

**Aus dem Department für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie**

**Abteilung Pharmakologie und Experimentelle Therapie**

**Leiter: Professor Dr. Dr. B. Nürnberg**

**Auswirkung des konservativen Aminosäureaustauschs  
Lysin gegen Arginin in den Nukleotidbindungsfalten des  
Sulfonylharnstoffrezeptors SUR2B auf die Bindungseigenschaften**

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

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

**vorgelegt von  
Sophie Pauline Schell**

**aus  
Göppingen**

**2010**

Dekan: Professor Dr. I.B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. U. Quast

2. Berichterstatter: Professor Dr. F. Lang



# Inhaltsverzeichnis

|  |            |
|--|------------|
| <b>Inhaltsverzeichnis .....</b>  | <b>IV</b>  |
| <b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>   | <b>VII</b> |
| <b>1 Einleitung .....</b>  | <b>1</b>   |
| 1.1 ATP-empfindliche Kaliumkanäle .....  | 1          |
| 1.1.1 Aufbau und molekulare Struktur von $K_{ATP}$ -Kanälen .....                                | 2          |
| 1.1.2 Kir 6.x, die porenformende $\alpha$ -Untereinheit der $K_{ATP}$ -Kanäle .....              | 4          |
| 1.1.3 Der Sulfonylharnstoffrezeptor (SUR), die $\beta$ -Untereinheit der $K_{ATP}$ -Kanäle ..    | 5          |
| 1.1.4 Regulation der $K_{ATP}$ -Kanäle.....  | 8          |
| 1.2 Subtypen und Funktion der $K_{ATP}$ -Kanäle .....  | 13         |
| 1.2.1 Gewebsspezifische Expression und Verteilung der Untereinheiten der $K_{ATP}$ -Kanäle ..... | 13         |
| 1.2.2 Physiologische Rolle der $K_{ATP}$ -Kanäle .....   | 14         |
| 1.2.3 Pathophysiologie der $K_{ATP}$ -Kanäle.....  | 17         |
| 1.3 Pharmakologie der $K_{ATP}$ -Kanäle.....   | 21         |
| 1.3.1 $K_{ATP}$ -Kanal-Inhibitoren .....   | 21         |
| 1.3.2 $K_{ATP}$ -Kanal-Öffner (KCO).....   | 27         |
| 1.4 Die Nukleotidbindungsfalten.....   | 30         |
| 1.4.1 Walker A- und Walker B-Motiv.....  | 31         |
| 1.4.2 Die Mutation KR-KR.....  | 32         |
| 1.5 Fragestellung der Arbeit .....   | 33         |
| <b>2 . Material und Methoden .....</b>   | <b>35</b>  |
| 2.1 Übersicht.....   | 35         |
| 2.2 Chemikalien .....  | 36         |
| 2.3 Puffer.....  | 37         |
| 2.4 HEK293-Zellen.....   | 43         |
| 2.4.1 Kultivierung der Zellen .....  | 43         |
| 2.4.2 Auftauen.....  | 44         |
| 2.4.3 Einfrieren (Kryokonservierung).....  | 44         |
| 2.4.4 Transfektion .....   | 45         |
| 2.4.5 Herstellung einer mikrosomalen Membranfraktion .....                                       | 46         |
| 2.5 Proteinbestimmung .....  | 47         |

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| 2.6      | Technik und Durchführung der Radioligand-Rezeptor-Bindungsversuche („Bindungsversuch“)   | 49        |
| 2.6.1    | Übersicht  | 49        |
| 2.6.2    | Gewinnung von Rezeptormaterial   | 49        |
| 2.6.3    | Inkubation   | 50        |
| 2.6.4    | Trennung von freiem und gebundenem Radioliganden   | 51        |
| 2.6.5    | Messung der Radioaktivität   | 51        |
| 2.7      | Mathematische Beschreibung der Rezeptorbindungsstudien   | 52        |
| 2.7.1    | Kompetitionsexperiment   | 54        |
| 2.7.2    | Verallgemeinerung der Bindungsisotherme nach Hill  | 56        |
| 2.8      | Datenauswertung und Statistik  | 57        |
| 2.8.1    | Analyse der Bindungskurven   | 57        |
| 2.8.2    | Statistik  | 58        |
| <b>3</b> | <b>Ergebnisse</b>  | <b>60</b> |
| 3.1      | Verdrängung der $^3\text{H}$ -GBC Bindung an SUR2B(YS) und SUR2B(YS)KRKR durch GBC in Abwesenheit von MgATP  | 60        |
| 3.2      | Wirkung von MgATP auf die $^3\text{H}$ -GBC Bindung an SUR2B(YS) und SUR2B(YS)KRKR   | 62        |
| 3.3      | Verdrängung der $^3\text{H}$ -GBC Bindung an SUR2B(YS) und SUR2B(YS)KRKR durch GBC in der Anwesenheit von MgATP  | 65        |
| 3.4      | Hemmung der $^3\text{H}$ -GBC Bindung an SUR2B(YS) und SUR2B(YS)KRKR durch den Öffner P1075 in der Abwesenheit von MgATP   | 67        |
| 3.5      | Hemmung der $^3\text{H}$ -GBC Bindung an SUR2B(YS) und SUR2B(YS)KRKR durch P1075 in der Anwesenheit vom MgATP  | 69        |
| <b>4</b> | <b>Diskussion</b>  | <b>72</b> |
| 4.1      | Übersichtstabelle über alle Ergebnisse dieser Arbeit   | 72        |
| 4.2      | Vergleich der $^3\text{H}$ -GBC Bindung zwischen SUR2B(YS) und SUR2B(YS)KRKR in der Abwesenheit von MgATP  | 73        |
| 4.3      | Wirkung von MgATP auf die $^3\text{H}$ -GBC Bindung an SUR2B(YS) und SUR2B(YS)KRKR   | 73        |
| 4.4      | Vergleich der $^3\text{H}$ -GBC Bindung an SUR2B(YS) und SUR2B(YS)KRKR in der Anwesenheit von MgATP und Vergleich mit den Ergebnissen in der Abwesenheit von MgATP | 75        |
| 4.4.1    | SUR2B(YS)  | 75        |
| 4.4.2    | SUR2B(YS)KRKR  | 76        |

|          |   |            |
|----------|---|------------|
| 4.5      | Vergleich der Hemmung der <sup>3</sup> H-GBC Bindung an SUR2B(YS) und SUR2B(YS)KRKR durch den Öffner P1075 in der Abwesenheit und Anwesenheit von MgATP ..... | 77         |
| <b>5</b> | <b>Zusammenfassung</b> .....  | <b>80</b>  |
|          | <b>Literaturverzeichnis</b> .....   | <b>82</b>  |
|          | <b>Danksagung</b> .....   | <b>103</b> |
|          | <b>Lebenslauf</b> .....   | <b>104</b> |

## Abkürzungsverzeichnis

|                         |  |
|-------------------------|--|
| $^3H$                   | Tritium  |
| <i>a</i>                | Amplitude  |
| Å                       | Ångström   |
| <i>Abb</i>              | Abbildung  |
| <i>ABC</i>              | ATP-Bindungs-Kassette (ATP-binding-cassette)   |
| <i>ADP</i>              | Adenosindiphosphat (MgADP für magnesiumgebundenes ADP)                                 |
| <i>Aqua Bidest</i>      | bidestilliertes Wasser   |
| <i>Aqua dest</i>        | demineralisiertes Wasser   |
| <i>Arg</i>              | Arginin  |
| <i>AS</i>               | Aminosäure   |
| <i>ATP</i>              | Adenosintriphosphat  |
| $B_{max}$               | maximale Bindungskapazität   |
| $B_s$                   | spezifische Bindung  |
| $B_{tot}$               | totale Bindung   |
| <i>BMI</i>              | body mass index  |
| <i>BSA</i>              | Rinderserumalbumin   |
| <i>C</i>                | Ein-Buchstaben-Symbol für die Aminosäure Cystein                                       |
| <i>C (als Variable)</i> | Rezeptor-Ligand-Komplex  |
| $Ca^{2+}$               | zweifach positiv geladenes Calciumion  |
| <i>Camp</i>             | zyklisches Adenosinmonophosphat  |
| <i>Cdna</i>             | copy DNA = DNA-Kopie eines RNA-Stücks; erhalten mit Hilfe einer Reversen Transkriptase |
| <i>C-Terminus</i>       | Carboxy-Terminus eines Proteins  |
| <i>CL</i>               | zytosolische Schleife (cytosolic Loop)   |
| <i>Ci</i>               | Curie (Einheit der spezifischen Aktivität eines radioaktiven Stoffes)                  |
| <i>cpm</i>              | counts per minute  |
| <i>DEND</i>             | developmental delay, epilepsy and diabetes   |
| <i>DMSO</i>             | Dimethylsulfoxid   |
| <i>dpm</i>              | Zerfälle pro Minute  |

|                                     |  |
|-------------------------------------|--|
| <i>E</i>                            | Ein-Buchstaben-Symbol für die Aminosäure Glutamat                                      |
| <i>E<sub>k</sub></i>                | Gleichgewichtspotential für K <sup>+</sup>   |
| <i>EDTA</i>                         | Ethylendiamintetraacetat   |
| <i>EGTA</i>                         | Ethylenglycol-bis-(2-Aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat                            |
| <i>ER</i>                           | Endoplasmatisches Retikulum  |
| <i>F</i>                            | Ein-Buchstaben-Symbol für die Aminosäure Phenylalanin                                  |
| <i>FBS</i>                          | Fetales Rinderserum (Fetal Bovine Serum)   |
| <i>GCK</i>                          | Glukokinase  |
| <i>GDH</i>                          | Glutamatdehydrogenase  |
| <i>G</i>                            | Ein-Buchstaben-Symbol für die Aminosäure Glycin  |
| <i>H</i>                            | Ein-Buchstaben-Symbol für die Aminosäure Histidin                                      |
| <i>I (als Variable)</i>             | Inhibitor  |
| <i>I</i>                            | Ein-Buchstaben-Symbol für die Aminosäure Isoleucin                                     |
| <i>IC<sub>50</sub></i>              | Konzentration eines Liganden, welche die halbmaximale Bindung / Wirkung zeigt          |
| <i>IPC</i>                          | Ischämische Präkonditionierung des Myokards  |
| <i>IONA</i>                         | Impact of Nicorandil in Angina (IONA)-Studie   |
| <i>HEK293</i>                       | humane embryonale Nierenzellen ( <u>H</u> uman <u>E</u> mbryonal <u>K</u> idney cells) |
| <i>HEPES</i>                        | N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N-(2-ethansulfonsäure)                                     |
| <i>HI</i>                           | kongenitaler Hyperinsulinismus im Kindesalter  |
| <i>HWZ</i>                          | Halbwertszeit  |
| <i>K</i>                            | Ein-Buchstaben-Symbol für die Aminosäure Lysin   |
| <i>K<sup>+</sup></i>                | positiv geladenes Kaliumion  |
| <i>K<sub>+</sub>; K<sub>-</sub></i> | Assoziations-; Dissoziationsgeschwindigkeit  |
| <i>K<sub>ATP</sub></i>              | ATP-empfindlicher Kaliumkanal  |
| <i>K<sub>Ca</sub></i>               | Ca <sup>2+</sup> aktivierter Kaliumkanal   |
| <i>K<sub>D</sub>, K<sub>i</sub></i> | Gleichwerts- Dissoziationskonstante, Gleichgewichtsinhibitionskonstante                |
| <i>K<sub>ir</sub></i>               | einwärts gleichrichtender Kaliumkanal (inward rectifying K <sup>+</sup> -channel)      |

|                         |  |
|-------------------------|--|
| <i>K<sub>v</sub></i>    | spannungsabhängiger Kaliumkanal (voltage dependent K <sup>+</sup> -channel)  |
| <i>Kap.</i>             | Kapitel  |
| <i>kb</i>               | kilo-Basen   |
| <i>KCO</i>              | K <sub>ATP</sub> -Kanal-Öffner   |
| <i>kDa</i>              | Kilo-Dalton  |
| <i>L</i>                | freie Ligandenkonzentration  |
| <i>L<sub>0</sub>*</i>   | Konzentration des Radioliganden im Inkubationsansatz   |
| <i>L<sub>frei</sub></i> | Konzentration des freien (= ungebundenen) Liganden   |
| <i>LB-Medium</i>        | Luria Bertani Medium   |
| <i>LC-Acyl-CoA</i>      | langkettiger Acyl-Coenzym A Ester  |
| <i>L-VOCC</i>           | voltage operated calcium channels  |
| <i>mdr</i>              | multidrug resistance protein   |
| <i>MEM</i>              | Minimal Essential Medium   |
| <i>Mg<sup>2+</sup></i>  | zwei-fach positiv geladenes Magnesiumion   |
| <i>MODY</i>             | Maturity-onset diabetes of the young   |
| <i>N</i>                | Ein-Buchstaben-Symbol für die Aminosäure Asparagin   |
| <i>NO</i>               | Stickstoffmonoxid  |
| <i>n</i>                | Anzahl der Einzelversuche  |
| <i>n<sub>H</sub></i>    | Hill-Koeffizient   |
| <i>N-Terminus</i>       | Amino-Terminus eines Proteins  |
| <i>NBF</i>              | Nukleotid-Bindungsfalte eines ABC-Proteins   |
| <i>NIDDM</i>            | Nichtinsulinabhängiger Diabetes Mellitus (Typ 2)   |
| <i>NSB</i>              | unspezifische Bindung  |
| <i>OD<sub>770</sub></i> | optische Dichte (Extinktion) bei einer Wellenlänge des Lichtes von 770nm   |
| <i>P1075</i>            | N-Cyano-N <sup>'</sup> -(1,1Dimethylpropyl)-N <sup>'</sup> -3-pyridylguanidin  |
| <i>pH</i>               | potentia hydrogenii (= negativer dekadischer Logarithmus der Oxoniumionenkonzentration)                                    |
| <i>PHHI</i>             | Persistierende hyperinsulinämische Hypoglykämie des Kindesalters   |
| <i>Pi</i>               | Phosphat   |
| <i>PIP<sub>2</sub></i>  | (C <sub>47</sub> H <sub>94</sub> N <sub>3</sub> O <sub>19</sub> P <sub>3</sub> ) L-α-Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate |

|                         |  |
|-------------------------|--|
| <i>pK<sub>s</sub></i>   | negativer, dekadischer Logarithmus der Säurekonstante  |
| <i>PNDM</i>             | Permanenter Neonataler Diabetes  |
| <i>Q</i>                | Ein-Buchstaben-Symbol für die Aminosäure Glutamin  |
| <i>R</i>                | Ein-Buchstaben-Symbol für die Aminosäure Arginin   |
| <i>R (als Variable)</i> | freie Rezeptorkonzentration  |
| <i>RT</i>               | Raumtemperatur   |
| <i>S</i>                | Ein-Buchstaben-Symbol für die Aminosäure Serin   |
| <i>SEM</i>              | Standard Error of the Mean   |
| <i>Ser</i>              | Serin  |
| <i>SH</i>               | Thiolgruppe  |
| <i>SKM</i>              | Standard-Kulturmedium für HEK293-Zellen  |
| <i>SU</i>               | Sulfonylharnstoff (Sulfonylurea)   |
| <i>SUR</i>              | Sulfonylharnstoffrezeptor  |
| <i>SUR2B(YS)</i>        | Mutation des SUR2B, an dem die Aminosäure Tyrosin an der Stelle 1206 durch Serin ersetzt wurde (bei der Maus)                        |
| <i>SUR2B(YS) KRRR</i>   | Mutation des SUR2B(YS), an dem die Aminosäure Lysin jeweils an den Stellen 707 und 1348 durch Arginin ersetzt wurden (bei der Ratte) |
| <i>TM</i>               | Transmembranhelix  |
| <i>TMD</i>              | Transmembrandomäne   |
| <i>TRIS</i>             | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan   |
| <i>VOCC</i>             | voltage operated calcium channels  |
| <i>WT</i>               | Wildtyp  |
| <i>Y</i>                | Ein-Buchstaben-Symbol für die Aminosäure Tyrosin   |
| <i>y</i>                | % B <sub>s</sub>   |
| <i>ZSM</i>              | Zellkultur Standard Medium   |

# 1 Einleitung

## 1.1 ATP-empfindliche Kaliumkanäle

Ionenkanäle sind Transportproteine, die in die Zellmembran eingebaut sind, um es Ionen wie z.B.  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  oder  $\text{Cl}^-$  zu ermöglichen, die Lipiddoppelschicht zu passieren. Für die verschiedenen Ionen gibt es spezifische Ionenkanäle. Sind die Ionenkanäle geöffnet, erlauben diese einen selektiven Ionenfluss mit hohen Flussraten ( $\cong 10^9$  Ionen / s). Die Flussrate wird durch den elektrochemischen Gradienten bestimmt, der zwischen Zytosol und Extrazellulärraum herrscht. Durch das Ermöglichen von Ionenströmen, haben die Ionenkanäle eine wichtige Aufgabe sowohl bei der Aufrechterhaltung des Membranruhepotentials als auch bei der Erregung von erregbaren Zellen, z.B. bei der Steuerung der Funktion endokriner Zellen, etwa der insulinsezernierenden  $\beta$ -Zellen des Pankreas.

Kaliumkanäle kommen in allen Zellen vor. Dabei handelt es sich um eine sehr heterogene Gruppe (über 70 Typen sind bekannt). Die Aufgabe der Kaliumkanäle ist die Stabilisierung des Membranpotentials möglichst nahe des Gleichgewichtspotentials für Kaliumionen ( $E_K$  bei  $37^\circ\text{C} = -98 \text{ mV}$ ). Dabei können die Kaliumkanäle durch eine Änderung des Membranpotentials, durch Transmitter und Hormone oder durch den metabolischen Zustand der Zelle reguliert werden (Hille, 2001).

Allgemein sind Kaliumkanäle Multimere aus zwei Typen von Untereinheiten, den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten. Durch den unterschiedlichen Aufbau der porenbildenden  $\alpha$ -Untereinheiten können Kaliumkanäle in vier Hauptfamilien unterteilt werden (Salkoff und Jegla, 1995; Gutman et al. 2003):

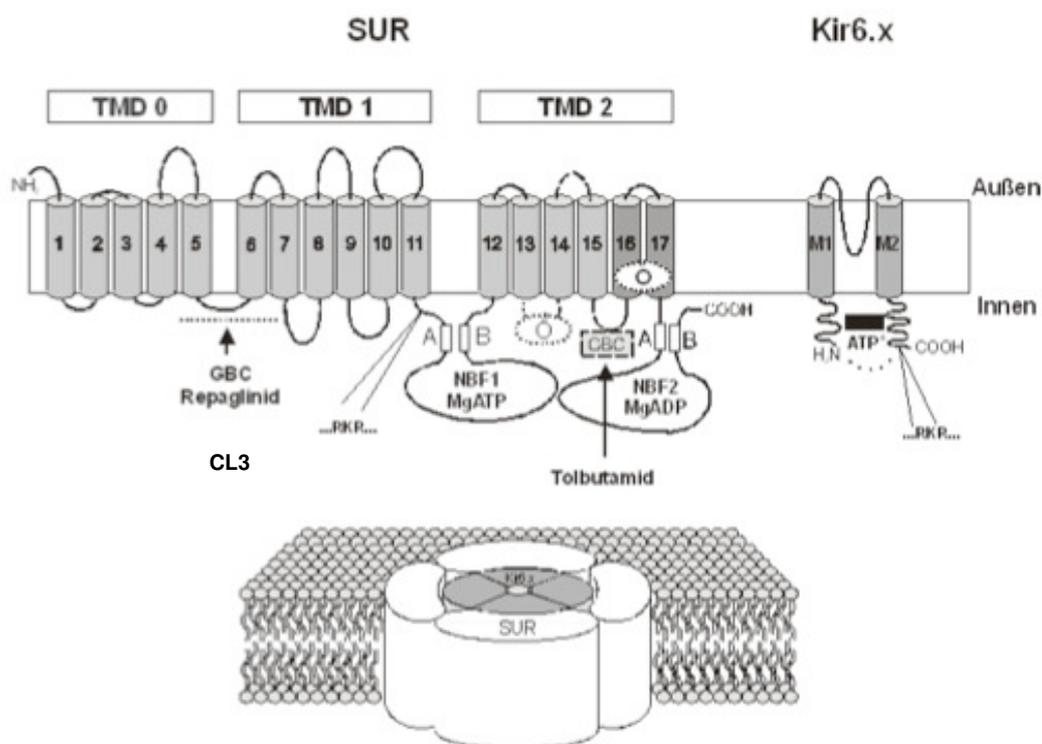
1. Einwärtsgleichrichtende Kaliumkanäle ( $\text{Kir}$ )
2. spannungsabhängige Kaliumkanäle ( $\text{Kv}$ )
3.  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierte Kaliumkanäle ( $\text{IK}_{\text{Ca}}$ ,  $\text{SK}_{\text{Ca}}$  oder  $\text{BK}_{\text{Ca}}$ )
4. Tandem-Kaliumkanäle ( $\text{K}_{2\text{P}X}$ )

An den  $\alpha$ -Untereinheiten können sogenannte regulatorische  $\beta$ -Untereinheiten assoziiert sein (siehe Kap. 1.1). In dieser Arbeit wurde die  $\beta$ -Untereinheit SUR2B(YS) untersucht, die am Aufbau der ATP-empfindlichen  $\text{K}^+$ -Kanäle ( $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanäle) beteiligt

ist und bei der die Aminosäure Tyrosin 1206 durch Serin ersetzt wurde (Hambrock et al., 2001).

### 1.1.1 Aufbau und molekulare Struktur von $K_{ATP}$ -Kanälen

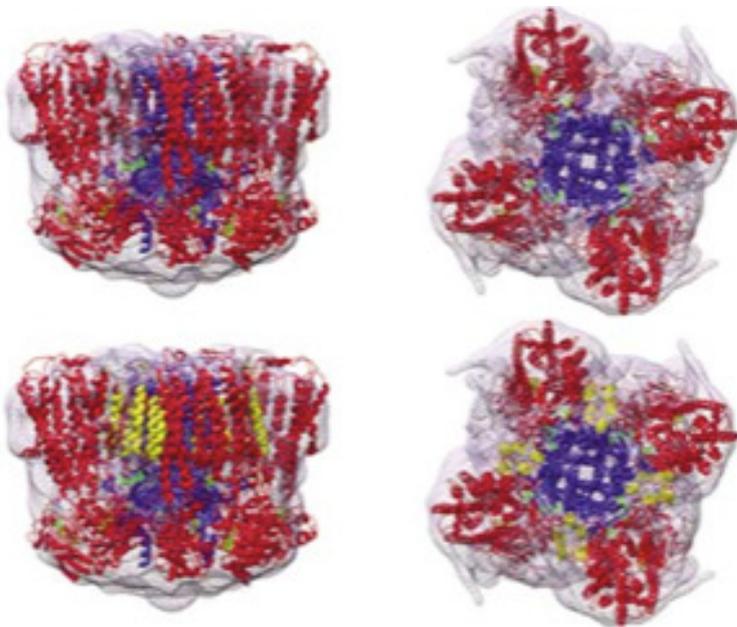
Bei den  $K_{ATP}$ -Kanälen handelt es sich um Heterooktamere, die aus vier Porenformenden (Kir6.x) und vier regulatorischen Untereinheiten (SURx / Sulfonylharnstoffrezeptor) aufgebaut sind (Clement et al., 1997) (Abb. 1).



**Abbildung 1:** Schema des Aufbaus und der Struktur des  $K_{ATP}$ -Kanals

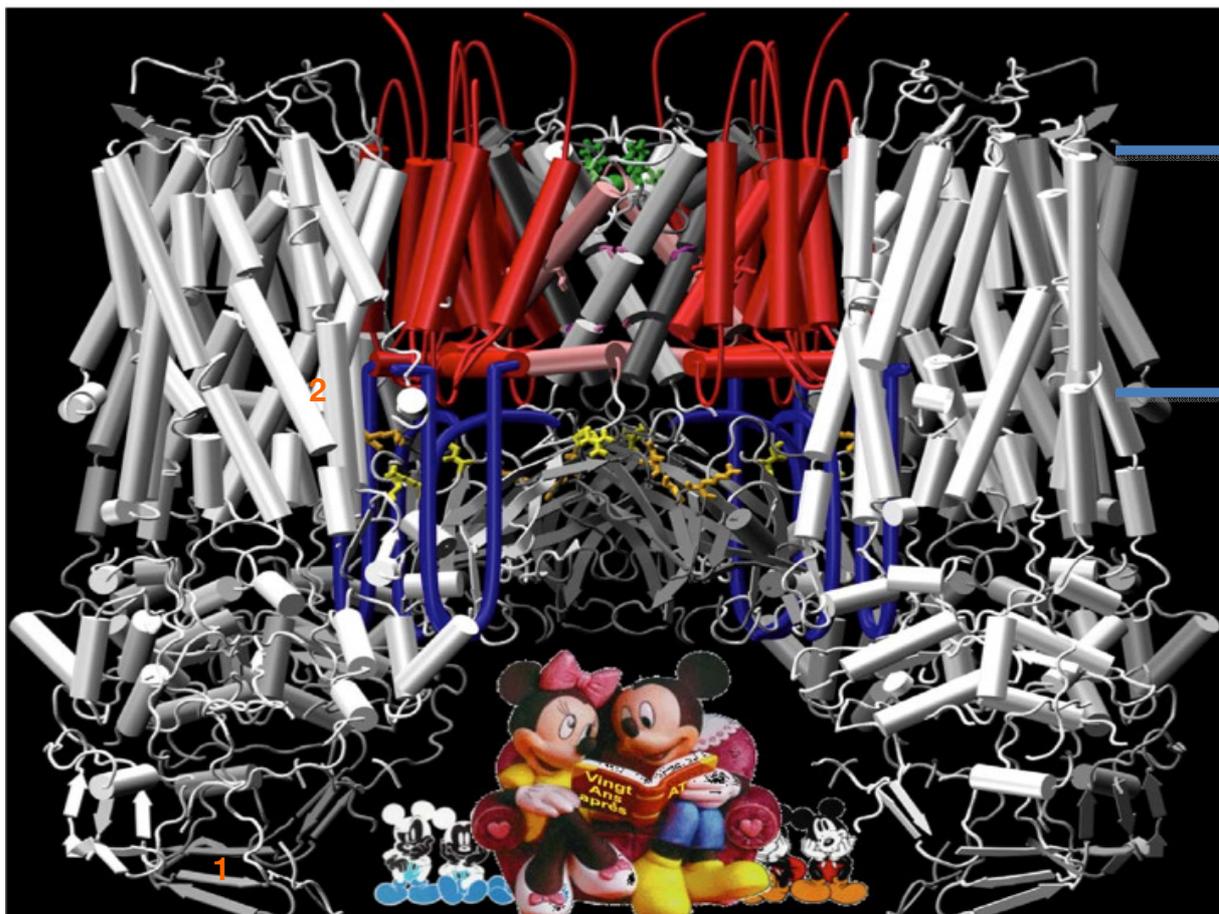
Funktionell wichtige Strukturen: TMD = Transmembrandomäne; M1, M2 = Transmembranhelices des Kir6.x; 1-17 = Transmembranhelices des SUR; NBF = Nukleotidbindungsfalten; A,B = Walker A- und B-Motiv; RKR = Retentionsmotiv; Ö = Öffnerbindungsstellen; GBC, Repaglinid, Tolbutamid, ATP, MgATP, MgADP = Bindungsstellen für die jeweiligen Substanzen

Sie besitzen eine relative Molekülmasse von ca. 950 kDa. Bei dem gesamten Kanal handelt es sich um eine komplexe Molekülstruktur mit einem Durchmesser von 18 nm und einer Höhe von ca. 13 nm (Mikhailov et al., 2005; siehe auch Abbildung 2).



**Abbildung 2:**

Eingliederung der molekularen Modelle in die 3-D-Struktur. Seitenansicht und Aufsicht der Dichte der Elektronenmikroskopaufnahme mit Kir (blau), SUR ohne TMD0 (rot) und TMD0 (gelb), die schrittweise eingefügt wurden. ATP-Moleküle sind grün eingezeichnet. (Aus Mikhailov et al., 2005)



Membran

**Abbildung 3: strukturelles Modell der Quartärstruktur des  $K_{ATP}$ -Kanal (nach Babenko et al., 2005)** Hierbei handelt es sich um ein gutes Modell zur Studie der Signaltransduktion innerhalb des Kanals. **1** = Region der NBF; **2** = Region, in der sich das Tyrosin-Molekül für die GBC-Bindung befindet

Vier  $\alpha$ -Untereinheiten, aus der schwach einwärtsgleichrichtenden Familie Kir6.x, bilden eine Pore des Kaliumkanals. Jedes Kir6.x ist mit einer viel größeren SUR Untereinheit verbunden (Clement et al., 1997). In der Arbeitsgruppe um Mikhailov konnte zum ersten Mal mittels Elektronenmikroskop die 3-D-Struktur des  $K_{ATP}$ -Kanals festgestellt werden (Auflösung ca. 18 Å; Abbildung 2). Dabei wurde die enge Interaktion sowohl der zytosolischen als auch der transmembranären Bereiche von SUR und Kir bestätigt (Mikhailov et al., 2005), wie es schon in anderen Interaktionsstudien vermutet wurde (Gibblin et al., 1999; Mikhailov et al., 2000; Schwappach et al., 2000; Babenko und Bryan, 2002; Chan et al., 2003; Bryan et al., 2004; Rainbow et al., 2004); was auch in Abbildung 3 dargestellt wird.

Unvollständige Kanalkomplexe können nicht in die Membran eingebaut werden, da dies durch das ER-Retentionsmotiv –RKR- verhindert wird. Dieses Motiv befindet sich sowohl an der Kir6.x- als auch an der SUR-Sequenz (Zerangue et al., 1999). Werden beide Untereinheiten zusammen exprimiert, werden die Retentionsmotive maskiert und der Komplex kann eingebaut werden.

Am C-Terminus verkürzte Kir6.x ( $\Delta C36, \Delta C26$ ) können auch ohne die SUR-Untereinheit funktionsfähige Kanäle bilden (Tucker et al., 1997).

Es besteht die Vermutung, dass SUR2B – Untereinheiten auch in der Abwesenheit von Kir6.x Tetrameren-Komplexe bilden können (Hambrock et al., 2001; Löffler-Walz et al., 2002; Winkler et al., in Bearbeitung). Dies konnte für SUR1 durch Gel-filtrationen schon gezeigt werden (de Wet et al., 2007a)

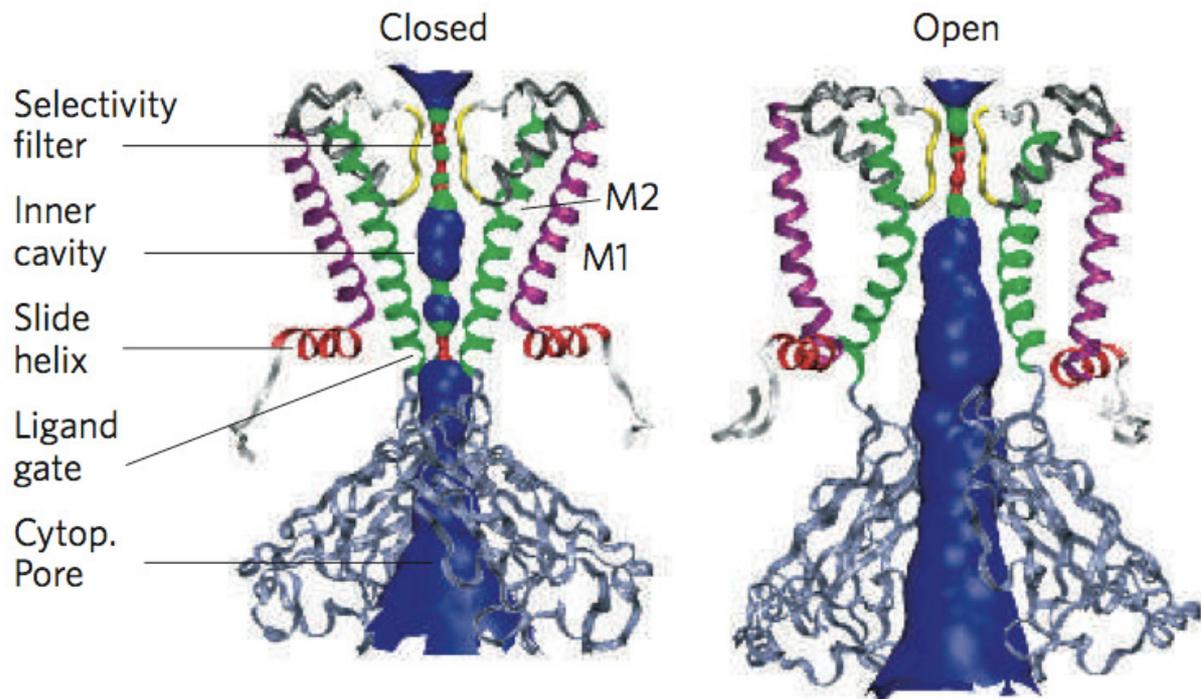
### 1.1.2 Kir 6.x, die porenformende $\alpha$ -Untereinheit der $K_{ATP}$ -Kanäle

Die Pore des  $K_{ATP}$ -Kanals wird durch vier Kir6.x-Untereinheiten gebildet. Typischerweise verfügen diese Untereinheiten jeweils über 2 Transmembranhelices TM1 und TM2, die über die so genannte P-Schleife (H5) verbunden sind. Der C- und der N-Terminus befinden sich im Zytosol. Der Selektivitätsfilter für  $K^+$  ist beim Kir6.x –GFG- (Seino, 1999).

Bisher liegen nur niedrig auflösende Strukturen des  $K_{ATP}$ -Kanals und damit des Kir6.x vor (Mikhailov et al., 2005). Demzufolge kleiden die TM2-Helices die Außenseite der Pore trichterförmig aus. Auf der zytosolischen Seite ist die Porenöffnung

verengt und es wird angenommen, dass die Bewegungen der TM2-Helices für die Öffnung und Schließung der Pore verantwortlich sind (Loussouarn et al., 2001, Nichols, 2006).

Beim Menschen sind zwei Subtypen bekannt: Kir6.1 und Kir6.2.



**Abbildung 4:** Modellhaft dargestellte einwärtsgerichtete Kir-Untereinheit, in zwei möglichen Zuständen: geschlossen und offen. Die Transmembranhelix TM2 (grün) klappt um das Glycin im Zentrum des Segments, um den Eingang zum inneren Hohlraum zu öffnen. Der blaue Bereich gibt den freien Zugang von Wasser wieder. Der Kanal ist im roten Bereich geschlossen (linkes Bild), in dem nicht genug Platz ist, um Wassermoleküle passieren zu lassen. Abbildung aus Kuo et al., „two different conformational states of the KirBac3.1 potassium channel revealed by electron crystallography“ (2005).

### 1.1.3 Der Sulfonylharnstoffrezeptor (SUR), die $\beta$ -Untereinheit der $K_{ATP}$ -Kanäle

Die Sulfonylharnstoffrezeptoren regulieren die  $K_{ATP}$ -Kanäle und gehören, wie z.B. das MDR (Multidrug Resistance Protein), zu der Familie der ATP-bindenden Kasettenproteinen (ABC-Proteine; ATP-binding cassette; Higgins et al, 1992; 1995; Holland und Blight, 1999). Diese wird als eine der größten Proteinfamilien angesehen, wenn nicht sogar die größte für den selektiven Transport von Substanzen durch

Biomembranen (Young und Holland, 1999). Allen Mitgliedern dieser Familie ist eine Grundstruktur gemein. Eine dieser Struktureinheiten ist aus zwei Teilen aufgebaut: der hydrophoben Transmembrandomäne (TMD) und einer zytoplasmatisch liegenden Nukleotidbindungsfalte (NBF). Typisch für funktionsfähige ABC-Proteine ist das Vorliegen von jeweils zwei NBFs sowie zwei TMDs. Auch am SUR findet man die besagten zwei NBFs und sogar - unüblich für ABC-Proteine - drei TMDs (siehe Abb.1). Was den SUR zusätzlich von anderen ABC-Proteinen unterscheidet ist, dass die ATPase-Aktivität nicht für den Transport von Substanzen genutzt wird (Gadsby et al., 1995), sondern für die Modulation des Gatings der Kir6.x-Pore (Nichols, 2006).

Man unterscheidet zwei Isoformen des SURs: SUR1 und SUR2 (Inagaki et al., 1996; Isomoto et al., 1996), die eine 67%ige Sequenzhomologie aufweisen (Ashcroft und Gribble, 2000). Von SUR2 existieren zwei Spleißvarianten: SUR2A und SUR2B. Diese unterscheiden sich nur in den 42 C-terminalen Aminosäuren (Inagaki et al., 1996, Isomoto et al. 1996). Der C-Terminus des SUR2B ähnelt dem des SUR1 mehr (74%ige Sequenzhomologie) als der entsprechenden Region des SUR2A (33% Homologie, Ashcroft und Gribble, 2000).

In Abbildung 1 ist das Modell der molekularen Struktur des SUR aufgeführt, das von Tusnady et al., 1997 vorgeschlagen wurde und heute noch Gültigkeit besitzt. Die SUR-Untereinheit besitzt 17 Transmembranhelices, die in Gruppen von 5, 6 und 6 - ausgehend vom extrazellulär liegenden N-Terminus - angeordnet sind. Diese Gruppen werden als Transmembrandomänen bezeichnet. Unüblich für ABC-Proteine finden sich am SUR also drei TMDs. Zwischen TMD0 und TMD1 befindet sich auf zytosolischer Seite eine Schleife (Schleife Nr. 3 / CL3), die an der Sulfonylharnstoffbindung mitwirkt (Mikhailov et al., 2001), gleichzeitig mit dem N-Terminus des Kir6.2 interagiert und damit am Öffnen und Schließen (Gating) der Pore beteiligt ist (Babenko und Bryan, 2002; Chan et al., 2003). Am Ende von TMD1 und TMD2 liegen jeweils intrazellulär die Nukleotidbindungsfalten NBF<sub>1</sub> und NBF<sub>2</sub>, an diese grenzt der intrazellulär liegende C-Terminus an. Die NBFs 1 und 2 sind für die Bindung und Hydrolyse der Nukleotide zuständig (SUR1: Ueda et al., 1999; SUR2: Bienengraeber et al., 2000; Zingman et al., 2001; Masia et al., 2005; Überblick über ABC-Transporter: Higgins und Linton, 2004; CFTR: Vergani et al., 2005).

SUR gehört zu den ABC (ATP-binding-casette) Proteinen (Higgins und Linton, 2004). Typisch dafür ist das Vorhandensein von sechs Transmembransegmenten, gefolgt von einer intrazellulären Nukleotidbindungsfalte, die das unter den ABC Proteinen hochkonservierte Walker A (Siehe Kap. 1.5.1) und Walker B (siehe Kap. 1.5.2) Motiv aufweisen, sowie das ABC-Signaturmotiv (=Linkersequenz) (siehe Kap.1.5.3). Außerdem liegen die invarianten Aminosäuren Glutamin und Histidin vor (Q-Loop und H-Loop).

SUR unterscheidet sich von den anderen ABC Proteinen, da es keine bekannte Transportfunktion besitzt (Gadsby et al., 1995), obwohl es die regulatorische Untereinheit eines Ionenkanals ist. Anstatt dessen beeinflusst die Interaktion der Mg-Nukleotide mit den Nukleotidbindungsfalten des SUR1 das Gating des Kir6.2 und trägt dadurch zur metabolischen Steuerung der Zelle bei (Tucker et al., 1997, Babenko und Bryan, 2001; Zingman et al., 2001; Bryan et al., 2004; Winkler et al., 2009).

Die Quartärstruktur des SUR ist bis heute noch nicht vollständig geklärt. Erst durch die schon erwähnte 3-D-Struktur von Kir6.2/SUR1 (Mikhailov et al., 2005; siehe Abbildung 2) konnten, trotz geringer Auflösung (18 Å), Vorlagen für die Anpassung und den Vergleich bekannter Modelle erstellt werden.

Unter anderem wurde in dieser Arbeit die Hypothese bekräftigt, dass sich die NBFs einer Untereinheit bei Nukleotidbindung aufeinander zu bewegen, während sie in der Abwesenheit der Nukleotide voneinander entfernt sind (Locher et al., 2002; Chen et al., 2003; Higgins und Linton, 2004; Reyes und Chang, 2005). Man geht davon aus, dass die räumliche Nähe der NBFs benachbarter Untereinheiten auch zu einer strukturellen und funktionellen Einflussnahme führen.

Nach dem Modell von Mikhailov et al., 2005 wird TMD0 neben die M1-Helix des Kir6.2 positioniert, wodurch die Vermutungen anderer Studien (Babenko und Bryan, 2002) bestätigt werden. Gemeinsam mit der oben genannten Nähe von CL3 des SURs und dem N-Terminus des Kir6.2 dient diese enge Nachbarschaft nicht nur der Stabilisierung des Kanalkomplexes, sondern auch der funktionellen Kopplung der Pore mit den regulatorischen Untereinheiten (Babenko und Bryan, 2002).

### 1.1.4 Regulation der $K_{ATP}$ -Kanäle

Es gibt verschiedene Liganden, die die  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität regulieren.

#### 1.1.4.1 ATP

Unter physiologischen Bedingungen liegt ATP ganz überwiegend in der Form des  $Mg^{2+}$ -Salzes als MgATP vor.

1. ATP (mit oder ohne  $Mg^{2+}$ ) schließt durch direkte Bindung an Kir6.2 den Kanal  
Ganz entscheidend wird die Kanalaktivität durch das intrazelluläre ATP / ADP-Verhältnis beeinflusst. Die Kanäle werden durch Interaktion von ATP oder ADP ( $ATP > ADP$ ) mit den porenbildenden Untereinheiten des Kir6.x geschlossen. Ein Indiz dafür ist die ATP-Hemmung der  $K^+$ -Kanäle, die nur aus C-terminal verkürzten Kir6.2-Untereinheiten bestehen ( $IC_{50}$  von ca. 100  $\mu M$ ; Tucker et al., 1997), sowie die Fotoaffinitätsmarkierung des Kir6.2 mit ATP-Analoga (Tanabe et al., 1999; Tanabe et al., 2000; Wang et al., 2002). Zwar können durch verschiedene Mutationsanalysen einzelnen Aminosäuren eine Beteiligung an der ATP-Bindung zugeschrieben werden, da jedoch noch keine Kristallstrukturen vorhanden sind, kann die Position der ATP-Bindungsstelle nur näherungsweise angegeben werden. In dem Modell von Antcliff et al., 2005 wird die Bindungsregion zwischen dem N- und C-Terminus benachbarter Kir6.2-Untereinheiten vermutet. Dabei geht man davon aus, dass die Kanalschließung mit der Interaktion zwischen dem C-Terminus der einen Untereinheit und der Gleithelix der benachbarten Untereinheit zusammenhängt (Antcliff et al., 2005). Da jede Kir-Untereinheit im  $K_{ATP}$ -Kanal-Komplex eine Bindungsstelle aufweist, hat der Komplex insgesamt vier Bindungsstellen (Markworth et al., 2000). Dabei reicht es aus, wenn nur eine Bindungsstelle besetzt ist, um den Kanal zu schließen (Dorschner et al., 1999).

Auch die SUR-Untereinheit hat einen Einfluss auf die ATP-Bindung am Kir: Sie erhöht zum einen die ATP-Empfindlichkeit des Kir6.2 um das 10-fache (Tucker et al., 1997), zum anderen scheint die  $\beta$ -Untereinheit, wie es in niedrigauflösenden Elektronenmikroskopaufnahmen zu sehen war, durch das Aufweisen einer Spalte zwischen zwei SUR-Untereinheiten den Zugang des ATPs zum Kir zu erleichtern (Mikhailov et al., 2005).

## 2. Die MgATP-Hydrolyse an NBF<sub>2</sub> öffnet den Kanal

Aber nicht nur die Kir-, sondern auch die SUR-Untereinheit spielt eine Rolle bei der Aktivierung des gesamten Kanals. MgADP zum Beispiel stimuliert den Kir6.2 / SUR1 Komplex. Durch Mutationen in den Walker A- oder Walker B-Motiven kann die Stimulation durch MgADP aufgehoben werden (Gribble et al., 1997; Shyng et al., 1997). Ferner kann MgATP nicht nur Kir6.2 / SUR, sondern auch die ATP-unempfindliche Mutante Kir6.2R50G / SUR1 aktivieren (Gribble et al., 1998). Diese beiden Tatsachen sprechen dafür, dass sowohl MgATP als auch MgADP durch Interaktion mit den NBFs des SURs die Kanäle öffnen können. Hierbei handelt es sich bei NBF<sub>1</sub> um die Mg<sup>2+</sup>-unabhängige, hochaffine Bindungsseite des ATPs (Ueda et al., 1997), während NBF<sub>2</sub> die Mg<sup>2+</sup>-abhängige, niedrigaffine Bindungsseite darstellt (Ueda et al., 1997; 1999). Bindet MgATP oder MgADP an NBF<sub>2</sub>, kommt es zu einer Verbesserung der ATP-Bindung an NBF<sub>1</sub> (Ueda et al., 1999). Diese Kooperativität zwischen den beiden NBFs ist für die Steuerung der Kanalaktivität von großer Bedeutung (Zingman et al., 2002).

Die K<sub>ATP</sub>-Kanäle weisen ATPase Aktivität auf (Mikhailov et al., 2005), die auch an isolierten SUR-NBFs nachgewiesen werden konnte (Ueda et al., 1999; Zingman et al., 2001; Masia et al., 2005; de Wet et al., 2007). An SUR1 wurden Bindungsversuche durchgeführt, bei denen zum einen die ATP-Bindung am ganzen Kanal (SUR1 / Kir6.2), an der alleinigen SUR1-Untereinheit, sowie nur an den einzelnen NBFs durchgeführt wurden (de Wet et al., 2007). Dabei wurde herausgefunden, dass am Kanalkomplex die Affinität zu ATP geringer und die Hydrolyse desselben schneller ist als an SUR1 alleine. Man geht davon aus, dass die höhere ATPase-Aktivität des K<sub>ATP</sub>-Kanalkomplexes auf eine Interaktion zwischen den SUR-Untereinheiten und / oder zwischen SUR- und Kir-Untereinheit, die zu Kooperativität führen und / oder auf ein Zusammenspiel der NBFs zurück zu führen ist (de Wet et al., 2007).

Allgemein ist die ATPase-Aktivität des SUR1 im Vergleich zu anderen ABC-Proteinen relativ gering. Man vermutet, dass der Grund dafür in der Aufgabe des Kanals liegt, und zwar, dass es sich hierbei um einen Regulator und nicht um einen Transporter handelt (de Wet et al., 2007).

Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass die ATP-Hydrolyse an SUR1 signifikant niedriger ist als an den isolierten NBFs von SUR1. De Wet et al., 2007 nehmen an, dass die Transmembrandomänen (TMD) des SUR eine Konformationsänderung in den NBFs hervorrufen, die die ATP-Bindung beeinflussen und dass diese Konformationsänderung durch Kir6.2 aufgehoben wird, da der  $K_m$  des gesamten Kanal-komplexes nicht signifikant verschieden ist, von dem der isolierten NBFs. Man weiß, dass sowohl die NBFs als auch die TMDs mit der Kir-Untereinheit interagieren (Mikhailov und Ashcroft, 2000; Mikhailov et al., 2000; Schwappach et al., 2000).

Im Vergleich der einzelnen Nukleotidbindungsfalten des SUR1 liegt kein signifikanter Unterschied vor (NBF<sub>1</sub>, NBF<sub>2</sub> und ein 1:1 Gemisch von NBF<sub>1</sub> und NBF<sub>2</sub>).

An SUR2A hingegen wurden Unterschiede der ATPase-Aktivität zwischen NBF<sub>1</sub> (220  $\mu$ M; Masia et al., 2005) und NBF<sub>2</sub> (370  $\mu$ M; Masia et al., 2005; bzw. 4.4 mM Bienengraeber et al., 2000) festgestellt.

Man fand heraus, dass ohne diese ATP-Hydrolyse keine Kanalaktivierung möglich ist (Zingman et al., 2001). Es wird davon ausgegangen, dass MgATP entweder direkt an NBF<sub>2</sub> bindet oder durch Hydrolyse von MgATP an NBF<sub>2</sub> entsteht. Die MgADP-Bindung bewirkt eine Konformationsänderung an NBF<sub>2</sub>, die wiederum eine Konformationsänderung an NBF<sub>1</sub> hervorruft, um die ATP-Bindung an NBF<sub>1</sub> zu stabilisieren (Matsuo et al., 2005). Die MgATP-Bindung an NBF<sub>2</sub> scheint essentiell zu sein, um den Kanal zu aktivieren. Da Zingman et al., 2001 feststellten, dass  $K_{ATP}$ -Kanäle im posthydrolytischen Zustand, in dem MgADP gebunden wird, geöffnet sind, schlugen Matsuo et al., 2005 folgendes Modell der Nukleotidbindung vor: Im aktivierten, also posthydrolytischen Zustand ist an NBF<sub>1</sub> ATP und an NBF<sub>2</sub> MgADP gebunden. Dabei dient der ATPase-Zyklus an NBF<sub>2</sub> als Sensor für den metabolischen Zustand der Zelle. Ist dieser gut (= hohe Phosphorylierungsrate von ADP) dissoziiert MgADP von NBF<sub>2</sub> und wird durch MgATP ersetzt. Dadurch wird der geschlossene Zustand des Kanals stabilisiert, da die ATP-Hydrolyse in diesem Fall schneller abläuft. Wenn aber der metabolische Zustand der Zelle abnimmt und damit auch die intrazelluläre MgADP-Konzentration ansteigt, verlangsamt sich die MgADP-Dissoziation an NBF<sub>2</sub>, die ATPase-Aktivität wird vermindert und dadurch geht der Kanal in den aktivierten (= posthydrolytischen / offenen) Zustand über.

Vergleicht man die einzelnen SUR-Subtypen miteinander stellt man deutliche Unterschiede im Nukleotidbindungsverhalten fest (Matsuo et al., 2005). Zum Beispiel bindet SUR1 ATP und ADP deutlich besser als SUR2A oder SUR2B. Hier wiederum weist SUR2B eine höhere Affinität zu ATP an NBF<sub>1</sub>, sowie eine höhere Affinität zu ADP an NBF<sub>2</sub> auf als SUR2A (Matsuo et al., 2000; Hambrock et al., 2002a).

Die ATP-Hydrolyse des SUR1 ist sehr wichtig für die metabolische Regulation des K<sub>ATP</sub>-Kanals (Mikhailov und Ashcroft, 2000) und in elektrophysiologischen Untersuchungen konnten sowohl MgATP, als auch MgADP die Kanalaktivität stimulieren (Nichols et al., 1996; Gribble et al., 1997; 1998; Tucker et al., 1997). Gegenwärtigen Anhaltspunkten zufolge ist es allerdings MgADP an NBF<sub>2</sub>, das den Kanal öffnet und MgATP muss zu MgADP hydrolysiert werden um eine Wirkung auf die Kanalaktivität zu haben (Zingman et al., 2001)

#### 1.1.4.2 PIP<sub>2</sub> und langkettige Fettsäure-Co-A-Ester

##### PIP<sub>2</sub> bestimmt den Arbeitspunkt (ATP-Empfindlichkeit) und die Möglichkeit sich zu öffnen

Neben den Nukleotiden spielen auch negativ geladene, langkettige Lipide eine wichtige Rolle bei der Regulation der K<sub>ATP</sub>-Kanäle. Dazu zählen zum Beispiel L- $\alpha$ -Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) oder Acyl-Coenzym A Ester (LC-Acyl-CoA). Sie verändern die ATP-Empfindlichkeit eines K<sub>ATP</sub>-Kanals, dadurch, dass sie an Kir6.2 in enger Nachbarschaft zu der ATP-Bindungsregion binden (Enkvetchakul und Nichols, 2003; Schulze et al., 2003, Trapp et al, 2003).

Dabei beruht die Regulation der K<sub>ATP</sub>-Kanäle durch PIP<sub>2</sub> auf der Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit derselben (Hilgemann und Ball, 1996), sowie der Senkung der ATP-Empfindlichkeit (Baukrowitz et al., 1998; Shyng und Nichols, 1998).

Auch LC-Acyl-CoA reduziert die ATP-Empfindlichkeit der K<sub>ATP</sub>-Kanäle (Gribble et al., 1998a; Liu et al., 2001) und koppelt somit das Membranpotential der Zelle an den Fettsäuremetabolismus.

Neben diesen Effekten heben Membranphospholipide und LC-Acyl-CoA die Wirkung der synthetischen K<sub>ATP</sub>-Kanalmodulatoren (GBC und KCO; siehe Kap. 1.2.4) auf (Koster et al., 1999; Krauter et al., 2001; Liu et al., 2001; Schulze et al., 2003;

Klein et al, 2005). Der Antagonismus zwischen ATP und den Lipiden wird vor allem auf allosterische Effekte zurückgeführt (Koster et al., 1999; Enkvetchakul und Nichols, 2003; Schulze et al., 2003).

#### 1.1.4.3 Weitere Modulationswege

$K_{ATP}$ -Kanäle können auch durch Phosphorylierung moduliert werden. Beispielsweise durch endogene Vasodilatoren (z.B. Adenosin, Calcitonin), die über Phosphorylierung durch die Proteinkinase A Kir6.1 / SUR2B-Kanäle der Gefäßmuskulatur aktivieren (Quinn et al., 2004). In anderen Studien konnte durch eine cAMP-erhöhende Substanz jedoch nur eine die Öffner-induzierte Kanalöffnung potenzierende bzw. eine geringe positiv-modulatorische Wirkung gefunden werden (Linde, Löffler und Quast, 1997/2; Ruß und Quast; unpublizierte Ergebnisse).

Im Gegensatz dazu hemmt die Proteinkinase C die Kir6.1 / SUR2B-Kanäle (Thorneloe et al., 2002). Dadurch bestimmt sie den Vasotonus durch Vasokonstriktion mit (Standen et al., 1989; Nelson und Quayle, 1995). An den sarkolemmal lokalisierten  $K_{ATP}$ -Kanälen von Kardiomyocyten (sarc $K_{ATP}$ -Kanäle) hingegen vermittelt die Proteinkinase C (zusammen mit Adenosin) die Öffnung derselben und gilt damit als essentiell in der ischämischen Präkonditionierung (Gross und Peart, 2003).

Im Bereich der SUR-Bindungsdomänen gibt es, nach der 3-D-Struktur von Mikhailov et al., 2005, einen Bereich, an den weitere Modulatorproteine binden können, wie zum Beispiel Kreatin-Kinase (Crawford et al., 2002b) Lactat-Dehydrogenase (Crawford et al., 2002a) oder Syntaxin (Cui et al., 2004).

Zusätzlich koppeln noch andere Proteine und Peptide wie G-Proteine (Sánchez et al., 1998) und Endosulfine (Heron et al., 1998) an eine der  $K_{ATP}$ -Kanalsubtypen und modulieren so deren Aktivität.

In Kapitel 1.2.4 wird noch auf die Wirkung der synthetischen Kanalmodulatoren eingegangen, die als synthetische Liganden durch Bindung an den SUR die Kanalaktivität modulieren.

## 1.2 Subtypen und Funktion der $K_{ATP}$ -Kanäle

### 1.2.1 Gewebsspezifische Expression und Verteilung der Untereinheiten der $K_{ATP}$ -Kanäle

In den verschiedenen Geweben liegen unterschiedliche Kombinationen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten vor.

Kir6.1 findet man vor allem im Gefäßmuskel, daneben in Herz-, Nebennieren- und Ovarialgewebe. Im Skelettmuskel, im Lungen-, Gehirn-, Magen-, Dickdarm-, Hoden-, Schilddrüsen-, und Pankreasgewebe kommt Kir6.1 seltener vor; in Niere, Leber, Dünndarm und Hypophyse wird Kir6.1 nur sehr wenig exprimiert. (Inagaki et al., 1995b).

Kir6.2 findet sich vor allem in den Inselzellen des Pankreas, im Gehirn, in Herz- und Skelettmuskulatur, sowie in der Lunge, Leber und glatten Muskulatur. Während in der Niere, dem Dün- und Dickdarm, in den Ovarien, in den Hoden, im Schilddrüsen- und Nebennierengewebe ein deutlich geringeres Vorkommen beschrieben wurde (Inagaki et al., 1995b).

SUR1 kommt vor allem in Neuronen, im Gehirn und in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas vor (Aguilar-Bryan et al., 1995). SUR2A hingegen findet man vor allem in Herz- und Skelettmuskel, dabei findet man SUR2B schwerpunktmäßig in der glatten Muskulatur (Inagaki et al., 1996; Isomoto et al., 1996, Chutkow et al., 1996; Chutkow et al., 1999).

Alle Untereinheiten lassen sich beliebig miteinander kombinieren und die entsprechenden Kanäle sind für bestimmte Gewebe typisch.

In Tabelle 1 sind die wichtigsten Kanalkombinationen mit ihrem typischen Expressionsgewebe aufgelistet.

**Tabelle 1:** Zusammensetzung der  $K_{ATP}$ -Kanäle

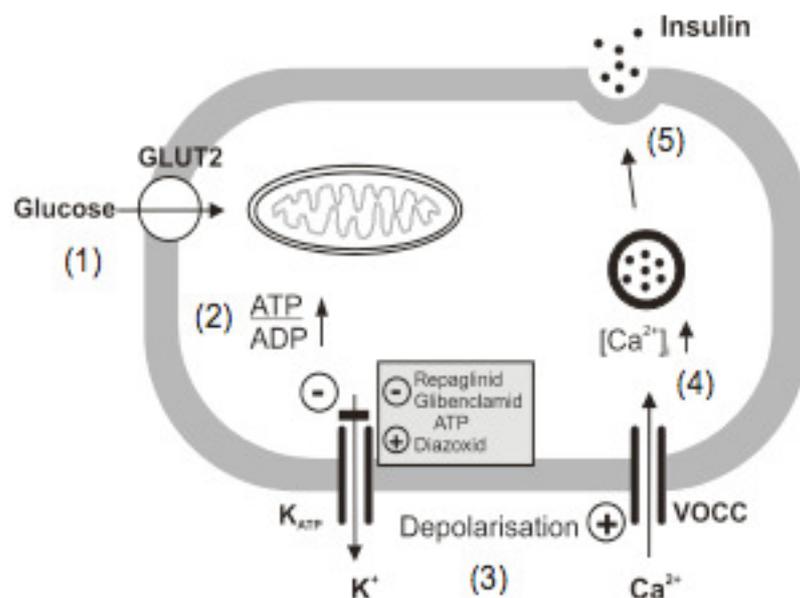
| Kanalkombination | Vorkommen                          | Referenzen                                     |
|------------------|------------------------------------|--|
| Kir6.2 / SUR1    | Pankreas, Neurone                  | Inagaki et al., 1995a<br>Gribble et al., 1997a |
| Kir 6.2 / SUR2A  | Herz- und Skelettmuskulatur        | Inagaki et al., 1996<br>Okuyama et al., 1998   |
| Kir6.2 / SUR2B   | Glatte Muskulatur<br>(ohne Gefäße) | Isomoto et al., 1996                           |
| Kir6.1 / SUR2B   | Gefäßmuskulatur                    | Yamada et al., 1997                            |

### 1.2.2 Physiologische Rolle der $K_{ATP}$ -Kanäle

Die wichtigste Aufgabe der  $K_{ATP}$ -Kanäle ist die Kopplung des Membranpotentials an den metabolischen Zustand der Zelle über den ATP / ADP Quotienten (s. Kap. 1.1.4). Dabei weisen die verschiedenen Kanalsubtypen ein unterschiedliches elektrophysiologisches Verhalten auf und reagieren auch unterschiedlich auf endogene oder pharmakologische Einflüsse.

Wie in Kap. 1.2.1 genannt, wird in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas der Kanalkomplex Kir6.2 / SUR1 exprimiert, der eine wichtige Rolle bei der Insulinfreisetzung spielt. Abbildung 5 zeigt die Signalkette, durch die in der  $\beta$ -Zelle Änderungen der Plasmaglukosekonzentration in eine Änderung der Insulinsekretion überführt werden. In der  $\beta$ -Zelle wird das Membranruhepotential vor allem durch die Aktivität der  $K_{ATP}$ -Kanäle bestimmt. Zudem ist die  $\beta$ -Zelle metabolisch so ausgelegt, dass physiologische Schwankungen des Glucosespiegels zu solchen Änderungen des ATP / ADP Quotienten führen, die in der Lage sind, die Aktivität des  $K_{ATP}$ -Kanals zu regulieren. Daher ist der  $K_{ATP}$ -Kanal in dieser Zelle als indirekter Glucosesensor anzusehen. Bei Glucosekonzentrationen von  $< 3$  mM (= substimulatorische Glucosekonzentration) wird das Ruhemembranpotential über einen  $K^+$ -Ausstrom durch offene Kir6.2 / SUR1-Kanäle bei ca. -70 mV stabilisiert. Bei diesem Potential sind die spannungsgesteuerten L-Typ- $Ca^{2+}$ -Kanäle (L-VOCC = voltage operated calcium channels), die für die Insulinausschüttung maßgeblich sind, überwiegend geschlos-

sen. Kommt es nun zu einem Anstieg der Plasmaglukosekonzentration wird die Glucose über GLUT2-Transporter vermehrt in die  $\beta$ -Zellen aufgenommen und durch die Glykolyse metabolisiert (1) (in Abbildung 5). Dadurch steigt der ATP / ADP Quotient an (2), was eine Inhibition der  $K_{ATP}$ -Kanäle bewirkt. Eine verminderte  $K^+$ -Leitfähigkeit ist die Folge, woraus eine Depolarisation der Zellmembran resultiert (3). Das wiederum führt zur Öffnung der spannungsabhängigen  $Ca^{2+}$ -Kanäle mit Einstrom von  $Ca^{2+}$  in die Zelle und daraus resultierender Exozytose der Insulingranula durch eine Erhöhung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration.



**Abbildung 5:** Modell der Insulinfreisetzung aus den  $\beta$ -Zellen der Bauchspeicheldrüse (nach Cook und Hales, 1984; Löffler-Walz und Quast, unveröffentlicht).

Auch im Hypothalamus wird Kir6.2 / SUR1 exprimiert (Miki und Seino, 2005). Der Hypothalamus spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulation des Energiemetabolismus und der Kontrolle des Körpergewichts, sowie des Blutzuckerspiegels (Levin et al., 1999). Nach Untersuchungen mit Kir6.2<sup>(-/-)</sup>- (Knockout)-Mäusen wird angenommen, dass an diesen Prozessen ebenfalls  $K_{ATP}$ -Kanäle beteiligt sind (Miki und Seino, 2005).

Des Weiteren spielen am Herzen  $K_{ATP}$ -Kanäle, genauer gesagt Kir6.2 / SUR2A, eine wichtige Rolle. Diese werden durch hohe intrazelluläre ATP-Konzentrationen geschlossen gehalten (Nichols und Lederer, 1991). Doch bei der Anpassung an adrenergen und physischen Stress sind funktionsfähige  $K_{ATP}$ -Kanäle von großer Wichtigkeit (Zingman et al., 2002b). Fällt das intrazelluläre ATP / ADP Verhältnis (Gögelein, 2001) oder steigt die Phospholipidkonzentration an (Liu et al., 2001), was während einer Ischämie und Hypoxie der Fall ist, bewirkt dies eine massive Öffnung der kardialen  $K_{ATP}$ -Kanäle. Es folgt eine Hyperpolarisation der Zellmembran, woraus eine reduzierte Erregbarkeit der Zelle resultiert. Dadurch ergibt sich wiederum eine Verkürzung des Aktionspotentials, das der Zelle hilft, Energie zu sparen (negativ inotrope Wirkung durch verminderten  $Ca^{2+}$ -Einstrom) (Escande und Caverio, 1992). Die potentiell gestörte elektrische Homogenität des Herzens kann aber zu Arrhythmien führen (Gögelein, 2001).

Kommt es zu länger andauernden Ischämien, führen diese durch Nekrose und Apoptose zum Untergang der Kardiomyocyten. Lagen vor einer solchen, länger andauernden Ischämie kurze ischämische Perioden vor, kann der Schaden begrenzt werden. Dieses Phänomen wird als ischämische Präkonditionierung des Myokards (IPC) bezeichnet (Murry et al., 1986; Gross und Fryer, 1999; Cohen et al., 2000). Die Freisetzung von u.a. Bradykinin, Adenosin, NO, Opioiden und Noradrenalin gelten als die Auslöser dieses Prozesses. Der genaue Mechanismus ist noch nicht klar, aber man geht davon aus, dass  $K_{ATP}$ -Kanäle eine wichtige Rolle spielen (Hanley und Daut, 2005), da z.B. Kir6.2<sup>(-/-)</sup>-Mäuse kein IPC aufweisen (Seino und Miki, 2005).

Kir6.2 / SUR2A kommt zusätzlich vermehrt in der Skelettmuskulatur vor und hat hier eine ähnliche Aufgabe wie im Myokard. Fällt der ATP /ADP Quotient, öffnen sich die  $K_{ATP}$ -Kanäle (Light et al., 1994). Durch den folgenden  $K^+$ -Ausstrom werden die Aktionspotentiale kürzer (Gramolini und Renaud, 1997), wodurch die Skelettmuskelzelle vor einer schädlichen  $Ca^{2+}$ -Überladung geschützt wird (Burton und Smith, 1997).

An der Gefäßmuskulatur moduliert Kir6.1 / SUR2B über den Einfluss auf den Vasotonus den Blutdruck (Edwards und Weston, 1993; Quast, 1993). Durch die Öffnung der Kir6.1 / Sur2B-Kanäle kommt es zu einer Hyperpolarisation der Gefäßmuskel-

zellen und damit zu einer Vasodilatation (Quast und Cook, 1989). An der Niere bewirken  $K_{ATP}$ -Kanäle eine Regulation der Reninsekretion in den juxtaglomerulären Zellen und im Tubulusepithel eine Ionenrückresorption (Quast, 1996).

### 1.2.3 Pathophysiologie der $K_{ATP}$ -Kanäle

#### 1.2.3.1 Kongenitaler Hyperinsulinismus im Kindesalter

Kongenitaler Hyperinsulinismus (HI) ist durch ungewöhnlich hohe Insulinsekretion trotz schwerwiegender Hypoglykämie gekennzeichnet (Ashcroft, 2005). Er tritt bei der Geburt oder in der frühen Kindheit auf und kann unbehandelt zu gravierenden, irreversiblen, neurologischen Ausfällen bis hin zum Tod führen. Meist wird der kongenitale Hyperinsulinismus autosomal-rezessiv vererbt (Huopio et al., 2000). Es sind fünf Gene bekannt, die zu HI führen können, aber für etwa 50% der Erkrankungen sind SUR1-Mutationen (im ABCC8-Gen) verantwortlich (Ashcroft, 2005).

Man unterscheidet zwei verschiedene Arten des HI: Bei der ersten Version liegt eine Reduktion bis hin zum vollständigen Verlust der  $K_{ATP}$ -Kanäle vor, der auf einer Beeinträchtigung der Proteinproduktion, deren Reifung, deren Transport oder Einbau in die Plasmamembran beruht (Taschenberger et al., 2002).

Bei den Mutationen der zweiten Klasse sind die Kanäle in der Zellmembran präsent, liegen jedoch im Zustand verminderter bzw. aufgehobener Aktivität vor (loss-of-function-Mutationen) und sind vom Metabolismus der Zelle entkoppelt. In diesem Fall wird die Kanalaktivierung durch  $MgATP / MgADP$  herabgesetzt (Nichols et al., 1996; Huopio et al., 2002). Daraus folgt, dass die mutierten Kanäle je nach Mutation, unabhängig vom metabolischen Zustand der Zelle, mehr oder weniger geschlossen sind. Die meisten Mutationen der Klasse 2 finden sich in den NBF des SUR1. HI als Folge von Mutationen im Kir sind seltener, aber auch sie reduzieren bzw. heben die Kanalaktivität auf (Thomas et al., 1996; Nestorowicz et al., 1997; Ashcroft, 2005; Henwood et al., 2005). Bedingt durch den Ausfall der Membranpotentialstabilisierung durch die  $K_{ATP}$ -Kanäle, kommt es bei HI-Patienten zu einer

mehr oder weniger großen Depolarisation der  $\beta$ -Zellmembran, verbunden mit einer mehr oder weniger gesteigerten, kontinuierlichen Insulinsekretion.

Des Weiteren werden Gain-of-function Mutationen in der Glucokinase (GCK) und Glutamat-Dehydrogenase (GDH) der Mitochondrien mit milden HI-Formen assoziiert (Stanley et al., 1998; Gloy et al., 2003). Bei diesen Enzymen handelt es sich um Schlüsselenzyme des  $\beta$ -Zellmetabolismus. Werden sie übermäßig aktiviert, kommt es zu verstärkter ATP-Synthese bei vergleichsweise niedrigen Glucosekonzentrationen, woraus eine unverhältnismäßige  $K_{ATP}$ -Blockade und Insulinfreisetzung resultieren.

Mutationen an Kir6.2 oder SUR1, die HI auslösen, sind meist schwerwiegend und durch  $K_{ATP}$ -Kanal-Öffnende Pharmaka (Diazoxid) nicht therapierbar (Dunne et al., 2004; Henwood et al., 2005). In diesen Fällen sind entweder zu wenige / keine Kanäle vorhanden oder die vorhandenen Kanäle erweisen sich als öffenerresistent. Die einzige therapeutische Therapie stellt in diesem Fall die subtotale Pankreatektomie dar (Cook und Bryan, 1998). Sind die Kanäle jedoch intakt, da HI durch Mutationen in GCK oder GDH ausgelöst werden, so können diese milden Formen adäquat mit Diazoxid therapiert werden (Dunne et al. 2004).

#### 1.2.3.2 *Permanenter neonataler Diabetes*

Beim permanenten neonatalen Diabetes (PNDM) treten typischerweise in den ersten drei Lebensmonaten Hyperglykämien auf. Etwa 50% der Erkrankungen sind auf Kir6.2-Mutationen zurück zu führen. Hier sind bis heute nur heterozygote Formen bekannt (Gloyn et al al., 2004; Sagen et al., 2004; Vaxillaire et al., 2004; Aguilar-Bryan und Bryan, 2008). Bei milden Formen kommt es bei intravenöser Glucosegabe zu einer minimalen Insulinantwort, die aber durch die Gabe von Sulfonylharnstoffen auf ein adäquates Niveau angehoben werden kann (Haider et al., 2005). Im Gegensatz dazu treten bei der schweren Form auch Entwicklungsstörungen, Muskelschwäche, Epilepsie und kraniofazialen Dysmorphien auf (DEND = developmental delay, epilepsy and diabetes). Diese schwerwiegenden Symptome sind wohl durch die Kir6.2-Mutationen selbst und nicht durch die Hyperglykämie verursacht (Gloyn et al al., 2004; Sagen et al., 2004; Vaxillaire et al., 2004).

Alle Mutationen, die bisher bekannt sind, erniedrigen die MgATP-Empfindlichkeit der Kir6.2/SUR1-Kanäle (Gloyn et al., 2004).

Liegen die Mutationen nahe oder sogar innerhalb der ATP-Bindungsregion, wie zum Beispiel R201H, R201C (Gloyn et al., 2004) oder Y330C, F333I (Sagen et al., 2004) wird zwar die ATP-Affinität herabgesetzt, auf die Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle in der Abwesenheit von Nukleotiden haben sie aber keinen wesentlichen Einfluss. Diese Mutationen sind mit der milden PNDM-Form assoziiert (Ribalet et al., 2003; Gloyn et al., 2004; Antcliff et al., 2005, Bryan, 2009). Hier kann man meist gut mit  $K_{ATP}$ -Kanal-Inhibitoren, wie Glibenclamid, behandeln (Gloyn et al., 2004; Sagen et al., 2004; Zung et al., 2004).

Kommen die Mutationen jedoch weiter entfernt von der ATP-Bindungsstelle vor, wie zum Beispiel Q52R, V59M, V59G und I296L, wird dadurch die Offenwahrscheinlichkeit erhöht, woraus eine schwerwiegendere Krankheitsausprägung resultiert (Gloyn et al., 2004; Sagen et al., 2004; Vaxillaire et al., 2004; Bryan, 2009). Gleichzeitig besitzen diese Kanäle eine verringerte Empfindlichkeit gegenüber den  $K_{ATP}$ -Blockern, sodass zur Therapie der Hyperglykämie Insulin eingesetzt werden muss (Proks et al., 2004; Aguilar-Bryan und Bryan, 2008).

#### 1.2.3.3 *MODY (Maturity-onset diabetes of the young)*

Bei dem maturity-onset diabetes of the young (MODY) handelt es sich um eine spezielle Form des Diabetes Mellitus mit autosomal dominanter Vererbung und dem Auftreten im frühen Erwachsenenalter (Fajans et al., 2001; Gloyn et al., 2003). Dabei liegt eine Dysfunktion der  $\beta$ -Zellen vor. Durch Mutationen in sechs verschiedenen Genen kann es zu unterschiedlichen Krankheitsbildern kommen. Ein Gen zum Beispiel kodiert für die Glukokinase, einen intrazellulären Glucosesensor im endokrinen Pankreas. Kommt es hier zu heterozygoten loss-of-function- Mutationen, wird die Sensitivität der  $\beta$ -Zelle gegenüber Glucose herabgesetzt, nicht genügend ATP gebildet und zu wenig Insulin sezerniert. Die Patienten entwickeln eine milde und über Jahre stabile Hyperglykämie, die nur selten zu diabetischen Spätkomplikationen führt. Bei homozygoten Veränderungen dieses Enzyms kommt es zu ausge-

prägen Störungen des  $\beta$ -Zellmetabolismus die zu einem permanenten neonatalen Diabetes führt (PNDM, s. Kap. 1.2.2)

Es sind noch fünf weitere Gene bekannt, die für verschiedene Transkriptionsfaktoren kodieren. Diese Faktoren sind zum einen für die Entwicklung der  $\beta$ -Zellen, zum anderen auch für die Expression von den Glucosestoffwechsel regulierenden Genen verantwortlich. Sind hier Mutationen vorhanden, führt das über einen gestörten Glucosestoffwechsel zu einem schweren Mangel an inhibitorischem MgATP und die Kanäle bleiben offen. Schließlich können auch Mutationen im Kir6.2 selbst einen MODY auslösen (Yorifuji et al., 2005).

#### 1.2.3.4 *Diabetes mellitus Typ 2 (NIDDM)*

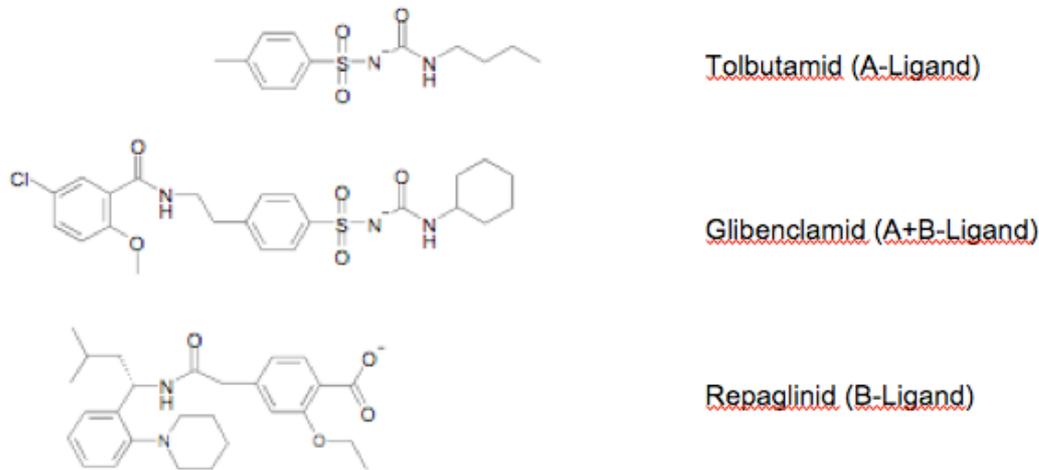
Als Ursachen des Nichtinsulinabhängigen Diabetes Mellitus (NIDDM = Typ-2-Diabetes) gelten Insulinresistenz kombiniert mit Insulinsekretionsdefekten. Meist manifestiert sich der Typ 2 Diabetes bei Patienten, die älter sind als 40 Jahre. Über 80% der Betroffenen sind adipös. Des Weiteren geht man von einer genetischen Prädisposition aus. Bei der europäischen Population kommt sehr häufig der heterozygote (45%) und der homozygote (13%) Kir6.2-Polymorphismus E23K vor (Sakura et al., 1996; Inoue et al., 1997; Gloyn et al., 2001) und man geht davon aus, dass dieser Polymorphismus mit einem höheren Risiko für Typ-2-Diabetes einhergeht (Hani et al., 1998; Barroso et al., 2003; Gloyn et al., 2003). Außerdem konnte ein Zusammenhang zwischen dem E23K-Polymorphismus und einem erhöhten BMI festgestellt werden (Nielsen et al., 2003). Diese Mutation erhöht leicht die Offenwahrscheinlichkeit, vermindert etwas die MgATP-Empfindlichkeit und verstärkt so die MgADP-Aktivierung der Kir6.2/SUR1-Kanäle etwas (Schwanstecher et al., 2002a; Schwanstecher et al., 2002b). Außerdem wird die Empfindlichkeit der betroffenen Kanäle gegenüber Oleoyl-CoA leicht verstärkt (Riedel et al., 2003). Da die beobachteten Effekte zwischen Wildtyp und E23K-Mutante gering und nicht immer reproduzierbar waren (Haider et al., 2005), scheinen breitere Funktionsstudien notwendig um den Effekt der E23K-Mutation auf die Glucosehomöostase aufzuklären.

## 1.3 Pharmakologie der $K_{ATP}$ -Kanäle

### 1.3.1 $K_{ATP}$ -Kanal-Inhibitoren

Zu den  $K_{ATP}$ -Kanal-Inhibitoren gehören Sulfonylharnstoffe, wie z.B. Tolbutamid oder Glibenclamid, sowie Glinide, wie z.B. Repaglinid und Nateglinid (Abbildung 6). Diese binden an die SUR-Untereinheit und hemmen damit die Kanalaktivität, woraus eine Depolarisation der  $\beta$ -Zelle resultiert. Pharmakotherapeutisch wird dies genutzt, um die Insulinfreisetzung aus den  $\beta$ -Zellen der Bauspeicheldrüse zu stimulieren. Allerdings kann diese Blockade, die bei der Typ2-Diabetestherapie erwünscht ist, auch  $K_{ATP}$ -Kanäle in anderen Geweben (z.B. Kardiomyocyten, Vaskulatur) betreffen, womit möglicherweise kardiovaskuläre Komplikationen verbunden sein können (Quast et al., 2004).

Bei den Sulfonylharnstoffen unterscheidet man drei Gruppen. Allen gemein ist die Phenylgruppe und die negative Ladung rechts davon, gegeben durch die SH- oder Carboxylgruppe (Abbildung 6). Bei den A-Liganden liegt das lipophile Zentrum rechts dieser Gruppe, bei den B-Liganden links. Die A+B-Liganden besitzen 3 lipophile Zentren (siehe Abbildung 6). Allen Ligandgruppen gemein ist, dass sie als schwache organische Säuren mit einem  $pK_S$ -Wert zwischen ca. 3.5 und 6.5 vorliegen und damit in wässriger Lösung mit physiologischem pH-Wert deprotoniert sind (Bryan et al., 2005). Diese Form stellt auch die tatsächlich wirksame Form dar und kommt über das Zytosol an die entsprechende Bindungsstelle (Schwanstecher et al., 1994a). Kamp et al, 2003 stellten die These eines Flip-Flop-Mechanismus auf, bei dem die protonierten (neutralen) Moleküle durch die Zellmembran diffundieren und im Zellinneren dissoziieren.

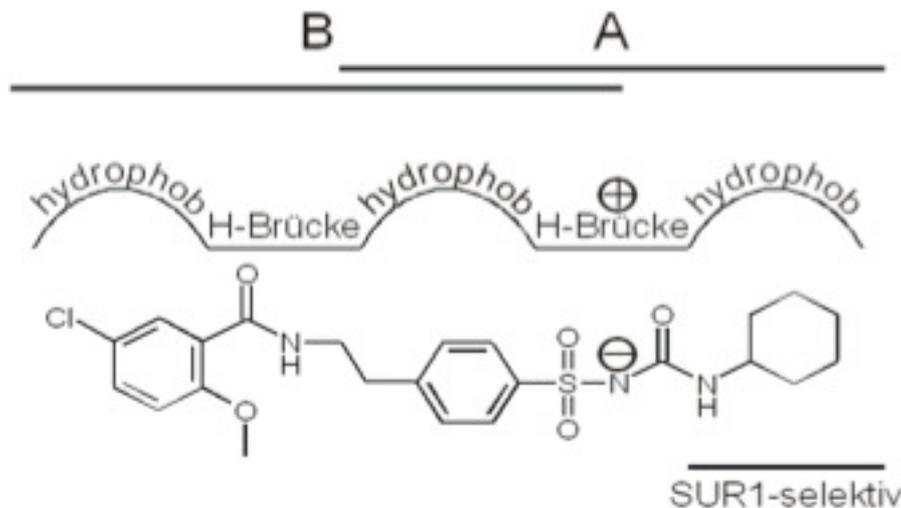


**Abbildung 6:** Struktur verschiedener K<sub>ATP</sub>-Inhibitoren.

Zu den A-Liganden gehören z.B. Tolbutamid und Glibornurid, die auch als kurzket- tige Sulfonylharnstoffe der ersten Generation bezeichnet werden. Diese sind SUR1-selektiv (Meyer et al., 1999; Reimann et al., 2001b; Chachin et al., 2003; Winkler et al., 2007). Man geht davon aus, dass SUR1, im Gegensatz zu SUR2, eine lipophile Bindungstasche besitzt, die mit dem lipophilen Zentrum der A-Liganden interagieren kann.

Durch Erweiterung der kurzket- tigen Sulfonylharnstoffe um ein weiteres, über ein Amid verknüpftes lipophiles Zentrum (in Abbildung 6 links von der Phenylgruppe), erhält man die Sulfonylharnstoffe der zweiten Generation, z.B. Glibenclamid (GBC) oder Glimepridid (= A+B-Liganden). Bei diesen ist im Vergleich zu den kurzket- tigen Sulfonylharnstoffen die Affinität zu SUR1 etwa 1000-fach höher. Die Trans- membransegmente 14-16 des SUR1 sind, wie bei Tolbutamid, an der Bindung be- teiligt (Ashfield et al., 1999, Abb.1). Aguilar-Bryan et al., 1995 stellten fest, dass <sup>125</sup>I- GBC SUR1-Proteinabschnitte in der TMD0 und CL3 photomarkieren kann. Darüber hinaus spielt die CL3 eine wichtige Rolle bei der Bildung der Hochaffinitätsbin- dungsstelle des <sup>3</sup>H-GBC (Mikhailov et al., 2001; Bryan et al., 2005; 2007; Vila- Cariles et al., 2007). Diese Tatsachen bekräftigen die Theorie des Vorhandenseins zweier Bindungsregionen (A und B) für die Sulfonylharnstoffe der zweiten Generati- on, die innerhalb einer großen Substratbindungstasche liegen (Gutsche et al., 1974, Rufer et al., 1974; Biere et al., 1974; Winkler et al., 2007; siehe auch Abbildung 1 und 7). Da die langkettigen Sulfonylharnstoffe gleichzeitig an zwei Bindungsregio-

nen binden (siehe auch Abbildung 7: A: CL8; B: CL3), lässt sich die hohe Affinität der Bindung, sowie die starke Potenz und geringe Reversibilität des GBC-Blocks an Kir6.2 / SUR1 erklären (Ashcroft und Gribble, 1999; Ashfield et al., 1999 Bryan et al., 2005; 2007; Vila-Cariles et al., 2007; Winkler et al., 2007; Russ et al., 2009).



**Abbildung 7:** Modell der Sulfonylharnstoff-Bindungstasche am SUR.

Durch Analysen der Ligandstruktur können Aussagen über die Beschaffenheit der Bindungstaschen gemacht werden: Dabei handelt es sich um zwei Bindungsregionen A und B, die sich überlappen. Die drei lipophilen Strukturen hier von GBC interagieren mit drei Taschen des Rezeptors. Zusätzlich kann das Molekül über H-Brücken oder ionische Wechselwirkungen fixiert werden. Die rechte hydrophobe Tasche befindet sich wahrscheinlich im Bereich von CL8 (S1237) und gibt es nur bei SUR1. Bei SUR2 wird die Tasche durch die Aminosäure Tyrosin1206 (anstelle von Serin 1237 im SUR1) gebildet. Die CL3 soll Bestandteil der linken hydrophoben Tasche sein. Über die Überlappungsregion ist noch wenig bekannt, sie muss als Rezeptor für die Phenyl-Gruppe und die negative Ladung dienen, kann aber noch keiner Struktur im SUR eindeutig zugeordnet werden (Winkler et al., 2007)

Winkler et al., 2007 untersuchten die Bindungseigenschaften der Schließer (A-, B- und A+B-Liganden) an den unterschiedlichen Subtypen, sowie das Verhalten bei der Koexpression von SURx mit Kir6.x.

Eines der wichtigsten Ergebnisse dieser Studie aber war die Erkenntnis, dass eine Koexpression mit Kir6.x die Affinität des SURx für alle Sulfonylharnstoffe anhebt und das, bei dem gleichen Subtyp, für A- und A+B-Liganden um genau den gleichen Grad (Winkler et al., 2007). Letzteres Ergebnis wird dadurch erklärt, dass sich die A- und B-Bindungsregionen (siehe Kap. 1.2.4.2) überlappen um die negative Ladung sowie den angrenzenden Phenylring aufzunehmen und dass der Kir6.2 N-

Terminus sowohl als Teil des Akzeptors für diese Elemente fungieren oder mit diesen allosterisch interagieren kann (Winkler et al., 2007).

Nach der 3D-Struktur von Mikhailov et al. (2005) liegen Strukturen des Kir6.2 in der Nähe der Bindungsregion oder sind sogar an der Ausbildung der Bindungsstelle beteiligt, was durch Untersuchungen, in denen die Koexpression von Kir6.1 bzw. Kir6.2 zur Affinitätserhöhung von GBC an SUR2B führte, bestätigt werden kann (Russ et al., 1999, Hambrock et al., 2001). Vergleicht man die Sequenzen der CL3-Region der verschiedenen SUR-Subtypen, ergeben sich keine großen Unterschiede (Bryan et al., 2005). Sulfonylharnstoffe der zweiten Generation sind wesentlich weniger SUR1-selektiv, als die Sulfonylharnstoffe der ersten Generation (Stephan, 2007).

Die Glinide enthalten keine Sulfonylharnstoff-Gruppe mehr, bei ihnen wird die negative Ladung durch eine Carboxylgruppe beigesteuert. Die Gruppe der Glinide enthält sowohl A- als auch B-Liganden.

### Nukleotideffekte

In der Abwesenheit der Mg-Nukleotide wird die Konformation des Kanalkomplexes durch die Bindung des Sulfonylharnstoffs an den SUR verändert, was zur Schließung des Kanals führt. Der Kir6.2-N-Terminus muss an diesem Prozess beteiligt sein, da eine Verkürzung dieser Kir6.2-Region um mehr als 10 Aminosäuren den inhibitorischen Effekt der Sulfonylharnstoffe verhindert (Babenko et al., 1999; Reimann et al., 1999; Prager et al., in Vorbereitung).

In der Gegenwart von Mg-Nukleotiden, hebt die Sulfonylharnstoff-Interaktion mit SUR1 zusätzlich die aktivierende Wirkung der Mg-Nukleotide auf die SUR-Untereinheit auf. Eine Erklärung dafür könnte die Feststellung von Ueda et al., 1999 sein, dass GBC die Kooperativität zwischen der MgATP-Bindung an NBF<sub>1</sub> und der MgATP/MgADP-Bindung an NBF<sub>2</sub> stört. Insgesamt verstärkt sich der Kanalblock noch, da die inhibierende Wirkung der Mg-Nukleotide auf die Kir-Untereinheit bestehen bleibt (Schwanstecher et al., 1992a; Zünkler et al., 1988; Ashcroft und Gribble, 1999; Babenko et al., 1999; Reimann et al., 1999; Procks et al., 2004, Winkler et al., 2009).

Die  $Mg^{2+}$ -Salze von ATP und ADP sind die natürlichen Regulatoren der  $K_{ATP}$ -Kanäle. Da während der Inkubation ATP durch verschiedene ATPasen zu ADP hydrolysiert wird und ADP wiederum durch die Adenylatkinase zu ATP (und AMP) umgewandelt wird (Gopalakrishnan et al., 1991; Schwanstecher et al., 1991; Hambrock et al., 1999; Hambrock et al., 2002) kommt es zu einer Kombination von Effekten aller Nukleotide.

In  $^3H$ -GBC-Bindungsstudien wurde gezeigt, dass MgATP die GBC-Bindung zu allen SUR-Subtypen verringert (Hambrock et al., 2002). Die Anwesenheit von  $Mg^{2+}$  ist für diesen Effekt von Nöten und nicht-hydrolysierbare ATP-Analoga haben keine Wirkung (Überblick bei Ashcroft und Ashcroft, 1992; Hambrock et al., 2002). Diese Inhibition ist eine Folge der Verringerung der Affinität des SURs gegenüber Glibenclamid durch die Bindung des MgATP am SUR, die Bindungsstelle des MgATP stimmt aber nicht mit der Bindungsregion des GBC überein (siehe Abb.1 und 3); sie sind also allosterisch miteinander gekoppelt (Schwanstecher et al., 1991; 1992).

Man kann annehmen, dass ATP und ADP gemeinsam wirksamer sind, wenn es um die Hemmung der Glibenclamidbindung geht, als jeweils allein (Hambrock et al., 2002).

Durch entsprechend erhobene Daten kann an SUR1 ein klassisches zwei Zustände Schema angenommen werden, in dem der Rezeptor in zwei verschiedenen, mit einander vertauschbaren Zuständen vorliegt, und MgATP verändert das Gleichgewicht in einen Zustand niedrigerer Affinität gegenüber Glibenclamid (Rüdiger; Dissertation 2009; Winkler et al., Dissertation 2009).

Im Fall der SUR2(YS)-Isoformen reduziert ATP die Anzahl der beobachtbaren Bindungsstellen, ohne dass sich der  $K_D$ -Wert dieser verändert. Das kann auf zwei Arten erklärt werden: Die eine Theorie behauptet, dass SUR2, wird es alleine exprimiert, Tetrameren mit negativer allosterischer Kopplung zwischen den Untereinheiten formt, abhängig von der Isoform. Im zweiten Modell wird angenommen, dass monomeres SUR zwischen zwei Zuständen im stady-state liegt, aber nicht im Gleichgewicht. Dieses wird durch die ATP-Hydrolyse angetrieben (Boynaems und Dumont, 1980; Löffler-Walz et al., 2002). Was auch immer der Grund dafür ist, es zeigt, dass zwischen SUR1 und SUR2 ein wichtiger mechanistischer Unterschied vorliegt (Hambrock et al., 2002).

Bei einer Koexpression mit Kir6.2 kam es zu einer Verringerung der Wirksamkeit von MgATP und MgADP in Bezug auf die Hemmung der Glibenclamidbindung für alle SUR-Subtypen (Hambrock et al., 2002).

Bei einer Koexpression mit Kir6.2 kam es zu einer Verringerung der Wirksamkeit von MgATP und MgADP in Bezug auf die Hemmung der Glibenclamidbindung für alle SUR-Subtypen (Hambrock et al., 2002)

### Die Mutation SUR2(Y1206S)

Da die SUR2-Subtypen eine geringe Affinität gegenüber Glibenclamid (GBC) aufweisen ( $\approx 100$  nM), wurde die Mutation (Y1206S) benutzt, die die Affinität des SUR2 für GBC anhebt (Hambrock et al., 2001; Stephan et al., 2005), aber gleichzeitig ähnliche pharmakologische Eigenschaften aufweist (Löffler-Walz et al., 2001).

Durch verschiedene Studien, in denen herausgefunden wurde, dass SUR1 eine hohe Affinität gegenüber Sulfonylharnstoffen aufweist, während die SUR2-Spleißvarianten eine hohe Affinität gegenüber den Kanalöffnern aufweisen (Hambrock et al., 1998; Schwanstecher et al., 1998; Dörschner et al., 1999; Hambrock et al., 1999; Russ et al., 1999), kamen Ashfield et al., 1999 darauf, die Bindungsdomänen von SUR1 und SUR2A zu vergleichen und stellten dabei fest, dass es eine Aminosäure gibt, die sich in der intrazellulären Schleife zwischen TMD15 und TMD16 befindet und für die Sulfonylharnstoffbindung wichtig zu sein scheint: wird Serin 1237 im SUR1 von der Ratte durch Tyrosin, das die entsprechende Aminosäure im SUR2A darstellt, ersetzt, geht die hohe Affinität gegenüber Tolbutamid und Glibenclamid verloren. Im Umkehrschluss lässt sich vermuten, dass der Austausch von Tyrosin (1206 bei der Maus) durch Serin an SUR2 eine Erhöhung der Affinität gegenüber den Sulfonylharnstoffen hervorruft.

In der Tat konnte die Affinität gegenüber Glibenclamid um etwa den Faktor 25 angehoben werden (Hambrock et al., 2001). Die YS-Mutation ist deswegen so wertvoll, da sie sowohl für Öffner als auch für Glibenclamide eine hohe Affinität aufweist. Das erlaubt  $^3\text{H}$ -GBC- und  $^3\text{H}$ -P1075-Bindungsstudien an einem SUR, woraus genauere Analysen der Beziehung zwischen Öffnern und Schließern resultieren (Hambrock et al., 2001). Darüber hinaus war an SUR2B die Bestimmung der GBC-Bindung an intakten Zellen schwierig, da ein hoher Anteil an nicht spezifischer Bin-

zung vorliegt (Russ et al., 1999), an Membranen war es sogar unmöglich (Dörschner et al., 1999; Russ et al., 1999).

Die Affinität gegenüber P1075 im Vergleich zum Wildtyp jedoch bleibt gleich (Hambrock et al., 2001)

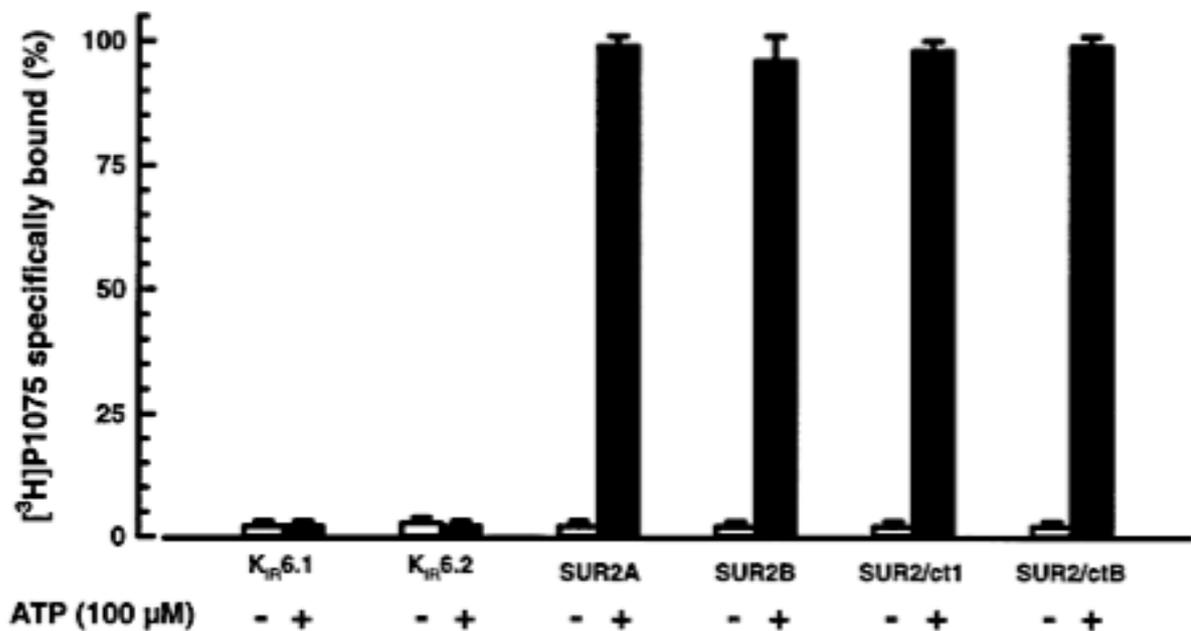
### 1.3.2 $K_{ATP}$ -Kanal-Öffner (KCO)

$K_{ATP}$ -Kanal-Öffner (KCO =  $K_{ATP}$  channel opener) kann man anhand ihres molekularen Aufbaus in unterschiedliche Strukturklassen unterteilen. Dazu gehören Cyano-guanidine (z.B. P1075), Benzopyrane (z.B. Levromakalim), Benzothiadiazine (z.B. Diaxozid), Thioformamide (z.B. Aprikalim), Pyridylnitrate (z.B. Nicorandil), sowie Pyrimidinsulfate (Minoxidisulfat) (Quast et al., 1993). Auch diese binden, wie die Sulfonylharnstoffe, an die SUR-Untereinheit (Aguilar-Bryan et al., 1995; Sakura et al., 1995; Hambrock et al., 1998; Schwanstecher et al., 1998; Vgl. Abb.1).

Pharmakotherapeutisch werden zur Zeit nur Diaxozid und Minoxidil eingesetzt – trotz schwerer Nebenwirkungen – und zwar zur Behandlung von hypertensiven Krisen bzw. therapierefraktärer Hypertonie, da Minoxidil selektiv am vaskulären  $K_{ATP}$ -Kanal (SUR2B / Kir6.1) wirkt. Diaxozid kann zusätzlich zur Therapie von Hyperinsulinämien eingesetzt werden, da es auch eine öffnende Wirkung auf SUR1 / Kir6.2 besitzt. Des Weiteren kommt noch Nicorandil zum Einsatz, das sowohl  $K_{ATP}$ -Kanäle aktiviert als auch NO freisetzt und deswegen bei der Behandlung von Angina pectoris Anwendung findet (Quast et al., 1996a; Karow und Lang, 2002; Autoren der IONA-Studie, 2002).

P1075 hat vor allem experimentelle Bedeutung.

Wie oben schon genannt liegt die Bindungsstelle für die KCO auf der  $\beta$ -Untereinheit (siehe Abb.8) und es werden für die hochaffine Kanalöffnung sowie zur Bindung am Rezeptor hydrolysierbares MgATP oder MgADP benötigt (Schwanstecher et al., 1992b; Quast et al., 1993; Schwanstecher et al., 1998, Hambrock et al., 1999).



**Abbildung 8:** Spezifische <sup>3</sup>H-P1075 Bindung an die K<sub>ATP</sub>-Untereinheiten (Schwanstecher et al., 1998)

Durch den Einfluss der Öffner auf die ATPase-Aktivität wird die allosterische Kopplung der Öffner- und Nukleotidbindungsregion bestätigt (Bienengraeber et al., 2000). Im Zuge der Nukleotidbindung und Hydrolyse an der NBF durchläuft der SUR zyklische Zustandsänderungen, die denen in verwandten, bakteriellen ABC-Proteinen ähnlich sind (Locher et al., 2002; Davidson und Chen, 2005). Dabei wird davon ausgegangen, dass der posthydrolytische Zustand mit der Aktivierung des Kanals im Zusammenhang steht (Zingman et al., 2001; Matsuo et al., 2005). Moreau et al., 2005b ziehen in Erwägung, dass dieser Zustand durch die Öffnerbindung eingeleitet und / oder stabilisiert wird. Tucker et al., 1997 konnten nachweisen, dass die Aktivität der Pore allein, also nur die Kir-Untereinheit, nicht durch den Öffner reguliert wird.

Die genaue Lage der Öffnerbindungsstellen ist noch nicht geklärt, aber Moreau et al., 2005b gehen, auf Grund von ausgedehnten Mutationsanalysen, davon aus, dass diese extrazellulär zugänglich ist. Stephan et al., 2006 jedoch konnten durch Verwendung eines schlecht membrangängigen Öffners eindeutig zeigen, dass zumindest Benzopyrane von der Innenseite her binden. Damit nehmen diese den gleichen Weg wie die Sulfonylharnstoffe (Schwanstecher et al., 1994).

Des Weiteren ist klar, dass die verschiedenen Öffner an unterschiedlichen SUR-Regionen binden (Babenko et al., 2000a; Moreau et al., 2000), sich aber gleichzeitig aus den Rezeptoren verdrängen können (Hambrock et al., 1998).

Radioligandbindungsstudien haben gezeigt, dass für eine hochaffine KCO Bindung sowohl  $Mg^{2+}$  als auch ATP oder andere hydrolysierbare Nukleotide erforderlich sind (Niki und Ashcroft, 1991; Schwanstecher et al., 1992; Quast et al., 1993; Dickinson et al., 1997; Hambrock et al., 1998; Schwanstecher et al., 1998) und es wird angenommen, dass die ATP-Hydrolyse erforderlich ist, um den SUR in eine Konformation mit hoher Affinität zu den KCOs zu bringen (Schwanstecher et al., 1998). Darüber hinaus heben die KCOs die ATPase Aktivität des SURs an, wodurch die Konzentration des MgADPs, der physiologische Öffner, steigt (Bienengraeber et al., 2000). Ferner gibt es einige Anhaltspunkte, dass  $K_{ATP}$ -Kanal-Öffner auch in der Abwesenheit von MgATP in der Lage sind SUR2-haltige Kanäle zu öffnen, was unabhängig von der ATP-Hydrolyse möglich ist (Skelettmuskel: Allard und Lazdunski, 1993; Forestier et al., 1993, 1996; Kir6.2 / Sur2A: D'hahan et al., 1999a; Babenko et al., 2000, Gribble et al., 2000; Kir6.2 / SUR2B: Reimann et al., 2000). MgATP verlangsamt die Frequenz der Kanalschließung nach der Auswaschung der Öffner, was vermuten lässt, dass MgATP die Dissoziation des Öffners vom Kanal verzögert (Gribble et al., 2000; Reimann et al., 2000; 2001).

Allgemein kann man sagen, dass SUR2B von allen SUR-Subtypen die größte Affinität zu den  $K_{ATP}$ -Kanal-Öffnern aufweist (Schwanstecher et al., 1998; Hambrock et al., 1999; Winkler et al., 2007)

Die Mutation Y1206S hat auf SUR2B kaum Auswirkungen auf die Bindung oder auf das Öffnen des Kanals durch P1075 (Russ et al., 2003). Außerdem haben Löffler-Walz et al., 2002 festgestellt, dass trotz der Mutation die allosterische Kopplung zwischen GBC und P1075 unverändert bleibt.

Bei einer heterologen Verdrängung von  $^3H$ GBC durch P1075 in der Anwesenheit von MgATP ergibt sich ein biphasischer Kurvenverlauf. Man geht davon aus, dass SUR2B, wird es alleine exprimiert, in der Anwesenheit von MgATP Tetrameren bildet (Löffler-Walz et al., 2002). Die erste Komponente der Kurve spiegelt dann die Öffnerbindung zu den nicht durch GBC besetzten Untereinheiten wieder. Durch ei-

ne negativ-allosterische Interaktion bewirkt die P1075-Bindung an der nicht durch  $^3\text{HGBC}$  besetzten Untereinheit eine Abschwächung der Affinität zum Radioliganden (Russ et al., 2003). Der zweite Teil der Kurve gibt den Teil der Bindungen an, die durch die Verdrängung von  $^3\text{HGBC}$  entstanden ist. Das geschieht mit geringerer Affinität und führt durch die negative Allosterie zu weiterem Ablösen von  $^3\text{HGBC}$  (Löffler-Walz et al., 2002).

In der Abwesenheit von MgATP waren die  $^3\text{H-GBC}$  Inhibitionskurven monophasisch und der  $K_i$ -Wert ähnelt dem des zweiten Teils der Kurve mit MgATP (Russ et al., 2003). Außerdem kam es zu keiner Interaktion der Untereinheiten (Löffler-Walz et al., 2002).

Eine wichtige Erkenntnis ist, dass die Anwesenheit von GBC an derselben Untereinheit die Bindung der Kanalöffner erschwert und andersherum (Hambrock et al., 2001). Das hat zur Folge, dass die Ergebnisse der heterologen Verdrängung ( $^3\text{HGBC}$  gegen P1075) die wirkliche Affinität in der Anwesenheit von MgATP unterschätzen. Diese Hypothese wird auch dadurch unterstützt, dass die  $K_i$ -Werte ohne MgATP denen des niedrig-affinen Teils der Kurve mit MgATP entsprechen (Russ et al., 2003). Dadurch wird gezeigt, dass an durch GBC belegten Untereinheiten die Anwesenheit von GBC für die Öffnerbindung wichtiger war als die des MgATPs (Russ et al., 2003).

Es wird davon ausgegangen, dass einige  $K_{\text{ATP}}$ -Kanalöffner in hoher Konzentration in der Lage sind  $K_{\text{ATP}}$ -Kanäle unabhängig von der ATP-Hydrolyse zu öffnen (Russ et al., 2003).

## 1.4 Die Nukleotidbindungsfalten

Die Nukleotidbindungsfalten enthalten das Walker A- und B-Motiv sowie die Linkersequenz (auch ABC-Signatursequenz genannt). Die NBFs verknüpfen sich in einer „head-to-tail“ Ausrichtung, um zwei Nukleotidbindungsstellen zu bilden, in welchen die Nukleotide zwischen den Walker A- und B-Motiven von der einen NBF und der Linkersequenz der anderen NBF eingeschlossen werden (Hollenstein et al., 2007).

Das bedeutet also, dass die eine Bindungsregion das Walker A- und Walker B-Motiv von NBF<sub>1</sub> und die Linkersequenz von NBF<sub>2</sub> beinhaltet und umgekehrt.

Bei Gelfiltrationen kam man zu dem Schluss, dass die isolierten Nukleotidbindungs-falten sich in Multimeren von acht bis neun Monomeren anordnen. Im Elektronen-mikroskop konnte man feststellen, dass sie ringartige Strukturen ausbilden. Der in- nere Durchmesser dieser Ringstruktur beträgt 40 bis 75 Å und man geht davon aus, dass dies den Platz für die Kir6.x-Untereinheit darstellt (de Wet et al., 2007).

Diese Ergebnisse lassen annehmen, dass die NBFs an einem physikalischen Zu- sammenschluss der Untereinheiten im K<sub>ATP</sub>-Kanalkomplex beteiligt sind woraus sich schließen lassen kann, dass sie auch an funktionellen Interaktionen zwischen den Untereinheiten Anteil haben (de Wet et al., 2007). Auch ältere Studien haben belegt, dass die NBFs untereinander interagieren (Mikhailov und Ashcroft, 2000; Hough et al., 2002) und dass die isoliert vorliegende NBF<sub>1</sub> von SUR1 Tetrameren bilden kann (Shevchenko und Shevchenko, 2001).

### 1.4.1 Walker A- und Walker B-Motiv

Walker et al., 1982 haben durch einen Sequenzvergleich der Aminosäuren von vie- len verschiedenen bakteriellen und eukaryotischen ATP-bindenden Proteinen die Walker A- und B-Motive in den NBFs entdeckt. Diese werden durch Assoziierung zweier hoch-konservierter Aminosäuregruppen gebildet. Von dem Walker A-Motiv (G-X-X-G-X-G-K-T(S)) wird angenommen, dass es eine Schleife (Loop) bildet (Sa- raste et al., 1990). Durch eine Konformationsänderung, die durch MgATP hervorgeru- fen wird, kann diese Schleife den Zugang zu der Nukleotidbindungs-falte (NBF) kontrollieren (Fry et al., 1986). Entsprechend den nukleotidbindenden und – hydrolysierenden Proteinen, von denen strukturelle Daten vorhanden sind (Fry et al., 1986; Pai et al., 1989; Abrahams et al., 1992 Story et al., 1992) , geht man da- von aus, dass der invariante Lysinrest in dem Walker A-Motiv der ABC-Transporter entscheidend für die Bindung des β- und γ-Phosphates des ATP ist, während das konservierte Aspartat in dem Walker B-Motiv (R/K-X-X-X-G-X-X-X-L-Hyd-Hyd-Hyd- Hyd-D) eine wichtige Rolle beim Binden des Mg<sup>2+</sup>-Ions zu spielen scheint (Schnei- der et al., 1997). Das Walker B-Motiv wird in die Nähe des Walker A-Motivs ange-

siedelt. Zusätzlich enthält die NBF weitere Motive, namentlich die Linkersequenz (LSGGQ), die bei der Familie der ABC-Proteine nachgewiesen wurde (Higgins et al., 1986). Diese Sequenz liegt zwischen der A- und B-Region.

Allgemein gilt, dass ein Aminosäureaustausch in den Walker A- und B-Motiven hinsichtlich der ATPase-Aktivität nicht toleriert wird (Schneider et al., 1994; Koronakis et al., 1995; Loo et al., 1995; Aparicio et al., 1996).

An STE6, auch ein ABC-Protein, wurde in den Walker-Motiven Lysin (K) durch Alanin (A) ersetzt, was zu einer Reduktion der Aktivität des Kanals um ca 75% führte (Berkower und Michaelis, 1991).

Verschiedene Experimente deuten an, dass der entsprechende (Walker A) Lysinrest wirkt, indem es entsprechend der Triphosphatkette des MgATP die benötigte Konformation für die Katalyse annimmt und die Interaktion des Substrates mit der aktiven Seite gewährleistet. Ein Aminosäureaustausch durch Arginin (R) hemmt wegen einer lokalen Konformationsänderung dieses Vorgehen (Azzaria et al., 1989).

Während ein anderer Ersatz für den Lysinrest nach wie vor eine Interaktion mit Nukleotiden zulässt, hebt ein Austausch durch Asparagin (N) die Nukleotidbindung auf (Panagiotidis et al., 1993; Shyamala et al., 1991).

Ein konservativer Aminosäureaustausch an dem Walker B-Motiv zeigt im Allgemeinen eine Aufhebung der ATPase-Aktivität sowie der Nukleotidbindung (Koronakis et al., 1995, Panagiotidis et al., 1993; Shyamala et al., 1991).

### **1.4.2 Die Mutation KR-KR**

Die Mutation KR-KR wurde bereits an anderen ABC-Proteinen beschrieben, z.B. durch Azzaria et al., 1989 an *mdr1*. Hierbei handelt es sich um eine ATP-abhängige Pumpe, deren Funktion auf der Bindung und Hydrolyse von MgATP beruht.

Bei der KR-KR-Mutation handelt es sich um einen konservativen Aminosäureaustausch, das bedeutet, dass eine Aminosäure durch eine gleichgeladene Aminosäure ausgetauscht wird.

Ein konservativer Aminosäureaustausch von Lysin (K) durch Arginin (R) hebt die ATP-Hydrolyse auf (Delepelaire, 1994; Schneider et al., 1994), die Nukleotidbin-

dung bleibt aber erhalten (Azzaria, 1989; Schneider et al., 1994). Dabei reichte die Mutation in einer der beiden NBFs aus, um das Protein zu inaktivieren, was annehmen lässt, dass die beiden Hälften von *mdr1* nicht von einander unabhängig sind (Azzaria et al., 1989).

An SUR2B konnten Schwanstecher und Kollegen zeigen, dass die KR-Mutation an NBF<sub>1</sub> und NBF<sub>2</sub> (also K707R und K1348R) jeweils die <sup>3</sup>H-P1075 Bindung an SUR (fast) vollständig aufhob (Schwanstecher et al., 1998). Auch an dem Transporter STE6 wurde eine K398R-K1093R-Mutation durchgeführt. In dieser Studie wurde in beiden Fällen die Transportfähigkeit des Kanals vermindert. Während die N-terminale Mutation (K398R) die Aktivität auf 1% der Aktivität des Wildtyps reduziert, weist die C-terminale Mutation (K1093R) mit 15% Restaktivität eine geringere Wirkung auf (Berkower und Michaelis, 1991). Vergleicht man das mit der KA-Mutation, ist die Restaktivität der KA-Mutation mit ca 25% größer als die der KR-KR-Mutation (1% / 15%). Das ist durchaus interessant, da bei der KA-Mutation das positiv geladene Lysin durch ein ungeladenes Alanin ersetzt wird. Das lässt annehmen, dass Veränderungen in der Struktur durch Aminosäureaustausch komplex sind und auch eine Behinderung und nicht nur eine Inaktivierung zur Folge haben können (Berkower und Michaelis, 1991).

## 1.5 Fragestellung der Arbeit

Nachdem die Mutation KRKR schon bei einigen anderen ABC-Proteinen (siehe Kap. 1.4.2) beschrieben wurde, soll in dieser Arbeit herausgefunden werden, welche Auswirkungen die KRKR-Mutation in den Nukleotidbindungsfalten (NBF) des SUR2B, also SUR2B(K707R, K1348R), hat. Dabei sollen folgende Fragen beantwortet werden:

Welchen Einfluss hat die Mutation auf die Bindung von Glibenclamid (GBC)?

Welchen Einfluss hat die Mutation auf die Bindung von P1075-Bindung?

Welche Wirkung hat MgATP auf die GBC- und P1075- Bindung an der KRKR-Mutante?

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden Rezeptorbindungsstudien mit  $^3\text{H}$ -GBC als Radioligand an SUR2B(YS) und SUR2B(YS)KRKR-Membranen durchgeführt.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Übersicht

Die Ergebnisse, die in dieser Arbeit dargestellt werden, wurden durch Radioligandbindungsstudien gewonnen. Bei diesem Verfahren bindet eine radioaktiv markierte Substanz (hier  $^3\text{H}$ -GBC) an bestimmten Rezeptoren der Plasmamembran. Voraussetzungen für solche Bindungsstudien sind eine ausreichende Affinität des Radioliganden zum Rezeptor, sowie eine entsprechende spezifische Radioaktivität. Zusätzlich muss das Rezeptormaterial in ausreichender Menge und adäquater Reinheit vorliegen.

Der Ablauf dieser Radioligandbindungsstudien geht folgendermaßen von statten:

Zunächst werden Radioligand und Rezeptor unter Standardbedingungen, was pH, Dauer und Temperatur betreffen, inkubiert. Anschließend werden membrangebundener und nicht gebundener Radioligand durch Filtration getrennt und dann die Menge des gebundenen Radioliganden mittels eines Flüssig-Scintillators in einem Betazähler gemessen.

Bei dieser Arbeit wurde mit Gleichgewichtsexperimenten gearbeitet. Diese Unterform der Bindungsuntersuchungen basiert auf dem Massenwirkungsgesetz, und somit auf dem Erreichen der Gleichgewichtslage. Hierbei muss darauf geachtet werden, dass die Inkubationszeit so gewählt wird, dass nach deren Ablauf keine beobachtbaren zeitlichen Veränderungen der Bindung mehr auftreten.

Gleichgewichtsexperimente werden hauptsächlich in Sättigungs- und Kompetitions-Experimente unterschieden. Eine genauere Beschreibung dieser Verfahren erfolgt in Kapitel 2.7.

Die anschließende Analyse der Ergebnisse erfolgte anhand eines theoretischen Modells der Rezeptor-Ligand-Interaktion, auf das in Kapitel 2.8 genauer eingegangen wird.

Teilweise war auch, vor allem zur vergleichenden Auswertung, die Bestimmung der in den Versuchsansätzen vorhandenen Rezeptorkonzentration notwendig. Was durch die quantitative Proteinbestimmung nach Lowry (Lowry et al., Kapitel 2.5) geschah.

Zum Schluss wurden die Daten auf statistische Relevanz geprüft (s. Kapitel 2.8). Das Rezeptormaterial wurde durch Kultivierung (s. Kapitel 2.4.1) und anschließende Membranaufbereitung (s. Kapitel 2.4.5) von mit SUR-Subtypen (hier SUR2B(YS) und SUR2B(YS)KRKR) transfizierten humanen embryonalen Nierenzellen (Human Embryonal Kidney Cells, HEK293-Zellen) gewonnen.

## 2.2 Chemikalien

**Tabelle 2:** Verwendete Chemikalien

| Substanzen                   | Hersteller                           |
|------------------------------|--------------------------------------|
| ATP-Na <sub>2</sub>          | Boehringer, Mannheim                 |
| CuSO <sub>4</sub>            | Merck & Co. Inc., USA                |
| DMSO                         | Merck & Co. Inc., USA                |
| EDTA-Na <sub>2</sub>         | Fluka, Buchs, Schweiz                |
| EGTA                         | Sigma, München                       |
| Ethanol 99% p.a.             | Merck & Co. Inc., USA                |
| FBS                          | Invitrogen, Auckland, Großbritannien |
| Folin-Ciocalteu-Reagenz (2M) | Fluka, Buchs, Schweiz                |
| Geneticinsulfat              | Invitrogen, Auckland, Großbritannien |
| Gentamycin                   | Invitrogen, Auckland, Großbritannien |
| Glibenclamid                 | Sigma Aldrich, Taufkirchen           |
| HCl                          | Fluka, Buchs, Schweiz                |
| HEPES-Puffer                 | Sigma, München                       |

|  |  |
|--|--|
| $^3\text{H}$ -Glibenclamid                 | PerkinElmer Life Science, USA              |
| $\text{K}^+/\text{Na}^+$ -Tartrat          | Merck & Co. Inc., USA                      |
| KCl  | Merck & Co. Inc., USA                      |
| MEM<br>+ L-Glutamin<br>+ Earle's Salze     | Invitrogen, Auckland, Großbritannien       |
| $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ | Merck & Co. Inc., USA                      |
| $\text{Na}_2\text{CO}_3$                   | Merck & Co. Inc., USA                      |
| NaCl                                       | Merck & Co. Inc., USA                      |
| NaOH                                       | Merck & Co. Inc., USA                      |
| P1075                                      | Leo Pharmaceuticals,<br>Ballerup, Dänemark |
| TRIS                                       | Fluka, Buchs, Schweiz                      |
| Ultima Gold                                | Packard Instruments, USA                   |

## 2.3 Puffer

Alle Puffer wurden bei 6°C im Kühlraum aufbewahrt.

### Hypotoner Puffer

10 mM Hepes

1 mM EGTA

Die Substanzen werden in aqua bidest gelöst und der pH-Wert bei einer Temperatur von 6°C auf 7.4 eingestellt.

Dieser Puffer wird zur Lyse der HEK293B-Zellen und der Herstellung einer Zellmembransuspension verwendet.

### **Isotoner Inkubationspuffer**

5 mM Hepes

139 mM NaCl

5 mM KCl

Nachdem die Substanzen in aqua bidest gelöst waren, wurden 2 verschiedene Puffer durch unterschiedliche Einstellung des pH-Wertes hergestellt.

Der eine wurde auf Eis bei 0 °C auf einen pH-Wert von 7.4 eingestellt und wurde für die Resuspension und das anschließende Einfrieren der Membranen verwendet. Der andere Puffer wurde bei einer Temperatur von 37 °C auf einen pH-Wert von 7.4 eingestellt. Dieser diente der Inkubation der Rezeptoren und Liganden, sowie der Herstellung von Stammlösungen und Verdünnungsreihen

### **Puffer zur Herstellung von Geneticin-Aliquots**

100 mM HEPES

HEPES wurde in aqua bidest gelöst und der pH-Wert bei 37 °C auf 7.3 eingestellt. Um die Sterilität zu erreichen wurden die Aliquots anschließend autoklaviert (60 min bei 121 °C und 4 bar). Anschließend wurden sie bei -20 °C aufbewahrt.

### **Waschpuffer**

50 mM Tris-Puffer

154 mM NaCl

Zuerst wurde eine zehnfach konzentrierte Stammlösung mit aqua monodest hergestellt, die für die Versuche 1:10 verdünnt und anschließend mit HCl auf einen pH-Wert von 7.4 bei 6 °C eingestellt wurde.

Der Waschpuffer diente der Trennung des gebundenen von dem nicht gebundenen Radioliganden bei der Filtration während des Versuches.

**Kulturmedium für die HEK293B-Zelllinie**

90% MEM ( Minimum Essential Medium)

10% hitzeinaktiviertes fötales Rinderserum (FBS)

20 µg/ml Gentamycin

Im Folgenden werden die Zusammensetzungen der einzelnen Bestandteile beschrieben:

**Minimum Essential Medium mit Earle's Salzen und mit L-Glutamin**

Zusammensetzung:

Anorganische Salze(mg/ml): CaCl<sub>2</sub> (264); KCl (400); MgSO<sub>4</sub> \* 7 H<sub>2</sub>O (200); NaCl (6800); NaHCO<sub>3</sub> (2200); NaHPO<sub>4</sub> \* 2 H<sub>2</sub>O (158)

Andere Komponenten(mg/ml): D-Glucose(1000); Phenolrot(10)

Aminosäuren(mg/ml): L-Arginin \* HCl (126); L-Cystein (24); L-Glutamin (292); L-Histidin (42); L-Isoleucin (52); L-Lysin \* HCl(73); L-Methionin(15); L-Phenylalanin (32); L-Threonin (48); L-Tryptophan (10); L-Thyrosin (36); L-Valin (46)

Vitamine(mg/ml): D-Ca-Pantothenat (1); Cholinchlorid (1); Folsäure (1); i-Inositol (2); Nikotinamid (1); Pyroxidal \* HCl (1); Riboflavin (0.1); Thiamin \* HCl (1)

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

**Hitzeinaktiviertes fötales Rinderserum (FBS)**

Dem Kulturmedium wird FBS zugegeben, da dieses mitogene Faktoren enthält und somit das Wachstum der Zellen anregt. Um aber eventuelle Restaktivitäten von Serumproteasen zu unterbinden, wird eine Hitzeinaktivierung durchgeführt. Dazu wird

die, bis zu diesem Zeitpunkt bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagerte, Flasche (500ml) aufgetaut und 90 Minuten in einem  $55^{\circ}\text{C}$  warmen Wasserbad hitzeinaktiviert. Danach wird die Flasche bis zu ihrer jeweiligen Verwendung im Kühlschrank gelagert.

### Gentamycin

Gentamycin, ein Aminoglykosidantibiotikum, ist ein wirksames Antibiotikum in der Zellkultur, da es ein breites Wirkspektrum (wirkt gegen Stämme von Proteus, Staphylokokkus, Pseudomonas und mehrere Mykoplasmen) und gleichzeitig keine Zelltoxizität aufweist.

Gentamycin ist in einem pH-Bereich von 2-10 in Gewebekulturmedien bei  $37^{\circ}\text{C}$  15 Tage stabil. Im Weiteren ist es bei allen Temperaturen beständig und kann auch autoklaviert werden.

Die Konzentration der gelieferten Stammlösung betrug 50 mg/ml. Das Gentamycin wurde in 6 ml-Aliquots angesetzt ( $c = 2 \text{ mg/ml}$ ; anschließende Verdünnung der Stammlösung auf die gewünschte Konzentration mit sterilem aqua bidest), bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt und zur Herstellung des Kulturmediums im Wasserbad auf  $37^{\circ}\text{C}$  erwärmt.

### Geneticin (G418 Sulfat)

Geneticin gehört ebenfalls zu den Aminoglykosid-Antibiotika. Bakterien besitzen zwei dominante Resistenzgene, die für Aminoglykosid-Phosphotransferase 3'(I) und Aminoglykosid-Phosphotransferase 3'(II) kodieren. Diese können auch in eukaryontischen Zellen exprimiert werden. Kommt es zur Aufnahme und Expression nur einer der beiden Gene führt dies in der Folge schon zu einer Geneticin-Resistenz in den Zellen.

Bei der Gewinnung der unterschiedlichen SUR-Subtypen für die Versuche wurde ein Plasmid angewendet, das zum einen die cDNA für die  $\beta$ -Untereinheit des  $K_{\text{ATP}}$ -Kanals und zum anderen ein Resistenzgen für Geneticin enthielt. Dadurch wurde erreicht, dass alle Zellen, die erfolgreich den SUR-Subtyp exprimierten gleichzeitig eine Geneticin Resistenz aufwiesen, und somit eine Selektion von SUR-exprimierenden und nicht-SUR-exprimierenden Zellen statt fand.

Welche Mengen an Geneticin benötigt werden ist vom Zellzyklus und der Zellphase abhängig. Eine sich teilende, nicht resistente Zelle wird im Allgemeinen eher von Geneticin beeinträchtigt als eine nicht resistente ruhende Zelle. Jedoch kann es noch drei bis sieben Tage dauern bis der Zelltod eintritt.

Die Substanz wurde in sterilem HEPES-Puffer (100 mM; pH = 7.3 bei 37°C) gelöst (30 mg/ml), in 1 ml Eppendorf-Gefäße aliquotiert und im Gefrierfach bei -20°C aufbewahrt.

Eingesetzt wurde Geneticin im Zellkulturmedium in einer Konzentration von 300 µg/ml (100 µl Stammlösung der Konzentration 30 mg/ml auf 10 ml Kulturmedium).

### **Medium zur Kultivierung von HEK293-Zellen:**

Zellkultur Standard Medium (ZSM):

MEM 500 ml

FBS 56 ml

Gentamycin (2 mg/ml) 5.6 ml

Die einzelnen Komponenten wurden unter sterilen Bedingungen (Laminar Flow, Sterilarbeitsbank) zusammenpipetiert und bei 6°C im Kühlschrank aufbewahrt. Bevor man das Medium zu den Zellen hinzufügte wurde dieses im Wasserbad auf 37°C erhitzt.

### **Medium zum Einfrieren von Zellen**

Gefriermedium A

MEM 60%

FBS 40%

Gefriermedium B

MEM 80%

DMSO 20%

Nachdem Gefriermedium A und B zu gleichen Anteilen gemischt wurden, konnten die Zellen in einer Endkonzentration von 20% FBS und 10% DMSO eingefroren werden.

### **Medium zum Auftauen von Zellen:**

Hierzu wurde ZSM verwendet, das auf 37°C erwärmt wurde.

### **Stammlösungen für die Proteinbestimmung nach Lowry:**

Lowry A:

2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in 0.1 M NaOH

Lowry B:

1% CuSO<sub>4</sub> in aqua bidest

Lowry C:

2% K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup>-Tartrat in aqua bidest

Lowry D:

Folin-Ciocalteu-Reagenz (2 M)

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

Lowry E

Lowry A 98 Teile

Lowry C 1 Teil

Lowry B 1 Teil

Die Reihenfolge A-C-B muss eingehalten werden, um ein Ausfallen der Substanzen zu verhindern.

Lowry F

Diese Reagenz besteht aus Lowry D und aqua bidest im Verhältnis 1:1

Lowry E und F sollten jeweils kurz vor der Proteinbestimmung frisch angesetzt werden.

## 2.4 HEK293-Zellen

Die HEK293-Zellen stammen aus menschlichen embryonalen Nierenzellen, die durch das DNA-haltige Adenovirus Typ 5 tumorös transformiert und dadurch immortalisiert wurden. Sie wurden durch das DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH), Braunschweig, Deutschland (Kat.-Nr. DSMACC305) bezogen.

Sämtliche Arbeiten mit den Zellen sowie das Herstellen der Membranen wurden freundlicherweise von Frau Petra Kühner übernommen.

### 2.4.1 Kultivierung der Zellen

Alle Arbeitsvorgänge mit lebenden Zellen wurden unter keimarmen Bedingungen an einer Sterilwerkbank mit laminarer Luftströmung (laminar flow, Hera Safe, Heraeus Instruments, Deutschland) durchgeführt. Zur Kultivierung verwendete man sterile Petrischalen (94 mm Durchmesser, Greiner 94/16, Frickenhausen) mit 10 ml Zellkultur Standardmedium (90% MEM, 10% FBS, 20µg/ml Gentamycin), die bei 37°C in mikroaerophiler Atmosphäre (5% CO<sub>2</sub>, 95% relative Luftfeuchtigkeit) des Zellkulturschranks (Heraeus Instruments, Deutschland) gelagert wurden.

Erreichte man eine Konfluenz der Zellen von 60-80% pro Schale (nach circa 3-5 Tagen), wurden diese im Verhältnis 1:5 passagiert und damit weitervermehrt. Während diesem Vorgang wurde das Medium, das hinsichtlich der Nährstoffe „verbraucht“ war, aus der Schale abgesaugt, frisches, auf 37°C erwärmtes Medium (ZSM) zugegeben und die Zellen mit einer 1 ml-Pipette vom Boden der Kulturschale abgelöst. Jeweils 1ml der abgelösten Zellen wurde in eine neue Schale gegeben und das Volumen pro Schale mit frischem und warmem Medium zu 10 ml aufgefüllt. Bei permanent transfizierten Zellen wurde jeweils noch 100 µl Geneticin zur Selektion SUR-exprimierender Zellen hinzugefügt.

### 2.4.2 Auftauen

Die Zellen werden in einem Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff bei  $-196^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Dieses Röhrchen wurde in einem Wasserbad ( $37^{\circ}\text{C}$ ) angetaut bis gerade noch ein dünner Eiskern im Röhrchen zu erkennen war. Das Pellet aus den Zellen war nun sichtbar und konnte unter der Sterilwerkbank in 20 ml Kulturmedium überführt werden. Dabei musste möglichst schnell vorgegangen werden um den Kontakt der Zellen mit dem 10% DMSO enthaltenden Gefriermedium bei diesen Temperaturen so kurz wie möglich zu halten. Die Zellen wurden darauf bei  $500 \times g$  für 2-3 Minuten zentrifugiert (Biofuge primo, Heraeus Instruments über Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau). Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt, woraufhin eine Resuspendierung des Pellets in 4 ml Kulturmedium ( $37^{\circ}\text{C}$ ) erfolgte. Zum Schluss wurde in einer Petrischale 6 ml Kulturmedium vorgelegt zu der man die Suspensionslösung (4 ml) hinzufügte.

Nach 24 Stunden wurde das Kulturmedium zum ersten Mal gewechselt und nach drei bis vier Tagen konnten die Zellen erstmalig passagiert werden. Dafür mussten noch  $100 \mu\text{l}$  Geneticin pro Schale hinzugefügt werden.

### 2.4.3 Einfrieren (Kryokonservierung)

Zum Einfrieren wurden Kulturschalen verwendet, die eine Zelldichte von  $> 70\%$  (7-10 Millionen Zellen pro Schale) aufwiesen. In einem Kryoröhrchen (Cryos, Greiner Labortechnik) wurde das Zellmaterial einer Kulturschale eingefroren.

Das Medium wurde aus der Kulturschale entfernt und die Zellen mit 4 ml Gefriermedium A (siehe Kap. 2.3; S.9) von dem Schalenboden abgelöst. Anschließend wurden sie in ein Falcon-Tube überführt und für zwei bis drei Minuten bei  $500 \times g$  zentrifugiert. In einem Kryoröhrchen wurden  $500 \mu\text{l}$  Gefriermedium B vorgelegt, in das das Pellet resuspendiert und mit dem Gefriermedium B (siehe Kap. 2.3; S.9) gemischt wurde, nachdem der Überstand aus dem Zentrifugenröhrchen abgesaugt worden war. Auch jetzt muss der Kontakt der Zellen, wie beim Auftauen, mit DMSO gering gehalten werden, da es bei Raumtemperatur toxisch wirkt. Deshalb mussten die Zellen nach Zugabe der Zellsuspension zum Gefriermedium B sofort auf Eis herabgekühlt werden. Bevor man die endgültige Aufbewahrungstemperatur von

–196 °C (in flüssigem Stickstoff) erreichen konnte, musste das Kryoröhrchen bei –80 °C vorgefroren werden.

## 2.4.4 Transfektion

### 2.4.4.1 Allgemeines

Unter Transfektion versteht man das Einbringen von Fremd-DNA in eine eukaryotische Zelle. Dabei unterscheidet man zwischen einem vorübergehenden Einbau des Plasmids (transiente Transfektion) und einem dauerhaften Einfügen in das Genom (permanente Transfektion). In dieser Arbeit wurden beide Verfahren angewendet: Die permanente Transfektion für SUR2B(YS) und die transiente Transfektion für SUR2B(YS)KRKR.

### 2.4.4.2 Verwendete Plasmide

**Tabelle 3:** Plasmide

| Rezeptor      | Spezies | Vektor      | Vektorgröße<br>in kb | Ursprunglabor                    |
|---------------|---------|-------------|----------------------|----------------------------------|
| SUR2B(YS)     | Maus    | pcDNA3.1(+) | 11.4                 | U.Quast / A.<br>Hambrock         |
| SUR2B(YS)KRKR | Ratte   | pcDNA3.1(+) | 10.5                 | Schwanstecher/Quast<br>(Winkler) |

### 2.4.4.3 Vorgehen bei transienter Transfektion

Bei diesem Verfahren wurden Zellkulturen mit einer Konfluenz von >90% verwendet. Am Vortag wurde das Standardkulturmedium gegen ein Gentamycinfreies Medium (MEM + 10% FBS) ausgewechselt.

Am Transfektionstag wurden pro Zellschale 2ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße mit jeweils 750 µm vorgewärmtem (37 °C) OptiMEM befüllt. In das eine Reaktionsgefäß wurde die DNA in das andere Lipofectamin2000<sup>TM</sup>-Reagenz zugegeben und 5 Minuten inkubiert. Anschließend wurde das DNA-Gemisch zu dem Lipofectamin-

Gemisch hinzugefügt (nicht umgekehrt), vorsichtig gemischt und weitere 20 Minuten inkubiert. Wodurch die Bildung der DNA-Lipofectamin2000-Mizellen ermöglicht wurde. Nach der Inkubation wurden die zu transfizierenden Zellen in ihren Kulturschalen aus dem Brutschrank entnommen, das Volumen des Nährmediums um 4 ml reduziert und mit dem inkubierten Transfektionsgemisch versetzt. Bis eine mikrosomale Membranfraktion hergestellt werden konnte wurden die Zellen zwei Tage im Brutschrank inkubiert.

Bei der Transfektion wurden 10 µg DNA pro Schale verwendet sowie entsprechend 37.5 µl Lipofectamin2000<sup>TM</sup>-Reagenz.

#### *2.4.4.4 Vorgehen bei permanenter Transfektion*

Um ständige Transfektionen zu umgehen griff man bei SUR2B(YS) auf die permanente Transfektion zurück.

Das Vorgehen war das gleiche wie bei der transienten Transfektion. Am nächsten Tag wurde aber zusätzlich Geneticin (s. Kap.2.3) in die Kulturschalen hinzugefügt. Dadurch wurde erreicht, dass nur diese Zellen überleben, die eine Geneticinresistenz aufweisen. Das wiederum können nur Zellen, die die transfizierten Plasmide dauerhaft durch Replikation in ihre chromosomale DNA integriert haben. Dadurch waren diese Zellen in der Lage dauerhaft zu replizieren und zu exprimieren.

Verwendet wurde Aminoglycosid-Geneticin in Konzentrationen von Anfangs 727 µg/ml, die dann von Versuch zu Versuch bis auf 297 µg/ml gesenkt wurden.

### **2.4.5 Herstellung einer mikrosomalen Membranfraktion**

Wenn die Zellen die gewünschten SUR-Proteine exprimiert hatten, konnten die Membranen für die Radioligand-Bindungsstudien hergestellt werden.

Für die Präparation wurden nur Zellkulturschalen verwendet, die eine Konfluenz von mindestens 60% aufwiesen. Ein Teil des Mediums wurde abgesaugt, der Rest diente zum Ablösen der Zellen. Auf diese Art und Weise konnten bis zu 12 Schalen in eine Falcon-Tube überführt werden, das anschließend bei Zimmertemperatur zentrifugiert wurde (500 \* g; 5min). Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und

das durch die Zentrifugation entstandene Zellpellet mit hypotonem Puffer lysiert (4 ml hypotoner Puffer pro Schale), um dann bei 0°C und 100 000 \* g 30 Minuten lang ultrazentrifugiert zu werden. Das Pellet konnte anschließend wieder in isotonem Inkubationspuffer (pH 7.4 bei 0°C) resuspendiert (0.3 – 1ml pro Schale), in 2 ml-Eppendorf-Cups aliquotiert und bei -80°C eingefroren werden.

Zu Beginn der Radioligand-Bindungsversuche wurde die benötigte Membranfraktion unter Eiskühlung mit einem Polytron-Homogenisator (PT 3000, Kinematika AG, Schweiz) 2 Mal für etwa 10 Sekunden bei 12 000 U/min homogenisiert, damit keine größeren Membranklumpen mehr vorhanden waren. Um das für den jeweiligen Versuch benötigte Volumen zu erreichen wurde schließlich noch isotoner Inkubationspuffer (pH 7.4 bei 37°C) in entsprechender Menge hinzugefügt.

## 2.5 Proteinbestimmung

Um die Konzentration des in den Bindungsversuchen eingesetzten Rezeptorproteins zu bestimmen, bediente man sich der Proteinbestimmung nach Lowry (Lowry et al., 1951). Dabei handelt es sich um eine Methode, die auf zwei Reaktionsschritten beruht. Im ersten Schritt, der sogenannten Biuretreaktion, bildet sich im alkalischen Milieu ein blauvioletter Komplex zwischen den  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen (Lowry E, Kap. 2.3) und den Peptidbindungen aus. Im zweiten Schritt können diese  $\text{Cu}^{2+}$ -Proteinkomplexe die Folin-Ciocalteau-Reagenz (Lowry F, Kap. 2.3) reduzieren. Bei dieser Reaktion entsteht ein blauer Farbstoff, dessen Extinktion mittels eines Photometers bestimmt werden kann.

Um die richtige Proteinkonzentration zu bestimmen, wurde während der Bindungsversuche eine Probe aus der Membransuspension entnommen, die homogenisiert und auf das endgültige Volumen verdünnt worden war. Gleichzeitig wurde auch eine gleiche Menge an reinem Inkubationspuffer entnommen, um damit den Leerwert zu bestimmen. Zu beiden Proben wurde je nach verwendeter Membrankonzentration wässrige 0.1 M NaOH-Lösung dazugegeben (1:10 oder 1:20 verdünnt). Die zusätzliche Bestimmung des Leerwertes des Inkubationspuffers war notwendig, da die freie

Stickstoffgruppe von HEPES, das im Inkubationspuffer enthalten ist (Kap. 2.3), mit den Lowry-Reagenzien stark interferiert.

Zunächst wurden jeweils 200 µl der Proben (entweder Membranen oder Puffer enthaltend), die schon mit NaOH verdünnt waren, sowie eine Lösung von 200 µl 0.1 M NaOH für den Nullabgleich in jeweils eine Halbmikroküvette überführt und 1 ml Lowry E Lösung (Kap. 2.3) hinzugefügt. Nach fünfminütiger Inkubation erfolgte die Zugabe von 100 µl Lowry F Lösung und anschließendes Mischen der Ansätze, die daraufhin weitere 20 Minuten ohne Lichteinwirkung inkubiert wurden. Anschließend konnte in einem Spektralphotometer (Hitachi U-3.000) die optische Dichte ( $OD_{770}$ ) der Membran- und Puffersuspension bestimmt werden. Dafür wurde eine Wolframlampe mit der Wellenlänge von 770 nm verwendet und der Spalt wies eine Breite von 5 nm auf.

Der Unterschied zwischen der Extinktion der Membransuspension und des Inkubationspuffers ( $\Delta OD_{770}$ ) wurde durch folgende Formel:

$$\Delta OD_{770} = 0.1032 * m_{\text{Prot}}$$

zur Bestimmung der Proteinkonzentration verwendet. Voraussetzung dafür war, dass die Extinktion im linearen Bereich der Kalibrierungskurve lag. Konnte das nicht erreicht werden, kam eine größere Verdünnung der Proben zum Einsatz.

Dieser Berechnung lag, wie oben genannt, eine Kalibrierungskurve zu Grunde, für die eine Verdünnungsreihe von Rinderserumalbumin (BSA) in 0.1 M NaOH hergestellt, analog zu den Protein- und Pufferproben mit Lowry E und Lowry F inkubiert und anschließend photometrisch die Extinktion der einzelnen Verdünnungen bestimmt wurde. Wurden die  $OD_{770}$ -Werte gegen die vorgegebene BSA-Konzentration aufgetragen, ergab sich eine Kalibrierungskurve.

## 2.6 Technik und Durchführung der Radioligand-Rezeptor-Bindungsversuche („Bindungsversuch“)

### 2.6.1 Übersicht

Alle Ergebnisse dieser Dissertation wurden mit Hilfe der sogenannten Radioligand-Rezeptor-Bindung, kurz Bindungsversuch, erzielt. Dabei handelt es sich um eine Methode, mit der man die Rezeptorenzahl, die Affinität zwischen Rezeptor und Radioligand, als auch zu einem unmarkierten, kreuzreagierenden Liganden bestimmen kann.

In dieser Arbeit wurden nur Gleichgewichtsexperimente, genauer gesagt Konkurrenzexperimente als Versuchsvariante benötigt. Dieses Prinzip beruht auf der Konkurrenz eines radioaktiv markierten und eines nicht-markierten Ligandens um die gleiche Rezeptorbindungsstelle. Hierdurch erzielt man in erster Linie Informationen über die halbmaximale Inhibitionskonzentration ( $IC_{50}$ ) des unmarkierten Liganden sowie über die Kooperativität der Bindung. Kennt man die Konzentration und die Affinität ( $K_D$ ) des Radioliganden kann man über  $IC_{50}$  die Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) des unmarkierten Liganden nach der Cheng-Prusoff-Korrektur (Kap. 2.8.1) berechnen.

Kommt es bei den Konkurrenzversuchen nicht zu einer vollständigen Verdrängung des Radioliganden durch den unmarkierten Liganden, entstehen Hemmkurven, die auf eine potentielle Heterogenität der Bindungsstelle hinweisen. Das bedeutet also, dass der unmarkierte Ligand an einer anderen Stelle bindet als der Radioligand. Dadurch kommt es zu einer Konformationsänderung, die zu einer Verschlechterung der Bindung (negativ-allosterisch) führen kann. Aber auch eine Verbesserung der Bindung des unmarkierten Liganden (positiv-allosterisch) ist möglich.

### 2.6.2 Gewinnung von Rezeptormaterial

Die Herstellung der Membranen mit dem Rezeptormaterial erfolgte wie in Kapitel 2.4 beschrieben. Aufbewahrt wurden die Membranen im Gefrierschrank bei  $-80^\circ\text{C}$  in einem magnesiumfreien Inkubationspuffer (pH 7.4 bei  $4^\circ\text{C}$ ). Während der Homoge-

nisierung und bis zum Start der Inkubation wurde das Membranprotein auf Eis (0 °C) gehalten, um es vor Denaturierung zu schützen.

### 2.6.3 Inkubation

Die Radioligand-Bindungsreaktion wurde durch Zugabe der Membranpräparation zu dem auf Eis gekühlten Reaktionsgemisch gestartet. Der Reaktionsansatz setzte sich also folgendermaßen zusammen:

- 25 µl Radioligand
- 10 µl unmarkierter Ligand in entsprechender Konzentration / Lösungsmittelausgleich zur Bestimmung von  $B_{\text{tot}}$
- 750 µl Inkubationspuffer ( $\pm 1$  mM MgATP)
- 200 µl Membranpräparation

Bei der Hemmung der  $^3\text{H}$ -GBC Bindung durch MgATP lag ein leicht variiertes Reaktionsansatz vor:

- 25 µl Radioligand
- 10 µl unmarkierter Ligand (300 nM GBC) zur Bestimmung des NSB
- 200 µl Membranpräparation

MgATP in unterschiedlichen Konzentrationen; die Verdünnungsreihe wurde mit Inkubationspuffer hergestellt.

Der Rest auf 1010 µl wurde mit Inkubationspuffer aufgefüllt.

Die Reaktion lief in beiden Fällen in 2 ml-Eppendorf-Gefäßen ab, die in einem Wasserbad bei physiologischer Temperatur von 37 °C 15 Minuten inkubiert wurden. Die Inkubationszeit wurde so gewählt, dass sich ein Gleichgewicht einstellen konnte. Als Inkubationsmedium diente der in Kapitel 2.3 dargestellte isotone Inkubationspuffer, der auf einen physiologischen pH von 7.4 bei 37 °C eingestellt war.

### 2.6.4 Trennung von freiem und gebundenem Radioliganden

Nach Ablauf der Inkubationszeit musste der ungebundene, also frei vorliegende Radioligand von dem Radioligand-Rezeptor-Komplex durch Filtration getrennt werden.

Dafür wurden aus dem Reaktionsansatz (Volumen = 1 ml) jeweils drei Mal ein Aliquot von 300 µl entnommen und je in ein mit 8 ml eiskaltem Waschpuffer (Kap. 2.3) gefüllten Reagenzglas gegeben. Hierdurch wurde das Gleichgewicht, das während der Inkubation entstanden ist, fixiert. Sofort darauf folgte die Filtration in einer entsprechenden Apparatur über Glasfilter (Whatman GF/B) an denen mittels einer Membranpumpe (KNF Neuberger Typ N 026.2 AN.18) ein Vakuum erzeugt wurde. Die Poren der Glasfilter sind so gewählt, dass der freie Radioligand hindurchgeht, nicht aber der Radioligand-Rezeptor-Komplex. Um die im Glasfilter gebundene unspezifische Radioaktivität möglichst vollständig zu entfernen, wurde noch zwei weitere Male mit dem eiskalten Waschpuffer nachgespült.

Durch die Entnahme von drei Aliquots pro Ansatz kam es zu einer dreifach Bestimmung pro Wert, aus der dann das arithmetische Mittel gebildet wurde.

### 2.6.5 Messung der Radioaktivität

Liganden, die mit dem Radioisotop Tritium ( $^3\text{H}$ -) markiert sind, emittieren Betastrahlung. Diese kann mittels eines Flüssig-Scintillators in einem Betacounter gemessen werden (TRICARB<sup>®</sup> Liquid Scintillation Analyser 2000CA, Packard).

Dafür wurden die einzelnen Filter in ein spezielles Messröhrchen (Super Polyethylene Vial 20 ml; Perkin Elmer) gegeben, mit jeweils 200 µl aqua bidest benetzt und anschließend pro Vial mit 4.5 ml Szintillationsflüssigkeit Ultima Gold) aufgefüllt. Die Zugabe von 200 µl aqua bidest war notwendig, da die Filter im trockenen Zustand die Szintillationsflüssigkeit nicht richtig aufnehmen können. Das Herauslösen der Radioaktivität aus den Glasfiltern dauert trotzdem einige Stunden, so dass nur Zählungen des Counters berücksichtigt werden konnten, die mindestens acht Stunden nach dem Auffüllen mit Ultima Gold statt gefunden haben.

54% der radioaktiven Zerfälle pro Minute (dpm) können durch den Betacounter detektiert werden. Dabei gilt folgende Gleichung:

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

Gleichung (1)

Um aus den resultierenden dpm Konzentrationseinheiten zu bekommen, bediente man sich folgender Formel:

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

Gleichung (2)

c = Konzentration in mol/l

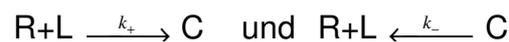
SA = spezifische Aktivität des Radioliganden in Ci/mmol

V = Filtrationsvolumen aus dem Reaktionsansatz in ml (0.3 ml)

1 Curie (Ci) =  $2.2 * 10^{12}$  dpm/min

## 2.7 Mathematische Beschreibung der Rezeptorbindungsstudien

Als Grundlage für die Rezeptorbindungsstudien wird die Bindung eines Radiolabels L an eine Klasse von Bindungsstellen angenommen, die nicht miteinander wechselwirken:



Gleichung (3)

Dabei gilt:

R = freie Rezeptorkonzentration

L = freie Ligandenkonzentration

C = Rezeptor-Ligand-Komplex

$k_+$  = Assoziationsgeschwindigkeit ( $M^{-1}s^{-1}$ )

$k_-$  = Dissoziationsgeschwindigkeit ( $s^{-1}$ )

Im Gleichgewicht gilt das Massenwirkungsgesetz:

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

Gleichung (4)

Dabei ist  $K_D$  die Gleichgewichtsdissoziationskonstante (mol/l)

Außerdem gelten die Massenbilanzen:

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

Gleichung (4a/4b)

Hierbei bezeichnet der Index  $_0$  die totale Konzentration, die sich aus der Summe der gebundenen und freien Konzentration ergibt.

Nach Möglichkeit werden die Experimente so angelegt, dass gilt:

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

Gleichung (4c)

Das bedeutet also, dass die gesamte Radioligandkonzentration deutlich höher ist, als die gesamte Rezeptorkonzentration. In der Praxis darf der Anteil der Radioliganden 5% der Gesamtkonzentration nicht übersteigen.

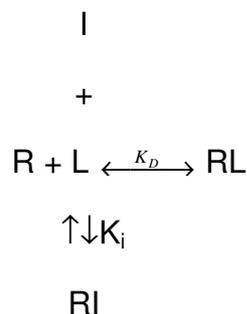
Die gesamte Bindung eines Radioliganden ( $B_{\text{tot}}$ ) kann man in die spezifische Bindung ( $B_S$ ), also die Bindung an spezifische Rezeptoren und die nichtspezifische Bindung (NSB), die an andere Bestandteile der Membranpräparation oder an die Glasfilter bindet, unterscheiden. Durch einen Überschuss an unmarkiertem Liganden, der die spezifische Bindung des Radioliganden vollständig verdrängt, wird der Wert für NSB extra bestimmt. Die spezifische Bindung berechnet sich dann folgendermaßen:

$$B_S = B_{\text{tot}} - \text{NSB}; B_S \equiv C$$

Gleichung(5)

### 2.7.1 Konkurrenzexperiment

Als Grundlage dient folgendes Reaktionsschema:



Gleichung (6)

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

Dabei wird angenommen, dass sich in der Präparation nur eine Klasse von Bindungsstellen befindet, wobei L und I in Konkurrenz um R stehen. Im Experiment wird die Abnahme von RL bei steigender Konzentration von I gemessen. Bei Reaktionsstart müssen R und I gleichzeitig zu dem Reaktionsansatz hinzugegeben, und die Inkubationszeit muss bei 37°C (s. Kap. 2.6) abgewartet werden. Durch die Datenauswertung ergibt sich eine typische Hemmkurve. Befinden sich die beiden Reaktionen im Gleichgewicht (ausreichend lange Inkubationszeit), gilt das Massenwirkungsgesetz:

$$K_D = \frac{R \cdot L}{RL} \text{ bzw. } K_i = \frac{R \cdot I}{RI}$$

Gleichung (7) a bzw. b

Da die Versuche so angelegt sind, dass die Bedingung  $R_0 \ll L_0, I_0$  gilt, muss nur die Massenbilanz für den Rezeptor berücksichtigt werden. Durch Umformung ergibt sich dann:

$$RL = R_0 \underbrace{\frac{L/K_D}{1+L/K_D}}_{RL(I=0)} * \underbrace{\frac{K_i(1+L/K_D)}{K_i(1+L/K_D)+I}}_{\xrightarrow{I \rightarrow 0} 1}$$

Gleichung (8)

Bei der Kurve gibt der Term  $K_i(1+L/K_D)$  den Mittelpunkt der Kurve an, da bei einer Inhibitorkonzentration von  $I = K_i(1+L/K_D)$  die Kurve um 50% abgefallen ist. Dieser Term wird als  $IC_{50}$  bezeichnet. Die Beziehung zwischen  $IC_{50}$  und  $K_i$  (Cheng-Prusoff-Gleichung (Cheng und Prusoff, 1973)) erlaubt die Berechnung von  $K_i$  bei gegebenem  $K_D$  und  $L$ , so dass gilt:

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

Gleichung (9)

Für die homologe Konkurrenz, also die Verdrängung des Radioliganden durch sein unmarkiertes Analogon gilt:

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

Gleichung (10) a bzw. b

Will man nun die Cheng-Prusoff-Gleichung mit einbeziehen, kann man die Hemmkurve beschreiben als

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

Gleichung (11) a und b

Der Anteil an Rezeptoren, die mit Liganden besetzt sind, wird als Sättigungsgrad  $y$  bezeichnet und folgendermaßen bestimmt:

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

Gleichung (12)

Woraus sich dann die Gesamtrezeptorenzahl, also die maximale Bindungskapazität,  $B_{\max} \equiv R_0$ , berechnen lässt (mit  $C \equiv B_s$ )

$$B_{\max} = \frac{1}{y} * B_s = \frac{L+K}{L} * C$$

Gleichung (13)

### 2.7.2 Verallgemeinerung der Bindungsisotherme nach Hill

Gelegentlich kann es vorkommen, dass sich die Bindungsisotherme entgegen der Gleichung 11a/b flacher oder steiler darstellt. Das kann vor allem dann vorkommen, wenn der unmarkierte und der markierte Ligand ein nicht-kompetitives oder kompliziertes Bindungsverhalten aufweisen. In solchen Fällen kann die oben genannte Gleichung 11 durch die Einführung eines Exponenten (Hill-Koeffizient =  $n_H$ ) verallgemeinert werden. Es gilt dann:

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

Gleichung (14)

Dabei gilt:

$B_s(0) = B_s$  bei Inhibitorkonzentration  $I = 0$  ( $pI \rightarrow +\infty$ )

Der Hill-Koeffizient erlaubt folgende Aussagen über die Radioligandbindung:

$n_H = 1$ : übliche Bindungsisotherme; es liegt nur eine Klasse von Bindungsstellen vor, die nicht miteinander interagieren.

$n_H > 1$ : positive Kooperativität; mehrere Ligandenmoleküle binden mit steigender Affinität an den Rezeptor

$n_H < 1$ : negative Kooperativität; Durch die Bindung des ersten Liganden können weitere Liganden nur erschwert binden.

In der experimentellen Praxis liegen meist verschiedene Rezeptorklassen in einer Membranpräparation vor. Diese unterscheiden sich aber in ihrer Affinität für den Liganden nicht stark genug (weniger als der Faktor 100), so dass sie nicht deutlich aufgelöst werden können und die Hemmkurve flach abfällt.

## 2.8 Datenauswertung und Statistik

### 2.8.1 Analyse der Bindungskurven

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

$$y = \frac{A}{1 + 10^{n_H (pIC_{50} - pI)}} + (100 - A)$$

Gleichung (15)

Dabei gilt:

$y$  = %B<sub>s</sub> (% der spezifischen Bindung)

$A$  = Amplitude (maximaler Effekt der Sättigung)

$A = 100$  → vollständige Hemmung / Verdrängung

$pI$  =  $-\log I$ ; wobei  $I$  die Konzentration des homologen beziehungsweise heterologen Inhibitors bezeichnet.

$pIC_{50}$  =  $-\log IC_{50}$ , wobei  $IC_{50}$  die halbmaximale Inhibitionskonzentration darstellt und den Mittel- bzw. Wendepunkt der Hemmkurve markiert.

$n_H$  = Hill-Koeffizient

In den Fällen, in denen galt:  $A \sim 100\%$  und  $n_H \sim 1$ , wurden diese Werte als Konstanten in die Gleichung eingesetzt, um die Fehler der verbleibenden Parameter zu reduzieren.

Die Anpassung erfolgte nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate mit Hilfe des Programms Sigma Plot 9.0 / Sigma Plot 2000 (SPSS Science, Chicago, USA).

## 2.8.2 Statistik

Da die Amplituden der Bindungskurven und die entsprechenden  $pIC_{50}$ -Werte einer Normalverteilung (Christopoulos, 1998) folgen, wurden zur Auswertung von diesen das arithmetische Mittel  $\pm$  SEM (Standardabweichung des Mittelwertes, standard error of the mean) aus den einzelnen Versuchen einer Versuchsreihe ermittelt und sind in den Tabellen wiedergegeben. Die Mittelwertskurven, die auch in dieser Arbeit abgebildet sind, sind Anpassungen an die gemittelten Daten aus den Einzelversuchen (gepoolte Daten).

Die Parameter der Kurven, die durch die gemittelten Werte entstanden sind, stimmten mit den Parametern der Einzelversuche größtenteils überein.

Die für die  $IC_{50}$ - bzw. die  $K_D$ -Werte notwendigen Konfidenzintervalle wurden durch folgende Gleichung bestimmt:

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

Gleichung (16)

Und in Ergebnistabellen dargestellt.

Sollten Meßserien untereinander verglichen werden, wurden die Amplituden und  $pIC_{50}$ -Werte, sowie einzelne Messwerte einer Versuchsreihe als normalverteilte Variablen (Smirnow-Kolmogorow-Test) einer einfachen Varianzanalyse unterzogen. Wurden Unterschiede festgestellt, konnten diese mittels T-Test (Student's T-Test) auf ihr Signifikanzniveau untersucht werden (Sigma Plot, SPSS Inc.)

Um den Fehler der  $\Delta pK_D$ - bzw.  $\Delta pK_i$ -Werte zu berechnen, wurden die Regeln der Fehlerrechnung angewandt (Bevington, 1969). Bei zwei Parametern mit Fehlern  $a \pm \sigma_a$  und  $b \pm \sigma_b$  ( $\sigma = SEM$ ) wurden die Fehler folgendermaßen berechnet:

Summen- und Differenzbildung:

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

Gleichung (17)

Produkt und Quotient:

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

Gleichung (18)

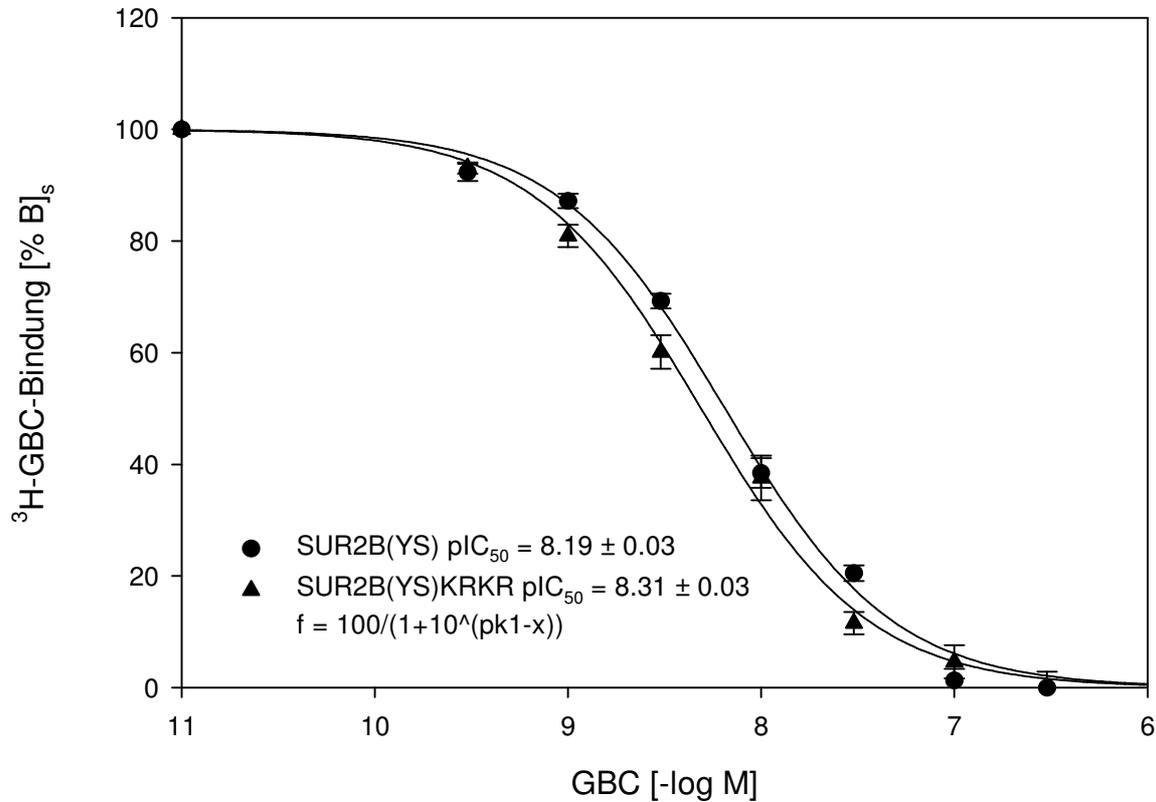
Für die statistischen Tests wurde das Programm SigmaStat 3.1 (Statistical Product & Service Solutions Inc., Chicago, USA) verwendet.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Verdrängung der $^3\text{H}$ -GBC Bindung an SUR2B(YS) und SUR2B(YS)KRKR durch GBC in Abwesenheit von MgATP

Zunächst wurde die homologe Verdrängung von  $^3\text{H}$ -GBC durch GBC gemessen, um die Affinität der Bindung an SUR2B(YS), die schon beschriebene Mutante, im Vergleich zu SUR2B(YS)KRKR zu bestimmen. Durch die Abwesenheit von MgATP wählte man für den Anfang die einfachsten, allerdings unphysiologischen Versuchsbedingungen.

Abb. 9 zeigt für beide SUR-Subtypen einen sehr ähnlichen, monophasischen Kurvenverlauf (Hill-Koeffizient 1). Aus den  $\text{IC}_{50}$ -Werten lassen sich durch Subtraktion der eingesetzten Radioligandenaktivität die Dissoziationskonstanten  $K_D$  berechnen. Dieses Vorgehen ist möglich, da es sich hierbei um eine homologe Verdrängung handelt (siehe Gleichung 1.3). Damit errechnet sich ein  $K_D$  Wert von 4.4 nM bei SUR2B(YS) und von 3.1 nM für die Mutante. Da die  $\text{pK}$ -Werte normalverteilt sind, wurden die  $\text{pK}_D$  Werte der Einzelversuche mittels T-Test verglichen; es ergab sich **kein** signifikanter Unterschied zwischen den beiden Mutanten ( $P = 0.172$ ). Diese Experimente zeigen somit, dass die KRKR-Mutation die Affinität des SUR2B(YS) für GBC nicht ändert.



**Abbildung 9:** Verdrängung der spezifischen  $^3\text{H}$ -GBC Bindung durch GBC an SUR2B(YS) und SUR2B(YS)KRKR in der Abwesenheit von MgATP mit 30  $\mu\text{M}$  EDTA.

SUR2B(YS) (n=5):  $L_0 = 2.48 \pm 0.11$  nM; Proteinkonzentration:  $0.16 \pm 0.01$  mg/ml;  $B_{\text{tot}} = 417 \pm 23$  fmol/mg, NSB bestimmt mit 300 nM GBC =  $23 \pm 3$  %  $B_{\text{tot}}$ ; 100%  $B_s$  entsprechen  $325 \pm 27$  fmol/mg; SUR2B(YS)KRKR (n= 6):  $L_0 = 1.56 \pm 0.11$  nM; Proteinkonzentration:  $0.23 \pm 0.01$  mg/ml;  $B_{\text{tot}} = 150 \pm 24$  fmol/mg; NSB bestimmt mit 300 nM GBC =  $38 \pm 1$  %  $B_{\text{tot}}$ ; 100%  $B_s$  entsprechen  $93 \pm 26$  fmol/mg.

Aus der Anpassung der gepoolten Experimente ergaben sich für SUR2B(YS) / SUR2B(YS)KRKR die  $pIC_{50}$  Werte  $8.19 \pm 0.03$  /  $8.31 \pm 0.03$ , woraus die  $pK_D$  Werte von  $8.48 \pm 0.03$  /  $8.40 \pm 0.03$  resultieren.

**Tabelle 4:** Verdrängung der spezifischen  $^3\text{H}$ -GBC Bindung durch GBC an SUR2B(YS) und SUR2B(YS)KRKR in der Abwesenheit von MgATP.

Mittelwert  $\pm$  SEM aus den  $pK_D$  Werten der Einzelexperimente, nicht aus dem gemeinsamen Fit Abb. A.

| Rezeptor      | $pK_D$           | KD [ nM ]     | A[%B <sub>s</sub> ] | n |
|---------------|------------------|---------------|---------------------|---|
| SUR2B(YS)     | 8.36 $\pm$ 0.04* | 4.4 [3.6,5.2] | 100                 | 5 |
| SUR2B(YS)KRKR | 8.51 $\pm$ 0.09* | 3.1 [2.0,4.7] | 100                 | 6 |

\*kein signifikanter Unterschied (P = 0.172, T-Test)

### 3.2 Wirkung von MgATP auf die $^3\text{H}$ -GBC Bindung an SUR2B(YS) und SUR2B(YS)KRKR

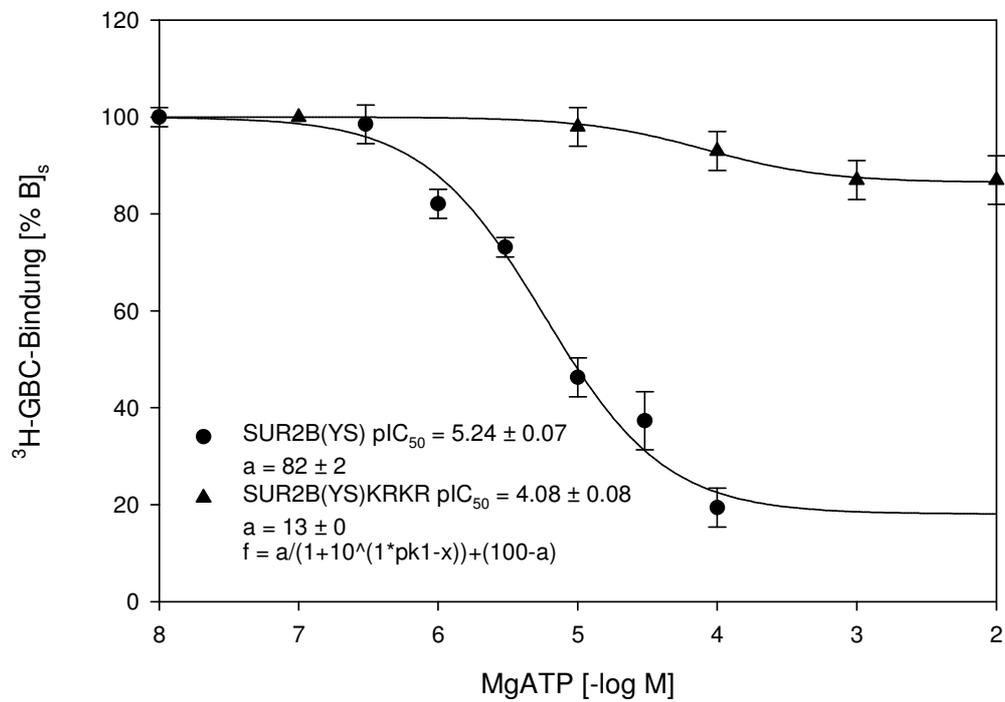
Unter physiologischen Bedingungen beträgt die intrazelluläre MgATP-Konzentration circa 3 bis 5 mM. Die beiden NBFs des Sulfonylharnstoffrezeptors sind dann durch MgATP besetzt. Diese MgATP Bindung an und Hydrolyse durch den SUR führt zu einer allosterischen Hemmung der GBC Bindung.

Deswegen wurde in der zweiten Versuchsreihe überprüft, wie MgATP in unterschiedlichen Konzentrationen die Glibenclamidbindung hemmt und ob die Mutation an SUR2B(YS)KRKR einen Einfluss darauf hat.

In Abbildung 10 fallen sofort die unterschiedlich stark ausgeprägten Amplituden auf. Da diese bei SUR2B(YS)KRKR verschwindend gering ist, wurde ein T-Test durchgeführt, um festzustellen, ob zwischen der GBC-Bindung bei 0 mM und 1 mM oder 10 mM MgATP überhaupt ein signifikanter Unterschied vorliegt. Dies wurde mit P = 0.015 bei einer Sicherheitswahrscheinlichkeit von 95% bestätigt.

Bei SUR2B(YS) liegt der IC<sub>50</sub> bei 5.8 [2.8,12]  $\mu\text{M}$ , während SUR2B(YS)KRKR einen IC<sub>50</sub> von 83 [58,120]  $\mu\text{M}$  aufweist.

Die KRKR-Mutation bewirkt also ein Abflachen der Amplitude, sowie eine stark abgeschwächte Affinität (um etwa den Faktor 15) gegenüber MgATP.



**Abbildung 10:** Hemmung der spezifischen  $^3\text{H}$ -GBC Bindung durch MgATP an SUR2B(YS) und SUR2B(YS)KRKR.

SUR2B(YS):  $L_0 = 1.73 \pm 0.04$  nM; (keine Proteinbestimmung, da Protein verloren ging); NSB bestimmt mit 100  $\mu\text{M}$  P1075 =  $46 \pm 2$  % $B_{\text{tot}}$  ( $n = 8$ ); 100%  $B_s$  entsprechen 50 fmol/ml.

**Tabelle 5:** Übersicht der Bestimmung des NSB mit unterschiedlichen Konzentrationen der Liganden.

| [NSB]                   | Mittelwerte [% $B_{\text{tot}}$ ] | SEM | n |
|-------------------------|-----------------------------------|-----|---|
| 300 nM GBC              | 33                                | 2   | 7 |
| 100 nM GBC              | 46                                | 2   | 6 |
| 100 $\mu\text{M}$ P1075 | 46                                | 2   | 8 |

Tabelle 5 zeigt an, dass die Bestimmung des NSB mit 100 nM GBC bzw. 100  $\mu$ M GBC die spezifische Bindung vollständig verdrängt. Bei 300 nM ist der NSB wohl unterbestimmt, da bei dieser Ligandkonzentration schon unspezifische Bindung verdrängt wird.

SUR2B(YS)KRKR:  $L_0 = 1.71 \pm 0.05$  nM; NSB wurde mit 300 nM GBC für jede MgATP-Konzentration separat bestimmt, dabei ergab sich folgender Mittelwert: NSB =  $53 \pm 2$  % $B_{tot}$ , 100%  $B_s$  entsprechen 21 fmol/ml. Die Bindung bei 1 mM MgATP ist signifikant von der bei 0 mM unterschieden ( $P = 0.015$ , T-Test)

Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten bei 37 °C, pH = 7.4 (Vergleiche Kapitel 2.6.3). Aus der Anpassung der Mittelwerte ergaben sich für SUR2B(YS) / SUR2B(YS)KRKR die  $pIC_{50}$  Werte  $5.24 \pm 0.07$  /  $4.08 \pm 0.08$ .

**Tabelle 6:** Hemmung der spezifischen  $^3$ H-GBC Bindung durch MgATP an SUR2B(YS) und SUR2B(YS)KRKR.

Mittelwert  $\pm$  SEM aus den  $pIC_{50}$  Werten der Einzelexperimente.

| Rezeptor      | $pIC_{50}$      | $IC_{50}$ [ $\mu$ M ] | A [% $B_s$ ] | n |
|---------------|-----------------|-----------------------|--------------|---|
| SUR2B(YS)     | $5.24 \pm 0.16$ | 5.8 [2.8,12]          | $82 \pm 2$   | 4 |
| SUR2B(YS)KRKR | $4.08 \pm 0.08$ | 83 [58,120]           | $13 \pm 1$   | 7 |

### 3.3 Verdrängung der $^3\text{H}$ -GBC Bindung an SUR2B(YS) und SUR2B(YS)KRKR durch GBC in der Anwesenheit von MgATP

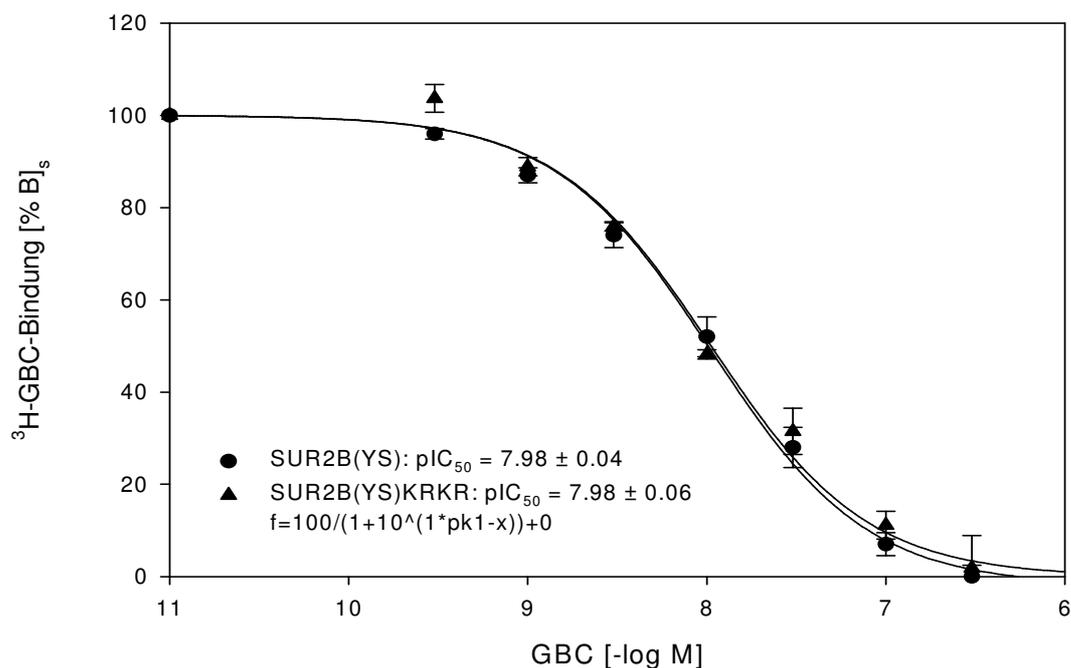
Nachdem der Einfluss von MgATP auf die  $^3\text{H}$ -GBC Bindung festgestellt wurde, konnte das Verhalten des nicht markierten Schließers in der Anwesenheit einer sättigenden Konzentration von MgATP (1 mM) untersucht werden (bei 0.7 mM freiem  $\text{Mg}^{2+}$ ). Diese Messungen sollten zeigen, ob die allosterische Hemmung von GBC durch MgATP auf einer Erniedrigung der Affinität (Erhöhung des  $K_D$ ) oder auf einen Verlust von Bindungsstellen (kleineres  $B_{\text{max}}$ ) oder beidem beruht.

Abbildung 11 zeigt die Ergebnisse. NSB wurde mit 300 nM GBC bestimmt und die spezifische Bindung kann in beiden Fällen durch das nicht markierte GBC vollständig verdrängt werden. Auffällig ist die Deckungsgleichheit der beiden Kurven. Mit einem Hill-Faktor von 1 ergibt sich ein monophasischer Kurvenverlauf. Es errechnet sich eine Dissoziationskonstante von 5.8 [2.8,12] nM bei SUR2B(YS) und von 7.2 [3.6,14] nM für SUR2B(YS)KRKR.

Die Mutation an SUR2B(YS) hat also keine Auswirkung auf die Affinität zu GBC in Anwesenheit von MgATP. Es liegt aber eine leichte Rechtsverschiebung im Gegensatz zu den Versuchen ohne MgATP vor, die den Faktor 1.6 für SUR2B(YS) und den Faktor 2.3 für SUR2B(YS)KRKR beträgt.

Da die  $pK_D$ -Werte normalverteilt sind, wurde ein T-Test durchgeführt. Im Vergleich der  $pK_D$ -Werte von SUR2B(YS) und SUR2B(YS)KRKR ergab sich mit  $P = 0.18$  und einer Sicherheitswahrscheinlichkeit von 95% kein signifikanter Unterschied.

Man muss schließen, dass die starke Hemmung der GBC Bindung an dem Wildtyp überwiegend auf dem Verlust von Bindungsstellen beruht. Das heißt die Affinität von SUR2B(YS) für GBC wurde bei der Stelle soweit erniedrigt, dass diese Bindungsstellen bei einer Radioligandkonzentration von 1.85 nM (für SUR2B(YS)) und 2.18 nM (für SUR2B(YS)KRKR) nicht mehr detektiert wurden.



**Abbildung 11:** Verdrängung der spezifischen  $^3\text{H}$ -GBC Bindung durch GBC an SUR2B(YS) und SUR2B(YS)KRKR in der Anwesenheit von MgATP.

SUR2B(YS):  $L_0 = 1.85 \pm 0.07$  nM; Proteinkonzentration:  $0.24 \pm 0.11$  mg/ml, NSB bestimmt mit 300 nM GBC =  $56 \pm 3$  %  $B_{\text{tot}}$ ; SUR2B(YS)KRKR:  $L_0 = 2.18 \pm 0.02$  nM; Proteinkonzentration:  $0.31 \pm 0.03$  mg/ml;  $B_{\text{tot}} = 148 \pm 8$  fmol/mg; NSB bestimmt mit 300 nM GBC =  $47 \pm 3$  %  $B_{\text{tot}}$ ; 100%  $B_s$  entsprechen  $80 \pm 9$  fmol/mg.

Aus der Anpassung der gemittelten Experimente ergaben sich für SUR2B(YS) / SUR2B(YS)KRKR die  $pIC_{50}$  Werte  $7.98 \pm 0.04$  /  $7.98 \pm 0.06$ , woraus die  $pK_D$  Werte von  $8.06 \pm 0.04$  /  $8.08 \pm 0.06$  resultieren.

**Tabelle 7:** Verdrängung der spezifischen  $^3\text{H}$ -GBC Bindung durch GBC an SUR2B(YS) und SUR2B(YS)KRKR in der Anwesenheit von MgATP.

Mittelwert  $\pm$  SEM aus den  $pK_D$  Werten der Einzelexperimente .

| Rezeptor      | $pK_D$          | $K_D$           | A[% $B_s$ ] | n |
|---------------|-----------------|-----------------|-------------|---|
| SUR2B(YS)     | $8.24 \pm 0.16$ | 5.8 [2.8,12] nM | 100         | 7 |
| SUR2B(YS)KRKR | $8.14 \pm 0.15$ | 7.2 [3.6,14] nM | 100         | 5 |

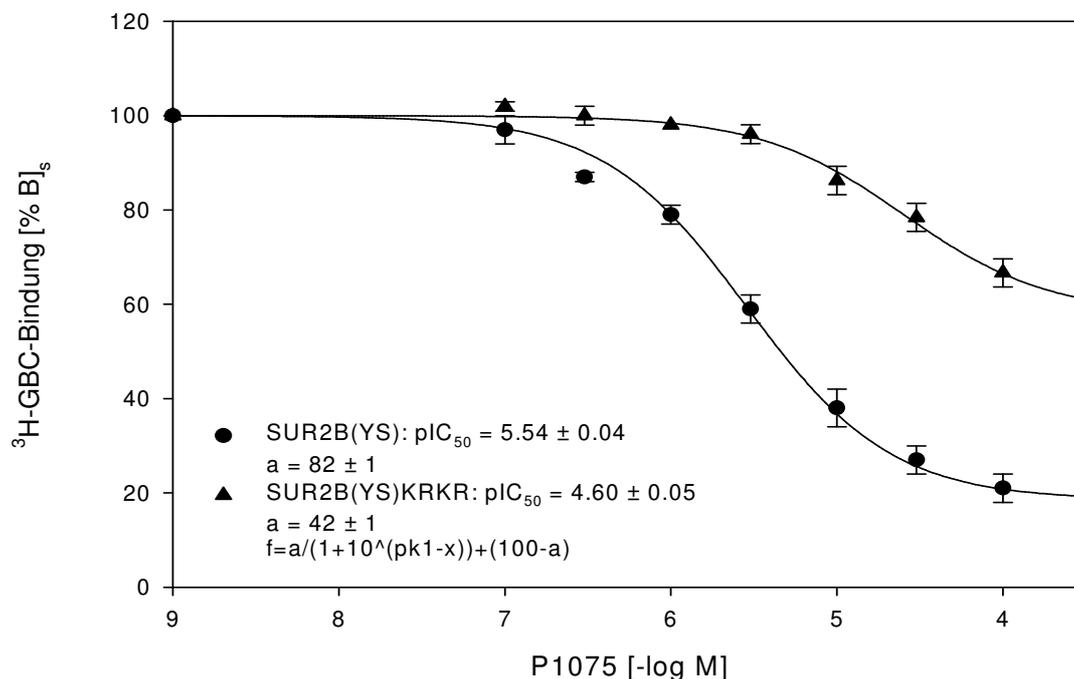
### 3.4 Hemmung der $^3\text{H}$ -GBC Bindung an SUR2B(YS) und SUR2B(YS)KRKR durch den Öffner P1075 in der Abwesenheit von MgATP

Um eine hochaffine Bindung des Öffners an SUR2B(YS) zu erreichen, wird MgATP benötigt (Bray und Quast, 1992; Schwanstecher et al., BJP 1992; Schwanstecher et al., EMBO 1998; Hambrock et al., 1998). Vor allem Cyanoguanide wie P1075 weisen jedoch auch in der Abwesenheit von MgATP eine niederaffine Bindung an SUR2B(YS) auf und können sogar den Kir6.2/SUR2B Kanal öffnen (0 MgATP; Russ et al., 2003).

In dieser Versuchsreihe wurde die Öffnerbindung zunächst in der Abwesenheit von MgATP mit  $^3\text{H}$ -GBC als Radioligand gemessen. Der Grund liegt darin, dass die Bindungsstellen für Öffner und Glibenclamid auf dem SUR in enger Nachbarschaft liegen und negativ allosterisch gekoppelt sind. Diese negative allosterische Kopplung wird durch MgATP verstärkt, weshalb zunächst in der Abwesenheit von MgATP gemessen wurde.

Auffällig in Abbildung 12 ist die deutliche Rechtsverschiebung der Kurve von SUR2B(YS)KRKR im Gegensatz zu SUR2B(YS) ( $K_i$  von SUR2B(YS): 2.2 [1.5,3.2]  $\mu\text{M}$ ;  $K_i$  von SUR2B(YS)KRKR: 17 [6.9,44]  $\mu\text{M}$ ), sowie eine flachere Amplitude ( $82 \pm 3 \%B_s$  im Gegensatz zu  $54 \pm 7 \%B_s$ ). Die Affinität zu P1075 wird also durch die KRKR-Mutation an SUR2B(YS) abgeschwächt. Den beiden Mutanten gemein ist der monophasische Kurvenverlauf (Hill-Koeffizient = 1).

Auch in dieser Versuchsreihe wurde sowohl bei SUR2B(YS) als auch dessen Mutante der NSB-Wert mit 300nM GBC bestimmt.



**Abbildung 12:** Hemmung der spezifischen  $^3\text{H}$ -GBC Bindung durch P1075 an SUR2B(YS) und SUR2B(YS)KRKR in der Abwesenheit von MgATP.

SUR2B(YS):  $L_0 = 1.87 \pm 0.12$  nM; (keine Proteinkonzentration, da Protein zu Verlust ging), NSB bestimmt mit 300 nM GBC =  $20 \pm 2$  %  $B_{\text{tot}}$ ;

SUR2B(YS)KRKR:  $L_0 = 2.21 \pm 0.06$  nM; Proteinkonzentration:  $0.34 \pm 0.04$  mg/ml;  $B_{\text{tot}} = 185 \pm 19$  fmol/mg; NSB bestimmt mit 300 nM GBC =  $49 \pm 3$  %  $B_{\text{tot}}$ ; 100%  $B_s$  entsprechen  $94 \pm 22$  fmol/mg.

Aus der Anpassung der gemittelten Experimente ergaben sich für SUR2B(YS) / SUR2B(YS)KRKR die  $pIC_{50}$  Werte  $5.54 \pm 0.04$  /  $4.60 \pm 0.05$ , woraus sich die  $pK_i$  Werte von  $5.70 \pm 0.04$  /  $4.82 \pm 0.05$  ergeben.

**Tabelle 8:** Hemmung der spezifischen  $^3\text{H}$ -GBC Bindung durch P1075 an SUR2B(YS) und SUR2B(YS)KRKR in der Abwesenheit von MgATP.

Mittelwert  $\pm$  SEM aus den  $pK_D$  Werten der Einzelexperimente .

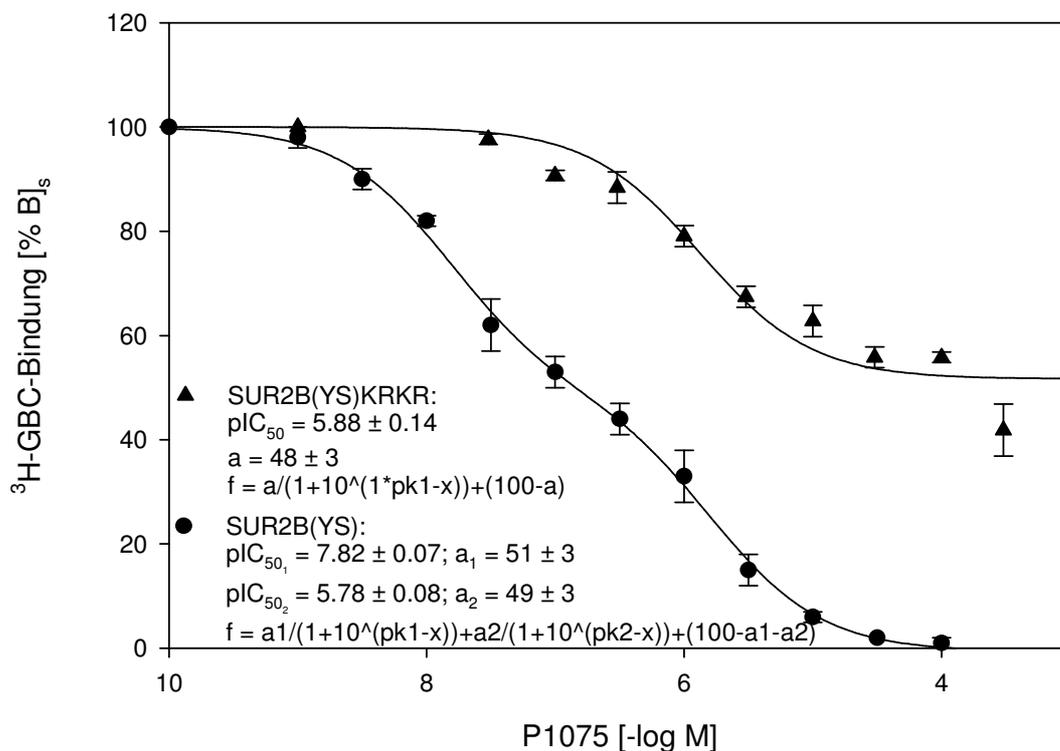
| Rezeptor      | $PK_i$          | $K_i$                       | A (% $B_s$ ) | n |
|---------------|-----------------|-----------------------------|--------------|---|
| SUR2B(YS)     | $5.66 \pm 0.08$ | 2.2 [1.5,3.2] $\mu\text{M}$ | $82 \pm 3$   | 4 |
| SUR2B(YS)KRKR | $4.76 \pm 0.20$ | 17 [6.9,44] $\mu\text{M}$   | $54 \pm 7$   | 7 |

### 3.5 Hemmung der $^3\text{H}$ -GBC Bindung an SUR2B(YS) und SUR2B(YS)KRKR durch P1075 in der Anwesenheit vom MgATP

Um das Verhalten von  $^3\text{H}$ -GBC gegen P1075 in der Anwesenheit von MgATP an SUR2B(YS) im Vergleich zu SUR2B(YS)KRKR zu beschreiben, wurde für SUR2B(YS) auf von unserer Gruppe publizierte Daten zurück gegriffen (Löffler-Walz et al., 2002)

Im Vergleich der beiden Kurven in Abbildung 13 fällt zum einen der biphasische Verlauf von SUR2B(YS) im Gegensatz zu dem monophasischen des SUR2B(YS)KRKR auf. Um eine Abhängigkeit des biphasischen Verlaufs zu der Radioligandkonzentration auszuschließen wurden Versuche mit Radioligandkonzentrationen von 0.6 bis 6 nM durchgeführt. Dabei kam es zu keinen Änderungen in Bezug auf  $K_i$  oder die Amplitude (Hambrock et al, 2002). Der hochaffine Teil der Kurve weist eine  $K_i$  von 5.9 [3.5,9.8] und eine Amplitude von  $45 \pm 4\%$  auf, die niedrigaffine Komponente ist durch eine  $K_i$  von 0.7 [0.5,1.0] und eine Amplitude von  $55 \pm 4\%$  gekennzeichnet. Insgesamt kann also die  $^3\text{H}$ -GBC Bindung durch P1075 vollständig gehemmt werden.

Außerdem fällt eine ausgeprägte Rechtsverschiebung von SUR2B(YS)KRKR im Gegensatz zu SUR2B(YS) auf und P1075 kann die  $^3\text{H}$ -GBC Bindung an SUR2B(YS)KRKR nur zu  $47 \pm 6\%$  hemmen.



**Abbildung 13:** Hemmung der spezifischen  $^3\text{H}$ -GBC Bindung durch P1075 an SUR2B(YS) und SUR2B(YS)KRKR in der Anwesenheit von MgATP.

SUR2B(YS): Auf von unserer Gruppe publizierte Daten zurückgegriffen:  $L_0 = 4.86 \pm 0.90$  nM;  $B_{\text{tot}} = 434 \pm 55$  fmol/mg; NSB bestimmt mit 3  $\mu\text{M}$  GBC =  $29 \pm 3$  %  $B_{\text{tot}}$ ; 100%  $B_s$  entsprechen  $308 \pm 59$  fmol/mg.

SUR2B(YS)KRKR:  $L_0 = 2.10 \pm 0.07$  nM; Proteinbestimmung konnte nicht erfolgen; NSB bestimmt mit 300 nM GBC =  $57 \pm 3$  %  $B_{\text{tot}}$ .

Aus der Anpassung der Mittelwerte ergaben sich für SUR2B(YS) / SUR2B(YS)KRKR die  $pIC_{50}$  Werte  $7.82 \pm 0.07$ ;  $5.78 \pm 0.08$  /  $5.88 \pm 0.14$ , woraus sich die  $pK_i$  Werte von  $8.17 \pm 0.07$ ;  $6.12 \pm 0.08$  /  $6.00 \pm 0.14$  berechnen.

**Tabelle 9:** Hemmung der spezifischen  $^3\text{H}$ -GBC Bindung durch P1075 an SUR2B(YS) und SUR2B(YS)KRKR in der Anwesenheit von MgATP.

Mittelwert  $\pm$  SEM aus den  $\text{pK}_D$  Werten der Einzelerperimente .

| Rezeptor      | $\text{PK}_{i1}$ | $\text{PK}_{i2}$ | $\text{K}_{i1}$             | $\text{K}_{i2}$             | n |
|---------------|------------------|------------------|-----------------------------|-----------------------------|---|
| SUR2B(YS)     | $8.23 \pm 0.11$  | $6.15 \pm 0.08$  | 5.9 [3.5,9.8] nM            | 0.7 [0.5,1.0] $\mu\text{M}$ | 6 |
| SUR2B(YS)KRKR | $6.20 \pm 0.23$  | -                | 0.6 [0.2,1.8] $\mu\text{M}$ | -                           | 5 |

| Rezeptor      | $A_1$ (% $B_s$ ) | $A_2$ (% $B_s$ ) |
|---------------|------------------|------------------|
| SUR2B(YS)     | $45 \pm 4$       | $55 \pm 4$       |
| SUR2B(YS)KRKR | $47 \pm 6$       | -                |

## 4 Diskussion

### 4.1 Übersichtstabelle über alle Ergebnisse dieser Arbeit

**Tabelle 10:** Hemmung der <sup>3</sup>H-GBC Bindung

| Hemmstoff | MgATP (mM) | Parameter                         | SUR2B(YS)        | SUR2B(YS)KR<br>KR | Vergleich (YS) / KRKR | Vergleich ± MgATP (YS) / KRKR |     |
|-----------|------------|-----------------------------------|------------------|-------------------|-----------------------|-------------------------------|-----|
| GBC       | 0          | pK <sub>D</sub>                   | 8.36 ± 0.04      | 8.51 ± 0.09       | ns                    |                               |     |
|           |            | K <sub>D</sub>                    | 4.4 [3.6,5.2] nM | 3.1 [2.0,4.7] nM  |                       |                               |     |
|           |            | A(%B <sub>tot</sub> )             | 77 ± 3           | 62 ± 1            | *1                    |                               |     |
|           |            | A(%B <sub>s</sub> )               | 100              | 100               |                       |                               |     |
|           | 1          | pK <sub>D</sub>                   | 8.24 ± 0.16      | 8.14 ± 0.15       | ns                    | ns                            | ns  |
|           |            | K <sub>D</sub>                    | 5.8 [2.8,12] nM  | 7.2 [3.6,14] nM   |                       |                               |     |
|           |            | A(%B <sub>tot</sub> )             | 44 ± 3           | 53 ± 3            | *1                    | **                            | **  |
|           |            | A(%B <sub>s</sub> )               | 100              | 100               |                       |                               |     |
| MgATP     |            | pIC <sub>50</sub>                 | 5.24 ± 0.16      | 4.08 ± 0.08       | **                    |                               |     |
|           |            | IC <sub>50</sub>                  | 5.8 [2.8,12] μM  | 83 [58,120] μM    |                       |                               |     |
|           |            | A(%B <sub>s</sub> )               | 82 ± 2           | 13 ± 1            | **                    |                               |     |
| P1075     | 0          | pK <sub>i</sub>                   | 5.66 ± 0.08      | 4.76 ± 0.20       | **                    |                               |     |
|           |            | K <sub>i</sub>                    | 2.2 [1.5,3.2] μM | 17 [6.9,44] μM    | **                    |                               |     |
|           |            | A(%B <sub>tot</sub> )             | 65 ± 3           | 26 ± 3            | ***                   |                               |     |
|           |            | A(%B <sub>s</sub> )               | 82 ± 3           | 54 ± 7            | ***                   |                               |     |
|           | 1          | pK <sub>i1</sub>                  | 8.23 ± 0.11      | -                 |                       | ***                           |     |
|           |            | K <sub>i1</sub>                   | 5.9 [3.5,9.8] nM | -                 |                       |                               |     |
|           |            | pK <sub>i2</sub>                  | 6.15 ± 0.08      | 6.20 ± 0.23       | **                    |                               | *** |
|           |            | K <sub>i2</sub>                   | 0.7 [0.5,1.0] μM | 0.6 [0.2,1.8] μM  |                       |                               |     |
|           |            | A <sub>1</sub> (%B <sub>s</sub> ) | 45 ± 4           | -                 |                       |                               |     |
|           |            | A <sub>2</sub> (%B <sub>s</sub> ) | 55 ± 6           | 47 ± 6            | **                    | **                            | ns  |

ns = nicht signifikant; \* p < 0.05; \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001

<sup>1</sup> die höhere nicht-spezifische Bindung bei KRKR ist der schlechteren Expression dieser Mutante geschuldet; Zwar muss man berücksichtigen, dass es sich bei SUR2B(YS) um eine Zelllinie und bei SUR2B(YS)KRKR um eine transiente Transfektion handelt, doch weiß man durch frühere Versuche, dass dies keinen Unterschied in der Expression macht.

Grau unterlegte Ergebnisse, geben schon publizierte Ergebnisse aus unserer Arbeitsgruppe (Löffler-Walz et al., 2002) an.

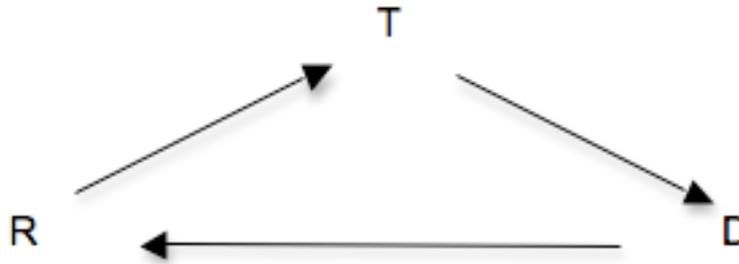
## **4.2 Vergleich der <sup>3</sup>H-GBC Bindung zwischen SUR2B(YS) und SUR2B(YS)KRKR in der Abwesenheit von MgATP**

In dieser Versuchsreihe wurde nachgewiesen, dass die KRKR-Mutation die Affinität des SUR2B(YS) gegenüber GBC nicht verändert (siehe auch Kapitel 3.1). In der Abwesenheit von MgATP ändert daher die Doppelmutation KRKR in NBF<sub>1</sub> und NBF<sub>2</sub> die Konformation der GBC-Bindungsstelle des SUR2B(YS) nicht.

## **4.3 Wirkung von MgATP auf die <sup>3</sup>H-GBC Bindung an SUR2B(YS) und SUR2B(YS)KRKR**

Zur Erklärung der Ergebnisse wird folgendes Modell angenommen:

Unter physiologischen Bedingungen wird die GBC-Bindung durch die Bindung und Hydrolyse von MgATP an den NBFs allosterisch gehemmt. Bei der Hydrolyse von ATP durchläuft der SUR verschiedene Zustände (mindestens drei: Grundzustand (R, kein Nukleotid gebunden); den prähydrolytischen Zustand (T; ATP gebunden) und den posthydrolytischen Zustand (D, ADP gebunden); siehe auch Abb.14). Diese Zustände haben verschiedene Affinitäten gegenüber GBC: Im Grundzustand ist die Affinität für GBC wie in der Abwesenheit von MgATP. Im prähydrolytischen Zustand liegt vermutlich eine mittlere Affinität vor und der posthydrolytische Zustand ist wahrscheinlich sehr niederaffin.



**Abbildung 14:** Drei-Zustandsschema für SUR, das während der Hydrolyse durchlaufen wird.

R = Grundzustand (hohe Affinität für GBC; gering für P1075)

T = prähydrolytischer Zustand (ähnlich R), MgATP gebunden

D = posthydrolytischer Zustand (ADP und Pi noch gebunden; hohe Affinität für P1075; niedrigaffin für GBC)

Bei anderen ABC-Proteinen (z.B. *mdr1*) verhindert die KRKR-Mutation zwar nicht die Anlagerung von MgATP an der NBF (Azzaria, 1989; Schneider et al., 1994), aber die dort stattfindende Hydrolyse (Delepelaire, 1994; Schneider et al., 1994; siehe auch Kapitel 1.4.2). Es bestand also die Vermutung, dass die GBC-Bindung nicht mehr allosterisch gehemmt wird.

Diese Überlegung konnte qualitativ bestätigt werden. Zwar war die Hemmung durch MgATP bei der KRKR-Mutation nicht vollständig aufgehoben, aber sie wurde von 82% auf 13% reduziert. Durch einen T-Test wurde der Unterschied auf Signifikanz überprüft und er bestätigte das Ergebnis (siehe auch Kapitel 3.2).

Das Ergebnis könnte dadurch erklärt werden, dass die KRKR-Mutation die Nucleotidhydrolyse nicht vollständig aufhebt, sondern nur sehr stark einschränkt (d.h.  $k_{cat}$  (Umsatzzahl eines Enzyms bei maximaler Substratsättigung) des Enzyms stark verringert), so dass durch eine nun sehr schwache MgATP-Hydrolyse die GBC Bindung noch schwach gehemmt werden kann. Man kann allerdings nicht ausschließen, dass zur Hemmung der GBC-Bindung durch MgATP noch weitere Faktoren ins Spiel kommen, die bis jetzt nicht geklärt sind.

Darüber hinaus schwächt die KRKR-Mutation die apparente Affinität gegenüber MgATP im Vergleich zu SUR2B(YS) um etwa den Faktor 15 ab. Dies könnte bedeuten, dass die Michaelis-Menten-Konstante von MgATP verringert wurde.

## 4.4 Vergleich der $^3\text{H}$ -GBC Bindung an SUR2B(YS) und SUR2B(YS)KRKR in der Anwesenheit von MgATP und Vergleich mit den Ergebnissen in der Abwesenheit von MgATP

Wie auch schon in Kapitel 3.3 erwähnt, wollte man nun herausfinden, ob die allosterische Hemmung der GBC-Bindung durch MgATP auf einer höheren  $K_D$  beruhte, was eine (mäßige) Erniedrigung der Affinität aller Bindungsstellen widerspiegelt, oder auf einem Verlust von Bindungsstellen (Erniedrigung von  $B_{\text{max}}$ ), was bedeutet, dass ein Teil der Bindungsstellen einen so großen Affinitätsverlust erlitten hat, dass er nicht mehr nennenswert bei den nM Radioligandkonzentrationen markiert wurde und damit in der Messung nicht mehr nachgewiesen wird. Schließlich könnte auch beides gleichzeitig auftreten.

### 4.4.1 SUR2B(YS)

An SUR2B(YS) liegen sowohl in der Anwesenheit als auch in der Abwesenheit von MgATP annähernd gleiche  $pK_D$ -Werte vor, die sich nicht signifikant von einander unterscheiden. Die Amplitude der spezifischen Bindung beträgt in beiden Fällen 100%. Allerdings nimmt durch die Zugabe von MgATP die Anzahl an Bindungsstellen,  $B_{\text{max}}$ , auf 25 % des Wertes ohne MgATP ab (Löffler-Walz et al., 2001). Dies wurde in dieser Arbeit, in der ausschließlich Verdrängungsversuche durchgeführt wurden, nicht mehr genau überprüft.

Dieses Ergebnis kann man im Rahmen des Drei-Zustandsschemas (Abbildung 14) folgendermaßen verstehen: in Gegenwart von MgATP liegt der SUR nur wenig im R, überwiegend jedoch im T und D Zustand vor. Der Verlust von Bindungsstellen entspricht vermutlich dem Anteil von SUR, der sich im posthydrolytischen Zustand befindet, in dem ja ADP gebunden ist. Wie in Kapitel 4.3 erwähnt, weist dieser Zustand vermutlich eine sehr niedrige Affinität gegenüber GBC auf – so niederaffin, dass die SURs in diesem Zustand nicht mehr mit einem Radioliganden im nanomolaren Bereich (hier ca 2 nM) erfasst werden können. Man würde daher schließen, dass ~ 75 % des SUR sich in diesem Zustand befinden. Der  $K_D$ -Wert hingegen

wurde durch MgATP nicht geändert. Dies bedeutet, dass die Affinität des T Zustandes für GBC sich von der des R-Zustands nicht unterscheidet.

#### 4.4.2 SUR2B(YS)KRKR

An dieser Mutanten erniedrigte MgATP die  $^3\text{H}$ -GBC Bindung um 13 %. Bei einem so kleinen Effekt ist die Aufspaltung in Änderungen von  $K_D$  oder  $B_{\max}$  naturgemäß schwierig. Es lässt sich aber nach dem Massenwirkungsgesetz abschätzen, wie groß der Effekt auf die  $K_D$  maximal sein kann.

Es seien  $K_-$  und  $K_+$  die  $K_D$ 's in der Ab- bzw. Anwesenheit von MgATP,  $L$  die Radioligandkonzentration. Dann gilt für die GBC Bindung in Abwesenheit ( $B_-$ ) und Anwesenheit ( $B_+$ ) von MgATP (sättigende Konzentration, vgl. Abbildung 10):

$$B_- = B_{\max_-} * \frac{L}{K_- + L} \quad \text{und} \quad B_+ = B_{\max_+} * \frac{L}{K_+ + L}$$

Da die  $^3\text{H}$ -GBC Bindung durch MgATP zu 13 % verdrängt wurde (siehe Kap. 3.2 und 4.3) gilt:

$$\frac{B_+}{B_-} = \frac{B_{\max_+} * \frac{L}{K_+ + L}}{B_{\max_-} * \frac{L}{K_- + L}} = 0.87$$

Bei dem experimentellen Ansatz von Abbildung 10 ist  $B_{\max_+} = B_{\max_-}$ : Also gilt:

$$0.87 = \frac{K_- + L}{K_+ + L} = \frac{1 + \frac{L}{K_-}}{\frac{K_+}{K_-} + \frac{L}{K_-}}$$

experimentell war  $L^* = 1.7 \text{ nM}$ ;  $K_- = 3 \text{ nM}$

$$\text{setzt man } x = \frac{K_+}{K_-}$$

$$0.87 = \frac{1.57}{x + 0.57}$$

woraus sich  $x$  zu  $x = 1.23$  ergibt

Damit ist  **$K_+ = 3.7 \text{ nM}$**

Diese Rechnung zeigt, dass sich bei einer MgATP-induzierten Abnahme der Bindung um 13 % die  $K_D$ -Werte von SUR2B(YS)KRKR in der Anwesenheit und in der Abwesenheit von MgATP um maximal 20 % unterscheiden.

Vergleicht man die Verdrängung der totalen  $^3\text{H}$ -GBC Bindung ( $B_{\text{tot}}$ ), kommt es sowohl bei SUR2B(YS) (ohne ATP: 77 %; mit ATP: 45 %) als auch bei SUR2B(YS)KRKR (ohne ATP: 62 %; mit ATP: 53 %) zu einem deutlichen Abfall der spezifischen Bindung. Dies beruht auf zwei verschiedenen Prozessen: Bei YS wird durch die Anwesenheit der  $\text{Mg}^{2+}$ -Nucleotide die Menge der detektierbaren Bindungsstellen reduziert, zudem erhöht MgATP die NSB auch in den Membranen von nicht transfizierten Zellen (Löffler-Walz und Quast, unpubliziert). Bei der KRKR-Mutation spielt letzterer Prozess eine entscheidende Rolle.

#### **4.5 Vergleich der Hemmung der $^3\text{H}$ -GBC Bindung an SUR2B(YS) und SUR2B(YS)KRKR durch den Öffner P1075 in der Abwesenheit und Anwesenheit von MgATP**

Die Bindung der Öffner an den SUR mit hoher Affinität erfordert die Anwesenheit von MgATP (Bray und Quast, 1992; Schwanstecher et al., 1992; 1998; Hambrock et al., 1998). P1075 weist aber auch in der Abwesenheit von MgATP eine niederaffine Bindung an SUR2B(YS) auf, die negativ-allosterisch mit der GBC-Bindung gekoppelt ist (Russ et al., 2003; siehe auch Kapitel 3.4).

##### In der Abwesenheit von MgATP

P1075 verdrängt die (spezifische)  $^3\text{H}$ -GBC Bindung an SUR2B(YS)KRKR mit einem 8x höheren  $\text{IC}_{50}$ -Wert als an SUR2B(YS). In beiden Fällen ist die Verdrängung nicht vollständig; allerdings ist die Amplitude bei der KRKR-Mutanten deutlich geringer als beim „Wildtyp“ (YS):  $B_s$  bei KRKR = 54 %, bei SUR2B(YS) 82 %.

Die KRKR-Mutation führt also zu einer Rechtsverschiebung der P1075 Hemmkurve, was vielleicht auf eine geringere Bindungsaffinität von P1075 an die Mutante hinweist, und zu einer Verringerung der Amplitude, was auf einer schwächeren negativ-allosterischen Kopplung zwischen der GBC und der P1075 Bindungsstellen beruhen könnte.

Man kann also annehmen, dass die KRKR-Mutation nicht nur eine Auswirkung auf die MgATP-Bindung hat, sondern auch auf die Bindung von P1075. Als Ursache könnten verschiedene Ansätze diskutiert werden. Zum Beispiel kann es sein, dass die ausgetauschten Aminosäuren direkt an der Bindung von P1075 beteiligt sind, was aber als unwahrscheinlich gilt, da die beiden Bindungsstellen sehr weit von einander entfernt liegen. Es scheint hingegen wahrscheinlich, dass die Mutation allosterisch die P1075 Bindungsstelle verändert und damit auch die Kopplung an die GBC-Bindungsstelle (die ja selbst nicht verändert wird) schwächt.

In der Anwesenheit von MgATP traten die größten Unterschiede zwischen den beiden Mutanten auf. Die  $^3\text{H}$ -GBC Bindung an SUR2B(YS) kann in einer biphasischen Hemmkurve zu 100% verdrängt werden, während das an SUR2B(YS)KRKR nur in einer niederaffinen Hemmkurve zu ca. 48% der Fall ist.

Zwei Modelle können den biphasischen Kurvenverlauf erklären. Zuerst sei auf das Tetramerenmodell verwiesen (Löffler-Walz et al., 2002): Dabei geht man davon aus, dass SUR auch in der Abwesenheit der Kir6.x-Untereinheiten Tetrameren ausbildet, in denen sich die Bindungsstellen innerhalb des Tetramers allosterisch beeinflussen und diese Beeinflussung durch die ATP-Hydrolyse aktiviert wird. Die Bindung eines GBC-Moleküls pro Tetramer wirkt sich auf die vier (vormals homogenen) Öffnerbindungsstellen aus und induziert eine Asymmetrie: Alle Öffnerbindungsstellen bleiben in einem hochaffinen Zustand, ausgenommen jene, die sich auf durch Glibenclamid besetzten Untereinheiten befindet. Die hochaffine Komponente der  $^3\text{H}$ -GBC Hemmkurve spiegelt dann die Öffnerbindung an den drei hochaffinen Öffnerbindungsstellen wider, die über die allosterische Kopplung der Untereinheiten die Affinität der GBC-Bindung abschwächt (Löffler-Walz et al., 2002). Die niederaffine Komponente gibt die Öffnerbindung zu den letzten (niederaffinen) Bindungsstellen an und führt

zu einem vollständigen Ablösen des GBC vom SUR (siehe auch Löffler-Walz et al., 2002).

Mit dem Drei-Zustandsmodell (Abbildung 14) lassen sich die Hemmkurven ebenfalls erklären; eine quantitative Ausarbeitung wird zur Zeit in Zusammenarbeit mit Prof. J Bryan, Seattle versucht. Qualitativ gesehen entsteht die Hochaffinitätskomponente dadurch, dass P1075 an D bindet, damit freies D aus dem steady-state entfernt wird und der Komplex  $^3\text{H-GBC} - \text{R}$  nachdissoziiert. In der Niederaffinitätskomponente verdrängt P1075 GBC aus dem SUR, der sich im Grundzustand befindet.

Bei SUR2B(YS)KRKR hingegen ist die Hemmkurve auch in der Anwesenheit von MgATP monophasisch. Interessanterweise liegen hier sehr ähnliche Amplituden und  $K_i$ -Werte vor wie im niederaffinen Teil der Hemmkurve von SUR2B(YS) (Amplitude: (YS):  $55\% \pm 6$ ; KRKR:  $47 \pm 6$ ;  $K_i$ : (YS):  $0.7 [0.5, 1.0]$ ; KRKR:  $0.6 [0.2, 1.8]$ ). Auch im Vergleich mit den Experimenten der KRKR-Mutante ohne MgATP ergibt sich eine ähnliche Amplitude ( $54 \pm 7$ ). Dieses Ergebnis ist zu erwarten, wenn SUR2B(YS)KRKR nur eine sehr geringe ATP-Hydrolyse besitzt: Dann liegt SUR2B(YS)KRKR kaum im Zustand D (ADP gebunden) vor. Löffler-Walz et al., 2002 haben festgestellt, dass in der Abwesenheit von MgATP keine Interaktion zwischen den Untereinheiten des Tertamers besteht. Folgerichtig kann es an SUR2B(YS)KRKR auch in der Anwesenheit von MgATP zu keiner Interaktion kommen, da MgATP an der NBF nicht hydrolysiert wird.

Die Tatsache, dass der hochaffine Teil der Hemmkurve von SUR2B(YS) bei der Mutante fehlt bestätigt die Vermutung, dass die Aminosäure Lysin an der Bindung von MgATP und eventuell auch an der darauf folgenden Hydrolyse beteiligt ist, da sich die Mutante unter den Bedingungen unter ATP ähnlich verhält wie SUR2B(YS) in der Abwesenheit des Nukleotids. Dabei scheint es nicht auszureichen die gleiche Ladung der Aminosäure beizubehalten wie es bei einem konservativen Aminosäureaustausch der Fall ist (in diesem Fall: Lysin zu Arginin), sondern es wird offensichtlich genau die entsprechende Aminosäure benötigt, um die Funktion aufrechtzuhalten.

## 5 Zusammenfassung

Die ATP-sensitiven  $K^+$ -Kanälen sind aus zwei Untereinheiten der  $\alpha$ - (Kir6.1 und Kir6.2) und der  $\beta$ -Untereinheit (Sulfonylharnstoffrezeptor (SUR1 / SUR2)) aufgebaut. Je vier SUR, die regulatorische Untereinheit und vier Kir6.x, die porenbildende Untereinheit, schließen sich zu Heterooktameren zusammen und bilden den Ionenkanal. Die Zusammensetzung der einzelnen  $K_{ATP}$ -Kanäle ist in den verschiedenen Geweben sehr unterschiedlich (z.B. Kir6.2 / SUR1 in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas; Kir6.2 / SUR2A im Myokard; Kir6.2 / SUR2B im glatten, nicht-vaskulären Muskel, Kir6.1 / SUR2B in der glatten Gefäßmuskulatur). Sie sind dafür zuständig die elektrische Zellaktivität an den metabolischen Zustand der Zelle anzupassen, indem sie den  $K^+$ -Strom regulieren.

Sulfonylharnstoffe (SU) und  $K_{ATP}$ -Kanal-Öffner (KCO) können an der  $\beta$ -Untereinheit binden und die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals beeinflussen. Darüber hinaus liegt am SUR eine Nukleotidbindungsfalte (NBF) vor, an der MgATP binden kann und dort hydrolysiert wird, was die Bindung der SU und KCO beeinflusst.

In der vorliegenden Arbeit wollte man durch einen konservativen Aminosäureaustausch (Arginin gegen Lysin) herausfinden, ob die NBF sich genau an dieser Stelle befindet, und welche Auswirkung die MgATP-Bindung und Hydrolyse auf die Bindung von GBC und P1075 hat.

Mittels Radioligandbindungsstudien mit dem Radioliganden  $^3\text{H}$ -GBC wurden Verdrängungs- (mit GBC) und Hemmkurven (mit P1075) erstellt, die über die Affinität und deren Veränderungen durch die KRKR-Mutation Aufschluss gaben. Bei der Verdrängung von  $^3\text{H}$ -GBC durch GBC wurden die Erwartungen bestätigt, da in der Abwesenheit von MgATP die Bindungskurven miteinander übereinstimmen, auch bei der Versuchreihe in der Anwesenheit von MgATP kam es zu keinem signifikanten Unterschied in der Affinität. Man geht davon aus, dass die starke Hemmung der  $^3\text{H}$ -GBC-Bindung durch einen Verlust von Bindungsstellen zu erklären ist, da bei den Verdrängungsversuchen von  $^3\text{H}$ -GBC durch MgATP an der KRKR-Mutation ein deutlicher Abfall der Affinität aufgetreten ist und  $^3\text{H}$ -GBC nur noch zu einem sehr kleinen Teil verdrängt werden kann.

Bei den KCOs wurde erstaunlicher Weise festgestellt, dass die KRKR-Mutation sogar eine Wirkung auf die Bindung von P1075 hat, wenn kein MgATP im Versuchs-

ansatz vorhanden ist. Es scheint so, als ob die P1075 Bindung durch die Mutation auch stark eingeschränkt ist. Über die Ursachen lässt sich nur spekulieren. Wahrscheinlich kommt es durch die Mutation zu einer Konformationsänderung des gesamten Moleküls, das die Bindung von P1075 erschwert und oder die  $^3\text{H}$ -GBC-Bindung erleichtert.

Durch diese Studie konnte belegt werden, dass sich die Aminosäure Lysin in der NBF befindet und einen wichtigen Part in der MgATP-Bindung und eventuell sogar in der Hydrolyse desselbigen übernimmt, da die Hemmkurve durch MgATP eigentlich nicht zustande kommt.

## Literaturverzeichnis

Abrahams JP, Leslie AGW, Lutter R und Walker JE; (1994); Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria ; Nature; **370**; 621-628

Aguilar-Bryan L und Bryan J; (2008); Neonatal Diabetes Mellitus; Endocrine Reviews; **29**; 265-291

Aguilar-Bryan L, Nichols CG, Wechsler SW, Clement IV JP, Boyd III AE, González G, Herrera-Sosa H, Nguy K, Bryan J und Nelson DA; (1995); Cloning of the  $\beta$ -cell High-Affinity Sulfonylurea Receptor: A Regulator of Insulin Secretion; Science; **268**; 423-426

Allard B und Lazdunski M; (1993); Pharmacological properties of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in mammalian skeletal muscle cells; European Journal of Pharmacology; **236**; 419-426

Antcliff J, Haider S, Proks P, Sansom MSP, Ashcroft FM; (2005); Functional analysis of a structural model of the ATP-binding site of the K<sub>ATP</sub> channel Kir6.2 subunit; The EMBO Journal; **24**; 229-239

Aparicio A, Gallart C, Chiosi C und Bertelli G; ; Model Color-Magnitude Diagrams for *Hubble Space Telescope* Observations of local Group Dwarf Galaxies; ; ;

Aparicio G, Buche A, Mendez C und Salas JA; (1996); Characterization of the ATPase activity of the N-terminal nucleotide binding domain of an ABC transporter involved in oleandomycin secretion by *streptomyces antibioticus*; FEMS Microbiol. Lett.; **141**; 157-162

Ashcroft FM; (2005); ATP-sensitive potassium channelopathies: focus on insulin secretion; The Journal of Clinical Investigation; **115**; 2047-2058

Ashcroft FM und Gribble FM; (1999); ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels and insulin secretion: their role in health and disease; Diabetologia; **42**; 903-919

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

Ashcroft SJH und Ashcroft FM; (1992); The sulfonylurea receptor; Biochimica et Biophysica Acta; **1175**; 45-59

Ashfield R, Gribble FM, Ashcroft SJH und Ashcroft FM; (1999); Identification of the High-Affinity Tolbutamide Site in the SUR1 Subunit of the  $K_{ATP}$  Channel; *Diabetes*; **48**; 39995

Autoren der IONA Studie; (2002); Effects of nicorandil on coronary events in patients with stable angina: the Impact Of Nicorandil in Angina (IONA) randomised trial; *Lancet*; **359**; 1269-1275

Azzaria M, Schurr E und GRos P; (1989); Discrete Mutations Introduced in the Predicted Nucleotide-Binding Sites of the *mdr1* Gene Abolish Its Ability To Confer Multidrug Resistance; *Molecular and Cellular Biology*; **9**; 5289-5297

Babenko AP; (2005);  $K_{ATP}$  channels “vingt ans après”: ATG to PDB to Mechanism; *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*; **39**; 79-98

Babenko AP und Bryan J; (2002); SUR-dependent Modulation of  $K_{ATP}$  channels by an N-terminal  $K_{IR6.2}$  Peptide; *The Journal of Biological Chemistry*; **277**; 43997-44004

Babenko AP, Bryan J; (2001); A Conserved Inhibitory and Differential Stimulatory Action of Nucleotides on  $K_{IR6.0/SUR}$  Complexes Is Essential for Excitation-Metabolism Coupling by  $K_{ATP}$  Channels; *The Journal of Biological Chemistry*; **276**; 49083-49092

Babenko AP, Gonzalez G und Bryan J; (1999); The Tolbutamide Site of SUR1 and a Mechanism for its Functional Coupling to  $K_{ATP}$  Channel Closure; *FEBS Lett*; **459**; 367-376

Babenko AP, Gonzalez G und Bryan J; 2000a; Pharmacology of sulfonylurea receptors – separate domains of the regulatory subunits of  $K_{ATP}$  channel isoforms are required for selective interaction with  $K^+$  channel openers; *British Journal of Pharmacology*; **275**; 717-720

Barroso I, Luan J, Middleberg RPS, Harding AH, Frank PW, Jakes RW, Clayton D, Schafer AJ, O’Rahilly S, Wareham NJ; (2003); Candidate Gene Association Study in Type 2 Diabetes Indicates a Role for Genes Involved in  $\beta$ -Cell Function as Well as Insulin Action; *PLOS Biology*; **1**; 41-55

Baukowitz T, Schulte U, Oliver D, Herlitz S, Krauter T, Tucker SJ, Ruppertsberg JP und Fakler B; (1998);  $PIP_2$  and  $PIP$  as Determinants for ATP Inhibition of  $K_{ATP}$  Channels; *Science*; **282**; 1141-1144

Berkower C und Michaelis S; (1991); Mutational analysis of the yeast a-factor transporter STE6, a member of the ATP binding cassette (ABC) protein superfamily; The EMBO Journal; **10**; 3777-3785

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; **14**; 1943-1952

Biere H, Rufer C, Ahrens H, Loge O und Schroder E; (1974); Blood glucose lowering sulfonamides with asymmetric carbon atoms; J Med Chem; **17**; 716-721

Bray KM und Quast U; (1992); A Specific Binding Site for  $K^+$  Channel Openers in Rat Aorta; The Journal of Biological Chemistry; **267**; 11689-11692

Bryan J, Crane A, Vila-Cariles WH, Babenko AP und Aguilar-Bryan L; (2005); Insulin Secretagogues, Sulfonylurea Receptors and  $K_{ATP}$  Channels; Current Pharmaceutical Design; **11**; 2699-2716

Bryan J, Muñoz A, Zhang X, Düfer M, Drews G, Krippelt-Drews P und Aguilar-Bryan L; (2007); ABCC8 und ABCC9: ABC transporters that regulate  $K^+$  channels; Pflügers Arch – Eur J Physiol; **453**; 703-718

Bryan J, Vila-Carriles WH, Zhao G, Babenko AP, Aguilar-Bryan L; (2004); Toward Linking Structure With Function in ATP-Sensitive  $K^+$  Channels; Diabetes; **53**; 104-112

Burton AL und Smith GL; (1997); The effect of chromakalim on intracellular  $[Ca^{2+}]$  in isolated rat skeletal muscle during fatigue and metabolic blockade; Experimental Physiology; **82**; 469-483

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  $\beta$ -Cell-Type  $K_{ATP}$  Channels; The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics; **304**; 1025-1032

Chan KW, Zhang H und Logothetis DE; (2003); N-terminal transmembrane domain of the SUR controls trafficking and gating of Kir6 channel subunits; The EMBO Journal; **22**; 3833-3843

Chen J, Lu G, Lin J, Davidson AL und Quirocho FA; (2003); A Tweezers-like Motion of the ATP-binding Cassette Dimer in an ABC Transporter; Molecular Cell; **12**; 651-661

Cheng Y und Prusoff WH; (1973); Relationship between the inhibition constant ( $K_i$ ) and the concentration of inhibitor which causes 50% inhibition ( $IC_{50}$ ) of an enzymatic reaction; *Biochem Pharmacol*; **22**; 3099-3108

Chutkow WA, Makielski JC, Nelson DJ, Burant CF und Fan Z; (1999); Alternative Splicing of *sur2* Exon 17 Regulates Nucleotide Sensitivity of the ATP-sensitive Potassium Channel; *The Journal of Biochemical Chemistry*; **274**; 13656-13665

Chutkow WA, Simon MC, Le Beau MM und Burant CF; (1996); Cloning, tissue expression and chromosomal localization of SUR2, the putative drug-binding subunit of cardiac, skeletal muscle, and vascular  $K_{ATP}$  channels; *Diabetes*; **45**; 1439-1445

Clement J, Kunjilwar K, Gonzalez G, Schwanstecher M, Panten U, Aguilar-Bryan L und Bryan J; (1997); Association and Stoichiometry of  $K_{ATP}$  Channel Subunits; *Neuron*; **18**; 827-838

Cohen MV, Baines CP und Downey JM; (2000); ISCHEMIC PRECONDITION: From Adenosine Receptor to  $K_{ATP}$  Channel; *Annu Rev. Physiol.* ; **62**; 79-109

Cook DL und Bryan J; (1998); ATP-sensitive  $K^+$  channels of age; *TiPS*; **19**; 477-478

Cook DL und Hales N; (1984); Intracellular ATP directly blocks  $K^+$  channels in pancreatic B-cells; *Nature*; **311**; 271-273

Crawford RM, Budas GR, Jovanovic S, Ranki H, Wilson TJ, Davies AM und Jovanovic A; (2002); M-LDH serves as a sarcolemmal  $K_{ATP}$  channel subunit essential for cell protection against ischemia; *The EMBO Journal*; **15**; 3936-3948

Crawford RM, Ranki HJ, Botting CH, Budas GR und Jovanovic A; (2002); Creatine kinase is physically associated with the cardiac ATP-sensitive  $K^+$  channel in vivo; *The FASEB Journal*; **16**; 102-104

Cui N, Kang Y, He Y, Leung YM, Xie H, Pasyk EA, Gao X, Sheu L, Hansen JB, Wahl P, Tsushima RG und Gaisano HY; (2004); H3 Domain of Syntaxin 1A Inhibits  $K_{ATP}$  Channels by Its Actions on the Sulfonylurea Receptor 1 Nucleotide-Binding Folds-1 and -2; *The Journal of Biochemical Chemistry*; **279**; 53259-53265

D'Hahan N, Jaquet H, Moreau C, Catty P und Vivaudou M; (1999); A Transmembrane Domain of the Sulfonylurea Receptor Mediates Activation of ATP-Sensitive  $K^+$  Channels by  $K^+$  Channel Openers; *Molecular Pharmacology*; **56**; 308-315

Davidson AL und Chen Jue; (2005); Flipping Lipids: Is the Third Time the Charm?; Science; **308**; 953-965

de Wet H., Rees MR, Shimomura K, Aittoniemi J, Patch AM, Flanagan SE, Ellard S, Hattersley AT, Sansom MSP und Ashcroft FM; (2007); Increased ATPase activity produced by mutations at arginine-1380 in nucleotide-binding domain 2 of ABCC causes neonatal diabetes ; PNAS; **104**; 18988-18992

Delepelaire P; (1994); PrtD, the integral membrane ATP-binding cassette component of the *Erwinia chrysanthemi* metalloprotease secretion system, exhibits a secretion signal-regulated ATPase activity; J. Bio. Chem.; **269**; 27952-27957

Dickinson KEJ, Bryson CC, Cohen RB, Green DW und Atwal KS; (1997); Nucleotide Regulation and Characteristics of Potassium Channel Opener Binding to Skeletal Muscle Membranes; Molecular Pharmacology; **52**; 473-481

Dörschner H, Brekardin E, Uhde I, Schwanstecher C und Schwanstecher M; (1999); Stoichiometry of Sulfonylurea-Induced ATP-Sensitive Potassium Channel Closure; Molecular Pharmacology; **55**; 1060-1066

Dunne MJ, Cosgrove KE, Shepherd RM, Aynsley-Green A und Lindley KJ; (2003); Hyperinsulinism in Infancy: From Basic Science to Clinical Disease; Physiol Rev; **84**; 239-275

Edwards G und Weston AH; (1993); The Pharmacology of ATP-Sensitive Potassium Channels; Annual Reviews Pharmacol. Toxicol.; **33**; 597-637

Enkvetchakul D, Nichols CG; (2003); Gating Mechanism of  $K_{ATP}$  Channels: Function Fits Form; The Journal of General Physiology; **122**; 471-480

Escande D und Caverio I; (1992);  $K^+$  channel openers and "natural" cardioprotection; TIPS; **13**; 269-271

Fajans SS, Bell GI, und Polonsky KS; (2001); Molecular mechanisms and clinical pathophysiology of maturity-onset diabetes of the young; New England Journal of Medicine; **345**; 971-978

Forestier C, Depresle Y und Vivaudou M; (1993); Intracellular protons control the affinity of skeletal muscle ATP sensitive  $K^+$  channels for potassium-channel-openers; FEBS; **325**; 276-280

Fry DC, Kuby SA und Mildvan AS; (1986); ATP-binding site of adenylate kinase: mechanistic implications of its homology with ras-encoded p21<sup>ras</sup> F1-ARFase, and other nucleotide-binding proteins ; Proc. Natl. Acad. Sci. USA; **83**; 907-911

Gadsby DC, Nagel G und Hwang TC; (1995); The CFTR Chloride Channel of Mammalian Heart; Annu. Rev. Physiol.; **57**; 387-416

Gibblin JP, Leaney JL und Tinker A; (1999); The molecular assembly of ATP-sensitive potassium channels - Determinants on the pore forming subunit; The Journal of Biological Chemistry; **274**; 22652-22659

Gloyn AL, ; (2003); Glucokinase (GCK) Mutations in Hyper- and Hypoglycemia: Maturity-Onset Diabetes of the Young, Permanent Neonatal Diabetes and Hyperinsulinemia of Infancy; Human Mutations; **22**; 353-362

Gloyn AL, Hashim Y, Ashcroft SJH, Ashfield R, Wiltshire S und Turner RC; (2001); Association studies of variants in promoter and coding regions of  $\beta$ -cell ATP sensitive K-channel genes SUR1 and Kir6.2 with Type 2 diabetes mellitus (UKPDS 53); Diabetes Medicine ; **18**; 206-212

Gloyn AL, Pearson ER, Antcliff JF, Proks P, Bruining GJ, Slingerland AS, Howard N, Srinivasan S, Silva JMCL, Molnes J, Edghill EL, Frayling TM, Temple IK, Mackay D, Shield JPH, Sumnik Z, van Rhijn A, Wales JKH; Clark P, Njølstad, Ashcroft FM und Hattersley AT; (2004); Activating Mutations in the Gene Encoding the ATP-Sensitive Potassium-Channel Subunit Kir6.2 and Permanent Neonatal Diabetes; The New England Journal of Medicine; **350**; 1838-1849

Gloyn AL, Weedon MN, Owen KR, Turner MJ, Knight BA, Hitman G, Walker M, Levy JC, Sampson M, Halford S, McCarthy M, Hattersley AT, and Frayling TM; (2003); Large-Scale Association Studies of Variants in Genes Encoding the Pancreatic  $\beta$ -Cell  $K_{ATP}$  Channel Subunit Kir6.2 (KCNJ11) and SUR1 (ABCC8) Confirm That the KCNJ11 E23K Variant Is Associated With Type 2 Diabetes; Diabetes; **52**; 568-572

Gögelein H, Ruetten H, Albus U, Englert HC und Busch AE; (2001); Effects of the cardioselective  $K_{ATP}$  channel blocker HMR 1098 on cardiac function in isolated perfused working rat hearts and in anesthetized rats during ischemia and reperfusion; Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol; **364**; 33-41

Gopalakrishnan M, Johnson DE, Janis RA und Triggle DJ; (1991); Characterization of binding of the ATP-sensitive potassium channel ligand, [<sup>3</sup>H]glibenclamide, to neuronal and muscle preparations; *J Pharmacol Exp Ther*; **257**; 1162-1171

Gramolini A und Renaud JM; (1997); Blocking ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel during metabolic inhibition impairs muscle contractility; *Am J Physiol*; **272**; C1936-C1946

Gribble FM, Proks P, Corkey BE und Ashcroft FM; (1998); Mechanism of Cloned ATP-sensitive Potassium Channel Activation by Oleoyl-CoA; *The Journal of Biochemical Chemistry*; **273**; 26383-26387

Gribble FM, Reimann F, Ashfield R und Ashcroft FM; (2000); Nucleotide Modulation of Pinacidil Stimulation of the Cloned K<sub>ATP</sub> Channel Kir6.2/SUR2A; *Molecular Pharmacology*; **57**; 1256-1261

Gribble FM, Tucker SJ und Ashcroft FM; (1997); The essential role of the Walker A motifs of SUR1 in K-ATP channel activation by Mg-ADP and daxozide; *The EMBO Journal*; **16**; 1145-1152

Gribble FM, Tucker SJ, Haug T und Ashcroft FM; (1998); MgATP activates the β cell K<sub>ATP</sub> channel b interaction with its SUR1 subunit; *Proc. Natl. Acad. Sci.*; **95**; 7185-1290

Gross GJ und Fryer RM; (1999); Sarcolemmal Versus Mitochondrial ATP-Sensitive K<sup>+</sup> Channels and Myocardial Preconditioning; *Circulation Research*; **84**; 973-979

Gross GJ und Peart J; (2003); KATP channels and myocardial preconditioning: an update; *Am J Physiol (Cell Physiol)*; **285**; H921-H930

Gutman G, Chandy G, Adelman J, Aiyar J, Bayliss D, Clapham D, Covarrubias M, Desir G, Furuichi K, Ganetzky B, Garcia M, Grissmer S, Jan L, Karschin A, Kim D, Kuperschmidt S, Kurachi Y, Lazdunsky M, Lesage F, Lester H, McKinnon D, Nichols C, O'Kelly I, Robbins J, Robertson G, Rudy B, Sanguinetti M, Seino S, Stuehmer W, Tamkun M, Vandenberg C, Wei A, Wulff H und Wymore R; (2003); Compendium of Voltage-Gated Ion Channels: Potassium Channels; *Pharmacological Reviews* ; **55**; 583-586

Gutsche K, Schroder E, Rufer C und Loge O; (1974); New hypoglycemic benzene-sulfonamido-pyrimidines N-substituted 4-N-(2-pyrimidinyl)sulfonyl-phenylacetamides; *Arzneimittelforschung*; **24**; 1028-1039

Haider S, Antcliff JF, Proks P, Sansom MS und Ashcroft FM; (2005); Focus on Kir6.2: a key component of the ATP-sensitive potassium channel; *J Mol Cell Cardiol*; **38**; 927-936

Hambrock A, Löffler-Walz C und Quast U; 2002a; Glibenclamide binding to Sulphonylurea receptor subtypes: dependence on adenine nucleotides; *British Journal of Pharmacology*; **136**; 955-1004

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, Kloor D, Delabar U, Horio Y, Kurachi Y und Quast U; (1999); ATP-Sensitive K<sup>+</sup> Channel Modulator Binding to Sulphonylurea Receptors SUR2A and SUR2B: Opposite Effects of MgADP; *Mol Pharmacol*; **55**; 832-840

Hambrock A, Löffler-Walz C, Kurachi Y und Quast U; (1998); Mg<sup>2+</sup> and ATP dependence of K<sub>ATP</sub> channel modulator binding to the recombinant sulphonylurea receptor, SUR2B; *Br J Pharmacol*; **125**; 577-583

Hambrock A, Löffler-Walz C, Russ U, Lange U und Quast U; (2003); Characterization of a Mutant Sulphonylurea Receptor SUR2B with High Affinity for Sulphonylureas and Openers: Differences in the Coupling to Kir6.x Subtypes; *Molecular Pharmacology*; **60**; 190-199

Hambrock A, Löffler-Walz C, Russ U, Lange U und Quast U; (2001); Characterization of a mutant Sulphonylurea Receptor SUR2B with High Affinity for Sulphonylureas and Openers: Differences in the Coupling to Kir6.x Subtypes; *Molecular Pharmacology*; **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 sulphonylurea receptor1; *Am J Physiol*; **283**; C587-C598

Hani EH, Boutin P, Durand E, Inou H, Permutt MA; Velho G, Froguel P; (1998); Missense mutations in the pancreatic islet beta cell inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel gene (KIR6.2/BIR): A meta-analysis suggests a role in the polygenic basis of Type II diabetes mellitus in Caucasians; *Diabetology*; **41**; 1511-1515

Hanley PJ und Daut J; (2005);  $K_{ATP}$  channels and preconditioning: A re-examination of the role of mitochondrial  $K_{ATP}$  channels and an overview of alternative mechanisms; *Journal of molecular and Cellular Cardiology*; **39**; 17-50

Henwood MJ, Kelly A, MacMullen C, Bhatia P, Ganguly A, Thornton PS, und Stanley CA; (2005); Genotype-Phenotype Correlations in Children with Congenital Hyperinsulinism Due to Recessive Mutations of the Adenosine Triphosphate-Sensitive Potassium Channel Genes; *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*; **90**; 789-794

Higgins CF; (1995); The ABC of Channel Regulation; *Cell*; **82**; 693-696

Higgins CF; (1992); ABC transporters: From microorganisms to man ; *Annu Rev Cell Biol*; **8**; 67-113

Higgins CF, Hiles ID, Salmond PC, Gill DR, Downie JA, Evans IJ, Holland IB, Gray L, Buckel SD und Bell AW; (1986); A family of related ATP-binding subunits coupled to many distinct biological process in bacteria; *Nature*; **323**; 448-450

Higgins CF, Linton KJ; (2004); The ATP switch model for ABC transporters; *Nature structural & molecular biology*; **11**; 918-926

Hilgemann DW und Ball R, ; (1996); Regulation of cardiac  $Na^+$ ,  $Ca^+$  exchange and  $K_{ATP}$  potassium channels by  $PIP_2$ ; *Science*; **273**; 497-515

Holland IB, Blight MA; (1999); ABC-ATPases, adaptable energy generators fuelling transmembrane movement of variety of molecules in organism from bacteria to humans; *J Mol Biol*; **293**; 381-399

Hollenstein K, Frei DC und Locher KP; (2001); Structure of an ABC transporter in complex with its binding protein; *Nature* ; **446**; 213-216

Hough E, Mair L, Mackenzie W und Sivaprasadarao A; (2002); Expression, purification and evidence for the interaction of the two nucleotide-binding folds of the sulphonylurea receptor; *Biochem. Biophys. Res. Commun*; **294**; 191-197

Huopio H, Jääskeläinen J, Komulainen J, Miettinen R, Kärkkäinen P, Laakso M, Tappanainen P und Voutilainen R; (2002); Acute Insulin Response Tests for the Differential Diagnosis of Congenital Hyperinsulinism; *The Journal of Clinical Endocrinology*; **87**; 4502-4507

Huopio H, Reimann F, Ashfield R, Komulainen J, Lenko AL, Rahier J, Vauhkonen I, Kere J, Laakso M, Ashcroft F, und Otonkoski T; (2000); Dominantly inherited hyperinsulinism caused by a mutation in the sulfonylurea receptor type 1; *The Journal of Clinical Investigation*; **106**; 897-906

Huopio H, Shyng S-L, Otonkoski T, und Bichols CG; (2002);  $K_{ATP}$  channels and insulin secretion disorder; *AM J Physiol Endocrinol Metab*; **283**; E207-E216

Inagaki N, Gono T, Vlement IV JP, Wang CZ, Aguilar-Bryan L, Bryan J und Seino S; (1996); A Family of Sulfonylurea Receptors Determines the Pharmacological Properties of ATP-Sensitive  $K^+$  Channels; *Neuron*; **16**; 1011-1017

Inagaki N, Inazawa J und Seino S; 1995b; cDNA Sequence, Gene Structure, and Chromosomal Localization of the Human ATP-Sensitive Potassium Channel  $uK_{ATP-1}$ , Gene (KCNJ8); *Genomics*; **30**; 102-104

Inagaki N, Tsuura Y, Namba N, Masuda K, Gono T, Horiel 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; *The Journal of Biochemical Chemistry*; **270**; 5691-5694

Inoue H, Ferrer J; Warren-Perry M, Zhang Y, Millny H, Turner RC, Elbein SC, Hampe CL, Suarez BK, Inagaki N, Seino S und Permutt MA; (1997); Sequence variants in the pancreatic islet  $\beta$ -cell inwardly rectifying  $K^+$  channel Kir6.2 (Bir) gene: identification and lack of role in Caucasian patients with NIDDM; *Diabetes* ; **46**; 502-507

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; *The Journal of Biological Chemistry*; **271**; 24321-24324

Karow T und Lang R; (2002); Vasodilatoren; ; ; 68-70

Klein A, Lichtenberg J, Stephan D und Quast U; (2005); Lipids modulate ligand binding to sulfonylurea receptors ; *British Journal of Pharmacology*; **145**; 907-915

Koronakis E, Hughes E, Milisav I und Koronakis V; (1995); Protein exporter function and in vitro ATPase activity are correlated in ABC-domain mutants of HlyB; *Mol Microbiol.*; **16**; 87-96

Koster JC, Sha Q, Shyng SL und Nichols CG; (1999); ATP-Inhibition of  $K_{ATP}$  channels: control of nucleotide sensitivity by the N-terminal domain of the Kir6.2 subunit; *Journal of Physiology*; **515.1**; 19-30

Krauter T, Ruppersberg JP und Baukowitz T; (2001); Phospholipids as Modulators of  $K_{ATP}$  Channels: Distinct Mechanism for Control of Sensitivity to Sulphonylureas,  $K^+$  Channel Openers, and ATP; *Molecular Pharmacology*; **59**; 1086-1093

Kuo A, Domene C, Johnson LN, Doyle DA und Vénien-Bryan C; (2005); Two Different Conformational States of the KirBac3.1 Potassium Channel revealed by Electron Crystallography; *Structure*; **13**; 1463-1472

Levin BE, Dunn-Meynell AA, und Routh VH; (1999); Brain glucose sensing and body energy homeostasis: role in obesity and diabetes; *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*; **276**; 1223-1231

Ligth PE, Comtois AS und Renaud JM; (1994); The effect of glibenclamide on frog skeletal muscle: evidence for  $K^+_{ATP}$  channel activation during fatigue; *Journal of Physiology*; **475.3**; 495-507

Linde C, Löffler C, Kessler C und Quast U; 1997/2; Interaction between thiol-modifying agents and P1075, a  $K_{ATP}$  channel opener in rat isolated aorta; *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*; **356**; 467-474

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

Locher KP, Lee AL und Rees DC; (2002); The E. coli BtuCD Structure: A Framework for ABC Transporter Architecture and Mechanism; *Science*; **296**; 1091-1098

Löffler-Walz C, Hambrock A und Quast; (2002); Interaction of  $K_{ATP}$ -Channel Modulators with Sulfonylurea Receptor SUR2B: Implication for Tetramer Formation and Allosteric Coupling of Subunits; *Molecular Pharmacology*; ; 407-414

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

Loo TW und Clarke DM; (1995); Covalent modification of human P-glycoprotein mutants containing a single cysteine in either nucleotide binding fold abolishes drug-stimulated ATPase activity; *J Biol. Chem.*; **270**; 22957-22961

Loo TW und Clarke DM; (1995); Rapid purification of human P-glycoprotein mutants expressed transiently in HEK 293 cells by nickel-chelate chromatography and characterization of their drug-stimulated ATPase activities; J Biol. Chem.; **270**; 21449-21451

Loussouarn G, Phillips LR, Masia R, Rose T und Nichols C; (2001); Flexibility of the Kir6.2 inward rectifier K<sup>+</sup> channel pore; PNAS; **98**; 4227-4232

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL und Randall RJ; (1951); Protein measurement with the folin phenol reagent; J Biol Chem; **193**; 265-275

Markworth E, Schwanstecher C und Schwanstecher M; (2000); ATP<sup>4-</sup> mediates closure of pancreatic  $\beta$ -cell ATP-sensitive potassium channels by interaction with 1 of 4 identical sites; Diabetes ; **49**; 1413-1418

Masia R, Enkvetchakul D, Nichols CG; (2005); Differential nucleotide regulation of K<sub>ATP</sub> channels by SUR1 and SUR2A; Journal of Molecular and Cellular Cardiology; **39**; 491-501

Matsuo M, Kimura Y, Ueda K; (2005); K<sub>ATP</sub> channel interaction with adenine nucleotides; Journal of Molecular and Cellular Cardiology; **38**; 907-916

Meyer M, Chudziak F, Schwanstecher C, Schwanstecher M und Panten U; (1999); Structural requirements of Sulphonylureas and analogues for interaction with sulphonylurea receptor subtypes; British Journal of Pharmacology; **128**; 27-34

Mikhailov M, Campbell J, de Wet H, Shimomura K, Zadek B, Collins R, Sansom M, Ford R and Ashcroft F; (2005); 3-D structural and functional characterization of the purified K<sub>ATP</sub> channel complex Kir6.2-SUR1; The EMBO Journal ; **24**; 4166-4175

Mikhailov MV, Mikhailova EA, Ashcroft SJH; (2000); Investigation of the molecular assembly of  $\beta$ -cell K<sub>ATP</sub>-channels; FEBS letters; **482**; 59-64

Mikhailov MV, Mikhailova EA, Ashcroft SJH; (2001); Molecular structure of the glibenclamide binding site of the  $\beta$ -cell K<sub>ATP</sub> channel; FEBS Letters; **499**; 154-160

Mikhailov MV, und Ashcroft SJH; (2000); Interactions of the Sulphonylurea Receptor 1 Subunit in the Molecular Assembly of  $\beta$ -Cell K<sub>ATP</sub> Channels; The Journal of Biological Chemistry; **275**; 3360-3364

Miki T und Seino S; (2005); Roles of K<sub>ATP</sub> channels as metabolic sensors in acute metabolic changes ; Journal of Molecular and Cellular Cardiology; **38**; 917-925

Moreau C, Jaquet 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*; **19**; 6644-6651

Moreau C, Prost A-L, Dérand R und Vivaudou M; 2005b; SUR, ABC proteins targeted by  $K^{ATP}$  channel openers; *J Mol Cell Cardiol*; **38**; 951-963

Murry CE, Jennings RB und Reimer KA; (1986); Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium; *Circulation – Journal of the American Heart Association*; **74**; 1124-1136

Nelson MT und Quayle JM; (1995); Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle ; *Am J Physiol (Cell Physiol)*; **286**; C799-C822

Nestorowicz A, Inagaki N, Gono T, Schoor KP, Wilson BA, Glaser B, Landau H, Stanley CA, Thornton PS, Seino S und Permutt MA; (1997); A nonsense mutation in the inward rectifier potassium channel gene, Kir6.2, is associated with familial hyperinsulinism; *Diabetes*; **46**; 1743-1748

Nichols C; (2006);  $K_{ATP}$  channels as molecular sensors of cellular metabolism; *Nature*; **440**; 470-476

Nichols CG und Lederer WJ; (1991); Adenosine triphosphate-sensitivity potassium channels in the cardiovascular system; *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; **261**; H1675-H1686

Nichols CG, Shyng S-L, Nestorowicz A, Glaser B, Clement IV JP, Gonzalez G, Aguilar-Bryan L, Permutt MA und Bryan J; (1996); Adenosine diphosphate as an intracellular regulator of insulin secretion; *Science*; **272**; 1785-1787

Nielsen MD, Hansen L, Carstensen B, Echwald SM, Drivsholm T, Glümer C, Thorsteinsson B, Borch-Johnsen K, Hansen K und Pedersen O; (2003); The E23K Variant of Kir6.2 Associates With Impaired Post-OGTT Serum Insulin Response and Increased Risk of Type 2 Diabetes; *Diabetes*; **52**; 573-577

Niki I und Ashcroft SJH; (1991); Possible involvement of protein phosphorylation in the regulation of the sulfonylurea receptor of a pancreatic  $\beta$ -cell line, HIT T15; *Biochemica et Biophysica Acta*; **1133**; 95-101

Okuyama Y, Yamada M, Konodo 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

Pai EF, Kabasch W, Krenzel U, Holmes KC, John J, und Wittinghofer A; (1995); Structure of the guanine-nucleotide-binding domain of the Ha-ras oncogene product p21 in the triphosphate conformation; Nature ; **370**; 621-628

Panagiotidis CH, Reyes M, Sievertsen A, Boos W und Shuman HA; (1993); Characterization of the structural requirements for assembly and nucleotide binding of an ATP-binding cassette transporter – the maltose transport system of Escherichia Coli; J Biol. Chem; **286**; 23685-23696

Proks P, Antcliff JF, Lippiat J, Gloyn AL, Hattersley AT, und Ashcroft FM; (2004); Molecular basis of Kir6.2 mutations associated with neonatal diabetes or neonatal diabetes plus neurological features; PNAS; **101**; 1753-17544

Quast U; (1993); Do the K<sup>+</sup> channel openers relax smooth muscle by opening K<sup>+</sup> channels; TiPS; **14**; 332-337

Quast U; (1996); ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in the kidney; Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol; **354**; 213-225

Quast U, Bray KM, Anders H, Manley PW, Baumlin Y, und Dosgne J; (1993); Binding of the K<sup>+</sup> Channel Opener [<sup>3</sup>H]P1075 in Rat isolated Aorta: Relationship to Functional Effects of Openers and Blockers; Molecular Pharmacology; **43**; 474-478

Quast U, Cook NS; (1989); Moving together: K<sup>+</sup> channel openers and ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels; TiPS; **10**; 431-434

Quast U, Stephan D, Bieger S und Russ U; (2004); The Impact of ATP-Sensitive K<sup>+</sup> Channel Subtype Selectivity of Insulin Secretagogues for the Coronary Vasculature and the Myocardium; Diabetes; **53**; S156-S164

Quinn KV, Giblin JP, Tinker A; (2004); Multisite Phosphorylation Mechanism for Protein Kinase A Activation of the Smooth Muscle ATP-Sensitive K<sup>+</sup> Channel; Circulation Research; ; 1359-1366

Rainbow RD, James M, Hudman D, Al Johi M, Singh H, Watson PJ, Ashmole I, Davies NW, Lodwick D und Norman RI; (2004); Proximal C-terminal domain of sulphonylurea receptor 2A interacts with pore-forming Kir6 subunits in K<sub>ATP</sub> channels; Biochem J.; **379**; 173-181

Reimann F, Gribble FM und Ashcroft FM; (2000); Differential response of K<sub>ATP</sub> channels containing SUR2A or SUR2B subunits to nucleotides and pinacidil; Molecular Pharmacology; **58**; 1318-1325

Reimann F, Proks P und Ashcroft FM; (2001); Effects of mitiglinide (S21403) on Kir6.2/SUR1, Kir6.2/SUR2A and Kir6.2/SUR2B types of ATP-sensitive potassium channel; British Journal of Pharmacology; **132**; 1542-1548

Reimann F, Tucker SJ, Proks P und Ashcroft FM; (1999); Involvement of the N-Terminus of Kir6.2 in Coupling to the Sulphonylurea Receptor; J Physiol (Lond); **518**; 325-336

Reyes CL und Chang G; (2005); Structure of the ABC Transporter MsbA in Complex with ADP Vanadate and Lipopolysaccharide; Science; **308**; 1028-1031

Ribalet B, John SA, und Weiss J; (2003); Molecular Basis for Kir6.2 Channel Inhibition by Adenine Nucleotides; Biophysical Journal; **84**; 266-

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; Diabetes; **52**; 2630-2635

Rufer C, Biere H, Ahrens H, Loge O und Schroder E; (1974); Blood glucose lowering sulfonamides with asymmetric carbon atoms; J Med Chem; **17**; 708-715

Russ U, Hambrock A, Artunc F, Löffler-Walz C, Horio Y, Kurachi Y und Quast U; (1999); Coexpression with the inward rectifier  $K^+$  channel Kir6.1 increases the affinity of the vascular sulphonylurea receptor SUR2B for glibenclamide; Mol Pharmacol; **56**; 955-961

Russ U, Kühner P, Prager R, Stephan D, Bryan J und Quast U; (2009); Incomplete dissociation of glibenclamide from wild-type and mutant pancreatic KATP channels limits their recovery from inhibition ; British Journal of Pharmacology; **156**; 354-361

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  $Mg^{2+}$ ; British Journal of Pharmacology; **139**; 368-380

Sagen JV, Ræder H, Hathout E, Shehadeh N, Gudmundsson K, Bævre H, Abuelo D, Phorphutkul C, Molnes J, Bell GI, Gloan AL, Hattersley AT, Molven A, Søvik O, und Njølstad PR; (2004); Permanent Neonatal Diabetes due to Mutations in KCNJ11 Encoding Kir6.2; Diabetes; **53**; 2713-2718

Sakura H, Ämmälä C, Smith PA, Gribble FM und Ashcroft FM; (1995); Cloning and functional expression of the c-DNA encoding a novel ATP-sensitive potassium

channel subunit expressed in pancreatic  $\beta$ -cells, brain, heart and skeletal muscle; FEBS Lett; **377**; 338-344

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

Salkoff L und Jegla T; (1995); Surfing the DNA Databases for K<sup>+</sup> Channels Nets Yet More Diversity; Neuron ; **15**; 489-492

Sánchez JA, Gonoï T, Inagaki N, Katada T und Seino S; (1998); Modulation of reconstituted ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels by GTP-binding proteins in a mammalian cell line; Journal of Physiology; **507.2**; 315-324

Saraste M, Sibbald PR, Wittinghofer A; (1990); The P-loop – a common motif in ATP- and GTP-binding proteins; Trends in Biochemical Sciences; **15**; 430-434

Schneider E, Wilken S, und Schmid R; (1994); Nucleotide-induced conformational changes of MalK, a bacterial ATP binding cassette transporter protein; J Biol Chem; **269**; 20456-20461

Schneider T Igelmund P und Hescheler J; (1997); G protein interaction with K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> channels; TIPS; **18**; 40125

Schulze D, Krauter T, Fritzenschaft H, Soom M und Baukrowitz T; (2003); Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) Modulation of ATP and pH Sensitivity in Kir Channels; The Journal of Biological Chemistry; **278**; 10500-10505

Schulze D, Rapedius M, Krauter T und Baukrowitz T; (2003); Long-chain acyl-CoA esters and phosphatidylinositol phosphates modulate ATP inhibition of K<sub>ATP</sub> channels by same mechanism; Journal of physiology; **552.2**; 357-367

Schwachstecher M, Schwachstecher C, Dickel C, Chudziak F, Moshiri A und Panten U; 1994a; Location of the sulphonylurea receptor at the cytoplasmic face of the  $\beta$ -cell membrane; British Journal of Pharmacology; **113**; 903-911

Schwachstecher C, Dickel C und Panten U; 1992a; Cytosolic nucleotides enhance the tolbutamide sensitivity of the ATP-dependent K<sup>+</sup> 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; 2002a; Kir6.2 Polymorphism Predisposes to Type 2 Diabetes by Inducing Overactivity of Pancreatic  $\beta$ -Cell ATP Sensitive  $K^+$  Channels; *Diabetes*; **51**; 875-879

Schwanstecher C, Neugebauer B, Schulz M, und Schwanstecher M; 2002b; The Common Single Nucleotide Polymorphism E23K in Kir6.2 Sensitizes Pancreatic  $\beta$ -Cell ATP-Sensitive Potassium Channels Toward Activation Through Nucleoside Diphosphates; *Diabetes*; **51**; S363-S367

Schwanstecher M, Brandt S, Behrends S, Schaupp U und Panten U; 1992b; Effect of MgATP on pinacidil-induced displacement of glibenclamide from the sulphonylurea receptor in a pancreatic b-cell line and rat cerebral cortex; *Br J Pharmacol*; **106**; 295-301

Schwanstecher M, Löser S, Rietze I und Panten U; (1991); Phosphate and thiophosphate group donating adenine and guanine nucleotides inhibit glibenclamide binding to membranes from pancreatic islets; *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*; **343**; 83-89

Schwanstecher M, Sieverding S, Dörschner H, Gross I, Aguilar-Bryan L, Schwanstecher C und Bryan J; (1998); Potassium channel openers require ATP to bind to and act through sulphonylurea receptors; *EMBO J*; **17**; 5529-5535

Schwappach B, Zerangue N und Jan YN; (2000); Molecular Basis for  $K_{ATP}$  Assembly: Transmembrane Interactions Mediate Association of a  $K^+$  channel with an ABC Transporter; *Neuron*; **26**; 155-167

Seino S; (1999); ATP-sensitive Potassium Channels: A Model of Heteromultimeric Potassium Channel/Receptor Assemblies; *Annu. Rev. Physiol.*; **61**; 337-62

Shevchenko A und Shevchenko A; (2001); Evaluation of the efficiency of in-gel digestion of proteins by peptide isotopic labelling and MALDI mass spectrometry; *Anal Biochem*; **296**; 279-283

Shymala V, Baichwal V, Beall E und Ames GF; (1991); Structure-function analysis of the histidine permease and comparison with cystic fibrosis mutations; *J Biol Chem*; **266**; 18714-18719

Shyng SL und Nichols CG; (1997); Octameric stoichiometry of the  $K_{ATP}$  channel complex; *J Gen Physiol*; **110**; 655-664

Shyng SL und Nichols CG; (1998); Membrane Phospholipid Control of Nucleotide Sensitivity of K<sub>ATP</sub> Channels; Science; **282**; 1138-1141

Shyng SL, Ferrigini T und Nichols CG; (1997); Regulation of K<sub>ATP</sub> channel activity by diazoxide and MgATP. Distinct Functions of the two nucleotide binding folds of the sulfonylurea receptor ; J Gen Physiol; **110**; 643-654

Standen NB, Quayle JM, Davies NW, Brayden JE, Huang Yn und Nelson MT; (1989); Hyperpolarizing vasodilators activate ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in arterial smooth muscle; Science; **245**; 177-180

Stanley CA, Lieu YK, Hsu BYL, Burlina AB, Greenberg CR, Hopwood NJ, Perlman K, Rich BH, Zammarchi E, und Poncz M; (1998); hyperinsulinism and hyperammonemia in infants with regulatory mutations of the glutamate dehydrogenase gene; The New England Journal of Medicine; **338**; 1352-1357

Stephan D, Salamon E, Weber H, Russ U, Lemoine H und Quast U; (2006); K<sub>ATP</sub> channel openers of the benzopyran type reach their binding site via the cytosol; British Journal of Pharmacology; **149**; 199-205

Stephan D, Strauss E, Lange U, Felsch H, Löffler-Walz C, Hambrock A, Russ U und 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**; 1078-1088

Story RM und Steitz TA; (1992); Structure of the recA protein-ADP complex; Nature; **355**; 374-376

Tanabe K, Tucker SJ, Ashcroft FM, Proks P, Kioka N, Amachi T und Ueda K; (2000); Photoaffinity Labeling of Kir6.2 by [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP-[ $\gamma$ ]4-Azidoanilide; Biochemical and Biophysical Research; **272**; 316-319

Tanabe K, Tucker SJ, Matsuo M, Proks P, Ashcroft FM, Seino S, Amachi T und Ueda K; (1999); Direct Photoaffinity Labeling of the Kir6.2 Subunit of the ATP-sensitive K<sup>+</sup> Channel by 8-Azido-ATP; The Journal of Biological Chemistry; **274**; 3931-3933

Taschenberger G, Mougey A, Shen S, Lester LB, LaFranchi S, und Shyng SL; (2002); Identificaton of a Familial Hyperinsulinism-causing Mutation in the Sulfonylurea Receptor 1 That Prevents Normal Trafficking and Function of K<sub>ATP</sub> Channels; The Journal of Biological Chemistry; **277**; 17139-17146

Thomas P, Ye Y und Lightner E; (1996); Mutation of the pancreatic islet inward rectifier Kir6.2 also leads to familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy; *Human Molecular Genetics*; **5**; 1809-1812

Thorneloe KS, Maruyama Y, Malcom AT, Light PE, Walsh MP und Cole WC; (2002); Protein kinase C modulation of recombinant ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels composed of Kir6.1 and / or Kir6.2 expressed with SUR2B; *The Journal of Physiology*; **541.1**; 65-80

Trapp S, Haider S, Jones P, Sansom MSP und Ashcroft FM; (2003); Identification of residues contributing to the ATP binding site of Kir6.2; *The EMBO Journal*; **22**; 2903-2912

Tucker SJ, Gribble FM, Zhao C, Trapp S und Ashcroft FM; (1997); Truncation of Kir6.2 produces ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in the absence of the sulphonylurea receptor; *Nature*; **387**; 179-183

Tusnády GE, Bakos E, Váradi A, Sarkadi B; (1997); Membrane topology distinguishes a subfamily of the ATP-binding cassette (ABC) transporters; *FEBS Letters*; **402**; 39873

Ueda K, Inagaki N und Seino S; (1997); MgADP Antagonism to Mg<sup>2+</sup>-independent ATP Binding of the Sulfonylurea Receptor SUR1; *The Journal of Biological Chemistry*; **272**; 22983-22986

Ueda K, Komine J, Matsuo M, Seino S und Anachi T; (1999); Cooperative binding of ATP and MgADP in the sulfonylurea receptor is modulated by glibenclamide; *Proc. Natl. Acad. Sci.*; **96**; 1268- 1272

Vaxillaire M, Populaire C, Busiah K, Cavé H, Gloyn AL, Hattersley AT, Czernichow P, Froguel P, und Polak M; (2004); Kir6.2 Mutations Are a Common Cause of Permanent Neonatal Diabetes in Large Cohort of French Patients; *Diabetes*; **53**; 2719-2721

Vergani P, Lockless SW, Nairn AC und Gadsby DC; (2005); CFTR channel opening by ATP-driven tight dimerization of its nucleotide-binding domains; *Nature*; **433**; 876-880

Vila-Cariles WH, Zhao G und Bryan J; (2007); Defining an binding pocket for sulfonylureas in ATP-sensitive potassium channels; *The FASEB Journal*; **21**; 18-25

Wang C, Wang K, Wang W, Cui Y, Fan Z; (2002); Compromised ATP-binding as a mechanism of phosphoinositide modulation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels; FEBS; **537**; 177-182

Winkler M, Lutz R, Russ U, Quast U und Brya J ; (2009); Analysis of Two KCNJ11 Neonatal Diabetes Mutations, V59G und V59A, and the Analogous KCNJ8 I60G Substitution; The Journal of Biological Chemistry ; **284**; 6752-6762

Winkler M, Lutz R, Russ U, Quast U und Bryan J; (2009); Analysis of two KCNJ11 Neonatal Diabetes Mutations, V59G and V59A, and the Analogous KCNJ8 I60G Substitution; The Journal of Biological Chemistry; **284**; 6752-6762

Winkler M, Stephan D, Bieger S, Kühner P, Wolff F und Quast U; ; Testing the Bipartite Model of the Sulfonylurea Receptor Binding Site: Binding of A-, B- and A + B-Site Ligands; ; ;

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-sensitive K<sup>+</sup> channel; Journal of Physiology; **499**; 715-720

Yorifuji T, Nagashima K, Kurokawa K, Kawai M, Oishi M, Akazawa Y, Hosokawa M, Yamada Y, Inagaki N und Nakahata T; (2005); The C42R Mutation in the Kir6.2 (KCNJ11) Gene as a Cause of Transient Neonatal Diabetes, Childhood Diabetes, or Later-Onset, Apparently Type 2 Diabetes Mellitus; The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism; **90**; 3174-3178

Young J und Holland IB; (1999); ABC transporters: bacterial exporters-revisited five years on; Biochem. Biophys Acta; **1416**; 177-200

Zerangue N, Schwappach B, Jan YN and Jan LY; (1999); A New ER Trafficking Signal Regulates the Subunit Stoichiometry of Plasma Membrane K<sub>ATP</sub> Channels ; Neuron; **22**; 537-548

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<sup>+</sup> Conductance; Neuron; **31**; 233-245

Zingman LV, Hodgson DM, Bast PH, Kane GC, Perez-Terciz C, Gumina RJ, Pucar D, Bienengraeber M, Dzeja PP, Miki T, Seino S, Alekseev AE und Terzic A; 2002b; Kir6.2 is required for adaption to stress; Proc Nat Acad Sci USA; **99**; 13278-13283

Zingman LV, Hodgson DM, Bienengraeber M, Karger AB, Kathman AC, Alekseev AE und Terzie A; (2002); Tandem Function of Nucleotide Binding Domains Confers Competence to Sulfonylurea Receptor in Gating ATP-sensitive K<sub>+</sub> Channels; The Journal of Biological Chemistry; **277**; 14206-14210

Zung A, Glaser B, Nimri R und Zadik Z; (2004); Glibenclamide tetrament in permanent neonatal diabetes mellitus due to an activating mutation Kir6.2; J Clin Endocrinol Metab; **89**; 5504-5507

Zünkler BJ, Lins S, Ohno-Shosaku T, Trube G und Panten U; (1988); Cytosolic ADP enhances the sensitivity to tolbutamide of ATP-dependent K<sub>+</sub> channels from pancreatic  $\beta$ -cells; FEBS Lett; **239**; 241-244

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Ulrich Quast am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen angefertigt.

Ich möchte mich an dieser Stelle bei all jenen bedanken, die es mir ermöglicht haben, diese Arbeit erfolgreich fertig zu stellen.

Allen voran gilt mein Dank meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Ulrich Quast, der mir diese interessante und herausfordernde Arbeit zur Verfügung gestellt hat. Darüber hinaus stand er mir mit seiner fachlichen, freundlichen und hilfreichen Betreuung jeder Zeit zur Seite.

Mein besonderer Dank gilt weiter Frau Petra Kühner für ihre Hilfsbereitschaft in jeder (Not-)Lage und die große Laborerfahrung, die sie mir zuteil kommen ließ – nicht nur durch ihre Herstellung der Membranen für diese Arbeit.

Für die kompetente Unterstützung in den verschiedensten Teilen dieser Arbeit und darüber hinausgehende Diskussionen (NBA-Fachgespräche, Mensabesuche etc.) bedanke ich mich bei Dr. Marcus Winkler.

Bei Herrn PD Dr. Ulrich Russ bedanke ich mich sehr für die geduldige Lösung aller meiner Computer-Probleme.

Ebenso möchte ich mich bei meinen Eltern für die liebevolle Unterstützung und den Rückhalt während der gesamten Arbeit bedanken.

Stuttgart im Oktober 2009

Sophie Schell

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

---

**Name:** Sophie Pauline Schell  
**Geburtsdatum** 12. Dezember 1983  
**Geburtsort** Göppingen

## Akademische Ausbildung

---

**10/2003 – 11/2008** Studium der Zahnheilkunde an der Eberhard Karls Universität Tübingen  
**28.11.2008** Zahnärztliche Prüfung  
**03/2007 – 10/2009** Dissertation über das Thema: „Auswirkung des konservativen Aminosäureaustauschs Lysin gegen Arginin in den Nukleotidbindungsfalten des Sulfonylharnstoffrezeptors SUR2B auf die Bindungseigenschaften“ unter der Anleitung von Prof. Dr. Ulrich Quast am Department für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

## Schulbildung

---

**09/1990- 07/1994** Grundschule Winkelwiese in Tübingen  
**09/1994-07/2000** Uhlandgymnasium in Tübingen  
**09/2000– 07/2003** Abitur am Freihof-Gymnasium in Göppingen

