-831

Inoue,H.Ferrer,J.(1997):Sequence variants in the pancreatic islet beta cell inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel Kir6.2 (Bir) gene: identification and lack of role in Caucasian patients with NIDDM. *Diabetes* **46**,502-507

Isacoff,E.Y.,Jan,Y.N., et al.(1991):Putative receptor for the cytoplasmic inactivation gat in the Shaker K<sup>+</sup> channel. *Nature* **353**,86-90

Isomoto,S.,Kondo,C.,Yamada,M.,Matsumoto,S.,Higashiguchi,O.,Horio,Y., Matsuzawa,Y.,Kurachi,Y.(1996):A novel sulfonylurea receptor forms with BIR (KIR6.2) a smooth muscle type ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel. *The Journal of Biological Chemistry* **271**(40),24321-24324

Iwasaki,N.,Kawamura,M.,Yamagata,K.,Cox,N.J.,Karibe,S.,Ohgawara,H., Inagaka,N.,Seino,S.,Bell,G.I.,Omori,Y.(1996):Identification of microsatellite markers near the human genes encoding the beta-cell ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel and linkage studies with NIDDM in Japanese. *Diabetes* **45**,267-269

## J

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

## K

Takei,M.,Noma,A.(1984):Adenosine-5'-triphosphate-sensitive single potassium channel in the atrioventricular node cell of the rabbit heart. *J. Physiol.* **352**,265-284

Kane,C.,Lindley,K.J., et al.(1997):Therapy for persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. understanding the responsiveness of beta cells to diazoxide and somatostatin. *J. Clin. Invest* **100**,1888-1893

Karow,T.,Lang,R.(2002):Vasodilatoren. 68-70

Kassem,S.A.,Ariel,I.,Thornton,P.S.,Scheimberg,I.,Glaser,B.(2000):Beta-cell proliferation and apoptosis in the developing normal human pancreas and in hyperinsulinism of infancy. *Diabetes* **49**,1325-1333

Ketchum,K.A.,Joiner,W.J., et al.(1995):A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem. *Nature* **376**,690-695

Köhler,M.,Hirschberg,B., et al.(1996):Small conductance,calcium-activated potassium channels from mammalian brain. *Science* **273**,1709-1714

Kozlowski,R.Z.,Hales,C.N., et al.(1989):Dual effects of diazoxide on ATP-K<sup>+</sup> currents recorded from an insulin-secreting cell line. *British Journal of Pharmacology* **97**,1039-1050

Kubo,Y.,Baldwin,T.J., et al.(1993):Primary structure and functional expression of mouse inward rectifier potassium channel. *Nature* **362**,127-133

## L

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

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

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

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

Lindner,T.,Gragoli,C.,Schulze,J.,Rietzsch,H.,Petzold,C.,Schroder,H.E.,Cox,N.J.,Bell,G.I.(1997):The 31-cM region of chromosome 11 including the obesity gene *tubby* and ATP-sensitive potassium channel genes, SUR1 and Kir6.2, does not contain a major susceptibility locus for NIDDM in 127 non-Hispanic white affected sibships. *Diabetes* **46**,1227-1229

Liss,B.,Bruns,R.,Roeper,J.(1999):Alternative sulfonylurea receptor expression defines metabolic sensitivity of K<sub>ATP</sub> channels in dopaminergic midbrain neurons. *EMBO J.* **18**,833-846

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

Löffler-Walz,C.,Hambrock,A.,Quast,U.(2002):Interaction of K<sub>ATP</sub> channel modulators with SU.onylurea receptor SUR2B:Implication for tetramer formation and allosteric coupling of subunits. *Molecular Pharmacology* **61**,407-414

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

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

Liu,Y.,Ren,G.,O'Rourke,B.,Marán,E.,Seharaseyon,J.(2001b):Pharmacological comparison of native mitochondrial K<sub>ATP</sub> channels with molecularly defined surface K<sub>ATP</sub> channels. *Molecular Pharmacology* **59**(2),225-230

## **M**

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

Matsuda,A.,K.,T.,Sugita,Y.,Kawashirma,K.(1983): Plasma levels of glibenclamide in diabetic patients during ist routine clinical administration determined by a specific radioimmunoassay. *Horm. Metab. Res.* **275**,28757-28763

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

Meirhaeghe, A., Helecque, Ni., Cottel, D., Arveiler, D., Ruidavets, Haas, B., Ferrières, J., Tauber, J., Bingham, A., Amouyel, P. (2001): Impact of SU.onylurea receptor 1 genetic variability on non- insulin- dependent Diabetes Mellitus prevalence and treatment: A population study. *American Journal of Medical Genetics* **101**,4-8

Mikhailov, M.V., Mikhailova, E.A., Ashcroft, S.J.H. (2001): Molecular structure of the glibenclamide binding site of the  $\beta$ -cell  $K_{ATP}$  channel. *FEBS Lett* **499**,154-160

Moreau, C., Jacquet, H., et al. (2000): The molecular basis of the specificity of action of  $K_{ATP}$  channel openers. *The EMBO Journal* **19**,6644-6651

## N

Nelson, M.T., Quayle, J.M. (1995): Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am. J. Physiol.* **268**,C799-822

Nestorowicz, A., Inagaki, N., Gono, T., Schoor, K.P., Wilson, B.a., Glaser, B., Landau, H., Stanley, C.A., Thornton, P.S., Seino, S., Permutt, M.A. (1997): A nonsense mutation in the inward rectifier potassium channel gene, Kir6.2, is associated with familial hyperinsulinism. *Diabetes* **46**,1743-1748

Nichols, C.G., Shyng, S.-L., et al. (1996): Adenosine diphosphate as an intracellular regulator of insulin secretion. *Science* **272**,1785-1787

Nielson, F.E., Bodvarsdottir, T.B., Worsaae, A., MacKay, P., Stidsen, C.E., Boonen, H. C., Pridal, L., Arkhammar, P.O., Wahl, P., Ynddal, L., Junager, F., Dragsted, N., Tagmose, T.M., Mogensen, J.P., Koch, A., Treppendahl, S.P., Hansen, J.B. (2002): 6-Chloro-3-alkylamino-4H-thieno[3,2-e]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxide derivatives potently and selectively activate ATP sensitive potassium channels of pancreatic beta-cells. *J. Med. Chem.* **45**,4171-4187

Niki, I., Nicks, J.L., et al. (1990): The beta-cell glibenclamide receptor is an ADP-binding protein. *Biochemical Journal* **268**,713-718

Noma, A. (1983): ATP-regulated  $K^+$  channels in cardiac muscle. *Nature* **305**,147-148

## O

Okuyama, Y., Yamada, M., Kondo, C., Satoh, E., Isomoto, S., Shindo, T., Horio, Y., Kitakaze, M., Hori, M., Kurachi, Y. (1998): The effects of nucleotides and potassium channel openers on the SUR2A/Kir6.2 complex K<sup>+</sup> channel expressed in a mammalian cell line, HEK293T cells. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology* **435**, 595-603

Otonkoski, T., Ammala, C., Huopio, H., Cote, G. J., Chapman, J., Cosgrove, K., Ashfield, R., Huang, E., Komulainen, J., Ashcroft, F. M., Dunne, M. J., Kere, J., T., P. M. (1999): A point mutation inactivating the SU.onylurea receptor causes the severe form of persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy in Finland. *Diabetes* **48**, 408-415

## P

Pfaffinger, P. J., Martin, J. M., et al. (1985): GTP-binding proteins couple cardiac muscarinic receptors to a K channel. *Nature* **317**, 536-538

Pountney, D. J., Sun, Z., Porter, L. M., Nitabach, M. N., Nakamura, T. Y., Holmes, D., Rosner, E., Kaneko, M., Manaris, T., Holmes, T. C., Coetzee, William, A. (2001): Is the molecular composition of K<sub>ATP</sub> channels more complex than originally thought? *Journal of molecular and cellular cardiology* **33**, 1541-1546

Proks, P., Reimann, F., Green, N., Gribble, F., Ashcroft, F. (2002): Sulfonylurea stimulation of insulin secretion. *Diabetes* **51** Suppl 3: S368-S376

## Q :

Quast, U., Bray, K. M., et al. (1993): Binding of the K<sup>+</sup> channel opener [3H]P1075 in rat isolated aorta: relationship to functional effects of openers and blockers. *Molecular Pharmacology* **43**, 474-481

Quast, U. 1993: Do the K<sup>+</sup> channel openers relax smooth muscle by opening K<sup>+</sup> channels. *Trends in Pharmacology Sciences* **14**, 332-337

Quast, U. (1996a): ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in the kidney. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **354**, 213-225

Quast, U. (1996b): Effects of potassium channel activators in isolated blood vessels. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **354**, 173-195

Quast, U. (2001): Repaglinid. [Repaglinide]. *Dtsch. Med. Wochenschr.* **126**, 559-560

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

Quast,U.,Gopalakrishnan,M.,Carroll,W.A.,Russ,U.,Löffler-Walz,C.,Hambrock,A.,Lange,U.,Felsch,F.(2003):Interaction of a novel dihydropyridine K<sup>+</sup> channel opener, A312110 with recombinant sulfonylurea receptors and K<sub>ATP</sub> channels comparison with the cyanoguanidine, P1075.

Quast,U.,Stephan,D.,Bieger,S.,Russ,U.(2004):The Impact of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel subtype selectivity of insulin secretagogues for the coronary vasculature and the myocardium. *Diabetes* **53** Suppl.3:S156-164

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

Quinn,K.V.,Giblin,J.P.,Tinker,A.(2004):Multisite phosphorylation mechanism for protein kinase A activation of the smooth muscle ATP-sensitive K<sup>+</sup>-channel. *Circ.Res.* **94**,1359-66

## R

Rajan,S.,Wischmeyer,E., et al.(2000):TASK-3, a novel tandem pore domain acid-sensitive K<sup>+</sup> channel. An extracellular histing as pH sensor. *The Journal of Biological Chemistry* **275**,16650-16657

Ramboer,I.,Boeynaems,J.M.(1989):Pharmacological modulation of 86Rb efflux from aortic endothelial cells. *European Journal of Pharmacology* **171**,251-254

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

Reimann,F.,Proks,P.,Ashcroft,F.M.(2001):Effects of mitiglinide (S21403) on Kir6.2/SUR1, Kir6.2/SUR2A, and Kir6.2/SUR2B types of ATP-sensitive potassium channel. *Br. J. Pharmacol.* **132**,1542-1548

Reimann,F.,Dabrowski,M.,Jones,P.,Gribble,F.M.,Ashcroft,F.M.(2003):Analysis of the differential modulation of sulfonylurea block of beta.cell and cardiac ATP-sensitive K<sup>+</sup> (K<sub>ATP</sub>) channels by Mg-nucleotides. *J. Physiol.* **547**,159-168

Reyes,R.,Duprat,F., et al.(1998):Cloning and expression of a novel pH-sensitive two pore domain K<sup>+</sup> channel from human kidney. *Journal of Biological Chemistry* **273**,30863-30869



Riedel, M.J., Boora, P., Steckley, D., deVries, G., 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.

Rissanen, J., Markkanen, A. (2000): Sulfonylurea receptor 1 gene variants are associated with gestational diabetes and type 2 diabetes but not with altered secretion of insulin. *Diabetes Care* **23**, 70-73

Rorsman, P., Trube, G. (1985): Glucose dependent K<sup>+</sup> channels in pancreatic beta-cells are regulated by intracellular ATP. *Pflugers Arch.* **405**, 305-309

Rudy, B. (1988): Diversity and ubiquity of K channels. *Neuroscience* **25**, 729-749

Russ, U., Metzger, F., Kickenweiz, E., Hambrock, A., Krippeit-Drews, P., Quast, U. (1997): Binding and effects of K<sub>ATP</sub> channel openers in the vascular smooth muscle cell line, A 10. *British Journal of Pharmacology* **122**, 1119-1126

Russ, U., Hambrock, A., Artunc, F., Löffler-Walz, C., Horio, Y., Kurachi, Y., Quast, U. (1999): Coexpression with the inward rectifier K<sup>+</sup> channel Kir6.1 increases the affinity of the vascular SU.onylurea receptor SUR2B for glibenclamide. *Molecular Pharmacology* **56**, 955-961

Russ, U., Lange, U., Löffler-Walz, C., Hambrock, A., Quast, U. (2001): Interaction of the SU.onylthiourea HMR 1883 with SU.onylurea receptors and recombinant ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels: Comparison with glibenclamide. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **299**, 1049-1055

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

## S

Sakura, H., Ämmälä, C., et al. (1995): Cloning and functional expression of the cDNA encoding a novel ATP-sensitive potassium channel subunit expressed in pancreatic β-cells, brain, heart and skeletal muscle. *FEBS Letters* **377**, 338-344

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

Salinas, M., Reyes, R., et al. (1999): Cloning of a new mouse two-P domain channel subunit and a human homologue with a unique pore structure. *The Journal of Biological Chemistry* **271**, 11751-11760

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

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

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

Schwanstecher,M.,Brandt,C., et al.(1992):Effect of MgATP on pinacidil-induced displacement of glibenclamide from the sulfonylurea receptor in a pancreatic β-cell line and rat cerebral cortex. *British Journal of Pharmacology* **106**,295-301

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

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

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

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

Seino,S.,Miki,T.(2003):Physiological and pathophysiological roles of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *Progress in Biophysics & Molecular Biology* **81**,133-176

Shyng,S.L.,Nichols,C.G.( 1998 ):Membrane phospholipid control of nucleotide sensitivity of K<sub>ATP</sub> channels. *Science* **282**,1138-1141

Shyng,S.L.,Ferrigni,T.,Shepard,J.B.,Nestorowicz,A.,Glaser,B.,Permutt,M.A.,Nichols,C.G.(1998):Functional analyses of novel mutations in the sulfonylurea receptor 1 associated with persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Diabetes* **47**,1145-1151

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

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

Spruce, A.E., Standen, N.B., Stanfield, P.R. (1985): Voltage-dependent ATP-sensitive potassium channels of skeletal muscle membrane. *Nature* **316**, 736-738

Standen, N.B., Quayle, J.M., Davies, N.W., Brayden, J.E., Huang, Y., Nelson, M.T. (1989): Hyperpolarizing vasodilators activate ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in arterial smooth muscle. *Science* **245**, 177-180

Stanley, C.A., Lieu, Y.K., Hsu, B.Y., Burlina, A.B., Greenberg, C.R., Hopwood, N.J., Perlman, K., Rich, B.H., Zammarchi, E., Poncz, M. (1998): Hyperinsulinism and hyperammonemia in infants with regulatory mutations of the glutamate dehydrogenase gene. *N. Engl. J. Med.* **338**, 1352-1357

Srephan, D., Stauss, E., Lange, U., Felsch, H., Löffler-Walz, C., Hambrock, A., Russ, U., Quast, U. (2005): The mutation Y1206S increases the affinity of the sulfonylurea receptor SUR2A for glibenclamide and enhances the effects of coexpression with Kir6.2. *Br. J. Pharmacol.* **14**.

Stirling, B., Cox, N.J., Bell, G.I., Hanis, C.L., Spielman, R.S., Concannon, P. (1995): Linkage studies in NIDDM with markers near the sulfonylurea receptor gene. *Diabetologia* **38**, 1479-1481

Sturgess, N.C., Ashford, M.L., Cook, D.L., Hales, C.N. (1985): The sulfonylurea receptor may be an ATP-sensitive potassium channel. *Lancet* **2**, 474-475

Sturgess, N.C., Kozlowski, R.Z., Carrington, C.A., Hales, C.N., Ashford, M.L. (1988): Effects of sulfonylureas and diazoxide on insulin secretion and nucleotide-sensitive channels in an insulin-secreting cell line. *BR. J. Pharmacol.* **95**, 83-94

Szewczyk, A., Wojcik, G., Lobanov, N.A., Nalecz, M.J. (1997): The mitochondrial sulfonylurea receptor: Identification and characterization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **230**, 611-615

Szewczyk, A., Mabán, E. (1999): A new target for K<sup>+</sup> channel openers?. *Trends in Pharmacology Sciences* **20**, 157-161

## T

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

Thomas, P.M., Cote, G.J., Hallman, D.M., Mathew, P.M. (1995): Homozygosity mapping, to chromosome 11p, of the gene for familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Am. J. Hum. Genet.* **56**, 416-421

Thomas,P.,Ye,Y.,Lightner,E.(1996):Mutation of a pancreatic islet inward rectifier Kir6.2 also leads to familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. Hum. Mol. Genet. **5**,1809-1812

Tinker,A.,Leaney,J.L.,Giblin,J.P.(1999):The molecular assembly of ATP-sensitive potassium channels. The Journal of Biological Chemistry Vol.274, No.**32**,22652-22659

Trapp,S,Ballanyi,K.(1995):KATP channel mediation of anoxia-induced outward current in rat dorsal vagal neurons in vitro. J. Physiol. **487**,37-50

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

Trube,G.,Rorsman,P.,Ohno-Shosaku,T.(1986):Opposite effects of tolbutamide and diazoxide on the ATP-dependent K<sup>+</sup> channel in mouse pancreatic beta-cells. Pflugers Arch. **407**,493-499

Tucker,S.J.,Gribble,F.M.,Zhao,Chao,Trapp,S.,Ashcroft,F.M.(1997a,b):Truncation of Kir6.2 produces ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in the absence of the sulfonylurea receptor. Nature **387**(6629),179-183

Tusnády,G.E.,Bakos,E. Et al.(1997):Membrane topology distinguishes a subfamily of the ATP-binding cassette (ABC) transporters. FEBS Letters **402**,1-3

## U

Ueda,K.,Inagaki,N., et al.(1997):MgADP antagonism to Mg<sup>2+</sup>-independent ATP binding of the sulfonylurea receptor SUR1. The Journal of Biological Chemistry **272**,22983-22986

Ueda,K.Matsuo,M, et al.(1999):Comparative aspects of the function and mechanism of SUR1 and MDR1 proteins. Biochimica Et Biophysica Acta **1461**,305-313

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

## V

Venkatesh,N.,Lamp,S.T. et al.(1991):Sulfonylurea, ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels, and cellular K<sup>+</sup> loss during hypoxia, ischemia, and metabolic inhibition in mammalian ventricle. Circulation Research **69**,623-637

## W

Walker, J.E., Saraste, M., et al. (1982): Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunit of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *The EMBO Journal* **1**, 945-951

## X

## Y

Yatani, A., Okabe, K., et al. (1990): Heart rate regulation by G proteins acting on the cardiac pacemaker channel. *Science* **249**, 1163-1166

## Z

Zawar, C., Plant, T.D., Schirra, C., Konnerth, A., Neumcke, B. (1999): Cell-type specific expression of ATP-sensitive potassium channels in the rat hippocampus. *J. Physiol.* **514**, 327-341

Zingman, L.V., Alekseev, A.E., et al. (2001): Signaling in channel/enzyme multimers: ATPase transitions in SUR module gate ATP-sensitive K<sup>+</sup> conductance. *Neuron* **31**, 233-245



# Danksagung

Besonders bedanken möchte ich mich an dieser Stelle bei meinem Doktorvater Herrn Professor Doktor Ulrich Quast für die sehr gute Betreuung während der experimentellen Phase meiner Tätigkeit und bei der Anfertigung dieses Schrifttums.

Mein herzlicher Dank gilt den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Quast, v.a. Herrn Apotheker Damian Stephan, Frau Petra Kühner (Laborassistentin) und Herrn Jochen Lichtenberg (Medizinstudent) für die tolle Zusammenarbeit, die uneingeschränkte Hilfsbereitschaft und die hervorragende Betreuung im Labor. Ein weiterer Dank geht an Herrn Ulf Lange und Herrn Doktor Ulrich Russ für deren Hilfe und an Frau Doktor Annette Hambrock für die Bereitstellung der permanent transfizierten Zellreihen.

Meinem Freund und allen Freunden und Bekannten, die mich während dieser Zeit in irgendeiner Weise unterstützt haben möchte ich hiermit danken. Der größte Dank in dieser Hinsicht gilt allerdings meiner Familie, v.a. meinen Eltern, die mir dieses Studium überhaupt erst ermöglicht haben. Sie sind mir bei finanziellen, als auch bei allen anderen Problemen und Angelegenheiten immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei all denen, die mir in irgendeiner Weise bei der Durchführung und Anfertigung dieser Doktorarbeit behilflich waren.

Vielen Dank!

Sollte ich dennoch jemanden versehentlich vergessen haben, bitte ich um Entschuldigung.





# LEBENS LAUF

## SUSANNE BIEGER

Geburtsdatum/ -ort: 20.01.1981 in Hechingen, Deutschland

### Schule:

Grundschule: 1987-1991 in Haigerloch, Deutschland

Progymnasium: 1991-1997 in Haigerloch, Deutschland

Allgemeines Gymnasium: 1997-2000 in Hechingen, Deutschland

### Studium:

Sommersemester 2000: Beginn des Studiums der Humanmedizin in Tübingen an der Eberhard-Karls-Universität.

September 2002 (4.09.2002): Ärztlich Vorprüfung (Physikum) in Tübingen.

August 2003 (28.08.2003): Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in Tübingen (1.Staatsexamen).

September 2003: Beginn der Promotionsarbeit am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Tübingen.

August 2005: Abschluss des Zweiten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung (2.Staatsexamen).

31.10. 2006: Abschluss des Dritten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung (3.Staatsexamen).