

**Elektrophysiologische Untersuchungen an rekombinanten
kardiovaskulären K_{ATP} -Kanälen: Effekte von Nukleotiden,
neuartigen K_{ATP} -Kanalöffnern und Blockern**

Dissertation

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2005

vorgelegt von

Ulf Lange

Tag der mündlichen Prüfung: 03.03.2005
Dekan: Prof. Dr. S. Laufer
1. Berichterstatter: Prof. Dr. U. Quast
2. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Drews

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Prof. U. Quast und PD. Dr. U. Ruß am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Eberhards-Karls-Universität Tübingen durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. U. Quast danke ich außerordentlich für die Schaffung meiner Doktorandenstelle und die interessante, herausfordernde Aufgabenstellung. Für seinen Ideenreichtum und seine ständige Diskussionsbereitschaft, aber auch für die außerordentlich gute Betreuung und die vielen abwechslungsreichen Gespräche auch außerhalb der Wissenschaft bin ich ihm sehr dankbar.

Frau Prof. Dr. G. Drews gilt mein besonderer Dank für die Betreuung und die Begutachtung dieser Arbeit und die Vertretung meiner Arbeit in der in der Fakultät sowie für ihre freundliche Unterstützung und der Teilnahme an ihren diskutierfreudigen Seminaren.

Herrn PD Dr. Ulrich Ruß danke ich herzlich für die freundliche Betreuung während der gesamten Arbeit, seine unendliche Gesprächs- und Hilfsbereitschaft, seine ruhige Art sowie der Einführung in die Elektrophysiologie und „Computerei“.

Frau Dr. Annette Hambrock möchte ich für die Einweisung in das mikrobiologische Arbeiten, einiger Transfektoren und ihrer steten Gesprächsbereitschaft danken.

Einem ganz herzlichen Dank gilt meiner Mitstreiterin Frau Dr. Julia Laske-Ernst für die moralische Begleitung während der gesamten Arbeit innerhalb und außerhalb des Labors.

Der Mutter des Labors, Frau Cornelia Walz, gilt mein Dank für einige Bindungsschnellversuche und die nicht wissenschaftlichen Gespräche.

Der elektrophysiologischen Leidensgenossin Frau Prof. Dr. Ljiljana Gojkovic-Bukarica danke ich für den regen geistigen Austausch im Labor.

Herrn Damian Stefan möchte ich für viele wissenschaftliche Diskussionen und seine zahlreiche Aufmunterungen danken.

Mein Dank gilt Herr Jochen Lichtenberg, Herrn Alexander Stehle und Herrn Markus Winkler für die vielen entspannenden Mittagessen.

Frau Petra Kühnert, Frau Elke Schenk und Frau Claudia Müller danke ich für die freundliche Unterstützung und Hilfe im Labor.

Frau Susanne Bieger, Frau Anke Leichtle, Frau Anke Piehl, Frau Eva Stauß, Herrn Holger Felsch, Herrn Alexander Klein, Herrn Dr. Ulrich Rauch und Herrn Felix Wolf danke ich für die humorvolle gute Arbeitsatmosphäre und das harmonische Miteinander im Labor.

Vielen Dank den Mitarbeitern des AK von Frau Prof G. Drews für die Diskussionen und Herrn PD Dr. Peter Krippheit-Drews für seine spontane technische Hilfeleistung am „Puller“.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der Eberhard-Karl-Universität Tübingen, insbesondere Frau Dr. Doris Kloor, Frau Dr. Ursel Delabar, Frau Barbara Hartel, Frau Bronja Vosskühler für ihre Unterstützung, sowie für die technische Hilfe Herrn Daniel Eberle, Herrn K. Stieler und Herr Englert

Bedanken möchte ich mich ebenfalls beim Forschungsprogramm der Tübinger Medizinischen *fortune* der Eberhard-Karls-Universität Tübingen und der DFG für die finanzielle Förderung dieser Arbeit, sowie der Firma Aventis, für das bereitwillige Überlassen der Substanzen.

Nicht zuletzt Danke ich meinen Eltern und Freunden, die mich seelisch und moralisch unterstützt haben, ganz besonders Herrn Stefan Ohmen, der diese Arbeit Korrektur gelesen hat.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	<u>I</u>
Abkürzungsverzeichnis	<u>VI</u>
1 Einleitung	<u>1</u>
1.1 Kaliumkanäle	<u>1</u>
1.1.1 Spannungsaktivierte Kaliumkanäle (K_V)	<u>2</u>
1.1.2 Ca^{2+}-aktivierte Kalium Kanäle (K_{Ca})	<u>3</u>
1.1.3 Tandem-Kaliumkanäle (K_{2P})	<u>3</u>
1.1.4 Einwärtsgleichrichtende Kaliumkanäle (K_{IR})	<u>4</u>
1.2 K_{ATP}-Kanäle	<u>6</u>
1.2.1 Molekulare Struktur	<u>7</u>
1.2.2 Funktion der K_{ATP}-Kanäle	<u>11</u>
1.2.2.1 -Zelle des Pankreas	<u>11</u>
1.2.2.2 Kardiomyocyten	<u>13</u>
1.2.2.3 Gefäße und andere glatte Muskulatur	<u>14</u>
1.2.2.4 mito-K_{ATP}-Kanal	<u>15</u>
1.2.3 Physiologische Regulation von K_{ATP}-Kanälen	<u>15</u>
1.2.3.1 Regulation der K_{ATP}-Kanäle durch Nukleotide	<u>16</u>
1.2.3.2 Rundown und Refreshment bei K_{ATP}-Kanälen	<u>17</u>
1.2.3.3 Regulation der K_{ATP}-Kanäle durch (Phospho)-Lipide	<u>17</u>
1.2.3.4 Regulation durch Phosphorylierung und G-Proteine	<u>19</u>
1.2.4 Pharmakologie der K_{ATP}-Kanäle	<u>20</u>
1.2.4.1 K_{ATP}-Kanalöffner	<u>20</u>
1.2.4.2 K_{ATP}-Kanalschließer	<u>22</u>
1.2.4.3 HMR1883	<u>26</u>
1.2.4.4 DIDS - ein Stilben als K_{ATP}-Kanalmodulator	<u>26</u>
1.3 Grün fluoreszierendes Protein (GFP)	<u>27</u>
1.4 Fragestellung der Arbeit	<u>30</u>
2 Materialien	<u>32</u>

2.1	Verwendete Plasmide	32
2.2	Verwendete Bakterien	32
2.3	Verwendete Zellen	32
2.4	Geräte	33
	2.4.1 Transformation / Transfektion von Zellen	33
	2.4.2 Patch-clamp Mess-System	34
2.5	Chemikalien	35
2.6	Lösungen und Medien	36
	2.6.1 Medien zur Kultivierung von Bakterien	36
	2.6.1.1 Medium zur Kultivierung von transformierten Bakterien ...	36
	2.6.1.2 Puffer zur Gewinnung der Plasmid DNA aus transformierten E. Coli	37
	2.6.2 Medien zur Kultivierung von Zellen	38
	2.6.2.1 Minimum Essential Medium (MEM)	38
	2.6.2.2 Hitzeinaktiviertes fötales Kälber-Serum (FKS)	39
	2.6.2.3 Medium zur Kultivierung von Zellen	40
	2.6.2.4 Medium zum Einfrieren von Zellen	40
	2.6.2.5 Medium zum Auftauen von Zellen	40
	2.6.2.6 Medium zur Transfektion von Zellen	40
2.7	Lösungen für die Durchführung der Patch Clamp Experimente	41
	2.7.1 Badlösungen	41
	2.7.2 Pipettenlösungen (PL)	42
	2.7.3 Pipelösung	43
	2.7.4 Lösungen für die Referenzelektrode	44
	2.7.5 Lösungen für die Agarbrücke	44
2.8	Zubehör zum Elektrophysiologie Messplatz	44
	2.8.1 Elektroden	44
	2.8.2 Pipettenhalter	45
	2.8.3 Messkammer	45
	2.8.4 Perfusionssystem	46
	2.8.4.1 Perfusionssystem bei WC- und CA-Experimenten	46

2.8.4.2	Perfusionssystem bei IO-Experimente	47
2.8.5	Pipesystem	47
2.9	Verwendete Substanzen	48
2.9.1	K_{ATP} -Kanalblocker	48
2.9.2	K_{ATP} -Kanal Öffner	48
2.9.3	PI-3 Kinase Inhibitoren	49
2.9.4	Nukleotide	49
3	Methoden	50
3.1	Mikrobiologische Arbeitsmethoden	50
3.1.1	Gewinnung von Plasmid-DNA aus E. coli mit dem Qiagen-MaxiKit	50
3.1.2	Kultivierung und Bearbeitung von HEK293 Zellen	52
3.1.2.1	Kultivierung von HEK293 Zellen	52
3.1.2.2	Auftauen von HEK293 Zellen	53
3.1.2.3	Einfrieren von HEK293 Zellen	53
3.1.2.4	Transfektion von HEK293 Zellen mit SUR und/oder $K_{IR6.x}$	54
3.1.2.5	Präparation der Zellen für die Elektrophysiologie	54
3.2	Durchführung der Patch-clamp Experimente	55
3.3	Aufbau des elektrophysiologischen Messplatzes	56
3.4	Pipetten	58
3.4.1	Vorbereitung der Pipetten	58
3.4.2	Pipetten für Ganzzellmessungen	58
3.4.3	Pipetten für isolierte Membranen und Messungen in der CA Konfig.	59
3.4.4	Vorbereitungen zum Gebrauch der gezogenen Pipetten	59
3.5	Elektrophysiologische Methoden	59
3.5.1	Messungen in der CA-Konfiguration	60
3.5.2	Messungen an isolierten Membran-Patches in der Inside-Out-Konfiguration (IO)	61
3.5.3	Messungen an ganzen Zellen (WC)	62
3.6	Auswertung der Experimente	63
3.6.1	Auswertung der DIDS Experimente	64
4	Ergebnisse	65

4.1	Wirkung von Nukleotiden an $K_{IR}6.2/SUR2A$ -Kanälen	65
4.1.1	ATP mit und ohne Mg^{2+}	65
4.1.2	ATP-regenerierendes System	68
4.1.3	ADP mit und ohne Mg^{2+}	70
4.2	K_{ATP} -Kanal-Blocker	81
4.2.1	Glibenclamid	81
4.2.2	HMR1883 / HMR1098	87
4.2.3	Effekte von Glibenclamid und HMR1883 in Gegenwart von MgADP	89
4.2.3.1	Glibenclamid und MgADP	89
4.2.3.2	HMR1883 in Gegenwart von MgADP	91
4.3	PNU-94750	92
4.3.1	PNU-96293	92
4.3.2	PNU-96179	96
4.4	Kaliumkanalöffner (KCOs)	99
4.4.1	A312110 und P1075 in der Gegenwart von MgATP	99
4.4.2	P1075 in Anwesenheit von 1 und 10 mM MgATP	101
4.5	K_{ATP} -Kanalöffnung durch K_{ATP} -Kanalöffner in Abwesenheit von Mg^{2+}	102
4.5.1	P1075	103
4.5.2	Nicorandil, Minoxidilsulfat, Diazoxid	105
4.6	DIDS	108
4.6.1	DIDS und Lipide	116
4.7	Aktivierung von $K_{IR}6.1/SUR2A(Y1206S)$ Kanälen	122
5	Diskussion	125
5.1	Nukleotide	125
5.1.1	Hemmende und aktivierende Wirkungen von Nukleotiden	125
5.1.2	Verringerung der ATP-Hemmwirkung bei Anwesenheit von Mg^{2+}	128
5.2	K_{ATP} -Kanal-Blocker	130
5.2.1	Einfluß der Patch-Clamp-Konfiguration auf die Hemmung rekombinanter K_{ATP} -Kanäle durch Glibenclamid, HMR1883 und PNU	130
5.2.1.1	Einfluß der Patch-Clamp-Konfiguration auf den Grad der Hemmung (Amplituden)	131

5.2.1.2	Potenz der Hemmung (IC_{50}) rekombinanter K_{ATP} -Kanäle in der Ganzzellkonfiguration	134
5.2.1.3	Potenz der Hemmung (IC_{50}) rekombinanter K_{ATP} -Kanäle im Inside-Out-Patch	135
5.2.2	Glibenclamid und HMR1883 in Gegenwart von MgADP	137
5.3	K_{ATP} -Kanal-Öffner	138
5.3.1	K_{ATP} -Kanalöffner öffnen $K_{IR}6.2/SUR2B$ -Kanäle auch in Abwesenheit von MgATP	138
5.3.2	A312110: ein Dihydropyridin als K_{ATP} -Kanalöffner	140
5.3.3	Die Enantiomere PNU-96179 und PNU-96293 des Racemats PNU-94750 öffnen oder schließen $K_{IR}6.2/SUR2$ K_{ATP} -Kanäle.	141
5.4	DIDS	143
5.5	$K_{IR}6.1/SUR2A$ -Kanäle	147
6	Zusammenfassung	149
7	Literaturverzeichnis	152

Abkürzungsverzeichnis

A.dest	Bidestilliertes Wasser
A312110	(9 <i>R</i>)-9-(4-Fluoro-3-iodophenyl)-2,3,5,9-tetrahydro-4 <i>H</i> -pyrano[3,4- <i>b</i>]thieno[2,3- <i>e</i>]pyridin-8(7 <i>H</i>)-one-1,1-dioxid
ABC	ATP-Bindungs-Kassette (ATP-binding-cassette)
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
AP	Aktionspotential
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintri-phosphat
B _{IR}	-Zellen K _{ATP} -Kanal = K _{IR} 6.2
CA	Cell Attached Konfiguration der Patch-Clamp Technik
CaCl ₂	Calciumchlorid
cDNA	copyDNA, DNA Kopie eines RNA Stückes mit Hilfe der Reversen Transkriptase
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembran Regulator
DIDS	4,4'-Diisothiocyantostilben-2,2'-disulfonsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykol-bis(2-amino-ethylether)-N,N,N',N',-tetraacetat
FKS	Fötale Kälber-Serum
G _{ii} /G	- bzw. - Untereinheit eines G-(GTP-bindende) Proteins
GBC	Glibenclamid
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	Green Fluorecence Protein
G _s	stimulierendes G- (GTP-bindende) Proteine
HCl	Salzsäure
HEK-293-Zellen	Menschliche embryonale Nierenzelllinie (Human Embryonal Kidney)
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-(2-ethansulfonsäure)
IC ₅₀	Konzentration eines Liganden, welcher die halbmaximale Wirkung zeigt [M]
IO	Inside-Out- Konfiguration der Patch-Clamp Technik
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
K-Glutamat	Kaliumglutamat
[K] _i	K ⁺ -Konzentration intrazellulär
[K] _o	K ⁺ -Konzentration extrazellulär
K _{2P}	Tandem-Kaliumkanäle
K _{ATP} -Kanal	ATP-sensitiver K ⁺ Kanal
K _{Ca}	Ca ²⁺ aktivierte Kaliumkanäle
KCl	Kaliumchlorid
KCO	Kaliumkanalöffner (K channel opener)
kDa	kilo-Dalton (relative Molekülmasse)
K _{IR} -Kanäle	einwärtsgerichtete Kaliumkanäle (inward rectifying)
K _V -Kanäle	spannungsabhängige Kaliumkanäle (voltage dependent)
LC-Acyl-CoA	Langkettige Acyl-Coenzym A Ester
M	Molarität (mol/l)
MDR	Multi-drug resistance
MEM	Minimum Essential Medium
MgADP	Magnesium-gebundenes ADP
MgATP	Magnesium-gebundenes ATP

MgCl ₂	Magnesiumchlorid
^{mito} K _{ATP}	mitochondrialer K _{ATP} -Kanal
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NBF	Nukleotidbindungsfalte
n _H	Hill-Koeffizient
Oleoyl-CoA	Oleoyl-Coenzym A
P1075	N-Cyano-N'-(1,1-Dimethylpropyl)-N''-3-pyridylguanidin
pcDNA	Plasmidvektor der Firma Invitrogen (San Diego), der die cDNA des zu exprimierenden Proteins enthält
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoff-Ionen-Konzentration
PI	Phosphatidylinositol
pIC ₅₀	negativer dekadischer Logarithmus der halbmaximalen Wirkung eines Liganden, [-log M]
PIP ₂	(C ₄₇ H ₉₄ N ₃ O ₁₉ P ₃) L- -Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PK	Proteinkonzentration
pK _D	negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstante
PLC	Phospholipase C
PNU-94750	Racemat von PNU-96179 und PNU-96293
PNU-96179	(S)-N-Cyano-N'-(1-phenylpropyl)-N''-3-(pyridylguanidin)
PNU-96293	(R)-N-Cyano-N'-(1-phenylpropyl)-N''-3-(pyridylguanidin)
RMP	Ruhemembranpotential
RT	Raumtemperatur (22 °C)
^{sarko} K _{ATP}	K _{ATP} -Kanal im Sarkolemma
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	(Standard error of the mean) Mittlerer Fehler des Mittelwerts
SL	Stammlösung
SU	Sulfonylharnstoffe (sulfonylureas)
SUR	(Sulfonylurea-Receptor) Sulfonylharnstoffrezeptor
TEA	Tetraethylammonium
TMD	Transmembrandomäne
TMS	Transmembransegment
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U/min	Umdrehungen pro Minute
UDP	Uridintriphosphat
uK _{ATP}	ubiquitärer K _{ATP} -Kanal = K _{IR} 6.1
WC	Whole Cell Konfiguration der Patch-Clamp Technik
WT	Wildtyp K _{IR} 6.x/SURx-Kanäle
ZSM	Zellkultur Standard Medium
	Ohm

1 Einleitung

1.1 Kaliumkanäle

Bisher sind über 70 unterschiedliche Typen von Kaliumkanälen bekannt (Hille, 2001). Typische K^+ -Kanäle zeigen eine mehr oder weniger ausgeprägte Spannungsabhängigkeit und können auf der Basis ihrer Eigenschaften und Aminosäuresequenz in vier Hauptfamilien unterteilt werden:

- (1) spannungsaktivierte Kaliumkanäle (K_V) enthalten sechs Transmembranregionen,
- (2) Ca^{2+} aktivierte Kaliumkanäle (K_{Ca}) enthalten sechs oder sieben Transmembranhelices,
- (3) einwärtsgleichrichtende Kaliumkanäle (K_{IR}) enthalten zwei Transmembranhelices und
- (4) Tandem-Kaliumkanäle (K_{2pX}) enthalten vier Transmembranhelices mit zwei porenbildenden Domänen (Gutman et al., 2003) (Abb. 1).

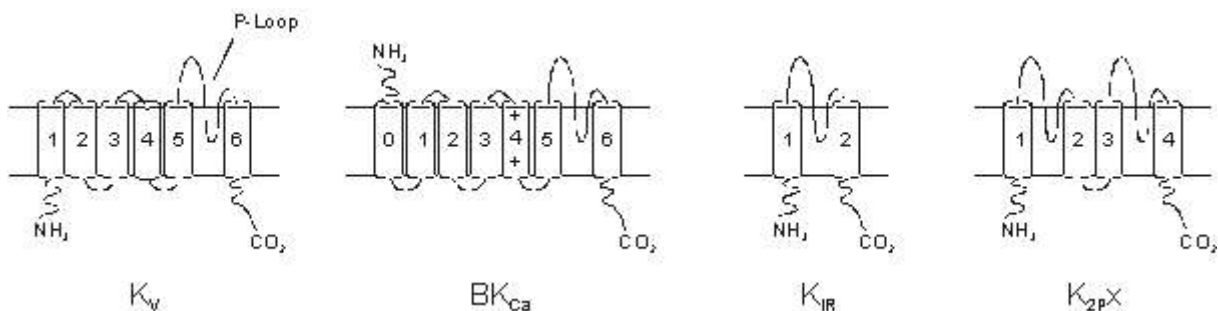


Abb. 1 Struktur der unterschiedlichen Kalium-Kanalfamilien

Jeweils vier dieser Einheiten lagern sich zu einem Tetramer zusammen und bilden die für Kalium selektive Pore (Heinemann, 2001). Die Pore wird immer von der letzten (2 und 4 bei K_{2pX}) Transmembranhelix zusammen mit dem P-Loop, auch dem Selektionsfilter für Kalium, ausgebildet. Die vorletzte Transmembranhelix bildet den Kontakt mit anderen Transmembranregionen (K_V , K_{Ca}) (Jan und Jan, 1997), die wiederum mit $-$ Untereinheiten oder der Zellmembran. Eine Tripeptidsequenz mit typischerweise [-GYG- oder -GFG-] auf dem P-Loop in der Pore des Kanals ist das gemeinsame Motiv für die K^+ -Ionen Selektivität (Inagaki et al., 1995a, Catterall, 1988). Als weitere Gemeinsamkeit haben die unterschiedlichen Kaliumkanäle, dass sie durch Tetraethylammonium (TEA) oder Cs^+ -Ionen blockiert werden (allerdings mit sehr unterschiedlicher Empfindlichkeit) (Hille, 2001). Abb. 2 zeigt typisierte Strom-Spannungskurven von (starken) Einwärtsgleichrichtern (z.B. $K_{IR2.x}$, $K_{IR3.x}$) und verzögerten

Gleichrichtern (z.B. BK_{Ca}).

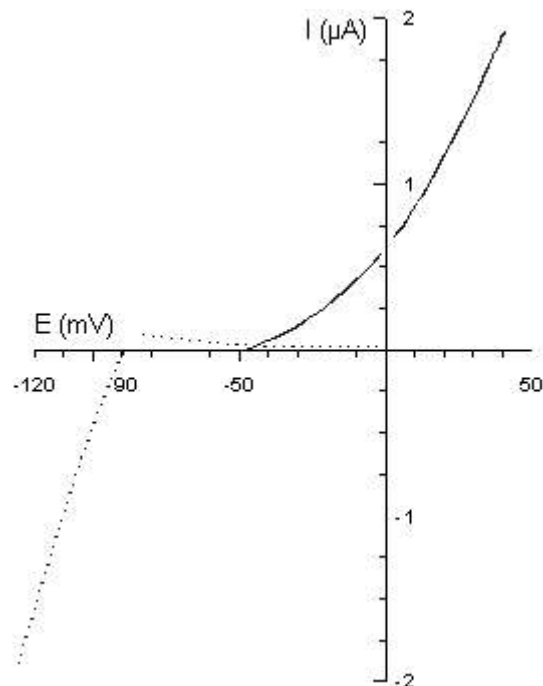


Abb. 2 Schematische Darstellung von Strom-Spannungskurven

Strom-Spannungskurven eines starken Einwärts-Gleichrichters = Inward Rectifier (gestrichelte Linie) (z.B. $K_{IR2.x}$, $K_{IR3.x}$) und eines verzögerten Gleichrichters = Delayed Rectifier (durchgezogene Linie) (z.B. BK_{Ca} , K_V) in physiologischen Bedingungen. Kaliumkanäle bei $[K]_i = 145 \text{ mM}$ / $[K]_o = 5 \text{ mM}$.

1.1.1 Spannungsaktivierte Kaliumkanäle (K_V)

Die K_V -Kanäle sind für die repolarisierende Phase des Aktionspotentials in erregbaren Zellen wie Cardiomyocyten und Nervenzellen verantwortlich, weiterhin sind sie beteiligt an der Volumenregulation, Hormonsekretion oder Aktivierung von mitogenen Faktoren. K_V -Kanäle sind oligomere Proteine, die aus vier α -Untereinheiten mit je sechs Transmembranhelices (TMS_1 - TMS_6) zusammengesetzt sind. Die Tripeptidsequenz für die K^+ -Selektivität [-GY-/FG-] liegt auf dem P-Loop zwischen der fünften (TMS_5) und sechsten (TMS_6) Transmembranregion. Das Transmembransegment TMS_4 enthält einen positiv geladenen Bereich und fungiert als Spannungssensor. Viele K_V -Kanäle besitzen spezifische β -Untereinheiten ($K_V\beta_1, K_V\beta_2$). Dabei handelt es sich um zytosolische Proteine (28-47 kDa), die am N-terminalen Ende mit der α -Untereinheit assoziiert sind. Daneben können auch andere Proteine (z.B. MinK, Isk, Chaperone)

mit der γ -Untereinheit assoziiert sein. Die Funktionen der verschiedenen γ -Untereinheiten ist zum Teil noch ungeklärt. Die K_V -Kanäle stellen zahlenmäßig die größte Gruppe unter den Kaliumkanälen dar (Catterall et al., 2002).

1.1.2 Ca^{2+} -aktivierte Kalium Kanäle (K_{Ca})

Calcium-aktivierte Kaliumkanäle werden durch intrazelluläres Calcium aktiviert. Man hat die K_{Ca} -Kanäle hinsichtlich ihrer Leitfähigkeit in zwei Klassen eingeteilt, die BK_{Ca} -Kanäle (= big K_{Ca} ; $g = 100-250$ pS) und die SK_{Ca} Kanäle ((= small K_{Ca} ; $g = 4-20$ pS) inklusive der IK_{Ca} -Kanäle (= intermediate K_{Ca} ; $g = 20-80$ pS)) (Hille, 2001). Die BK_{Ca} -Kanäle haben im Unterschied zu den aus sechs Transmembransegmenten bestehenden SK_{Ca} -Kanälen am N-Terminus ein zusätzliches Transmembransegment (TMS_0) (der N-Terminus liegt damit im Extrazellulärraum), wodurch sich eine sieben teilige Transmembranstruktur (TM) Struktur ergibt. Die Aminosäuresequenz der SK_{Ca} und IK_{Ca} Kanaltypen ist mit den BK_{Ca} Kanälen nur entfernt verwandt und unterscheidet sich auch funktionell und pharmakologisch deutlich. Die Ca^{2+} -empfindliche Domäne der BK_{Ca} -Kanäle liegt am C-terminalen Ende des Proteins. SK_{Ca}/IK_{Ca} -Kanäle werden durch Calcium indirekt über Calmodulin gesteuert, das mit den porenformenden SK_{Ca}/IK_{Ca} -Untereinheiten einen sehr stabilen Komplex bildet. Neben der Aktivierung durch Ca^{2+} (1-10 μ M (BK_{Ca}), 50-900 nM (SK_{Ca}/IK_{Ca})) werden BK_{Ca} -Kanäle durch Depolarisation aktiviert. Ca^{2+} verschiebt die Aktivierungskurve zu negativeren (= physiologischeren) Potentialen (Hille, 2001).

1.1.3 Tandem-Kaliumkanäle (K_{2P})

Die Tandem-Kaliumkanäle (TWIK, TASK, TREK, TRAAK) zeigen entweder eine schwache oder keine Gleichrichtung (Lesage und Lazdunski, 2000). Die Tandem Kaliumkanäle enthalten meist vier (oder auch acht) Transmembranhelices mit zwei (oder vier) porenbildenden Domänen. Das [-GYG- oder -GFG-] Motiv kommt im P-Loop der ersten Porendomäne vor, während der K^+ -Selektivitätsfilter in der zweiten Porendomäne aus [-GFG-] oder [-GLG-] besteht. Zwei K_{2P} -Einheiten bilden unter Beibehaltung der tetrameren Struktur der Pore einen funktionellen Kanal (Lesage und Lazdunski, 2000). Die Mitglieder dieser Familie besitzen (wie auch die K_{IR} -Kanäle) kein spannungsempfindliches TMS_4 Transmembransegment der

spannungsaktivierten Kaliumkanäle, d.h. sie werden nicht wie diese durch Depolarisation aktiviert. Physiologisch gesehen leiten diese Kanäle in ruhenden Zellen einen spannungsunabhängigen Auswärtskaliumstrom und sind damit eine wichtige Komponente für das Ruhemembranpotential. Neben ihrem Einfluss auf das Ruhemembranpotential haben diese Kanäle unterschiedliche, zum Teil auch noch unbekannte physiologische Aufgaben. So können sie sensitiv für Säure oder intrazelluläre Second Messenger Signale oder mechanische Stimuli sein (Millar et al., 2000, Talley et al., 2000). Pharmakologisch werden einige K_{2P} -Kanäle durch Interaktion mit Inhalationsnarkotika (z.B. Chloroform, Halothan, Isofluran) geöffnet (Patel et al., 1999).

1.1.4 Einwärtsgleichrichtende Kaliumkanäle (K_{IR})

K_{IR} -Kanäle sind, wie der Name schon sagt, mehr oder weniger einwärtsgleichrichtende Kaliumkanäle. Bisher sind sieben K_{IR} -Unterfamilien ($K_{IR}1-7$) identifiziert worden (Nichols und Lopatin, 1997). Die sieben K_{IR} -Unterfamilien können auf Grund ihrer Stärke der Gleichrichtung, ihrer Antwort auf zelluläre Signale und ihrer molekularen Ähnlichkeiten unterschieden werden. Allgemein betrachtet stabilisieren sie in erregbaren und nicht erregbaren Zellen das Membranpotential (E_M) nahe beim K^+ Umkehrpotential (ca. -90 mV; Isomoto et al., 1997)

Die Namen gebende Eigenschaft der Einwärtsrichtung (vgl. Abb. 2 für typische Strom-Spannungskurven) ist vor allem bei den starken Einwärtsgleichrichtern $K_{IR}2.x$ und $3.x$ zu beobachten. Ursache dieser Charakteristik ist ein spannungsabhängiger Porenblock des Auswärtsstroms durch die intrazellulären Polyamine Spermin und Spermidin. Zwei definierende Bereiche der starken Einwärtsgleichrichter, einer im cytoplasmatischen C-Terminus und ein anderer mit den negativ geladenen Aminosäuren Glutamat und Aspartat im zweiten Transmembransegment, sind ursächlich für diesen Block.

K_{IR} -Kanäle werden aus vier porenbildenden Strukturelementen (P-Loop mit anschließendem TMS) (bzw. porenbildenden Domänen bei K_{2PX}) gebildet, wobei jede wiederum aus zwei Transmembransegmenten (TMS_1 , TMS_2) besteht, die zusammen das Tetramer bilden (vgl. Abb. 1). Die extrazelluläre Verbindung zwischen TMS_1 und TMS_2 (P-Loop), in der auch der Selektionsfilter für K^+ liegt, bildet zusammen mit der inneren Helix TMS_2 die Pore für den K^+ Fluss. $K_{IR}3$ -Kanäle bestehen aus verschiedenen $K_{IR}3.x$ -Untereinheiten, eine Eigenschaft die auch für $K_{IR}2.x$ diskutiert wird. $K_{IR}4$ -Kanäle bilden mit den $K_{IR}5$ -Kanälen Heteromultimere. $K_{IR}6$ -

(K_{ATP} -) Kanäle sind mit dem SUR, einer γ -Untereinheit, verknüpft und werden unter anderem durch das ATP/ADP Verhältnis reguliert (*Kap. 1.2*) (Nichols und Lopatin, 1997). K_{IR3} -Kanäle werden durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren aktiviert, z.B. muscarinische Acetylcholin-Rezeptoren.

Einige K_{IR} -Kanäle wie K_{IR3} und K_{IR6} zeigen ein Burst-Verhalten mit kurzen Offenphasen (burst = plötzliche Amplitudenanhäufung), unterbrochen von langen Geschlossenphasen. Das wurde als Zweikomponenten-Schließverhalten beschrieben, das ein schnelles und langsames Schließverhalten beinhaltet. Das schnelle Schließverhalten wird durch eine kurze Öffnungsphase (flickering) innerhalb eines Burst bestimmt und durch die Intraburstoffen- und -geschlossendauer festgelegt (Bichet et al., 2003). Das langsame Schließverhalten ist der Übergang zwischen einer Burst-Offenphase und einer Zwischenburst-Geschlossenphase, die als Dauer zwischen zwei Burstphasen gemessen wird.

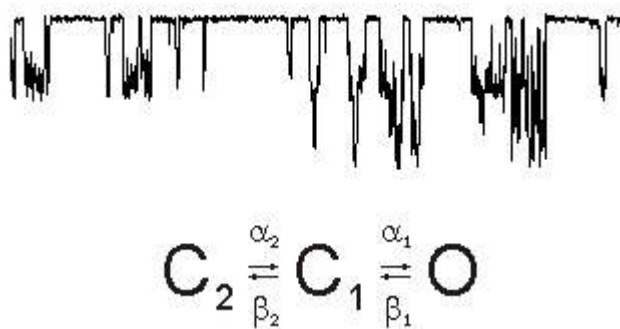


Abb. 3 Einzelkanalspur und K_{IR} -Kinetikmodell

Einzelkanalspur eines mit einem Öffner aktivierten $K_{IR6.1}/SUR2B$ -Kanals in der Cell-Attached-Konfiguration (-50 mV), (aus Manley, Löffler-Walz, et al., 2001), und ein K_{ATP} -Kinetikmodell (aus Satoh, Yamada, et al., 1998). C_2 stellt den langlebigen (Interburst) Geschlossenzustand, C_1 den Intraburst Geschlossen- und O den Offenzustand dar. α_1 , α_2 , β_1 und β_2 sind Geschwindigkeitskonstanten der Hin- oder Rückreaktion.

Betrachtet man die Kinetik von K_{IR} -Kanälen am Beispiel einer Einzelkanalspur (Abb. 3), so sind bei einem vereinfachten Modell drei Zustände zu finden (Abb. 3). Es gibt die beiden Geschlossenzustände C_1 und C_2 , wobei der Kanal im C_2 -Zustand lang andauernd geschlossen ist. Der C_1 -Zustand ist kurzlebig und geht entweder in den Offenzustand O oder C_2 über. Während der Burstphase wechselt der Kanal rasch zwischen O und C_1 hin und her. Die Zeitkonstanten τ_1 , τ_2 , τ_1 und τ_2 stellen Geschwindigkeitskonstanten der Hin- und Rückreaktionen dar (Satoh et al., 1998). Fan und Makielski, 1999, und Alekseev et al., 1998, haben das Kinetikmodell (Gillis et

al., 1989) modifiziert und zwischen mehreren Interburstphasen unterschieden.

Die Aktivität der K_{IR} -Kanäle kann durch eine Vielzahl von zellulären Faktoren (PIP_2 , Arachidonsäure, Na^+ und Mg^{2+} Ionen, pH-Wert, Phosphorylierung, Oxidation/Reduktion) beeinflusst werden (Ashcroft, 2000, Ruppertsberg, 2000). Obwohl einige Regionen und Reste, die an dieser Regulation beteiligt sind, identifiziert wurden, ist es z.T. nicht leicht, die physiologische Bedeutung der einzelnen Faktoren zu bewerten. Neben diesen physiologischen Faktoren werden K_{IR} -Kanäle durch die nichtselektiven Blocker TEA, Ba^{2+} und Cs^+ , oder durch intrazelluläres Magnesium gehemmt (Hille, 2001), allerdings mit unterschiedlichen Affinitäten.

Die verschiedenen K_{IR} -Kanäle kommen in verschiedenen Geweben vor. In der *Tabelle 1.1* ist das native Vorkommen der verschiedenen K_{IR} -Kanäle und ihre physiologische Funktion aufgelistet.

Tab. 1.1 *Vorkommen der verschiedenen K_{IR} -Kanäle und ihre physiologische Funktion*

	K_{IR1}	K_{IR2}	K_{IR3}	K_{IR4}	K_{IR5}	K_{IR6}	K_{IR7}
G e w e b e	Niere Gehirn Milz	Gehirn Herz Niere Skelettmuskel Endothelzellen Aorta Makrophagen Retina	Gehirn Herz z.B.: Schrittmacher- gewebe ubiquitär (3.2)	Gehirn	Niere Milz Leber, Gehirn Hoden	6.1: ubiquitär glatte Gefäß- muskulatur 6.2: Pankreas - Zelle, Herz- und Skelettmuskulatur Glatter Muskel Gehirn	Herz Gehirn Niere Prostata Lunge Hoden
P h y s i o l o g i e		Erhaltung der Ruhe Membranpotentials Repolarisation des Herzaktionspotentials	Rezeptorabhän- gige Hyperpolarisation	K^+ - Transport		Regulation des glaten Muskeltonus, Regulation der Insulinsekretion, Sauerstoff und Insulinsensor im Gehirn Zellschutz bei kardialer und cerebraler Ischemie	Steuerung des Ruhe- membran- potentials bei Neuronen und der aktionspotentialdauer im Herzen

1.2 K_{ATP} -Kanäle

K_{ATP} -Kanäle gehören zur Familie der einwärtsgerichtenden Kaliumkanäle, sind jedoch nur sehr schwache Gleichrichter. Sie wurden in einer Vielzahl von Geweben gefunden (*s. Tabelle 1.1*). Als erstes entdeckte Noma, 1983, die K_{ATP} -Kanäle im Herzen. Cook und Hales, 1984, beschrieb sie in der pankreatischen β -Zelle. Spruce et al., 1985, im Skelettmuskel, Standen et al., 1989, im glatten Muskel, Ashford et al., 1988, im Gehirn und Hunter und Giebisch, 1988, in der Niere.

1.2.1 Molekulare Struktur

Der K_{ATP} -Kanal ist ein Proteinkomplex von ~950 kDa Größe. Er setzt sich aus einer porenbildenden β -Untereinheit, dem $K_{IR}6.x$, und der regulatorischen α -Untereinheit, dem SUR zusammen. Jeweils vier $K_{IR}6.x$ Proteine bilden die für Kalium selektive Pore und damit den (schwach) einwärtsgerichteten Kaliumkanal. Die β -Untereinheit $K_{IR}6.x$ liegt weiterhin als Dimer mit der α -Untereinheit (SUR) vor. Daraus ergibt sich ein heterooktamerer Komplex mit einer 4:4 Stoichiometrie (Abb. 4) (Aguilar-Bryan et al., 1998). Für einen funktionellen Kanal muss der Kanalkomplex in die Zellmembran gelangen. Dies geschieht aber nur dann, wenn am C-Terminus das RKR-Motiv des $K_{IR}6.x$ durch die Assoziation mit dem SUR maskiert wurde. Ansonsten wird der Kanalkomplex am Endoplasmatischen Retikulum zurückgehalten.

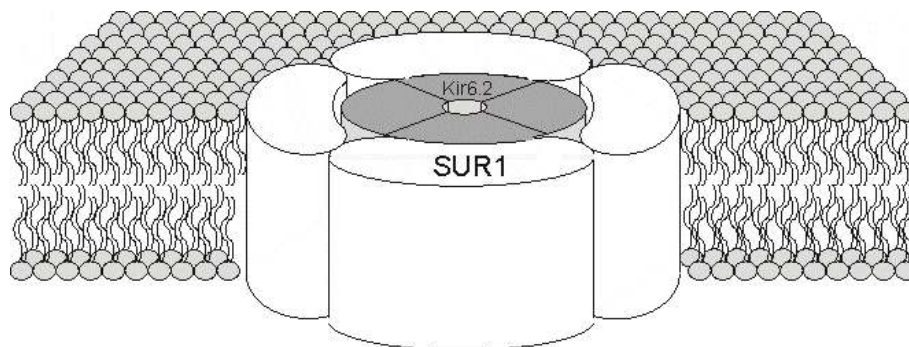


Abb. 4 Modell des K_{ATP} -Kanals in der β -Zelle des Pankreas

Vom $K_{IR}6.x$ sind zwei Isoformen bekannt, der $K_{IR}6.1$ oder auch uK_{ATP} (ubiquitärer K_{ATP} -Kanal (Inagaki et al., 1995b)) und der $K_{IR}6.2$ oder auch B_{IR} (β -Zelle einwärtsgerichteter Kaliumkanal (Inagaki et al., 1995b)). Der $K_{IR}6.1$ besitzt 424 AS bei einer Größe vom 48 kDa, der $K_{IR}6.2$ hat bei einer Größe von 45 kDa 390 AS. Die Kanäle besitzen 71 % Übereinstimmung in ihrer Aminosäuresequenz. Der $K_{IR}6.x$ hat wie alle anderen K_{IR} -Kanäle zwei Transmembransegmente (Abb. 1). Zwischen den beiden Transmembransegmenten liegt auf dem P-Loop der Selektionsfilter für Kalium, der die Aminosäuresequenz -GFG- besitzt. An den $K_{IR}6.x$ Untereinheiten wurden zwei potentielle Proteinkinase A und mehrere Proteinkinase C Phosphorylierungsstellen gefunden, über die der Kanal reguliert werden kann (Seino und Miki, 2003, Ruppertsberg, 2000, Ashcroft, 2000).

Die α -Untereinheit, der SUR, gehört zur Familie der ATP bindenden Proteine (ABC-Proteine), welche zwei ATP-Bindungskassetten enthalten. Im Gegensatz zu vielen anderen ABC-Proteinen (MDR (Multi drug resistance protein), CFTR (cystic fibrosis transmembrane

regulator)) ist für den SUR keine Transportfunktion beschrieben worden. Die funktionelle Einheit eines ABC-Proteins besteht aus sechs TMS (= TMD_x), gefolgt von der intrazellulären ATP-Bindungskassette (NBF). Bei den ABC-Proteinen der Eukaryonten sind durch Genduplikation zwei solcher Einheiten hintereinander gehängt: (TMD₁ + NBF₁) + (TMD₂ + NBF₂). Der SUR hat zusätzlich am aminoterminalen Ende eine dritte Transmembrandomäne TMD₀, die fünf Transmembransegmente enthält. Daraus ergeben sich beim SUR 17 Transmembransegmente (5+6+6), bei dem in TMD₀ TMS₁ bis TMS₅, in TMD₁ TMS₆ bis TMS₁₁ und in TMD₂ TMS₁₂ bis TMS₁₇ zu finden sind. Analog zu den anderen ATP-Proteinen liegen beim SUR die zwei großen intrazellulären Domänen mit den beiden NBFs (NBF1 und NBF2) zwischen TMD₁ und TMD₂ (~40 kDa) bzw. zwischen TMD₂ und dem C-Terminus (~38 kDa) (Abb. 5).

Jede NBF enthält das Walker A-Motiv (-GXXGXXGKS-, wobei X irgendeine Aminosäure sein kann) und das Walker B-Motiv (-YYYYD-, wobei Y ein hydrophober Rest ist; Walker et al., 1982). Die Segmente, die die Walker A- und Walker B- Motive verbinden, enthalten ein konserviertes Motiv, die Linker-Sequenzen (-LSGGQ- in NBF1 und -FSQGQ- in NBF2), welche den Besetzungszustand der NBFs registrieren (Ashcroft, 2000).

Vom SUR gibt es zwei Isoformen, den SUR1 und den SUR2, die aus zwei unterschiedlichen Genen (*ABCC8*, auf Chromosom 11 (11p15.1) und *ABCC9*, auf Chromosom 12 (12p12.1)) gebildet werden. Unter den Produkten des *ABCC9*-Gens wurde eine Vielzahl von

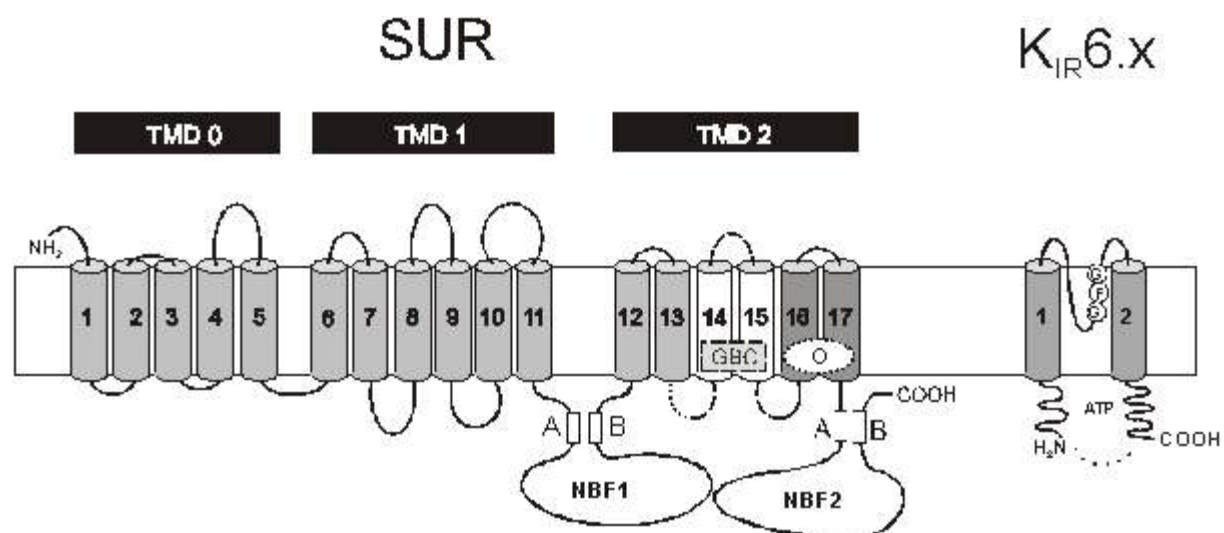


Abb. 5 Struktur der Bestandteile des K_{ATP} -Kanals

<i>SUR</i>	= Sulfonylharnstoffrezeptor	$K_{IR6.x}$	= Einwärtsgleichrichtender Kaliumkanal 6.x
<i>TMD</i>	= Transmembrandomäne (0,1,2)	1-17(<i>SUR</i>)	= Transmembranbereich (TMS _x)
1-2 (K_{IR})	= Transmembransegment (TMS _x)	<i>GFG</i>	= Glycin-Phenylalanin-Glycin (=K ⁺ -Kanalsignatur)
<i>GBC</i>	= Glibenclamid-Bindungsstelle	<i>O</i>	= Öffnerbindungsstelle
<i>NBF</i>	= Nukleotidbindungsstelle	A, B	= Walkerregionen für die Bindung von Nukleotiden

Spleißvarianten gefunden, wobei SUR2A und SUR2B die beiden Hauptprodukte darstellen. Sie werden durch unterschiedliches Spleißen des C-terminalen Exons gebildet und unterscheiden sich in den letzten 42 Aminosäuren, wobei der C-Terminus vom SUR2B dem des SUR1 sehr stark ähnelt. Auch von SUR1 wurden verschiedene Spleißvarianten beschrieben (Hambrock et al., 2002b). Es ist aber bis jetzt noch ungeklärt, ob ihnen neben SUR1, SUR2A und SUR2B eine physiologische Bedeutung in den verschiedenen Geweben zukommt. Das SUR1-Protein ist beim Menschen 176 kDa groß und besteht aus 1581 Aminosäuren. Die SUR2A- und SUR2B- Proteine beim Menschen haben beide 1549 AS bei einer Größe von 174 kDa (Seino, 1999, Babenko et al., 1998a).

K_{ATP} -Kanäle kommen in vivo wahrscheinlich nicht in jeder denkbaren $K_{IR}6.x/SUR$ -Kombination vor (Babenko et al., 1998a). In vitro bilden jedoch alle $K_{IR}6.x/SUR$ Kombinationen funktionelle Kanäle (Seino und Miki, 2003). Die möglichen Kombinationen mit ihren typischen Gewebsvorkommen sind in der *Tabelle 1.2* aufgeführt:

Tab.1.2 *Natürliches Vorkommen der $K_{IR}6.x/SUR$ -Kombinationen*

	SUR1	SUR2A	SUR2B
$K_{IR}6.1$	-	-	glatte Gefäßmuskulatur
$K_{IR}6.2$	Pankreas & Neurone	Herz- & Skelettmuskel	glatte nichtvaskuläre Muskulatur

Im SUR1 gibt es zwei potentielle N-verknüpfte Glykosylierungsstellen, die sich extrazellulär am N-Terminus bzw. zwischen der zwölften und dreizehnten Helix befinden. Der SUR1 hat vier PKA Phosphorylierungsstellen. Daneben gibt es viele potentielle PKC-abhängige Phosphorylierungsstellen (Seino, 1999). Im SUR2 findet man extrazellulär drei potentielle Glykosylierungsstellen, wobei die eine am N-Terminus und die beiden anderen zwischen TMS₇ und TMS₈ zu finden ist. Zwei PKA-abhängige Phosphorylierungsstellen und wie am SUR1 viele potentielle PKC abhängige Phosphorylierungsstellen sind an den SUR2-Typen zu finden (Seino, 1999).

An den beiden SUR-Isoformen SUR1 und SUR2 sind in verschiedenen Bereichen Aminosäuren lokalisiert worden, die für die Bindung bestimmter Pharmaka wichtig sind (Abb. 5). Die beiden SUR-Isoformen haben eine unterschiedliche Empfindlichkeit für K_{ATP} -Kanalöffner oder -blocker. Typischerweise bindet der SUR1 mit einer hohen Affinität Sulfonylharnstoffe und Glinide (K_{ATP} -Kanalblocker, s. 1.2.5.2), während die K_{ATP} -Kanalöffner am SUR2 mit einer hohem Affinität gebunden werden. Um die Eigenschaften der Kanäle für Öffner oder

Blocker ändern und damit genauer untersuchen zu können, wurden verschiedene Chimären zwischen SUR1 und SUR2 bzw. Mutationen der Proteine hergestellt und deren Bindungs- bzw. Kanaleigenschaften untersucht.

Die Kaliumkanalöffner-Bindungsstellen sind in verschiedenen Bereichen des SUR lokalisiert worden. Uhde et al., 1999, identifizierte im TMD₂ zwei Segmente, die für Substanzen aus der Pinacidilgruppe (Cyanoguanidine, z.B. auch P1075) und für Benzopyrane (z.B. Levromakalim) empfindlich sind. Der eine kurze Bereich liegt in der Schleife zwischen TMS₁₃ und TMS₁₄ (Abb. 5), ein längerer ist in den Helices TMS₁₆ und TMS₁₇ und in NBF2 zu finden. Moreau et al., 2000, identifizierten in der letzten TMS (TMS₁₇) des SUR2 zwei Aminosäuren (L1249 und T1253), die für ein hochempfindliche Öffnung durch Cyanoguanidine und Benzopyrane notwendig sind. Der Wildtyp SUR1 ist kaum sensitiv für Benzopyrane oder Cyanoguanidine, der aber durch den Austausch der korrespondierenden Aminosäuren (T1286L, M1290T) des SUR2 für diese Öffner empfindlich wird (Hambrock et. al, Diabetes in press). Die Wirksamkeit von Diazoxid (300 µM gegen 0,1 mM ATP) ist an SUR1-Kanälen wesentlich größer als an SUR2A-Kanälen. Bei einer zusätzlichen ADP (0,1 mM) -Applikation wurde beim SUR1 ein Wirksamkeitsverlust und beim SUR2 eine Steigerung der Wirksamkeit gesehen. Diese erhöhte Diazoxid-Wirkung konnte unabhängig von Anwesenheit von ADP durch Punktmutationen im Walker A- (K1384M) oder Walker B- (D1469N) Motiv bei SUR2A-Kanälen vollständig aufgehoben werden. Beim SUR1 blieb die Diazoxid-, aber nicht die ADP-Wirkung erhalten (D'hahan et al., 1999). Babenko et al., 2000, entdeckte, dass die TMS₆ bis TMS₁₁ und die NBF₁, für die Aktivierung durch Diazoxid Reaktion notwendig sind, was er an SUR1/SUR2 Chimeren getestet hatte. Daneben benötigt die hochaffine Bindung von Kaliumkanalöffnern an den SURs hydrolysierbares ATP und Mg²⁺ (Quast et al., 1993, Schwanstecher et al., 1992b, Löffler-Walz und Quast, 1998).

1.2.2 Funktion der K_{ATP}-Kanäle

1.2.2.1 -Zelle des Pankreas

Allgemein stellen K_{ATP}-Kanäle die Verbindung zwischen dem metabolischen Zustand der Zellen und ihrer Aktivität her. Die funktionelle Rolle der K_{ATP}-Kanäle ist am Besten in den - Zellen des Pankreas charakterisiert worden. Sie haben hier eine zentrale Funktion für die

Regulation der Glucosekonzentration im Organismus (Abb. 6). Glucose wird durch den Glucosetransporter in die β -Zellen transportiert, und durch den nachfolgenden Glucosemetabolismus steigt die ATP-Konzentration in den Zellen. Die Zunahme des ATP/ADP-Verhältnisses schließt die K_{ATP} 6.2/SUR1-Kanäle, welches zur Depolarisation der β -Zellen führt. Dadurch werden spannungsabhängige Calciumkanäle geöffnet, was dann zu einem Calciumeinstrom führt. Der

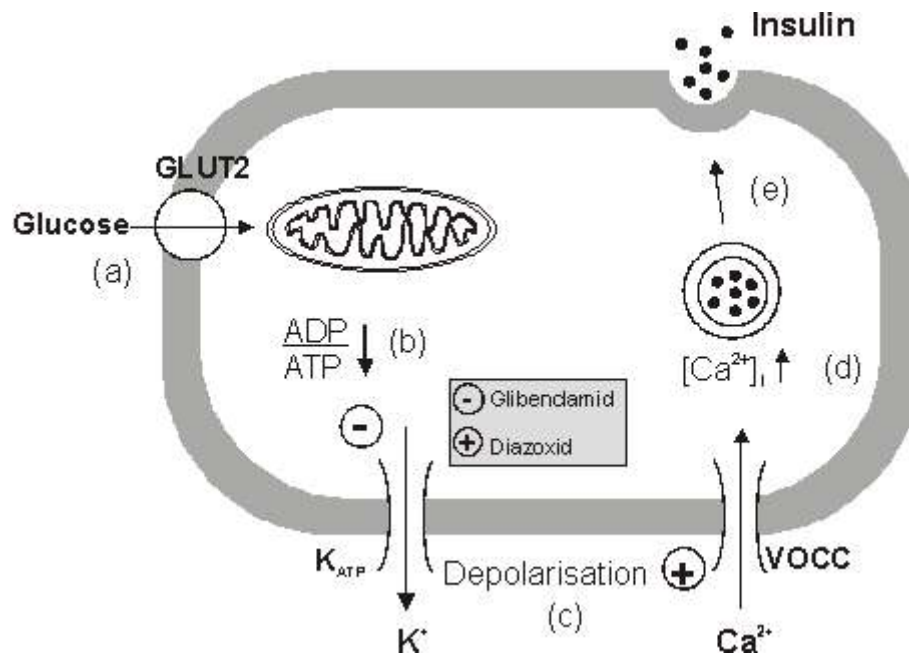


Abb. 6 Modell der Insulinfreisetzung in den β -Zellen des Pankreas (Konsensusmodell nach Cook und Hales, 1984) Aus Quast et al. 2001. In der β -Zelle wird das Ruhemembranpotential (RP) durch die Aktivität der K_{ATP} -Kanäle bestimmt und liegt bei ca. -70 mV. Dabei sind die spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanäle (L-VOC = voltage operated calcium channel) noch geschlossen. Der postprandiale Anstieg des Blutglucosespiegels führt, nach der Glucoseaufnahme durch den Transporter GLUT2 (a), zu einer gesteigerten intrazellulären ATP-Synthese aus ADP, wobei das ADP / ATP-Verhältnis zu ATP hin verschoben wird (b). Dies bewirkt eine K_{ATP} -Kanalblockierung, wodurch die Zelle depolarisiert (c) und sich die spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle öffnen (d). Der resultierende Ca^{2+} -Einstrom wiederum löst die Exozytose von Insulinvesikeln aus (e).

Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration in den β -Zellen löst die Insulinfreisetzung durch Exozytose von Insulinvesikeln aus (Cook und Hales, 1984, Seino, 1999). Sulfonylharnstoffe und Glinide, die bei der Behandlung des nicht insulinabhängigen Diabetes-Mellitus-Typ-2 Verwendung finden, stimulieren die Insulinsekretion in den β -Zellen des Pankreas durch die Hemmung von K_{ATP} -Kanälen (Ashcroft und Ashcroft, 1992) (Kap. 1.2.2).

Fehlregulationen der Glucosekonzentration im Blutplasma sind die bekanntesten Krankheiten, die mit K_{ATP} -Kanälen, genauer dem $K_{IR}6.2/SUR1$ (vgl. 1.2.5) in Verbindung

stehen. Die Ursachen des Typ-2-Diabetes-Mellitus sind noch nicht genau verstanden. Eine genetische Prädispositionen für diese Erkrankung spielt aber auf jeden Fall eine Rolle. So konnte ein Zusammenhang zwischen den Polymorphismen E23K in der porenformenden Einheit $K_{IR}6.2$ oder E1506K in der regulatorischen Einheit des SUR1 und der Wahrscheinlichkeit, Typ-2-Diabetes zu entwickeln, gezeigt werden (Schwanstecher et al., 2002, Huopio et al., 2003, Riedel et al., 2003). Andere Polymorphismen als am K_{ATP} -Kanal der β -Zelle (z.B. welche, die eine Insulinresistenz begünstigen) und äußere Einflüsse sind aber ebenfalls wichtige Parameter. K_{ATP} -Kanal-Hemmstoffe spielen eine wichtige Rolle bei der Behandlung des Typ-2-Diabetes (vgl. Kap. 1.2.1 und 1.2.5.2).

Der kongenitale Hyperinsulinismus oder PHHI (persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy) entsteht durch Mutationen in den Genen von $K_{IR}6.2$ oder SUR1, die zu einem mehr oder weniger großen Funktionsverlust des Kanals führen. Mehr als 50 Mutationen wurden in den menschlichen SUR1- und $K_{IR}6.2$ -Genen identifiziert, die zu einer Einschränkung oder deren Verlust der Funktion der K_{ATP} -Kanäle führen. Dies führt zu einer Depolarisation der β -Zellen, erhöhten Insulinblutspiegeln und zu einer Senkung des Blutglukosespiegels. Als mögliche Therapie bei eingeschränkter K_{ATP} -Kanal-Funktion werden K_{ATP} -Kanal-Öffner (in der Regel Diazoxid) verwendet oder eine partieller Pankreasresektion vorgenommen (Seino, 2003).

In vielen Gehirnregionen führt bei Ischämie die Abnahme des ATP/ADP-Verhältnisses zur Öffnung von K_{ATP} -Kanälen und damit zur Hyperpolarisation der Neurone, wodurch die elektrische Aktivität reduziert oder sogar vollständig aufgehoben wird (Liss und Roeper, 2001). Dies führt in den betroffenen Gehirnarealen zu einer Ruhigstellung der Zellen und damit ähnlich wie im Herzen (s. Kap. 1.2.2.2) zur Energieeinsparung unter Ischämie. Ebenso wie im Herzen gibt es im Gehirn ein Preconditioning, an dem K_{ATP} -Kanäle beteiligt sind.

In Ventromedial Kernen des Hypothalamus (VMH) gibt es glucoseempfindliche Neurone (glucose-responsive-neurons (GRN)), die abhängig von der extrazellulären Glucosekonzentration ihre Erregungsrate steigern (bei einem erhöhtem Glucosespiegel) oder senken (bei einem erniedrigten Glucosespiegel) (Sakura et al., 1999, Seino und Miki, 2003). Durch diesen Glucosesensor im Gehirn werden die Glucagonsekretion aus den α -Zellen der Langerhans'schen Inseln im Pankreas und ferner Appetit und Nahrungsaufnahme moduliert (Riedel et al., 2003). Bei steigendem Blutglucosespiegel wird so die Glucagonsekretion gehemmt und ein Sättigungsgefühl ausgelöst. Fällt der Blutglucosespiegel, findet eine Aktivierung von K_{ATP} -Kanälen in den glucoseempfindlichen Neuronen des Hypothalamus statt, womit eine auto-

matische Übermittlung an die pankreatischen β -Zellen verbunden ist, bei der eine Glucagon Sekretion zur Steigerung der Glucosekonzentration im Blut ausgelöst wird. Zudem wird ein Hungergefühl induziert (Seino und Miki, 2003).

Die Glucose-Homöostase wird in vielen Geweben durch eine balancierte Sekretion von Hormonen regelrecht aufrechterhalten. Interessanterweise ist der K_{ATP} -Kanal an der dazugehörigen Sekretion von Insulin, Glucagon und GLP-1 beteiligt. Eine neuronale Kontrolle der Lebensmittelaufnahme und Hormonsekretion über glucoseempfindliche Neurone im Hypothalamus repräsentieren eine bei homozygoten polymorphen Individuen, weil K_{ATP} -Kanäle viel im Zentralnervensystem expremiert werden.

1.2.2.2 Kardiomyocyten

Adaption an Stress: In Herzmuskelzellen sind K_{ATP} -Kanäle unter physiologischen Bedingungen geschlossen und öffnen unter ischämischen Bedingungen. Dennoch zeigen Versuche mit $K_{IR}6.2$ -knock-out Mäusen, dass dem Herzen die Anpassung an erhöhte Sympathikotonus ermöglicht wird (Zingman et al., 2002b). Beim Menschen sind Mutationen am SUR2A gefunden worden, die zu einer veränderten Kinetik der Hydrolyse der Nukleotide und damit zu einer veränderten metabolischen Signaldekodierung führen. Diese Mutationen waren mit einer dilatativen Kardiomyopathie, die zum Tode führt, verbunden (Bienengraeber et al., 2004).

Ischämie und Hypoxie: Während einer schweren Ischämie oder Hypoxie findet eine Abnahme des ATP/ADP-Verhältnisses (Gögelein, 2001) und eine Zunahme der Oleyl-Coenzym A Ester Konzentrationen (Liu et al., 2001) statt, was zu einer Öffnung von kardialen K_{ATP} -Kanälen führt (*Kapitel 1.2.3*). Die Öffnung von kardialen K_{ATP} -Kanälen während Hypoxie oder Ischämie führt zu einer Reduzierung der Aktionspotentialdauer und hält die Kardiomyocyte auf dem Gleichgewichtspotential für Kalium.

K_{ATP} -Kanäle sind wichtige Mediatoren der Kardioprotektion. Ihre Bedeutung ist im Ganztier, am isolierten Herzen und an kardialen Myocyten gezeigt worden (Terzic et al., 1995). Die Öffnung der kardialen K_{ATP} -Kanäle unter ischämischen Bedingungen hat unterschiedliche Folgen. Zum einen arbeitet das Herzzellgewebe schwächer oder gar nicht mehr, was zu einer Energieeinsparung und damit zu einem Schutz des Gewebes führt (Cavero et al., 1995). Zum anderen kann es durch die Aktionspotentialverkürzung bzw. Kreisströme um unerregbare Herzareale zu Arrhythmien, Herzflimmern und plötzlichem Herztod kommen. Die Verkürzung

des Aktionspotentials kann durch Sulfonylharnstoffe oder den Thiosulfonylharnstoff HMR1883 aufgehoben werden (Gögelein et al., 1999).

Ein weiteres wichtiges kardioprotektives Element ist die Preconditionierung. Die ischämische Preconditionierung ist ein Phänomen, bei welchem einzelne oder mehrere kurze Ischämieperioden gefolgt von Reperfusionen dazu führen, dass das Herz gegen eine erneute, anhaltende Ischämie geschützt ist. Die Preconditionierung wurde erstmalig 1986 demonstriert (Murry et al., 1986). Seit dieser Entdeckung konnte dieses Phänomen der Kardioprotektion bei allen untersuchten Lebewesen gefunden werden (Yellon und Downey, 2003). Der Effekt wurde auch bei kultivierten Zellen, die Hypoxie oder metabolischer Inhibition ausgesetzt waren, beobachtet (Terzic et al., 1995). Obwohl eine Anzahl von pharmakologischen Agentien und verschiedene zelluläre Komponenten an dem kardioprotektiven Effekt der ischämischen Preconditionierung beteiligt sind, ist eine zentrale Rolle der K_{ATP} -Kanäle unumstritten. So können einige K_{ATP} -Kanalöffner eine Preconditionierung nachahmen, und der Schutz kann durch K_{ATP} -Kanalblocker aufgehoben werden (Yellon und Downey, 2003). Neben den sarkolemmalen K_{ATP} -Kanälen sind möglicherweise auch mitochondriale K_{ATP} -Kanäle (mito K_{ATP} -Kanäle) am Preconditioning beteiligt.

1.2.2.3 Gefäße und andere glatte Muskulatur

Der K_{ATP} -Kanal nimmt eine wichtige Rolle bei der Blutdruckregulation ein, die über die Gefäßweite gesteuert wird (vgl. Kap. 1.2.1). Die Öffnung von K_{ATP} -Kanälen der Gefäßmuskelzellen führen zu einer Hyperpolarisation der sarkolemmalen Membranen und damit zu einer Vasodilatation, was mit einer Blutdrucksenkung verbunden ist (Quast und Cook, 1989b). Die K_{ATP} -Kanalöffner sind deshalb potente Vasodilatoren, die den Blutdruck senken. Im Gegensatz zu der oben behandelten Herz- und Skelettmuskulatur spielen in der glatten Muskulatur K_{ATP} -Kanäle aber auch unter physiologischen Bedingungen eine Rolle und sind zumindest im Gehirn, dem Herzen und der Niere an der physiologischen Regulation des Gefäßtonus beteiligt. In K_{ATP} -Knock-Out-Mäusen war der Blutdruck (diastolisch und systolisch) im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen signifikant erhöht (Chutkow et al., 2002). Pathophysiologisch scheint der K_{ATP} -Kanal bei der essentiellen Hypertonie und der vasospastischen (Prinzmetal) Angina von Bedeutung zu sein (Chutkow et al., 2002, Miki et al., 2002). Die Mäuse ohne den vaskulären K_{ATP} -Kanal sterben den plötzlichen Herztod (Chutkow et al., 2002, Seino, 2003). In nicht vaskulären glatten

Myozyten (z.B. Blase, Bronchien) sind K_{ATP} -Kanäle ebenfalls an einer Relaxation der Muskulatur beteiligt, ihre Bedeutung unter physiologischen Bedingungen ist aber noch unklar.

1.2.2.4 mito- K_{ATP} -Kanal

Einen Sonderfall stellt der K_{ATP} -Kanal der Mitochondrien ($_{\text{mito}}K_{ATP}$) dar. Die molekulare Struktur dieses Kanals ist noch nicht bekannt. Die Gemeinsamkeiten der plasmalemalen K_{ATP} - und der $_{\text{mito}}K_{ATP}$ -Kanäle sind die Selektivität für Kalium und die Regulation durch ATP. Auch auf typische K_{ATP} -Kanal-Öffner und -Blocker reagiert der $_{\text{mito}}K_{ATP}$ -Kanal grundsätzlich ähnlich wie die plasmalemalen Kanäle, sein pharmakologisches Profil im Detail entspricht aber keinem der oben beschriebenen K_{ATP} -Kanal-Typen der Plasmamembran (Grover und Garlid, 2000, Szewczyk und Wojtczak, 2002, Terzic et al., 2000, Yellon und Downey, 2003, O'Rourke, 2000).

1.2.3 Physiologische Regulation von K_{ATP} -Kanälen

K_{ATP} -Kanäle werden durch verschiedene intrazelluläre Faktoren gesteuert. Neben der Hauptregulation durch Nukleotide gehören auch Phospholipide, langkettige AcylCoenzym A Ester, die Proteinkinasen A (PKA) und C (PKC) und G-Proteine zu den direkten oder indirekten Modulatoren von K_{ATP} -Kanälen (Seino und Miki, 2003). Daneben können an der Regulation der K_{ATP} -Kanäle weitere lose assoziierte Untereinheiten wie die Kreatinkinase (Crawford et al., 2002b), die Adenylatkinase (Carrasco et al., 2001) und die Laktatdehydrogenase (Crawford et al., 2002a) beteiligt sein. Auch der intrazelluläre pH-Wert (Baukrowitz et al., 1999, Schulze et al., 2003c) und das Zytoskelett spielen eine Rolle (Furukawa et al., 1996).

1.2.3.1 Regulation der K_{ATP} -Kanäle durch Nukleotide

Namengebend für die K_{ATP} -Kanäle ist ihre Hemmung durch ATP. Am bestuntersuchten und bestverstandenen K_{ATP} -Kanal, dem der pankreatischen β -Zelle ($K_{IR}6.2/SUR1$), liegt, gemessen mit Inside-Out-Patches, die IC_{50} für ATP ungefähr bei 10 μM , wobei die Anwesenheit von Magnesium keine große Rolle spielt (Ueda et al., 1999). Ohne zusätzliche aktivierende Komponenten sollten diese Kanäle also eigentlich weitest gehend inaktiv sein, da die ATP-Konzentration in Zellen $> 1 \text{ mM}$ ist. GTP hat hier ähnliche Eigenschaften wie ATP (Lederer und

Nichols, 1989), während UTP deutlich schwächer hemmt. Durch die Expression der porenbildenden Kanaluntereinheiten $K_{IR}6.2$ (z.B. $K_{IR}6.2$ C36) ohne SUR und durch Entdeckung verschiedener $K_{IR}6.2$ -Mutationen mit deutlich reduzierter ATP-Empfindlichkeit (z.B. G334D) konnte gezeigt werden, dass $K_{IR}6.2$ die für die Hemmung durch ATP verantwortliche Untereinheit ist (Tucker et al., 1997, Drain et al., 1998).

Eine wichtige Rolle bei der Regulation der K_{ATP} -Kanäle spielen auch Nucleosiddiphosphate (NDPs), die in Mg^{2+} -freier Lösung eine hemmende Wirkung wie ATP oder GTP haben, wenn auch bei deutlich höheren Konzentrationen (IC_{50} ca. 0.5 mM). Im Gegensatz dazu aktiviert MgADP die Kanäle mit einer EC_{50} von ca. 50 μ M. Bei höheren Konzentrationen (> 100 μ M) überwiegt dann wieder, ähnlich wie in Abwesenheit von Mg^{2+} , die hemmende Wirkung. GDP und UDP verhalten sich grundsätzlich ähnlich, wobei auch hier (wie bei UTP) die hemmende Wirkung von MgUDP nur sehr gering ist (Lederer und Nichols, 1989). Mit analogen Experimenten wie oben (Alleinexpression der Kanaluntereinheiten und $K_{IR}6.2$ / SUR-Varianten, die (Mg)NDP unempfindlich sind) konnte gezeigt werden, dass für die Aktivierung die intakten NBFs der SUR-Untereinheit notwendig sind, während ATP für die Hemmung des Kanals $K_{IR}6.2$ ansetzen (Baukrowitz und Fakler, 2000).

In seinem Verhalten deutlich abweichend verhält sich der K_{ATP} -Kanal in glatten Gefäßmuskelnzellen, $K_{IR}6.1/SUR2B$. Im Gegensatz zu $K_{IR}6.2$ - K_{ATP} -Kanälen ist er in Abwesenheit von Mg-Nucleosiden völlig inaktiv. Nucleosiddiphosphate aktivieren wesentlich stärker als Nucleosidtriphosphate (Yamada et al., 1997, Satoh et al., 1998). Diese Kanäle wurden deshalb auch als K_{NDP} -Kanäle bezeichnet (Beech et al., 1993). Höhere Konzentrationen der Nucleotide (vor allem ATP und GTP) haben (analog zu $K_{IR}6.2$) dann wieder eine hemmende Wirkung (Yamada et al., 1997, Satoh et al., 1998). Obwohl hier keine detaillierten Untersuchungen vorliegen, kann aus den Parallelen mit $K_{IR}6.2$ - K_{ATP} -Kanälen angenommen werden, dass auch hier die Aktivierung durch den SUR vermittelt wird, während Nucleotide für die Hemmung an der K_{IR} -Untereinheit ansetzen.

1.2.3.2 Rundown und Refreshment bei K_{ATP} -Kanälen

K_{ATP} -Kanäle haben die Eigenschaft, mit zunehmender Zeit in extrazellulärer Lösung ihre Kanalaktivität zu verlieren (Ashcroft und Ashcroft, 1990), was z.B. an einer Abnahme des Stroms in elektrophysiologischen Experimenten zu sehen ist. Dieser Vorgang, der als Rundown

bezeichnet wird, kann in einen reversiblen und irreversiblen Rundown unterteilt werden (Ribalet et al., 2000). Die Geschwindigkeit, mit der der Rundown einsetzt und anhält, ist unter anderem abhängig von zweiwertigen Ionen. In Abwesenheit von Ca^{2+} und Mg^{2+} wird nur ein geringer Rundown beobachtet, wohingegen freie Mg^{2+} und Ca^{2+} -Ionen beim K_{ATP} -Kanal einen deutlichen Rundown bewirken. Durch MgATP kann die reversible Komponente des Rundowns beseitigt werden; dieser Vorgang wird als Refreshment bezeichnet (Okuyama et al., 1998). Unter Refreshment versteht man eine Erhöhung des Stroms über den Wert direkt vor der MgATP Gabe nach Auswaschen des Nukleotids. In magnesiumfreier Lösung ist der Rundown und das Refreshment sehr stark verlangsamt bis nicht vorhanden. Der molekulare Mechanismus des Rundown ist noch nicht in allen Teilen vollständig geklärt worden. Neben MgATP bzw. Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen scheinen auch (Membran)lipide (OleoylCoA, PIP_2) eine Rolle zu spielen (Liu et al., 2001, Baukrowitz et al., 1998, Ashcroft, 1998).

1.2.3.3 Regulation der K_{ATP} -Kanäle durch (Phospho)-Lipide

Phosphatidylinositole aktivieren durch die Steigerung der Offenwahrscheinlichkeit K_{IR} -Kanäle (Hilgemann und Ball, 1996, Fan und Makielski, 1997). Entsprechendes konnte auch für K_{ATP} -Kanäle gezeigt werden (Fan und Makielski, 1997, Baukrowitz et al., 1998, Shyng und Nichols, 1998). Phosphatidylinositolphosphate entstehen in der Zellmembran durch Veresterung von Glycerol mit Insosit und Fettsäuren (z.B. C16:0, C16:1, C18:1....) und Phosphorylierung durch Phosphorsäure vermittelt durch die PI-3- und/oder PI-4-Kinase (Abb. 7). Aus PI wird durch Phosphorylierung PI-4-P mit nachfolgender Übertragung von Phosphat durch die PIP-Kinase zu PI-4,5- P_2 (= PIP_2). Die PI-3 Kinase phosphoryliert PI, PI-4-P, PI-4,5- P_2 und PI-1,4,5- P_3 . PIP_2 kann durch die Phospholipase C hydrolysiert werden, wodurch die second Messenger IP_3 und DAG gebildet werden (Abb. 7).

In kardialen K_{ATP} -Kanälen führt die Applikation von PIP_2 zu einer Zunahme der Offenwahrscheinlichkeit und einer Abnahme der ATP Empfindlichkeit (Baukrowitz et al., 1998, Shyng und Nichols, 1998). Die Wirkung von Pharmaka wird durch eine PIP_2 Applikation verringert, wobei mit zunehmender PIP_2 Applikationsdauer der Effekt größer wird. Die am SUR bindenden Substanzen können nicht mehr den $\text{K}_{\text{IR}}6.2$ steuern (blockieren bzw. aktivieren), so dass man von einem vom SUR entkoppelten $\text{K}_{\text{IR}}6.2$ sprechen kann. Polykationen können den PIP_2 -Effekt für ATP, nicht aber für Kaliumkanalöffner und Blocker aufheben (Krauter et al.,

2001). Werden die PI-3- und PI-4-Kinasen durch spezifische Blocker (Wortmannin, LY-294002 (Abb. 7)) gehemmt, so sinkt die PI-4-P und damit auch die PI-4,5-P₂ Konzentration. Dadurch nimmt die Empfindlichkeit der K_{ATP}-Kanäle für ATP zu (Song und Ashcroft, 2001a, Xie et al., 1999).

Langkettige Acyl Coenzym A Ester (z.B. OleoylCoA (C18:1); Formel s. Abb. 7) sind potente Aktivatoren des K_{ATP}-Kanals. Sie erhöhen wie die Phospholipide bei K_{ATP}-Kanälen die Offenwahrscheinlichkeit und reduzieren die ATP- und Glibenclamid-Empfindlichkeit (Schulze et al., 2003, Larsson et al., 1996, Liu et al., 2001). Es wurde berichtet, dass die Modulation der ATP-Empfindlichkeit bei SUR1- und SUR2A-Kanälen ähnlich ist (Schulze et al., 2003) oder dass die SUR-Subtypen sich hier unterscheiden, wobei beim SUR1 eine größere Wirkung als beim SUR2A gesehen wird (Liu et al., 2001). Diese Aktivierung kann bei K_{IR}6.2 C36- (Gribble et al., 1998b) und auch bei K_{IR}6.2 C26-Kanälen jeweils ohne SUR1 (Bränström et al., 1998) genauso wie bei Wildtyp (K_{IR}6.2/SUR1)-Kanälen gesehen werden (Bränström et al., 1998). Auf Grund von diesen Ergebnissen kann davon ausgegangen werden, dass OleylCoA am K_{IR}6.2 ansetzt und so seine Wirkung vermittelt. Gribble et al., 1998b, postulieren eine unterschiedliche Empfindlichkeit für OleylCoA bei K_{IR}6.2/SUR1- und K_{IR}6.2/SUR2-Kanälen während Schulze et al., 2003, für beide Kanaltypen eine nahezu identische Empfindlichkeit beschreiben. Der Einfluss von langkettigen Acyl-Coenzym A Estern in Gegenwart von Kaliumkanalöffnern wurde noch nicht untersucht. Es ist umstritten, ob OleylCoA und PIP₂ den K_{ATP}-Kanal über die gleichen Mechanismen regulieren. Bei K_{IR}6.2/SUR2A-Kanälen wird von Liu et al., 2001, ein unterschiedlicher Mechanismus für OleylCoA und PIP₂ beschrieben; demnach ist die OleylCoA-Wirkung abhängig von Zellmetabolismus während für PIP₂ ein elektrostatischer Mechanismus angenommen wird. Für die beiden Phospholipide OleylCoA und PIP₂ werden von Schulze et al., 2003, und Rohács et al., 2003, ein gleicher (elektrostatischer) Mechanismus für K_{IR}6.2/SUR1- und K_{IR}6.2/SUR2A-Kanäle angenommen.

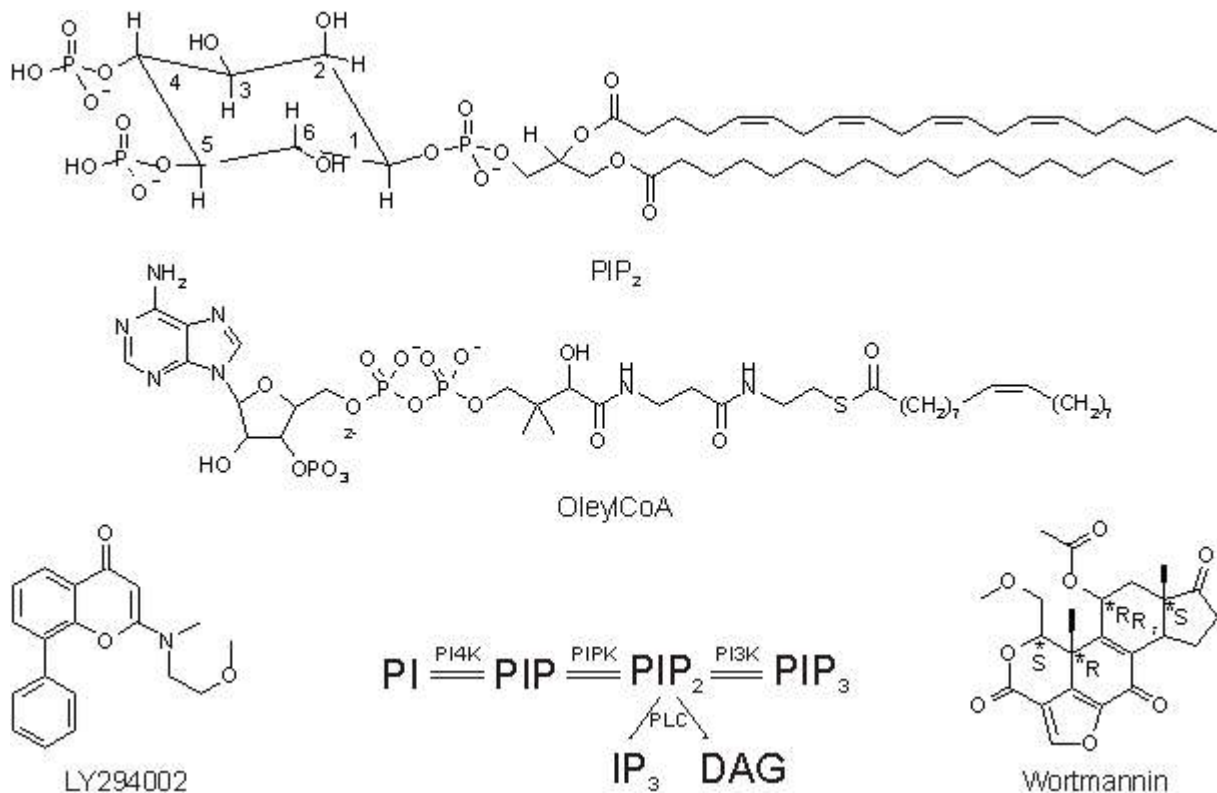


Abb. 7 Strukturformeln von PIP_2 , $OleylCoA$, $LY294002$ und $Wortmannin$ und schematisches Diagramm des Phosphatidylinositolmechanismus

PI-4,5-P₂-Formel: Nummern der C-Atome geben die Position der (potentiellen) Phosphorylierungsstellen an. **$OleylCoA$** ist ein (Phospholipid); **$LY294002$** und **$Wortmannin$** sind PI3- und PI4-Kinaseinhibitoren. **Phosphatidylinositolmechanismus:** PI, Phosphatidylinositol. PIP (PI-4-P), Phosphatidylinositol-4-monophosphat. PIP_2 (PI-4,5-P), Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat. PIP_3 (PI-1,4,5-P₃), Phosphatidylinositol-1,4,5-trisphosphat. IP_3 , Inositol-1,4,5-trisphosphat. DAG, Diacylglycerol. PI4K, PI 4-Kinase. PI3K, PI 3-Kinase. PIPK, PIP-Kinase. PLC, Phospholipase C.

1.2.3.4 Regulation durch Phosphorylierung und G-Proteine

Die Aktivität der K_{ATP} -Kanäle wird durch eine Reihe weiterer intrazellulärer Faktoren moduliert. Zu diesen verschiedenen Faktoren gehören die Proteinkinase A (PKA) und trimere GTP-Bindungs-Proteine (G-Proteine).

Proteinkinase A stimuliert die Aktivität der K_{ATP} -Kanäle in nativem Gewebe (Ribalet et al., 2000, Quayle und Standen, 1994, Wellman et al., 1998). Phosphorylierungsstellen sind sowohl am $K_{IR}6.x$ als auch den verschiedenen SUR- Subtypen vorhanden (Seino, 1999). Die PKA-Phosphorylierung am $K_{IR}6.2$ ist für die Steigerung der Kanalaktivität verantwortlich und kann über G_s -koppelnde Rezeptoren vermittelt werden. Beim SUR1 ist die PKA am grundlegenden Zustand der Kanalwirkung beteiligt (Seino, 1999).

Trimere GTP-Bindungs-Proteine können auch direkt die Aktivität von K_{ATP} -Kanälen

beeinflussen (Seino und Miki, 2003). Während G_{i1} $K_{IR}6.2/SUR2A$ - und $K_{IR}6.2/SUR1$ - Kanäle stimuliert, stimuliert G_{i2} $K_{IR}6.2/SUR2A$ -Kanäle aber keine $K_{IR}6.2/SUR1$ -Kanäle. Obwohl die G_{i1} Untereinheit keinen Effekt auf die Offenwahrscheinlichkeit der $K_{IR}6.2/SUR1$ - Kanäle hat (Sánchez et al., 1998), verursachen sie eine Reduktion der ATP induzierten Hemmung der $K_{IR}6.2/SURx$ -Kanäle durch die Reduktion der ATP-Empfindlichkeit (Wada et al., 2000).

1.2.4 Pharmakologie der K_{ATP} -Kanäle

Die pharmakologische Charakterisierung von Ionen-Kanälen, hier speziell K_{ATP} -Kanälen, kann auf einfache Weise beschrieben werden: Zum einen können die geschlossenen Kanäle durch eine Klasse von Modulatoren, die Öffner (z.B. Cyanoguanidine, Benzopyrane) geöffnet und durch eine andere Klasse von Substanzen (z.B. Sulfonylharnstoffe, Glinide) geschlossen werden. Da die K_{ATP} -Kanäle in verschiedenen Geweben und Organen eine wichtige physiologische und/oder pathophysiologische Rolle spielen (Kap. 1.2.2), haben gewebspezifische K_{ATP} -Kanalmodulatoren (Öffner/Schließer) ein großes therapeutisches Potential.

1.2.4.1 K_{ATP} -Kanalöffner

Die K_{ATP} -Kanalöffner besitzen die Eigenschaft, einen durch MgATP geschlossenen K_{ATP} -Kanal zu öffnen. Auf Grund ihrer chemischen Strukturen kann man sie in unterschiedliche Gruppen einteilen. Typische Vertreter dieser Stoffgruppe sind die Cyanoguanidine und Benzopyrane. Zu den Cyanoguanidinen gehören neben Pinacidil auch P1075 und PNU-96179. Pinacidil, der bekannteste Vertreter aus dieser Klasse, wird als Racemat eingesetzt, wobei beide Enantiomere K_{ATP} -Kanäle öffnen können. Das (*R*)-Enantiomer ist jedoch 8 bis 24 mal wirksamer als das (*S*)-Enantiomer (Quast et al., 1993). Zur Gruppe der Benzopyrane gehören Cromakalim (mit dem wirksamen Enantiomer Levromakalim) (Quast und Villhauer, 1993) und Rilmakalim (Terzic et al., 1994).

Als „untypische“ K_{ATP} -Kanalöffner werden das Benzothiadiazinderivat Diazoxid (Quast und Cook, 1989a), das Pyrimidinderivat Minoxidil (Quast et al., 1993) und das Pyridinderivat Nicorandil (Furukawa et al., 1981) betrachtet, die zur Gruppe von K_{ATP} -Kanalöffnern der ersten Generation gehören (Mannhold, 2004). Alle K_{ATP} -Kanalöffner sind Vasodilatoren. Diazoxid stellt die Ausnahme bei den K_{ATP} -Kanalöffnern dar. Es kann als einziger Öffner mit

vergleichbaren Konzentrationen K_{ATP} -Kanäle im Pankreas und im Gefäß öffnen (Quast und Cook, 1989a, Pirotte et al., 1993, Khelili et al., 1999). Die übrigen K_{ATP} -Kanalöffner haben am Pankreas eine sehr viel schwächere Wirkung als am kardiovaskulären System (Seino, 2003).

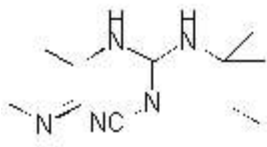
Alle bisher besprochenen K_{ATP} -Kanalöffner werden als Modellsubstanzen bei der Öffnung von kardiovaskulären K_{ATP} -Kanälen in vitro Versuchen verwendet.

Die K_{ATP} -Kanal Öffnung bewirkt eine Hyperpolarisation der Plasmamembran und einer Reduktion der elektrischen und mechanischen Aktivität (Hamilton et al., 1986, Ashcroft und Gribble, 2000), vorzugsweise im glatten Muskel. Klinisch finden Diazoxid und Minoxidil (inaktive Vorstufe, die im Körper zum aktiven Minoxidilsulfat sulfatiert wird) bei der Behandlung der Hypertensiven Krise Verwendung. Da Diazoxid auch den pankreatischen K_{ATP} -Kanal öffnet, kann es bei der Behandlung von Kreislauferkrankungen zu einer unerwünschten Hypoglykämie kommen; andererseits ist es geeignet für die Behandlung von PHHI (vgl. 1.2.2.1). Minoxidil wird auch als Haarwuchsmittel bei androgenetischer Alopezie verwendet (Fenton und Wilkinson, 1983). Nicorandil besitzt neben der Fähigkeit K_{ATP} -Kanäle zu öffnen, auch die Eigenschaft, die Guanylatcyclase zu aktivieren (NO-Donor), wodurch es über einen zusätzlichen Mechanismus zu einer Erschlaffung der glatten Muskulatur kommt (Edwards und Weston, 1995). Therapeutisch wird Nicorandil im benachbarten Ausland bei der Behandlung von Angina Pectoris eingesetzt. In der IONA-Studie konnte Nicorandil einen von der NO-Freisetzung unabhängigen vasodilatatorischen Effekt zeigen (Lesnefsky, 2002, The IONA Study Group, 2002).

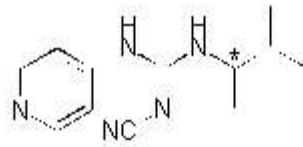
Vor Kurzem wurden die tertiären Carbinole (z.B ZD-6169) und Dihydropyridinderivate (z.B. A312110) als Kaliumkanalöffner entdeckt. Von den Dihydropyridinen existieren Verbindungen, die K_{ATP} -Kanäle öffnen, aber auch schließen können (Gopalakrishnan et al., 2002, Gopalakrishnan et al., 2003b).

Die selektive Öffnung von K_{ATP} -Kanälen in einer Vielzahl von nichtvaskulären glattmuskulären Geweben wie dem Vas deferens, dem Uterus, der Harnblase, der Trachea und dem Intestinum (Eda et al., 1994) bieten interessante therapeutische Anwendungen (Lawson, 1996, Gopalakrishnan et al., 2002). Intensiv werden K_{ATP} -Kanalöffner bei neuen Indikationen wie Asthma und Inkontinenz erforscht (Raeburn und Karlsson, 1991), aber auch ein Einsatz zur Kardioprotektion (s.o.), oder zum Schutz der β -Zellen beim Diabetes Mellitus Typ 2 wird diskutiert (Ritzel et al., 2004).

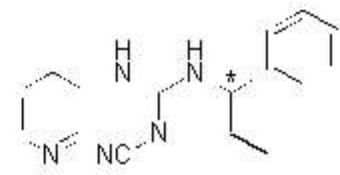
Cyanoguanidine



P1075

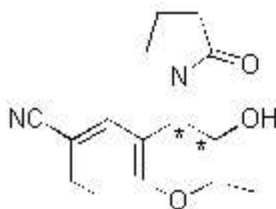


Pinacidil



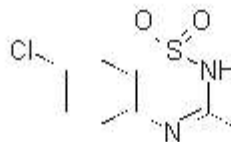
PNU-94750
(Racemat)
PNU-96179 / PNU-96293
(-Enantiomer / +Enantiomer)

Benzopyran



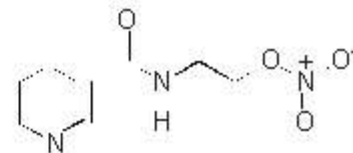
Cromakalim

Benzothiadiazin



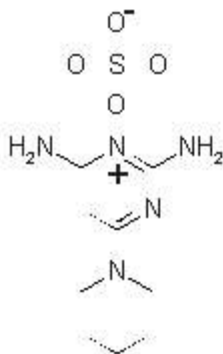
Diazoxid

Pyridin



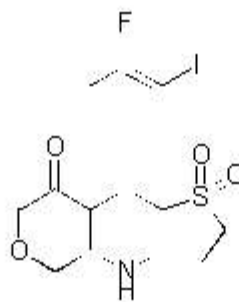
Nicorandil

Pyrimidin



Minoxidilsulfat

Dihydropyridin



A312110

Abb. 8 Strukturformeln von K_{ATP} -Kanalöffnern (Ausnahme PNU-96293)

1.2.4.2 K_{ATP} -Kanalschließer

Die Sulfonylharnstoffe wurden zufällig entdeckt. Vor 60 Jahren behandelte Janbon drei Patienten, die an Typhus erkrankt waren, mit einem Sulfonamid (2254 RP); alle Patienten starben an einer schweren Hypoglykämie. Danach leistete Loubatières die grundlegenden Arbeit

für die Behandlung des Diabetes, indem er im Tierversuch bei Hunden durch die Gabe des Sulfonamids 2254 RP die Insulinsekretion stimulieren konnte. 2254 RP wurde niemals für die Behandlung des Diabetes verwendet, aus ihm wurde die erste Generation der Sulfonylharnstoffe (Tolbutamid) entwickelt (Loubatieres, 1957). Zu den ersten in der Therapie eingesetzten Sulfonylharnstoffen gehörte Tolbutamid (1955) (Cook und Hales, 1984). Das langkettige Glibenclamid, der erste Sulfonylharnstoff der zweiten Generation, wurde 1969 in die Therapie eingeführt.

Auf Grund von Struktur-Wirkungsbeziehungen stellten Rufer und Losert, 1979, die Hypothese auf, dass Tolbutamid und Glibenclamid über ihre Sulfonylharnstoffgruppe mit dem Rezeptor an einer A Seite bindet. Die Sulfonylharnstoffgruppe ist nicht unbedingt für die hypoglykämische Aktivität nötig, wie das Beispiel Meglitinid zeigt (Meyer et al., 1999). An der A Seite muss lediglich der aromatische Ring der Phenylethylgruppe entsprechend mit einer sauren Gruppe (z.B. Sulfonylharnstoff-, Carboxylgruppe, ...), die bei physiologischen pH-Werten deprotoniert vorliegen, substituiert sein (Brown und Foubister, 1984). Die negative Ladung ist für die Interaktion mit dem Rezeptor nötig (Abb. 9). Sulfonylharnstoffe der zweiten Generation, z.B. Glibenclamid, binden über die Amidgruppe an einer (zweiten) B Seite. Brown und Foubister, 1984, fanden heraus, dass für eine hypoglykämische Wirksamkeit zwischen der A und B Seite ein definierter Abstand (zwei Kohlenstoffatome) eingehalten werden muss.

Um die Wirkung dieser Substanzen zu erklären postulierte Meyer et al., 1999, dass bis zu drei (lipophile) Bereiche für die Interaktion von SUR und Blockern notwendig sind, um den K_{ATP} -Kanal zu schließen. Am Beispiel von der Modellsubstanz Glibenclamid, das diese drei lipophilen Bereiche beinhaltet, soll die Hypothese erläutert werden. Abb. 9 zeigt, dass in der Mitte des Moleküls ein Benzolring ist, der das (lipophile) Zentrum darstellt. Auf der einen Seite des Benzolrings folgt die Sulfonylharnstoffgruppe mit ihrer negativer Ladung, an die ein zweiter lipophiler Rest (Cyclohexyl-Rest) ankonjugiert ist. Auf der anderen Seite des Benzolrings (para von dem ersten Rest) des Sulphonylharnstoffs sitzt an einer Seitenkette (2 C-Atome) ein (lipophiler) Benzamido-Rest. Ausgehend von diesen Beobachtungen kann man die unterschiedlichen Substanzen in A (z.B. Tolbutamid, Glibornurid) sowie in gemischte (A und B) Liganden (z.B. Glibenclamid, Glimepirid) einteilen. Meglitinid, als „linke Hälfte“ von Glibenclamid, trägt die negative Ladung nicht auf der Sulfonylharnstoff-, sondern auf einer Carbonylgruppe (Meyer et al., 1999). Trotz dieser Verkürzung wird der Insulinspiegel durch Meglitinid angehoben.

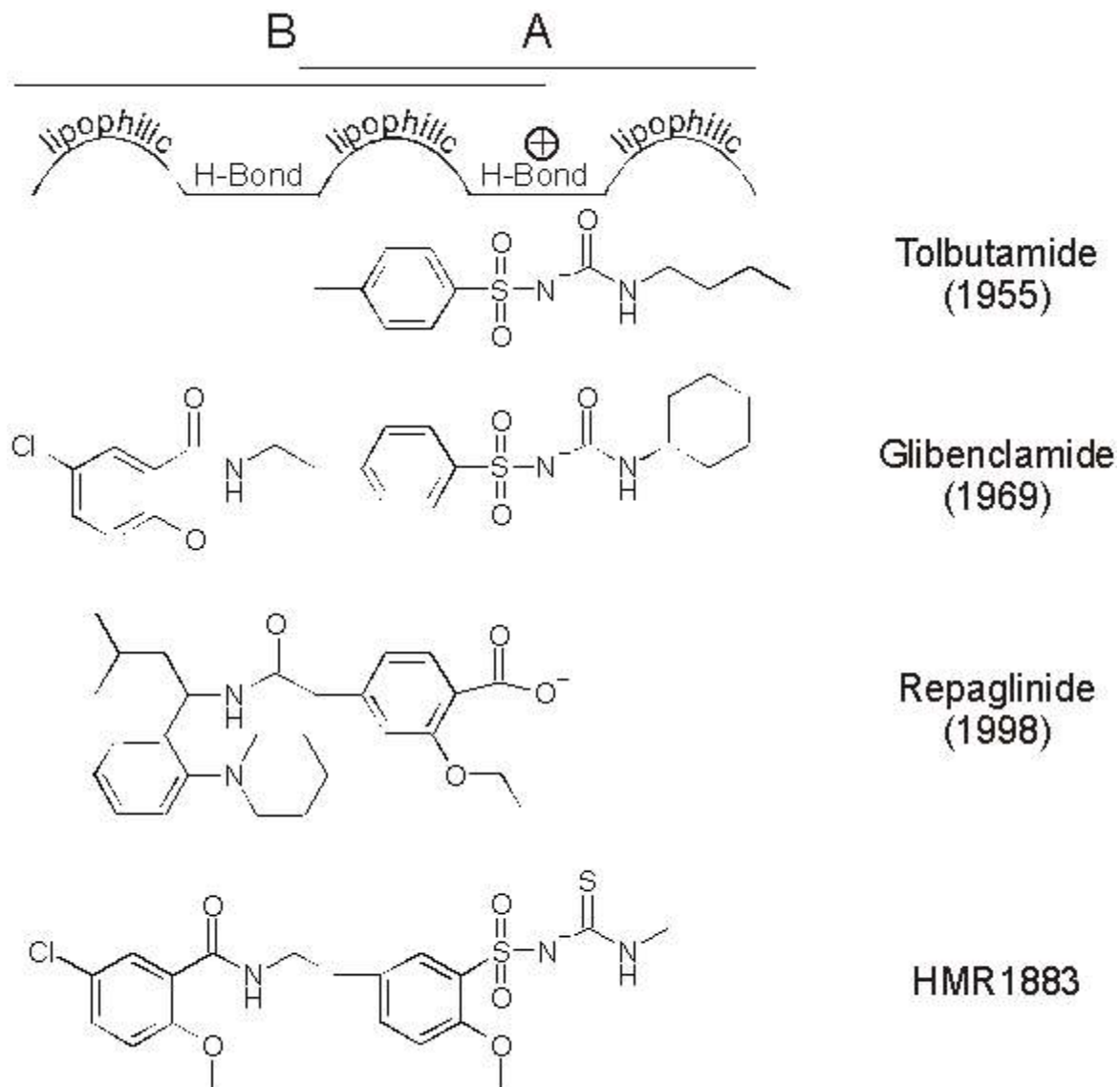


Abb. 9 Strukturformeln von K_{ATP} -Kanalblockern

K_{ATP} -Kanalblocker verfügen über eine zentrale lipophile Bindungsstelle (Benzolring), von dem rechts eine funktionelle Gruppe mit negativer Ladung (NH-acide Verbindung: z.B. Sulfonylharnstoffgruppe) mit ankonjugiertem lipophilen Rest (lipophile Tasche) abgeht. Auf der linken Seite ist über eine Ethyl-Gruppe (= notwendiger Abstand bei SU), die an eine Amidgruppe gebunden ist, eine substituierte lipophile Gruppe gebunden.

Auch die Substanzen der neuesten Gruppe der insulinsteigernden Antidiabetika, die Glinide Repaglinid, Nateglinid und Mitiglinid wirken nach dem oben genannten Schema über den SUR. Glinide enthalten keine Sulfonylharnstoffgruppe und sind eine heterologe Gruppe (Hansen et al., 2002). Sie enthalten zwei lipophile Gruppen und binden somit als reine A Liganden (Nateglinid, Mitiglinid) oder B Liganden (Repaglinid, Meglitinid). Glinide besitzen im Gegensatz zu Sulfonylharnstoffen eine geringe Halbwertszeit (2-4 Stunden) und sind demnach kurzwirksame Antidiabetika.

Die Bindungsstellen für Sulfonylharnstoffe (bzw. andere Blocker) des K_{ATP} -Kanals sind

ebenfalls mit Hilfe von Bindungsstudien und Chimärenmodellen untersucht worden. Die Wirkung für Sulfonylharnstoffe ist beim SUR1 höher als beim SUR2. Vergleicht man die Aminosäuresequenzen von SUR1 und SUR2, so findet man beim SUR1 zwischen der TMS 15 und 16 an der Position 1237 ein Serin und an äquivalenter Stelle am SUR2 (1206) ein Tyrosin. Tauscht man diese beiden Aminosäuren gegeneinander aus (SUR1: S1237Y und beim SUR2: Y1206S), so findet man beim SUR1 eine Abnahme und beim SUR2 eine Zunahme der Empfindlichkeit für Glibenclamid (Ashfield et al., 1999, Hambrock et al., 2002a). Diese Verminderung (SUR1) bzw. Steigerung (SUR2) der Empfindlichkeit für Sulfonylharnstoffe ist bei dem Glinid Metiglinid nicht vorhanden (Ashfield et al., 1999). A Liganden sind für $K_{IR}6.2/SUR1$ selektiv, bei B Liganden ist diese Tendenz nicht zu beobachten (Hu et al., 2001, Hansen et al., 2002).

Während allerdings in der Regel die Wirkung von Kaliumkanalöffnern bei SUR2-Kanälen besser ist als beim SUR1, ist das Verhältnis bei der Blockade vertauscht; Sulfonylharnstoffe und Glinide wirken typischerweise besser beim SUR1 als bei den SUR2-Typen. Die K_{ATP} -Kanal-Selektivität für die verschiedenen SUR Untereinheiten wurde bei verschiedenen Substanzen untersucht. Während die IC_{50} von Tolbutamid im mikromolaren Bereich liegt, liegt die von Glibenclamid in nanomolaren Bereich. So zeigt Glibenclamid im Inside-Out-Patch für den SUR1 0,13 nM, für SUR2A 45 nM und für SUR2B 42 nM (koexprimiert mit $K_{IR}6.2$ in COS Zellen) (Proks et al., 2002). In der Oozyte (Makropatche) wurden 4 nM und 27 nM ((SUR1, SUR2A) + $K_{IR}6.2$) erreicht (Übersicht in Proks et al., 2002). Bei den Gliniden gibt es zwei Gruppen. Nateglinid und Mitiglinid, beides A Liganden, sind für SUR1 tausendmal empfindlicher als für SUR2-Kanäle (Chachin et al., 2003, Reimann et al., 2001b). Die Benzoesäurederivate Repaglinid und Meglitinid, beides B Liganden, hemmen mit einer IC_{50} von 7,4 nM, 8,7 nM und 10,0 nM für SUR1, SUR2A und SUR2B und zeigen keine Prävalenz für einen Kanaltyp (untersucht in Inside-Out-Patch zusammen mit $K_{IR}6.2$).

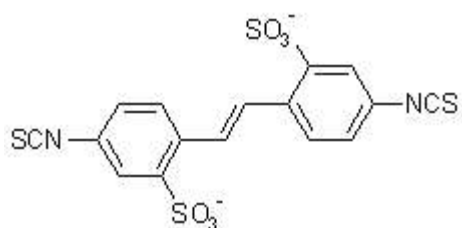
Neben den Sulfonylharnstoffen und Gliniden wurden Blocker auch mit anderen Leitstrukturen z.B. Cyanoguanidine (PNU-99963) oder Dihydropyridine (A184209)) entwickelt, die ebenso über den SUR den Kanal schließen. Sie haben jedoch bisher keine therapeutische Bedeutung. Weiterhin ist man auf der Suche nach dem SUR2-Subtyp bzw. Gewebe spezifischen K_{ATP} -Kanalblockern, um gezielt therapieren zu können und K_{ATP} -Kanalmodulatoren für neue Indikationen (z.B. Herz) zu finden.

1.2.4.3 HMR1883

HMR1883 ist ein Thiosulfonylharnstoff (Abb. 9) und hat eine ähnliche Struktur wie der Sulfonylharnstoff Glibenclamid. Im Unterschied zu Glibenclamid hemmt HMR1883 vor allem die kardialen K_{ATP} -Kanäle, während das von der Firma Aventis entwickelte HMR1883 (und auch sein Natriumsalz (HMR1098)), gezielt die K_{ATP} -Kanäle in den Herzmuskelzellen blockiert (Gögelein et al., 2000). Diese Charakteristik spiegelt sich auch in der Pharmakonbindung wieder (Russ et al., 2001). Mit dieser Substanz blieben die K_{ATP} -Kanäle geschlossen, die sich während einer Ischämie öffnen. Lange Zeit ist man davon ausgegangen, dass K_{ATP} -Kanäle während ihrer normalen Funktionen geschlossen bleiben, aber geöffnet werden, wenn die intrazelluläre ATP-Konzentration unter einen kritischen Wert absinkt. Eine Aktivierung von K_{ATP} -Kanälen kann durch metabolische Inhibierung beobachtet werden (Noma, 1983), was zu einer Aktionspotentialverkürzung führt und Reentry Arrhythmien auslösen und den plötzlichen Herztod hervorrufen kann (Gögelein, 2001). Darüber hinaus blockiert der kardioselektive Blocker HMR1883 bei einer Ischämie keine K_{ATP} -Kanäle in den Mitochondrien während $mitoK_{ATP}$ -Kanäle durch Glibenclamid gehemmt werden (Oldenburg et al., 2002). Es ist daher anzunehmen, dass HMR1883 die Peconditionierung nicht beeinflusst (Gross und Fryer, 1999).

1.2.4.4 DIDS - ein Stilben als K_{ATP} -Kanalmodulator

DIDS (4,4'-Diisothiocyano-2,2'-Disulfonsäure) gehört zur Gruppe der Stilbene.



DIDS

Das Stilben DIDS ist seit langem als Chlorid-Kanal-Blocker bekannt (Review in Jentsch et al., 2002). DIDS beeinflusst unter anderem den HCO_3^-/Cl Transporter, den Natrium-Protonen-Austauscher, und aktiviert KvLQT1 ($K_{V7.1/Isk}$) (Busch et al., 1994). DIDS ist zuerst von Furukawa et al., 1993, im Zusammenhang mit dem K_{ATP} -Kanal beschrieben worden und wurde von ihm an Kardiomyozyten untersucht. Proks et al., 2001, beschrieben eine Kanal hemmende Wirkung in Mg^{2+} freiem Medium. Diese Hemmung wird durch die Anwesenheit von Mg^{2+} verstärkt (Gojkovic-Bukarica et al., 2002c). Es gibt aber auch Hinweise auf eine Kanal

aktivierende Wirkung von niedrigen DIDS-Konzentrationen (Lange et al., 2003). Auch Bindungsergebnisse aus unserem Labor (unveröffentlichte Daten) deuten auf Ähnlichkeiten zwischen typischen Kaliumkanalöffnern und DIDS hin.

DIDS kann mit seiner Isothiocyanat (R-NCS)-Gruppe kovalent an Lysin oder Cystein binden (Gatto et al., 1997). Furukawa et al., 1993, untersuchte auch die Stilbene SITS, DADS und DNDS, die nur eine Isothiocyanat-Gruppe (SITS) oder keine (DADS, DNDS) enthalten und eine viel schwächere (SITS) oder keine (DADS, DNDS) Interaktion mit Cystein und Lysin zeigen. Proks et al., 2001, stellten die Hypothese auf, dass DIDS durch die kovalente Bindung mit seiner NCS-Gruppe mit dem K_{ATP} -Kanal den Kanal schließt. Die Hemmung des Kanals durch Stilbendisulfonate läuft wahrscheinlich in zwei Schritten ab: einer reversiblen Bindung der Substanz an den Kanal folgt eine kovalente Modifikation von Lysin oder Cystein-Resten in der Nähe der Bindungsstelle, die eine irreversible Anlagerung des Stilbendisulfonats zur Folge hat.

1.3 Grün fluoreszierendes Protein (GFP)

Das grün fluoreszierende Protein (GFP) war ein wichtiges Hilfsmittel bei der Identifizierung von transfizierten HEK293 Zellen. Die drei Plasmide (SUR + K_{IR6} + GFP) wurden gemischt und als Lipofektamingemisch dem Medium zugefügt, den die Zellen aufnehmen. Bei der Bildung der K_{ATP} -Kanal-Proteine wird auch das GFP-Protein expremiert. Im UV-Licht sind die Zellen, in denen die Proteine gebildet werden, als leuchtende Kugeln zu erkennen.

GFP wurde in der im Pazifik lebenden Qualle *Aequorea victoria* gefunden und besteht aus 238 Aminosäuren. Die Fluoreszenz des 27 kDa großen GFP ist tolerant gegenüber Hitze (bis 65°C) und Alkalien (pH 11) (Tsien, 1998). Chalfie et al., 1994, beschrieben zuerst, dass das Protein bei der rekombinanten Expression als biologische Sonde bei der Genexpression sowie der Proteinlokalisierung in lebenden Zellen verwendet werden kann. Dabei zeigt GFP in eukariotischen (und auch prokariotischen) Zellen

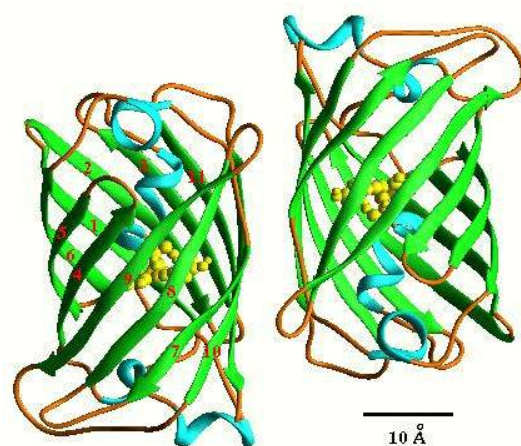


Abb. 11 Räumliche Struktur von GFP
Die β -Faltblätter umgeben die α -Helix, in dessen Zentrum das Chromophor liegt (aus Yang, Moss, et al., 1996).

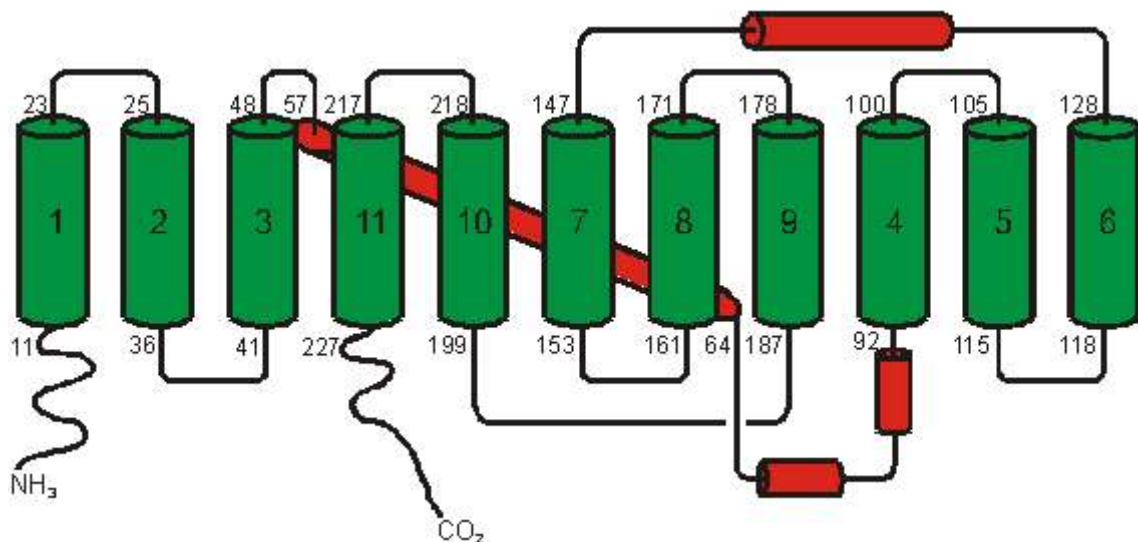


Abb. 12 Struktur des Green Fluorescence Protein (GFP)

GFP bildet eine zylindrische Struktur aus, in dessen Zentrum sich eine α -Helix (rot) findet, auf der das Chromophor liegt. Sie wird von elf β -Faltblättern umschlossen (grün). Die Zahlen geben die Aminosäuren am Anfang und am Ende eines Falts an. Ein verändertes Modell nach Yang, Moss, et al., 1996.

eine intensive grüne Fluoreszenz. Das Protein besitzt Anregungsmaxima bei 395 nm und 470 nm (blau), die Emission (grün) hat ein Hauptmaximum bei 509 nm und ein Nebenmaximum bei 540 nm (Chalfie, 1995). Diese Fluoreszenz entsteht durch ein Chromophor, das aus der Tripeptidsequenz Ser⁶⁵-Tyr⁶⁶-Gly⁶⁷ gebildet wird. Die Tripeptidsequenz liegt konserviert auf der α -Helix und unterbricht diese nahezu im geometrischen Zentrum. Die α -Helix wird von sechs polaren Aminosäuren und fünf Wassermolekülen sowie von zwei geladenen Seitenketten vom umgebenden Lösungsmittel vollständig abgeschirmt. Ein zylindrisches, elfsträngiges β -Faltblatt umwindet die im Zentrum liegende α -Helix (Abb. [12](#), [11](#)). Das Protein fluoresziert erst bei korrekter Faltung. Dabei wird durch einen nukleophilen Angriff des Amins vom Glycin (Gly⁶⁷) auf die Carbonylgruppe des Serin (Ser⁶⁵) eine Abspaltung von Wasser und eine Konjugation des aromatischen Systems an das gebildete p-Hydroxybenzyliden-imidazolinon durchgeführt. Durch Sauerstoff wird die C-C-Bindung vom Try⁶⁶ zu einem weit delokalisierten Pi-System oxidiert. (Abb. [13](#)) (Chalfie, 1995, Yang et al., 1996, Tsien, 1998).

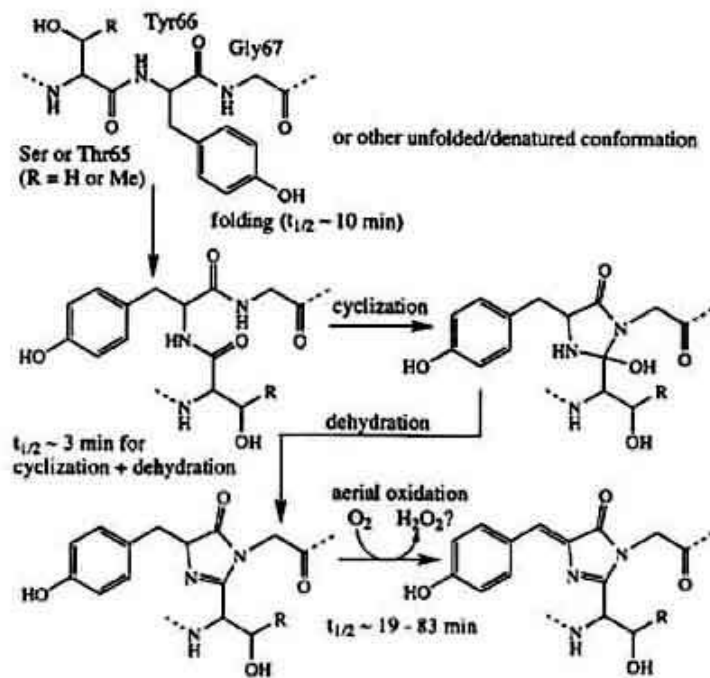


Abb. 13 Bildung des Chromophors durch Faltung des Proteins

Durch einen nukleophilen Angriff des Amins von Glycin (Gly⁶⁷) auf die Carbonylgruppe des Serin (Ser⁶⁵) wird eine Abspaltung von Wasser und eine Konjugation des aromatischen Systems an das gebildete p-Hydroxybenzyliden-imidazolinon durchgeführt. Durch Sauerstoff wird die C-C-Bindung vom Try⁶⁶ zu einem weit delokalisierten Pi-System oxidiert (aus Tsien, 1998).

1.4 Fragestellung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurden die rekombinanten K_{ATP} -Kanäle, $K_{IR}6.x/SUR2x$, in HEK293-Zellen exprimiert und deren pharmakologische Eigenschaften durch die Verwendung verschiedener schon länger bekannter und auch neuer Substanzen untersucht. Zu klären waren folgende Fragen:

1 Welche Wirkungen haben Nukleotide auf den kardialen K_{ATP} -Kanal?

Es stellt sich die Frage, mit welcher Affinität Nukleotide den $K_{IR}6.2/SUR2A$ -Kanal beeinflussen. Dazu wurden ATP und ADP getrennt in An- und Abwesenheit von Magnesium untersucht, wie auch die Mischungen von ATP/ADP bzw. ATP/UDP sowie Kombinationen von Nukleotiden mit dem K_{ATP} -Kanalblocker Glibenclamid.

2 Vergleich des Blocks von Glibenclamid und HMR1883 an $K_{IR}6.2/SUR2x$ Kanälen in Ganzzellmessungen und isolierten Membran-Patches.

An isolierten Geweben und im Tierversuch durchgeführte Experimente hatten gezeigt, dass der Thiosulfonylharnstoff HMR1883 ein von Glibenclamid abweichendes pharmakologisches Profil hat. Im Gegensatz zu Glibenclamid hemmt HMR1883 die pankreatischen K_{ATP} -Kanäle nur sehr schwach (Gögelein et al., 1999). HMR1883 ist als selektiver kardialer K_{ATP} -Kanalblocker bekannt und hemmt mit mikromolarer Potenz $K_{IR}6.2/SUR2A$ -Kanäle. Über die Interaktion von HMR1883 mit dem rekombinanten System ist bisher wenig bekannt. Deshalb wurde HMR1883 mit dem Standard K_{ATP} -Kanalblocker Glibenclamid verglichen und bei denselben Bedingungen, $K_{IR}6.2/SUR2A$ - und $K_{IR}6.2/SUR2B$ -Kanäle in der Inside-Out-Konfiguration und $K_{IR}6.1/SUR2B$ -Kanäle in der Ganzzellkonfiguration untersucht. Diese Ergebnisse sind in Russ et al., 2001, veröffentlicht.

3 Elektrophysiologische Charakterisierung der + und - Enantiomere von PNU-94750 an $K_{IR}6.2/SUR2$ -Kanälen.

Beim Ca^{2+} -Kanal wurden racemische Modulatoren gefunden, von denen ein Enantiomer den Kanal öffnet, während das andere ihn schließt (Khan et al., 1997). Bei den K_{ATP} -Kanälen beschreiben solche Enantiomere erstmals Khan et al., 1997. Sie charakterisieren Substanzen durch ihren vasodilatierenden Effekt. Eine dieser Substanzen ist das Cyanoguanidin PNU-94750 bzw. seine Enantiomere PNU-96179 und PNU-96293, jedoch treten in der Wirksamkeit des Enantiomers im Verhältnis zum Racemat Widersprüche auf. Wir haben aber mit Radioligandbindungsmessungen und elektrophysiologischen Experimenten im rekombinanten

System eine eindeutige Charakterisierung eines Enantiomernpaars (PNU-96179 und PNU-96293) vollzogen (Lange et al., 2002b).

4 Charakterisierung einer neuen K_{ATP} -Kanalöffner-Struktur am Beispiel des Dihydropyridins A312110 an $K_{IR}6.2/SUR2x$ Kanälen.

Substanzen mit einer Dihydropyridin Struktur sind seit langem als Calciumkanalblocker bekannt. In neuester Zeit wurden K_{ATP} -Kanal Modulatoren entwickelt, die eine Dihydropyridinstruktur aufweisen und entweder als Öffner oder Blocker von K_{ATP} -Kanälen wirken. Es sollte in isolierten Membran-Patches die Potenz des Dihydropyridinderivat A312110 als K_{ATP} -Kanalöffner an $K_{IR}6.2/SUR2A$ - und $K_{IR}6.2/SUR2B$ -Kanälen untersucht werden (Felsch et al., 2004).

5 Charakterisierung von K_{ATP} -Kanalöffnern in Abwesenheit von Mg^{2+}

Der Mechanismus, wie K_{ATP} -Kanalöffner den Kanal aktivieren ist noch weitgehend unverstanden. Im Allgemeinen wird aber angenommen, dass für ihre Wirkung MgATP notwendig ist (siehe z.B. Quast et al., 1993, Schwanstecher et al., 1998). Somit stellt sich die auch für den Mechanismus wichtige Frage, ob Kaliumkanalöffner verschiedener Strukturklassen auch in Abwesenheit von Magnesium K_{ATP} -Kanäle öffnen können.

6 Untersuchung und von DIDS als K_{ATP} -Kanalöffner am Beispiel des $K_{IR}6.2/SUR2B$.

Die K_{ATP} -Kanal hemmende Wirkung von DIDS ist seit langem aus der Literatur bekannt (Furukawa et al., 1993, Proks et al., 2001, Gojkovic-Bukarica et al., 2002c). Auf Grund von Radioligandbindungsstudien aus unserem Labor (unveröffentlichte Daten) ließen sich Ähnlichkeiten zwischen typischen Kaliumkanalöffnern (z.B. P1075, Rilmakalim,...) und DIDS finden. Wie bei den K_{ATP} -Kanalöffnern ist auch bei DIDS die Bindung am SUR2B positiv allosterisch an die MgATP-Bindung gekoppelt (Lange et al., 2003). In dieser Arbeit wird die öffnende Wirkung von DIDS an $K_{IR}6.2/SUR2B$ -Kanälen genauer untersucht.

2 Materialien

2.1 Verwendete Plasmide

Die verwendeten Klone stammen beim SUR1 aus der Ratte und wurden uns von Dr. C. Derst (Freiburg) zur Verfügung gestellt. Die SUR2 und K_{IR}6.x Klone sind aus der Maus und wurden uns von den Drs. Y. Krachi und Y. Horio (Osaka) überlassen. Die zugehörigen Genbanknummern der verwendeten Gene lauten: SUR1 (X97279), SUR2A (D86037), SUR2B (D86038), K_{IR}6.1 (D88159), K_{IR}6.2 (D50581). Diese Plasmide wurden verwendet um folgende Mutanten herzustellen: SUR2A(Y1206S), SUR2B(Y1206S), K_{IR}6.1 48, K_{IR}6.2 C26, K_{IR}6.2 C36. Diese Gene werden in den pcDNA3.1-Vektor (Invitrogen) eingebaut und zur Gewinnung kompetenter Bakterien (*Kap. 3.1.1*) und HEK293 Zellen (*Kap. 3.1.2.4*) verwendet. GFP wird in einen pEGFP-C1 Vektor eingebaut und zur Gewinnung von kompetenten Bakterien verwendet.

2.2 Verwendete Bakterien

Zur Transformation wurden kompetente Escherichia coli (E. coli) Bakterien (XL1 Blue MRF⁺ supercompetent cells (Stratagene); Max Efficiency DH 5 Competent Cells (Invitrogen)), die den Vektor (pcDNA3.1) enthielten, verwendet. Die Transformation der Bakterien führten Frau Dr. A. Hambrock und C. Müller (Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Tübingen) durch (Hambrock et al., 1998).

2.3 Verwendete Zellen

Die Experimente wurden ausschließlich mit HEK293 Zellen (**H**uman **E**mbyonal **K**idney Cells) (DSMZ, Braunschweig, Deutschland (Kat.-Nr. DSMACC305)) durchgeführt. Die HEK293 Zelllinie gewinnt man aus menschlichen embryonalen Nierenzellen, die durch den DNA haltigen Adenovirus Typ 5 tumorös transformiert und dadurch immortalisiert wurden. Die DNA zur Transfektion (*Kap. 3.1.2.4*) der HEK293 Zellen wurde aus E. coli gewonnen (*Kap. 3.1.1*). Transfektionen führten Frau Dr. A. Hambrock, Frau Müller und ich durch.

2.4 Geräte

2.4.1 Transformation / Transfektion von Zellen

Autoklav	2540 MK Tuttnauer, Wesel, D
Brutschrank	B5060EC/CO ₂ 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
Schüttelbrutschrank	TH 30 (Edmund Bühler) MS Laborgeräte Schroeder, Wiesloch bei Heidelberg, D
Stickstofftank	XLC 511-FD Chart Europe GmbH, Solingen, D
Wasserbad	W12 P-D Industriegesellschaft mbH, Dresden, D
Zentrifuge	Biofuge Primo, Heraeus Instruments GmbH, Osterode, D

2.4.2 Patch-clamp Mess-System

Elektrodenziehgerät	DMZ-Universalpuller, Zeitz-Instrumente, Augsburg, D
Elektroden Glas	GC150T-7.5 und GC150-7.5, Harvard Apparatus LTD, Edenbridge (Kent), GB
Mikromanipulator	*PatchMan, Eppendorf, Hamburg, D DC3K, Märzhäuser, Wetzlar, D
Mikroskop	*Axiovert 100, Zeiss, Stuttgart, D Nikon ECLIPSE TS 100, Düsseldorf, D
Filtersatz (für Fluoreszenz- anregung)	*Filtersatz 13, Zeiss Stuttgart, D B-2A, Nikon, Düsseldorf, D
Oszilloskop	*MH 205-3, HAMEG GmbH, Frankfurt a. M., D PM 3305 35 MHz, Koninklijke Philips Electronics, N.V, Eindhoven, NL
Software	*Pulse, HEKA Elektronik, Lamprecht/Pfalz, D Chart, ADInstruments, Castle Hill (NSW), AUS Clamfit, Axon Instruments, Union City, USA
Verstärker	*EPC 9, HEKA Elektronik, Lamprecht/Pfalz, D EPC10, HEKA Elektronik, Lamprecht/Pfalz, D GeneClamp 500, Axon Instruments, Union City, USA
AD-Wandler	*ITC-16 (EPC 9), InstruTECH, Port Washington (NY), USA ITC-1600 (EPC 10), InstruTECH, Port Washington (NY), USA MacLab/2e, ADInstruments, Castle Hill (NSW), AUS
Ventile / Spule des Perfusionssystem	Sirai S10407 / Z030A, Elettromeccanica S.r.l. Bussero (MI) Italien (0,76 mm ID; 1,65 mm OD; 0,4 mm))

*sind zu einem Messplatz gehörig; die ohne zu einem anderen

2.5 Chemikalien

Agar	ICN Biomedicals, Ohio, USA
Ampicillin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
CaCl ₂	Merck, Darmstadt, D
DMSO	Merck, Darmstadt, D
EDTA	Fluka, Buchs SG, CH
EGTA	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
EndoFree Plasmid MaxiKit	Qiagen, Hilden, D
Ethanol	Merck, Darmstadt, D
FKS	Invitrogen, Auckland, UK
Gentamicin	Invitrogen, Auckland, UK
Glukose	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Glycerin	Merck, Darmstadt, D
Hefeextrakt	ICN Biomedicals, Ohio, USA
HEPES	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Kanamycin	Invitrogen, Auckland, UK
KCl	Merck, Darmstadt, D
Lipofectamine	Invitrogen, Auckland, UK
MEM	Invitrogen, Auckland, UK
MgCl ₂	Merck, Darmstadt, D
NaCl	Merck, Darmstadt, D
NaOH	Merck, Darmstadt, D
Opti-MEM	Invitrogen, Auckland, UK
Trypton (Pepton)	Invitrogen, Auckland, UK

2.6 Lösungen und Medien

Puffer und Medien lagerten im Kühlschrank bei 4-8°C. Stammlösungen wurden im Eisfach bei -18°C aufbewahrt. Alle Lösungen sind bei Raumtemperatur (21-27°C) unter Rühren hergestellt worden. Die Puffer wurden mit A. dest bis auf ~90% aufgefüllt und nach der pH Einstellung bis auf das Endvolumen ergänzt. Dabei änderte sich der pH Wert nicht.

2.6.1 Medien zur Kultivierung von Bakterien

2.6.1.1 Medium zur Kultivierung von transformierten Bakterien

Luria Bertani Medium: LB-Medium

Trypton (Pepton)	6 g
Hefeextrakt	3 g
NaCl	3 g
H ₂ O	ad 600 g

Das Medium wird mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt und autoklaviert.

Medium zur Kultivierung von transformierten E.Coli

LB-Medium	150 ml
Antibiotikum (s.u.)	150 µl
E.coli-Stammlösung	150 µl

Antibiotika-Zusätze zur Kultivierung von E.Coli

Kanamycin (GFP)	30 µg/ml
Ampicillin (SUR, K _{IR})	100 µg/ml

Die Stammlösungen der Antibiotika wurden in A. dest hergestellt. Je nach Plasmid sind 1:1000 [V/V] der Antibiotikastammlösungen dem LB-Medium zugesetzt worden. Kanamycin wurde zur Selektion von GFP, Ampicillin zur Selektion von SUR und K_{IR}6.x verwendet.

Medium zur Lagerung von transformierten Bakterien

Bakteriensuspension in LB-Medium	850 µl
Glycerin	150 µl

2.6.1.2 Puffer zur Gewinnung der Plasmid DNA aus transformierten E. Coli

Qiagen EndoFree Plasmid MaxiKit Catalog No.: 12362

Puffer P1:

Zusammensetzung	Konzentration
Tris	50 mM
EDTA	10 mM
RNase A	100 µg/ml
P1 ist auf pH 8.0 eingestellt	

Puffer P2:

Zusammensetzung	Konzentration
NaOH	200 mM
SDS	1 %

Puffer P3:

Zusammensetzung	Konzentration
K-Acetat	3 M
P3 ist auf pH 5.5 eingestellt	

Puffer QBT:

Zusammensetzung	Konzentration
NaCl	750 mM
MOPS	50 mM
Isopropanol	15 %
Triton X-100	0,15 %
QBT ist auf pH 7,0 eingestellt	

Puffer QC;

Zusammensetzung	Konzentration
NaCl	1,0 M
MOPS	50 mM
Isopropanol	15 %
QC ist auf pH 7,0 eingestellt	

Puffer QN:

Zusammensetzung	Konzentration
NaCl	1,6 M
MOPS	50 mM
Isopropanol	15 %
QN ist auf pH 7,0 eingestellt	

Puffer ER:

Der Puffer ER wurde nach einem patentierten Verfahren von Qiagen hergestellt und dient dazu, Endotoxine, die eine ähnliche Struktur wie die Plasmide haben, aus der Lösung zu entfernen.

2.6.2 Medien zur Kultivierung von Zellen

2.6.2.1 Minimum Essential Medium (MEM)

Im Minimum Essential Medium (MEM) befinden sich neben anorganischen Salzen Glukose, Aminosäuren, Vitamine und ein Indikator.

CaCl ₂ * 2H ₂ O	264 mg/l
KCl	400 mg/l
MgSO ₄ + 7H ₂ O	200 mg/l
NaCl	6800 mg/l
NaHCO ₃	2200 mg/l
NaH ₂ PO ₄ * 2 H ₂ O	158 mg/l
D-Glukose	1000 mg/l
Phenolrot	10 mg/l
L-Arginin * HCl	126 mg/l

L-Cystein	24 mg/l
L-Glutamin	292 mg/l
L-Histidin HCl +H ₂ O	42 mg/l
L-Isoleucin	52 mg/l
L-Leucin	52 mg/l
L-Lysin * H ₂ O	73 mg/l
L-Methionin	15 mg/l
L-Phenylalanin	32 mg/l
L-Threonin	48 mg/l
L-Tryptophan	10 mg/l
L-Tyrosin	36 mg/l
L-Valin	46 mg/l
D-Ca-Panθοthenat	1 mg/l
Cholinchlorid	1 mg/l
Folsäure	1 mg/l
i-Inositol	2 mg/l
Niacinamid	1 mg/l
Pyridoxal	1 mg/l
Riboflavin	0,1 mg/l
Thiamin	1 mg/l

2.6.2.2 **Hitzeinaktiviertes fötales Kälber-Serum (FKS): Serumzusatz zum Zellkulturmedium**

Um eine Restaktivität von Serumproteasen auszuschließen, wurde fötales **Kälber-Serum** (FKS) vor der Verwendung für 90 Minuten im Wasserbad bei 55°C hitzeinaktiviert und ausschließlich in dieser Form verwendet. Das fötale Kälberserum enthält zum Wachstum der Zellen erforderliche mitogene Faktoren, welches dem MEM zugesetzt wurde. Zur weiteren Verwendung wurde das FKS im Kühlschrank gelagert.

2.6.2.3 Medium zur Kultivierung von Zellen

Zellkultur Standard Medium: (ZSM)

MEM	500 ml
FKS	56 ml
Gentamicin [2 mg/ml]	5,6 ml

MEM, FKS und die aufgetaute Gentamicinstammlösung [2 mg/ml] sind im Laminar Flow zusammenpipetiert und zur weiteren Verwendung im Kühlschrank [4-8°C] gelagert worden. Vor der Zugabe von ZSM zu den Zellen, wurde es auf 37°C erwärmt. Zur Herstellung der Gentamicinstammlösung wurde Gentamicin in sterilisiertem A. dest [2 mg/ml] gelöst und bei -20°C in 6 ml Aliquots aufbewahrt (Endkonzentration $c = 20 \mu\text{g/ml}$).

2.6.2.4 Medium zum Einfrieren von Zellen

Gefriermedium 1: (Gef.1)

MEM	60 % (V/V)
FKS	40 % (V/V)

Gefriermedium 2: (Gef.2)

MEM	80 % (V/V)
DMSO	20 % (V/V)

2.6.2.5 Medium zum Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden in auf 37°C temperiertes ZSM aufgetaut.

2.6.2.6 Medium zur Transfektion von Zellen

Statt Eagle's Minimum Essential Medium (MEM) wurde das leicht veränderte Opti-MEM verwendet. Opti-MEM enthält als Puffersubstanzen HEPES und Natriumbikarbonat (2,4g/l), zusätzlich die Substanzen Hypoxanthin, Thiamin, Natrium-Pyruvat, L-Glutamin, Spurenelemente sowie Wachstumsfaktoren. Die Phenolrotkonzentration ist gegenüber MEM auf 1,1 g/l reduziert worden. Die Mengenangaben der übrigen Bestandteile sind urheberrechtlich geschützt.

Transfektionsmedium A: (Trans. A)

Opti-MEM	800 μ l
SUR x	6,4 μ g
K _{IR} 6.x	4,0 μ g
GFP	1,0 μ g

Transfektionsmedium B: (Trans. B)

Opti-MEM	800 μ l
Lipofectamin (1mg/ml)	25 μ l pro Plasmid Typ (GFP nicht berücksichtigt)

Trans.A und Trans.B wurden in 6,3 ml Opti-MEM pipettiert. Nach fünf Stunden wurde 10 ml einer Mischung aus 80% MEM und 20% FKS dazu pipettiert.

2.7 Lösungen für die Durchführung der Patch Clamp

Experimente

2.7.1 Badlösungen

Die Badlösungen wurden für Ganzzellexperimente bei 37°C und für isolierte Membranen bei Raumtemperatur (22-26°C) hergestellt und mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt.

Na-HEPES - Badlösungen für Ganzzellexperimente

NaCl	142 [mmol/l]
KCl	2,8 [mmol/l]
CaCl ₂	1 [mmol/l]
MgCl ₂	1 [mmol/l]
HEPES	10 [mmol/l]
D-(+)Glucose	11 [mmol/l]

K-HEPES - Badlösungen für isolierte Membranen

KCl	142 [mmol/l]
NaCl	2,8 [mmol/l]
CaCl ₂	1 [mmol/l]
MgCl ₂	1 [mmol/l]
HEPES	10 [mmol/l]
D-(+)Glucose	11 [mmol/l]

2.7.2 Pipettenlösungen (PL)

Die Pipettenlösungen wurden bei Raumtemperatur hergestellt und mit NaOH auf pH 7,2 für Ganzzellexperte (WC) und auf pH 7,4 für IO (Inside-Out) und CA (Cell-Attached) Experimente eingestellt.

WC-PL - Pipettenlösung für Ganzzellmessungen

K-Glutamat	132 [mmol/l]
NaCl	10 [mmol/l]
MgCl ₂	2 [mmol/l]
EGTA	1 [mmol/l]
HEPES	10 [mmol/l]
GDP	1 [mmol/l]
ATP	0,3 [mmol/l]

IO-PL - Pipettenlösung für isolierte Membranmessungen mit Mg²⁺

Die Pipettenlösung war eine HEPES gepufferte physiologische Salzlösung mit Mg²⁺ und hat die gleiche Zusammensetzung wie eine extrazelluläre Lösung (K-HEPES).

2.7.3 Pipelösung

Die Pipelösungen wurden bei RT hergestellt und mit NaOH auf pH 7,2 eingestellt. Bei den Substanzen ATP, ADP und UDP in den Konzentrationen 0,1; 1 ; 3; 10 [mM], die der *Mg X Pipe*-Lösungen hinzugefügt wurden, ist die Osmolarität auf die Mg^{2+} -Konzentration korrigiert worden; 0,7 mM freies Mg^{2+} .

Mg X Pipe : Pipelösung mit physiologischer $[Mg^{2+}]_{free}$ (0,7 mM)

KCl	143 - 2x [mmol/l]
MgCl ₂	0,7 + x [mmol/l]
CaCl ₂	1 [mmol/l]
EGTA	5 [mmol/l]
HEPES	10 [mmol/l]
D-(+)Glucose	11 [mmol/l]
Nukleotid	x [mmol/l]

X Pipe – Mg 1: Pipelösung ohne Mg^{2+}

KCl	140 [mmol/l]
EDTA	5 [mmol/l]
HEPES	10 [mmol/l]
D-(+)Glucose	11 [mmol/l]
Nukleotid	x [mmol/l]

X Pipe – Mg 2: Pipelösung mit Mg^{2+} (0,3 μ M)

KCl	145 [mmol/l]
MgCl ₂	0,5 [mmol/l]
CaCl ₂	0,5 [mmol/l]
EDTA	5 [mmol/l]
HEPES	10 [mmol/l]
D-(+)Glucose	11 [mmol/l]
Nukleotid	x [mmol/l]

In der *X Pipe 0,5 Mg* Lösung waren genau definierte Mg^{2+} und Ca^{2+} Konzentrationen vorhanden ($0,3 \mu M$ freies Mg^{2+} ; $5 nM$ freies Ca^{2+} ; berechnet nach einem von U. Ruß geschriebenen Programm zur Berechnung von freiem Ca^{2+} und Mg^{2+} Konzentrationen in EDTA- und EGTA-Lösungen). Als Nukleotide ließen sich ADP und ATP in Konzentrationen von 10 bis $1000 \mu M$ verwenden.

2.7.4 Lösungen für die Referenzelektrode

Das Referenzbad ist mit Pipettenlösung gefüllt worden, in der die Referenzelektrode eintauchte. Die elektrische Verbindung vom Referenzbad mit der Messkammer wurde über eine Agarbrücke hergestellt.

2.7.5 Lösungen für die Agarbrücke

KCl	200 [mmol/l]
Agar	1,5 %

Zur Herstellung von Agarbrücken wurden Glaskapillaren (Kimble Products, Vineland, New Jersey USA) aus Meterware ($1,2 - 1,5 mm$) auf $7,5 cm$ zurechtgeschnitten. Diese ließen sich in der Bunsenbrennerflamme zu einem U biegen. Der 1,5 %ige Agar wurde in einer wässrigen $200 mM$ KCl Lösung klar gekocht. Die U-Röhrchen wurden in den Agar getaucht, und dieser zog sich in die Kapillare. Die Agarbrücken wurden in $200 mM$ KCl Lösung bei $4-8^{\circ}C$ gelagert.

2.8 Zubehör zum Elektrophysiologie Messplatz

2.8.1 Elektroden

Als Mess- und Referenzelektrode wurden chlorierte Silberdrähte ($0,5 mm$, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D) verwendet. Die Mess- und die Referenzelektrode wurden mit Schmirgelpapier (600 Korn) von der alten Silberchloridschicht befreit. Die Silberelektroden wurden mit Ethanol (70%) oder Aceton gereinigt. Die Silberdrähte ließen sich in $3M$ KCl 10 Minuten bei $\sim 0,7 V$ und $1 mA$ chlorieren. Die Elektroden wurden nach der Chlorierung mit

Wasser von der KCl Lösung befreit. Danach waren sie für 3-5 Tage zu gebrauchen, bevor eine neue Chlorierung notwendig wurde. Ein gut chlorierter Silberdraht zeichnete sich durch ein geringes Offset-Potential aus. Indikator für eine beschädigte Ag/AgCl-Schicht war ein von -20 bis $+10$ mV abweichendes Offset-Potential.

2.8.2 Pipettenhalter

Es wurde der Standard Pipettenhalter von Heka bzw. Axon verwendet. In ihm war ein selbst eingelöteter ~ 4 cm langer chlorierter Silberdraht. Der Silberdraht wurde einmal im Jahr ersetzt (s. Abb. [14](#), [15](#)).

2.8.3 Messkammer

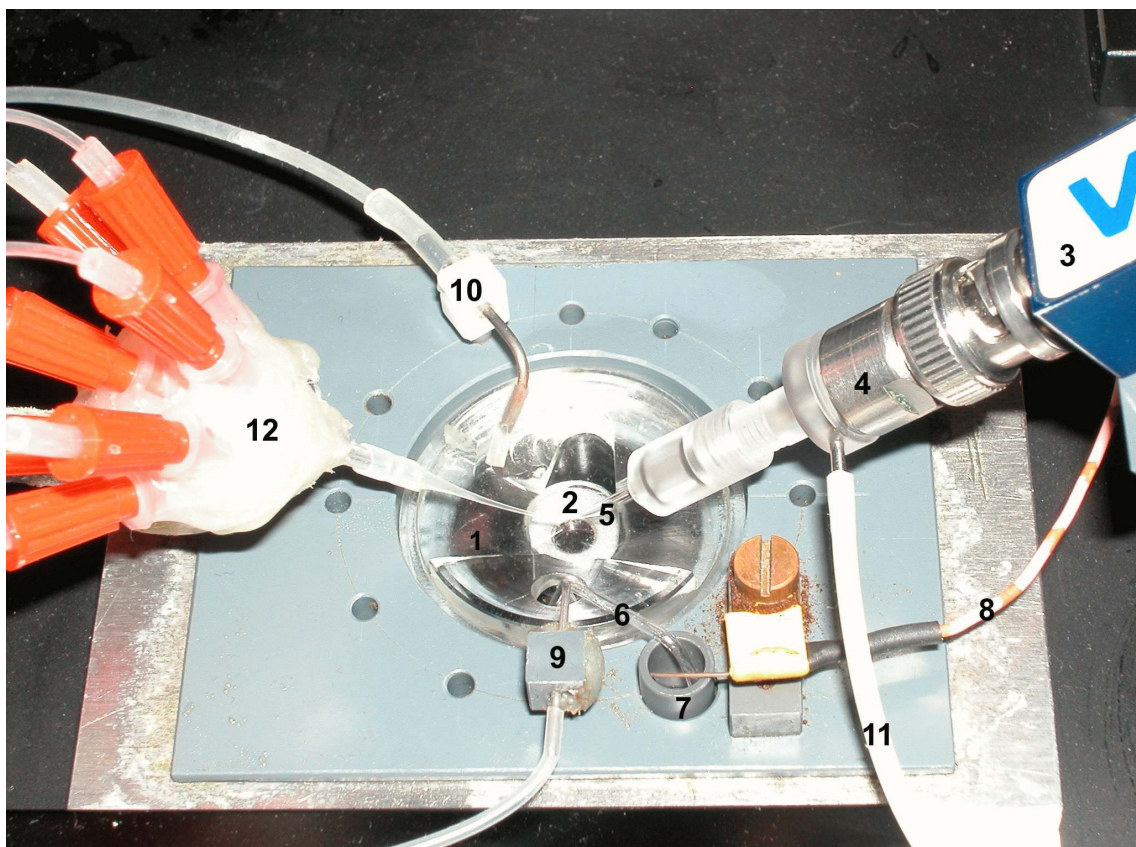


Abb. 14 Messkammer

Optisches System: Das Licht fällt von oben auf die Zellen, die am Boden des Perfusionsbades liegen und wird durch das Objektiv zum Okular und/oder der Kamera geleitet.

Messsystem:

1. Messkammer, 2. Objektiv, 3. Vorverstärker, 4. Pipettenhalter, 5. Glaspipette, 6. Agarbrücke, 7. Referenzbad, 8. Referenzelektrode, 9. Zulauf, 10 Absaugung, 11. Silikonschlauch, 12 Pipesystem (bestehend aus 8 Zulaufen, die in einer Kanüle zusammengeführt werden)

Die Messkammer wurde aus Plexiglas gefertigt, in die für den Zufluss eine eigene Kammer eingelassen war, der mit der Hauptkammer über einen Kanal verbunden war. Die Lösung aus dem Badlösungsvorratsgefäß bzw. bei WC Experimenten aus der Perfusionsapparatur wurde über eine gebogene geerdete Edelstahlkanüle zugeführt. Der Abfluss bestand ebenfalls aus einer gebogenen geerdeten Kanüle aus Edelstahl, über dessen Ende ein Stück Silikonschlauch gezogen war, womit eine gleichmäßigere Absaugrate erzielt wurde. Der Abfluss wurde auf einer im Perfusionsbad endenden Rampe so positioniert, dass eine gleichmäßige Absaugung ohne große Schwankungen der Badlösung erzielt wurde.

2.8.4 Perfusionssystem

Das selbst gebaute Perfusionssystem bestand aus einem Kunststoffgehäuse (L:359 mm, H:71mm, T:69mm), in dem 8 Standard Luer-Lock Spritzen mit einem Volumen von 3 bis 50 ml eingesetzt wurden. Die Spritzen standen auf eingeschraubten Luer-Verbindern (Schottverbinder FTLB A10, Vetter, Ammerbuch, Deutschland), über Schläuche mit dem Perfusionsbad verbunden. Über elektrische Schlauchklemmventile, die über ein Bedienpult betätigt worden sind, wird der Lösungswechsel gesteuert. Die Luer-Lock-Spritzen lagerten in einem Gehäuse, in das Temperierakkus eingebracht werden konnten. In WC und CA-Experimenten wurde auf Grund des höheren Lösungsverbrauchs 50 ml Perfusorspritzen eingesetzt, bei den IO-Experimenten kamen 10 ml Spritzen zum Einsatz. Der Zufluss der Lösung in die Messkammer erfolgte ausschließlich durch Gravitation. Die Perfusionsgeschwindigkeit hing von der Höhe der Perfusionsgefäße über dem Perfusionsbad ab (0,5 bis 2 Tropfen pro Sekunde, d.h. 0,6 bis 2,4 ml/min). Die Perfusion des Bades wurde zusätzlich über eine Schlauchklemme geregelt.

2.8.4.1 Perfusionssystem bei WC- und CA-Experimenten

WC- und CA-Experimente wurden bei 37°C durchgeführt. Die Gefäße wurden von den Luer-Verbindern über ~15 cm lange Silikonschläuche in eine Tropfkammer (Spritze 3 ml; Pharmaseal Laboratories, Glendale (California), USA), in der 8 Kanülen eingeklebt waren, zusammengeführt. Von der Tropfkammer führte ein Schlauch durch ein temperierbaren Wassermantel in das Perfusionsbad. Die Lösungen benötigten experimentell bedingt 30 – 60 s, um die Messkammer zu erreichen. Ab diesem Zeitpunkt begann der Austausch des gesamten

Bades. Da die Substanzen erst nach dieser Zeit das Bad erreicht hatten und am intrazellulären Rezeptor wirkten, konnten deren Effekte erst nach drei bis sechs Minuten registriert werden.

2.8.4.2 Perfusionssystem bei IO-Experimente

Bei IO-Experimenten wurden die 8 Perfusionsgefäße über 50 cm lange Schläuche mit einem Volumen von ~ 350 µl in einem Sammelrohr, der Pipe, zusammengeführt. Die ersten 10 cm bestanden aus Silikonschlauch (Vetter, Ammerbuch, D), der für die Schlauchklemmventile benötigt wurde. Für die letzten 40 cm wurde ein Polyethylen-Schlauch (Portex, ID = 0,75 mm; AD 1,22 mm (Portex Ltd, Hythe (Kent), GB)) benutzt, der bei 4/5 der Strecke mit einer vom Kopf abgeknipsten und an den Enden abgerundeten Edelstahlkanüle (Henke, RC; 0,90 0,40 mm No.1) als Erdung versehen war. Bei den Experimenten mit Nukleotiden wurden alle 8 Lösungen mit auf 4°C heruntergekühlten Kühl-Akkus ummantelt, um die spontane Hydrolyse der Nukleosid-Di- und Triphosphate zu reduzieren.

2.8.5 Pipesystem

Das Pipesystem wurde selbst gebaut. Es besteht aus 8 an den Spitzen abgerundeten Kanülen (Sterican 0,40 20 mm(27 G $\frac{3}{4}$), Braun, D), die in einer Pipettenspitze (Microloader No.: 5242 956.003, Eppendorf, Hamburg, D) zusammengeführt und verklebt wurden. Der Microloader wurde an der Spitze soweit gekürzt, dass eine ausreichend große Öffnung vorhanden war, um das aus der Zelle herausgerissene Membranstück direkt vor oder in die Pipe zu bewegen. Der Totraum war nur wenige Mikroliter klein, so dass der Lösungswechsel fast ohne Vermischung der einzelnen Lösungen erfolgte. Durch diese Anordnung konnten relativ schnelle Lösungswechsel innerhalb von ~1 s stattfinden.

Die Enden der Kanülen wurden durch Adapter (Adapter: Farbe rot (Luer positiv - Record negativ), J. Söllner GmbH, Deggendorf, D) wiederum mit den Schläuchen des Perfusionssystems verbunden (s. Abb. [14](#), [15](#)). Über deren Enden war Silikonschlauch (Vetter, Ammerbuch, D) gestülpt worden, um die Schläuche mit den Adaptern passgenau abzudichten. Die Schläuche wurden durch Schlauchklemmventile zu den Reservoirs geführt und mit diesen verbunden (Kap. 2.8.4.2).

2.9 Verwendete Substanzen

Aus den verwendeten Substanzen (Nukleotide und DIDS ausgeschlossen) wurden 10 oder 100 mM Stammlösungen hergestellt, aus denen je nach Substanz eine Verdünnungsreihe (10 μ M bis 100 mM) erzeugt wurde. Das Solvens für die Stammlösung bestand aus einer Mischung aus DMSO und Ethanol (1:1). Für die Experimente wurden die Stammlösungen 1:1000 mit *PIPE-Lösung* oder *Na-HEPES* bzw. *K-HEPES* (2.7.1) verdünnt. Der Lösungsmittelanteil von 0,1 % hatte keinen Einfluss auf die K_{ATP} -Kanäle. DIDS wurde in einer 1 mM Stammlösung hergestellt und 1:10000 mit *Mg X Pipe : Pipelösung mit Mg^{2+}* (Kap. 2.7.3) verdünnt.

2.9.1 K_{ATP} -Kanalblocker

Glibenclamid	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
HMR1883	Aventis Pharma Deutschland GmbH, Bad Soden a. Ts.
PNU-96293*	Aventis Pharma Deutschland GmbH, Bad Soden a. Ts.
Tolbutamid	Aventis Pharma Deutschland GmbH, Bad Soden a. Ts.

2.9.2 K_{ATP} -Kanal Öffner

A312110	Abbott, Abbott Park, Illinois, USA
Diazoxid	Essex Pharma GmbH, München, D
DIDS	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
Minoxidilsulfat	Novartis International AG, Basel, CH
Nicorandil	Merck KGaA, Darmstadt, D
P1075	Leo Pharma A/S, Ballerup, DK
PNU-96179*	Aventis Pharma Deutschland GmbH, Bad Soden a. Ts.

* Synthetisiert nach Humphrey et al., 1996

2.9.3 PI-3 Kinase Inhibitoren

Die PI-3-Kinase Inhibitoren wurden in einer Stammlösung von 10 mM oder 100 mM in DMSO und Ethanol (1:1) gelöst und bei 4°C gelagert. Sie wurden in Konzentrationen von 10 bis 100 µM eingesetzt und einer 1 oder 3 mM MgATP-*Pipe-Lösung* zugesetzt.

Wortmannin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
LY294002	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D

2.9.4 Nukleotide

Die Nukleotide wurden in Puffer (Badlösung bzw Pipelösung) gelöst.

ADP	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
ATP	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
UDP	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D

Es wurden Stammlösungen zu 1 oder 10 mM in Puffer hergestellt. Dafür wurden zuerst die Salze eingewogen, der pH Wert auf ~7,4 eingestellt. Die Nukleotide wurden zugegeben und der pH Wert auf 7,2 mit NaOH titriert. Niedrigere Konzentrationen wurden aus den hohen Konzentrationen durch Verdünnen hergestellt.

3 Methoden

3.1 Mikrobiologische Arbeitsmethoden

3.1.1 Gewinnung von Plasmid-DNA aus *E. coli* mit dem Qiagen-MaxiKit

Anzucht der Bakterien

Aus einer bei -80°C lagernden Stammkultur mit transformierten *E. coli* (*vergl. 2.1*) werden pro Ansatz $\sim 50\ \mu\text{l}$ -Bakterien-Suspension und $150\ \mu\text{l}$ Antibiotikum dem LB-Medium ($150\ \text{ml}$) zugesetzt (*Kap. 2.6.1.1*). Bei der DNA-Aufarbeitung werden zwei Ansätze von zweimal $150\ \text{ml}$ LB-Medium verwendet. Diese wird für 12-14 Stunden bei 37°C unter Schütteln ($200\text{U}/\text{Min}$) inkubiert. Der Vektor von SUR und $\text{K}_{\text{IR}6.x}$ -Plasmiden enthält ein β -Lactamase-Gen; SUR und $\text{K}_{\text{IR}6.x}$ werden mit Ampicillin selektioniert. Die Selektion von GFP, welches in seinem Plasmid eine Neomycin- Resistenz für die Neomycin-Phosphotransferase codiert, findet mit dem Aminoglykosid Kanamycin (Kreuzresistenz) statt.

Gewinnung der Stammkulturen

Aus den so vermehrten Bakterien (*s.o.: Anzucht der Bakterien*) können auch Stammkulturen angelegt werden. Dafür werden $850\ \mu\text{l}$ Bakterien-Suspension und $150\ \mu\text{l}$ Glycerin in ein Kryoröhrchen abgefüllt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Kryoröhrchen mit Stammkulturen werden bei -80°C im Gefrierschrank gelagert.

Lyse durch SDS

Die folgenden Schritte werden nach der Gewinnung der Bakterienkultur mit dem Qiagen MaxiKit bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Zusammensetzung der Puffer und Reagenzien ist in Kapitel 2.6.1.2 zu finden und entspricht der Qiagen-Nomenklatur. Die Zellsuspension (zweimal $150\ \text{ml}$) wird in 6 Facon Tubes aufgeteilt und bei 4°C bei $2000\ \text{U}/\text{Min}$ für 20 Minuten zentrifugiert. Die Überstände werden dekantiert und die gewonnenen Pellets in $10\ \text{ml}$ P1 (*Kap. 2.6.1.2*) vereinigt und in einem Röhrchen resuspendiert. $10\ \text{ml}$ P2 (*Kap. 2.6.1.2*) werden zu P1 hinzugefügt. SDS in P2 löst die Phospholipide und Proteinkomponenten der Zellmembranen auf, wodurch der Zellinhalt freigesetzt wird. NaOH in P2 denaturiert die

chromosomale und die Plasmid-DNA. Nach 4-6maligem mischen durch Umdrehen der Röhren wird für 5 Minuten inkubiert.

Neutralisation durch Kaliumacetat

Das Lysat wird durch die Gabe von 10 ml auf Eis gelagertem saurem Kaliumacetat (P3 (Kap. 2.6.1.2)) neutralisiert. Durch die hohe Salz-Konzentration fällt SDS aus, und die denaturierten Proteine, chromosomale DNA und zelluläre Trümmer werden in einem Salz-Detergenz-Komplex gebunden und von dem QIA-Filter zurückgehalten. Plasmid DNA ist kleiner, renaturiert vollständig und bleibt in der Lösung im Eluat zurück. Das Filtrat wird auf einen Filter gegeben und inkubiert dort für 10 Minuten.

Klärung des Bakterien-Lysats

Danach werden die Endotoxine aus dem gefilterten Lysat durch Zugabe von 2,5 ml ER Puffer (Kap. 2.6.1.2) durch 10maliges Umschwenken entfernt. Es folgt eine 30-minütige Inkubation auf Eis. Durch den ER-Puffer wird das Binden von Endotoxinen an die Harzsäule verhindert. Die Salz- und pH-Bedingungen des Lysats und die bessere Selektivität für das Harz gewährleisten, dass nur die Plasmid DNA bindet, während die degenerierte RNA, zelluläre Proteine und Metabolite nicht zurück gehalten werden und in der Ausflussfraktion, erscheinen.

Reinigung und Elution von Ionenaustauscher

Nachdem 10 ml QBT Puffer (Kap. 2.6.1.2) den Ionenaustauscher durch Besetzung der Bindungsstellen aktiviert haben, wird das klare Lysat auf den Ionenaustauscher aufgebracht. Es wird zweimal mit einem Puffer (30 ml QC (Kap. 2.6.1.2)) mittleren Salzgehalts gespült, wodurch verbliebene Kontaminationen (RNA und Protein Spuren) vollständig ausgewaschen werden. Die Plasmid DNA wird nach Entfernen der Rückstände effizient mit einer hohen Salzkonzentration vom Ionenaustauscher gewaschen (15 ml QN (Kap. 2.6.1.2)). Die 15 ml werden in 1 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt; 12 x 1,25 ml.

Entsalzung und Aufkonzentrierung

Die eluierte Plasmid-DNA wird durch Isopropanol (0,45 ml je Reaktionsgefäß) entsalzt und ausgefällt. Die isolierte Plasmid-DNA wird in Ethanol (70%) (0,167 ml) durch dreimaliges Resuspendieren und Zentrifugieren (15000 x g; 1.: 30 Min; 2. + 3.: 10 Min. bei 4°C) gewaschen.

Die Plasmid-DNA wird unter dem Laminar-Flow luftgetrocknet und die getrockneten Pellets werden in Aqua ad injectabilia gelöst und bei -25°C gelagert.

Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration wird mittels einer Absorptionsmessung im UV-Bereich (Eppendorf Uvette, Eppendorf AG, D) bei einer Verdünnung von 1:70 mit Aqua ad injectabilia Ph. Eur. (Delta Pharma GmbH [Boehringer Ingelheim], 72793 Pfullingen) gegen den Leerwert ermittelt. Bei 260 nm und 280 nm wird die UV-Absorption im Photometer gemessen. Bei einer Extinktion von 260 nm wird die Menge der zu messenden Plasmid-DNA bestimmt, mit 280 nm die Verunreinigungen (Protein) gemessen. Zusätzlich bestimmt das UV-Messgerät das Verhältnis der beiden Extinktionen; liegt dieser Wert zwischen 1,8 und 2,0 so liegt hochreine Plasmid-DNA vor. Liegen die Werte unter 1,8, so sind Proteinverunreinigungen in der Probe. Ein Quotient größer als 2,0 weist auf aromatische Verunreinigungen aus der Präparation hin. Der Extinktionskoeffizient für DNA beträgt $50 \mu\text{g/ml}$. Die Konzentration der pc-DNA betrug nach Verdünnen zwischen 1 und $2,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$.

$$c = A_{260} * \epsilon * V \quad (1)$$

c	DNA-Konzentration ($\mu\text{g/ml}$)
A_{260}	Absorption des Peaks um 260 nm
	molarer Extinktionskoeffizient (für DNA = $50 \mu\text{g/ml}$)
V	Verdünnung

3.1.2 Kultivierung und Bearbeitung von HEK293 Zellen

3.1.2.1 Kultivierung von HEK293 Zellen

Die HEK293-Zellen wurden in sterilen Petrischalen (Greiner 94/16 (94 mm)) mit ZSM (*Kap. 2.6.2.3*) im Zellkulturschrank bei 37°C , 5% CO_2 und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % kultiviert. Sie wurden bei einer Konfluenz von 60-80 %, die nach 3-5 Tagen erreicht wird, im Verhältnis 1:3 bis 1:5 passagiert. Dafür konnten die Zellen durch Abspülen mit Medium (ZSM; 37°C) unter zu Hilfenahme einer 1 ml Pipette von dem Boden der Kulturschale abgelöst werden.

3.1.2.2 Auftauen von HEK293 Zellen

Die Zellen wurden aus dem flüssigen Stickstoff (-196°C) genommen und sofort im Wasserbad bei 37°C angetaut, bis nur noch ein dünner Eisstift zu erkennen war. Das angetaute Pellet wurde zügig unter dem Laminar Flow in 10 ml Medium (ZSM ; 37°C) überführt, um den Kontakt mit flüssigem DMSO so kurz wie möglich zu halten. Nach dreimaligem Umschwenken wurden die Zellen 2-3 Minuten bei 200 g zentrifugiert. Der Überstand ist vorsichtig abgesaugt worden. Das Pellet wurde in 4 ml ZSM (37°C) (Kap. 2.6.2.3) resuspendiert. In eine Petrischale (94 mm) wurden 6 ml Medium vorlegt und die Zellsuspension (4 ml) zugeben. 24 Stunden danach wurde das Medium (ZSM ; 37°C) ausgetauscht. Nach einer Brutdauer von 3-4 Tagen wurden die Zellen im Verhältnis 1:3-1:5 passagiert.

3.1.2.3 Einfrieren von HEK293 Zellen

Um Zellen einzufrieren, sind ausschließlich Kulturschalen verwendet worden, die eine Zelldichte von 70-80% erreicht hatten, wobei die Zellen aus einer Petrischale in ein Kryoröhrchen überführt wurden. Dazu wurden die Zellschalen aus dem Kulturschrank entnommen und das Medium durch Absaugen entfernt. Die Zellen wurden mit 4 ml Gef 1 (s. 2.6.2.4) pro Petrischale durch Abspülen der Zellen vom Boden der Schale abgelöst und zentrifugiert (Zentrifugen-Parameter vgl. Kap. 3.1.2.2). Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt, das Pellet in 0,5 ml Gef 1 resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Dazu ist 0,5 ml Gef 2 (Kap. 2.6.2.4) hinzugefügt worden. Durch 3-5maliges Umschwenken wurden die Zellen gemischt und auf Eis gestellt. Die Zugabe von Gef 2 zu Gef 1 und das Mischen und Überführen auf Eis musste zügig vonstatten gehen, weil das Detergens DMSO bei zu langem Kontakt die Zellen, die noch Stoffwechsel betreiben können, schädigt. Das im Eis lagernde Kryogefäß (1,2 ml; NALGENE CRYOWARE , Nalge Company, Rochester, New York 14602-0365 USA; Cat-No.: 5000-0012, Lot.: 061) wurde zusammen mit dem Eis in die Kühltruhe gestellt, damit die Zellsuspension schonend eingefroren wurde. Das Kryogefäß lagerte einen Tag bei -80°C im Eis, um dann nach 24 Stunden in flüssigem Stickstoff bis zum nächsten Auftauen aufbewahrt zu werden.

3.1.2.4 Transfektion von HEK293 Zellen mit SUR und/oder $K_{IR}6.x$

Für die Transfektion von HEK293 Zellen wurden Zellen mit einer Passage_{Nummer} (P_x) P_8 - P_{35} ausgewählt. Nach dem Auftauen sind die Zellen mindestens zweimal passagiert worden, bevor sie mit GFP, $K_{IR}6.x$ - und SUR-DNA transfiziert wurden. Es wurden ausschließlich Schalen mit einer 60-80% Konfluenz verwendet. Für die Transfektion wurden drei unterschiedliche Plasmide benötigt, die (SUR, K_{IR} , GFP) kodierte (*Kap. 2.2*). Der pEGFP-C1 Vektor kodierte für das grüne fluoreszierende Protein (GFP), welches der Identifikation von transfizierten Zellen diente. Die DNA-Komponenten wurden mit Hilfe von 25 μ g Lipofektamin pro SUR- und $K_{IR}6.x$ -DNA Plasmid, d.h. 6,4 μ g SUR, 4,0 μ g $K_{IR}6.x$, 1,0 μ g GFP und 50 μ l Lipofektamin in Kotransfektionen zusammen mit 7,9 ml OptiMEM den Zellen zugesetzt (Trans.A + Trans.B (*s. 2.6.2.6*)). Nach fünf Stunden, in denen die Zellen die in Liposomen eingeschlossene DNA aufgenommen hatten, wurde dem Transfektionsmedium (Trans.A + Trans.B + 6,3 ml OptiMEM) 10 ml einer Mischung aus 80% MEM und 20% FKS zugesetzt. 24 Stunden nach der Transfektion wurden das Transfektionsmedium abgesaugt und die Zellen mit gentamicinhaltigem Medium (ZSM) in sterile mit Deckgläsern bestückte Petrischalen 1:20 passagiert (*Kap. 3.1.2.5*). Die Transfektionsausbeute lag bei ~5 bis 15 %. Die fluoreszierenden Zellen hatten die Plasmide aufgenommen und exprimierten die Proteine, was unter blauem-Licht (420-450 nm) im Mikroskop durch die grüne Fluoreszenz des GFP in den Zellen gesehen werden konnte.

3.1.2.5 Präparation der Zellen für die Elektrophysiologie

Die Deckgläser (Assistent (Stärke 1; 30 mm)) in den Petrischalen (FALCON 353801 (35 mm)) wurden unmittelbar nach dem Beginn der Transfektion mit 10 μ l Poly-D-Lysin (1 mg/ml) und 200 μ l H_2O (A. dest) beschichtet. Nach dem Aufpipetieren wurden die Petrischalen verschlossen und mehrere Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen. 90 Minuten vor der Passage wurde die Beschichtungslösung von den Petrischalen abgesaugt. Danach wurden die Innenflächen der Petrischalen (Deckel und Boden) und die darin befindlichen Deckgläser unter UV-C Licht (254 nm) (Lampentyp: UV-C 30, Heraeus Instruments GmbH, Stuttgart, D) im Laminar-Flow für 90 min. sterilisiert. Dabei wurde die DNA von Mikroorganismen geschädigt.

In die sterilisierten Schalen wurde die abgelöste Zellsuspension mit transformierten Zellen gegeben. Dazu ließen sich die Zellen vom Boden der Petrischale ablösen und 1:20 verdünnt mit ZSM in die mit Deckgläsern bestückten Schalen geben. 24 h nach der Passage waren die Zellen fest am Deckglas angehaftet.

Um die Beschichtung unter sterilen Bedingungen durchführen zu können, wurde als Alternative zu der Sterilisation mittels UV-Licht die Sterilisation durch Hitze bei 180°C für 60 Minuten durchgeführt. Poly-D-Lysin wurde in sterilem Wasser (Aqua ad injectabilia) (0,0048 µg/µl) gelöst und 210 µl auf die in sterilen Petrischalen liegenden sterilisierten Deckgläser unter der Sterilbank pipettiert. Die mit den beschichteten Deckgläsern befüllten Petrischalen wurden verschlossen und 24 h in der Sterilbank gelagert. Die Beschichtungslösung wurde mit einer sterilen Glaspipette in der Sterilbank abgesaugt. Danach wurde 3 ml der Zellsuspension in jede Schale gefüllt und für weitere 24 h im Brutschrank gelagert. Die Hitzesterilisation der Deckgläser und das Einbringen in sterile Petrischalen hatte die Oberflächenbeschaffenheit der Deckgläser jedoch verändert. Die Zellen hafteten nicht so stark am Boden an und wurden bei IO Experimenten oft nach Erreichen eines Giga seals mit der Pipette vom Deckglas abgerissen. Diese Methode wurde deshalb nicht weiter verwendet.

Um Zellen elektrophysiologisch vermessen zu können, wurde eine Petrischale aus dem Brutschrank genommen. Das Deckglas wurde mit einer Kanüle aus der Petrischale gehoben. Das Medium wurde mit einem saugfähigem Papiertuch von der Unterseite entfernt. Danach wurde das Deckglas auf eine mit einer Mischung aus Vaseline und Laborfett (glisseal, borer chemie, Zuchwil, CH) (1:3) dünn eingestrichene Schale, die mit einem 10 mm großen Loch versehen war, eingesetzt. Mit der Messkammer wurde das Deckglas in der Schale festgedrückt. Die Schale mit den Zellen wurde in den Strahlengang des Mikroskops platziert und Zu- und Abfluss wurden angebracht, sowie bei IO-Experimenten die Pipe positioniert.

3.2 Durchführung der Patch-clamp Experimente

Bei den „grünen Zellen“ konnte nach entsprechender Manipulation immer ein K_{ATP} -Strom gesehen werden. Bei den nicht fluoreszierenden Zellen konnte keine Stromsteigerung beobachtet werden. Es kann davon ausgegangen werden, dass sie keine funktionellen K_{ATP} -Kanäle ausbilden konnten. Das wurde immer wieder durch Patchen von nichtfluoreszierenden Zellen überprüft. Sie zeigten genau wie nicht transfizierte Zellen nie eine Stromsteigerung.

3.3 Aufbau des elektrophysiologischen Messplatzes



Abb. 15 *Elektrophysiologischer Messplatz*

1. Mikroskop, 2. Faradaykäfig, 3. Verdunkelung, 4. Schwingungsisolierter Tisch, 5. Videokamera, 6. Videomonitor, 7. Motoreinheit des Manipulators, 8. Steuergerät des Manipulators mit Joystick, 9. Vorverstärker, 10. Hauptverstärker, 11. Perfusionssystem, 12. Pipesystem, 13. Badlösungsvorratsgefäß, 14. Absaugpumpe, 15. Abfall- und Überlaufgefäße, 16. Computer, 17. Oszilloskop, 18. Plotter

Das inverse Mikroskop steht in einem Faradaykäfig auf einem pneumatisch betriebenen schwingungsgedämpften Tisch, um erschütterungs- und vibrationsarm arbeiten zu können. Das Mikroskop enthält zum Betrachten der Zellen während der Messung ein Okular mit 10facher und ein Objektiv mit 40facher Vergrößerung. Eine schwarz-weiß Videokamera ist an das Mikroskop angeschlossen, um die Annäherung der Pipette an die Zelle betrachten zu können. An der Rückseite ist eine Quecksilberdampf Lampe angebracht, bei der, bis auf die Wellenlängen des blauen Licht (450-490 nm) durch eine Filtereinheit alle anderen Wellenlängen herausgefiltert und in den Strahlengang des Objektivs geleitet werden. Nur die Zellen zeigen eine grüne

Fluoreszenz (Zeiss: 505-530 nM; Nikon: >520 nM), welche GFP aufgenommen und das grün-fluoreszierende-Protein gebildet haben (s. 3.1.2.4).

Auf der rechten Seite ist die Motoreinheit des Manipulators angebracht, der über einen Joystick bedient wird. Auf diesem sitzt der Vorverstärker, der den Pipettenhalter enthält. An der linken Seite ist das Perfusionssystem angebracht, welches für Excised-Patches in einer Pipe endet. Die Badperfusion ist davon getrennt. Für Ganzzellmessungen werden die Schläuche des Perfusionssystems vor dem Wasserbad zusammengeführt, um dann als Badperfusion in das Bad geleitet zu werden. Die einzelnen Gefäße des Pipe bzw. des Durchstömungssystems werden separat über Schlauchklemmventile gesteuert. Das Bad wird mit ca. 30-60 Tropfen (= 0,6-1,2 ml) pro Minute durchspült. Auf der gegenüberliegenden Seite sitzt eine Absaugung, die den Flüssigkeitspegel im Bad konstant hält. Ganzzellmessungen sind bei 37°C durchgeführt worden, IO-Patches werden bei Raumtemperatur untersucht.

Um die für den Sealvorgang notwendige saubere Pipettenspitze zu haben, wird ein Überdruck im Inneren der Pipette angelegt. In der Pipette war gefilterte saubere Lösung, die durch den Überdruck aus der Öffnung der Pipette strömt. Durch den ständigen Ausstrom aus der Pipettenspitze können keine Verunreinigungen aus dem Bad an die Spitze der Pipette gelangen. Um den Überdruck zu erzielen, sind zwei 10 ml Pipetten über einen Schlauch zu einem U verbunden. In diesem wurde eine 10 cm hohe Wassersäule aufgebaut, die für den nötigen Überdruck sorgte.

Die mit Na- oder K-HEPES gefüllten Pipetten (*Kap. 2.7.2 und Kap. 3.3*) werden in einem Teflon Pipettenhalter (*Kap. 2.8.2*) eingesetzt und über einen Sikonschlauch mit dem Überdrucksystem über einen Dreiwegehahn verbunden, um einen Überdruck beim Eintauchen in das Bad zu haben. Nach dem Aufsetzen der Pipette auf die Zelle wird der Überdruck abgeschaltet und es kann ein Unterdruck erzeugt werden, was sich positiv auf die Patchformung auswirkt. Während der Messung wurden die Zellen von der Perfusionslösung (*Kap. 2.7.1*) in der Messkammer umspült.

Alle Metallteile in dem Faradaykäfig werden geerdet. Um die Messelektrode in der Messkammer mit der Referenzelektrode des Referenzbades elektrisch zu verbinden, wird eine Agarbrücke als Stromleiter verwendet (*Kap. 2.7.5*).

3.4 Pipetten

3.4.1 Vorbereitung der Pipetten

Die Glasrohlinge (s. 2.4.2) wurden bei der Produktion durch Brechen auf eine Länge von 7,5 cm gebracht und so geliefert. Im Labor wurde die Bruchkanten der Glasrohlinge in der gelben Flamme des Bunsenbrenners geglättet, um die Silber/Silberchloridschicht der Elektrode beim Einsetzen der Pipette in den Halter nicht zu beschädigen. Danach wurden die Glaskapillare mit Aceton oder Ethanol 70% mit einem Papiertuch von Rückständen gereinigt.

Die so aufbereiteten Glaskapillaren wurden mit dem Zeits Puller gezogen und poliert. Die für IO bzw. WC entwickelten Pullprogramme (Kap. 3.3.2 und Kap. 3.3.3) setzten sich aus zwei Vorpulls und einem zweistufigen Hauptpull, der die Glaskapillare auseinanderreißt, zusammen. Anschließend wurden die Glaspipetten poliert.

3.4.2 Pipetten für Ganzzellmessungen

Pipetten für Ganzzellmessungen wurden aus Clark Borosilikat Glas-Kapillaren ohne Filament mit einem Außendurchmesser von 1,5 mm und einem Innendurchmesser von 0,86 mm hergestellt (s. 2.4.2). Die Daten für das zugrundeliegende Pull-Programm sind:

*Pull A (P(A)): Heat H 635; Force Prim. Pull F(TH) 80; Distance threshold s(TH) 24; Delay heat stop t(H) 50; Distance heat stop s(H) 40; Adjust AD 120

Pull B (P(B)): Heat ca. H 480; Distance heat stop s(TH) 24; Delay heat stop t(H) 0; Distance heatstop s(H) 3; Delay (Pull1) t(F1); Force Pull 1 F1 38; Distance Pull 2 s(F2) 4; Force Pull2 F2 40; Adjust AD 515

Nach dem Füllen der Pipetten mit der entsprechenden Pipettenlösung betrug der Widerstand zwischen 3 und 5 M Ω . Um die Pipettenwiderstände zu verändern, reichte es aus, den Wert der Hitze vom Pull-Programm B (H(P(B))) zu verändern. Waren die Pipetten zu hochohmig, so wurden kleinere Werte für H (P(B)) eingegeben. Lag der Wert für den Pipettenwiderstand bei zu niedrigen Werten, so wurde der Wert der Hitze H P(B) erhöht.

3.4.3 Pipetten für isolierte Membranen und Messungen in der CA Konfig.

Clark Borosilikat Glas-Kapillaren ohne Filament mit einem Außendurchmesser von 1,5 mm und einem Innendurchmesser von 1,17 mm wurden als Pipetten für Messungen mit isolierte Membranen verwendet (*Kap. 2.4.2*). Wegen der dünneren Wand der Pipetten für IO-Patche mußte H P(B) im Vergleich zu den Parametern bei WC-Pipetten erniedrigt werden. Die Daten für das zugrundeliegende Pull-Programm sind:

*Pull A (P(A)): Heat H 635; Force Prim. Pull F(TH) 80; Distance threshold s(TH) 24; Delay heat stop t(H) 50; Distance heat stop s(H) 40; Adjust AD 120

Pull B (P(B)): Heat ca. H 400; Distance heat stop s(TH) 24; Delay heat stop t(H) 0; Distance heatstop s(H) 3; Delay (Pull1) t(F1); Force Pull 1 F1 38; Distance Pull 2 s(F2) 4; Force Pull2 F2 40; Adjust AD 515

Nach dem Pipettenziehen und dem Befüllen mit der entsprechenden Pipettenlösung betrug der Widerstand $\sim 1,0 \text{ M}\Omega$. Der Widerstand konnte über Veränderung der H [P(B)] Werte geändert werden.

3.4.4 Vorbereitungen zum Gebrauch der gezogenen Pipetten

Zu Beginn eines Experimentiertages wurden Pipetten für den Tagesgebrauch gezogen und in einer geschlossenen Box mit der Spitze nach oben gelagert. Beim Gebrauch einer Pipette wurde diese aus dem Kasten genommen und mit filtrierten Puffer zuerst von der Spitze her gefüllt. Danach wurde die Pipette zu einem Drittel von hinten mittels einer Spritze mit Lösung gefüllt.

3.5 Elektrophysiologische Methoden

Die Patch Clamp Technik wurde Ende der 70er Jahre von Neher und Sackman in Göttingen entwickelt. Sie fanden heraus, dass filigran ausgezogene und mit einer Salz-Lösung befüllte Glaspipetten mit ihrer Spitze an Membranen eine dichte Verbindung erzeugen, wodurch ein hoher Abdichtwiderstand erreicht wurde (giga seal).

In meinen Messungen wurde die Spannungsklemme (Voltage Clamp) verwendet. Bei ihm wird der durch die Membran fließende Strom bei konstantem Membranpotential gemessen.

Die Grundlage dafür bildet das Ohm'sche Gesetz. Bei einer konstanten Spannung ($U[\text{mV}]$) und durch Öffnen oder Schließen der Kanäle sich änderndem Membranwiderstand ($R[\]$), verändert sich der Strom ($I[\text{pA}]$).

$$I[A] = \frac{U[V]}{R[\Omega]} \quad (2)$$

Mit der Patch clamp Technik können sowohl Ströme durch einzelne Kanäle (Single-Channel-Recording) als auch Summenströme oder der Strom einer ganzen Zelle (Whole-Cell-Recording) gemessen werden. Ist nach dem Aufsetzen der Pipette auf die Zelle ein hoher Abdichtwiderstand erreicht worden, d.h. 1 G oder höher, so spricht man von der Cell-Attached (CA)-Konfiguration (Abb. 16); reißt man das Membranstück aus der Zelle, so liegt die Inside-Out-(IO) Konfiguration vor (Abb. 16). Zerstört man den Membranfleck ohne die dichte Verbindung zu der Zelle zu zerstören, bekommt man die Ganzzellkonfiguration (Whole-Cell (WC)) (Abb. 16).

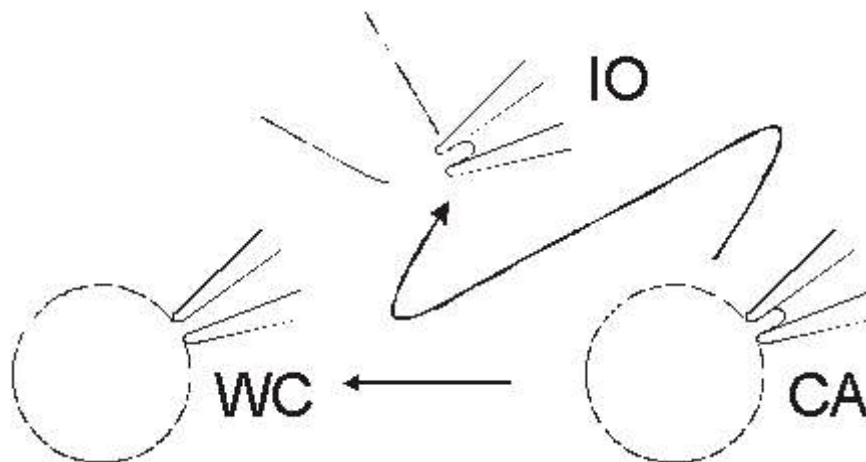


Abb. 16 Darstellung der unterschiedlichen Patch-Konfigurationen

3.5.1 Messungen in der CA-Konfiguration

Bei den hier durchgeführten Cell-Attached-Experimenten (CA) wurden bei einem Haltepotential von -50 mV Summenströme, d.h. der Strom durch viele K_{ATP} -Kanäle gemessen.

Bei der „physiologischsten“ aller elektrophysiologischen Messungen sitzt die Pipette mit einem hohen Abdichtwiderstand auf der Zelle. Die verwendeten Pipetten hatten die Eigenschaften von Pipetten für isolierte Membranen (Kap. 3.3.3). Die Zelle wurde nicht

beschädigt, sondern nur ein Membranstück verformt; Pipette und Zellinneres stehen nicht direkt miteinander in Kontakt. Die K_{ATP} -Kanäle blieben trotz der Membranverformung in der Pipette geschlossen. In der CA-Konfiguration entwickelte sich bei transfizierten HEK-Zellen spontan kein Strom. Kaliumkanalöffner konnten in dieser Konfiguration Kanäle öffnen und so gemessen werden. Die CA-Experimente wurden bei 37°C Badtemperatur durchgeführt. Während einer Dauer von 2 Sekunden wurden 2000 Punkte aufgezeichnet. Diese 2000 Punkte wurden mit 1 kHz digitalisiert, wobei die Mittelwerte der ersten und der zweiten 1000 Messpunkte gebildet worden sind.

3.5.2 Messungen an isolierten Membran-Patches in der Inside-Out-Konfiguration (IO)

Zur Messung an isolierten Membran-Patches wurde nach Formung eines Gigaseals (CA Zustand) das Membranstück unter der Pipette herausgerissen und vor die Pipe mit intrazellulärer Lösung gefahren (Abb. [16](#)). Die intrazelluläre Membranseite zeigte zum Bad bzw. zur Pipe, während die extrazelluläre Membranseite der Pipette zugewandt war. Beim Herausreißen wurden intrazelluläre Faktoren weggespült, so dass vorwiegend Transmembranproteine, d.h. die expremierten K_{ATP} -Kanäle bzw. fest an die Membran angeheftete Proteine erhalten blieben. Durch diese Technik lassen sich Kanäle sehr gezielt untersuchen. Die IO-Experimente wurden bei RT, die auf Grund von jahreszeitlichen Schwankungen zwischen 22°C (Winter, Frühjahr, Herbst) und 27°C (Sommer) lag, durchgeführt.

Das Haltepotential betrug wie in der CA-Konfiguration -50 mV. Während eines zwei sekundigen Intervalls, in dem 2000 Punkte ermittelt werden, wird mit 1 kHz digitalisiert. Die Mittelwerte der ersten und der zweiten 50 % dieser Daten werden zur weiteren Datenauswertung verwendet. Gemessen wurden in dieser Konfiguration nicht, wie bei IO-Patches meist üblich, der Strom von einzelnen Kanälen, sondern der Strom von vielen Kanälen, ein sog. Summenstrom. Während in der CA-Konfiguration die Kaliumkanäle geschlossen blieben, entwickelte sich beim Herausreißen durch Öffnung der einzelnen Kanäle spontan ein Strom. Dabei schwankte der Summenstrom von 40 bis 9000 pA. Aus diesen Parametern konnte die Anzahl der Kanäle ermittelt werden:

$$n = \frac{I[pA]}{U[V]*P[pS]} \quad (3)$$

Wenn die Leitfähigkeit für $K_{IR}6.2/SUR2A$ -Kanäle in symmetrischem hohem K^+ (140 mM) auf 80 pS festgelegt wird (Babenko et al., 1998a), so entsprechen Ströme von 40 - 9000 pA 10 bis 2250 offenen K_{ATP} -Kanälen (P-open wurde nicht bestimmt). Diese enormen Stromschwankungen lagen zum einen an der Expressionsrate der Kanäle der einzelnen Zelle, zum anderen an der Größe des Patches in der Pipette, die wiederum von der Form der Pipette abhängt.

3.5.3 Messungen an ganzen Zellen (WC)

Bei der Ganzzellableitung, dem whole cell recording (WC), wurde ausgehend von der CA-Konfiguration das Membranstück durch einen kurzen elektrischen Impuls oder kurzen Unterdruck in der Pipette zerstört (Abb. 16). Es entstand eine Verbindung zwischen Pipettenlösung und Zellinnerem. Der Zellinhalt ist mit der Pipettenlösung dialysiert worden. Dabei fand eine Verdünnung bzw. ein Auswaschen des Zellinneren statt.

Das Haltepotential von -60 mV wurde nach dem Abgleich der kapazitiven Ströme und vor dem Zerstören der Zellmembran angelegt. Nach dem Zerstören der Membran wurde die Spannung vor und nach einem Puls für 40 bzw. 10 ms auf -50 mV festgelegt, wohingegen während eines 500 ms Pulses Spannungen von -130 bis +10 mV in 20 mV Schritten festgesetzt und dabei ermittelten Ströme gemessen wurden. Dabei betrug die Aufzeichnungsphase der einzelnen Pulse mit Vor- und Nach-Puls 1,5 s. Nach der Sequenzen der sieben einzelnen Pulse wurden u.a. die Kapazitäten und der Serienwiderstand bestimmt und nach ~12 s startete die Puls-Serie erneut. Die WC-Experimente wurden bei 37°C Badtemperatur durchgeführt.

Die Auswertung der einzelnen Kurven geschah auf graphischem Wege. Aufgetragen wurde der Strom gegen die Zeit bei -50 mV. Die anderen Potentiale wurden mitbestimmt, um evtl. auch diese auswerten zu können. Es wurde jedoch ausschließlich bei -50 mV eine Auswertung der Daten vorgenommen. Nachdem sich ein Maximalstrom entwickelt hatte, wurden meist kumulativ erst kleinere, dann höhere Konzentrationen von der zu untersuchenden Substanz appliziert und nach Erreichen des steady states wieder ausgewaschen. Nach dem

vollständigen Auswaschen konnte evtl. noch eine hohe Konzentration einer Referenzsubstanz gegeben werden. Der maximal blockierbare Strom z.B. durch eine hohe Glibenclamid Konzentration wurde als Basis für die niedrigeren Konzentrationen genommen.

3.6 Auswertung der Experimente

Die Experimente wurden graphisch ausgewertet und die erhaltenen Punkte in einem Graphen aufgetragen. Die Originaldaten wurden für die Berechnung der Mittelpunktskurven herangezogen. In den Abbildungen wurden die Mittelpunktskurven mit Standardabweichung (SEM) dargestellt. Bei Experimenten, die entweder eine stimulierende oder inhibierende Komponente enthielten, wurde zur Beschreibung der Konzentrations-Wirkungsbeziehung die logarithmische Form der Hill-Gleichung in einem *1-Komponenten-Modell* verwendet.

$$y = \frac{A}{1 + 10^{-(n * (x - pk))}} \quad (4)$$

y	Wirkung [%]
A	Amplitude (Maximale Wirkung)
n	Hill-Koeffizient (n_H)
x	neg. log. der eingesetzten Konzentration [mol/l]
pk	$-\log(K)$

Bei Experimenten, die neben einer inhibitorischen auch eine stimulatorischen Komponente enthielten, wurde eine modifizierte Form der Hill-Gleichung in einem *2-Komponenten-Modell* gewählt.

$$y = 100 + \frac{A}{1 + 10^{n_1 * (x - pk_1)}} - \frac{100 + A}{1 + 10^{n_2 * (x - pk_2)}} \quad (5)$$

(Bedeutung der verwendeten Parameter siehe (4))

Die logistische Gleichung wurde verwendet, da sie den pk-Wert liefert; dieser ist, im Gegensatz zum K-Wert, normal verteilt. Für die im Text angegebenen K-Werte (IC_{50} , EC_{50}) wird das nach Gleichung (6) berechnete 95% Konfidenzintervall in Klammern angegeben.

$$y = 10^{-(pIC_{50} \pm 2SEM)} \quad (6)$$

Arithmetrische Mittel werden als \pm Standardfehler (SEM) dargestellt. Die experimentell gewonnenen Daten wurden mit Hilfe des SigmaPlot 6.0 und SigmaStat 2.03 (Statistical Product & Service Solutions Inc.; Chicago (IL) USA) analysiert. Zum Vergleich von Messserien wurden die einzelnen Amplituden und pIC_{50} Werte als normalverteilte Variable (Smirnow-Kolmogorow Test) einer einfachen Varianzanalyse unterzogen und eventuelle Unterschiede mit geeigneten Tests (z.B. t-Test, ANOVA) auf ihr Signifikanzniveau untersucht. Bei nicht normalverteilten Daten wurden nicht die IC_{50}/EC_{50} -Werte, sondern die Mediane von verschiedenen Messungen mit einem RANK-SUM-Test (z.B. Mann-Whitney RANK-SUM-Test, Kruskal-Wallis ANOVA on RANKS) auf Signifikanz untersucht.

3.6.1 Auswertung der DIDS Experimente

Zur Auswertung der DIDS Experimente konnte die Hill-Gleichung nicht herangezogen werden, da die Messwerte nicht normalverteilt waren. Stattdessen wurde der Box-Plot, bei der die Häufigkeitsverteilung dargestellt wird, als graphische Darstellungsform gewählt. Beim Box-Plot ist der Median der entscheidende Wert. Er wird graphisch in der Box als gerade Linie dargestellt. Die Grenzen, der obere und untere Rand des Balkens stellen das 25 % und das 75 % Niveau, das Quartil, dar. Die Fehlerbalken, die durch senkrechte Linien mit der Box verbunden sind, zeigen die 10 % und die 90 % Grenze an. Die Dreiecke über und unter dem Balken stellen das 5 % bzw. 95 % Niveau, das Perzentil, dar.

Aufgetragen wurde auf der Y-Achse der $I(K(ATP))$ vom $I(K(DIDS))$ in Prozent. Zur Vereinfachung wird auf der Y-Achse dann immer vom $I(K(ATP))$ gesprochen.

4 Ergebnisse

4.1 Wirkung von Nukleotiden an $K_{IR}6.2/SUR2A$ -Kanälen

Nukleotide sind als wichtige physiologische Metabolite entscheidend auch an den Regulationsvorgängen in der Zelle, insbesondere des K_{ATP} -Kanals, beteiligt. Zur Regulation des Kanals setzen die Nukleotide zum einen an den beiden Nukleotidbindungsdomänen (NBF = nucleotide-binding-folds (NBF1; NBF2)) des SUR oder direkt an der Kanaluntereinheit ($K_{IR}6.x$) an (s. Kap. 1.2.3.1). Nukleotide haben auf K_{ATP} -Kanäle drei Wirkungen: Hemmung über Bindung am K_{IR} , Refreshment und Stimulation über Bindungshydrolyse am SUR (s. Kap. 1.2.3.2). Die Nukleotiduntersuchungen wurden überwiegend am $K_{IR}6.2/SUR2A$ -Kanal durchgeführt, weil dessen Regulationsmechanismus durch Nukleotide nur unzureichend geklärt ist. Zwar sind die K_{ATP} -Kanäle im Sarkolemma der Kardiozyten im Normalzustand geschlossen, werden aber bei Hypoxie oder Ischämie in Folge der Veränderung des ADP/ATP Verhältnisses in der Zelle geöffnet. Die Regulation über Nukleotide und deren Interaktion mit Sulfonylharnstoffen (s. Kap. 4.2.3) soll bei diesen Experimenten genauer betrachtet werden.

Der Einfluss von verschiedenen Nukleosiddi- und triphosphaten, insbesondere von ATP, ADP und UDP wurde in Abhängigkeit von Mg^{2+} untersucht. Dafür wurden isolierte Membranen in der Inside-Out-Konfiguration (IO) mit Pipe-Lösung, (die Ionenzusammensetzung ähnelt einer intrazellulärer Lösung), umspült (s. Kap. 2.7.3). In dieser Lösung wurde die Mg^{2+} -Konzentration variiert, so dass entweder *Mg-Pipe-Lösung* (0,7 mM freies Mg^{2+}) oder *Mg^{2+} -freie Lösung* (in Wirklichkeit 0,3 μ M freies Mg^{2+}) verwendet wurde (s. Kap. 2.7.3). Die Badlösung für Experimente in der Inside-Out-Konfiguration bestand aus *K-HEPES* (Kap. 2.7.1).

4.1.1 ATP mit und ohne Mg^{2+}

ATP wurde in unterschiedlichen Konzentrationen (3 bis 1000 μ M) in der Inside-Out-Konfiguration am kardialen K_{ATP} -Kanal ($K_{IR}6.2/SUR2A$) eingesetzt. Abb. 17 zeigt einen typischen Experimentverlauf. Bei diesem Experiment wurden kumulativ verschiedene ATP Konzentrationen in nahezu Mg^{2+} -freier Lösung (0,3 μ M freies Mg^{2+}) appliziert, wodurch eine konzentrationsabhängige Hemmung von $K_{IR}6.2/SUR2A$ zu beobachten war.

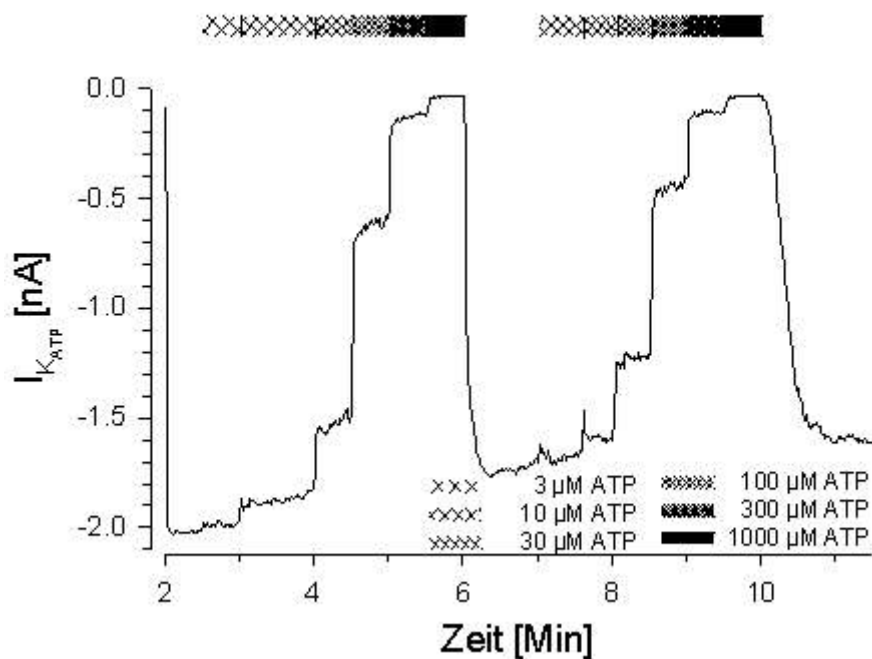


Abb. 17 ATP hemmt konzentrationsabhängig $K_{IR6.2/SUR2A}$

Dargestellt ist ein Inside-Out-Patch mit $K_{IR6.2/SUR2A}$ -Kanälen. In nahezu magnesiumfreier Lösung ($0,3 \mu\text{M}$ frei) wurden kumulativ verschiedene ATP-Konzentrationen getestet.

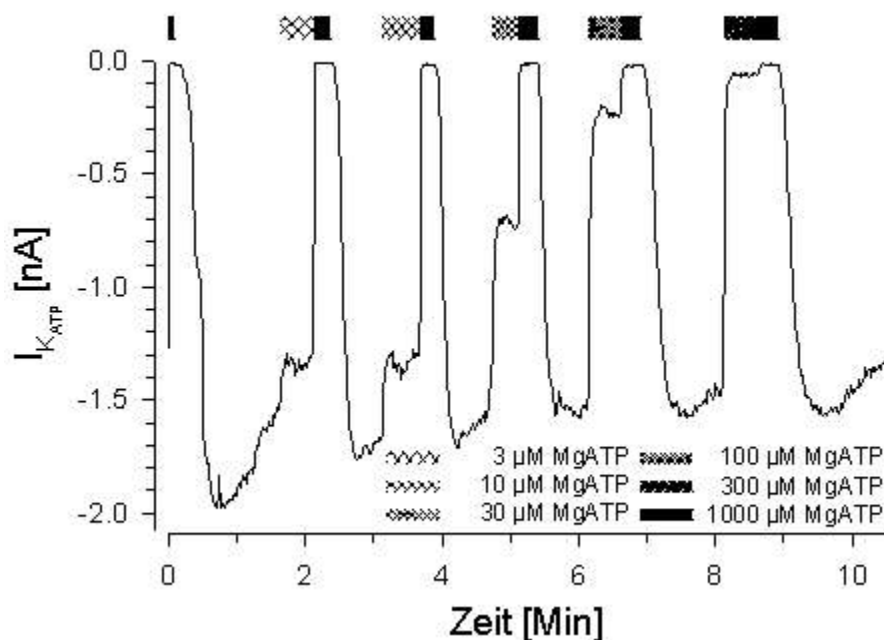


Abb. 18 MgATP hemmt konzentrationsabhängig den $K_{IR6.2/SUR2A}$

Dargestellt ist ein Inside-Out-Patch mit $K_{IR6.2/SUR2A}$ -Kanälen. Nach dem Herausreißen entwickelte sich spontan ein Strom, wobei sehr bald Rundown sichtbar wird. Nach einer Waschphase wurde $3 \mu\text{M}$ ATP appliziert. Anschließend wurden die Kanäle mit 1mM MgATP vollständig geschlossen. Dieser Kreislauf (Auswaschen, ATP $x \mu\text{M}$, ATP 1mM) wurde bei $10, 30, 100$ und $300 \mu\text{M}$ ATP wiederholt. Der Rundown ist in diesem Experiment relativ gering (vgl. Abb. 21).

Die Anwesenheit von freiem Mg^{2+} in der Lösung erforderte wegen des einsetzenden Rundown ein anderes Experimentdesign. Abb. 18 zeigt exemplarisch eine Kurve, bei der 0,7 mM freies Mg^{2+} in der Lösung vorlag. MgATP wurde zuerst in einer niedrigen Konzentration appliziert, auf welche die maximale (1 mM MgATP) kumulativ folgte. Am deutlichsten beim 1.

Auswaschen des MgATPs, abgeschwächt aber auch später, ist Refreshment sichtbar. Nach dem Auswaschen wurde dieser Zyklus mit einer höheren ATP Konzentration fortgesetzt, worauf wieder 1 mM MgATP mit nachfolgendem Auswaschen folgte.

Die Auswertung der Experimente ergab, dass die IC_{50} in Anwesenheit von Mg^{2+} ungefähr um das Dreifache nach rechts verschoben ist (12 μM zu 30 μM) (Abb. 19).

Tab. 4.1 Hemmung von K_{ATP} -Kanälen durch ATP in An- und Abwesenheit von Mg^{2+}

Kanal	Konfiguration	ATP		MgATP	
		IC_{50} [μM]	n_H	IC_{50} [μM]	n_H
$K_{IR6.2/SUR2A}$	Inside-Out-	12 [6 ; 21]	$1,05 \pm 0,07$	30 [25 ; 36]	$1,16 \pm 0,13$

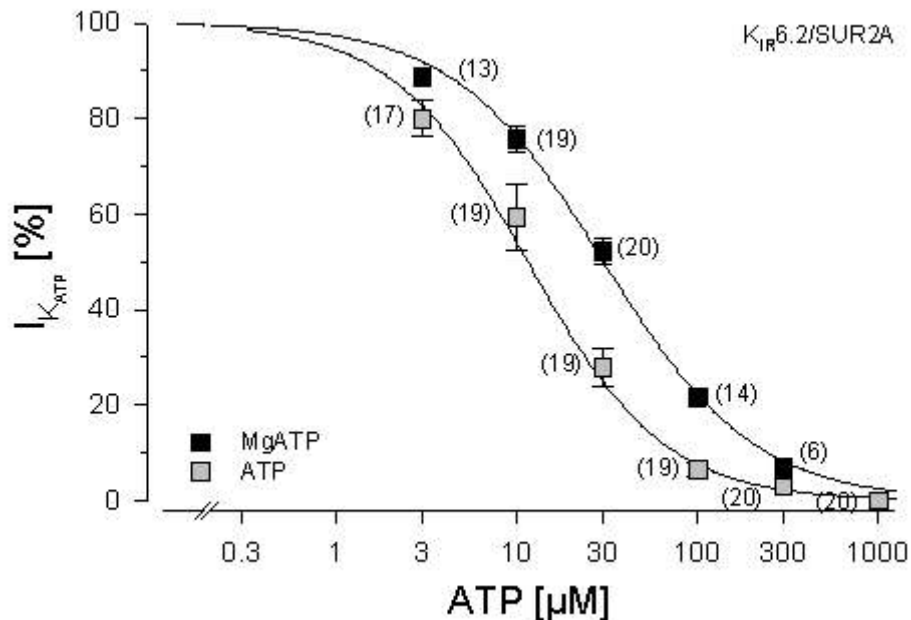


Abb. 19 Hemmung von ATP in An- und Abwesenheit von Mg^{2+} beim $K_{IR6.2/SUR2A}$

ATP Konzentrationswirkungskurven in Mg^{2+} -reicher (0,7 mM frei) und Mg^{2+} -armer (0,3 μM frei) Lösung an $K_{IR6.2/SUR2A}$ -Kanälen. Die IC_{50} , die aus den verschiedenen ATP und MgATP Konzentrationen ermittelt wurden, betragen 12 μM und 30 μM .

4.1.2 ATP-regenerierendes System

Die Empfindlichkeit von K_{ATP} -Kanälen (vor allem mit SUR2-Untereinheiten) schwankt stark (Baukrowitz et al., 1998) und nimmt mit der Zeit ab (Song und Ashcroft, 2001a). Um auszuschließen, dass ADP, das aus hydrolysiertem ATP entstanden sein könnte, für diese Verschlechterung des ATP-Blocks verantwortlich ist, wurde ein ATP-regenerierendes System eingesetzt und an $K_{IR}6.2/SUR2A$ -Kanälen untersucht. Das ATP-regenerierende System bestand aus Phosphokinase (50 u/ml) und Kreatinphosphat (20 mM) und wurde der ATP-Lösung (*Mg-Pipe; Kap. 2.7.3*) zugesetzt. Zusätzlich wurde die Lösung in den Vorratsgefäßen während des Experiments mit Eispacks gekühlt. Durch die dünnen Schläuche der Perfusionsapparatur erwärmte sich die Lösung bis zum Erreichen der Messkammer auf Raumtemperatur.

Ein weiterer Aspekt in diesem Zusammenhang ist das durch MgATP bewirkte Refreshment (vgl. Abb. 18 und 21). Es könnte sein, dass ADP, welches bei der Hydrolyse von ATP gebildet wird, für dieses Phänomen zuständig ist. Somit sollte bei einem völligen Fehlen von ADP ein Refreshment nicht vorkommen.

Die Wirkung von 0,1 mM oder 1 mM MgATP wurde in An- und Abwesenheit des regenerierenden Systems untersucht. Nach einer ATP-Gabe ohne regenerierendes System folgte eine ATP-Gabe mit dem regenerierenden System. Die beiden Konzentrationen wurden nach einer Auswaschphase abwechselnd in ein und demselben Experiment appliziert.

Der Einfluß des ATP-regenerierenden Systems auf die Größe des ATP-Blocks (und somit die Hydrolyse zu ADP) wurde in 14 Experimenten untersucht (*Tab. 4.2*). Ausgewertet wurden die Daten im Hinblick auf das Ausmaß des ATP-Block und das Vorhandensein eines Refreshment.

Bei 0,1 mM ATP und Zugabe des regenerierenden Systems war der ATP-Block in vier Experimenten (29 %) gleich blieb und in 10 Experimenten (71 %) verbessert wurde, nie jedoch verschlechtert. Statistisch sind diese Ergebnisse wegen fehlender Kontrolldaten ohne ATP-regenerierende System nicht ohne Weiteres auszuwerten. Aus Experimenten, die ohne das ATP-regenerierende System durchgeführt wurden, ist bekannt, dass der ATP-Block mit der Zeit nachlässt (vgl. z.B. Abb. 44 bzw. Song und Ashcroft, 2001a). Es wurden deshalb 14 Experimente angenommen, bei denen der ATP-Block gleich blieb. Da ja höchstens eine Verschlechterung des Block zu erwarten ist (eine Verbesserung des Blocks wird normalerweise nicht gesehen), ist dies die ungünstigste Annahme. Beim Vergleich der fiktiven Experimente

(14mal ATP-Block gleich geblieben; 0mal verbessert) mit den Ergebnissen bei mit ATP-regenerierendem System bei 0,1 mM ATP (4mal ATP-Block gleich geblieben; 10mal verbessert) mit dem Chi-Quadrat Test zeigt sich eine signifikante Verbesserung des ATP-Blocks durch das ATP-regenerierende System.

Bei 1 mM MgATP war eine Verbesserung des ATP-Blocks durch das ATP-regenerierende System nur in 22 % der Fälle beobachtet worden (*Tab. 4.2*). Da der ATP-Block bei 0,1 mM MgATP stärker beeinflusst wurde, ist mit der Unvollständigkeit des ATP-Blocks bei 0,1 mM ATP (50-90 %; s. *Kap. 4.1.1*) zu erklären. Bei 1 mM MgATP kann eine Verbesserung des ATP-Blocks durch die fast vollständige Hemmung maskiert worden sein und wurde wahrscheinlich deshalb seltener beobachtet.

Tab.4.2 ATP-Verhältnis in An-und Abwesenheit des ATP regenerierenden Systems

ATP [mM]	ATP - Reg. Sys. / ATP [Block]				Refreshment vorhanden			
	gleich		besser		ja		nein	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)
0,1	4	29	10	71	1	7	13	93
1,0	7	78	2	22	6	67	3	33

Die Auswertung von 14 Experimenten in Bezug auf das Refreshment wird im Folgenden betrachtet. Nach Applikation des ATP regenerierenden Systems zeigte sich bei 0,1 mM MgATP nur in sieben Prozent der Experimente ein Refreshment (vergleichbare Daten ohne das regenerierende System existieren nicht; ein Vergleich mit den Daten aus den gleichen Experimenten ist nicht möglich, da das Refreshment stark zeitabhängig ist (vgl. [Abb. 18](#)) und in diesen Experimenten das ATP-regenerierende System immer der alleinigen ATP-Applikation folgte). Bei 1 mM MgATP konnten als Referenzen Daten verwendet werden, die mit einem ähnlichen Protokoll ohne ATP regenerierendes System ermittelt wurden (69 % ein Refreshment (n = 59), 31 % kein Refreshment (n = 26)). Beim Einsatz des ATP regenerierenden Systems wurden in 67 % ein Refreshment erzielt, in 33 % der Fälle konnte kein Refreshment beobachtet werden. Das ATP regenerierende System hat somit keinen Einfluss auf das Refreshment.

Da bei 0,1 mM MgATP nur ein Experiment ein Refreshment zeigte und bei 1 mM MgATP nur bei zwei Experimenten ein verbesserter ATP-Block mit dem ATP-regenerierenden

System zu sehen ist, ist es nicht möglich festzustellen, ob zwischen Refreshment und ATP-Block ein Zusammenhang besteht.

4.1.3 ADP mit und ohne Mg^{2+}

Die Interaktion von ADP, dessen Konzentration während Ischämie oder Hypoxie (vor allem in Kardiomyozyten) ansteigt, mit dem K_{ATP} -Kanal, kann die Wirkung von Sulfonylharnstoffen insbesondere des herzselektiven HMR1883 beeinflussen und wurde hier untersucht.

In Mg^{2+} -armer Lösung ist ADP, ähnlich wie ATP (vgl. Abb. 18), ausschließlich ein $K_{IR6.2/SUR2A}$ -Kanal Blocker. Die IC_{50} Werte sind allerdings im Vergleich mit ATP fast um das 75-fache nach rechts verschoben ($IC_{50(ATP)} = 12 \mu M$; $IC_{50(ADP)} = 851 \mu M$). Die Hemmung durch ADP wurde auch am $K_{IR6.2/SUR2B}$ (Abb. 20) untersucht, der ungefähr doppelt so empfindlich ist wie der kardiale Kanal. Die genauen Hemmkonstanten (IC_{50} , nH, A) sind in Tabelle 4.3 zu finden.

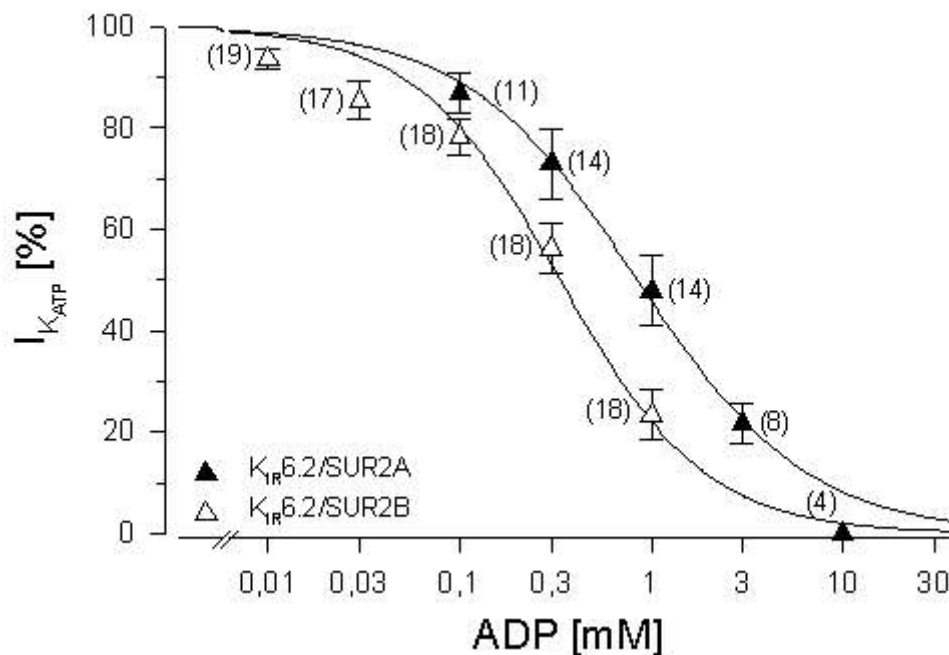


Abb. 20 ADP hemmt sowohl $K_{IR6.2/SUR2A}$ - und $K_{IR6.2/SUR2B}$ -Kanäle
In Abwesenheit von Mg^{2+} hemmt ADP $K_{IR6.2/SUR2A}$ und $K_{IR6.2/SUR2B}$ -Kanäle im millimolaren Bereich.

Liegt $0,7 \text{ mM}$ freies Mg^{2+} vor (Lösungszusammensetzung Kap. 2.7.3), so sieht man dagegen bei niedrigen ADP-Konzentrationen eine Steigerung der Kanalaktivität (Abb. 21). Dabei wurde zwischen jeder $MgADP$ -Gabe (30 s) 30 s ausgewaschen und danach für 15 s

MgATP (1 mM) gegeben. Der Rundown war während der ADP Applikation sehr stark vermindert bis nicht vorhanden, wohingegen in ADP-freier Lösung der Rundown unverändert weiterging. Der K_{ATP} -Strom konnte durch MgADP ungefähr verdoppelt werden (Abb. 22). Eine Aktivierung war mit bis zu 300 μM MgADP zu registrieren. Höhere ADP-Konzentrationen führen dagegen, wie in Abwesenheit von Mg^{2+} beschrieben wurde, zu einer vollständigen Hemmung der K_{ATP} -Kanäle (Abb. 21 und 22). Auffällig ist hier auch die außerordentlich starke Streuung der Messwerte (Abb. 22), die zu weiteren Auswertungen angeregt hat (siehe Kap. 4.1.4 und Diskussion).

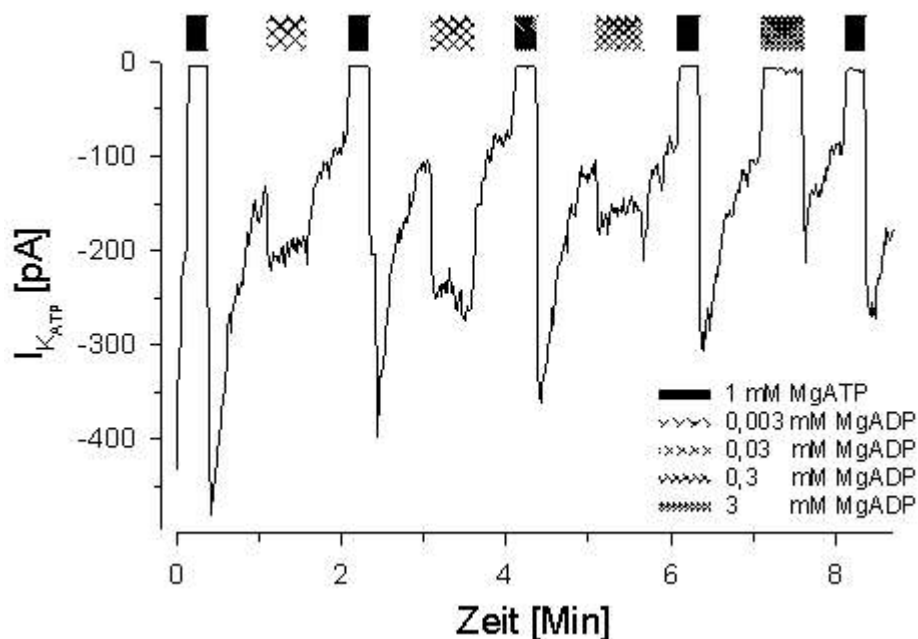


Abb. 21 MgADP aktiviert $K_{IR6.2/SUR2A}$ -Kanäle

Es wurde für 30 Sekunden ADP gegeben, gefolgt von einer Waschphase für 30 Sekunden und nachfolgender ATP Gabe von 15 Sekunden. Nach einer erneuten Waschphase von 45 Sekunden konnten weitere ADP-Konzentrationen untersucht werden. 3 μM aktivieren zu 165 %, 30 μM zu 263 %, 300 μM zu 159 % und 3 mM hemmen vollständig

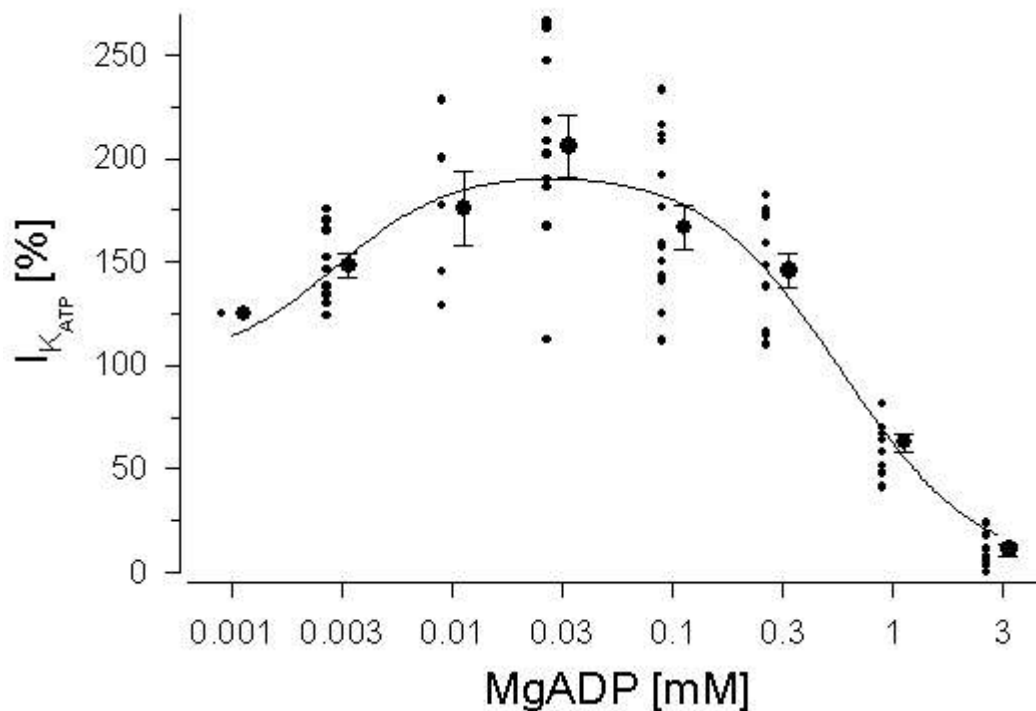


Abb. 22 Konzentrations-Wirkungsbeziehung von MgADP bei $K_{IR}6.2/SUR2A$ -Kanälen

Die Punkte welche die Einzelergebnisse der Wirkung von MgADP repräsentieren und die Mittelwerte mit SEM sind aus Gründen der Klarheit etwas nach rechts und links verschoben. Der Fit einer Hill-Funktion mit zwei Komponenten (Formel 4) ergibt eine maximale Aktivierung von $95 \pm 15\%$; $pk_1=5,5 \pm 0,1$ mit $n_1=1,6 \pm 1,3$ und $pk_2=3,2 \pm 0,1$ mit $n_2=1,4 \pm 0,3$.

Tab. 4.3 Aktivierende und Hemmende Wirkung von ADP in Abhängigkeit von Mg^{2+}

Kanal	MgADP			ADP		
	IC_{50}	n_H	A	IC_{50}	n_H	A
	[μM]		[%]	[μM]		[%]
$K_{IR}6.2/SUR2A$ aktivierend	2,93	$1,61 \pm 1,38$	95 ± 15			
	[1,53 ; 5,62]					
hemmend	577	$1,78 \pm 2,06$	196 ± 12	845	$0,98 \pm 0,16$	100
	[389 ; 838]			[619 ; 1155]		fix
$K_{IR}6.2/SUR2B$ hemmend				335	$1,15 \pm 0,11$	100
				[285 ; 393]		fix

4.1.4 ATP und ADP und Rundown

Es sollte die Hypothese geprüft werden, ob die Stärke des Rundowns mit der Wirkung von ATP bzw. ADP zusammenhängt. Dazu wurde die Veränderung des Stroms durch die

Nukleotide bei verschiedenen Konzentrationen gegen den Stromverlust mit der Zeit (Rundown/Minute) in dem jeweiligen Patch aufgetragen (Abb. 23). Grundlage für diese Auswertung waren die Experimente, die in Gegenwart von Mg^{2+} durchgeführt wurden (vgl. Kap. 4.1.1 und 4.1.3). Die linearen Regressionen der Hemmwirkung der einzelnen ATP-Konzentrationen (0,003 mM - 1 mM MgATP) in Beziehung zum Rundown die im linken Teil von Abb. 23 dargestellt ist, läßt keine deutliche Korrelationen erkennen. Die Korrelationskoeffizienten r^2 liegen alle unter 0,2 (Tab. 4.4). Deutlich anders ist die Situation bei ADP. Bei allen ADP Konzentrationen, bei denen die Aktivierung überwiegt (bis 0,1 mM, siehe Kap. 4.1.3) besteht ein Zusammenhang Stromerhöhung und Rundown ($r^2 = 0,5$; Tab. 4.4). D.h. Patches, die einen starken Rundown zeigen, werden auch stark von ADP aktiviert.

Im Bereich der Hemmung gibt es wie bei ATP keine Korrelation zwischen dem Ausmaß der Hemmung und dem Rundown in dem jeweiligen Patch.

Tab. 4.4 Ergebnisse der Regressionen aus Abb. 23. Wirkung von ATP / ADP auf $K_{IR}6.2/SUR2A$

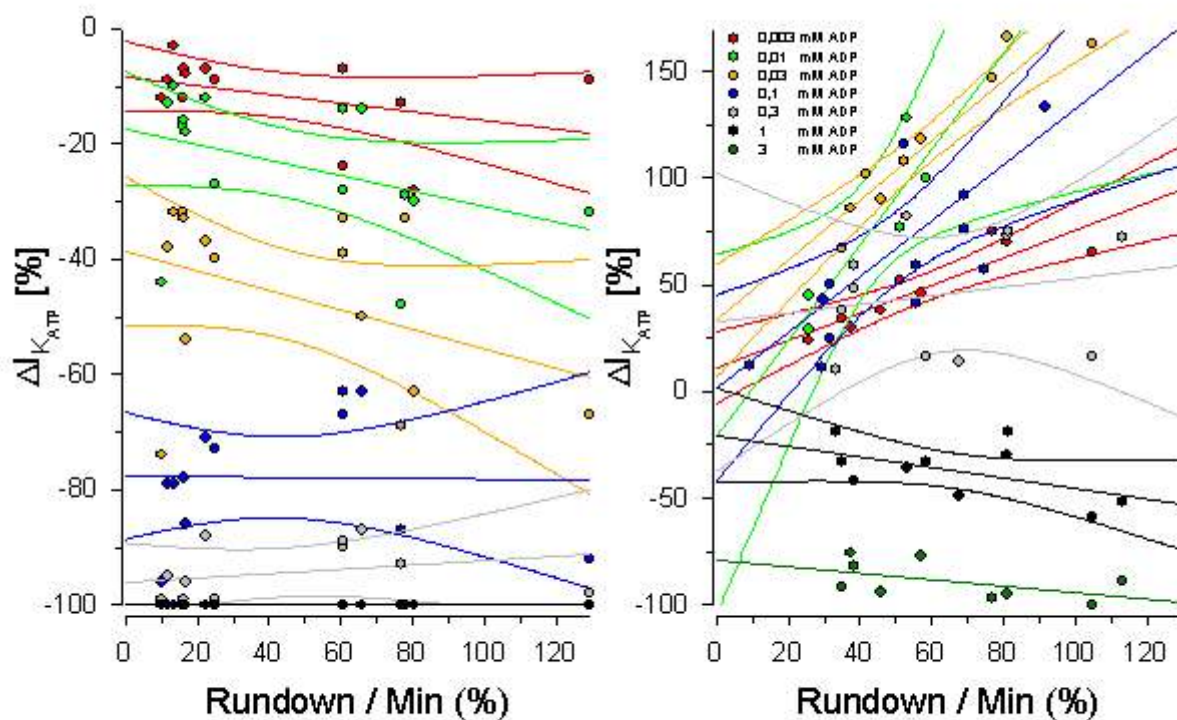


Abb. 23 Wirkung von ATP bzw. ADP in Relation zum Rundown von $K_{IR}6.2/SUR2A$ in IO-Patches
Dargestellt sind die linearen Regressionen, bei denen die Wirkung der unterschiedlichen MgATP- (links) und ADP-Konzentrationen (rechts) zum Rundown in den jeweiligen Experimenten ins Verhältnis gesetzt wurden. Die verwendeten Konzentrationen waren 0,003 mM (rot), 0,01 mM (grün), 0,03 mM (gelb), 0,1 mM (blau), 0,3 mM (grau) 1 mM (schwarz) und 3 mM (dunkelgrün, nur ADP). Die Daten der linearen Regression sind in Tab. 4.4 aufgeführt.

MgATP [mM]	Achsenabschnitt	Steigung	r ²
0,003	8,25	0,08	0,16
0,01	17,33	0,13	0,17
0,03	38,57	0,17	0,16
0,1	77,59	< 0,01	< 0,01
0,3	95,93	-0,04	0,07
1,0	100	0	0
MgADP [mM]	Achsenabschnitt	Steigung	r ²
0,003	11,48	0,64	0,80
0,01	-20,35	2,24	0,78
0,03	33,33	1,40	0,89
0,1	1,70	1,31	0,50
0,3	32,56	0,21	0,04
1,0	-20,40	-0,25	0,28
3,0	-79,10	-0,15	0,27

4.1.5 ADP in Gegenwart von Mg²⁺ und ATP

MgADP wurde in Gegenwart von 0,1 mM MgATP untersucht. 0,1 mM MgATP schließt den K_{IR}6.2/SUR2A Kanal zu 50-90 %. Nach einer Waschphase für 45 Sekunden wurde für jeweils 30 Sekunden 0,1 mM MgATP gegeben. Darauf folgten die zu untersuchenden MgADP Konzentrationen (0,03 / 0,1 / 1,0 mM) in Gegenwart von 0,1 mM MgATP. Anschließend wurde für jeweils 30 Sekunden wieder mit 0,1 mM MgATP, danach mit Waschpuffer ausgewaschen. Dann folgte eine MgATP-Konzentration von 1,0 mM. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abb. 24 zu sehen. Eine EC₅₀ von über 100 µM für die Aktivierung bedeutet eine starke Rechtsverschiebung (vgl. Kap. 4.1.3) und eine hemmende Komponente ist bei den hier verwendeten Konzentrationen nicht vorhanden.

Weiterhin stellte sich die Frage, ob die aktivierende Wirkung von MgADP und die hemmende Wirkung von MgATP miteinander korrelieren. Dazu wurde die Wirkung von 30 µM ADP und 30 µM ATP in Gegenwart von 0,7 mM Mg²⁺ am gleichen Patch verglichen. Eine maximale Aktivierung war mit 30 µM ADP erzielt worden (s. Kap. 4.1.3), während 30 µM ATP

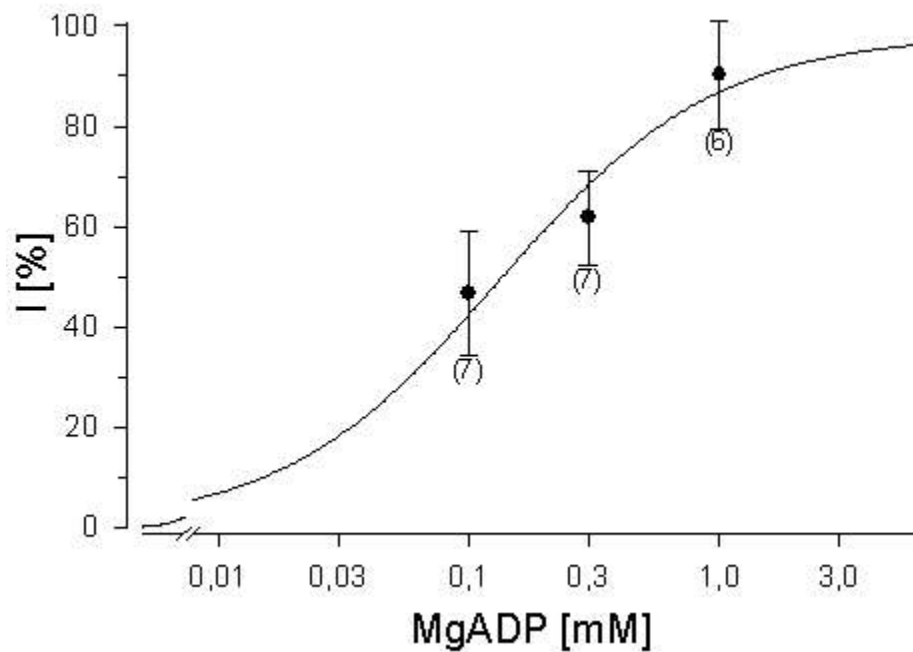


Abb. 24 Konzentrationswirkungskurve von ADP in Anwesenheit von MgATP (0,1 mM) mit $K_{IR6.2/SUR2A}$ -Kanälen

Verschiedene ADP-Konzentrationen wurden mit 0,1 mM ATP zusammen appliziert. Als 100 % wurde der Strom (I) in ATP freier Lösung definiert, als 0 % der in Gegenwart von 0,1 mM MgATP. Die halbmaximale Aktivierung durch ADP lag unter diesen Bedingungen bei 132 μ M [739 ; 238]. Die Amplitude wurde mit 98 ± 17 % Aktivierung bestimmt (n_H war auf 1 festgesetzt).

$K_{IR6.2/SUR2A}$ -Kanäle zu ca. 50 % blockieren (s. Kap. 4.1.1). Trägt man die Aktivierung durch ADP gegen die Hemmung mit ATP auf, so ergibt sich demzufolge ein Zusammenhang, bei dem ein schwacher ATP-Block eine gute ADP-Aktivierung bedeutet (Abb. 25). Die Korrelation ist allerdings mit $r^2 = 0,21$ nur sehr schwach.

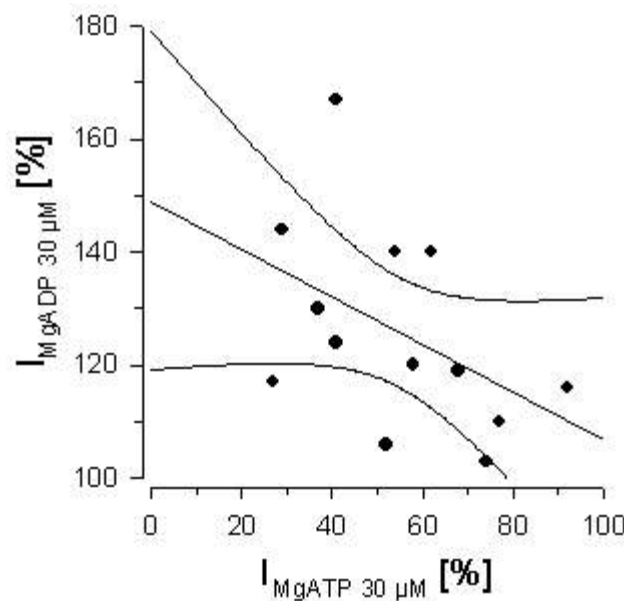


Abb. 25 Erhöhung des Stroms durch 0,03 mM MgADP in Anwesenheit von 0,03 mM MgATP bei $K_{IR6,2}/SUR2A$ -Kanälen

Dargestellt ist die lineare Regression mit dem 95 % Konfidenzintervall. Die Steigung der Regressionsgeraden beträgt $-0,42$ bei einem y-Achsenabschnitt von 149 ($r^2 = 0,21$)

4.1.6 MgUDP in Ab- und Anwesenheit von ATP

MgUDP öffnet wie MgADP in Abwesenheit von ATP K_{ATP} -Kanäle (Findlay, 1988, Lederer und Nichols, 1989).

In einem Vorversuch wurde UDP (0,1 mM) in magnesiumhaltiger Lösung (*s. Kap. 2.7.3*) in Abwesenheit von ATP untersucht. Es wurde eine schnelle Aktivierung der kardialen K_{ATP} -Kanäle ($K_{IR6,2}/SUR2A$) durch MgUDP registriert, die beim Auswaschen reversibel war. In diesem Experiment mit mehreren UDP Applikationen war eine Stromerhöhung von 30 % bis 50 % durch 0,1 mM UDP zu erkennen. Unter dem Einfluß von UDP war ähnlich wie bei ADP der Rundown sehr stark vermindert (siehe auch Alekseev et al., 1998). Trotzdem war der Rundown insgesamt sehr groß, so dass eine Auswertung schwierig gewesen wäre.

Um diesen Zeittrend zu minimieren und deutlicher messbare Effekte zu bekommen, wurden unterschiedliche UDP-Konzentrationen (0,03-10 mM UDP) zu einer MgATP-Konzentration gegeben, die den K_{ATP} -Kanal zu 50-90 % blockierte (0,1 mM ATP; analog wie in *Kap. 4.1.5*). Die Applikation von UDP konnte kumulativ geschehen. Abhängig von der eingesetzten UDP-Konzentration konnte eine Steigerung des Stroms in Anwesenheit von ATP

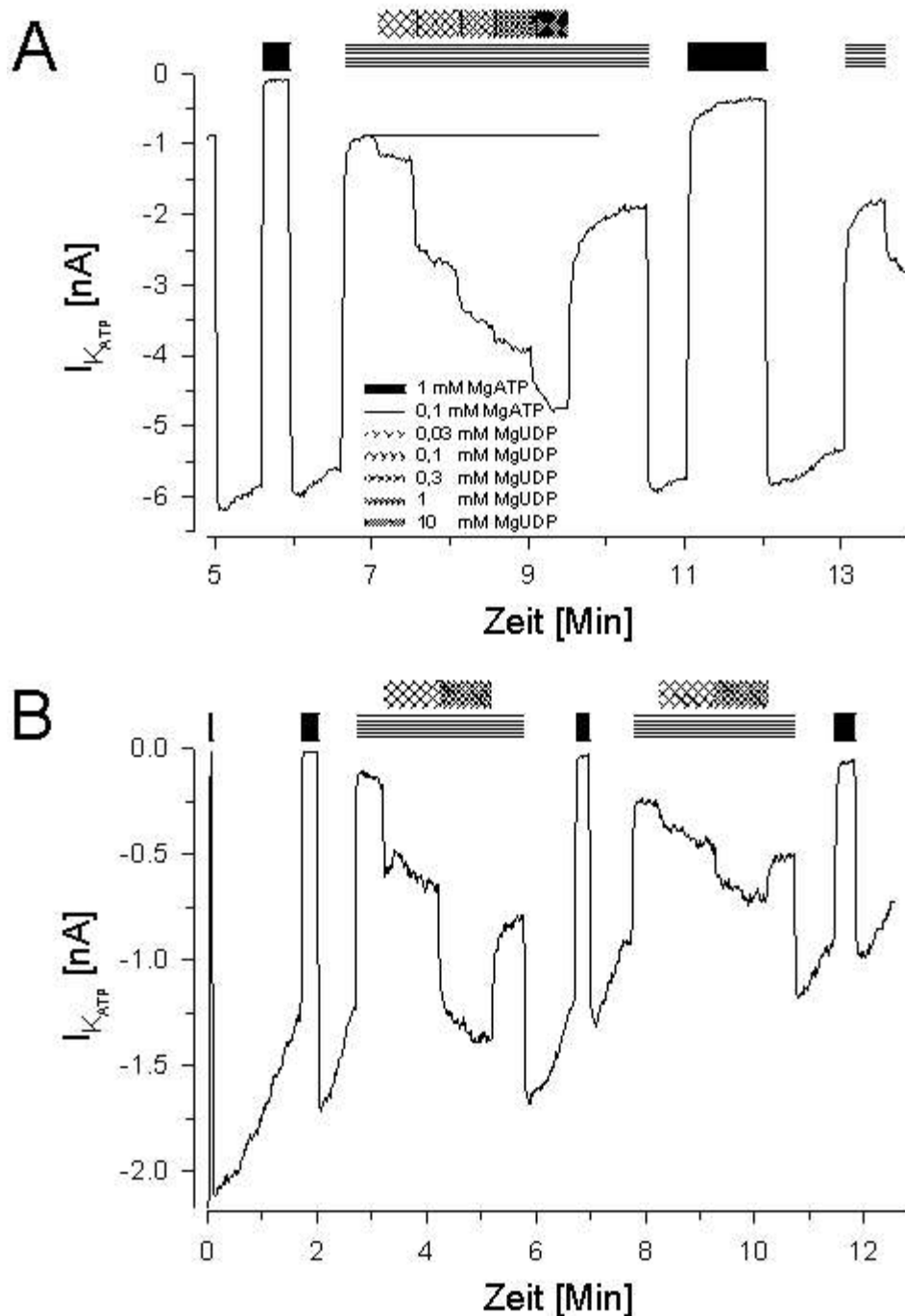


Abb. 26 MgUDP aktiviert $K_{IR6.2}/SUR2A$ -Kanäle im *IO-Patch*

A: Nach einer Hemmung durch MgATP (1 mM) und nach dessen Auswaschen wurde der $K_{IR6.2}/SUR2A$ mit 0,1 mM MgATP geblockt. Es wurden dann 0,03 bis 10 mM MgUDP appliziert, was die Kanäle konzentrationsabhängig aktiviert. Die waagerechte Linie stellt die Bezugslinie für die Extrapolation des MgATP-Blocks (0,1 mM) dar. **B:** Experimentdesign wie in A, aber nur 0,1 und 1,0 mM MgUDP getestet. Dieses Experiment wurde als Beispiel für die teilweise sehr langsame Reversibilität der Kanal-Aktivierung durch MgUDP gewählt.

beobachtet werden (Abb. 26A). Trotz der beträchtlich schwankenden Werte für den ATP Block, welches die Auswertung stark erschwerte, wurde ein EC_{50} Wert für die UDP Aktivierung von ca.

150 μM ermittelt (Abb. 27). Das Auswaschen des UDP scheint in zwei Schritten zu verlaufen; unmittelbar nach dem Umschalten bleibt der Strom in Anwesenheit von 0,1 mM ATP deutlich höher als vorher (Abb. 26B). In 11 Experimenten (mit zum Teil mehreren Durchläufen) wurde vor der UDP-Gabe der Strom von 0,1 mM ATP zu durchschnittlich $80 \pm 3\%$ gehemmt, während er danach nur zu $58 \pm 3\%$ gehemmt war. Diese beiden Werte unterscheiden sich hochsignifikant voneinander ($p < 0,001$; $n = 25$, gepaarter t-Test). Waschen des Patches mit 1,0 mM ATP und ATP-freier Lösung (siehe Abb. 26) führt zu einer Vergrößerung des Blocks durch 100 μM ATP von $63 \pm 6\%$ auf $75 \pm 5\%$, eine signifikante Steigerung ($p < 0,005$, $n = 9$). Betrachtet man nur die 2. UDP Applikation, so ist auch hier der ATP-Block (75 % s.o.) nach UDP wieder signifikant ($p < 0,001$) auf $57 \pm 6\%$ reduziert. Die Zeitkonstante dieser langsamen Komponente beim Auswaschen von UDP liegt im Minutenbereich (Abb. 26). Mit UDP alleine (d.h. in Abwesenheit von MgATP, 6 UDP Applikationen in einem Experiment) war diese langsame Komponente nicht zu sehen. Genauere Untersuchungen sind dazu nicht gemacht worden.

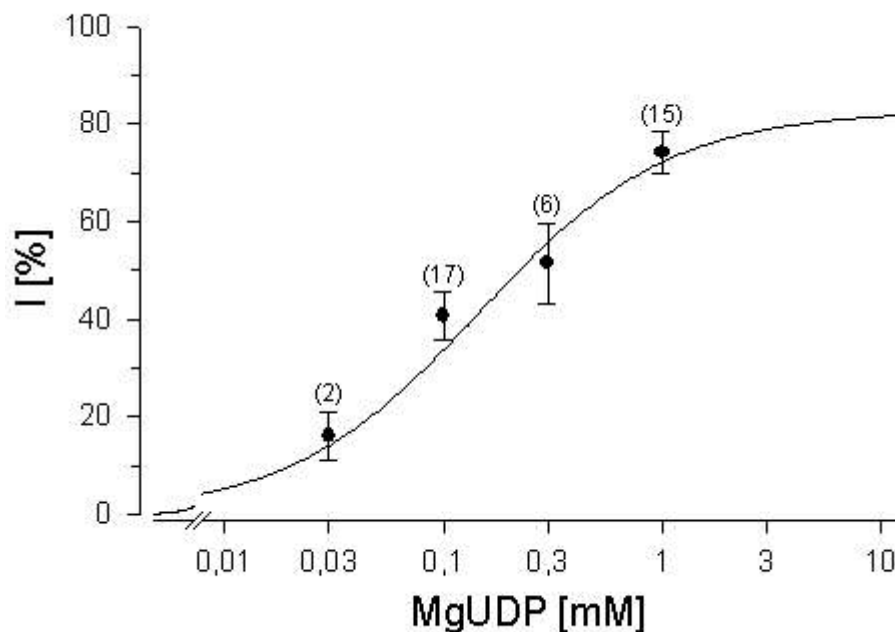


Abb. 27 Konzentrationswirkungskurve von UDP in Anwesenheit von MgATP (0,1 mM) mit $K_{IR}6.2/SUR2A$ -Kanälen

Verschiedene UDP-Konzentrationen wurden mit 100 μM ATP kombiniert appliziert. Normierung des Stroms wie in Abb. 24. UDP zeigte in Gegenwart von ATP eine deutliche Aktivierung des durch ATP geschlossenen Kanals. Die halbmaximale Aktivierung beträgt 146 μM [99 ; 214] (n_H festgelegt auf 1). Die Amplitude wurde mit $82 \pm 9\%$ Aktivierung ermittelt.

Auch bei diesen Experimenten wurde untersucht, ob die Größe der Aktivierung durch UDP mit der Hemmwirkung des ATPs korreliert (Abb. 28, Tab. 4.5). Bei 0,1 mM UDP ist eine deutlichere Korrelation zu beobachten als bei ADP (siehe Abb. 24), mit $r^2=0,53$ ist sie aber immer noch relativ schwach. Bei höheren UDP-Konzentrationen besteht kein Zusammenhang mehr.

Tab. 4.5 Parameter der Regression in Abb. 28

MgUDP [mM]	Achsenabschnitt	Steigung	r
0,1	128,15	-1,08	0,53
0,3	57,17	-0,07	<0,01
1,0	101,59	-0,34	0,08

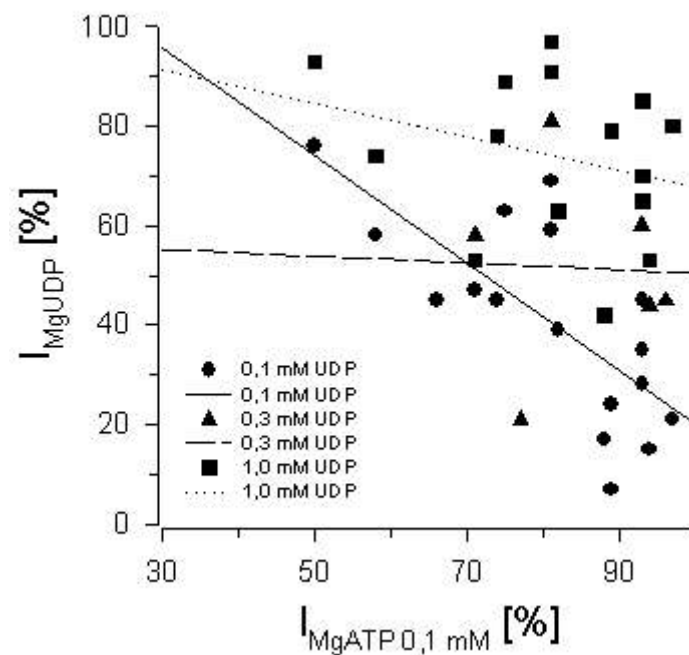


Abb. 28 Korrelation zwischen der Aktivierung durch MgUDP (0,1, 0,3 und 1 mM) und der Hemmung mit 0,1 mM MgATP

Daten wiedergegeben wie in Abb. 24. Eine Korrelation ist nur bei 0,1 mM MgUDP zu beobachten. Die Daten der Linearen Regression stehen in Tab. 4.5.

4.2 K_{ATP} -Kanal-Blocker

4.2.1 Glibenclamid

Glibenclamid (Strukturformel *Kap. 1.2.4.2*) ist ein hochpotenter Sulfonylharnstoff, der den pankreatischen K_{ATP} -Kanal mit nanomolarer Potenz hemmt ($IC_{50} \sim 1-5$ nM); bei 10-20-fach höheren Konzentrationen hemmt Glibenclamid aber auch die kardiovaskulären K_{ATP} -Kanäle. Glibenclamid ist als Standardblocker der K_{ATP} -Kanäle anzusehen.

Ziel dieser Untersuchungen war der systematische Vergleich der Hemmung der kardiovaskulären K_{ATP} -Kanäle durch Glibenclamid in der Ganzzell- vs. der Inside-Out-Patch-Konfiguration der Saugelkrodeentechnik. Solche Daten mit rekombinanten Kanälen, exprimiert in Säugerzellen, liegen bisher noch nicht vor. Von besonderem Interesse ist, weil bisher noch nie untersucht, der Vergleich der Hemmung der $K_{IR}6.1/SUR2B$ - und $K_{IR}6.2/SUR2B$ -Kanäle gewesen, d.h. der K_{ATP} -Kanäle im Gefäß und in glatter Muskulatur außerhalb der Gefäße. Zusätzlich zu den Wildtyp-Kanälen wurden auch die entsprechenden Mutanten $K_{IR}6.x/SUR2B(Y1206S)$ gemessen, die eine höhere Affinität für Glibenclamid haben.

Abb. [29](#) zeigt ein Beispielexperiment für die Experimente mit $K_{IR}6.2/SUR2B$ in der Ganzzellkonfiguration und Abb. [30](#) die Konzentrations-Hemmkurven der Wildtyp- und der Mutanten- $K_{IR}6.x/SUR2B$ -Kanäle in dieser Konfiguration. Die Parameter der Hemmkurven sind in *Tab. 4.7* zusammengestellt. Glibenclamid hemmt die Wildtyp $K_{IR}6.1/SUR2B$ - und $K_{IR}6.2/SUR2B$ -Kanäle mit IC_{50} Werten von 43 nM (33 ; 55) und 167 nM (103 ; 270) (*Tab. 4.7*). Dies zeigt, dass die $K_{IR}6.2$ -Kanäle eine ungefähr viermal schwächere Affinität für Glibenclamid haben als die $K_{IR}6.1$ -Kanäle. Die SUR2B Hochaffinitätsmutanten für Glibenclamid (Y1206S) gaben IC_{50} Werte von 2,7 nM (2,1 ; 3,5) für $K_{IR}6.1/SUR2B(Y1206S)$ Kanäle und 13 nM (6 ; 28) für $K_{IR}6.2/SUR2B(Y1206S)$ Kanäle. Auch bei den Mutanten-Kanälen ergibt sich für Glibenclamid eine ca. fünfmal höhere Potenz bei der Hemmung der $K_{IR}6.1$ -Kanäle im Vergleich mit den $K_{IR}6.2$ -Kanälen, ähnlich wie bei den Wildtyp-Kanälen gefunden wurde. Betrachtet man den Effekt der Mutation Y1206S auf die Potenz von Glibenclamid, so ergibt sich eine ca. 16-fach höhere Potenz für die $K_{IR}6.1$ -Kanäle; bei den $K_{IR}6.2$ -Kanälen ist der Unterschied 13-fach (Abb. [30](#), *Tab. 4.7*)

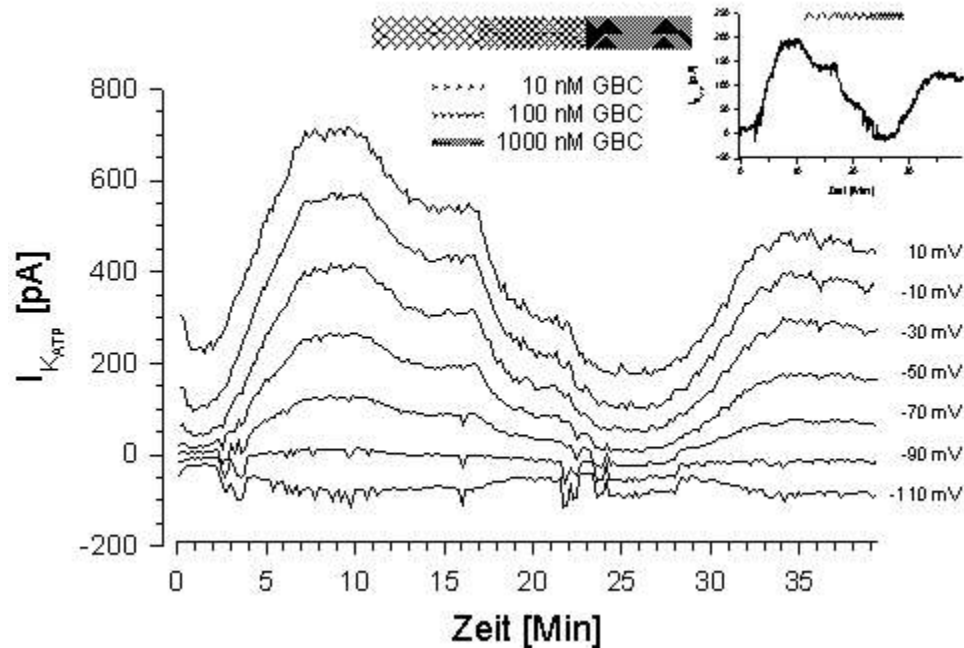


Abb. 29 Hemmung von $K_{IR6.2}/SUR2B$ -Kanälen durch Glibenclamid in der Ganzzellmessung

Die Beispielspur zeigt die Stromentwicklung einer WC-Messung. Die Spannung wurde von -110 bis $+10$ in 20 mV Schritten variiert. Während der Dialyse der Zelle mit 1 mM MgATP / $0,3$ mM MgGTP entwickelte sich ein Strom, der durch GBC ($0,01$, $0,1$, und 1 μ M) konzentrationsabhängig gehemmt wurde. GBC konnte, zumindest teilweise, wieder ausgewaschen werden, was an einer erneuten Stromentwicklung zu sehen ist. Das kleine Bild zeigt den Strom-Zeitverlauf bei -60 mV.

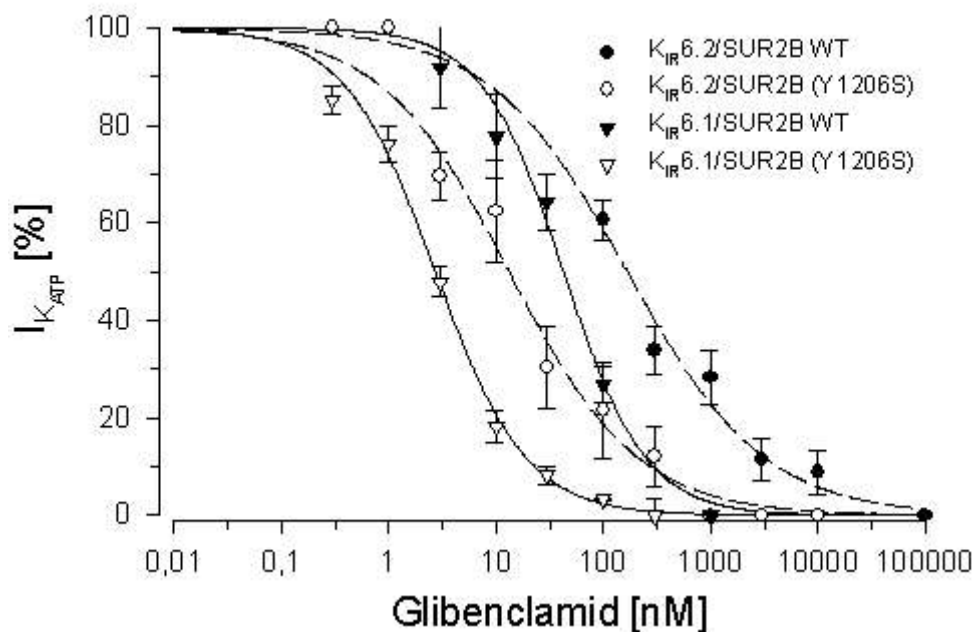


Abb. 30 Konzentrations-Wirkungskurven für die Hemmung der $K_{IR6.1}$ - und $K_{IR6.2}$ -Kanäle koexprimiert mit $SUR2B$ WT und $SUR2B(Y1206S)$ durch GBC.

Ganzzellmessungen von $K_{IR6.2}/SUR2B$ WT, $K_{IR6.2}/SUR2B(Y1206S)$, $K_{IR6.1}/SUR2B$ WT, und $K_{IR6.1}/SUR2B(Y1206S)$. Die Parameter sind in der Tab. 4.7 zusammengefasst.

Tab. 4.7 Hemmung der verschiedenen Kanalkombinationen durch Glibenclamid

Kanal	Konfiguration	Nukleotid	Glibenclamid		
			IC ₅₀	n _H	A
		[mM]	[nM]		(%)
K _{IR} 6.2/SUR2A	IO	0	26 (23 ; 29)	1,0 ± 0,1	54 ± 3
K _{IR} 6.2/SUR2A(YS)	IO	0	0,84 (0,58 ; 1,21)	1 fix	70 ± 2
K _{IR} 6.2/SUR2A	WC	1,0*GDP 0,3 ATP	funktionelle Kanäle vorhanden		
K _{IR} 6.2/SUR2B	IO	0	27 (22 ; 32)	1,0 ± 0,1	63 ± 2
K _{IR} 6.2/SUR2B(YS)	IO	0	1,0 (0,7 ; 1,5)	1 fix	65 ± 2
K _{IR} 6.2/SUR2B	WC	1,0 GDP 0,3 ATP	167 (103 ; 270)	0,73 ± 0,18	100
K _{IR} 6.2/SUR2B(YS)	WC	1,0 GDP 0,3 ATP	13 (6 ; 28)	0,68 ± 0,15	100
K _{IR} 6.1/SUR2A	IO	1 ATP	funktionelle Kanäle vorhanden		
K _{IR} 6.1/SUR2A(YS)	IO	1 ATP	funktionelle Kanäle vorhanden		
K _{IR} 6.1/SUR2A(YS)	WC	1 ATP 1 GTP	funktionelle Kanäle vorhanden		
K _{IR} 6.1/SUR2B	WC	1,0 GDP 0,3 ATP	43 (33 ; 55)	1,1 ± 0,2	100
K _{IR} 6.1/SUR2B(YS)	WC	1,0 GDP 0,3 ATP	2,7 (2,1 ; 3,5)	1,0 ± 0,1	100

(YS) Mutation (Y1206S);* die Nukleotid Lösung wurde bis auf 10 mM MgATP gesteigert (s. Text)

Untersuchungen an K_{IR}6.2/SUR2A-Kanälen waren in der Ganzzellkonfiguration unter den gegebenen Bedingungen nicht möglich, weil die Zellen zu hohe Ströme entwickelten und die Zelle nicht mehr auf ein gegebenes Potential geklemmt werden konnte. Um die Stromdichte zu reduzieren, wurde die intrazelluläre Nukleotidkonzentration von der standardmäßigen 0,3 mM ATP/1,0 mM GDP auf 10 mM ATP (0 mM GDP) erhöht. Die Kanäle öffneten sich während der Dialyse trotz der hohen Nukleotidkonzentration; die Öffnung erfolgte langsamer, ohne dass ein Plateau erreicht werden konnte. Ebenso blieben Versuche erfolglos, durch Reduktion der DNA-Menge bei der Transfektion eine geringere Stromdichte zu erreichen.

Die Hemmung der $K_{IR}6.2/SUR2A$ - und $K_{IR}6.2/SUR2B$ -Kanäle und deren Y1206S Mutanten durch Glibenclamid wurde ebenfalls in isolierten Patches in der Inside-Out-Konfiguration in der Abwesenheit von Mg^{2+} und ATP untersucht. Unter diesen Bedingungen war auch bei sättigenden Konzentrationen von Glibenclamid nur eine unvollständige Hemmung zu beobachten (Abb. 31). Die Amplitude betrug beim $K_{IR}6.2/SUR2A$ und $K_{IR}6.2/SUR2B$ 54 % bzw. 70 % (Abb. 32A, Abb. 33A) und bei beiden Y1206S Mutanten 70 % bzw. 63 % (Abb. 32A, Abb. 33A). Wenn man die Hemmung der Kanäle bei unterschiedlichen Glibenclamid Konzentrationen auf die Hemmung bei 1 μM Glibenclamid (= 100 %) normiert, errechnet man IC_{50} -Werte von 26 nM und 27 nM bei einem n_H von jeweils $1,0 \pm 0,1$ für die $K_{IR}6.2$ Kanäle koexprimiert mit SUR2A und SUR2B (Abb. 32B, Abb. 33B). Bei den Y1206S Mutanten liegen die IC_{50} -Werte bei 0,84 nM und 1,0 nM bei einem festgelegten n_H von 1 (Abb. 32B, Abb. 33B). Somit ist die IC_{50} bei beiden mutanten Kanälen in Vergleich zu den Wildtyp Kanälen um den Faktor ~ 27 nach links verschoben.

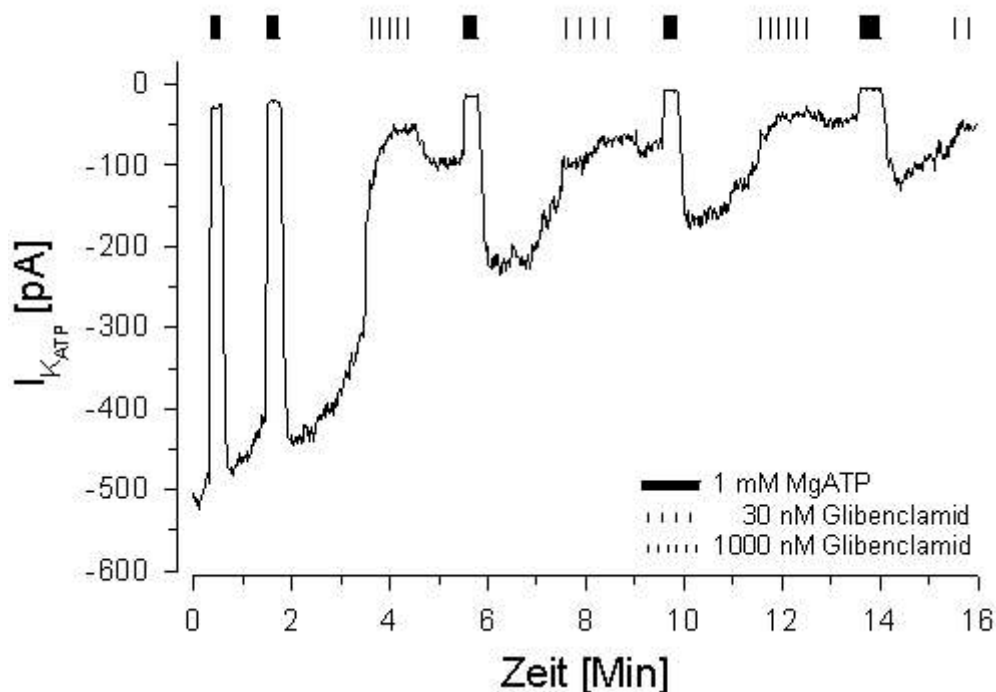


Abb. 31 Hemmung von $K_{IR}6.2/SUR2A$ -Kanälen durch Glibenclamid im IO-Patch

Nach dem Herausreissen aus der Zelle entwickelte sich ein Strom, der durch Glibenclamid gehemmt werden konnte. Zwischen jeder Glibenclamid Applikation wurde mit Puffer gewaschen und mit MgATP ein Refreshment erzeugt. Der Rundown wurde entlang der Stromkurve vor der Glibenclamidgabe extrapoliert. Als Basislinie für die Hemmung wurde der durch MgATP blockierte Strom durch Extrapolation gewählt.

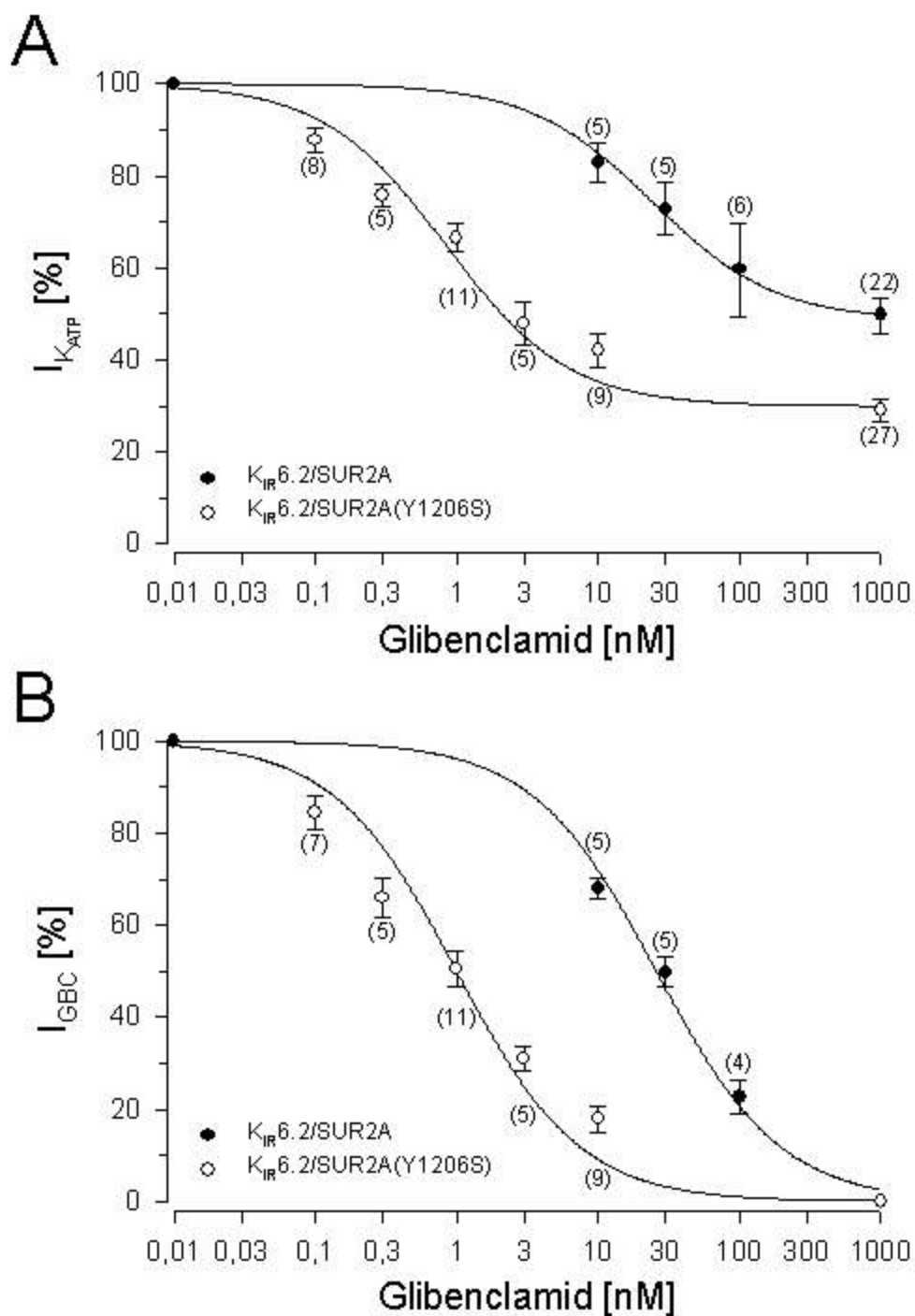


Abb. 32 Konzentrations-Wirkungskurve der Hemmung von $K_{IR6.2/SUR2A}$ und $K_{IR6.2/SUR2A(Y1206S)}$ Kanälen durch Glibenclamid in Inside-Out-Patches

A: Die Fit-Parameter sind in Tab. 4.7 aufgeführt. In (n) stehen die Anzahl Experimente (Patche). **B:** Der Strom wurde auf den durch 1 μ M Glibenclamid hemmbaren Anteil renormiert. Die Anzahl der Messwerte unterscheiden sich z.T. von denen in Abb. 32A, weil nicht in allen Experimenten eine Normierung auf 1 μ M Glibenclamid durchgeführt werden konnte.

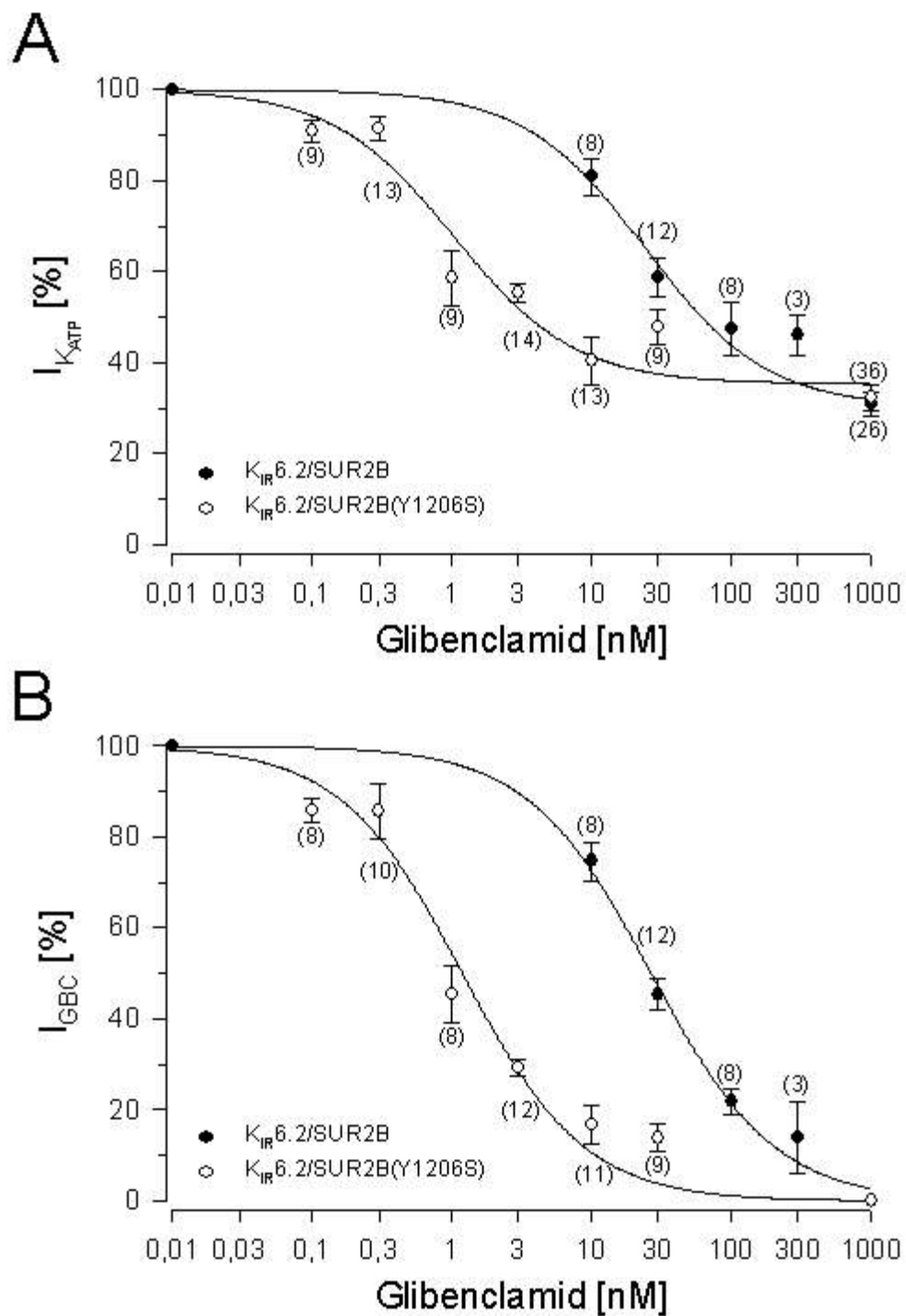


Abb. 33 Konzentrations-Wirkungskurve der Hemmung von $K_{IR}6.2/SUR2B$ und $K_{IR}6.2/SUR2B(Y1206S)$ Kanälen durch Glibenclamid in Inside-Out-Patches

A: Die Fit-Parameter sind Tab. 4.7 aufgeführt. In (n) stehen die Anzahl von Experimenten (Patche). **B:** Der Strom wurde auf den durch $1 \mu\text{M}$ Glibenclamid hemmbaren Anteil renormiert. Die Anzahl der Messwerte unterscheiden sich z.T. von denen in Abb. 33A, weil nicht in allen Experimenten eine Normierung auf $1 \mu\text{M}$ Glibenclamid durchgeführt werden konnte.

4.2.2 HMR1883 / HMR1098

HMR1883 ist ein Sulfonylthioharnstoff (HMR1098 ist das Natriumsalz der Substanz), (Strukturformel *Kap. 1.2.4.2*) der sich vom Glibenclamid in verschiedenen Aspekten unterscheidet. Im Unterschied zu Glibenclamid hat HMR1883 eine schwache Affinität an pankreatischen β -Zellen, hemmt aber K_{ATP} -Kanäle im Sarkolemma der Kardiozyten im mikromolaren Bereich. Ziel war es, HMR1883 an verschiedenen rekombinanten Kanälen zu untersuchen.

In Abb. 34 ist ein typisches Experiment zu sehen. Nach dem Herausreißen des Patches aus der Membran in nukleotidfreie Lösung, unterlag der Patch einem Rundown. HMR1883 (10 μ M) hemmt hier den Strom ($K_{IR6.2/SUR2A}$) um 47 %, und Glibenclamid, bei einer sättigenden Konzentration von 1 μ M, um 63 %. Für die Auswertung der Konzentrationswirkungskurve wurde in jedem Patch die Glibenclamid empfindliche Fraktion

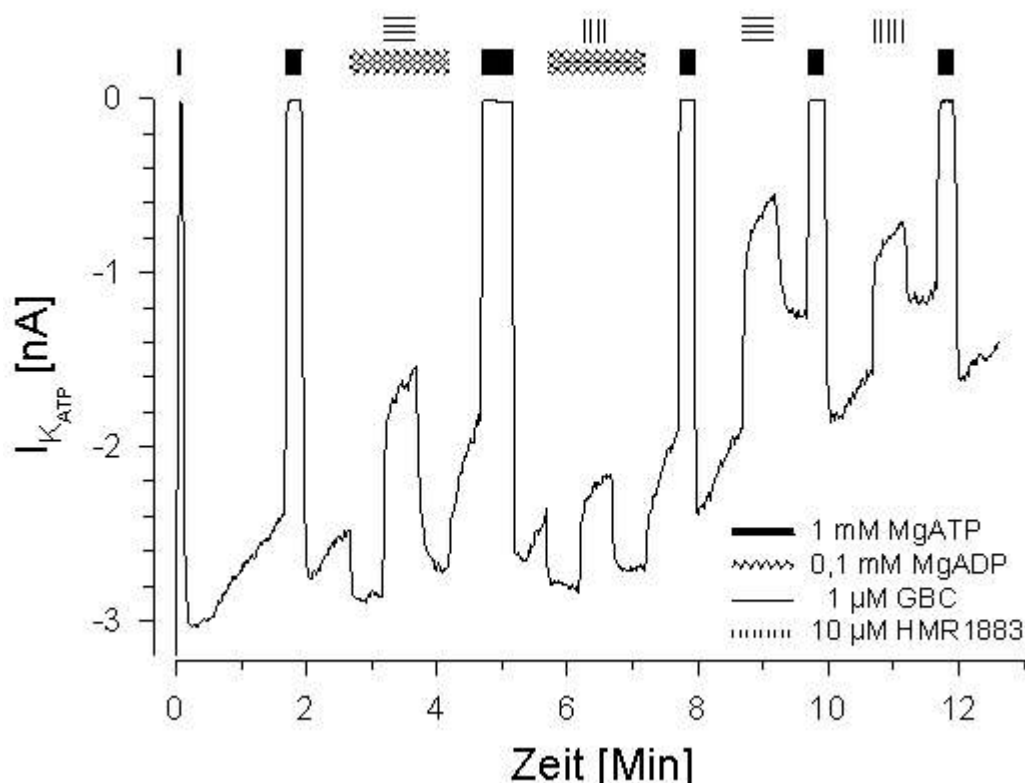


Abb. 34 MgADP reduziert den Block durch Glibenclamid und HMR1883 am $K_{IR6.2/SUR2A}$
MgATP hemmt den $K_{IR6.2/SUR2A}$ und nach dem Auswaschen von ATP hat ein Refreshment stattgefunden. Nach einer Aktivierung durch MgADP, wurde entweder Glibenclamid [1 μ M] oder HMR1883 [10 μ M] appliziert, was zu einer reversiblen Blockade der Kanäle führte. GBC/ADP und HMR/ADP hemmten zu 47 % und 21 %. In Abwesenheit von MgADP war der Block durch Glibenclamid (63 %) und HMR1883 (47 %) größer.

des Stroms auf 100 % gesetzt. Im Mittel lag die Hemmung durch Glibenclamid bei 54 ± 3 % des durch ATP (1 mM) hemmbaren Stroms des K_{ATP} -Kanals (vgl. Tab. 4.7). HMR1883 hemmen den $K_{IR}6.2/SUR2A$ -Kanal mit einem IC_{50} Wert von $0,38 \mu M$ bei einem Hill-Koeffizient nahe 1 (Tab. 4.8).

Tab. 4.8 Hemmung von HMR1883

Kanal	Konfiguration	HMR1883		
		IC_{50} [μM]	n_H	A (%)
$K_{IR}6.2/SUR2A$	Inside-Out-	0,38 (0,28 ; 0,51)	$1,2 \pm 0,2$	100
$K_{IR}6.2/SUR2B$	Inside-Out-	1,2 (0,9 ; 1,6)	$0,6 \pm 0,1$	100
$K_{IR}6.1/SUR2B$	whole-cell*	5,3 (4,7 ; 6,0)	$1,7 \pm 0,2$	100

*in Anwesenheit von 0,3 mM MgATP in der Pipettenlösung

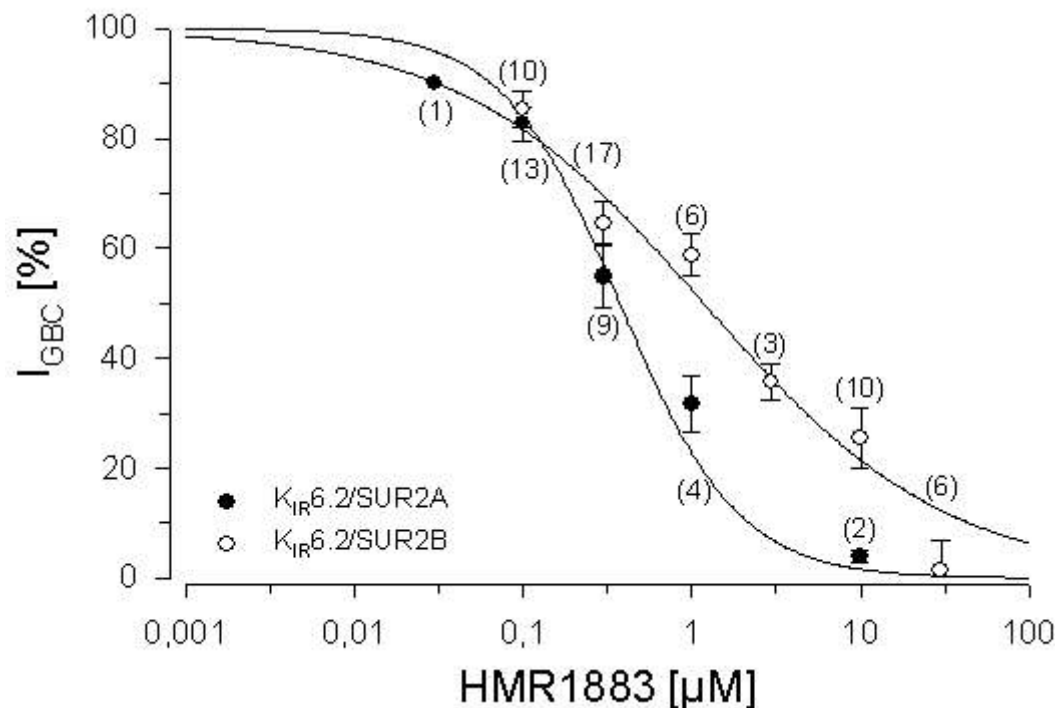


Abb. 35 Konzentrationsabhängige Hemmung der $K_{IR}6.2/SUR2A$ und $K_{IR}6.2/SUR2B$ -Kanäle durch HMR1883

Gezeigt ist die Auswertung von Inside-Out-Patches. Die durch Glibenclamid ($1 \mu M$) erzeugte Hemmung, im Durchschnitt 67 % vom $I(K_{ATP})$, wurde auf 100 % gesetzt.

In Inside-Out-Patches mit $K_{IR}6.2/SUR2B$ wurde der Strom (Tab. 4.8) im Durchschnitt um 67 % durch Glibenclamid ($1 \mu M$) gehemmt, der zur Renormierung herangezogen wurde.

Abb. 35 zeigt für HMR1883 hier einen IC_{50} Wert von $1,2 \mu\text{M}$; überraschenderweise war der Hill Koeffizient kleiner als eins ($0,6 \pm 0,1$) (Tab. 4.8). Glibenclamid hatte nicht zwischen den beiden Kanälen unterschieden und gab Hemmkurven mit einem Hill-Koeffizient von 1 (vgl. Kap. 4.2.1).

4.2.3 Effekte von Glibenclamid und HMR1883 in Gegenwart von MgADP

In den vorherigen Kapiteln (Kap. 4.2.1, Kap. 4.2.2) wurde gezeigt, dass die K_{ATP} -Kanal-Blocker HMR1883 und Glibenclamid $K_{\text{IR}6.2/\text{SUR}2\text{A}}$ - und $K_{\text{IR}6.2/\text{SUR}2\text{B}}$ -Kanäle konzentrationsabhängig hemmen können. Während ischämischer oder hypoxischer Bedingungen ändert sich das MgATP/MgADP Verhältnis in der Zelle und aus diesem Grund können sich kardiale K_{ATP} -Kanäle öffnen (vgl. Kap. 1.2.2.2). In den folgenden Untersuchungen wurde daher der Effekt von pathophysiologischen MgADP-Konzentrationen auf die Hemmung von $K_{\text{IR}6.2/\text{SUR}2\text{A}}$ -Kanälen durch Glibenclamid und HMR1883 untersucht. Als Dinukletid-Konzentrationen wurden $0,03 \text{ mM}$, $0,1 \text{ mM}$ und $0,3 \text{ mM}$ MgADP gewählt, auch weil bei diesen MgADP-Konzentrationen in Gegenwart von Mg^{2+} eine maximale Aktivierung der $K_{\text{IR}6.2/\text{SUR}2\text{A}}$ -Kanäle zu beobachten ist (vgl. Kap. 4.1.3).

4.2.3.1 Glibenclamid und MgADP

In der folgenden Experimentserie wurde die Konzentrationsabhängigkeit von Glibenclamid in Gegenwart von 30 , 100 und $300 \mu\text{M}$ MgADP untersucht. Es wurde abwechselnd einmal Glibenclamid in Gegenwart und in Abwesenheit von der MgADP-Konzentration appliziert (vgl. Abb. 34). Dazwischen wurden die Substanzen ausgewaschen und mit 1 mM MgATP ein Block mit nachfolgendem Refreshment erzeugt.

Abb. 36 zeigt die Hemmkurve von Glibenclamid in der Gegenwart von $30 \mu\text{M}$ MgADP. Durch $30 \mu\text{M}$ MgADP wird die IC_{50} von Glibenclamid an $K_{\text{IR}6.2/\text{SUR}2\text{A}}$ -Kanälen von 26 nM auf 141 nM um den Faktor $5,4$ nach rechts verschoben. Die maximale Hemmung betrug $50 \pm 7 \%$ (Abb. 36) und erreichte ähnliche Werte wie ohne MgADP (54 ± 3) (Abb. 32; Tab. 4.7).

Die Hemmung der $K_{\text{IR}6.2/\text{SUR}2\text{A}}$ -Kanäle durch Glibenclamid wurde auch in Gegenwart von $300 \mu\text{M}$ MgADP untersucht (Tab. 4.9). Bei $300 \mu\text{M}$ MgADP war die Hemmung durch

Glibenclamid (0,3 μM und 1 μM) um Faktoren von 0,6 bzw. 0,7 niedriger als in der Abwesenheit von MgADP ($p < 0.001$). Beim Auswaschen mit MgADP erreichte der Strom oft nicht die Höhe, die er vor der Behandlung mit dem Kalium-Kanal-Blocker hatte. In *Kap. 4.2.3.2* wurde Glibenclamid (1 μM) in Gegenwart von 100 μM ADP im Vergleich zu HMR1883 untersucht. Diese Messwerte können nicht direkt miteinander verglichen werden, da sie aus unterschiedlichen Messserien stammen.

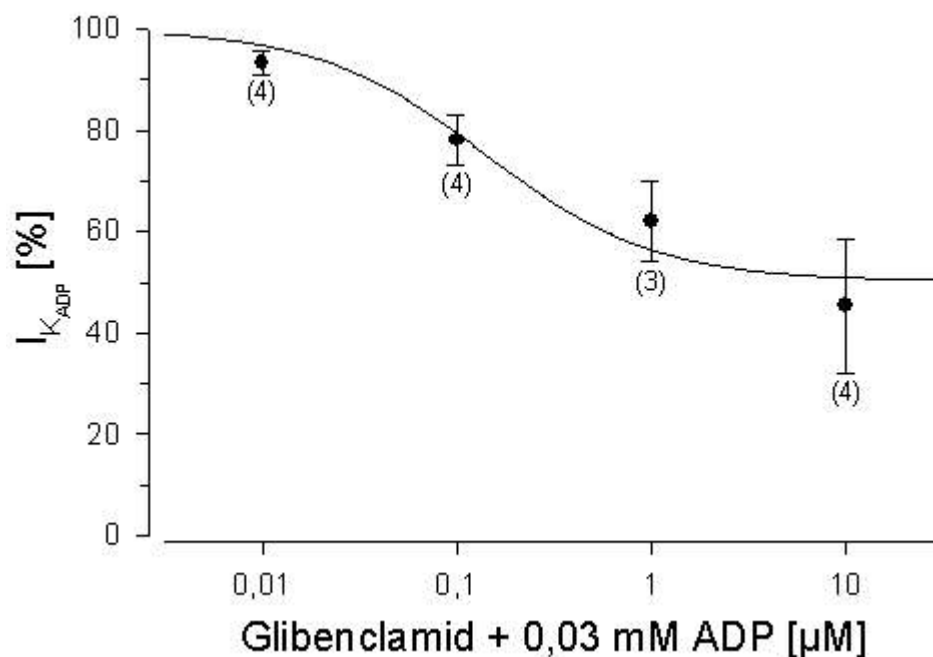


Abb. 36 Hemmung von $K_{IR6.2/SUR2A}$ -Kanälen durch Glibenclamid in Gegenwart von ADP (0,03 mM)

Glibenclamid hemmt konzentrationsabhängig $K_{IR6.2/SUR2A}$ -Kanäle in Gegenwart von 30 μM MgADP. Die $IC_{50} = 141 \text{ nM}$ (75 ; 266) bei einem auf $n_H = 1$ festgesetzten Hill-Koeffizienten und einer Amplitude von $A = 50 \pm 7\%$.

Tab. 4.9 Hemmung von $K_{IR6.2/SUR2A}$ -Kanälen durch Glibenclamid in An- und Abwesenheit von MgADP (300 μM)

	Glibenclamid			
	0,3		1,0	
MgADP (μM)	0	300	0	300
Block [%]	72 ± 4	$43 \pm 4^{***}$	79 ± 3	$57 \pm 3^{***}$
Anzahl (n)	13	12	19	20

***hochsignifikant unterschiedlich zu den Werten in Abwesenheit von ADP

Der durch ADP erreichbare Strom ($I_{(K_{ADP})}$) betrug ermittelt aus 20 Experimenten 196 ± 43 [%].

4.2.3.2 HMR1883 in Gegenwart von MgADP

HMR1883 ist ein kardioselektiver K_{ATP} -Kanalblocker, der für die Indikation Kardioprotektion bei Ischämie entwickelt wurde (Gögelein et al., 2000). Da bei Ischämie die intrazelluläre ADP-Konzentration ansteigt, war es von besonderem Interesse, den Effekt von MgADP auf die Hemmung von $K_{IR}6,2/SUR2A$ -Kanälen zu untersuchen. Die Experimente wurden analog zu den vorhin beschriebenen Experimenten mit Glibenclamid durchgeführt (vgl. auch Abb. 34).

In Anwesenheit von MgADP (0,1 mM) wurde die Hemmung der $K_{IR}6,2/SUR2A$ -Kanäle in Inside-Out-Patches durch unterschiedliche HMR1883- (3 und 10 μM) mit Glibenclamid- (1 μM) Konzentrationen verglichen (Tab. 4.10). Die Versuchsserie war nur schwer auswertbar, da die Effekte von Patch zu Patch, wie auch bei der alleinigen Gabe von MgADP (vgl. Kap. 4.1.3), stark streuten. In An- und Abwesenheit von MgADP betrug die Hemmung durch HMR1883 $26 \pm 5\%$ bzw. $40 \pm 5\%$ (bei 3 μM HMR1883) und $35 \pm 5\%$ bzw. $48 \pm 4\%$ (bei 10 μM HMR1883) und bei Glibenclamid (1 μM) $39 \pm 7\%$ bzw. $64 \pm 3\%$. Damit kann die Hemmung von HMR1883/MgADP mit 65 % (bei 3 μM HMR1883) bzw. 74 % (bei 10 μM HMR1883) von der von HMR1883 alleine und von Glibenclamid/MgADP mit 61 % von Glibenclamid alleine angegeben werden (vgl. Tab. 4.10).

Tab. 4.10 Hemmung durch Glibenclamid und HMR1883 in An- und Abwesenheit von MgADP

	HMR1883 (μM)				Glibenclamid (μM)	
	3	3	10	10	1	1
MgADP (μM)	0	100	0	100	0	100
block [%]	$40 \pm 5^{**}$	26 ± 5	$48 \pm 4^{**}$	35 ± 5	64 ± 3	39 ± 7
Anzahl (n)	10	11	10	14	7	7

** hochsignifikant unterschiedlich im Vergleich mit der Hemmung durch Glibenclamid

Betrachtet man die Hemmwerte für HMR1883 (3 μM und 10 μM) mit denen von Glibenclamid in Anwesenheit von ADP, so ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Hemmung der $K_{IR}6,2/SUR2A$ -Kanäle durch HMR1883 und Glibenclamid (HMR 3 μM / GBC (1 μM): $p = 0,259$; HMR 10 μM / GBC (1 μM): $p = 0,657$). In Abwesenheit von ADP hemmte HMR1883 (3 und 10 μM) die $K_{IR}6,2/SUR2A$ -Kanäle signifikant schwächer als Glibenclamid (1 μM) (Tab. 4.10; $p < 0,002$).

4.3 PNU-94750

PNU-94750 gehört wie P1075 oder Pinacidil zur Klasse der Cyanoguanidine; hier wurde in die Seitenkette des Pinacidils ein Phenylring eingeführt (Strukturformeln *Kap. 1.2.4.1*). PNU-94750 ist (wie Pinacidil) ein Racemat, dessen Stereoisomere die Bezeichnungen PNU-96179 (*S*) und PNU-96293 (*R*) tragen. Khan und Kollegen (Khan et al., 1997) konnten zeigen, dass das (*R*)-Enantiomer die durch verschiedene K_{ATP} -Kanal-Öffner erzeugte Vasodilatation aufheben konnte.

Das Ergebnis ihrer Studie läßt folgende zwei Interpretationen zu. Zum einen könnte sich die Substanz als *neutraler Agonist* verhalten. Bei dieser Betrachtung würde die Substanz durch Verdrängung des Öffners vom SUR wirken, ohne einen direkten Effekt auf die Kanalaktivität zu haben. Die Folge davon wäre ein Kanalverschluss, bedingt durch eine hohe intrazelluläre MgATP Konzentration in der glatten Muskelzelle. Alternativ könnte die Substanz als *inverser Agonist* reagieren. In diesen Fall könnte sie den Öffner verdrängen und, ähnlich wie Sulfonylharnstoffe, durch ihre Bindung einen Kanalblock auch in Abwesenheit von MgATP induzieren. Um zwischen diesen Alternativen unterscheiden zu können, wurden die beiden Enantiomere PNU-96179 und PNU-96293 vorwiegend an den rekombinanten $K_{IR}6.2/SUR2$ -Kanälen untersucht.

4.3.1 PNU-96293

Das (*R*)-Enantiomer PNU-96293 wurde an $K_{IR}6.2/SUR2A$ und $K_{IR}6.2/SUR2B$ in der Inside-Out-Konfiguration untersucht. In der Gegenwart von 1 mM MgATP entwickelten $K_{IR}6.2/SUR2B$ -Kanäle unter PNU-96293 (10, 30 oder 100 μ M) keinen Strom. Dies zeigt, dass die Substanz trotz der Cyanoguanidinstruktur keine Öffnereigenschaften besitzt. Wurde die MgATP Konzentration auf 3 μ M reduziert, wurden die Kanäle konzentrationsabhängig durch die Substanz gehemmt. Abb. [37](#) zeigt eine Beispielspur mit $K_{IR}6.2/SUR2B$ -Kanälen. Bei 100 μ M, die höchste getestete Konzentration, wurde eine maximale Hemmung von ca. 50 % erreicht während mit Glibenclamid (1 μ M) ca. 80 % erzielt wurden. Die Konzentrationswirkungskurve für die Hemmung des PNU Enantiomers extrapolierte auf eine maximale Hemmung von 54 % beim $K_{IR}6.2/SUR2A$ bzw. 46 % beim $K_{IR}6.2/SUR2B$ mit IC_{50} -Werten von 21 μ M bzw. 16 μ M (Abb. [38](#)) (*Tab. 4.11*).

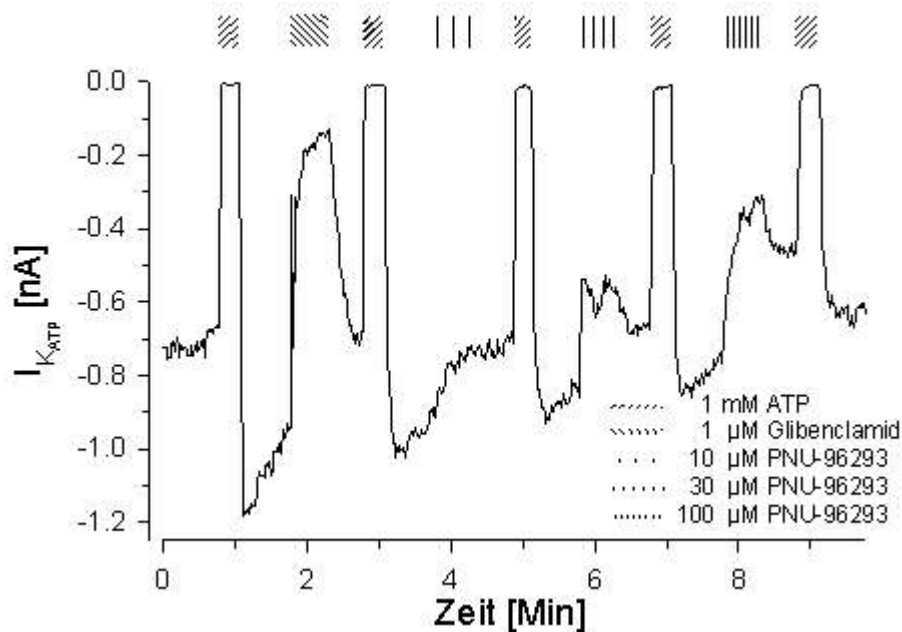


Abb. 38 PNU-96293 hemmt $K_{IR}6.2/SUR2B$ -Kanäle im *IO-Patch*

Originalspur eines Experiments mit $K_{IR}6.2/SUR2B$ -Kanälen in Anwesenheit von 0,003 mM MgATP ($[Mg^{2+}]_{frei} = 0,7$ mM) bei -50 mV. Eine 15 sekundige MgATP Gabe blockt den Kanal und bewirkt ein Refreshment des Stroms in 0,003 mM MgATP. Der gemessene Strom zwischen den Waschphasen mit MgATP wurde mit Glibenclamid ($1 \mu\text{M}$) oder PNU-96293 (10 , 30 oder $100 \mu\text{M}$) gehemmt.

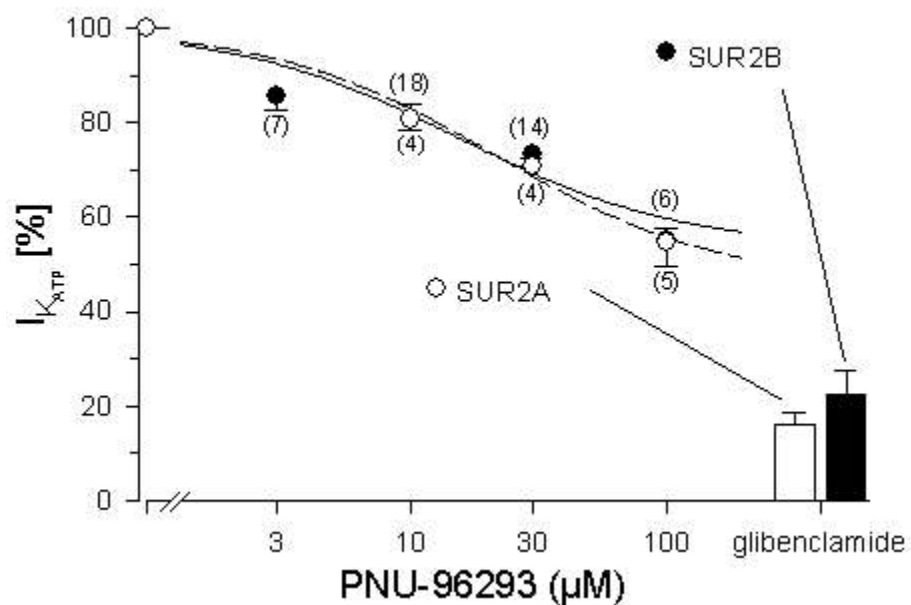


Abb. 37 PNU-96293 hemmt in *Inside-Out-Patches* $K_{IR}6.2/SUR2$ -Kanäle

Konzentrationsabhängige Hemmung von $K_{IR}6.2/SUR2B$ (●) und $K_{IR}6.2/SUR2A$ (○) Kanälen durch PNU-96293 in Anwesenheit von $3 \mu\text{M}$ MgATP; die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der Patche an. Die Säulendiagramme zeigen die Hemmung durch $1 \mu\text{M}$ GBC im Vergleich. Die mit der Hill-Gleichung erhaltenen Parameter sind in Tabelle 4.7 zusammengefaßt.

In Abwesenheit von MgATP wurde beim $K_{IR}6.2/SUR2B$ der Strom maximal um 30 % bei einem IC_{50} Wert von 12 μM gehemmt (Tab. 4.11, $n = 12$).

Der pankreatische K_{ATP} -Kanal ($K_{IR}6.2/SUR1$) konnte ebenfalls durch PNU-96293 gehemmt werden. In Inside-Out-Patches in Abwesenheit von ATP wurde der Strom durch 100 μM PNU-96293 um $40 \pm 5 \%$ ($n = 5$) gehemmt; ein vergleichbares Ergebnis wurde mit derselben Konzentration von Tolbutamid erreicht (Tab. 4.11).

Tab. 4.11 Hemmung durch PNU-96293 an den verschiedenen Kanalkombinationen in der intakten Zelle und an isolierten Membranen

Kanal	Konfiguration	MgATP [μM]	PNU-96293		GBC-Block	n
			IC_{50} [μM]	A (%)	[1 μM]	
$K_{IR}6.2/SUR1$	IO	0	bei 100	40 ± 5	42 ± 6^a	5
$K_{IR}6.2/SUR2A$	IO	3	21 (12 ; 37)	54 ± 4	84 ± 5	6
$K_{IR}6.2/SUR2A$	WC	1000	0,014 ^b (0,008 ; 0,023)	68 ± 4^b	79 ± 6^b	3
$K_{IR}6.2/SUR2B$	IO	0	12 (2 ; 83)	30 ± 7	78 ± 5	12
$K_{IR}6.2/SUR2B$	IO	3	16 (7 ; 32)	46 ± 6	77 ± 3	15
$K_{IR}6.2/SUR2B$	WC	1000	0,078 (0,037 ; 0,165)	74 ± 6	96 ± 4	5
$K_{IR}6.2/SUR2B(YS)^c$	WC	1000	0,045 (0,015 ; 0,140)	86 ± 9	100 ± 0	3

Beim Fitten der Konzentrations-Wirkungskurven wurde der Hill-Koeffizient $n_H = 1.0$ gesetzt.

^a Hemmung durch 100 μM Tolbutamid Hambrock et al., 2001b

^b Parameter für $K_{IR}6.2/SUR2A$ in der Ganzzellkonfiguration beziehen sich auf die Gruppe mit hoher Glibenclamidempfindlichkeit

^c Ref. Hambrock et al., 2001a

Der $K_{IR}6.2/SUR2$ hemmende Effekt von PNU-96293 wurde auch in der Ganzzellkonfiguration bei 37°C untersucht (Abb. 39). Die Dialyse der Zelle mit 1 mM MgATP führt zu einem Strom, der durch das PNU-Enantiomer im nanomolaren Konzentrationsbereich

($IC_{50} = 14 \text{ nM}$ ($K_{IR}6.2/SUR2A$); $IC_{50} = 78 \text{ nM}$ ($K_{IR}6.2/SUR2B$) (Abb. 40) mit einer maximalen Hemmung von 68 % bzw. 74 % inhibiert wurde (Tab. 4.11); Glibenclamid ($1 \mu\text{M}$) erzeugt eine vollständige Hemmung (Abb. 40). Vergleicht man die Daten der Ganzzellmessung mit denen aus isolierten Membranen, so zeigt sich ein Unterschied in der Wirksamkeit bei den verschiedenen Konfigurationen. 78 nM ($K_{IR}6.2/SUR2B$) wurden in Ganzzell-Experimenten gegenüber $16 \mu\text{M}$ in Inside-Out-Experimenten gefunden, d.h. PNU-96293 hemmt den Kanal in isolierten Membranen 200-fach schwächer als in der intakten Zelle. Beim $K_{IR}6.2/SUR2A$ ergaben sich IC_{50} -Werte von 14 nM (WC) und $21 \mu\text{M}$ (IO), womit sich eine 1500-fach schwächere Hemmung in Inside-Out-Patches resultiert. In Analogie zu den Wild-Typ Experimenten wurde der $K_{IR}6.2/SUR2B(Y1206S)$ -Kanal untersucht, der ähnliche Resultate lieferte (Tab. 4.11). Die Mutation verändert nicht die Empfindlichkeit des Kanals für PNU-96293.

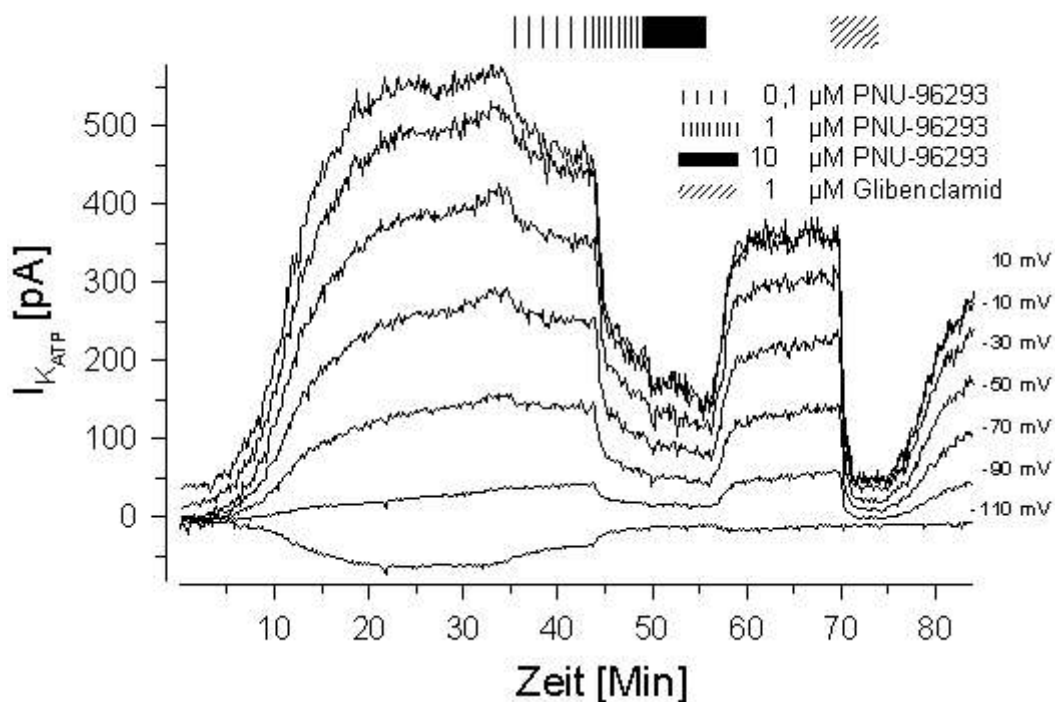


Abb. 39 PNU-96293 hemmt $K_{IR}6.2/SUR2B$ in Ganzzelleexperimenten

Originalaufzeichnung eines Ganzzelleexperimentes mit PNU-96293 und Glibenclamid (Kontrolle). Die Spannung wurde schrittweise von -110 auf 10 mV in 20 mV Schritten variiert. Während der Dialyse der Zelle mit 1 mM MgATP bei 37°C entwickelte sich ein Strom, der konzentrationsabhängig durch PNU-96293 gehemmt werden konnte. Nach dem Auswaschen erreichte Glibenclamid ($1 \mu\text{M}$) eine vollständige Hemmung.

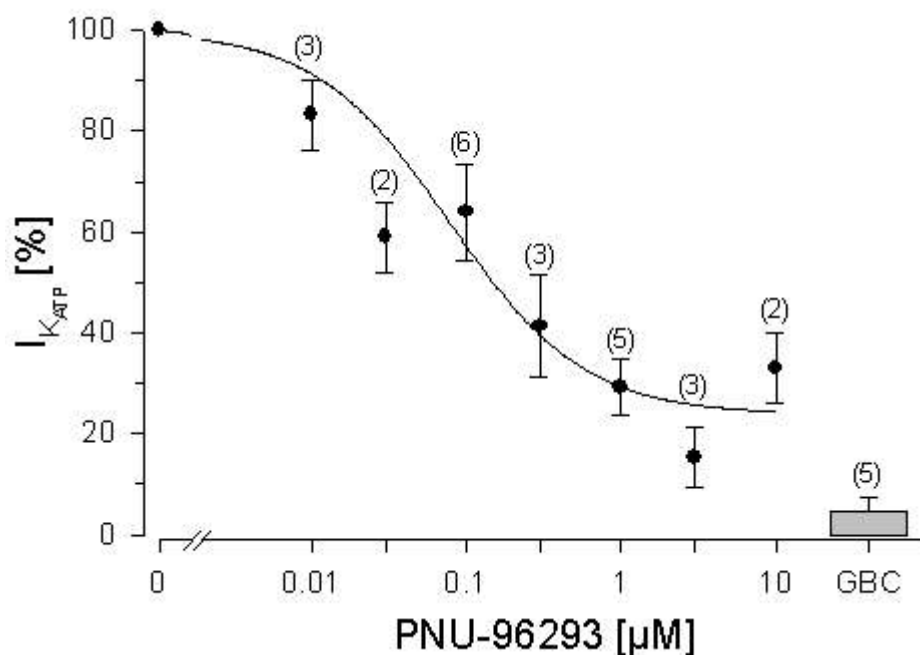


Abb. 40 PNU-96293 hemmt $K_{IR6.2/SUR2B}$ -Kanäle in Ganzzellexperimenten
 Konzentrationsabhängige Hemmung bei -60 mV. Der Hill wurde auf $n_H=1$ festgesetzt. Die Anzahl der Werte ist in Klammern angegeben.

4.3.2 PNU-96179

PNU-96179 ist das (S)-Enantiomer des Racemats PNU-94750 (vgl. Kap. 1.2.4.1). Abb. 41 stellt den Verlauf eines typischen Experiments in der Inside-Out-Konfiguration mit $K_{IR6.2/SUR2B}$ -Kanälen dar. Die Kanäle wurden mit 1 mM MgATP geschlossen. Nach der Zugabe von PNU-96179 (100 μ M) entwickelte sich ein Strom, der reversibel durch Glibenclamid (3 μ M) gehemmt werden konnte ($n = 4$). Weitere Experimente zeigten, dass der durch PNU-96179 (100 μ M) hervorgerufene Strom nur 10 - 20 % des durch die maximal stimulierende Konzentration P1075 (0,1 μ M)-stimulierten Stromes betrug. Niedrigere Konzentrationen der PNU-96179 Substanz ergaben kleine, uneinheitliche Effekte.

Es wurde ebenfalls die Fähigkeit von PNU-96179 untersucht, $K_{IR6.2/SUR2B}$ -Kanäle in der Ganzzellkonfiguration zu öffnen. Aber selbst 3 mM oder 10 mM MgATP in der Pipette konnten die Kanäle während der Dauer des Experiments nicht geschlossen halten (s. Kap. 4.2.1). Für diese Experimente wurde deshalb auf die CA-Konfiguration gewechselt. Abb. 42 zeigt den Verlauf eines Experiments, bei dem 100 μ M PNU-96179 eine Aktivierung von 13 % (Mittelwert: $15,6 \pm 1,6$; $n = 6$) bezogen auf die durch P1075 erzeugte maximale Aktivierung erreichte, während 10 μ M keinen Effekt hatten. Zusammenfassend zeigen die Daten, dass

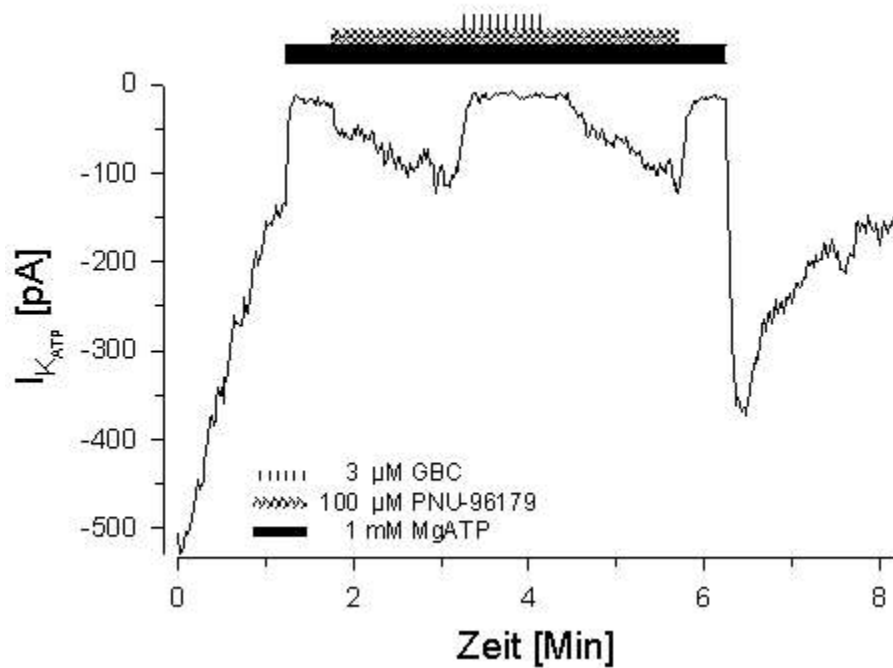


Abb. 42 PNU-96179 öffnet $K_{IR6.2}/SUR2B$ -Kanäle

Originalspur eines Inside-Out-Patches. Nach dem Herausreißen in Mg^{2+} haltige Lösung war ein starker Rundown zu beobachten. 1 mM MgATP konnten die Kanäle vollständig schließen. Bei zusätzlicher Applikation von PNU-96179 (100 μ M) entwickelte sich ein Strom, der durch GBC (3 μ M) reversibel gehemmt werden konnte.

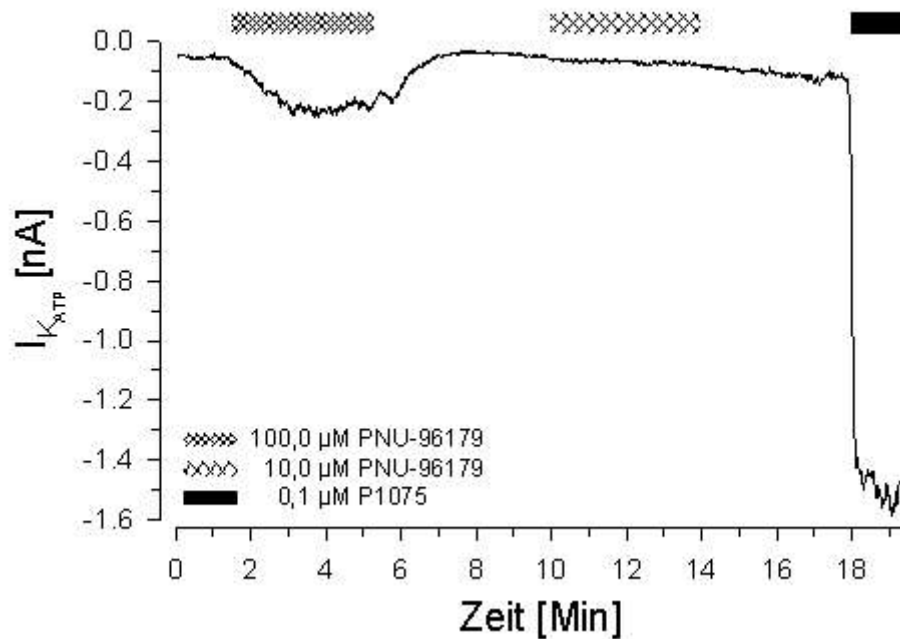


Abb. 41 PNU-96179 öffnet $K_{IR6.2}/SUR2B$ -Kanäle in der cell-attached-Konfiguration

Originalregistrierung eines Patches in der Cell-Attached-Konfiguration, bei der PNU-96179 (100 und 10 μ M) und P1075 (0,1 μ M) appliziert wurden (siehe Balken). Das Haltepotential betrug -50 mV, als Bad- und Pipettenlösung wurde K-Hepes verwendet (Messung bei 37 °C).

PNU-96179 ein Öffner für $K_{IR}6.2/SUR2B$ -Kanäle ist, wengleich auch mit niedriger Effektivität und Wirkstärke. Die Öffnungseigenschaften wurden nicht weiter untersucht, da die Kanalöffnung ein Effekt ist, der für Cyanoguanidine erwartet werden konnte.

Tab. 4.12 Vergleich der Effektivität von von PNU-96179 bei der Öffnung von $K_{IR}6.2/SUR2B$ -Kanälen in der Inside-Out-(1 mM MgATP) und Cell-Attached-Konfiguration

Kanal	Konfiguration	MgATP	PNU-96179 (100 μ M)
		[mM]	$I_{(P1075)}$ (0,1 μ M) [%]
$K_{IR}6.2/SUR2B$	IO	1	ca. 10 bis 20
	CA	$\sim 5^*$	$15,6 \pm 1,6$

* intrazelluläre Konzentration

4.4 Kaliumkanalöffner (KCOs)

Kaliumkanalöffner sind eine heterogene Gruppe von Substanzen. Zu Ihnen gehören die Cyanoguanidine, mit den bekanntesten Vertretern Pinacidil und P1075, die Benzopyrane (Cromakalim und Rilmakalim), Benzothiadiazine (Diazoxid), Pyrimidine (Minoxidilsulfat), Nikotinamidnitrat (Nicorandil) sowie als neuere Gruppe Dihydropyridine (A312110) (Strukturformeln *Kap. 1.2.4.1*).

Um einen Effekt eines Kaliumkanalöffners sehen zu können, müssen die Kanäle geschlossen sein. Geschlossen werden die $K_{IR}6.2/SUR2x$ Kanäle mit Nukleotiden, vorwiegend mit ATP, dessen physiologisch Konzentration in der Zelle 3-5 mM MgATP beträgt. Für die hochaffine Bindung der Kaliumkanalöffner ist MgATP notwendig (Bray und Quast, 1992, Schwanstecher et al., 1992b, Dickinson et al., 1997, Löffler-Walz und Quast, 1998). Weder Mg^{2+} in der Abwesenheit von ATP noch ATP allein ermöglichen die hochaffine Bindung (Schwanstecher et al., 1998, Hambrock et al., 1998).

4.4.1 A312110 und P1075 in der Gegenwart von MgATP

P1075 gehört zur Klasse der Cyanoguanidine. In meinen Experimenten wurde P1075 als Vergleichssubstanz für die Kanalöffnung verwendet. Die Substanz A312110 gehört zur Klasse der Dihydropyridine und sie ist einer der ersten K_{ATP} -Kanal-Öffner dieser Substanzklasse (Gopalakrishnan et al., 2003).

P1075 und A312110 wurde in Inside-Out-Patches am $K_{IR}6.2/SUR2A$ und $K_{IR}6.2/SUR2B$ -Kanälen in Gegenwart von 1 mM MgATP (*s. Kap. 2.7.3*) untersucht. Nach der Blockade der Kanäle wurden P1075 und A312110 in Konzentrationen von 0,01 μ M bis 30 μ M appliziert. Nach dem Auswaschen der Substanzen und nachfolgenden Entfernen von MgATP war wieder ein Strom sichtbar. Die Substanzgabe mit Ein- und Auswaschen von MgATP wurde in bis zu drei aufeinander folgenden Pulsen in einem Experiment durchgeführt.

In Abb. [43](#) ist ein Experiment mit A312110 exemplarisch dargestellt, das eine Aktivierung des mit 1 mM MgATP geschlossenen Kanals zeigt. In diesem Experiment wurden 0,01, 0,1 und 1 μ M A312110 verwendet. Die kleinste Konzentration (0,01 μ M) zeigt nahezu keinen Effekt, wohingegen 0,1 und 1 μ M deutlich $K_{IR}6.2/SUR2A$ -Kanäle aktivieren. In Abb. [44](#) wird die Konzentrationswirkungskurve von A312110 im Vergleich mit P1075 an $K_{IR}6.2/SUR2x$

Kanälen dargestellt. Die Parameter sind in der *Tabelle 4.9* zu finden. A312110 und P1075 können alle Kanaltypen mit ziemlich ähnlicher Wirksamkeit aktivieren (ca. 50 nM). Die beiden Substanzen unterscheiden sich hinsichtlich ihres maximalen Effekts. P1075 besitzt eine etwa 20-30 % größere Effektivität (Amplitude) als A312110. In der maximalen Wirkung gibt es auch Unterschiede zwischen den Kanaltypen. Bezieht man die maximale Wirkung der Öffner am $K_{IR}6.2/SUR2B$ auf die maximale Wirkung am $K_{IR}6.2/SUR2A$, die auf 100 % gesetzt wurde, so ergibt sich eine Effektivität von 170 ± 21 % für A312110 und 184 ± 12 % für P1075 .

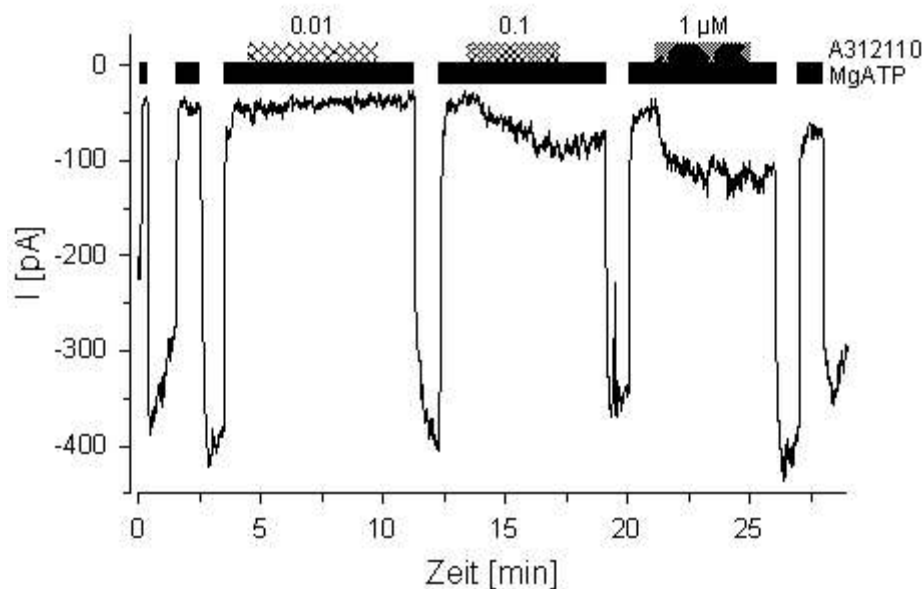


Abb. 43 A312110 öffnet $K_{IR}6.2/SUR2A$ -Kanäle

Die Spur zeigt die Aktivierung von $K_{IR}6.2/SUR2A$ -Kanälen im Inside-Out-Patch durch A312110. Nach dem Herausreißen in nukleotidfreie Lösung entwickelte sich ein Strom, der durch die Perfusion mit MgATP (1 mM) im wesentlichen aufgehoben werden konnte. Damit konnte gezeigt werden, dass das ein Strom durch den K_{ATP} -Kanal ist. A312110 (schraffierte Balken) wurde in Anwesenheit von MgATP (schwarzer Balken) appliziert.

Tab. 4.13 Darstellung der Parameter der KCO's P1075 und A312110 beim geschlossenen Kanal.

Kanal	Konfiguration	P1075			A312110		
		IC ₅₀	n _H	A	IC ₅₀	n _H	A
		[μM]		[%]	[μM]		[%]
$K_{IR}6.2/SUR2A$	Inside-Out-	0,058	1 fix	63 ± 2	0,058	1 fix	51 ± 5
		(0,035;0,096)			(0,025 ; 0,137)		
$K_{IR}6.2/SUR2B$	Inside-Out-	0,044	1 fix	116 ± 9	0,049	1 fix	87 ± 9
		(0,017 ; 0,116)			(0,019 ; 0,123)		

Der Hillkoeffizient wurde auf $n_H = 1$ festgesetzt

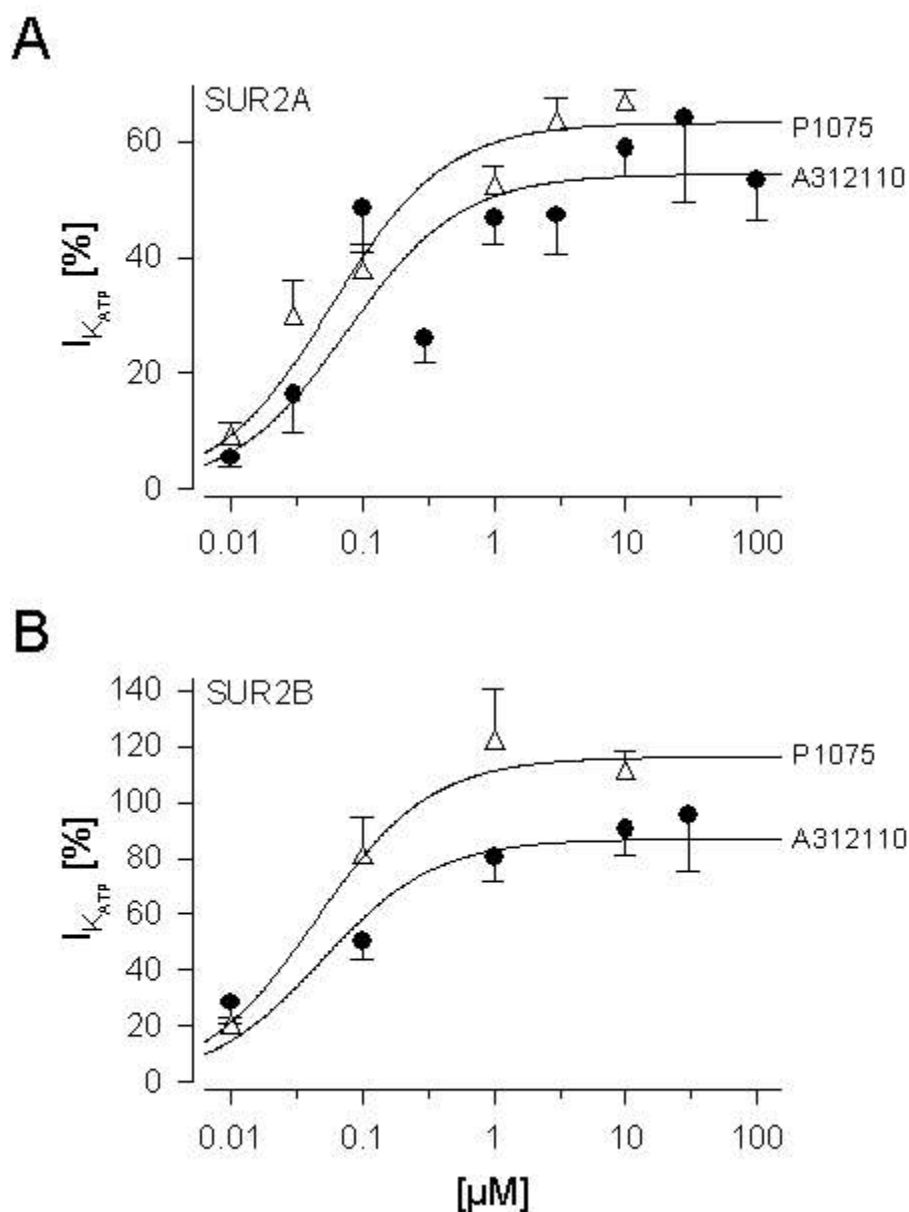


Abb. 44 Konzentrationswirkungskurve der aktivierenden Wirkung von A312110 und P1075 an $K_{IR6.2}/SUR2x$ Kanälen

(A) $K_{IR6.2}/SUR2A$, (B) $K_{IR6.2}/SUR2B$. Die Daten wurden aus Experimenten, wie sie in Abb. 43 zu sehen sind erstellt. Der durch den Kaliumkanalöffner-vermittelte Strom wurde auf den Strom in Abwesenheit von MgATP und vor einsetzendem Rundown bezogen. Die Konzentrationswirkungskurven wurden mit $n_H = 1$ bestimmt. Pro Datenpunkt wurden 3 bis 12 Messpunkte verwendet.

4.4.2 P1075 in Anwesenheit von 1 und 10 mM MgATP

In einigen wenigen Experimenten wurde die Aktivierung des $K_{IR6.2}/SUR2B$ Kanals, der der empfindlichste K_{ATP} -Kanal Subtyp für die Aktivierung durch Öffner ist, durch P1075 in Anwesenheit von 10 mM MgATP untersucht und mit der Aktivierung bei 1 mM MgATP verglichen. Bei diesen Experimenten sollte die Aktivierbarkeit von P1075 in Gegenwart von

10 mM MgATP untersucht werden; zum Vergleich, in einer nativen Zelle liegt die MgATP-Konzentration zwischen 3 und 5 mM MgATP.

Es wurden eine hohe (1 μ M) und eine saturierende (10 μ M) P1075 Konzentration gewählt. Die Kanäle wurden für 1-2 Minuten mit 10 mM MgATP geschlossen und durch P1075 in Anwesenheit des Nukleotids für 5 Minuten versucht zu aktivieren. MgATP wurde eine Minute ausgewaschen und nach einer erneuten Stromentwicklung wurde der Zyklus erneut gestartet, nun aber in Anwesenheit von 1 mM MgATP. Die Reihenfolge der ATP Konzentrationen wurde bei einigen Experimenten vertauscht.

Wurde 1 μ M P1075 verwendet, so konnten die mit 1 mM MgATP blockierten Kanäle jedesmal aktiviert werden, während in einem von einem Experiment mit 10 mM MgATP keine Kanalaktivierung beobachtet wurden. Die Aktivierung durch 10 μ M P1075 in Anwesenheit von 10 mM MgATP war nur in 44 % der Fälle zu sehen, während in 56 % der Fälle der Kanal nicht aktiviert werden konnte. Die Aktivierung in Anwesenheit von 1 mM MgATP war immer prominent vorhanden. Die Aktivierung schien nachmittags vermehrt aufzutreten. Das könnte an der Hydrolyse des ATP liegen, da es den ganzen Tag über bei Raumtemperatur (24°C) aufbewahrt wurde. Dieses Phänomen ist jedoch nicht weiter untersucht worden. Die Aktivierung durch P1075 in Anwesenheit von 10 mM MgATP war aber niemals höher als 5 %.

Tab. 4.14 Häufigkeit der Aktivierung von P1075 in Gegenwart von 1 mM oder 10 mM MgATP bei RT

Kanal	Konfiguration	MgATP [mM]	P1075 [μ M]	Responder	alle
				n	Experimente n
K _{IR} 6.2/SUR2B	Inside-Out-	1	1	2	2
			10	4	4
K _{IR} 6.2/SUR2B	Inside-Out-	10	1	0	1
			10	3	7

4.5 K_{ATP} -Kanalöffnung durch K_{ATP} -Kanalöffner in Abwesenheit von Mg^{2+}

Es stellte sich die Frage, ob K_{ATP} -Kanalöffner in Abwesenheit von Magnesium $K_{IR6.2}/SUR2B$ K_{ATP} -Kanälen Kanäle aktivieren können. Es sollten die Unterschiede bei verschiedenen K_{ATP} -Kanal-Öffner, unabhängig von der ATP Hydrolyse, untersucht werden. Für diese Untersuchungen wurde als Kanal-Rezeptor ausschließlich der SUR2B verwendet, der SUR-Subtyp, der die höchste Affinität für die K_{ATP} -Kanal-Öffner mit Ausnahme vom Diazoxid besitzt (D'haan et al., 1999, Matsuoka et al., 2000). Als Kanaleinheit fungierte der $K_{IR6.2}$, der im Gegensatz zum $K_{IR6.1}$ besser in Inside-Out-Patches zu untersuchen ist. Für die Öffneruntersuchungen wurden in unserem Labor typische Vertreter der einzelnen Substanzklassen (P1075, Rilmakalim, Diazoxid, Nicorandil und Minoxidilsulfat) in Mg^{2+} -freier Lösung (*Pipe-Mg*) untersucht (Strukturformeln Kap. 1.2.4.1). Die Substanzen wurden in der Inside-Out-Konfiguration in Anwesenheit von ATP, das den Kanal geschlossen hielt, getestet.

4.5.1 P1075

Ausgehend von vorliegenden Ergebnissen mit P1075 und Rilmakalim habe ich weitere Messungen mit P1075 und weiteren Öffnern durchgeführt (Russ et al., 2003). Bei der Untersuchung von P1075 wurde die Nukleotidempfindlichkeit in magnesiumfreier Lösung untersucht. Dafür wurde in ein und demselben Patch P1075 in Anwesenheit von 0,1 mM, 1 mM und 10 mM ATP gegeben. Wie aus Abb. 45 zu sehen ist, kann nach einer Stromentwicklung der Kanal sowohl durch 0,1 (99 % Block) als auch durch 1 mM ATP (100 % Block) wirksam geschlossen werden. Mit P1075 (1 μ M) wird eine Stromsteigerung in Anwesenheit von 0,1 mM ATP am $K_{IR6.2}/SUR2B$ auf ca. 200 % des Stroms in Abwesenheit von ATP in diesem Experiment erzielt. Tauscht man die 0,1 mM ATP Lösung gegen eine 10 mM ATP-Lösung aus, so wird die P1075 Aktivierung vollständig aufgehoben. Nach dem Auswaschen steigt der Strom wie erwartet an. Diese Aktivierung durch 1 μ M P1075 (bei 0,1 mM ATP) und die nachfolgende Blockade (bei 10 mM ATP) wird mit nachfolgendem Auswaschen noch zweimal wiederholt. Dabei wurde durch die P1075 Applikation bezogen jeweils auf den Strom davor eine Stromsteigerung von 109 %, 139 % und 150 % erreicht. Der Rundown schwankte in

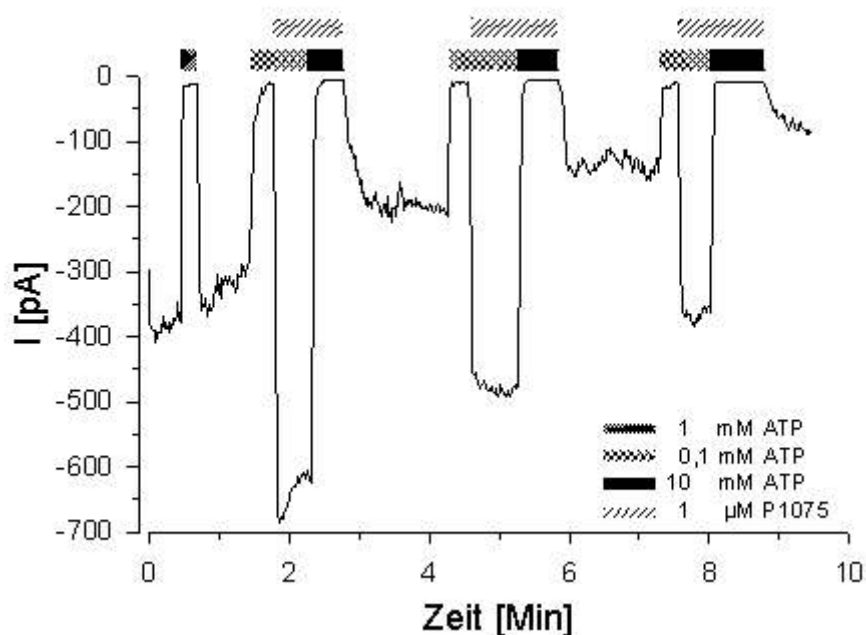


Abb. 45 Aktivierung von $K_{IR6.2}/SUR2B$ -Kanälen durch P1075 in Abwesenheit von Mg^{2+}

Originalspur eines Inside-Out-Patches nach dem Herausreißen in Mg^{2+} freie Lösung. ATP (1 mM) hemmt den Kanal vollständig und reversibel. Die Kanäle wurden mit 0,1 mM ATP gehemmt und durch die Zugabe von 1 μ M P1075 aktiviert. Durch 10 mM ATP wird die Aktivierung von P1075 aufgehoben.

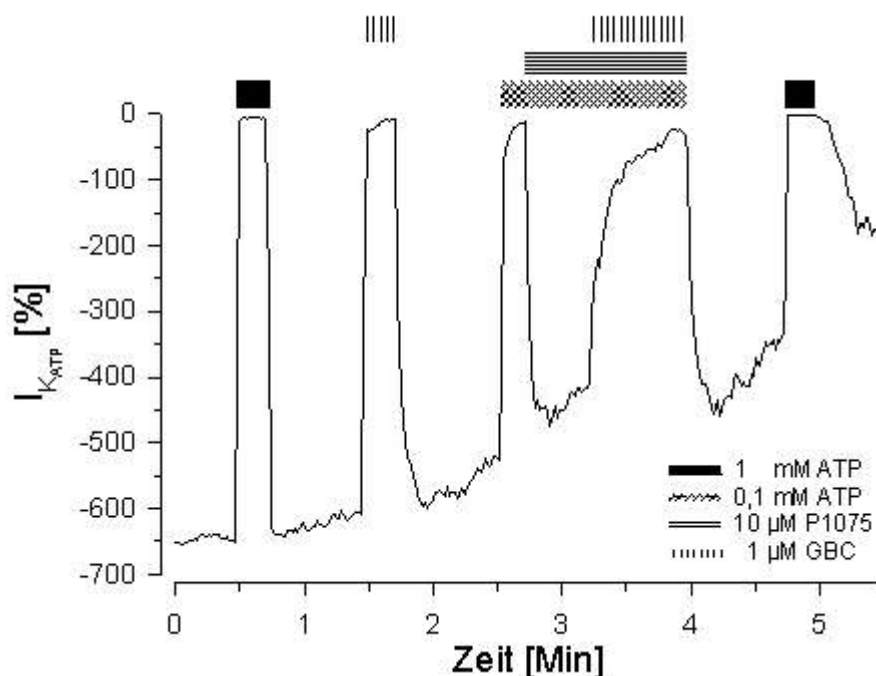


Abb. 46 P1075 benötigt kein Mg^{2+} um $K_{IR6.2}/SUR2B$ -Kanäle zu aktivieren

In diesem IO-Patch kann 1 mM ATP die Kanäle schließen. GBC hemmt wie ATP auch die Kanäle. 0,1 mM ATP hemmen den Strom ebenso fast vollständig. Bei Zugabe von P1075 findet eine Aktivierung statt, die mit GBC reversibel ist.

nukleotidfreier Lösung von 4 bis 17 % und in Gegenwart von ATP und P1075 betrug er 10 % und verschwand während der beiden anderen P1075 Applikationen vollständig.

In Abb. 46 wurde der Effekt von Glibenclamid auf einen mit P1075 aktivierten Kanal untersucht. Dazu wurden in einem Experiment zwei Kontrollen durchgeführt. Erst wurde der Strom mit 1 mM ATP blockiert und nach dem Auswaschen erneut mit 1 μ M Glibenclamid gehemmt. Nach erneutem Auswaschen wurden die Kanäle mit 0,1 μ M ATP blockiert und danach mit P1075 (10 μ M) aktiviert. Diese Aktivierung konnte durch die Gabe von Glibenclamid gehemmt werden. Nach dem Auswaschen war wieder ein ATP empfindlicher Strom zu sehen.

4.5.2 Nicorandil, Minoxidilsulfat, Diazoxid

Nicorandil, Diazoxid und Minoxidil wurden in Anwesenheit von 0,1 mM ATP untersucht. Zur Kontrolle war in jedem Experiment P1075 (100 μ M) verwendet worden.

Nicorandil zeigte bei 100 μ M kaum Aktivierung, während bei 1000 μ M die Aktivierung meist

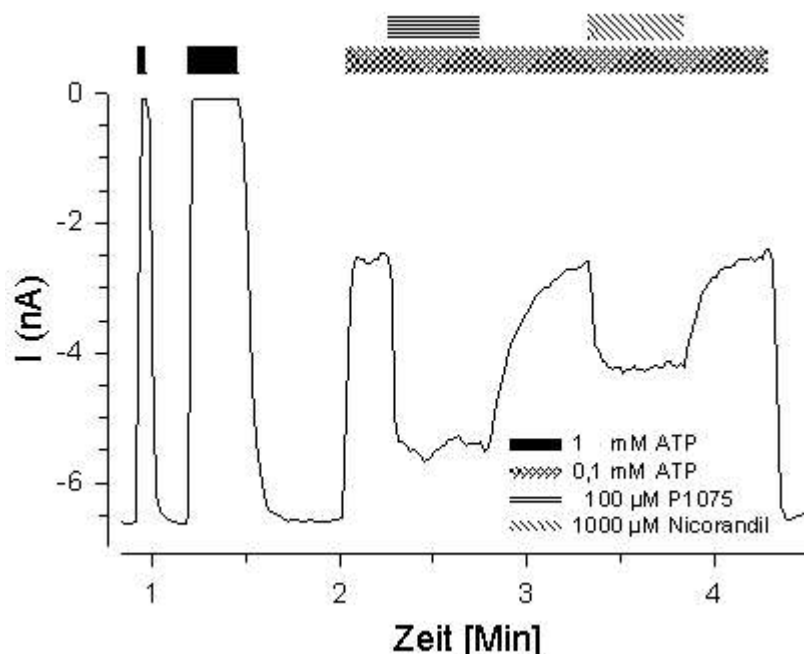


Abb. 47 P1075 und Nicorandil können in Abwesenheit von Mg^{2+} $K_{IR6.2}/SUR2B$ -Kanäle aktivieren

Nach dem Herausreißen entwickelt sich ein Strom, der mit ATP (1 mM; schwarzer Balken) blockiert werden konnte. Nach dem Auswaschen und erneuter partieller Blockade durch 0,1 mM ATP (gekreuzter Balken) wurde im ersten Puls P1075 (100 μ M), im zweiten Nicorandil (1000 μ M) appliziert. Bei beiden Substanzen ist eine prominente Aktivierung zu sehen.

deutlich zu sehen war. Abb. 47 zeigt als Beispiel einen Inside-Out-Patch, bei dem nach einer ATP Kontrolle (1 mM) und einem P1075 Puls in Gegenwart von 0,1 μM ATP 1000 μM Nicorandil eine deutliche Aktivierung zeigte (ca. 65 % des Effekts von P1075).

Diazoxid (300 μM) war weniger effektiv und gab in 63 % der Experimente keine Antwort. Aus diesem Grund wurde Diazoxid in An- und Abwesenheit von Mg^{2+} untersucht (Abb. 48). Zusätzlich wurde zu den ATP (100 μM) noch ADP (100 μM) hinzugefügt. In Abwesenheit von Mg^{2+} war der ATP/ADP-Block vollständig und Diazoxid (300 μM) zeigte keinen Effekt. Nach dem Auswaschen mit Mg^{2+} -haltigem Puffer wurde der Strom wieder mit ATP/ADP blockiert. In deren Anwesenheit zeigte Diazoxid eine große Aktivierung. Nachdem Mg^{2+} wieder entzogen wurde, hatte Diazoxid keinen Effekt. In diesem Experiment (Abb. 48) konnte auch gesehen werden, dass die Stromgröße in Mg^{2+} -haltiger Lösung um ~50 % reduziert war gegenüber Mg^{2+} -freiem Puffer. Der MgATP/MgADP Block war in Anwesenheit von Mg^{2+} wie erwartet leicht verschlechtert. In der magnesiumhaltigen Lösung liegt 0,7 mM Mg^{2+} frei vor.

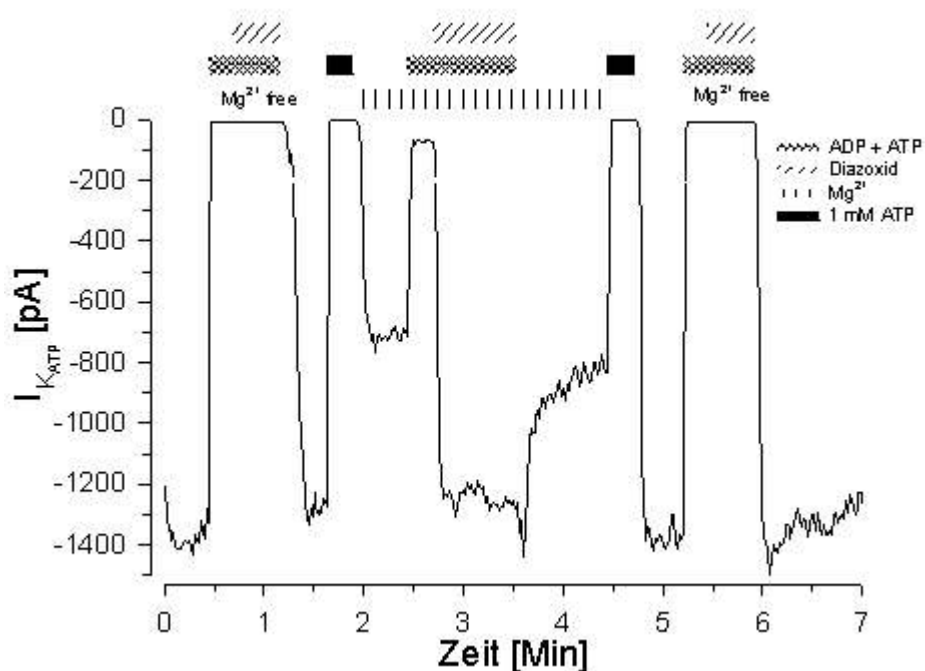


Abb. 48 Aktivierung des $K_{IR6.2/SUR2B}$ durch Diazoxid in An- und Abwesenheit von Mg^{2+}

Originalspur eines IO-Patches. Eine Mischung aus ADP/ATP (je 0,1 mM; gekreuzter Balken) blockt den Kanal in Mg^{2+} -freier Lösung. Diazoxid (300 μM) zeigt dabei keine Aktivierung von K_{ATP} -Kanälen. Nach dem Auswaschen entwickelte sich ein Strom, der mit ATP (1 mM; schwarzer Balken) inhibierbar ist. Beim Auswaschen mit Mg^{2+} -haltiger Lösung sinkt der Strom um ~50 %. Dieser wird mit ADP/ATP gehemmt. Nach Zugabe von Diazoxid entwickelt sich ein großer Strom, der nach dem Auswaschen wieder auf das Ausgangsniveau unter Mg^{2+} absinkt. Bei erneuter Applikation von 1 mM ATP in Mg^{2+} -freier Lösung, erneutem Auswaschen und nachfolgendem Block durch ATP/ADP war nach Zugabe von Diazoxid kein Effekt zu beobachten.

Mg^{2+} kann in dieser Konzentration in Inside-Out-Patch eine partielle Hemmung des Stroms erzeugen. In Abb. 48 wird bei einem Haltepotential von -50 mV der Auswärtsstrom in symmetrischem Kalium (140 mM) durch diese Hemmung bei $K_{IR}6.2/SUR2A$ -Kanälen reduziert.

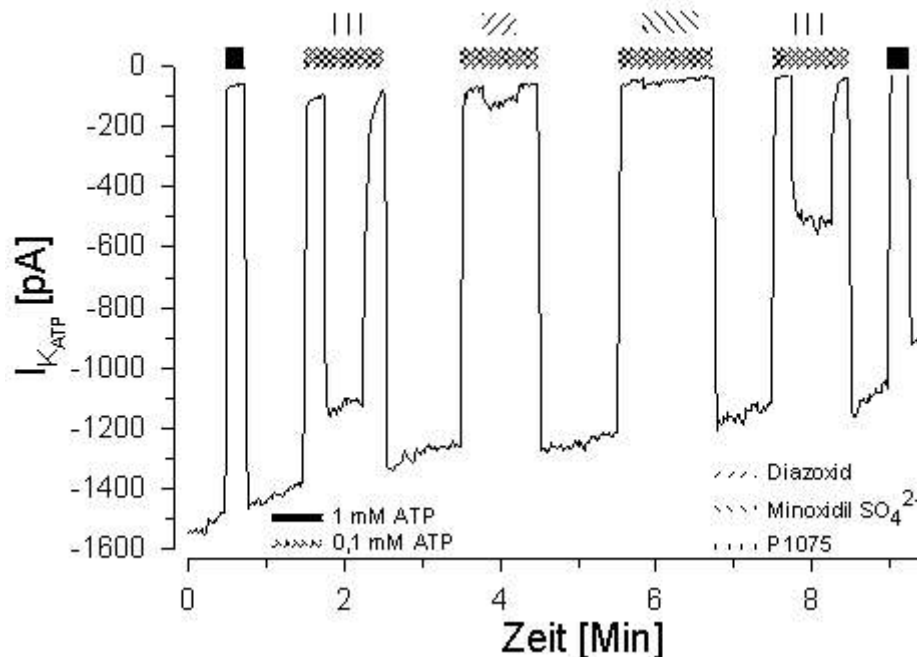


Abb. 49 Diazoxid und Minoxidil-Sulfat aktivieren $K_{IR}6.2/SUR2B$ -Kanäle

ATP hemmt die Kanäle. In Anwesenheit von 0,1 μ M ATP werden P1075, Diazoxid und Minoxidil-Sulfat gegeben. Eine prominente Aktivierung ist mit P1075 zu sehen; Diazoxid und Minoxidilsulfat (300 μ M) zeigen eine sehr schwache bzw. keine Aktivierung.

Abb. 49 zeigt eine Beispielspur, bei der P1075 (100 μ M), Minoxidilsulfat (300 μ M) und Diazoxid (300 μ M) in einem Experiment eingesetzt wurden. Die KCOs Diazoxid, Minoxidilsulfat und P1075 wurden in Anwesenheit von 100 μ M ATP untersucht. Minoxidilsulfat zeigte nur eine sehr kleine oder keine Antwort. Diazoxid war etwas wirksamer. Da die Öffnereffekte sehr starken Schwankungen unterlagen, wurden diese in 3 Gruppen eingeteilt. Die Unterteilung erfolgte in Experimente mit einer großen, einer kleinen und ohne Aktivierung des durch ATP geschlossenen Kanals. Die Tab. 4.15 zeigt die Daten der Experimente und fasst die Wirkung in Abwesenheit von Mg^{2+} an $K_{IR}6.2/SUR2B$ -Kanälen zusammen, woraus sich folgende Rangfolge für die Potenz der Öffner ergibt:

P1075 > Rilmacalim = Nicorandil > Diazoxid > Minoxidilsulfat

Tab. 4.15 Aktivierung von $K_{IR}6.2/SUR2B$ -Kanälen durch KCOs in Abwesenheit von Mg^{2+}

KCO (μ M)	I_{KCO}	Antwort			Gesamtzahl der Patche
		groß	klein ($<5\%$)	ohne (0)	
	(%)	(n)	(n)	(n)	(n)
P1075 (10)	$31,4 \pm 2,3$	26	1	–	27
Rilmakalim (10)	$18,4 \pm 2,8$	9	2	–	11
Nicorandil (100)	6	1	1	1	3
Nicorandil (1000)	$20,5 \pm 4,9$	8	1	–	9
Diazoxid (300)	$11,7 \pm 4,1$	3	3	10	16
Minoxidilsulfat (300)	–	–	3	4	7

Der Strom der durch die Kaliumkanalöffner erzeugt wurde, war in Anwesenheit von 100μ M ATP gemessen worden. Für die Ermittlung des I_{KCO} wurden die „großen“ Antworten verwendet.

4.6 DIDS

In [³H]Glibenclamid Radioligandbindungsstudien an Membranen von HEK293-Zellen, die SUR2B expremiert haben, konnte gezeigt werden, dass MgATP die K_i -Werte für DIDS, ein Stilben, von 17 auf 3,2 nM verschiebt. Das bedeutet, dass die DIDS Bindung am SUR2B postiv allosterisch mit der MgATP-Bindung verknüpft ist, was typisch für K_{ATP} -Kanal-Öffner ist (Hambrock et al., 1998). Auf Grund dieser Beobachtung habe ich die Öffnereigenschaften von DIDS in Inside-Out-Patches am $K_{IR}6.2/SUR2B$ untersucht.

Aus Untersuchungen in Inside-Out-Patches von Ljiljana Gojkovic-Bukarica, die in unserem Labor Gastwissenschaftlerin gewesen ist und vor allem den Block und die Mg^{2+} -Abhängigkeit des DIDS-Effekts auf verschiedene Typen der K_{ATP} -Kanäle elektrophysiologisch untersucht hat (Gojkovic-Bukarica et al., 2002c) und mir, ging hervor, dass die größte Aktivierung der K_{ATP} -Kanäle bei 30 bis 100 nM DIDS zu finden ist (Lange et al., 2003).

Ausgehend von diesen Erkenntnissen habe ich die Aktivierung durch DIDS untersucht. Die $K_{IR}6.2/SUR2B$ -Kanäle wurden dafür für ein bis fünf Minuten mit 1 mM MgATP (*s. Kap. 2.7.3; vgl. Kap. 4.1.1*) geschlossen. Nach ein bis drei Minuten wurde DIDS wieder aus der MgATP-Lösung entfernt. MgATP wurde dann ebenfalls nach weiteren ein oder zwei Minuten ausgewaschen und danach der Maximalstrom bestimmt. DIDS wurde vorwiegend in einer Konzentration von 100 nM verwendet. Ein typisches Experiment zeigt Abb. [50](#).

Die Auswertung der „DIDS-Experimente“ erfolgte analog wie bei den anderen K_{ATP} -Kanal Öffnern. Als obere Grenze ($I = 100\%$) wurde der Maximalstrom vor Einsetzen des Run-down verwendet. Als untere Grenze ($I = 0\%$) wurde der Strom in Gegenwart von 1 mM MgATP unmittelbar vor der DIDS Applikation verwendet. Der DIDS Effekt, d.h. die Stromsteigerung durch DIDS, wurde am Ende der DIDS-Applikation, vor dessen Auswaschen durch MgATP, gemessen. Wurden mehrere DIDS Applikationen in einem Experiment vorgenommen, wurde der DIDS Effekt immer auf den vorangegangenen Maximalstrom und den Strom in Anwesenheit von ATP unmittelbar vor der entsprechenden DIDS Applikation bezogen.

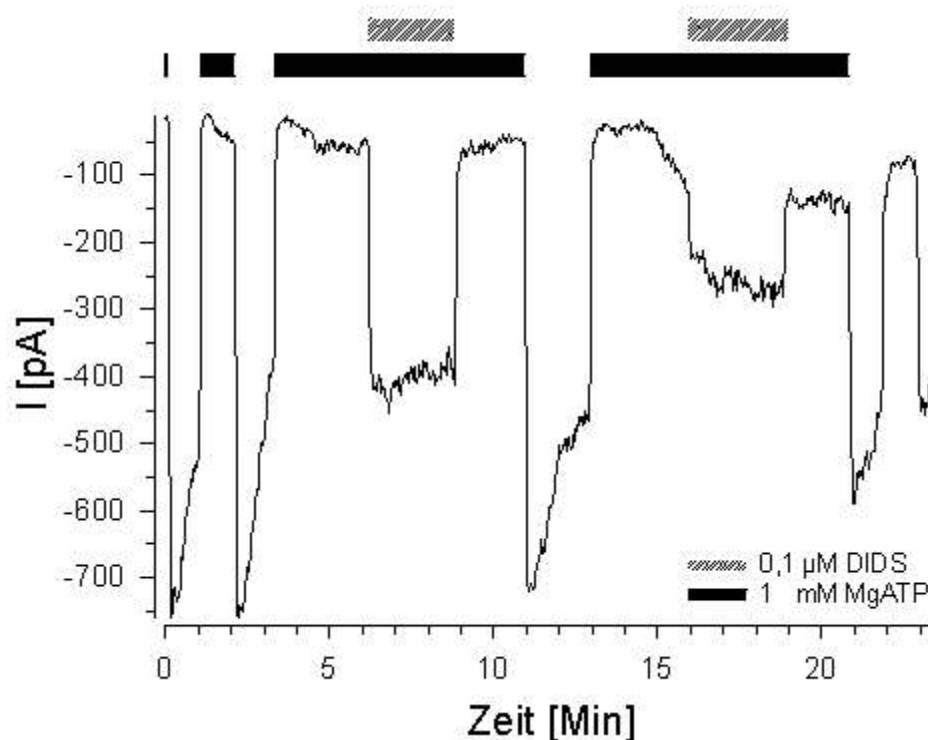


Abb. 50 Beispielspur eines Experiments mit DIDS

In ATP-freier Lösung ist sofort ein Strom sichtbar, der aber durch mehr oder weniger starken Rundown reduziert wird. ATP blockiert diesen Strom sofort und fast vollständig (schwarze Balken). In ATP-freier Lösung ist dann ein Strom sichtbar, der ungefähr dem Ausgangswert entspricht, d.h. der Rundown wurde durch ein Refreshment der Kanäle aufgehoben. Nach erneuter MgATP-Gabe wurde 0,1 μM DIDS appliziert. Es entwickelte sich spontan ein höherer Strom durch den mit ATP blockierten Kanal. Nach dem Entfernen von DIDS aus der ATP-Lösung sank der Strom wieder auf den Wert von MgATP vor der DIDS Applikation ab. Nach dem Auswaschen von MgATP entwickelte sich erneut ein Strom der wieder mit MgATP gehemmt werden konnte. DIDS konnte auch im zweiten Puls die Kanäle aktivieren. Nach dem Auswaschen von DIDS ging der MgATP-Block aber nicht wieder auf das Ausgangsniveau vor der DIDS Applikation zurück. Erst nach nochmaligen Auswaschen von ATP und erneuter Gabe wurde der Block wieder verbessert.

Bei den DIDS-Experimenten konnte beobachtet werden, dass in 35 % der Experimente keine Aktivierung durch 0,1 μM DIDS vorhanden war. In 65 % der Experimente war eine Aktivierung zu beobachten, wobei der DIDS-Effekt in den einzelnen Experimenten von 1 bis 75 % schwankte. Abb. 51 fasst alle Experimente zusammen. Berechnet man den Median der Aktivierung durch DIDS bei allen 163 Experimenten, bei denen sowohl Non-Responder als auch Responder berücksichtigt wurden, beträgt dieser vier Prozent. Die Responder alleine betrachtet geben einen Median der Aktivierung von acht Prozent (s. Tab. 4.16).

Tab. 4.16 Darstellung der Aktivierung durch DIDS (Median I (%) vom Maximalstrom ($I_{K(ATP)}$)) an $K_{IR}6.2/SUR2B$ -Kanälen

	alle Experimente	nur Responder
Anzahl	106 + 57 = 163	106
Median	4 (0 ; 34)	8 (2 ; 49)

Das unten angegebene Intervall gibt die 5 % und 95 % Verteilungsgrenzen (in Klammern dargestellt) der Messwerte an (vgl. Abb. 51)

Bei einer deutlichen DIDS-Aktivierung konnte auch ein zweiter DIDS Puls die K_{ATP} -Kanäle stimulieren. Werden die Experimente, in denen ausschließlich DIDS-Doppelpulse verwendet werden, zur Auswertung herangezogen, so ist die Aktivierung in der zweiten Gabe eines Experiments signifikant kleiner als bei der ersten DIDS Applikation (Abb. 52). Der Median beträgt für die erste DIDS-Applikation sechs, für die zweite DIDS-Applikation vier Prozent ($p = 0,021$; $n = 47$).

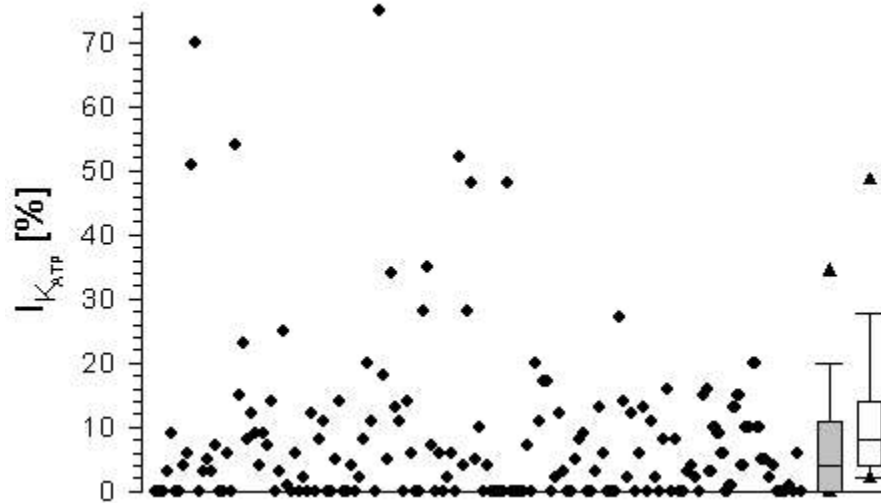


Abb. 51 Streuung der DIDS Aktivierung

Auftragung aller Einzelwerte und der Mediane der ersten Kanalaktivierung durch DIDS bei Experimenten mit $K_{IR}6.2/SUR2B$. Die Werte streuen von 0 bis 75 %. In 106 Experimenten ist eine aktivierende Wirkung von DIDS auf K_{ATP} -Kanäle zu beobachten, 57mal zeigt DIDS keine Wirkung auf den Kanal. Im Box-Plot sind alle Experimente (graue Box, Median 4 %) dargestellt. Bei der ausschließlichen Berücksichtigung der Responder (weiße Box) beträgt der Median 8 %. Die Dreiecke geben das 5 % bzw. 95 % Niveau der Streuung an. Die Linie, die die Box teilt, repräsentiert den Median. Die Fehlerbalken, die durch senkrechte Linien mit der Box verbunden sind, zeigen die 10 % und die 90 % Grenze an. Die Grenzen des oberen und unteren Rand der Box stellen das 25 % und das 75 % Niveau dar.

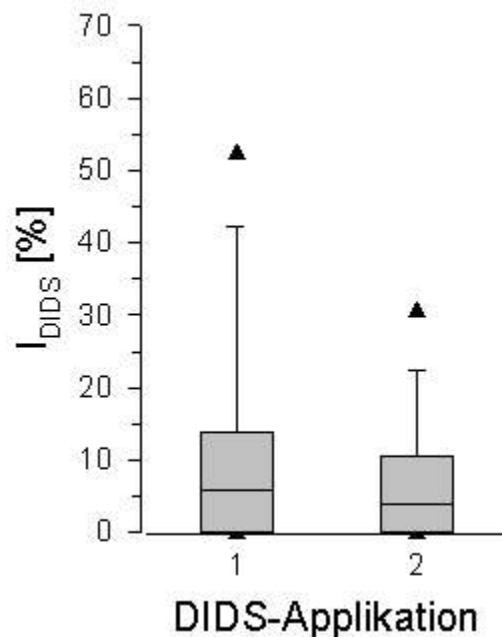


Abb. 52 DIDS Applikation im 1. und 2. Puls
 Bei der Applikation von DIDS in zwei aufeinanderfolgenden Pulsen beträgt der Median im ersten Puls 6, für den zweiten Puls 4 %. Dieser Unterschied ist signifikant. Box-Plot dargestellt wie Abb. 57 (n=47).

Um zu überprüfen, ob die Aktivierung über den $K_{IR6.2}$ oder den SUR2B vermittelt wurde, wurden in unserem Labor DIDS-Experimente am $K_{IR6.2}$ C26 durchgeführt. Der $K_{IR6.2}$ C26 hat im Gegensatz zum Wildtyp- $K_{IR6.2}$ die Eigenschaft, auch ohne SUR in die Membran eingelagert zu werden und funktionelle Kanäle zu bilden (vgl. Kap. 1.2.3.1). Dabei zeigte sich, dass es in Inside-Out-Patches keine Aktivierung des mit 1 mM MgATP geschlossenen Kanals gab. Bei der Verwendung von $K_{IR6.2}$ C26/SUR2B konnte genauso wie beim $K_{IR6.2}$ /SUR2B eine Aktivierung durch DIDS beobachtet werden (Abb. 53).

Um die Aktivierung durch DIDS sehen zu können, müssen die K_{ATP} -Kanäle geschlossen werden. Dafür wurde, wie schon vorher erwähnt, ATP in Gegenwart von Mg^{2+} in einer Konzentration von 1 mM verwendet. Die Hemmwirkung von ATP wird jedoch meist mit der Zeit geringer. Zum anderen ist die Anwesenheit von Mg^{2+} dafür verantwortlich, dass der Block geringer wird. Auf diese beiden Aspekte wurde die DIDS Aktivierung hin untersucht; erstens, die Einwirkdauer von MgATP, und zweitens, der Verminderung des MgATP-Blocks mit zunehmender Applikationsdauer des Nukleotids. Im Hinblick auf die sehr variable Aktivierung durch DIDS habe ich hier zwei Aspekte auf eine Korrelation untersucht. Zum einen könnte die Zeit, die MgATP vor der DIDS Applikation auf den Kanal eingewirkt hatte, eine Rolle spielen,

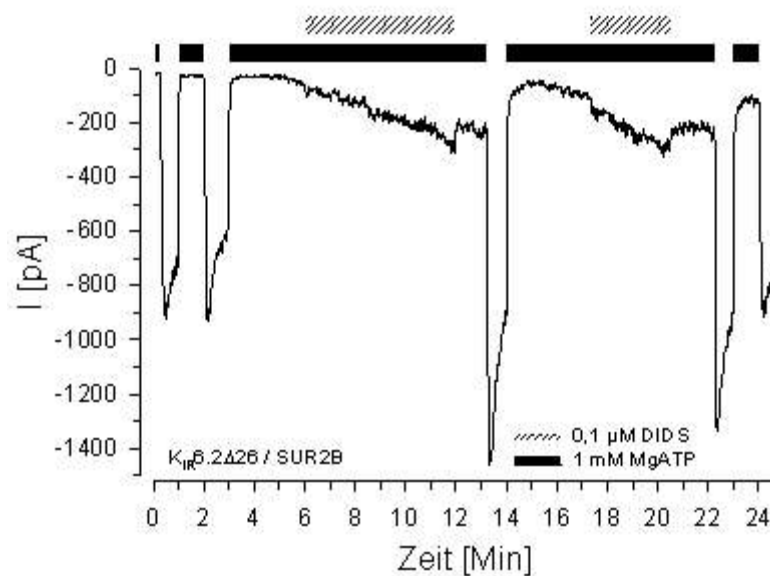


Abb. 53 *DIDS aktiviert auch $K_{IR6.2}$ DC26/SUR2B*
 DIDS aktiviert den mit 1mM MgATP geschlossenen $K_{IR6.2}$ DC26/SUR2B Kanal. Im ersten Puls erreicht die Aktivierung 12 %, im zweiten Puls 6 %. Der Strom nach der ersten DIDS Applikation in ATP-freiem Medium ist durch Refreshment höher als zu Beginn des Experiments.

zum anderen könnte auch in dem entsprechenden Patch die nachlassende Effizienz des 1 mM MgATP-Blocks von Bedeutung sein.

Zuerst möchte ich auf die Länge der MgATP-Applikation eingehen. Bei den DIDS Experimenten wurde in unterschiedlichen Serien die Länge des MgATP Vorlaufs variiert. In der ersten Serie betrug der MgATP Vorlauf eine halbe oder eine Minute, in den folgenden meist drei, teilweise aber auch fünf Minuten. In Abb. 54 wurden die Daten, der unterschiedlichen Serien aufgetragen. Die Daten sind für alle Experimente und nur für die Responder dargestellt. Eine Anova-Analyse der Daten ergab bei Betrachtung der Responder für die Vorlaufzeiten der ATP-Applikation bezogen auf die Aktivierung durch DIDS keine Unterschiede ($p = 0,310$). Bei der Betrachtung von allen Werten ergab die Anova Unterschiede, die aber durch einen weiteren Test (Dunn's Method) nicht bestätigt wurde. Aus diesen Ergebnissen kann gefolgert werden, dass die ATP-Vorbehandlungsdauer nicht mit der Größe der Aktivierung durch DIDS korreliert ist.

Tab. 4.17 Einfluss der MgATP-Vorinkubationsdauer auf die Aktivierung durch DIDS bei K_{ATP} 6.2/SUR2B-Kanälen

ATP Vorlauf [Min]	0,5		1		2		3		5	
	alle	R	alle	R	alle	R	alle	R	alle	R
Median [%]	0	5	5	9	9	9	4	8,5	0	4
Anzahl [n]	5	1	51	35	13	11	83	54	5	2

alle (alle Experimente); R (Responder)

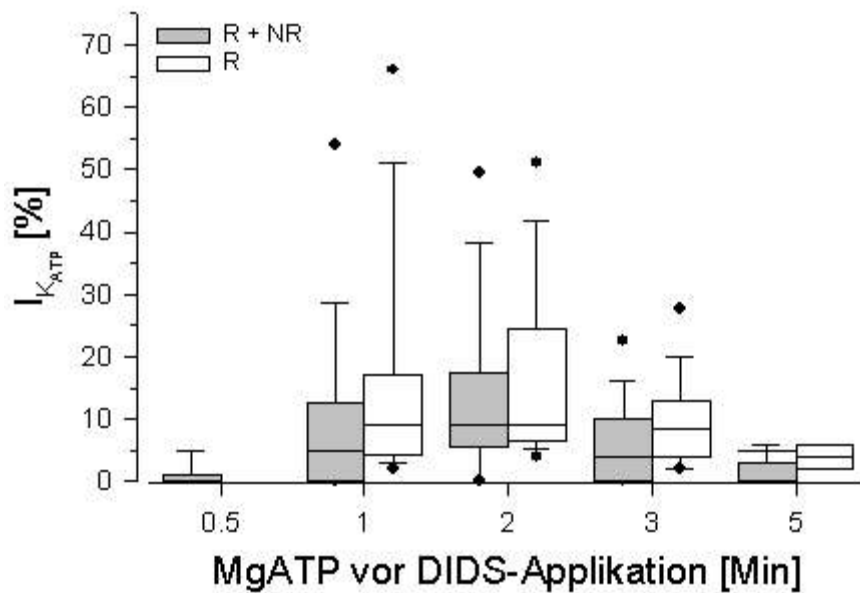


Abb. 54 Größe des MgATP-Block vor der DIDS Applikation bezogen auf die Aktivierung durch DIDS

Aufgetragen wurde die Aktivierung durch DIDS bei unterschiedlichem MgATP-Vorlauf. Dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied bei der unterschiedlichen Länge des Vorlaufs von MgATP auf die Aktivierung von K_{ATP} -Kanälen durch DIDS.

Im Folgenden möchte ich die Größe des MgATP-Blocks der K_{ATP} -Kanäle in Beziehung zur Aktivierung durch DIDS setzen. Vergleicht man die Größe der Hemmung des mit 1 mM MgATP blockierten Kanals unmittelbar vor der DIDS Applikation mit dem DIDS Effekt, so scheint es einen Trend zu geben, dass je schwächer der MgATP-Block ist, umso größer die Aktivierung durch DIDS ist (Tab. 4.18) Durch das Nachlassen des MgATP-Blocks mit der Zeit war dessen Verlauf deutlicher zu erkennen sowie dessen Extrapolation leichter durchzuführen und die Wirkung durch DIDS besser zu sehen. Es läßt sich also Folgendes feststellen: Obwohl die DIDS Aktivierung bei schwächer werdendem MgATP-Block scheinbar zunimmt, gibt es keine signifikanten Unterschiede beim Vergleich der einzelnen Werte untereinander. Eine Anova-Analyse ergab jedoch keine signifikanten Unterschiede.

Tab.4.18 Aktivierung der $K_{IR}6.2/SUR2B$ -Kanäle durch DIDS bei unterschiedlicher Hemmung der Kanäle durch 1 mM MgATP

MgATP-Block	< 70 %	< 80 %	< 90 %	< 100 %	100 %
Median [%] DIDS [0,1 μ M]	18	7,5	6	5,5	2
Anzahl [n]	13	20	30	58	56

Eine weitere Beobachtung in dem Zusammenhang mit DIDS und dem Ausmaß des ATP-Blocks ist folgende. Betrachtet man den MgATP-Block vor und nach einer DIDS-Applikation, so ist zu beobachten, dass nach der DIDS Gabe der MgATP-Block manchmal geringer ist als vor der DIDS-Applikation. Nach kurzer Zeit in ATP-freiem Puffer hat der MgATP-Block oft wieder das Ausgangsniveau erreicht (Abb. [53](#)).

Eine weitere interessante Frage ist, ob DIDS, im Gegensatz zu anderen K_{ATP} -Kanalblockern (vgl. Kap. 4.2), in Anwesenheit von hohen MgATP Konzentrationen noch wirksam ist. Es wurden $K_{IR}6.2/SUR2B$ -Kanäle mit 10 mM MgATP gehemmt und DIDS zusätzlich appliziert. Dabei konnte auch bei diesem starken Block in 66 % der Experimente eine Öffnung der Kanäle gesehen werden. Das gleiche Ergebnis wurde mit 1 mM DIDS erzielt (Tab. 4.19). Der Median der Aktivierung durch DIDS in 10 mM MgATP betrug 1 % (0 ; 4), in 1 mM MgATP 3 % (0 ; 11). Diese Werte unterscheiden sich nicht signifikant voneinander ($p = 0,309$) (Abb. [55](#)).

Tab. 4.19 Aktivierung von $K_{IR}6.2/SUR2B$ -Kanälen durch DIDS in Gegenwart von 1 mM und 10 mM MgATP

Experimente	1 mM MgATP		10 mM MgATP	
	Median [%]	Anzahl n	Median [%]	Anzahl n
alle	35	9	1	9
Responder	3	6	1	6

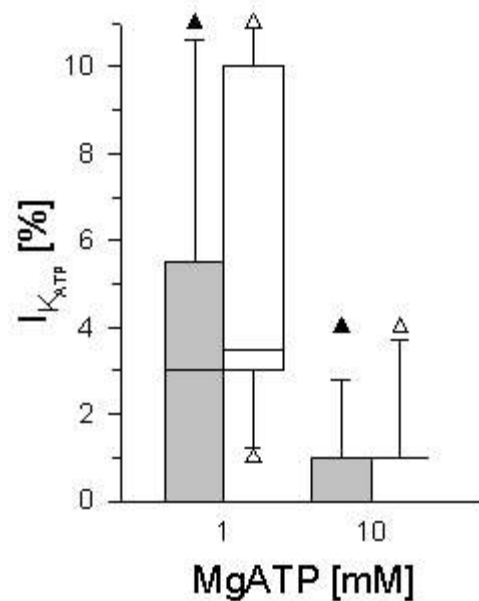


Abb. 55 DIDS bei 1 und 10 mM MgATP
 Dargestellt wurden die Aktivierung durch DIDS bei einem mit 1 und 10 mM MgATP blockierten Kanal (graue Boxen alle Daten, weiße Boxen Responder) (Daten siehe Tabelle 4.15)

Wie der Block durch ATP schwankte auch der Rundown in diesen Experimenten sehr stark, d.h. von kaum messbar bis nahezu 80 % Stromreduktion pro Minute. Wegen dieser starken Schwankungen wurde überprüft, ob der Rundown einen Einfluss auf die Aktivierung durch DIDS hat. Wie aus Abb. 56 deutlich wird, ist das aber nicht der Fall. Auf Grund der unregelmäßigen DIDS-Antwort wurden verschiedene Parameter verändert. Da DIDS lichtempfindlich ist, wurde in einigen Experimenten ein Vergleich mit DIDS unter Lichtausschluss und unter Lichteinfluss durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die Wirksamkeit von DIDS bei Licht nicht schlechter als beim Ausschluss von Licht war. Als weitere Behandlung wurde die verdünnte Lösung vor den Experimenten für 10 Minuten mit Licht von 254 nm oder 360 nm oder mit Rotlicht das ganze Experiment über bestrahlt. Durch die Bestrahlung war keine signifikante Verbesserung der Aktivierung von DIDS festzustellen. Zu den weiteren variablen physikalischen Parametern zählte die Temperatur, die von 22°C (normale RT im Labor) auf 27°C (RT im Sommer im Labor) angehoben wurde. Auch dadurch konnte keine Wirksamkeitsverstärkung bzw. eine regelmäßige Wirkung durch DIDS gesehen werden. Temperaturveränderungen in der Lösung können zu einem Schwanken des pH-Wertes führen. Aus diesem Grund wurde der pH-Wert in der Lösung von pH 7,2 auf pH 7,0 abgesenkt und auf pH 7,4 angehoben. Diese Veränderung hatte auch keinen Einfluss auf die Frequenz und die Größe des DIDS Effekts.

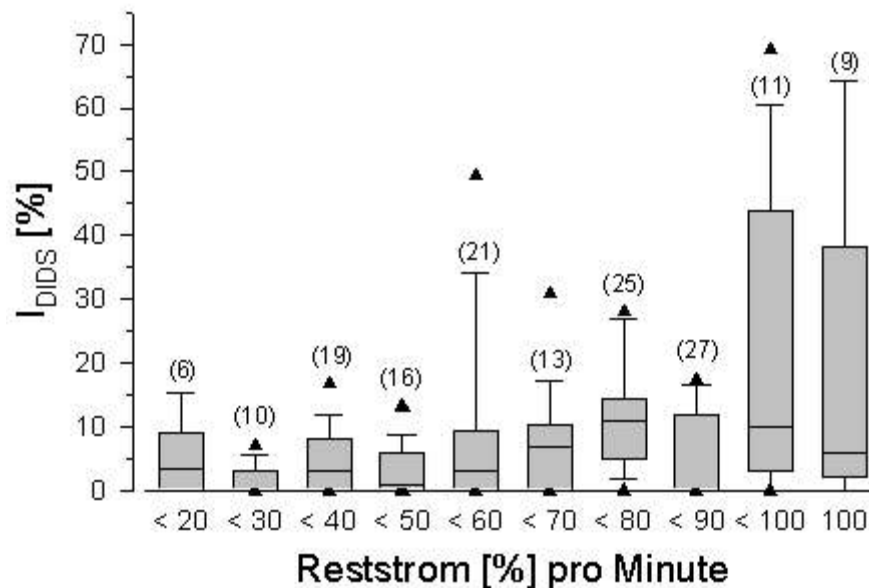


Abb. 56 Zusammenhang von Rundown und der Effektivität von DIDS
 Auftragung des Rundowns in Prozent repräsentiert durch den Reststrom nach einer Minute bezogen auf die Aktivierung von K_{ATP} -Kanäle durch DIDS. Der Reststrom wurde in Gruppen von < 20 % bis 100 % Reststrom eingeteilt. Dabei zeigte sich, dass die Daten sich nicht signifikant voneinander unterscheiden.

4.6.1 DIDS und Lipide

Um den Mechanismus der K_{ATP} -Kanalaktivierung durch DIDS aufzuklären, wurden weitere Experimente durchgeführt. Phosphorylierungen spielen bei der Regulation der K_{ATP} -Kanäle eine wichtige Rolle Hilgemann, 1997. Durch die Bildung von Phospholipiden, insbesondere von PIP_2 , wird die Kanalaktivität gesteigert und die ATP-Empfindlichkeit gesenkt (Song und Ashcroft, 2001a, Baukrowitz et al., 1998, Shyng et al., 2000). Durch den Einsatz von Phosphokinaseinhibitoren, vor allem von PI-3 und PI-4 Kinaseinhibitoren wie LY-294002 und Wortmannin, kann die Bildung höher phosphorylierter Phospholipide durch partielle Phosphorylierung nicht mehr stattfinden. Durch die Hemmung der Phosphorylierungen der Phospholipide durch PI-3-Kinase-Inhibitoren wird dann die Verschlechterung des MgATP-Block im Laufe der Zeit verhindert. Gleichzeitig wird der maximale Strom vermindert, der Kanal Rundown und die ATP-Empfindlichkeit gesteigert. Es stellte sich die Frage, ob DIDS über eine Hemmung der Phosphorylierungen die Kanalaktivität erhöht. Wenn DIDS die Phosphorylierung an den Phospholipiden begünstigt, sollte der Effekt der Aktivierung der K_{ATP} -Kanäle durch DIDS unter dem Einfluss von Phosphokinaseinhibitoren wie LY-294002 oder Wortmannin nicht mehr auftreten.

Nach den Daten von Song und Ashcroft, 2001a, kommt es beim Einsatz von PI-3-Kinaseinhibitoren zu keiner Verschlechterung des MgATP-Blocks mit der Zeit. Durch die Verhinderung der Lipid-Phosphorylierungen sollten nun auch kleine DIDS-Effekte zu beobachten sein.

Die Experimente mit LY-294002 und DIDS wurden immer mit 1 mM MgATP zur K_{ATP}^- -Kanalhemmung durchgeführt (Abb. 57). Nach der Kanalblockade mit MgATP wurde LY-294002 zu der Nukleotidlösung hinzugefügt und im nächsten Schritt DIDS hinzugegeben. Nach der DIDS-Applikation wurden die Lösungen in umgekehrter Reihenfolge ausgewaschen. Nach dem erneuten Waschen mit Puffer wurden die Kanäle mit MgATP blockiert und die Wirkung von DIDS mit dem Standard-Protokoll überprüft. Zur Auswertung wurden ausschließlich Experimente herangezogen, bei denen Doppelstimulationen von DIDS/LY-294002 und DIDS durchgeführt wurden.

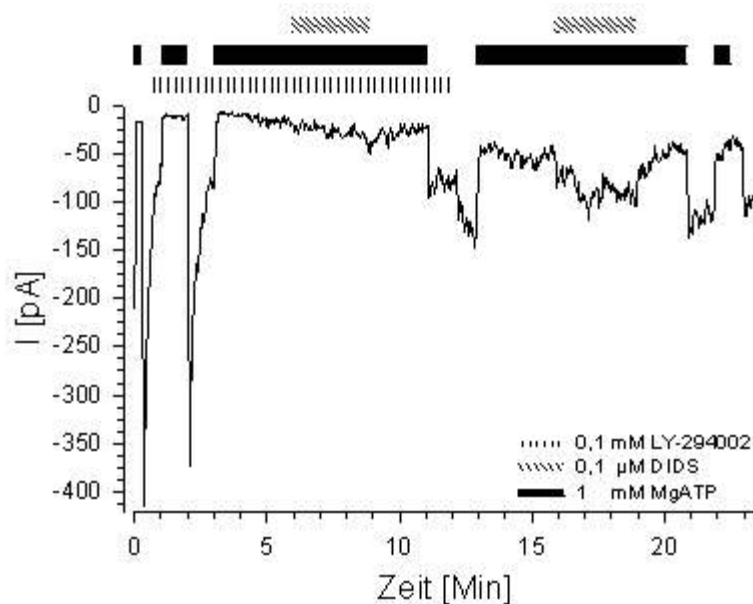


Abb. 57 *Beispielexperiment für LY/DIDS und DIDS in einem Experiment*

Nach der Entwicklung eines Stroms und starkem Rundown wurde LY-294002 zugesetzt (längsgestreifte Balken). Der sich entwickelnde Strom wurde mit 1mM MgATP (schwarze Balken) gehemmt. Nach dem Auswaschen von MgATP stieg der Strom spontan wieder an, um rasch wieder abzunehmen. Der verbliebene Strom wurde mit MgATP gehemmt. DIDS (quergestreifte Balken) wurde zusätzlich appliziert, wodurch eine leichte Steigerung der Kanalaktivität zu beobachten war. Nach dem Auswaschen von DIDS sank die Kanalaktivität. MgATP wurde ausgewaschen, LY wurde ausgewaschen und erneut mit MgATP der Kanal blockiert. Nach einer erneuten DIDS Gabe entwickelte sich ein Strom, der durch Entfernen von DIDS wieder absank. Nach dem Auswaschen von MgATP stieg der Strom wieder auf den Wert vor der MgATP Applikation.

Der MgATP-Block unter dem Einfluss von LY-294002 wurde teilweise schon durch den PI-3 Kinaseinhibitor selber verändert. Somit zeigten sich bei den Experimenten durch LY-294002 eine Stromsteigerung im Durchschnitt um 1 % (0 ; 27) (Median). Der Verlust des MgATP-Blocks war jeweils geringer als ohne den PI-3-Kinaseinhibitor, aber im Gegensatz zu den Ergebnissen von Song und Ashcroft, 2001a, mit SUR2A noch deutlich sichtbar (Abb. 57).

Wurde der PI-3-Kinaseinhibitor im ersten Puls zusammen mit DIDS und MgATP gegeben, konnte keine signifikant ($p = 0,098$) geringere Kanalaktivität in Anwesenheit von LY-294002 beobachtet werden. Der Median betrug dabei im ersten Puls für LY-294002/DIDS 1 %, für DIDS im zweiten Puls 5 %. Werden nur die Responder berücksichtigt, ist der Unterschied signifikant ($p = 0,05$). Die Mediane liegen bei 3,5 % für LY-294002/DIDS (erster Puls) und bei 16,5 % für DIDS (zweiten Puls). Wurde die Reihenfolge umgekehrt, d.h. zuerst DIDS alleine im ersten Puls und dann die Kombination von LY-294002/DIDS im zweiten Puls gegeben, so ist kein signifikanter Unterschied bei den 4 ausschließlich aus Respondern bestehenden durchgeführten Experimenten zu erkennen (Abb. 58). Fasst man die Ergebnisse, bei denen DIDS eine deutliche Aktivierung zeigte (Responder), zusammen, so sieht man keinen signifikanten Unterschied bei der Aktivierung der K_{ATP} -Kanälen ($K_{IR6.2/SUR2B}$) durch DIDS, dem Phosphokinaseinhibitor LY-294002 alleine oder die Kombination von beiden Substanzen

Tab. 4.20 Vergleich von DIDS mit DIDS/LY294002 in ein und demselben Patch an $K_{IR6.2/SUR2B}$ -Kanälen

Anzahl	1. Puls	Median	2. Puls	Median
13 alle Experimente		1 (0 ; 16)		5* (0 ; 44)
8 Responder	LY + DIDS	3,5 (0 ; 16)	DIDS	16,5* (3 ; 46)
4 Nur Responder	DIDS	8 (2 ; 10)	LY + DIDS	4 (0 ; 11)

* $p = 0,05$ (signifikant)

Vergleicht man die Quote der Experimente, die in Anwesenheit von LY auf DIDS reagieren mit den im Vorangegangenen geschilderten Experimenten, so ist kein Unterschied vorhanden. Die Responderrate (62 %) ist im statistischen Mittel genauso hoch wie in Abwesenheit von LY-294002 (65 %).

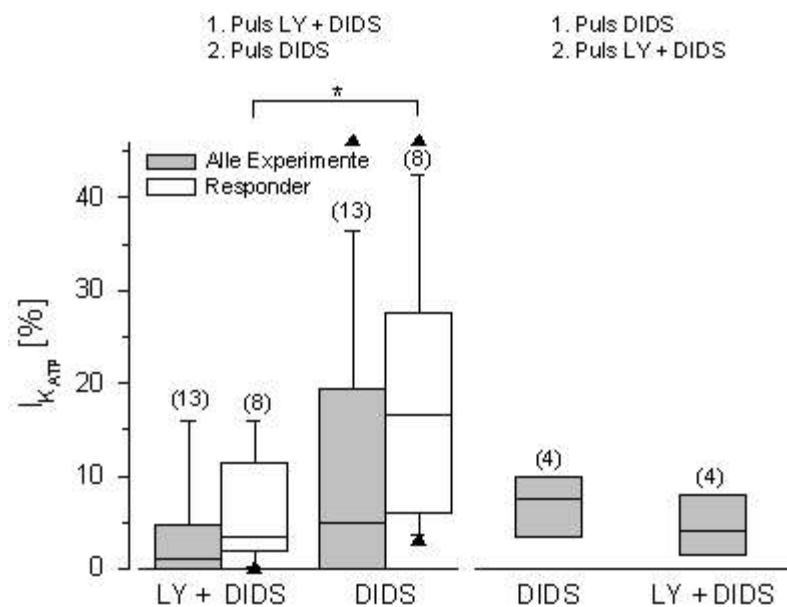


Abb. 58 Wirkung von LY/DIDS im Vergleich mit DIDS alleine

Auswertung von Doppelpulsprotokollen von LY/DIDS und DIDS. Auf der linken Hälfte wurde DIDS in Kombination mit LY und in zweiten Puls DIDS alleine gegeben. Der Median beträgt 1 % bzw. 5 % ($p = 0,098$).

Auf der rechten Hälfte ist die Auswertung der einen Experimente mit umgekehrter Reihenfolge dargestellt. DIDS wurde zuerst alleine und im zweiten Puls LY/DIDS gegeben. Dabei lag der Median bei 8 % bzw. 4 % ($p = 0,536$).

Die weißen Boxen zeigen ausschließlich die Responder. DIDS in Anwesenheit von LY ergibt im ersten Puls für die Aktivierung einen Median von 3,5 %, der von DIDS alleine im zweiten Puls 16,5 % ($p = 0,05$; signifikant (Sigma Stat)).

Wie in Abb. 57 zu sehen ist, war der Rundown in dieser Experimentserie sehr hoch. In acht Experimenten betrug der Rundown 10-35 % pro Minute, in fünf Experimenten 50-90 % pro Minute. In der Gruppe mit niedrigem Rundown (50-90 % Reststrom) lag die Responderrate bei ~35 %, in der Gruppe mit hohem Rundown (10-35 % Reststrom) bei 75 %, im Durchschnitt bei 63 %. (Abb. 59) (Tab. 4.21).

Tab. 4.21 Vergleich der K_{ATP} -Kanal-Aktivierung durch DIDS und DIDS/LY294002 bezogen auf den Rundown und die Responder-Rate

Anzahl	Rundown pro Minute als Reststrom	Responder-Rate	Aktivierung gegen 1mM MgATP	
			LY/DIDS	DIDS
n	%	%	Median	Median
5	10-35	75	3 (0 ; 16,5)	21 (0 ; 46)
8	50-90	50	0 (0 ; 16)	1,5 (0;19)
13	10-90	63	1 (0 ; 16)	5 (0;44)

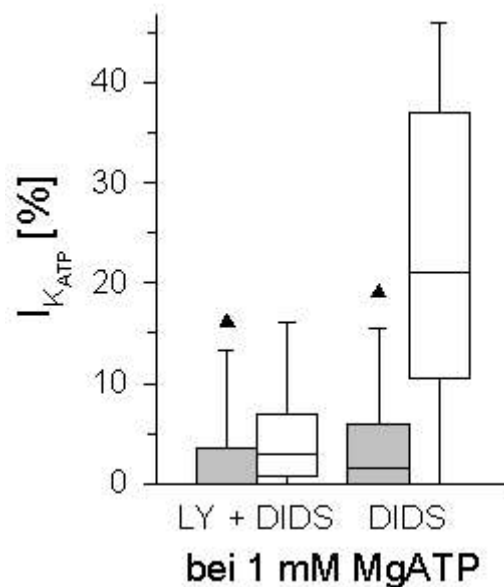


Abb. 59 K_{ATP} -Kanal-Aktivierung durch DIDS bei Experimenten mit hohem und niedrigem Rundown

Auftragung der Aktivierung durch DIDS und LY/DIDS (Mediane) bei niedrigem (50 - 90 % Reststrom; weiße Balken) und hohem (10 - 35 % Reststrom; graue Balken) Rundown pro Minute. Keine Signifikanz zwischen LY+DIDS und DIDS bei niedrigem ($p = 0,222$) und hohem Reststrom ($p = 0,065$).

DIDS wurde auch in Anwesenheit von Wortmannin, ebenfalls ein PI-3 Kinaseinhibitor, untersucht. Dabei wurden 1 und 10 μM verwendet. Der Median für die Stromaktivierung durch DIDS in Anwesenheit von Wortmannin (10 μM) beträgt 0 % (0 ; 26) im ersten Puls; für DIDS alleine im zweiten Puls 13 % (0 ; 18) ($p = 0,385$; $n = 9$). Bei diesen Konzentrationen war kein

signifikanter Unterschied zwischen Wortmannin/DIDS und DIDS alleine zu beobachten (Abb. 60).

Langkettige-AcylCoA-Ester und Phospholipide gehen in die Membran und interagieren mit K_{ATP} -Kanälen. Sie beeinflussen hauptsächlich den $K_{IR6.2}$. Durch die Substanzen verlieren die K_{ATP} -Kanal-Öffner ihre Wirkung. Langkettige Acyl-CoA-Ester, zu denen OleylCoA gehört, senken weiterhin die ATP Empfindlichkeit. Weiterhin wird wie durch Phospholipide (z.B. PIP_2) der Rundown verringert und der Strom gesteigert (Liu et al., 2001).

Unter dem Einfluss von Oleyl-CoA konnte eine Aktivierung durch DIDS bei dem mit 1 mM MgATP geschlossenen Kanal gesehen werden. Dabei war die Kanal-Aktivierung durch DIDS in Anwesenheit von Oleyl-CoA nicht signifikant verändert im Vergleich mit der Aktivierung im zweiten DIDS Puls. Betrachtet man die Mediane der beiden DIDS Pulse, so ist der Median in Anwesenheit von Oleyl-CoA nur etwas kleiner als in Abwesenheit, 30 % (0 ; 59) bzw. 37 % (16 ; 53) ($p = 1,000$; $n = 6$). Die Responderrate betrug 83 %. Der MgATP-Block (1 mM MgATP) nahm bei Zugabe von Oleyl-CoA ab. Nachdem Oleyl-CoA entfernt worden ist, wurde der MgATP-Block wieder größer.

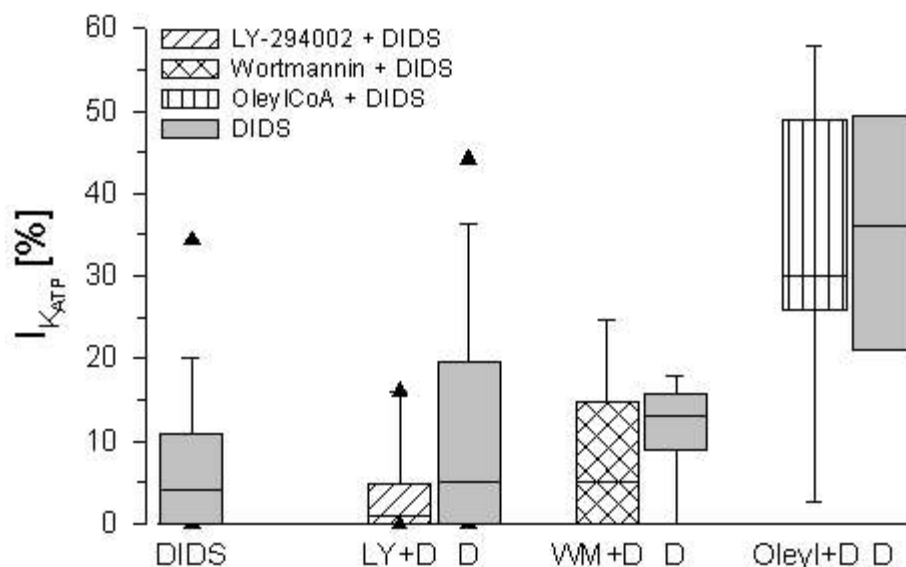


Abb. 60 DIDS in Kombination von LY-294002, Wortmannin, OleylCoA

Der erste Balken stellt die Daten aus Abb. 51 als Vergleich zu den Experimenten dar, der die mit PI-3-Kinaseinhibitoren (LY-294002 (LY), Wortmannin (WM)) oder Lipiden (OleylCoA) durchgeführt wurden. Die Experimente mit LY, WM und Oleyl (CoA) wurden in Kombination mit DIDS in einem ersten Puls und DIDS alleine im zweiten Puls appliziert. Die Experimente sind jeweils gepaart ausgewertet worden (Substanz/DIDS verglichen mit DIDS alleine aus ein und derselben Experimentserie).

4.7 Aktivierung von $K_{IR}6.1/SUR2A(Y1206S)$ Kanälen

In nativem Gewebe wurde die Kombination bestehend aus $K_{IR}6.1/SUR2A$ -Kanälen bisher nicht gefunden. Obwohl die beiden Proteine ($K_{IR}6.1$ und $SUR2A$) in denselben Zellen (z.B. Kapillare, Herzmuskelzelle) vorkommen (Mederos y Schnitzler et al., 2000, Singh et al., 2003), ist diese Kanalkombination in Vivo bisher nicht gefunden worden. Babenko et al., 1998a, hatten in heterolog exprimierten Zellen bei der Untersuchung von den $K_{IR}6.1$ und $K_{IR}6.2$ Kanaluntereinheiten mit den $SUR1$, $SUR2A$ und $SUR2B$ Rezeptoruntereinheiten nur für die Kombination $K_{IR}6.1/SUR2A$ keine Kanalaktivität gefunden; alle anderen Kombinationen erzeugten K_{ATP} -Kanäle. In späteren Untersuchungen konnte von verschiedenen Arbeitsgruppen in vitro gezeigt werden, dass auch der $K_{IR}6.1$ zusammen mit dem $SUR2A$ funktionale Kanäle bildet (Kono et al., 2000, Kondo et al., 1998). In der Inside-Out Konfiguration öffnen sich die Kanäle in ATP-freier Lösung nicht spontan. Wurde der Patch millimolarem UDP ausgesetzt, kam es zu einer schwachen Kanalaktivierung mit einer schwachen Rektifikation, wobei die Leitfähigkeit (bei negativen Potentialen) bei 34 pS lag (Kondo et al., 1998, Kono et al., 2000).

In Ganzzellmessungen sowie in Inside-Out-Untersuchungen habe ich die Kanalaktivierbarkeit bei $K_{IR}6.1/SUR2A$ - und $K_{IR}6.1/SUR2A(Y1206S)$ -Kanälen bei 37°C untersucht. Primäres Ziel war, die Kanalaktivität der $K_{IR}6.1/SUR2A(Y1206S)$ -Mutanten zu untersuchen. In Abb. [61](#) ist eine Spur einer Ganzzellmessung eines $K_{IR}6.1/SUR2A(Y1206S)$ Kanals zu sehen, bei der sich ein Strom entwickelte, der durch Glibenclamid gehemmt werden konnte. Der Block durch Glibenclamid konnte durch Auswaschen wieder aufgehoben werden. Auch hier ist abzusehen, dass die Ströme trotz der verwendeten ATP/GTP-Konzentration von 1 mM/0,3 mM zu groß geworden wären, wodurch es zum oszillieren und damit zum Verlust des Patches gekommen wäre, hätte man ein konstantes Niveau abgewartet (vgl. Abb. [29](#) mit $K_{IR}6.2/SUR2A$).

Inside-Out-Patche, mit $K_{IR}6.1/SUR2A$ waren auf Grund von einer geringeren Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle, quantitativ schwer auswertbar. Für die Öffnung von $K_{IR}6.1$ Kanälen werden im Unterschied zur Aktivierung von $K_{IR}6.2$ -Kanälen, die auch ohne Nukleotide eine spontane Öffnung nach dem Herausreißen zeigen, Nukleosiddiphosphate benötigt (z.B. UDP, ADP) (Kondo et al., 1998). Große Effekte werden aber nur durch die zusätzliche Applikation von Kalium-Kanalöffnern (z.B. Pinacidil) erreicht (Satoh et al., 1998).

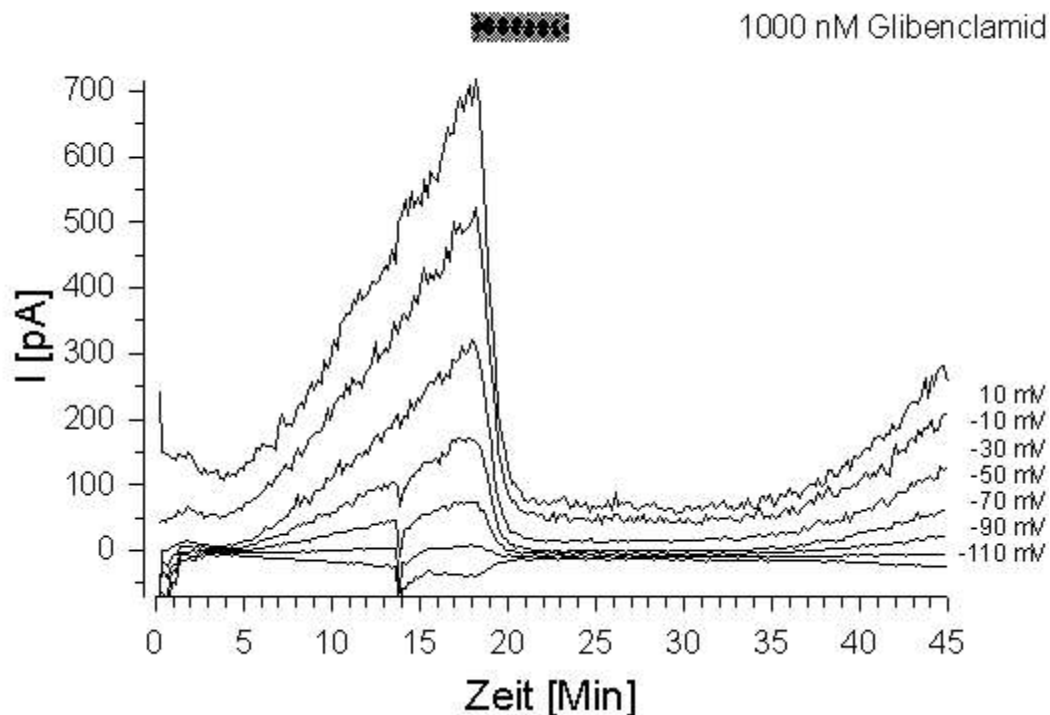


Abb. 61 *K_{IR}6.1/SUR2A(Y1206S) wird durch Glibenclamid gehemmt*

Die Beispielspur zeigt die Stromentwicklung einer WC-Messung. Die Spannung wurde von -110 bis $+10$ in 20 mV Schritten variiert. Während der Dialyse der Zelle mit 1 mM MgATP / $0,3$ mM MgGTP entwickelte sich ein Strom, der durch eine saturierende Konzentration Glibenclamid (1 μ M) gehemmt wurde. Glibenclamid konnte, zumindest teilweise, wieder ausgewaschen werden, was an einer erneuten Stromentwicklung zu sehen ist.

Erwartet wurde bei der Einzelkanalmessung der K_{IR}6.1/SUR2A(Y1206S)-Kanäle im symmetrischen Kalium (140 mM) dieselbe Leitfähigkeit wie für die Wildtyp-Kanäle, die bei ihnen ca. 35 pS beträgt. Die Leitfähigkeit, die sich aus der Einzelkanalspur für die Y1206S Mutante des K_{IR}6.1/SUR2A ergab, betrug 43 ± 4 pS (Abb. 62). Für die Kanalöffnung wurde UDP zusammen mit UTP und ADP in Kombination mit ATP (jeweils 1 mM) verwendet. Werden die Leitfähigkeiten für die beiden Nukleotide getrennt ermittelt, so zeigt sich ein signifikanter Unterschied (UDP = $40,4 \pm 2,8$ ($n = 10$); ADP = $44,0 \pm 3,9$ ($n = 25$); $p = 0,047$). Die unterschiedlichen K⁺-Konzentrationen (150 mM zu 140 mM) in den Lösungen sollten keinen gravierenden Einfluss auf die Leitfähigkeit der Kanäle besitzen. Die Experimente wurden bei vergleichbaren Temperaturen gemessen (22 - 25 °C (UDP); 26 - 28 °C (ADP)). Dieser etwas höhere Wert könnte an der etwas erhöhten RT-Temperatur gelegen haben.

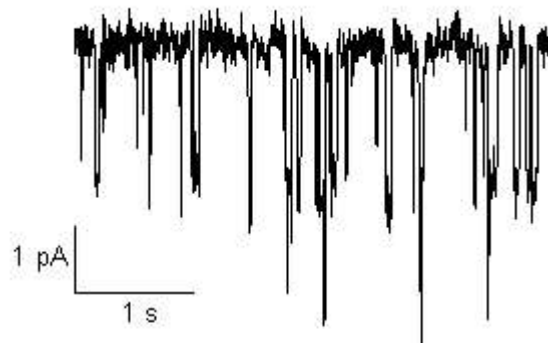


Abb. 62 $K_{IR6.1}/SUR2A(Y1206S)$ wird in der IO-Konfiguration durch MgATP aktiviert

In Anwesenheit von Nukleotiden (1 mM MgATP) und in symmetrischen Kalium (140 mM) werden in der IO-Konfiguration beim $K_{IR6.1}/SUR2A(Y1206S)$ nur wenige Kanäle aktiviert. In dem gezeigten Patch sind mindestens zwei Einzelkanäle mit einer Leitfähigkeit von 43 pS zu sehen. Das Haltepotential betrug -50 mV.

5 Diskussion

5.1 Nukleotide

5.1.1 Hemmende und aktivierende Wirkungen von Nukleotiden

In der Einleitung wurde bereits darauf hingewiesen, welche große Bedeutung die Nukleotide, vor allen Dingen auch die Nucleosiddiphosphate, auf die Modulation der K_{ATP} -Kanäle haben. Ich habe deshalb begonnen, die Interaktion von ADP mit K_{ATP} -Kanälen zu untersuchen. Da der therapeutische Ansatzpunkt des in dieser Arbeit ebenfalls untersuchten HMR1883 das Herz ist und hier ungeklärte, wahrscheinlich mit ADP korrelierte Phänomene der Glibenclamidwirkung in Kardiomyozyten beschrieben wurden (Abb. 25; Venkatesh et al., 1991, Findlay, 1993) habe ich mich zunächst auf SUR2A konzentriert.

Die Notwendigkeit von Mg^{2+} -Ionen für die aktivierende Wirkung von Nucleosidtri- und -diphosphaten ist bei $K_{IR}6.2$ allgemein akzeptiert. Dies konnte auch in meinen Arbeiten auch bestätigt werden. In Mg^{2+} -freier Lösung verhält sich ADP genauso wie ATP, d.h. es kann nur eine hemmende Wirkung beobachtet werden. Bei ADP ist sie aber 27mal schwächer (Abb. 17, Abb. 20; Tab. 4.1, Tab. 4.3).

In Anwesenheit von Magnesium lässt der fast unverändert hemmende Effekt bei Konzentrationen $100 \mu M$ MgADP darauf schließen, dass es sich um den gleichen Effekt wie in Abwesenheit von Mg^{2+} handelt. Dies wurde bei entsprechend niedrigeren Konzentrationen so auch für ATP / MgATP beschrieben (an $K_{IR}6.2$ /SUR1-Kanälen: Hambrock et al., 2002b, Gribble et al., 1998c; an $K_{IR}6.2$ /SUR2A: Babenko et al., 1998b), so dass es zumindest sehr wahrscheinlich ist, dass die hemmende Wirkung von Nucleotiden generell den gleichen, im wesentlichen Magnesium-unabhängigen Mechanismus hat. Dieser konnte an $K_{IR}6.2$ lokalisiert werden (für ATP: Tucker et al., 1997; für ADP: Koster et al., 1999). Interessant ist in diesem Zusammenhang die auch von anderen Arbeitsgruppen beobachtete etwas höhere IC_{50} von MgATP im Vergleich zu Mg^{2+} -freiem ATP. Zwei Erklärungen bieten sich dafür an. Während Ashcroft und Kakei, 1989, noch vermuten, nur freies ATP^{4-} würde den Kanal hemmen (welches natürlich in Anwesenheit von Mg^{2+} in geringerer Konzentration vorliegt), erscheint nach den heute vorliegenden Daten eine Überlagerung des aktivierenden Effekts von MgATP am SUR (Gribble et al., 1998c) mit der Hemmung durch ATP^{4-} oder MgATP am K_{IR} für diesen

Beobachtung verantwortlich. Ein klarer Hinweis für die Richtigkeit dieser Hypothese ist die fehlende Rechtsverschiebung der Konzentrationswirkungskurve für ATP durch Mg^{2+} am ohne SUR exprimierten $K_{IR}6.2$ C36 (Gribble et al., 1998c). Da aber bei MgATP die IC_{50} (ca. 10 nM) und die EC_{50} (< 100 nM Gribble et al., 1998c) zu dicht beieinander liegen, können sie nicht (wie bei MgADP; Abb. 22) auseinander gerechnet werden.

Mit einer EC_{50} von 3 μ M (gegenüber einer IC_{50} von ca. 500 μ M) lässt sich die aktivierende Komponente für MgADP dagegen hier leicht isolieren (Abb. 22). Auffällig ist die hohe Streuung der Messdaten. Dies hat Anlass zu weiteren Analysen der Daten gegeben (Kap. 4.1.4). Da reversibler Rundown als Mg^{2+} abhängiger Prozess vermutlich am SUR lokalisiert ist, ist es nicht verwunderlich, dass in Abb. 23 kein Zusammenhang zwischen der Größe des Rundowns und der Kanal-Hemmung durch die Nukleotide (die ja am K_{IR} ohne Mg^{2+} stattfindet) zu erkennen ist. Es gibt aber einen klaren Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Aktivierung und dem Rundown (Abb. 23; Tab. 4.4). Diese Korrelation lässt sich für eine

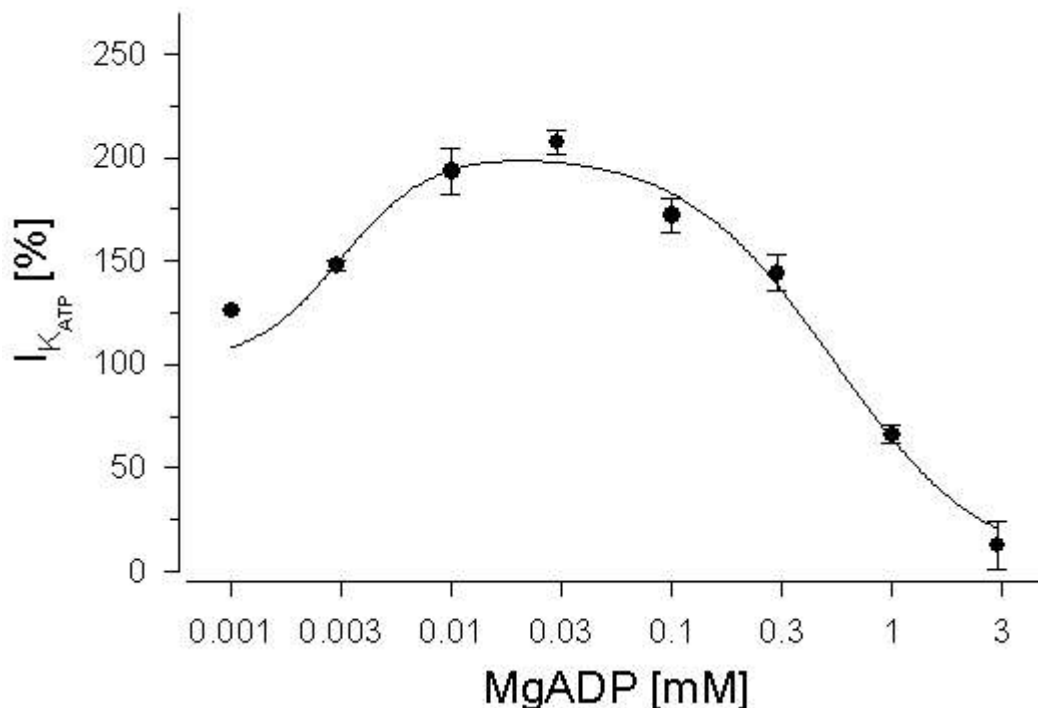


Abb. 63 *Rundown korrigierte Konzentrationswirkungsbeziehung von MgADP*

Modifizierte Form der Abb. 22. Teilt man die Strommodulation ($K_{IR}6.2/SUR2A$) durch MgADP (I) durch den individuellen Rundown in dem jeweiligen Patch und multipliziert dann mit einem durchschnittlichen Rundown von 55 %, so erhält man diese Darstellung. Deutlich wird im Vergleich mit Abb. 22 die geringere Streuung der Daten bei aktivierenden MgADP-Konzentrationen. Die Fit-Parameter ändern sich nur geringfügig: maximale Aktivierung 103 ± 11 %; $pk_1=5,5 \pm 0,1$ mit $n_1=2,1 \pm 1,4$ und $pk_2=3,3 \pm 0,1$ mit $n_2=1,3 \pm 0,2$. Der Korrelationskoeffizient R steigt allerdings von 0,89 auf 0,93.

veränderte Darstellung der Daten aus Abb. [22](#) anwenden. Teile ich die individuell für jeden Patch gemessene Stromaktivierung durch den Rundown des jeweiligen Patches (% / Minute) und korrigiere dann diesen Wert durch Multiplikation mit einem durchschnittlichen Rundown von 55 % / Minute wird die Streuung der Messdaten bei aktivierenden MgADP-Konzentrationen deutlich reduziert (Abb. [63](#)). Diese verringerte Streuung ist ein weiterer Hinweis auf den schon erwähnten Zusammenhang zwischen Kanal-Rundown und Kanal-Aktivierung durch MgADP. Diese Beobachtung lässt zunächst vermuten, dass Rundown (vielleicht auch Refreshment) und Aktivierung durch Nucleosiddiphosphate derselbe Mechanismus zugrunde liegt bzw. die Beobachtung trivial ist; je stärker der Rundown, desto mehr Kanäle können aktiviert bzw. „aufgefrischt“ werde. Dies ist im Grundsatz zwar durchaus richtig, es gibt aber auch Unterschiede. Die Beispielspur in Abb. [21](#) zeigt, dass die Aktivierung durch MgADP nie das maximale Niveau des vorhergehenden Refreshments erreicht. Die Aktivierung durch MgADP unterscheidet sich auch deshalb deutlich vom Refreshment, weil die Aktivierung, im Gegensatz zum Refreshment, in wenigen Sekunden reversibel ist und nach Auswaschen ungefähr eine Stromgröße erreicht wird, auf die die Stromspur auch in Abwesenheit von ADP extrapoliert werden kann (Abb. [21](#)). In hohen Konzentrationen (3 mM) kann zwar auch MgADP ein Refreshment bewirken, es ist aber deutlich schwächer als 1 mM MgATP. Die deutlichen Unterschiede zwischen Refreshment nach Auswaschen von MgATP und der Kanalaktivierung mit MgADP werden auch durch die Experimente mit dem ATP-regenerierenden System unterstützt. Auch unter diesen, praktisch ADP-freien Bedingungen wird ein unverändertes Refreshment beobachtet. Es ist also dafür kein freies MgADP notwendig.

Bei der hochaffinen Kanalaktivierung durch MgADP handelt es sich also um einen anderen Vorgang als Rundown und Refreshment durch MgATP. Die Frage aber, ob trotzdem ein mechanistischer Zusammenhang zwischen diesen Phänomenen besteht, dass nämlich Kanäle, die schnell ihre Aktivität reduzieren, besonders empfindlich auf MgADP reagieren oder aber ob der Zusammenhang einfach dadurch gegeben ist, dass wenn eine geringe Aktivität vorhanden ist mehr Kanäle aktiviert werden können, kann mit den vorliegenden Daten nicht abschließend entschieden werden.

Die Experimente mit aktivierenden MgNDPs bei gleichzeitiger Anwesenheit von hemmenden ATP-Konzentrationen lassen sich vor dem Hintergrund bekannter Daten einfach interpretieren. Die deutliche Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungsbeziehung der Aktivierung durch MgADP bei Anwesenheit von ATP (Abb. [24](#)) dürfte einerseits durch die

Kompetition von MgADP mit dem deutlich schwächer aktivierenden MgATP und andererseits durch die generell nach rechts verschobene EC_{50} von K_{ATP} -Kanal-Öffnern in Gegenwart von hemmenden ATP-Konzentrationen begründet sein. Letzteres ist vermutlich auch die Ursache für die (schwache) Korrelation zwischen schwachem ATP-Block und guter Aktivierung durch MgNDP (Abb. 25 und Abb. 28). Kanäle die nur schwach inhibiert werden sind empfindlicher für Öffner. Ebenso wird vermutlich durch die schon stark hemmenden 100 μ M ATP die inhibitorische Wirkung, die 1 mM MgADP alleine hatte (Abb. 22, Abb. 63) maskiert. MgUDP verhält sich in diesen Experimenten grundsätzlich sehr ähnlich wie MgADP. Einziger auffälliger Unterschied ist die verzögerte 2. Komponente beim Auswaschen der Substanz (Abb. 26B). Eine Erklärung für diese Beobachtung habe ich zur Zeit nicht.

5.1.2 Verringerung der ATP-Hemmwirkung bei Anwesenheit von Mg^{2+}

Wenn man Inside-Out-Patche mit $K_{IR}6.2/SURx$ -Kanälen längere Zeit (d.h. einige Minuten) in Anwesenheit von Mg^{2+} untersucht, wird die Hemmung durch ATP, mehr oder weniger stark ausgeprägt, immer schwächer (siehe z.B. Abb. 50). Dieses Phänomen wird von anderen Gruppen immer wieder beobachtet. Da es weitgehend unverstanden ist und die Messungen erschwert, wird es aber korrigiert oder ignoriert. Publiizierte Beobachtungen gibt es z.B. von Reimann et al., 2000, und Song und Ashcroft, 2001a. Nach diesen Publikationen ist der Effekt bei Kanälen mit $K_{IR}6.2/SUR2B$ am stärksten ausgeprägt, bei $K_{IR}6.2/SUR1$ -Kanälen am schwächsten, was sich mit unseren Beobachtungen deckt. Bei $K_{IR}6.2/SUR2A$ -Kanälen konnten Song und Ashcroft, 2001a, den Verlust der Hemmwirkung von ATP durch die Gabe von PI-Kinase Inhibitoren verhindern. Sie vermuten also, dass die Ursache dafür in einer Zunahme von PIP_2 und PIP_3 liegt, welche die Hemmwirkung von ATP verringert (Baukrowitz et al., 1998, Shyng und Nichols, 1998). Bei unseren Untersuchungen mit $K_{IR}6.2/SUR2B$ konnten wir dies nicht bestätigen, im Gegenteil, der PI-Kinase Inhibitor LY-294002 aktivierte sogar die Kanäle. Nach diesen Daten scheint es hier also einen grundsätzlichen Unterschied zwischen $K_{IR}6.2/SUR2A$ - und $K_{IR}6.2/SUR2B$ -Kanälen zu geben.

Schwer zu interpretieren sind auch meine Beobachtungen (mit $K_{IR}6.2/SUR2A$) zu diesem Aspekt mit dem ATP-regenerierenden System. Hier war bei Anwesenheit des ATP-regenerierenden Systems, der ATP-Block nicht nur konstant, er wurde sogar besser (Tab. 4.2). Dies kann vermutlich nicht mit der Abwesenheit von ADP erklärt werden, denn MgADP hat

keinen Effekt auf den ATP-Block (siehe Abb. [21](#)) und auch bei kombinierter Gabe von MgADP und MgATP ist kein auffälliger Hemmungswirkungsverlust von MgATP zu beobachten (Daten nicht gezeigt). Eine mögliche Erklärung dieser Beobachtung könnte von einer ganz anderen Seite kommen. Beziehungen von K_{ATP} -Kanälen mit der Kreatinkinase werde schon lange diskutiert. Dzeja und Terzic, 1998, und Crawford et al., 2002b, konnten eine direkte Assoziation dieses Proteins mit kardialen K_{ATP} -Kanälen zeigen. Es ist also möglich, dass in meinen Experimenten das vorhandene Kreatinphosphat eine direkte Wirkung auf die Kanäle hatte.

Es ist schwer, hier eine abschließende Zusammenfassung zu geben. Deutlich wird auf jeden Fall, dass die Reduktion der Hemmwirkung von MgATP mit Phosphorylierungen oder Dephosphorylierungen zusammen hängt und Kanalsubtyp spezifisch, komplex abläuft.

5.2 K_{ATP} -Kanal-Blocker

In dieser Arbeit wurden drei K_{ATP} -Kanalblocker untersucht, der Sulfonylharnstoff Glibenclamid, der Standardblocker der K_{ATP} -Kanäle, der schwach kardioselektive Sulfonylthioharnstoff HMR1883 sowie der Pinacidil-Abkömmling PNU-96293, dessen (*S*)-Antipode ein schwacher Öffner des $K_{IR}6.2/SUR2B$ -Kanals ist. Die beiden folgenden Aspekte verdienen Beachtung und sollen im Folgenden genauer diskutiert werden: Zunächst die Verschiedenartigkeit der Hemmkurven in Abhängigkeit von der Konfiguration der Saugelektrode sowie die Modulation der Hemmung durch MgADP.

5.2.1 Einfluß der Patch-Clamp-Konfiguration auf die Hemmung rekombinanter K_{ATP} -Kanäle durch Glibenclamid, HMR1883 und PNU-96293

Die im *Kapitel 4.2* dargestellten Ergebnisse mit den drei Hemmstoffen, dem Sulfonylharnstoff Glibenclamid, dem Thiosulfonylharnstoff HMR1883 und dem Cyanoguanidin PNU-96293 sind in den folgenden beiden Tabellen zusammengefasst:

Tab. 5.1 Vergleich der Hemmung der verschiedenen K_{ATP} -Kanäle in der Ganzzellkonfiguration

Kanaltyp	Glibenclamid		HMR1883		PNU-96293	
	IC ₅₀	A	IC ₅₀	A	IC ₅₀	A
	[nM]	[%]	[nM]	[%]	[nM]	[%]
$K_{IR}6.2/SUR2A$ ¹	--	--	--	--	14 (8;23)	68 ± 4
$K_{IR}6.2/SUR2B$ ²	167 (103;270)	100	--	--	78 (37;165)	74 ± 6
$K_{IR}6.2/SUR2B(YS)$ ²	13 (6;28)	100	--	--	45 (15;140)	86 ± 9
$K_{IR}6.1/SUR2B$ ²	43 (33;55)	100	5300 (4700;6000)	100	--	--
$K_{IR}6.1/SUR2B(YS)$ ²	2,7 (2,1;3,5)	100	--	--	--	--

¹ Messungen am $K_{IR}6.2/SUR2A$ -Kanal waren schwierig, da sich sehr oft ein so großer Strom entwickelte, dass Verstärker die Zellen nicht mehr auf vorgegebenes Potential klemmen konnte (vgl. Seite 100, Kap. 4.2.1). Daher wurde nur PNU-96293 untersucht. Nukleotid-Konz.: 1,0 MgATP [mM]

² Nukleotid-Konz.: 1,0 MgGDP; 0,3 MgATP [mM]

Tab. 5.2 Vergleich der Hemmung der verschiedenen K_{ATP} -Kanäle in der I/O-Konfiguration

Kanaltyp	Glibenclamid		HMR1883		PNU-96293	
	IC ₅₀	A	IC ₅₀	A	IC ₅₀	A
	[nM]	[%]	[nM]	[%]	[nM]	[%]
K _{IR} 6.2/SUR2A	26 (23;29)	54 ± 3	380 (280;510)	54 ± 3*	21 # (12;37)	54 ± 4
K _{IR} 6.2/SUR2A(YS)	0,84 (0,58;1,21)	70 ± 2	--	--	--	--
K _{IR} 6.2/SUR2B	27 (22;32)	63 ± 2	1200 (900;1600)	63 ± 2*	12 # (3;83)	30 ± 7
K _{IR} 6.2/SUR2B(YS)	1,0 (0,7;1,5)	65 ± 2	--	--	--	--

* derselbe Hemmungsgrad wie bei 1 µM Glibenclamid (A = 100 %) s. Kap. 4.2.2;

in Gegenwart von 3 µM MgATP

5.2.1.1 Einfluß der Patch-Clamp-Konfiguration auf den Grad der Hemmung

(Amplituden)

Die Betrachtung der Amplituden in der *Tabelle 5.1* zeigt, dass unter in der Ganzzellkonfiguration der Sulfonylharnstoff Glibenclamid und der Thiosulfonylharnstoff HMR1883 K_{ATP} -Kanäle vollständig hemmen konnten, während mit dem Cyanoguanidin PNU-96293 keine vollständige Hemmung erreicht werden konnte; hier blieb ein Reststrom von 15 - 30 % auch bei Sättigung mit dem Hemmstoff erhalten. Es ist also festzustellen, dass der Sulfonylharnstoff und der die daraus abgeleitete Thioverbindung in der Ganzzellkonfiguration als Antagonisten mit voller Efficacy wirken, d.h. der mit vier Hemmstoffen besetzte Kanal kann den Offenzustand nicht mehr erreichen. PNU-96293 hingegen ist ein Partialantagonist; bei Sättigung der Bindungsstellen des Kanals mit dem Hemmstoff, hat dieser immer noch eine Offenwahrscheinlichkeit, die mit 15 - 30 % von derjenigen in Abwesenheit des Hemmstoffes deutlich über 0 liegt.

Im isolierten Patch in der Inside-Out-Konfiguration fällt auf, dass nun auch Glibenclamid und HMR1883 nun auch bei Sättigung nur noch als Partialantagonisten wirkten; es blieb jeweils ein Reststrom von 30-45 %. Radioligandbindungsexperimente in unserem Labor haben gezeigt, dass für verschiedene Kanalsubtypen die Anzahl der Glibenclamidbindungsstellen in Membranen aus mit den Kanälen transifizierte HEK-Zellen in der Abwesenheit von MgATP gleich war wie die Anzahl der Öffnerbindungsstellen in Gegenwart von MgATP. (Hambrock et

al., 2002a, Löffler-Walz et al., 2002). Man muß also davon ausgehen, dass trotz vollständiger Besetzung aller SURs mit Glibenclamid der Kanal sich noch mit 30 - 45 %iger der Wahrscheinlichkeit öffnet wie ansonsten bei Abwesenheit der Hemmstoffe. Durch eine weitere Erhöhung der Blocker-Konzentrationen in den hohen μM Bereich hinein (also >1000-fach höher als die therapeutisch genutzten Konzentrationen) läßt sich die restliche Kanalaktivität vollständig auf 0 reduzieren. Diese zweite Hemmstufe wird durch eine Porenblock, d.h. durch Bindung am $K_{\text{IR}}6.2$ bewirkt (Gribble und Ashcroft, 1999). Solche Konzentrationen wurden in dieser Arbeit nicht eingesetzt. Bezüglich PNU-96293 ist anzumerken, dass die Hemmung des $K_{\text{IR}}6.2/\text{SUR2B}$ im Inside-Out-Patch nur etwa 50 % derjenigen des $K_{\text{IR}}6.2/\text{SUR2A}$ beträgt; in der Ganzzellkonfiguration war kein Unterschied aufgetreten (*Tab. 5.1 und 5.2*).

Die nur partielle Hemmung der K_{ATP} -Kanäle im Inside-Out-Patch durch Sulfonylharnstoffe ist von früheren Autoren sowohl mit nativen als auch mit rekombinanten Kanälen unabhängig vom Kanalsubtyp und vom Expressionssystem durchgängig beobachtet worden. Einige Daten sind in *Tab. 5.3* zusammengefasst:

Tab. 5.3 Vergleich der Hemmparameter für SU und Glinide (Literaturdaten)

Stoff	Stoff- gruppe	$K_{\text{IR}}6.2$								
		SUR1			SUR2A			SUR2B		
		IC_{50} [nM]	n_{H}	A [%]	IC_{50} [nM]	n_{H}	A [%]	IC_{50} [nM]	n_{H}	A [%]
¹ Glibenclamid	SU	0,13	1,23	60-80	45	1,35	60-80	42	1,27	60-80
² Glimepirid	SU	3,0	0,64	80	5,4	0,69	77	7,3	0,6	77
¹ Tolbutamid	SU	1600	1,0	57	85000	1,30	60-80	88000	1,29	60-80
⁷ Gliclazid	SU	50	1,0	61	800000	0,9	100	--	--	--
¹ Glipizide	SU	3,8	1,26	60-80	--	--	--	1200	1,32	60-80
³ Repaglinid	Glinid	5,6	0,8	61	2,2	0,8	51	2,0	1,0	54
⁴ Nateglinid	Glinid	75	0,8	63	105000	1,2	100	111000	1,1	100
⁵ Meglitinid	Glinid	300	1,0	80	600	1,2	75	1600	1,26	60-80
⁶ Mtigliinid	Glinid	3800	0,7	45	3200	0,7	56	4600	0,7	56

¹ Dörschner et al., 1999a

² Song und Ashcroft, 2001b

³ Dabrowski et al., 2001

⁴ Chachin et al., 2003

⁵ Reimann et al., 2003

⁶ Reimann et al., 2001b

⁷ Lawrence et al., 2001

Diese Daten an rekombinanten Kanälen zeigen, dass die nur partielle Hemmung sowohl bei Sulfonylharnstoffen als auch bei Gliniden auftritt. Warum diese Hemmstoffe in Inside-Out-

Messungen K_{ATP} -Kanäle bei physiologischen Blocker-Konzentrationen nicht, wie in Ganzzellmessungen, vollständig hemmen konnten, ist noch nicht geklärt. Wahrscheinlich sind verschiedene Faktoren an der Umsetzung der Bindung der Hemmstoffe (die ja vollständig ist) in das Überführen der Kanäle in den Geschlossenenzustand beteiligt wie z. B. das Zytoskelett (Terzic und Kurachi, 1996, Metzger et al., 1997, Furukawa et al., 1996, Yokoshiki et al., 1997, Song und Ashcroft, 2001a), (Phospho-) Lipide (Baukrowitz et al., 1998, Krauter et al., 2001), Phosphorylierungen (Ashcroft, 2000), Second Messenger (Harvey et al., 2000) u.a..

Auch die Nukleotide spielen eine Rolle: MgADP reduziert die Sulfonylharnstoff-Hemmung der Kardiomyocyten ($K_{IR}6.2/SUR2A$) (Miyamura et al., 2000); die Glibenclamid IC_{50} -Werte werden in Gegenwart von MgADP nach rechts verschoben (Weiss und Venkatesh, 1993), wie dies auch in meinen Experimenten gesehen werden konnte (*vgl. Kap. 4.2.3.1*). Auch bei Tolbutamid wird die IC_{50} durch die zusätzliche Gabe von ADP nach rechts verschoben. Der MgADP-Effekt ist jedoch biphasisch (*vgl. Kap. 4.1.3*): Während in Gegenwart von steigenden MgADP-Konzentrationen (0,1 und 0,3 mM) die Tolbutamid- IC_{50} zunächst ansteigt, nimmt die IC_{50} für Tolbutamid in Gegenwart von 1 und 3 mM MgADP wieder ab (Miyamura et al., 2000), vergleichbar der IC_{50} -Verschiebung durch Tobutamid/ATP bei Kardiomyozyten (Miyamura et al., 2000). Vergleicht man andere K_{ATP} -Kanal-Blocker an $K_{IR}6.2/SUR2A$ -Kanälen, die zusammen mit MgADP appliziert worden sind, so zeigt sich auch bei Ihnen eine Schwächung, d.h. Verminderung der Hemmwirkung durch MgADP (im Vergleich zur Blockerapplikation alleine) (z.B. Meglitinid (Reimann et al., 2003, Glimepirid (Lawrence et al., 2002)). Bei Nateglinid gab es im Gegensatz zu den anderen Blockern keine signifikante Hemmung durch MgADP (Chachin et al., 2003).

Im Gegensatz zum hemmenden Effekt von MgADP auf die Inhibition des $K_{IR}6.2/SUR2A$ -Kanals verstärkt beim K_{ATP} -Kanal der β -Zelle ($K_{IR}6.2/SUR1$) MgADP die Sulfonylharnstoffwirkung. Bei der β -Zelle des Pankreas ($K_{IR}6.2/SUR1$) wird durch steigende ADP-Konzentrationen zum einen eine vollständige Hemmung erreicht und zum anderen die IC_{50} (Tolbutamid) zu niedrigeren Werten verschoben (Zünkler et al., 1988b).

Beim Herausreißen eines Inside-Out-Patches aus der Membran wird das Zytoskelett teilweise zerstört. Wie aber vorher gesehen, können Sulfonylharnstoffe K_{ATP} -Kanäle auch in dieser Konfiguration hemmen, obwohl die Blockade der Kanäle nicht mehr vollständig ist. Zerstört man das Zytoskelett im Patch vollständig, so sinkt die ATP-Empfindlichkeit irreversibel (Song und Ashcroft, 2001a). Die Hemmung durch Sulfonylharnstoffe wird auch fast vollständig

reduziert (Brady et al., 1996, Yokoshiki et al., 1997), kann aber durch die Wiederherstellung des Aktinzytoskeletts wiedererlangt werden (Yokoshiki et al., 1997). Somit ist das Zytoskelett wesentlich an der Wirkung der Sulfonylharnstoffe oder Glinide im Inside-Out-Patch beteiligt.

5.2.1.2 Potenz der Hemmung (IC_{50}) rekombinanter K_{ATP} -Kanäle in der Ganzzellkonfiguration

Betrachten wir zunächst die Daten in der Ganzzellkonfiguration. Hier liegen für Glibenclamid die meisten Daten vor. *Tab. 5.1* und *Tab. 5.4* zeigt einmal, dass der vaskuläre Kanal ($K_{IR}6.1/SUR2B$) etwa 3mal empfindlicher auf Glibenclamid reagiert als der nicht-vaskuläre glattmuskuläre Kanal $K_{IR}6.2/SUR2B$, bei der Glibenclamid-Hochaffinitätsmutanten $SUR2B(Y1206S)$ ist der Unterschied ca. 5fach. In Radioligandbindungsstudien hatten wir das Umgekehrte gesehen: Koexpression von $SUR2B(Y1206S)$ mit $K_{IR}6.2$ erhöht die Affinität für Glibenclamid ca. zweimal mehr als Coexpression mit $K_{IR}6.1$ (Hambrock et al., Mol Pharm 2001). Dies zeigt, dass Koexpression mit $K_{IR}6.x$ die pharmakologischen Eigenschaften des SUR in K_{IR} -Subtyp-spezifischer Weise moduliert. Zugleich werden Bindung und Effekt in entgegengesetzter Weise moduliert, was wiederum auf eine komplexe Signaltransduktion im Kanal hinweist. Der zweite Punkt betrifft den Einfluß der Mutation (Y1206S), der eine höhere Affinität für Glibenclamid zur Folge hat und bei der Koexpression von $SUR2B(Y1206S)$ mit $K_{IR}6.1$ und $K_{IR}6.2$ Potenserhöhungen von 16 bzw. 13 zur Folge hat (*Tab 5.1, Tab.5.4*).

Tab. 5.4 Vergleich der IC_{50} -Werte für Glibenclamid für unterschiedliche Kanalmodifikationen

$K_{IR}6.1/SUR2B$	(16)	$K_{IR}6.1/SUR2B(YS)$	WC
(4)	Faktor	(5)	
$K_{IR}6.2/SUR2B$	(13)	$K_{IR}6.2/SUR2B(YS)$	WC
(6)	Faktor	(13)	
$K_{IR}6.2/SUR2B$	(27)	$K_{IR}6.2/SUR2B(YS)$	IO
(1)	Faktor	(1)	
$K_{IR}6.2/SUR2A$	(31)	$K_{IR}6.2/SUR2A(YS)$	IO

In Bindungsexperimenten sind die Affinitätserhöhungen nur etwa halb so groß (Hambrock et al., 2001b, Stephan et al., 2004). Über die Hemmung des $K_{IR}6.2/SUR2A$ -Kanals durch Glibenclamid in der Ganzzellkonfiguration gibt es keine Daten, da die Ströme häufig zu groß waren (vgl. Kap. 4.2.1).

Für den Thiosulfonylharnstoff HMR1883 gibt es nur Daten am $K_{IR}6.1/SUR2B$, den die Substanz mit einer Potenz von $5,3 \mu\text{M}$ hemmt (Tab. 5.1); damit ist es dort ca. 120mal schwächer als Glibenclamid. PNU-96293 hemmt den $K_{IR}6.2/SUR2A$ -Kanal mit 5mal höherer Potenz als den $K_{IR}6.2/SUR2B$ und zeigt damit eine leichte Selektivität für das Herz. Interessanterweise wird diese Substanz durch die Mutation $SUR2B(Y1206S)$ am Kanal mit $K_{IR}6.2$ nur um den Faktor 1,7 potenter (Glibenclamid ca. 13mal), d.h. die Mutation erzielt für PNU-96293 kaum eine Wirkung. Dies beruht vermutlich auf den unterschiedlichen Strukturen der beiden Substanzen. Glibenclamid bindet als langer Sulfonylharnstoff auch an das A-Subkompartiment, wo die Aminosäure Y1206 liegt (vgl. Kap. 1.2.1). Die PNU-96293 Substanz gehört wie vorher besprochen zu den Cyanoguanidinen und bindet vermutlich an die Öffnerbindungsstelle (vgl. Kap. 4.3), die in unmittelbarer Nachbarschaft zur SU-Bindungsstelle liegt (Abb. 5), aber physikalisch von ihr getrennt ist und durch eine negativ allosterische Wechselwirkung an sie gekoppelt ist. Die Mutation Y1206S hat auf die Affinität des Cyanoguanidins P1075 kaum eine Auswirkung (Hambrock et al., 2001b, Russ et al., 2003).

5.2.1.3 Potenz der Hemmung (IC_{50}) rekombinanter K_{ATP} -Kanäle im Inside-Out-Patch

Betrachtet man zunächst die Glibenclamidempfindlichkeit der rekombinanten Kanäle in der Inside-Out-Patch-Konfiguration, so zeigt Tab. 5.2, dass Glibenclamid sowohl beim $K_{IR}6.2/SUR2A$ - und auch $K_{IR}6.2/SUR2B$ -Kanälen identische Hemmkonstanten (26 nM ; 27 nM) besitzt. Gribble et al., 1998a, erhielten für Glibenclamid denselben Wert für $K_{IR}6.2/SUR2A$ -Kanäle ($IC_{50} = 27 \text{ nM}$; $n_H = 1$; *Xenopus* Oozyten). Bezüglich der $K_{IR}6.2/SUR2$ -Kanäle ist keine Subtyp-Selektivität zu erkennen, d.h. die letzten 44 Aminosäuren, die ja den einzigen Unterschied zwischen $SUR2A$ und $SUR2B$ ausmachen (Isomoto et al., 1996) spielen für die Interaktion von Glibenclamid mit dem SUR keine Rolle, jedenfalls nicht im Inside-Out-Patch. Dies wird durch die Ergebnisse anderer Autoren mit anderen Sulfonylharnstoffen bzw. Gliniden bestätigt. Chachin et al., 2003, untersuchten Nateglinid und Dabrowski et al., 2001, Repaglinid als Hemmstoffe der $K_{IR}6.2/SUR2A$ - und $K_{IR}6.2/SUR2B$ -Kanäle in Inside-Out-Experimenten. Sie

erhielten für die einzelnen Substanzen nahezu identische Hemmwerte für $K_{IR}6.2/SUR2A$ - und $K_{IR}6.2/SUR2B$ -Kanäle (*Tab. 5.3*).

Untersucht man die für Glibenclamid empfindlicheren $K_{IR}6.2/SUR2x(Y1206S)$ Mutanten, so ergeben sich Werte von 0,84 nM ($K_{IR}6.2/SUR2A(Y1206S)$) und 1.0 nM ($K_{IR}6.2/SUR2B(Y1206S)$) (*Tab. 4.7, Tab. 5.2*). Damit sind die Mutanten $SUR2A$ - und $SUR2B$ -Kanäle 27 bzw. 31mal empfindlicher als die Wildtypkanäle. Auch bei den Mutanten-Kanälen ist keine Subtyp-Selektivität zu erkennen. Betrachtet man den Effekt der Mutation in den beiden Patch-Clamp-Konfigurationen, so zeigt sich dass die Potenserhöhung im Inside-Out-Patch etwa zweimal stärker ist als in der Ganzzellkonfiguration (Faktor ca. 30 gegenüber ca. 15, *vgl. Tab. 5.4*). Außerdem zeigt der Vergleich der beiden Konfigurationen an den Wildtyp und den Mutanten $K_{IR}6.2/SUR2B$ -Kanälen, dass die Kanäle im Inside-Out-Patch deutlich empfindlicher auf Glibenclamid als in der Ganzzellkonfiguration sind (IC_{50} -Werte (I/O): 27 (WT) bzw. 1 nM (Y1206S); Ganzzell: 167 (WT) bzw. 13 nM (Y1206S)); allerdings war die Hemmung im Inside-Out-Patch nur partiell (*vgl. Kap. 5.6.1*). In der Ganzzellkonfiguration wurde mit MgGDP 1,0 mM/ MgATP 0,3 mM) die Zelle dialysiert. Die Hemmung durch Glibenclamid war vollständig.

Betrachtet man die Potenz der drei unterschiedlichen Blocker in der Inside-Out-Konfiguration, so hemmen Glibenclamid und PNU-96293 die $K_{IR}6.2/SUR2A$ - und $K_{IR}6.2/SUR2B$ -Kanäle mit nahezu derselben Potenz (*vgl. Tab. 5.2*) (Gribble et al., 1998a). Die Wirksamkeit von HMR1883 ist 15mal ($K_{IR}6.2/SUR2A$) und 44mal ($K_{IR}6.2/SUR2B$) schwächer als für Glibenclamid; somit zeigt HMR1883 eine schwache (3-fache) Selektivität für $K_{IR}6.2/SUR2A$ - über $K_{IR}6.2/SUR2B$ -Kanäle.

Tab. 5.3 trägt IC_{50} -Werte aus der Literatur für die gebräuchlichsten Sulfonylharnstoffe und Glinide an drei rekombinanten K_{ATP} -Kanälen zusammen. Alle Werte sind aus Experimenten im Inside-Out-Patch erhoben, daher fehlt der vaskuläre Kanal ($K_{IR}6.1/SUR2B$). Die Daten wurden von verschiedenen Laboren und teilweise auch unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt (unterschiedliches Expressionssystem (Oozyten, COS-Zellen, HEK-Zellen), verschiedene Lösungszusammensetzung, etc.). Setzt man dennoch die Daten als relative Werte in Bezug zueinander, so zeigen sich Glibenclamid, Glimepirid und Repaglinid eine sehr hohe Wirksamkeit an $SUR2$ -Kanälen. Die übrigen Substanzen (Tolbutamid, Gliclazid, Glipizid, Nateglinid und Miglitinid) sind hauptsächlich $SUR1$ selektiv und haben an den $SUR2$ -Kanälen eine Wirkung bei sehr hohen Konzentrationen (*vgl. Tab 5.3*). Dörschner et al., 1999, erhalten zwar im Vergleich zu meinen Messungen für Glibenclamid (*Tab. 5.2*) an den $K_{IR}6.2/SUR2$ -

Kanälen zweifach höhere IC_{50} -Werte, bestätigen aber, dass Glibenclamid diese beiden Kanäle mit der gleichen Potenz hemmt (s.o.).

5.2.2 Glibenclamid und HMR1883 in Gegenwart von MgADP

Während ischämischer oder hypoxischer Bedingungen ändert sich das MgATP/MgADP Verhältnis in der Zelle und aus diesem Grund können sich kardiale K_{ATP} -Kanäle öffnen (vgl. Kap. 1.2.2.2). Es wurde berichtet, dass physiologische MgADP Konzentrationen den hemmenden Effekt an $K_{IR}6.2/SUR2A$ -Kanälen vermindern und an $K_{IR}6.2/SUR1$ -Kanälen verstärken (Züinkler et al., 1988a, Schwanstecher et al., 1992a, Gribble et al., 1997b; Gribble et al., 1997a). In unseren Versuchen wurde der Effekt von MgADP auf die Hemmung der $K_{IR}6.2/SUR2A$ -Kanäle im Inside-Out-Patch untersucht (Kap. 4.1.3).

Unsere Untersuchungen bestätigen, dass MgADP in pathophysiologisch relevanten Konzentrationen (30-300 μM) die Hemmung $K_{IR}6.2/SUR2A$ -Kanäle durch Glibenclamid signifikant schwächt. Dabei übte MgADP keinen Einfluss auf die Amplitude der Hemmung aus, vielmehr wurde durch MgADP (30 μM) der IC_{50} -Wert von 26 nM auf 141 nM um einen Faktor 5,4 nach rechts verschoben (s. Abb. 36). Reimann et al., 2003, berichteten, dass 100 μM MgATP eine Rechtsverschiebung der Hemmkurve von Meglitinid am $K_{IR}6.2/SUR2A$ -Kanal in *Xenopus* Oozyten um eine Faktor ca. 3 (von 0.6 auf 1.7 μM) bewirkte, ohne die Amplitude zu ändern.

Für den kardioselektiven K_{ATP} -Kanalhemmer HMR1883 wurde der Effekt von MgADP ebenfalls untersucht und wiederum eine signifikante Verminderung der Hemmung beobachtet (Tab 4.8, Abb. 35). Hier wurde keine vollständige Konzentration-Hemmungskurve gemessen, aber man kann vermuten, dass wie bei Glibenclamid der IC_{50} -Wert nach rechts zu höheren Konzentrationen verschoben und nicht die Amplitude vermindert, wie dies auch bei Glibenclamid und Meglitinid beobachtet wurde (s.o.).

Vergleicht man andere K_{ATP} -Kanal-Blocker an $K_{IR}6.2/SUR2A$ -Kanälen, die zusammen mit MgADP appliziert worden sind, so zeigt sich auch bei Ihnen eine Schwächung, d.h. Verminderung der Hemmwirkung durch MgADP (im Vergleich zur Blockerapplikation alleine) (z.B. Meglitinid: Reimann et al., 2003, Glimepirid: Lawrence et al., 2002). Bei Nateglinid gab es im Gegensatz zu den anderen Blockern keine signifikante Hemmung durch MgADP (Chachin et al., 2003).

5.3 K_{ATP} -Kanal-Öffner

5.3.1 K_{ATP} -Kanalöffner öffnen $K_{IR}6.2/SUR2B$ -Kanäle auch in Abwesenheit von MgATP

In Radioligandbindungsstudien wurde gezeigt, dass MgATP für eine hochaffine Bindung der Kaliumkanalöffner an den Kanal nötig ist (Schwanstecher et al., 1992b, Quast et al., 1993, Dickinson et al., 1997; Löffler-Walz und Quast, 1998). Weder Mg^{2+} in der Abwesenheit von ATP noch ATP allein ermöglichen die hochaffine Bindung (Schwanstecher et al., 1998, Hambrock et al., 1998). Diese Tatsache wird so verstanden, dass MgATP notwendig ist, um den SUR in eine Hochaffinitätskonformation für die Öffner zu bringen (Schwanstecher et al., 1998). Neuere Untersuchungen aus der Gruppe um Terzic haben gezeigt, dass die (langsame) Hydrolyse von MgATP v.a. an der NBD₂ den Kanal eine Reihe von Offen- und Geschlossenzuständen durchlaufen läßt (Bienengraeber et al., 2000, Zingman et al., 2002a). In einer ersten Veröffentlichung wurde gezeigt, dass Pinacidil und andere Öffner die ATPase Aktivität des SUR2 steigern, wobei die lokale MgADP-Konzentration ansteigt, die der physiologische Öffner für diese Kanäle ist (Bienengraeber et al., 2000). Später konnten Zingman et al., 2001, zeigen, dass Pinacidil den SUR in einer MgADP-bindenden posthydrolytische Konformation stabilisiert. Andererseits konnten wir und andere zeigen, dass in der Abwesenheit von MgATP die meisten Öffner bei hohen Konzentrationen [³H]Glibenclamid vom SUR verdrängen können (SUR1: Schwanstecher et al., 1992b; SUR2B: Russ et al., 2003). Für die Wechselwirkung von Pinacidil, P1075, Rilmakalim, Levromakalim (LCRK) und Aprikalim, mit dem SUR2B sind ca. 200fach höhere Konzentrationen nötig als in der Gegenwart von MgATP; Nicorandil und Minoxidilsulfat können in der Abwesenheit von MgATP [³H]Glibenclamid nicht vom SUR2B verdrängen (Ruß et al., 2002). Die entscheidende Frage war nun, ob diese Öffnerbindung in der Abwesenheit von MgATP eine Öffnung von $K_{IR}6.2/SUR2B$ -Kanälen nach sich ziehen würde.

Um diese Frage zu untersuchen, wurde der Inside-Out-Membranpatch nach dem Herausreißen mit einer ATP-haltigen Mg^{2+} -freien Lösung umspült, um den Kanal zu schließen. Dann wurde, in der Gegenwart von ATP (1 mM) Öffner in das Bad gegeben und die Entwicklung eines Stromes gemessen. Die Experimente wurden am $K_{IR}6.2/SUR2B$ durchgeführt, da der SUR2B unter den SUR Subtypen die höchste Affinität für Kaliumkanalöffner (Ausnahme Diazoxid) besitzt (Schwanstecher et al., 1998, Hambrock et al.,

1999) und nur der Kanal nach Koexpression mit $K_{IR}6.2$ der Untersuchung im Inside-Out-Patch zugänglich ist (vgl. Kap. 4.7).

Die Fähigkeit der Kalium-Kanalöffner, den $K_{IR}6.2/SUR2B$ -Kanal in Abwesenheit von Mg^{2+} zu öffnen, hängt von der verwendeten Substanz ab. P1075 besitzt die höchste öffnende Potenz, die der übrigen Öffner war dagegen geringer. Für Nicorandil konnte keine Interaktion der [3H]Glibenclamid-Bindung aber eine Kanalöffnung registriert werden. Die Wirksamkeit von Nicorandil an $K_{IR}6.2/SUR2B$ -Kanälen ist in der Abwesenheit von Mg^{2+} limitiert, aber erstaunlich deutlich sichtbar. In Gegenwart von MgATP ist dessen öffnender Effekt an $K_{IR}6.2/SUR2B$ -Kanälen größer als an $K_{IR}6.2/SUR2A$ -Kanälen (Shindo et al., 1998, Reimann et al., 2001a). Minoxidilsulfat zeigte ebenfalls keine Wirkung in den Bindungsstudien, bei 300 μM war jedoch ein sehr kleiner öffnender Effekt sichtbar. Interessanterweise konnte Diazoxid $K_{IR}6.2/SUR2B$ -Kanäle in Abwesenheit von Mg^{2+} aktivieren, obwohl seine öffnenden Eigenschaften bei $K_{IR}6.2/SUR2A$ -Kanälen an die Präsenz von MgADP oder MgATP geknüpft ist (D'hahan et al., 1999). Aus diesen Daten liess sich folgenden Reihenfolge der Wirksamkeit ableiten: P1075 > Rilmakalim = Nicorandil > Diazoxid > Minoxidilsulfat (vgl. Kap. 4.5.2).

Der öffnende Effekt von P1075, der in der Abwesenheit von MgATP potentesten und wirksamsten Substanz, wurde genauer untersucht. Konzentrations-Wirkungskurven in Abwesenheit und Anwesenheit von Mg^{2+} gaben EC_{50} -Werte von 2 μM / 67 nM und maximale Effekte (Efficacies) von 32 / 134 % (Russ et al., 2003). Die Wirkung von P1075 unterlag einem Wirkungsverlust bei verlängerter oder wiederholter Anwendung (Rundown) (Ruß et al., 2002). Auffallend war auch die hohe Variabilität des Effektes von Patch zu Patch. Dafür werden zwei Mechanismen verantwortlich gemacht. Zum einen nimmt mit zunehmender Zeit die Kanalaktivität ab, zum anderen hat sich die ATP-Empfindlichkeit von Patch unterschieden (vgl. Tab. 4.13). Dabei war es unerheblich, ob P1075 oder Rilmakalim verwendet wurden (Ruß et al., 2002). Vergleichbare Ergebnisse sind von Gribble et al., 2000, mit Pinacidil in nukleotidfreier aber Mg^{2+} -haltiger Lösung an $K_{IR}6.2/SUR2A$ -Kanäle beobachtet worden. In Abwesenheit von Nukleotiden oder Mg^{2+} ist die Phosphorylierung verhindert. Infolge dessen kann die Abnahme der Kanalempfindlichkeit z. B. die Abnahme wichtiger modulatorischer Membran Phospholipide (PIP_2 oder PIP_3), die Dephosphorylierung einer Kanaluntereinheit oder die Freisetzung eines ATP-Hydrolyseprodukts wie MgADP vom SUR widerspiegeln. Membranphospholipide wie PIP_2 sind die grundlegende Bestimmungsgröße der Empfindlichkeit der K_{ATP} -Kanäle für die Hemmung durch ATP (Hilgemann und Ball, 1996, Baukrowitz et al., 1998, Shyng und Nichols,

1998) und für die Kaliumkanalöffner (Krauter et al., 2001). So scheint die große Variabilität der ATP-Empfindlichkeit der K_{ATP} -Kanäle in Inside-Out-Patches auf Unterschiede in der PIP_2 -Konzentration im Patch zu beruhen (Baukrowitz et al., 1998, Krauter et al., 2001, Shyng und Nichols, 1998).

Das wichtigste Ergebnis dieser Untersuchungen ist, dass P1075 und andere K_{ATP} -Kanalöffner auch in Abwesenheit von Mg^{2+} , d.h. auf einem Weg der unabhängig von der Hydrolyse von MgATP ist, $K_{IR}6.2/SUR2B$ -Kanäle öffnen können, auch wenn die benötigten Konzentrationen etwa 300-fach höher sind und die Efficacy nur 25 % beträgt im Vergleich zu den entsprechenden Parametern in der Gegenwart von MgATP.

5.3.2 A312110: ein Dihydropyridin als K_{ATP} -Kanalöffner

Dihydropyridine sind als Hemmstoffe des L-Typ Ca^{2+} -Kanals bekannt. Es ist den Medizinalchemikern aber gelungen, durch geeignete Modifikationen diese Eigenschaft sehr stark abzuschwächen und zugleich eine K_{ATP} -Kanal öffnende Eigenschaft hineinzubringen (Coghlan et al., 2001). Ein besonders potenter Kaliumkanalöffner aus dieser Strukturklasse ist das neue Dihydropyridin A312100, das mit einem Iod am Ringsystem substituiert ist (Davis-Taber et al., 2003) (Strukturformel s. Abb. 8). Gopalakrishnan et al., 2003b, stellten durch Austausch mit [^{125}I] einen iodierten Radioliganden her und konnten zeigen, dass er in nativen Membranen aus Meerschweinchenherz und -Blase mit einer Affinität von ca. 5 nM an die in diesen Geweben vorhandenen K_{ATP} -Kanäle ($K_{IR}6.2/SUR2A$ und $K_{IR}6.2/SUR2B$) bindet (Werte bei 37 °C). Es gab bis jetzt aber noch Untersuchungen mit dieser Substanz am rekombinanten System. In [3H]P1075 Verdrängungsmessungen erwies sich A312110 an SUR2A und SUR2B in Membranen mit K_i -Werten von 10-20 nM als ungefähr äquipotent mit dem Standardöffner P1075 (Felsch et al., 2004). Ziel meiner Experimente war, die Wirksamkeit (= Efficacy) und Wirkstärke (= Potency) von A312110 im Vergleich zu P1075 an an $K_{IR}6.2/SUR2A$ und $K_{IR}6.2/SUR2B$ -Kanälen zu bestimmen (Felsch et al., 2004).

Untersuchungen an Inside-Out-Patches ergeben für die beiden Öffner identische EC_{50} Werte von ca. 50 nM für die Öffnung der $K_{IR}6.2/SUR2A$ - und $K_{IR}6.2/SUR2B$ -Kanälen (Werte bei 22°C). Vergleicht man diese Werte mit den EC_{50} -Werte für Pinacidil (680 nM), Levromacalim (3100 nM) und Diazoxid (5800 nM) an $K_{IR}6.2/SUR2B$ -Kanälen (Schwanstecher

et al., 1998), so zeigt sich, dass P1075 und auch A312110 die kardiovaskulären K_{ATP} -Kanäle mit einer deutlich höheren Potenz öffnet.

Diese EC_{50} -Werte für A312110 und P1075 an den $K_{IR}6.2/SUR2$ -Kanälen sind deutlich höher als die K_D/K_I -Werte der Bindung, die in Membranen ohne Koexpression mit $K_{IR}6.2$ ermittelt wurden (10 bis 20 nM, Felsch et al., 2004). In nativen Membranen aus der glatten Muskulatur bzw. vom Herzen liegen die K_D Werte der Bindung bei 5 bis 6 nM (Bray und Quast, 1992; Löffler-Walz und Quast, 1998, Davis-Taber et al., 2003; alle Werte wurden bei 37°C ermittelt). Dieser Unterschied zwischen Bindung und Effekt konnte generell bei allen K_{ATP} -Kanalöffnern gesehen werden (Schwanstecher et al., 1998) und trat bei gleicher Temperatur (37°C) noch deutlicher hervor (Quast et al., 1993). Dies deutet wiederum, wie auch bei der Hemmung mit Glibenclamid, auf eine komplizierte Signaltransduktion im Kanal hin.

Bezüglich der Effektivität der beiden Öffner ist A312110 dem P1075 an beiden $K_{IR}6.2/SUR2$ -Kanälen leicht aber signifikant unterlegen (*Tab. 4.13*). Interessanterweise weisen beide K_{ATP} -Kanalöffner an $K_{IR}6.2/SUR2B$ -Kanälen eine zweimal höhere Effektivität der Kanalaktivierung als $K_{IR}6.2/SUR2A$ -Kanäle auf, was an einer stärkeren Hemmung durch MgATP an $K_{IR}6.2/SUR2A$ -Kanälen liegen kann (Felsch et al., 2004).

5.3.3 Die Enantiomere PNU-96179 und PNU-96293 des Racemats

PNU-94750 öffnen oder schließen $K_{IR}6.2/SUR2$ K_{ATP} -Kanäle.

Die von Khan et al., 1997, untersuchten PNU-Enantiomere (PNU-96179 und PNU-96293) wurden als K_{ATP} -Kanalöffner behandelt. Aus den Daten konnte aber abgeleitet werden, dass die PNU-94750 Substanzen trotz der Cyanoguanidinstruktur keine K_{ATP} -Kanalöffnereigenschaften mehr besaßen sondern statt dessen die Pinacidil-induzierte Relaxation der Mesenterialarterie des Kaninchens hemmten (Khan et al., 1997). Das Racemat PNU-94750 konnte bei einer Konzentration von 5 μ M die Relaxation zu 80 % blockieren, während das (*R*)-Enantiomer schon bei 0,5 μ M den Kanal fast vollständig schloss. PNU-96179, das (*S*)-Enantiomer hatte kaum eine Wirkung auf die Relaxation. Aus den Experimenten kann man nicht schließen, dass die PNU-Substanzen K_{ATP} -Kanal Blocker sind. Eine mögliche Interpretation dieser Experimente ist die, dass die PNU-Substanzen als neutraler Agonist Pinacidil verdrängt. Dies hat uns veranlasst diese Substanzen genauer zu untersuchen.

Die Hemmung der K_{ATP} -Kanäle durch das (*R*)-Enantiomer (PNU-96293) wurde in *Kapitel 4.3* untersucht und in *Kapitel 5.6* zusammen mit den anderen Hemmstoffen diskutiert. Die Öffnereigenschaften des (*S*)-Enantiomers (PNU-96179) sind schwach und wurden nur am $K_{IR}6.2/SUR2B$ Kanal im Inside-Out- und Cell-Attached-Patch untersucht (*Kap. 4.3.2*). Bei 100 μM der Substanz zeigte sich eine schwache Kanalöffnung; damit ist die Substanz ca.1500mal schwächer als P1075 oder A312110 (*vgl. Kap. 4.3.2 und Kap. 4.4.1*). In den Bindungsmessungen zeigt sich am $K_{IR}6.2/SUR2B$ ein K_i -Wert von 3,6 μM (intakte Zellen) (Lange et al., 2002b) und damit ist dieses Enantiomer auch in der Bindung ca. 500fach schwächer als P1075 oder A312110 (Pentz et al., 2004).

Es konnte gezeigt werden, dass die SUR Untereinheiten verschiedene Sensitivität auf die Kaliumkanalöffner haben. So werden z.B. $K_{IR}6.2/SUR1$ -Kanäle mit Diazoxid aber nicht mit Pinacidil aktiviert (Review Miller et al., 1999). $K_{IR}6.2/SUR2A$ -Kanäle werden mit Pinacidil und Cromakalim aktiviert, während dies mit Diazoxid nur schwach und in der Gegenwart von MgADP möglich ist (D'hahan et al., 1999). $K_{IR}6.2/SUR2B$ werden sowohl durch Diazoxid als auch durch Pinacidil oder Cromakalim aktiviert (Inagaki et al., 1995a, Isomoto et al., 1996, Gribble et al., 1998a). Allgemein kann man feststellen, dass die Wirksamkeit von Kaliumkanalöffnern an $K_{IR}6.2/SUR2B$ -Kanälen viel besser ist als an K_{ATP} -Kanälen, die mit SUR1 assoziiert sind. Die Kaliumkanalöffner fördern die ATP Hydrolyse an NBD_2 und die Kanalöffnung durch Kanalstabilisierung in dem Magnesium gebundenen Nukleotidstatus (Bienengraeber et al., 2000).

5.4 DIDS

Das Stilben DIDS beeinflusst eine Vielzahl von zellulären Faktoren. Es hemmt Chlorid-Kanäle, beeinflusst den HCO_3^-/Cl Transporter und den Natrium Protonen Austauscher und aktiviert den KvLQT1 ($\text{K}_{\text{v}7.1/\text{Isk}}$) (vgl. Kap. 1.2.4.4). DIDS wurde das erste Mal von Furukawa et al., 1993, in Verbindung mit K_{ATP} -Kanälen erwähnt. Er untersuchte verschiedene Stilbene und ihre Wirkung auf den K_{ATP} -Kanal im Kardiomyocyten. Er fand heraus, dass DIDS in hohen Konzentrationen (0,1 μM bis 10 mM) den K^+ -Strom durch den Kanal irreversibel hemmen kann, wobei die IC_{50} bei 71 μM liegt. Ausgehend von diesen Untersuchungen wurde die Hemmung des Kanals durch DIDS weiter von Gojkovic-Bukarica et al., 2002a, und Proks et al., 2001, in HEK293 Zellen, die heterolog expremiert waren, charakterisiert. Dabei konnte sowohl für $\text{K}_{\text{IR}6.2/\text{SUR}1}$ - als auch für die $\text{K}_{\text{IR}6.2/\text{SUR}2(\text{A und B})}$ -Kanäle eine konzentrationsabhängige Hemmung gesehen werden, wobei die Affinität mit der DIDS bindet und wirkt, unterschiedlich ist (Gojkovic-Bukarica et al., 2002b). Es konnte von Proks et al., 2001, gezeigt werden, dass ATP, in Gegenwart von DIDS appliziert, auf den K_{ATP} -Kanal eine protektive Wirkung besitzt. Dadurch können die Kanäle nach dem Auswaschen von DIDS wieder aktiviert werden. In einer Arbeit von Gojkovic-Bukarica et al., 2002b, wurde der Einfluss von Mg^{2+} auf die DIDS Wirkung untersucht. In Gegenwart von Mg^{2+} war die DIDS-Wirkung (untersucht an $\text{K}_{\text{IR}6.2/\text{SUR}1}$ und $\text{K}_{\text{IR}6.2/\text{SUR}2}$ -Kanälen) besser als in dessen Abwesenheit; die IC_{50} -Werte schwanken von ca. 3 μM bis 25 μM und liegen im Mittel bei ca. 10 μM (Gojkovic-Bukarica et al., 2002b). An welcher Stelle des K_{ATP} -Kanals (K_{IR} oder SUR) DIDS eine Interaktion mit dem Kanal eingeht, wurde an dem verkürzten $\text{K}_{\text{IR}6.2}$ -Kanälen (C26 oder C36) sowie in Koexpression mit dem SUR untersucht. Die hemmenden Effekte durch DIDS beim verkürzten K_{ATP} -Kanal ($\text{K}_{\text{IR}6.2}$ C26 oder $\text{K}_{\text{IR}6.2}$ C36) sind sichtbar, unabhängig, ob Mg^{2+} vorhanden war oder nicht (Proks et al., 2001, Gojkovic-Bukarica et al., 2002b). Auch bei Koexpression von $\text{K}_{\text{IR}6.2}$ C26 mit SUR2B waren die Effekte sowohl in Gegenwart wie auch in Abwesenheit von Mg^{2+} deutlich sichtbar (Gojkovic-Bukarica et al., 2002b). Ausgehend von diesen Ergebnissen kann man annehmen, dass die Hemmung durch DIDS am $\text{K}_{\text{IR}6.2}$ zu finden ist.

DIDS wurde auch in Radioligandbindungsstudien an Membranen untersucht, die das SUR2B Protein enthielten. Die K_i -Werte der Verdrängung des Radioliganden [^3H]Glibenclamid mit DIDS betragen in Abwesenheit von MgATP 17 μM und in Anwesenheit von MgATP 3 μM . (Lange et al., 2003). Diese Beobachtung zeigt, dass DIDS positiv allosterisch mit der

MgATP-Bindung verknüpft ist, was typisch für K_{ATP} -Kanal-Öffner wie z.B. P1075 ist. Auch in elektrophysiologischen Untersuchungen hatte sich gezeigt, dass DIDS die durch ATP geschlossenen Kanäle öffnen kann, wobei der Konzentrationsbereich zwischen 10 und 300 nM liegt (Dunne et al., 2004). Vergleicht man den Effekt mit der Verdrängung von [3 H]Glibenclamid durch DIDS, so liegt die K_D ca. 170 bzw. 30mal höher als der öffnende DIDS-Effekt. Die Bindung am Rezeptor ist aber wesentlich empfindlicher (720 nM (-MgATP); 1,7 nM (+MgATP)) als der Effekt am Kanal (49 nM) (vgl. Kap. 4.4.1, Felsch et al., 2004). Die im Vergleich zum Effekt relativ niedrige Bindungsaffinität und der Vergleich mit anderen K_{ATP} -Kanalöffnern deutet daraufhin, dass DIDS nicht an die typische Bindungsstelle der K_{ATP} -Kanalöffner geht bzw. die K_{ATP} -kanalaktivierende DIDS-Bindung nicht mit der [3 H]Glibenclamid Bindung interferiert. Wo DIDS diese Öffnung bewirkt, konnte bisher nicht geklärt werden.

Zur weiteren Charakterisierung wurde DIDS von mir in Inside-Out Patches in der Konzentrationen von 0,1 μ M in Mg^{2+} -haltiger Lösung in Gegenwart von 1 mM MgATP untersucht. Es wurde nur diese eine DIDS Konzentration verwendet, weil die Öffnung bei dieser Konzentration am häufigsten auftrat. Die Öffnung liegt damit im Konzentrationsbereich 100mal (in Gegenwart von Mg^{2+}) bzw. 1000mal (in Abwesenheit von Mg^{2+}) niedriger als die Hemmung (*s.o.*). DIDS ist (bei K_{ATP} -Kanälen) bisher das einzig bekannte Stilben mit diesen öffnenden und hemmenden Eigenschaften.

Außer in der Responderrate war auch die Antwortgröße extrem variabel. Um den Wirkort von DIDS herauszufinden, wurde der DIDS Effekt an den verkürzten $K_{IR}6.2$ C26-Kanälen sowie der Koexpression mit SUR2B untersucht, um zu sehen, ob die Aktivierung am SUR oder K_{IR} liegt. Es wurde bei Zellen, die mit $K_{IR}6.2$ C26/SUR2B-Kanälen transfiziert waren (Abb. 53), eine Stromentwicklung durch DIDS, wie sie bei den Wildtyp-Zellen $K_{IR}6.2$ /SUR2B beobachtet wurde, gesehen, die bei der alleinigen Expression von $K_{IR}6.2$ C26 nicht mehr vorhanden war (Dunne et al., 2004). Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass die Aktivierung über der SUR vermittelt wird. Da die aktivierende Eigenschaft von DIDS nur in Gegenwart von MgATP beobachtet wurde, habe ich bei der Untersuchung des Mechanismus einen besonderen Schwerpunkt auf ATP-abhängige Phosphorylierungsvorgänge gelegt.

Zum einen wurde die Länge des ATP-Vorlaufs variiert. Die ATP Applikationsdauer wurde in den von mir durchgeführten Experimenten von 0,5 bis 5 Minuten ATP-Vorlauf (in Abwesenheit von DIDS) verändert. Dabei konnte bei 1, 2 und 3 Minuten ATP-Vorlauf die

gleiche Aktivierung gesehen werden. Bei 0,5 Minuten ATP-Vorlauf war die Aktivierung durch DIDS kleiner und bei 5 Minuten ATP-Vorlauf war die Aktivierung von DIDS auch wieder reduziert (vgl. Kap. 4.6). Eine möglich Erklärung dafür ist, dass bei $K_{IR}6.2/SUR2B$ -Kanälen MgATP eine Mindesteinwirkzeit benötigt und nach mehr als drei Minuten der (irreversible) Rundown auch in Gegenwart von ATP einsetzt und somit die maximale Anzahl der aktivierbaren Kanäle abnimmt.

In Gegenwart von 10 mM MgATP war die DIDS Wirkung niedriger als in Gegenwart von 1 mM MgATP (vgl. Abb. 55). Wurde nur eine ATP-Konzentration verwendet (1 mM MgATP), konnte beobachtet werden, dass bei relativ schlechtem ATP-Block eine verbesserte Wirkung von DIDS vorhanden war. Diese Abhängigkeit der Wirkung von der Stärke des ATP-Blocks bzw. verschiedenen ATP-Konzentrationen wurde auch bei typischen Öffnern beobachtet. Dabei zeigten die Öffner Levromakalim (200 μ M; bei < 5 mM ATP) und KR-30450 (10 μ M; bei < 1 mM ATP) eine Aktivierung, die bei höheren ATP-Konzentrationen abnahm (Wymann et al., 2003, Forestier et al., 1996). Ähnliches konnte auch bei Pinacidil und Nicorandil gesehen werden (Krämer et al., 2004, Dobrowolski und Sadowski, 2004). Auch bei P1075 ist eine reduzierte Wirksamkeit in Gegenwart von 10 mM MgATP im Vergleich zu 1 mM MgATP zu beobachten (vgl. Kap. 4.2.2). Somit verhalten sich 100 nM DIDS in Gegenwart von MgATP wie ein typischer K_{ATP} -Kanalöffner.

Da DIDS lichtempfindlich ist, wurden die Beleuchtungsverhältnisse betrachtet. Zum einen wurde DIDS unter Lichtausschluss appliziert. Bei diesen Experimenten ergab sich keine signifikante Aktivitätserhöhung durch DIDS. Bei der Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 254 nM und 360 nM konnte auch keine verbesserte Wirkung registriert werden. Eine Variation der Temperatur von 22°C auf 27°C zeigte auch keine Erhöhung der Responderrate. Es wurde allerdings auch niemals eine Aktivitätsreduktion beobachtet.

Durch die Variation des pH-Wertes wurden zwei Absichten verfolgt. Zum einen sollte die pH-abhängige Aktivierung untersucht werden, zum anderen sollte durch die Erniedrigung des pH-Werts die Reaktionsfreudigkeit der Isothiocyanatgruppe mit primären Aminen vermindert oder gesteigert werden. Bei einer moderaten Anhebung oder Absenkung des pH-Werts (pH = 7,0 bzw pH = 7,4) (Lösungen vgl. Kap. 2.7) kann auch keine vermehrte DIDS Antwort gesehen werden. (Bei einer Erniedrigung des pH-Werts auf 6,0 ist keine Kanalaktivität mehr vorhanden (Gojkovic-Bukarica et al., 2002b)). Die Isothiocyanatgruppe des DIDS kann mit primären Aminen (bei pH 9,0 bis 10,0) reagieren. Wenn DIDS mit primären Aminen des

Proteins reagiert, so sollte der Effekt der Aktivierung bei niedrigeren pH-Werten gesteigert sein, denn es ist davon auszugehen, dass DIDS durch die Bindung an primäre Amine nicht mehr für den Mechanismus der Öffnung der Kanäle zur Verfügung steht. Andererseits könnte gerade durch die Bindung an ein Substrat, das primäre Amine enthält und die Öffnung vermittelt (indirekte Wirkung), die Aktivierung gesteigert sein. Die Variation des pH-Wertes nach oben oder unten zeigte keine signifikante Steigerung oder Erniedrigung der Aktivierungsfrequenz.

Ob membrangebundene oder lösliche Lipide wie Phospholipide oder LC-AcylCoAs an der Regulation der Aktivierung des K_{ATP} -Kanals durch DIDS beteiligt sind, wurde ebenfalls untersucht.

Phospholipide wie PIP, PIP₂ oder PIP₃ entstehen durch partielle Phosphorylierung von Phosphoinositol und werden in der Membran eingelagert (Cantley, 2002). Die ATP vermittelte Phosphorylierung wird durch die PI-3-Kinase, PI-4-Kinase und PI-5-Kinase vermittelt. Aus PIP₂ wird durch die PKC IP₃ und DAG gebildet. PIP₂ bewirkt eine Entkopplung von SUR und K_{IR} (Cantley, 2002), wodurch die Wirkung der am SUR bindenden Öffner und Blocker stark reduziert wird. Phospholipide wie z.B. PIP₂ oder auch OleylCoA reduzieren weiterhin die ATP-Empfindlichkeit an K_{ATP} -Kanälen (Baukrowitz et al., 1998, Krauter et al., 2001, Shyng und Nichols, 1998).

Aus diesen Beobachtungen können verschiedene Hypothesen für eine Beeinflussung der Kanalaktivierung durch DIDS aufgestellt werden: 1. PIP₂ führt zu einer Entkopplung von SUR und K_{IR} . Werden die Phosphokinasen gehemmt, so dass weniger PIP₂ gebildet wird, sollte, falls DIDS am SUR bindet und wie ein typische Öffner wirkt, die DIDS-Wirkung verbessert werden. 2. Andererseits könnte DIDS eine Aktivierung der Phosphokinasen und damit der K_{ATP} -Kanäle (über eine erhöhte PIP₂-Konzentration und damit eine Abschwächung des ATP-Blocks) bewirken. Somit sollte eine Blockade der Phosphokinasen auch eine DIDS-Wirkung verhindern. Generell muss auch noch berücksichtigt werden, dass Manipulationen der PIP₂-Konzentrationen auch den ATP-Block beeinflussen kann, was wiederum einem Einfluss auf die Aktivierung durch DIDS hat.

In Gegenwart von LY-294002 oder Wortmannin werden die PI-3- und PI-4-Kinase gehemmt, wodurch sich die PIP-, PIP₂- und PIP₃-Konzentration erniedrigt. Ein Einfluss dieser Manipulation auf K_{ATP} -Kanäle konnte auch schon gezeigt werden (Song und Ashcroft, 2001a). In meinen Experimenten konnte keine eindeutige Steigerung der Aktivierung durch DIDS bei der Phosphoinositolkinase-Hemmung gesehen werden. Einzig bei der Betrachtung der

Experimente, die auf DIDS/LY bzw. DIDS alleine eine Antwort gezeigt hatten, war eine signifikante Steigerung der Kanalaktivität bei DIDS/LY zu beobachten. Diesem Einzelergebnis sollte aber keine zu große Bedeutung beigemessen werden, da zum einen alle anderen Versuchsreihen keine Wirkung der PI-3-Kinasehemmung ergaben und zum anderen ein falsch signifikantes Ergebnis auf Grund der starken Streuung der Messserien relativ wahrscheinlich ist. Diese Experimente geben also keine klaren Hinweise auf verbesserte DIDS-Wirkung durch eine Steigerung der Kopplung von SUR und K_{IR} .

Da aber auch bei Phosphoinositolkinase-Hemmung eine Wirkung von DIDS beobachtet wurde, ergeben diese Experimente auch keine Hinweise auf Hypothese 2.

LC-AcylCoAs ähneln in ihrer Wirkung PIP_2 , es gibt aber auch deutliche Unterschiede (Liu et al., 2001, Schulze et al., 2003; Baukowitz persönliche Mitteilung).

Durch den Einsatz von LY-294002 und Wortmannin oder OleylCoA in Kombination mit DIDS konnte keine klare Steigerung im Vergleich zur alleinigen Gabe von DIDS beobachtet werden. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Senkung der Phospholipide (PIP , PIP_2 oder PIP_3) nicht an der Aktivierung durch DIDS beteiligt ist. Abschließend ist zu sagen, dass der aktivierende Mechanismus von DIDS unklar bleibt. Welcher intrazellulärer(n) oder membranäre(n) Faktor(en) für die Aktivierung des K_{ATP} -Kanals durch DIDS verantwortlich ist (sind), konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden. Weder die Variation der physikalisch veränderbaren Bedingungen (Temperatur, pH-Wert, h^*), noch die Applikation physiologisch beeinflussender Faktoren (Zugabe von PI-3-Kinaseinhibitoren oder Phospholipide) konnten weder die Aktivierung des K_{ATP} -Kanals ($K_{IR}6.2/SUR2B$) steigern noch die Responderrate erhöhen. Da DIDS auch noch eine Vielzahl von anderen zellulären Faktoren beeinflusst, kann der für die Aktivierung von DIDS zuständige Faktor noch unbekannt sein. Diskutiert werden kann ein Membranbestandteil, das durch das Herausreißen der Membran aus der Zelle manchmal verloren gehen konnte. Auf der anderen Seite können es aber auch intrazelluläre Faktoren sein, die je nach Patch-Größe oder -Form mehr oder weniger an der Membran gebunden bleiben und dadurch je nach Vorhandensein die K_{ATP} -Kanäle durch DIDS öffnen können oder keinen Effekt haben.

5.5 $K_{IR}6.1/SUR2A$ -Kanäle

Kono et al., 2000, konnten zeigen, dass bei der Verwendung der Inside-Out-Konfiguration der $K_{IR}6.1$ zusammen mit dem SUR2A funktionelle Kanäle bildet, die im symmetrischen Kalium (150 mM) eine Leitfähigkeit von $33,6 \pm 4,2$ pS haben. Um eine Kanalaktivität zu sehen, setzte Kono et al., 2000, UDP in millimolaren Konzentrationen (10 mM UDP) ein. Somit war es nicht weiter verwunderlich, dass für den für Glibenclamid empfindlicheren Kanal $K_{IR}6.1/SUR2A(Y1206S)$ im symmetrischen Kalium (140 mM) eine Leitfähigkeit von 43 ± 4 pS ermittelt werden konnte. Die Leitfähigkeit von $K_{IR}6.2/SUR2A$ -Kanälen beträgt 79,5 pS (im symmetrischen Kalium) (Kondo et al., 1998). Diese Leitfähigkeiten sind mit denen in nativen Geweben vergleichbar; 30 pS Koronararterie vom Schwein (Mioshi), 40 pS Trachea von der Katze (Teramoto und Brading, 1996), 27 pS im Kolon von der Maus (Mannhold, 2004). Kono et al., 2000, verwendete ausschließlich 10 mM UDP, um die Kanäle zu aktivieren. In meinen Experimenten wurde MgADP/MgATP oder MgUDP/MgUTP jeweils in einer Konzentration von 1 mM verwendet. Werden die Leitfähigkeiten für die beiden Nukleotide getrennt ermittelt, zeigt sich ein signifikanter Unterschied (MgUDP = $40,4 \pm 2,8$ (n = 10); MgADP = $44,0 \pm 3,9$ (n = 25)). Die unterschiedliche K^+ -Konzentrationen (150 mM zu 140 mM) in den Lösungen sollten keinen gravierenden Einfluss auf die Leitfähigkeit der Kanäle besitzen. Außerdem wurde bei vergleichbaren Temperaturen gemessen (22-25°C zu 26-28°C).

In der Ganzzellkonfiguration wurde der $K_{IR}6.1/SUR2A$ sowie die Hochaffinitätsmutante für Glibenclamid Y1206S untersucht. In beiden Untersuchungen entwickelte sich ein Strom, der durch 1 μ M Glibenclamid gehemmt werden konnte. Bei diesen Messungen verhielten sich die Kanäle wie die $K_{IR}6.1/SUR2B$ - oder $K_{IR}6.1/SUR2B(Y1206S)$ -Kanäle (Hambrock et al., 2001b).

6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden die Effekte von Nukleotiden, K_{ATP} -Kanalblockern und -Öffnern auf die Aktivität v. a. der rekombinanten kardiovaskulären K_{ATP} -Kanäle mit der patch-clamp-Technik untersucht.

Die Aktivität der K_{ATP} -Kanäle wird durch Nukleosid-di- und -triphosphate reguliert. Dies wurde in dieser Arbeit primär an $K_{IR}6.2/SUR2A$ -Kanälen, der rekombinanten Form der Kanäle in Herz- und Skelettmuskelzellen untersucht. In Abwesenheit von Mg^{2+} beobachtet man eine Hemmwirkung (ATP: $IC_{50}=12 \mu M$; ADP: $IC_{50} \sim 800 \mu M$). In Gegenwart von Mg^{2+} ergibt sich für ATP eine leichte Rechtsverschiebung der Hemmkurve ($IC_{50}=30 \mu M$). Bei MgADP hingegen wird ein biphasischer Effekt beobachtet: bei niedrigen Konzentrationen ergibt sich eine Aktivierung um ca. 100 % (mit $EC_{50}=3 \mu M$); bei hohen Konzentrationen eine Hemmung ($IC_{50}=600 \mu M$). Es ist wahrscheinlich, dass der Hemmung immer der gleiche, Mg^{2+} unabhängige Prozess, zugrunde liegt. Die Aktivierung durch Nukleosidphosphate benötigt dagegen Mg^{2+} . Bei MgADP kann man die beiden Komponenten getrennt analysieren; bei MgATP liegen sie jedoch so dicht beieinander, dass die Überlagerung der beiden Effekte zu einer leichten Rechtsverschiebung der beobachteten Hemmkurve führt. Es gibt einen eindeutigen Zusammenhang zwischen der aktivierenden Wirksamkeit von MgADP und der Größe des beobachteten Rundown in den einzelnen Patches. Der molekulare Mechanismus für diese Beobachtung ist unklar. Die Hemmwirkung der Nukleosidphosphate ist vom Rundown unabhängig.

Von den Blockern des K_{ATP} -Kanals wurde je ein Beispiel aus drei verschiedenen Substanzklassen untersucht, der Standard-Sulfonylharnstoff Glibenclamid, der kardioselektive Sulfonylthioharnstoff HMR1883 sowie der aus der Öffnerstruktur der Cyanoguanidine (Pinacidil) abgeleitete Blocker PNU-96293. Alle drei Blocker schließen den Kanal durch Bindung am SUR. Untersuchungspunkte waren die Effizienz der Blocker in Abhängigkeit von der patch-clamp Konfiguration (Ganzzelle- vs I/O-Patch), der Effekt von Nukleotiden auf den Block, eine eventuelle Selektivität für einer der Kanal-Subtypen sowie der Effekt der Mutation SUR2A(Y1206S).

In der Ganzzellkonfiguration zeigen die K_{ATP} -Kanalblocker Glibenclamid und HMR1883 als Antagonisten einen vollständigen Block der $K_{IR}6.2/SUR2x$ -Kanäle; die Hemmung durch PNU-96293 hingegen ist nicht vollständig. PNU-96293 ist daher ein Partialantagonist. Im

Inside-Out-Patch erreichen alle drei Substanzen nur eine partiellen Block (50-70 %). Dies zeigt dass je nach den Umständen vollständig mit Blockern besetzte Kanalspezies noch eine Offenwahrscheinlichkeit >0 haben.

Die MgADP-Empfindlichkeit des Blockes wurde für Glibenclamid und HMR1883 im I/O patch untersucht. Unter MgADP zeigen beide Substanzen eine signifikante Abnahme der Potenz des Blockes aber nicht der maximalen Hemmung. Bei der Erhebung des Selektivitätsprofils der Blocker zeigen sich leichte Differenzen zwischen den Substanzen; quantitativ hängen die Unterschiede auch von der patch-clamp Konfiguration ab. Die Mutation Y1206S in den SUR2-Subtypen erhöht die Potenz der inhibitorischen Wirkung von Glibenclamid an den $K_{IR}6.2/SUR2(YS)$ -Kanälen $\sim 30x$ (I/O-Patch, keine Nukleotide); in der Ganzzellkonfiguration ist der Unterschied kleiner. Bei PNU-96293 beträgt der Effekt der Mutation nur $1,7x$, was auf eine andere Bindungsstelle dieser Substanz am SUR hinweist.

Bezüglich der K_{ATP} -Kanalöffner wurden drei Aspekte untersucht:(1) die Öffnung des $K_{IR}6.2/SUR2B$ Kanals in der Abwesenheit von MgATP durch Öffner verschiedener Strukturklassen; (2) die Wirkung von A312110, einem neuartigen Öffner aus der Klasse der Dihydropyridine; (3) die kanalöffnende Wirkung des Stilbens DIDS.

Die Öffnung von K_{ATP} -Kanälen durch K_{ATP} -Kanal-Öffner wird durch MgATP sehr stark gefördert. Der MgATP-abhängige Signalweg beruht auf einer Öffner-induzierten Steigerung der ATPase-Aktivität des SUR und der Stabilisierung des Proteins in einer posthydrolytischen Konformation. Andererseits können hohe Konzentrationen von Öffnern den $K_{IR}6.x/SUR2$ -Kanäle in Abwesenheit von MgATP öffnen. Ziel meiner Untersuchungen war es, die Öffnung von $K_{IR}6.2/SUR2B$ -Kanälen durch P1075, Minoxidilsulfat, Diazoxid und Nicorandil in Abwesenheit von Mg^{2+} zu erfassen. Die Messungen zeigen, dass die Öffner bezüglich dieses Effektes in verschiedene Klassen eingeteilt werden können, und dass bei P1075 der MgATP-unabhängige Weg ab 10-fach höheren Konzentrationen bis zu 20 % zur Kanalöffnung in Anwesenheit von MgATP beitragen kann.

Das neue Dihydropyridin A312110 erwies sich an $K_{IR}6.2/SUR2A$ - und $/SUR2B$ -Kanälen als ebenso potenter Öffner wie der Standardöffner P1075; allerdings ist die Effektivität der Öffnung bei A312110 etwas geringer.

Das Stilben DIDS blockt mit mikromolarer Potenz K_{ATP} -Kanäle (SUR1, SUR2A, SUR2B koexprimiert mit $K_{IR}6.2$). Hier wird zum ersten Mal gezeigt, dass DIDS in nM Konzentrationen den $K_{IR}6.2/SUR2B$ -Kanal öffnen kann; die Öffnung tritt jedoch nur in ca. 65 % der Experimente

auf. Die aktivierende Wirkung setzt am SUR an, da $K_{IR}6.2$ C26-Kanäle nicht aktiviert werden, und benötigt MgATP. Die PI-3-Kinaseinhibitoren LY-294002 und Wortmannin sowie OleylCoA haben keinen Einfluss auf die aktivierende Wirkung, so dass der Aktivierungsmechanismus dieses Stibens PIP_2/PIP_3 unabhängig ist.

Zusammenfassend kann man sagen, dass das auffallendste Ergebnis der Arbeit die starke Abhängigkeit der quantitativen Effekte der Schließer und Öffner der K_{ATP} -Kanäle von der Konfiguration der patch-clamp Technik ist. Ein zweites Hauptergebnis ist die starke Beeinflussung der Pharmakawirkungen durch die Gegenwart von Nukleotiden. Die Arbeit zeigt die ganze Komplexität in der Modulation dieser Kanäle, die als metabolische Sensoren der Zelle außer von Nukleotiden auch von anderen Zellbestandteilen wie dem Zytoskelett und Phospholipiden entscheidend beeinflusst werden.

7 Literaturverzeichnis

- Aguilar-Bryan L, Clement IV JP, Gonzalez G, Kunjilwar K, Babenko A und Bryan J (1998) Toward understanding the assembly and structure of K_{ATP} channels. *Physiol Rev* **78**:227-245.
- Alekseev AE, Brady PA und Terzic A (1998) Ligand-insensitive state of cardiac ATP-sensitive K^+ channels - Basis for channel opening. *J Gen Physiol* **111**:381-394.
- Ashcroft FM (1998) Ion channels - Exciting times for PIP_2 . *Science* **282**:1059-1060.
- Ashcroft FM und Gribble FM (2000) New windows on the mechanism of action of K_{ATP} channel openers. *Trends Pharmacol Sci* **21**:439-445.
- Ashcroft FM und Kakei M (1989) ATP-sensitive K^+ channels in rat pancreatic β -cells: modulation by ATP and Mg^{2+} ions. *J Physiol (Lond)* **416**:649-67.
- Ashcroft SJ und Ashcroft FM (1992) The sulfonylurea receptor. *Biochim Biophys Acta* **1175**:45-59.
- Ashcroft SJH (2000) The β -cell K_{ATP} channel. *J Membrane Biol* **176**:187-206.
- Ashcroft SJH und Ashcroft FM (1990) Properties and functions of ATP-sensitive K-channels. *Cell Signal* **2**:197-214.
- Ashfield R, Gribble FM, Ashcroft SJH und Ashcroft FM (1999) Identification of the high-affinity tolbutamide site on the SUR1 subunit of the K_{ATP} channel. *Diabetes* **48**:1341-1347.
- Ashford ML, Sturgess NC, Trout NJ, Gardner NJ und Hales CN (1988) Adenosine-5'-triphosphate-sensitive ion channels in neonatal rat cultured central neurones. *Pflugers Arch* **412**:297-304.
- Babenko AP, Aguilar-Bryan L und Bryan J (1998a) A view of SUR/ $K_{IR}6.X$, K_{ATP} channels. *Annu Rev Physiol* **60**:667-687.

- Babenko AP, Gonzalez G, Aguilar-Bryan L und Bryan J (1998b) Reconstituted human cardiac K_{ATP} channels - Functional identity with the native channels from the sarcolemma of human ventricular cells. *Circ Res* **83**:1132-1143.
- Babenko AP, Gonzalez G und Bryan J (2000) Pharmacology-topology of sulfonylurea receptors - Separate domains of the regulatory subunits of K_{ATP} channel isoforms are required for selective interaction with K^+ channel openers. *J Biol Chem* **275**:717-720.
- Baukrowitz T und Fakler B (2000) K-ATP channels gated by intracellular nucleotides and phospholipids. *European Journal Of Biochemistry* **267**:5842-5848.
- Baukrowitz T, Schulte U, Oliver D, Herlitz S, Krauter T, Tucker SJ, Ruppersberg JP und Fakler B (1998) PIP_2 and PIP as determinants for ATP inhibition of K_{ATP} channels. *Science* **282**:1141-1144.
- Baukrowitz T, Tucker SJ, Schulte U, Benndorf K, Ruppersberg JP und Fakler B (1999) Inward rectification in K_{ATP} channels: a pH switch in the pore. *EMBO J* **18**:847-853.
- Beech DJ, Zhang H, Nakao K und Bolton TB (1993) K channel activation by nucleotide diphosphates and its inhibition by glibenclamide in vascular smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* **110**:573-582.
- Bichet D, Haass FA und Jan LY (2003) Merging functional studies with structures of inward-rectifier $K(+)$ channels. *Nat Rev Neurosci* **4**:957-967.
- Bienengraeber M, Alekseev AE, Abraham MR, Carrasco AJ, Moreau C, Vivaudou M, Dzeja PP und Terzic A (2000) ATPase activity of the sulfonylurea receptor: a catalytic function for the K_{ATP} channel complex. *FASEB J* **14**:1943-1952.
- Bienengraeber M, Olson TM, Selivanov VA, Kathmann EC, O'Coilain F, Gao F, Karger AB, Ballew JD, Hodgson DM, Zingman LV, Pang YP, Alekseev AE und Terzic A (2004) ABCC9 mutations identified in human dilated cardiomyopathy disrupt catalytic K_{ATP} channel gating. *Nat Genet* **36**:382-387.

- Brady PA, Alekseev AE, Aleksandrova LA, Gomez LA und Terzic A (1996) A disrupter of actin microfilaments impairs sulfonylurea-inhibitory gating of cardiac K_{ATP} channels. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* **271**:H2710-H2716.
- Bränström R, Leibiger IB, Leibiger B, Corkey BE, Berggren P-O und Larsson O (1998) Long chain coenzyme A esters activate the pore-forming subunit (Kir6.2) of the ATP-regulated potassium channel. *J Biol Chem* **273**:31395-31400.
- Bray KM und Quast U (1992) A specific binding site for K^+ channel openers in rat aorta. *J Biol Chem* **267**:11689-11692.
- Brown GR und Foubister AJ (1984) Receptor binding sites of hypoglycemic sulfonylureas and related [(acylamino)alkyl]benzoic acids. *J Med Chem* **27**:79-81.
- Busch AE, Herzer T, Takumi T, Krippeit-Drews P, Waldegger S und Lang F (1994) Blockade of human IsK channels expressed in *Xenopus* oocytes by the novel class III antiarrhythmic NE-10064. *Eur J Pharmacol* **264**:33-37.
- Cantley LC (2002) The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* **296**:1655-1657.
- Carrasco AJ, Dzeja PP, Alekseev AE, Pucar D, Zingman LV, Abraham MR, Hodgson D, Bienengraeber M, Puceat M, Janssen E, Wieringa B und Terzic A (2001) Adenylate kinase phosphotransfer communicates cellular energetic signals to ATP-sensitive potassium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:7623-7628.
- Catterall WA (1988) Structure and function of voltage-sensitive ion channels. *Science* **242**:50-61.
- Catterall WA, Chandy KG und Gutman GA (2002) *The IUPHAR Compendium of Voltage-gated Ion Channels*
- Cavero I, Djellas Y und Guillon JM (1995) Ischemic myocardial cell protection conferred by the opening of ATP-sensitive potassium channels. *Cardiovasc Drugs Ther* **9**:245-255.

- Chachin M, Yamada M, Fujita A, Matsuoka T, Matsushita K und Kurachi Y (2003) Nateglinide, a D-phenylalanine derivative lacking either a sulfonylurea or benzamido moiety, specifically inhibits pancreatic β -cell-type K_{ATP} channels. *J Pharmacol Exp Ther* **304**:1025-1032.
- Chalfie M (1995) Green fluorescent protein. *Photochem Photobiol* **62**:651-656.
- Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW und Prasher DC (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**:802-805.
- Chutkow WA, Pu J, Wheeler MT, Wada T, Makielski JC, Burant CF und McNally EM (2002) Episodic coronary artery vasospasm and hypertension develop in the absence of Sur2 K_{ATP} channels. *J Clin Invest* **110**:203-208.
- Coghlan MJ, Carroll WA und Gopalakrishnan M (2001) Recent developments in the biology and medicinal chemistry of potassium channel modulators: Update from a decade of progress. *J Med Chem* **44**:1627-1653.
- Cook DL und Hales CN (1984) Intracellular ATP directly blocks K^+ channels in pancreatic B-cells. *Nature* **311**:271-273.
- Crawford RM, Budas GR, Jovanovic S, Ranki HJ, Wilson TJ, Davies AM und Jovanovic A (2002a) M-LDH serves as a sarcolemmal $K(ATP)$ channel subunit essential for cell protection against ischemia. *EMBO J* **21**:3936-3948.
- Crawford RM, Ranki HJ, Botting CH, Budas GR und Jovanovic A (2002b) Creatine kinase is physically associated with the cardiac ATP-sensitive K^+ channel in vivo. *FASEB J* **16**:102-104.
- D'hahan N, Moreau C, Prost A-L, Jacquet H, Alekseev AE, Terzic A und Vivaudou M (1999) Pharmacological plasticity of cardiac ATP-sensitive potassium channels toward diazoxide revealed by ADP. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:12162-12167.
- Dabrowski M, Wahl P, Holmes WE und Ashcroft FM (2001) Effect of repaglinide on cloned beta cell, cardiac and smooth muscle types of ATP-sensitive potassium channels. *Diabetologia* **44**:747-756.

- Davis-Taber R, Molinari EJ, Altenbach RJ, Whiteaker KL, Shieh C-C, Rotert G, Buckner SA, Malysz J, Milicic I, McDermott JS, Gintant GA, Coghlan MJ, Carroll WA, Scott VE und Gopalakrishnan M (2003) [¹²⁵I]A-312110, a novel high-affinity 1,4-dihydropyridine ATP-sensitive K⁺ channel opener: characterization and pharmacology of binding. *Mol Pharmacol* **64**:143-153.
- Dickinson KEJ, Bryson CC, Cohen RB, Rogers L, Green DW und Atwal KS (1997) Nucleotide regulation and characteristics of potassium channel opener binding to skeletal muscle membranes. *Mol Pharmacol* **52**:473-481.
- Dobrowolski L und Sadowski J (2004) Renal medullary infusion of indomethacin and adenosine. Effects on local blood flow, tissue ion content and renal excretion. *Kidney Blood Press Res* **27**:29-34.
- Dörschner H, Brekardin E, Uhde I, Schwanstecher C und Schwanstecher M (1999) Stoichiometry of sulfonylurea-induced ATP-sensitive potassium channel closure. *Mol Pharmacol* **55**:1060-1066.
- Drain P, Li L und Wang J (1998) K_{ATP} channel inhibition by ATP requires distinct functional domains of the cytoplasmic C terminus of the pore-forming subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:13953-13958.
- Dunne MJ, Cosgrove KE, Shepherd RM, Aynsley-Green A und Lindley KJ (2004) Hyperinsulinism in infancy: from basic science to clinical disease. *Physiol Rev* **84**:239-275.
- Dzeja PP und Terzic A (1998) Phosphotransfer reactions in the regulation of ATP-sensitive K⁺ channels. *FASEB J* **12**:523-529.
- Eda M, Takemoto T, Ono S, Okada T, Kosaka K, Gohda M, Matzno S, Nakamura N und Fukaya C (1994) Novel potassium-channel openers: preparation and pharmacological evaluation of racemic and optically active N-(6-amino-3-pyridyl)-N'-bicycloalkyl-N"-cyanoguanidine derivatives. *J Med Chem* **37**:1983-1990.

- Edwards G und Weston AH (1995) Pharmacology of the potassium channel openers. *Cardiovasc Drugs Ther* **9**:185-193.
- Fan Z und Makielski JC (1997) Anionic phospholipids activate ATP-sensitive potassium channels. *J Biol Chem* **272**:5388-5395.
- Fan Z und Makielski JC (1999) Phosphoinositides Decrease ATP Sensitivity of the Cardiac ATP-sensitive K⁺ Channel. A Molecular Probe for the Mechanism of ATP-sensitive Inhibition. *J Gen Physiol* **114** :251-269.
- Felsch H, Lange U, Hambrock A, Löffler-Walz C, Russ U, Carroll WA, Gopalakrishnan M und Quast U (2004) Interaction of a novel dihydropyridine K⁺ channel opener, A-312110, with recombinant sulphonylurea receptors and K_{ATP} channels:comprarison with the cyanoguanidine P1075. *Br J Pharmacol* **141**:1098-1105.
- Fenton DA und Wilkinson JD (1983) Topical minoxidil in the treatment of alopecia areata. *Br Med J (Clin Res Ed)* **287**:1015-1017.
- Findlay I (1993) Sulphonylurea drugs no longer inhibit ATP-sensitive K⁺ channels during metabolic stress in cardiac muscle. *J Pharmacol Exp Ther* **266** :456-467.
- Findlay I (1988) Calcium-dependent inactivation of the ATP-sensitive K⁺ channel of rat ventricular myocytes. *Biochim Biophys Acta* **943**:297-304.
- Forestier C, Pierrard J und Vivaudou M (1996) Mechanism of action of K channel openers on skeletal muscle K_{ATP} channels. Interactions with nucleotides and protons. *J Gen Physiol* **107**:489-502.
- Furukawa K, Itoh T, Kajiwara M, Kitamura K, Suzuki H, Ito Y und Kuriyama H (1981) Vasodilating actions of 2-nicotinamidoethyl nitrate on porcine and guinea-pig coronary arteries. *J Pharmacol Exp Ther* **218**:248-259.
- Furukawa T, Virág L, Sawanobori T und Hiraoka M (1993) Stilbene disulfonates block ATP-sensitive K⁺ channels in guinea pig ventricular myocytes. *J Membrane Biol* **136**:289-302.

- Furukawa T, Yamane T, Terai T, Katayama Y und Hiraoka M (1996) Functional linkage of the cardiac ATP-sensitive K^+ channel to the actin cytoskeleton. *Pflügers Arch -Eur J Physiol* **431**:504-512.
- Gatto C, Lutsenko S und Kaplan JH (1997) Chemical modification with dihydro-4,4'-diisothiocyanostilbene-2,2'-disulfonate reveals the distance between K480 and K501 in the ATP-binding domain of the Na,K-ATPase. *Arch Biochem Biophys* **340**:90-100.
- Gillis KD, Gee WM, Hammoud A, McDaniel ML, Falke LC und Misler S (1989) Effects of sulfonamides on a metabolite-regulated ATPi-sensitive K^+ channel in rat pancreatic cells. *Am J Physiol* **257**:C1119-C1127.
- Gögelein H (2001) Inhibition of cardiac ATP-dependent potassium channels by sulfonylurea drugs. *Curr Op Investigational Drugs* **2**:72-80.
- Gögelein H, Englert HC, Kotzan A, Hack R, Lehr K-H, Seiz W, Becker RHA, Sultan E, Schölkens BA und Busch AE (2000) HMR 1098: An inhibitor of cardiac ATP-sensitive potassium channels. *Cardiovascular Drug Reviews* **18**:157-174.
- Gögelein H, Hartung J und Englert HC (1999) Molecular basis, pharmacology and physiological role of cardiac K_{ATP} channels. *Cell Physiol Biochem* **9**:227-241.
- Gojkovic-Bukarica L, Hambrock A, Löffler-Walz C, Quast U und Russ U (2002) Mg^{2+} sensitizes K-ATP channels to inhibition by DIDS: dependence on the sulfonylurea receptor subunit. *Br J Pharmacol* **137**:429-440.
- Gopalakrishnan M, Miller TR, Buckner SA, Milicic I, Molinari EJ, Whiteaker KL, Davis-Taber R, Scott VE, Cassidy C, Sullivan JP und Carroll WA (2003a) Pharmacological characterization of a 1,4-dihydropyridine analogue, 9-(3,4-dichlorophenyl)-3,3,6,6-tetramethyl-3,4,6,7,9,10-hexahydro-1,8(2H,5H)-acridinedione (A-184209) as a novel K-ATP channel inhibitor. *British Journal Of Pharmacology* **138**:393-399.
- Gopalakrishnan M, Buckner SA, Whiteaker KL, Shieh C-C, Molinari EJ, Milicic I, Daza AV, Davis-Taber R, Scott VE, Sellers D, Chess-Williams R, Chapple CR, Liu Y, Liu D, Brioni JD, Sullivan JP, Williams M, Carroll WA und Coghlan MJ (2002) (-)-(9S)-9-(3-

- bromo-4-fluorophenyl)-2,3,5,6,7,9- hexahydrothieno[3,2-b]quinolin-8(4H)-one 1,1-dioxide (A- 278637): A novel ATP-sensitive potassium channel opener efficacious in suppressing urinary bladder contractions. I. In vitro characterization. *J Pharmacol Exp Ther* **303**:379-386.
- Gribble FM und Ashcroft FM (1999) Differential sensitivity of beta-cell and extrapancreatic K_{ATP} channels to gliclazide. *Diabetologia* **42**:845-848.
- Gribble FM, Tucker SJ, Seino S und Ashcroft FM (1998a) Tissue specificity of sulfonylureas - Studies on cloned cardiac and beta-cell K-ATP channels. *Diabetes* **47**:1412-1418.
- Gribble FM, Proks P, Corkey BE und Ashcroft FM (1998b) Mechanism of cloned ATP-sensitive potassium channel activation by oleoyl-CoA. *J Biol Chem* **273**:26383-26387.
- Gribble FM, Reimann F, Ashfield R und Ashcroft FM (2000) Nucleotide modulation of pinacidil stimulation of the cloned K_{ATP} channel Kir6.2/SUR2A. *Mol Pharmacol* **57**:1256-1261.
- Gribble FM, Tucker SJ und Ashcroft FM (1997a) The essential role of the Walker A motifs of SUR1 in K-ATP channel activation by Mg-ADP and diazoxide. *EMBO J* **16**:1145-1152.
- Gribble FM, Tucker SJ und Ashcroft FM (1997b) The interaction of nucleotides with the tolbutamide block of cloned ATP-sensitive K^+ channel currents expressed in *Xenopus* oocytes: a reinterpretation. *J Physiol (Lond)* **504**:35-45.
- Gribble FM, Tucker SJ, Haug T und Ashcroft FM (1998c) MgATP activates the cell K_{ATP} channel by interaction with its SUR1 subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:7185-7190.
- Gross GJ und Fryer RM (1999) Sarcolemmal versus mitochondrial ATP-sensitive K^+ channels and myocardial preconditioning. *Circ Res* **84**:973-979.
- Grover GJ und Garlid KD (2000) ATP-sensitive potassium channels: A review of their cardioprotective pharmacology. *J Mol Cell Cardiol* **32**:677-695.

- Gutman GA, Chandy KG, Adelman JP, Aiyar J, Bayliss DA, Clapham DE, Covarrubias M, Desir GV, Furuichi K, Ganetzky B, Garcia ML, Grissmer S, Jan LY, Karschin A, Kim D, Kuperschmidt S, Kurachi Y, Lazdunski M, Lesage F, Lester HA, McKinnon D, Nichols CG, O'Kelly I, Robbins J, Robertson GA, Rudy B, Sanguinetti M, Seino S, Stuehmer W, Tamkun MM, Vandenberg CA, Wei A, Wulff H und Wymore RS (2003) International Union of Pharmacology. XLI. Compendium of voltage-gated ion channels: potassium channels. *Pharmacol Rev* **55**:583-586.
- Hambrock A, Löffler-Walz C, Ruß U, Lange U, Müller C und Quast U (2001a) High affinity binding of sulfonylureas and openers to a mutant SUR2B: Differences in the coupling to Kir6.x subtypes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **363**:R72.
- Hambrock A, Löffler-Walz C, Kloor D, Delabar U, Horio Y, Kurachi Y und Quast U (1999) ATP-Sensitive K⁺ channel modulator binding to sulfonylurea receptors SUR2A and SUR2B: opposite effects of MgADP. *Mol Pharmacol* **55**:832-840.
- Hambrock A, Löffler-Walz C, Kurachi Y und Quast U (1998) Mg²⁺ and ATP dependence of K_{ATP} channel modulator binding to the recombinant sulphonylurea receptor, SUR2B. *Br J Pharmacol* **125**:577-583.
- Hambrock A, Löffler-Walz C und Quast U (2002a) Glibenclamide binding to sulphonylurea receptor subtypes: dependence on adenine nucleotides. *Br J Pharmacol* **136**:995-1004.
- Hambrock A, Löffler-Walz C, Russ U, Lange U und Quast U (2001b) Characterization of a mutant sulfonylurea receptor SUR2B with high affinity for sulfonylureas and openers: Differences in the coupling to Kir6.x subtypes. *Mol Pharmacol* **60**:190-199.
- Hambrock A, Preisig-Müller R, Russ U, Piehl A, Hanley PJ, Ray J, Daut J, Quast U und Derst C (2002b) Four novel splice variants of sulfonylurea receptor 1. *Am J Physiol (Cell Physiol)* **283**:C587-C598.
- Hamilton TC, Weir SW und Weston AH (1986) Comparison of the effects of BRL 34915 and verapamil on electrical and mechanical activity in rat portal vein. *Br J Pharmacol* **88**:103-111.

- Hansen AM, Christensen IT, Hansen JB, Carr RD, Ashcroft FM und Wahl P (2002) Differential Interactions of Nateglinide and Repaglinide on the Human β -Cell Sulphonylurea Receptor 1. *Diabetes* **51**:2789-2795.
- Harvey J, McKay NG, Walker KS, Van der Kaay J, Downes CP und Ashford MLJ (2000) Essential role of phosphoinositide 3-kinase in leptin-induced K_{ATP} channel activation in the rat CRI-G1 insulinoma cell line. *J Biol Chem* **275**:4660-4669.
- Heinemann SH (2001) Sodium, Calcium and Potassium Channels. *ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES / & 2001 Nature Publishing Group / www.els.net* 1-7.
- Hilgemann DW (1997) Cytoplasmic ATP-dependent regulation of ion transporters and channels: mechanisms and messengers. *Annu Rev Physiol* **59**:193-220.
- Hilgemann DW und Ball R (1996) Regulation of cardiac Na^+ , Ca^{2+} exchange and K_{ATP} potassium channels by PIP_2 . *Science* **273**:956-959.
- Hille B (2001) *Ionic Channels of Excitable Membranes*, Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts.
- Hu S, Wang S und Dunning BE (2001) Glucose-dependent and glucose-sensitizing insulinotropic effect of nateglinide: comparison to sulphonylureas and repaglinide. *Int J Exp Diabetes Res* **2**:63-72.
- Humphrey, Stephen J., Meisheri, Kaushik D., Ludens, James H. und Hester, Jackson B. Preparation of N(3pyridyl)N''cyanoguanidines as potassium channel blockers. 5567722 A [5567722 A]. 1996. U.S. patent.
Ref Type: Patent
- Hunter M und Giebisch G (1988) Calcium-activated K-channels of *Amphiuma* early distal tubule: inhibition by ATP. *Pflugers Arch* **412**:331-333.
- Huopio H, Otonkoski T, Vauhkonen I, Reimann F, Ashcroft FM und Laakso M (2003) A new subtype of autosomal dominant diabetes attributable to a mutation in the gene for sulphonylurea receptor 1. *Lancet* **361**:301-307.

- Inagaki N, Gonoï T, Clement IV JP, Namba N, Inazawa J, Gonzalez G, Aguilar-Bryan L, Seino S und Bryan J (1995a) Reconstitution of I_{KATP} : an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science* **270**:1166-1170.
- Inagaki N, Tsuura Y, Namba N, Masuda K, Gonoï T, Horie M, Seino Y, Mizuta M und Seino S (1995b) Cloning and functional characterization of a novel ATP-sensitive potassium channel ubiquitously expressed in rat tissues, including pancreatic islets, pituitary, skeletal muscle, and heart. *J Biol Chem* **270**:5691-5694.
- Isomoto S, Kondo C, Yamada M, Matsumoto S, Higashiguchi O, Horio Y, Matsuzawa Y und Kurachi Y (1996) A novel sulfonylurea receptor forms with BIR (KIR6.2) a smooth muscle type ATP-sensitive K^+ channel. *J Biol Chem* **271**:24321-24324.
- Isomoto S, Kondo C und Kurachi Y (1997) Inwardly rectifying potassium channels: Their molecular heterogeneity and function. *Jap J Physiol* **47**:11-39.
- Jan LY und Jan YN (1997) CLONED POTASSIUM CHANNELS FROM EUKARYOTES AND PROKARYOTES. *Annu Rev Neurosci* **20**:91-123.
- Jentsch TJ, Stein V, Weinreich F und Zdebik AA (2002) Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiol Rev* **82**:503-568.
- Khan SA, Higdon NR, Hester JB und Meisheri KD (1997) Pharmacological characterization of novel cyanoguanidines as vascular $KATP$ channel blockers. *J Pharmacol Exp Ther* **283**:1207-1213.
- Khelili S, de Tullio P, Lebrun P, Fillet M, Antoine MH, Ouedraogo R, Dupont L, Fontaine J, Felekidis A, Leclerc G, Delarge J und Pirotte B (1999) Preparation and pharmacological evaluation of the R- and S-enantiomers of 3-(2-butylamino)-4H- and 3-(3-methyl-2-butylamino)-4H-pyrido[4,3-e]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxide, two tissue selective ATP-sensitive potassium channel openers. *Bioorg Med Chem* **7**:1513-1520.

- Kondo C, Repunte VP, Satoh E, Yamada M, Horio Y, Matsuzawa Y, Pott L und Kurachi Y (1998) Chimeras of Kir6.1 and Kir6.2 reveal structural elements involved in spontaneous opening and unitary conductance of the ATP-sensitive K^+ channels. *Receptors And Channels* **6**:129-140.
- Kono Y, Horie M, Takano M, Otani H, Xie L-H, Akao M, Tsuji K und Sasayama S (2000) The properties of the Kir6.1-6.2 tandem channel co-expressed with SUR2A. *Pflügers Arch - Eur J Physiol* **440**:692-698.
- Koster JC, Sha Q, Shyng S-L und Nichols CG (1999) ATP inhibition of K_{ATP} channels: control of nucleotide sensitivity by the N-terminal domain of the Kir6.2 subunit. *J Physiol (Lond)* **515**:19-30.
- Krämer BK, Kammerl MC und Kömhoff M (2004) Renal cyclooxygenase-2 (COX-2). Physiological, pathophysiological, and clinical implications. *Kidney Blood Press Res* **27**:43-62.
- Krauter T, Ruppertsberg JP und Baukrowitz T (2001) Phospholipids as modulators of K_{ATP} channels: Distinct mechanisms for control of sensitivity to sulphonylureas, K^+ channel openers, and ATP. *Mol Pharmacol* **59**:1086-1093.
- Lange U, Bukarica LG, Löffler-Walz C, Hambrock A, Quast U und Ruß U (2003) The stilbene DIDS opens the Kir6.2/SUR2B channel. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **367**:R69.
- Lange U, Ruß U, Löffler-Walz C, Hambrock A, Englert HC und Quast U (2002a) Stereo selective modulation of K_{ATP} channel gating by pinacidil analogues. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **365**:R63.
- Lange U, Löffler-Walz C, Englert HC, Hambrock A, Russ U und Quast U (2002b) The stereoisomers of a pinacidil analog open or close cloned ATP-sensitive K^+ channels. *J Biol Chem* **277**:40196-40205.

- Larsson O, Deeney JT, Bränström R, Berggren PO und Corkey BE (1996) Activation of the ATP-sensitive K⁺ channel by long chain acyl-CoA. A role in modulation of pancreatic beta-cell glucose sensitivity. *J Biol Chem* **271**:10623-10626.
- Lawrence CL, Proks P, Rodrigo GC, Jones P, Hayabuchi Y, Standen NB und Ashcroft FM (2001) Gliclazide produces high-affinity block of K_{ATP} channels in mouse isolated pancreatic beta cells but not rat heart or arterial smooth muscle cells. *Diabetologia* **44**:1019-1025.
- Lawrence CL, Rainbow RD, Davies NW und Standen NB (2002) Effect of metabolic inhibition on glimepiride block of native and cloned cardiac sarcolemmal K_{ATP} channels. *Br J Pharmacol* **136**:746-752.
- Lawson K (1996) Potassium channel activation: A potential therapeutic approach? *Pharmacol Ther* **70**:39-63.
- Lederer WJ und Nichols CG (1989) Nucleotide modulation of the activity of rat heart ATP-sensitive K⁺ channels in isolated membrane patches. *J Physiol (Lond)* **419**:193-211.
- Lesage F und Lazdunski M (2000) Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels. *Am J Physiol (Renal Physiol)* **279**:F793-F801.
- Lesnefsky EJ (2002) The IONA study: preparing the myocardium for ischaemia? *Lancet* **359**:1262-1263.
- Liss B und Roeper J (2001) A role for neuronal K_{ATP} channels in metabolic control of the seizure gate. *Trends Pharmacol Sci* **22**:599-601.
- Liu GX, Hanley PJ, Ray J und Daut J (2001) Long-chain acyl-coenzyme A esters and fatty acids directly link metabolism to K_{ATP} channels in the heart. *Circ Res* **88**:918-924.
- Löffler-Walz C, Hambrock A und Quast U (2002) Interaction of K_{ATP} channel modulators with sulfonylurea receptor SUR2B: implication for tetramer formation and allosteric coupling of subunits. *Mol Pharmacol* **61**:407-414.

- Löffler-Walz C und Quast U (1998) Binding of K_{ATP} channel modulators in rat cardiac membranes. *Br J Pharmacol* **123**:1395-1402.
- Loubatieres A (1957) The hypoglycemic sulfonamides: history and development of the problem from 1942 to 1955. *Ann N Y Acad Sci* **71**:4-11.
- Manley PW, Löffler-Walz C, Russ U, Hambrock A, Moenius T und Quast U (2001) Synthesis and characterization of a novel tritiated K_{ATP} channel opener with a benzopyran structure. *Br J Pharmacol* **133**:275-285.
- Mannhold R (2004) K_{ATP} Channel Openers: Structure-Activity Relationships and Therapeutic Potential. *Med Res Rev* **24**:213-266.
- Matsuoka T, Matsushita K, Katayama Y, Fujita A, Inageda K, Tanemoto M, Inanobe A, Yamashita S, Matsuzawa Y und Kurachi Y (2000) C-terminal tails of sulphonylurea receptors control ADP-induced activation and diazoxide modulation of ATP-sensitive K^+ channels. *Circ Res* **87**:873-880.
- Mederos y Schnitzler M, Derst C, Daut J und Preisig-Müller R (2000) ATP-sensitive potassium channels in capillaries isolated from guinea-pig heart. *J Physiol (Lond)* **525**:307-317.
- Metzger F, Löffler C und Quast U (1997) Sulphonylurea binding in rat isolated glomeruli: pharmacological characterization and dependence on cell metabolism and cytoskeleton. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **355**:141-149.
- Meyer M, Chudziak F, Schwanstecher C, Schwanstecher M und Panten U (1999) Structural requirements of sulphonylureas and analogues for interaction with sulphonylurea receptor subtypes. *Br J Pharmacol* **128**:27-34.
- Miki T, Suzuki M, Shibasaki T, Uemura H, Sato T, Yamaguchi K, Koseki H, Iwanaga T, Nakaya H und Seino S (2002) Mouse model of Prinzmetal angina by disruption of the inward rectifier Kir6.1. *Nature Med* **8**:466-472.
- Millar JA, Barratt L, Southan AP, Page KM, Fyffe RE, Robertson B und Mathie A (2000) A functional role for the two-pore domain potassium channel TASK-1 in cerebellar granule neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:3614-3618.

- Miller TR, Taber RD, Molinari EJ, Whiteaker KL, Monteggia LM, Scott VE, Brioni JD, Sullivan JP und Gopalakrishnan M (1999) Pharmacological and molecular characterization of ATP-sensitive K⁺ channels in the TE671 human medulloblastoma cell line. *Eur J Pharmacol* **370**:179-185.
- Miyamura A, Kakei M, Ichinari K, Okamura M, Oketani N und Tei C (2000) On the mechanism of ADP-induced alteration of sulphonylurea sensitivity in cardiac ATP-sensitive K⁺ channels. *Br J Pharmacol* **130**:1411-1417.
- Moreau C, Jacquet H, Prost A-L, D'hahan N und Vivaudou M (2000) The molecular basis of the specificity of action of K_{ATP} channel openers. *EMBO J* **19**:6644-6651.
- Murry CE, Jennings RB und Reimer KA (1986) Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* **74**:1124-1136.
- Nichols CG und Lopatin AN (1997) Inward rectifier potassium channels. *Annu Rev Physiol* **59**:171-191.
- Noma A (1983) ATP-regulated K⁺ channels in cardiac muscle. *Nature* **305**:147-148.
- O'Rourke B (2000) Pathophysiological and protective roles of mitochondrial ion channels. *J Physiol (Lond)* **529**:23-36.
- Okuyama Y, Yamada M, Kondo C, Satoh E, Isomoto S, Shindo T, Horio Y, Kitakaze M, Hori M und Kurachi Y (1998) The effects of nucleotides and potassium channel openers on the SUR2A/Kir6.2 complex K⁺ channel expressed in a mammalian cell line, HEK293T cells. *Pflügers Arch -Eur J Physiol* **435**:595-603.
- Oldenburg O, Cohen MV, Yellon DM und Downey JM (2002) Mitochondrial K_{ATP} channels: role in cardioprotection. *Cardiovasc Res* **55**:429-437.
- Patel AJ, Honore E, Lesage F, Fink M, Romey G und Lazdunski M (1999) Inhalational anesthetics activate two-pore-domain background K⁺ channels. *Nat Neurosci* **2**:422-426.

- Pentz ES, Moyano MA, Thornhill BA, Sequeira Lopez MLS und Gomez RA (2004) Ablation of renin-expressing juxtaglomerular cells results in a distinct kidney phenotype. *Am J Physiol (Regulatory Integrative Comp Physiol)* **286**:R474-R483.
- Pirotte B, de Tullio P, Lebrun P, Antoine MH, Fontaine J, Masereel B, Schynts M, Dupont L, Herchuelz A und Delarge J (1993) 3-(Alkylamino)-4H-pyrido[4,3-e]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxides as powerful inhibitors of insulin release from rat pancreatic B-cells: a new class of potassium channel openers? *J Med Chem* **36**:3211-3213.
- Proks P, Jones P und Ashcroft FM (2001) Interaction of stilbene disulphonates with cloned K-ATP channels. *British Journal Of Pharmacology* **132**:973-982.
- Proks P, Reimann F, Green N, Gribble F und Ashcroft F (2002) Sulfonylurea stimulation of insulin secretion. *Diabetes* **51 Suppl 3**:S368-S376.
- Quast U (2001) Repaglinid. [Repaglinide]. *Dtsch Med Wochenschr* **126**:559-560.
- Quast U und Villhauer EB (1993) The individual enantiomers of cis-cromakalim possess K⁺ channel opening activity. *Eur J Pharmacol* **245**:165-171.
- Quast U, Bray KM, Andres H, Manley PW, Baumlin Y und Dosogne J (1993) Binding of the K⁺ channel opener [³H]P1075 in rat isolated aorta: relationship to functional effects of openers and blockers. *Mol Pharmacol* **43**:474-481.
- Quast U und Cook NS (1989a) In vitro and in vivo comparison of two K⁺ channel openers, diazoxide and cromakalim, and their inhibition by glibenclamide. *J Pharmacol Exp Ther* **250**:261-271.
- Quast U und Cook NS (1989b) Moving together: K⁺ channel openers and ATP-sensitive K⁺ channels. *Trends Pharmacol Sci* **10**:431-435.
- Quayle JM und Standen NB (1994) K_{ATP} channels in vascular smooth muscle. *Cardiovasc Res* **28**:797-804.
- Raeburn D und Karlsson JA (1991) Potassium channel openers: airway pharmacology and clinical possibilities in asthma. *Prog Drug Res* **37**:161-180.

- Reimann F, Ashcroft FM und Gribble FM (2001a) Structural basis for the interference between nicorandil and sulfonylurea action. *Diabetes* **50**:2253-2259.
- Reimann F, Dabrowski M, Jones P, Gribble FM und Ashcroft FM (2003) Analysis of the differential modulation of sulphonylurea block of beta-cell and cardiac ATP-sensitive K^+ (K_{ATP}) channels by Mg-nucleotides. *J Physiol (Lond)* **547**:159-168.
- Reimann F, Gribble FM und Ashcroft FM (2000) Differential response of K_{ATP} channels containing SUR2A or SUR2B subunits to nucleotides and pinacidil. *Mol Pharmacol* **58**:1318-1325.
- Reimann F, Proks P und Ashcroft FM (2001b) Effects of mitiglinide (S 21403) on Kir6.2/SUR1, Kir6.2/SUR2A and Kir6.2/SUR2B types of ATP-sensitive potassium channel. *Br J Pharmacol* **132**:1542-1548.
- Ribalet B, John SA und Weiss JN (2000) Regulation of cloned ATP-sensitive K channels by phosphorylation, MgADP, and phosphatidylinositol bisphosphate (PIP_2) - A study of channel rundown and reactivation. *J Gen Physiol* **116**:391-409.
- Riedel MJ, Boora P, Steckley D, de Vries G und Light PE (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.
- Ritzel RA, Hansen JB, Veldhuis JD und Butler PC (2004) Induction of beta-cell rest by a Kir6.2/SUR1-selective K_{ATP} -channel opener preserves beta-cell insulin stores and insulin secretion in human islets cultured at high (11 mM) glucose. *J Clin Endocrinol Metab* **89**:795-805.
- Rohács T, Lopes CMB, Jin T, Ramdya PP, Molnár Z und Logothetis DE (2003) Specificity of activation by phosphoinositides determines lipid regulation of Kir channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:745-750.
- Rufer C und Losert W (1979) Blood glucose lowering sulfonamides with asymmetric carbon atoms. 3. Related N-substituted carbamoylbenzoic acids. *J Med Chem* **22**:750-752.

- Ruppersberg JP (2000) Intracellular regulation of inward rectifier K⁺ channels. *Pflügers Arch - Eur J Physiol* **441**:1-11.
- Ruß U, Lange U, Löffler-Walz C, Hambrock A und Quast U (2002) K_{ATP} channel openers differ in their ability to activate the channel in the absence of Mg²⁺. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **365** :R63.
- Russ U, Lange U, Löffler-Walz C, Hambrock A und Quast U (2001) Interaction of the sulfonylthiourea HMR 1883 with sulfonyleurea receptors and recombinant ATP-sensitive K⁺ channels: Comparison with glibenclamide. *J Pharmacol Exp Ther* **299**:1049-1055.
- Russ U, Lange U, Löffler-Walz C, Hambrock A und Quast U (2003) Binding and effect of K_{ATP} channel openers in the absence of Mg²⁺. *Br J Pharmacol* **139**:368-380.
- Sakura H, Trapp S, Liss B und Ashcroft FM (1999) Altered functional properties of K_{ATP} channel conferred by a novel splice variant of SUR1. *J Physiol (Lond)* **521**:337-350.
- Sánchez JA, Gonoï T, Inagaki N, Katada T und Seino S (1998) Modulation of reconstituted ATP-sensitive K⁺ channels by GTP-binding proteins in a mammalian cell line. *J Physiol (Lond)* **507**:315-324.
- Satoh E, Yamada M, Kondo C, Repunte VP, Horio Y, Iijima T und Kurachi Y (1998) Intracellular nucleotide-mediated gating of SUR/Kir6.0 complex potassium channels expressed in a mammalian cell line and its modification by pinacidil. *J Physiol (Lond)* **511**:663-674.
- Schulze D, Rapedius M, Krauter T und Baukrowitz T (2003a) Long-chain acyl-CoA esters and phosphatidylinositol phosphates modulate ATP inhibition of K_{ATP} channels by the same mechanism. *J Physiol* **552**:357-367.
- Schulze D, Krauter T, Fritzenschaft H, Soom M und Baukrowitz T (2003b) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) modulation of ATP and pH sensitivity in Kir channels. A tale of an active and a silent PIP₂ site in the N terminus. *J Biol Chem* **278**:10500-10505.

- Schwanstecher C, Dickel C und Panten U (1992a) Cytosolic nucleotides enhance the tolbutamide sensitivity of the ATP-dependent K^+ channel in mouse pancreatic B cells by their combined actions at inhibitory and stimulatory receptors. *Mol Pharmacol* **41**:480-486.
- Schwanstecher C, Meyer U und Schwanstecher M (2002) $K_{IR}6.2$ polymorphism predisposes to type 2 diabetes by inducing overactivity of pancreatic β -cell ATP-sensitive K^+ channels. *Diabetes* **51**:875-879.
- Schwanstecher M, Brandt C, Behrends S, Schaupp U und Panten U (1992b) Effect of MgATP on pinacidil-induced displacement of glibenclamide from the sulphonylurea receptor in a pancreatic β -cell line and rat cerebral cortex. *Br J Pharmacol* **106**:295-301.
- Schwanstecher M, Sieverding C, Dörschner H, Gross I, Aguilar-Bryan L, Schwanstecher C und Bryan J (1998) Potassium channel openers require ATP to bind to and act through sulfonylurea receptors. *EMBO J* **17**:5529-5535.
- Seino S (1999) ATP-sensitive potassium channels: A model of heteromultimeric potassium channel/receptor assemblies. *Annu Rev Physiol* **61**:337-362.
- Seino S (2003) Physiology and pathophysiology of K_{ATP} channels in the pancreas and cardiovascular system. A review. *J Diabetes Complications* **17**:2-5.
- Seino S und Miki T (2003) Physiological and pathophysiological roles of ATP-sensitive K^+ channels. *Prog Biophys Mol Biol* **81**:133-176.
- Shindo T, Yamada M, Isomoto S, Horio Y und Kurachi Y (1998) SUR2 subtype (A and B)-dependent differential activation of the cloned ATP-sensitive K^+ channels by pinacidil and nicorandil. *Br J Pharmacol* **124**:985-991.
- Shyng S-L und Nichols CG (1998) Membrane phospholipid control of nucleotide sensitivity of K_{ATP} channels. *Science* **282**:1138-1141.
- Shyng S-L, Cukras CA, Harwood J und Nichols CG (2000) Structural determinants of PIP_2 regulation of inward rectifier K_{ATP} channels. *J Gen Physiol* **116**:599-607.

- Singh H, Hudman D, Lawrence CL, Rainbow RD, Lodwick D und Norman RI (2003) Distribution of Kir6.0 and SUR2 ATP-sensitive potassium channel subunits in isolated ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* **35**:445-459.
- Song D-K und Ashcroft FM (2001a) ATP modulation of ATP-sensitive potassium channel ATP sensitivity varies with the type of SUR subunit. *J Biol Chem* **276**:7143-7149.
- Song D-K und Ashcroft FM (2001b) Glibenclamide block of cloned β -cell, cardiac and smooth muscle K_{ATP} channels. *Br J Pharmacol* **133**:193-199.
- Spruce AE, Standen NB und Stanfield PR (1985) Voltage-dependent ATP-sensitive potassium channels of skeletal muscle membrane. *Nature* **316**:736-738.
- Standen NB, Quayle JM, Davies NW, Brayden JE, Huang Y und Nelson MT (1989) Hyperpolarizing vasodilators activate ATP-sensitive K^+ channels in arterial smooth muscle. *Science* **245**:177-180.
- Stephan D, Felsch H, Hambrock A und Quast U (2004) Effect of coexpression with Kir6.x on the sulphonylurea receptor SUR2A. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **369**:R65.
- Szewczyk A und Wojtczak L (2002) Mitochondria as a pharmacological target. *Pharmacol Rev* **54**:101-127.
- Talley EM, Lei Q, Sirois JE und Bayliss DA (2000) TASK-1, a two-pore domain K^+ channel, is modulated by multiple neurotransmitters in motoneurons. *Neuron* **25**:399-410.
- Teramoto N und Brading AF (1996) Activation by levcromakalim and metabolic inhibition of glibenclamide-sensitive k channels in smooth muscle cells of pig proximal urethra. *Br J Pharmacol* **118**:635-642.
- Terzic A, Dzeja PP und Holmuhamedov EL (2000) Mitochondrial K_{ATP} channels: Probing molecular identity and pharmacology. *J Mol Cell Cardiol* **32**:1911-1915.

- Terzic A, Jahangir A und Kurachi Y (1994) HOE-234, a second generation K⁺ channel opener, antagonizes the ATP-dependent gating of cardiac ATP-sensitive K⁺ channels. *J Pharmacol Exp Ther* **268**:818-825.
- Terzic A, Jahangir A und Kurachi Y (1995) Cardiac ATP-sensitive K⁺ channels: Regulation by intracellular nucleotides and K⁺ channel-opening drugs. *Am J Physiol (Cell Physiol)* **269**(3):C525-C545.
- Terzic A und Kurachi Y (1996) Actin microfilament disrupters enhance KATP channel opening in patches from guinea-pig cardiomyocytes. *J Physiol (Lond)* **492.2**:395-404.
- The IONA Study Group (2002) Effect of nicorandil on coronary events in patients with stable angina: the Impact Of Nicorandil in Angina (IONA) randomised trial. *Lancet* **359**:1269-1275.
- Tsien RY (1998) THE GREEN FLUORESCENT PROTEIN. *Annu Rev Biochem* **67**:509-544.
- Tucker SJ, Gribble FM, Zhao C, Trapp S und Ashcroft FM (1997) Truncation of Kir6.2 produces ATP-sensitive K⁺ channels in the absence of the sulphonylurea receptor. *Nature* **387**:179-183.
- Ueda K, Komine J, Matsuo M, Seino S und Amachi T (1999) Cooperative binding of ATP and MgADP in the sulphonylurea receptor is modulated by glibenclamide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:1268-1272.
- Uhde I, Toman A, Gross I, Schwanstecher C und Schwanstecher M (1999) Identification of the potassium channel opener site on sulphonylurea receptors. *J Biol Chem* **274**:28079-28082.
- Venkatesh N, Lamp ST und Weiss JN (1991) Sulphonylureas, ATP-sensitive K⁺ channels, and cellular K⁺ loss during hypoxia, ischemia, and metabolic inhibition in mammalian ventricle. *Circ Res* **69**:623-637.
- Wada Y, Yamashita T, Imai K, Miura R, Takao K, Nishi M, Takeshima H, Asano T, Morishita R, Nishizawa K, Kokubun S und Nukada T (2000) A region of the sulphonylurea receptor critical for a modulation of ATP-sensitive K⁺ channels by G-protein β -subunits. *EMBO J* **19**:4915-4925.

- Walker JE, Saraste M, Runswick MJ und Gay NJ (1982) Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J* **1**:945-951.
- Weiss JN und Venkatesh N (1993) Metabolic regulation of cardiac ATP-sensitive K⁺ channels. *Cardiovasc Drugs Ther* **7 Suppl**:499-505.
- Wellman GC, Quayle JM und Standen NB (1998) ATP-sensitive K⁺ channel activation by calcitonin gene-related peptide and protein kinase A in pig coronary arterial smooth muscle. *J Physiol (Lond)* **507**:117-129.
- Wymann MP, Zvelebil M und Laffargue M (2003) Phosphoinositide 3-kinase signalling--which way to target? *Trends Pharmacol Sci* **24**:366-376.
- Xie L-H, Takano M, Kakei M, Okamura M und Noma A (1999) Wortmannin, an inhibitor of phosphatidylinositol kinases, blocks the MgATP-dependent recovery of Kir6.2/SUR2A channels. *J Physiol (Lond)* **514**:655-665.
- Yamada M, Isomoto S, Matsumoto S, Kondo C, Shindo T, Horio Y und Kurachi Y (1997) Sulphonylurea receptor 2B and Kir6.1 form a sulphonylurea-sensitive but ATP-insensitive K⁺ channel. *J Physiol (Lond)* **499**:715-720.
- Yang F, Moss LG und Phillips G-NJ (1996) The molecular structure of green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* **14**:1246-1251.
- Yellon DM und Downey JM (2003) Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. *Physiol Rev* **83**:1113-1151.
- Yokoshiki H, Katsube Y, Sunagawa M, Seki T und Sperelakis N (1997) Disruption of actin cytoskeleton attenuates sulfonylurea inhibition of cardiac ATP-sensitive K⁺ channels. *Pflügers Arch -Eur J Physiol* **434**:203-205.
- Zingman LV, Alekseev AE, Bienengraeber M, Hodgson D, Karger AB, Dzeja PP und Terzic A (2001) Signaling in channel/enzyme multimers: ATPase transitions in SUR module gate ATP-sensitive K⁺ conductance. *Neuron* **31**:233-245.

- Zingman LV, Hodgson D, Bienengraeber M, Karger AB, Kathmann EC, Alekseev AE und Terzic A (2002a) Tandem function of nucleotide binding domains confers competence to sulfonylurea receptor in gating ATP-sensitive K^+ channels. *J Biol Chem* **277**:14206-14210.
- Zingman LV, Hodgson DM, Bast PH, Kane GC, Perez-Terzic C, Gumina RJ, Pucar D, Bienengraeber M, Dzeja PP, Miki T, Seino S, Alekseev AE und Terzic A (2002b) Kir6.2 is required for adaptation to stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:13278-13283.
- Züinkler BJ, Lenzen S, Männer K, Panten U und Trube G (1988a) Concentration-dependent effects of tolbutamide, meglitinide, glipizide, glibenclamide and diazoxide on ATP-regulated K^+ currents in pancreatic B-cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **337**:225-230.
- Züinkler BJ, Lins S, Ohno-Shosaku T, Trube G und Panten U (1988b) Cytosolic ADP enhances the sensitivity to tolbutamide of ATP-dependent K^+ channels from pancreatic B-cells. *FEBS Lett* **239**:241-244.

Publikationsliste

Originalarbeiten

Stephan 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 sulphonylurea receptor SUR2A for glibenclamide and enhances the effects of coexpression with Kir6.2. *Br J Pharmacol* **144**:1078-88.

Felsch H, Lange U, Hambrock A, Löffler-Walz C, Russ U, Carroll WA, Gopalakrishnan M und Quast U (2004) Interaction of a novel dihydropyridine K⁺ channel opener, A-312110, with recombinant sulphonylurea receptors and K_{ATP} channels: comparison with the cyanoguanidine P1075. *Br J Pharmacol* **141**:1098-1105.

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

Lange U, Löffler-Walz C, Englert HC, Hambrock A, Russ U und Quast U (2002b) The stereoisomers of a pinacidil analog open or close cloned ATP-sensitive K⁺ channels. *J Biol Chem* **277**:40196-40205.

Russ U, Lange U, Löffler-Walz C, Hambrock A und Quast U (2001) Interaction of the sulphonylthiourea HMR 1883 with sulphonylurea receptors and recombinant ATP-sensitive K⁺ channels: Comparison with glibenclamide. *J Pharmacol Exp Ther* **299**:1049-1055.

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

Kongressbeiträge

Hambrock A, Löffler-Walz C, Ruß U, Lange U, Müller C und Quast U (2001a) High affinity binding of sulphonylureas and openers to a mutant SUR2B: Differences in the coupling to Kir6.x subtypes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **363**:R72.

Lange U, Ruß U, Löffler-Walz C, Hambrock A, Englert HC und Quast U (2002a) Stereo selective modulation of K_{ATP} channel gating by pinacidil analogues. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **365**:R63.

- Lange U, Bukarica LG, Loffler-Walz C, Hambrock A, Quast U und Ruß U (2003) The stilbene DIDS opens the Kir6.2/SUR2B channel. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **367**:R69.
- Quast U, Felsch H, Lange U, Loffler-Walz C, Ruß U, Carroll WA, Gopalakrishnan M und Hambrock A (2003) Interaction of a novel dihydropyridine with sulphonylurea receptors and K_{ATP} channels. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **367**:R68.
- Ruß U, Lange U, Loffler-Walz C, Hambrock A und Quast U (2001) Interaction of HMR 1883 and glibenclamide with K_{ATP} channels and sulphonylurea receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **363**:R73.
- Ruß U, Lange U, Loffler-Walz C, Hambrock A und Quast U (2002) K_{ATP} channel openers differ in their ability to activate the channel in the absence of Mg^{2+} . *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **365** :R63.
- Stauss E, Hambrock A, Lange U, Felsch H, Loffler-Walz C, Ruß U und Quast U (2003) Effect of the mutation Y1206S on the sulphonylurea receptor SUR2A. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **367**:R69.

Akademische Lehrer:

Meine Akademischen Lehrer neben Frau Prof. Dr. Gisela Drews, Herrn Prof. Dr. Ulrich Quast und Herrn PD Dr. Ulrich Russ waren:

PD. Dr. Barbara Arlemaier	Pharmakologie und Toxikologie
Dr. K. D. Bremmecker	Pharmazeutische Technologie
Prof. Dr. Peter Dilg	Geschichte der Naturwissenschaften
Prof. Dr. Alfred Fahr	Pharmazeutische Technologie
PD. Dr. Thomas Gillmann	Chemie
Prof. Dr. Manfred Haake	Chemie
Prof. Dr. Hans Häberlein	Pharmazeutische Biologie
Prof. Dr. Wolfgang Hanefeld	Organische Chemie
Dr. Jürgen Hocke	Physikalische Chemie
Prof. Dr. Josef Hölzl	Pharmazeutische Biologie
Prof. Dr. Peter Imming	Chemie
Prof. Dr. Susanne Klumpp	Biochemie
Prof. Dr. Thomas Kissel	Pharmazeutische Technologie
Prof. Dr. Fritz Krafft	Geschichte der Naturwissenschaften
Prof. Dr. Dr. Josef Krieglstein	Pharmakologie und Toxikologie
Prof. Dr. Klaus Kuschinski	Pharmakologie und Toxikologie
PD. Dr. C. Mäder	Pharmazeutische Technologie
Prof. Dr. Rudolf Matusch	Chemie
Prof. Dr. Ulrich Matern	Pharmazeutische Biologie
Prof. Dr. Maike Peterson	Pharmazeutische Biologie
Prof. Dr. Roland Radziwill	Klinische Pharmazie
Prof. Dr. Martin Schlitzer	Chemie
Prof. Dr. Gunther Seitz	Pharmazeutische Chemie
Prof. Dr. Max Wichtl	Pharmazeutische Biologie

Lebenslauf:

Persönliche Daten:

Name: Ulf Hans Udo Lange
Geburtstag: 22. Januar 1969
Geburtsort: Mönchengladbach

Schulbildung:

1975 – 1979 Grundsule Palkestraße in Mönchengladbach
1979 – 1990 Gymnasium an der Gartenstraße in Mönchengladbach

Grundwehrdienst:

11/1990 – 01/1992 Zivildienst beim Deutschen Roten Kreuz Kreisverband Rheydt in Mönchengladbach als Rettungssanitäter

Berufstätigkeit als Rettungssanitäter:

02/1992 – 09/1993 Rettungssanitäter beim Deutschen Roten Kreuz Kreisverband Rheydt in Mönchengladbach

Hochschulausbildung:

10/1993 - 04/1999 Studium der Pharmazie an der Philippsuniversität in Marburg

Praktische Ausbildung:

05/1999 – 10/1999 Pharmaziepraktikant im Klinikum Fulda in Fulda
11/1999 – 04/2000 Pharmaziepraktikant in der Apotheke am Lustnauer Tor in Tübingen
05/2000 Approbation als Apotheker

Berufliche Tätigkeit:

07/2000 – 03/2005 Anfertigen der Doktorarbeit mit dem Titel **„Elektrophysiologische Untersuchungen an rekombinanten kardiovaskulären K_{ATP} -Kanälen: Effekte von Nukleotiden, neuartigen K_{ATP} -Kanalöffnern und Blockern“** unter der Anleitung von Herrn Prof. Ulrich Quast und Frau Prof. Gisela Drews am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen