

**Aus dem Department für Experimentelle und Klinische  
Pharmakologie und Toxikologie der Universität Tübingen  
Abteilung Pharmakologie und Experimentelle Therapie  
Direktor: Prof. Dr. Dr. B. Nürnberg**

**Die einen permanenten neonatalen Diabetes  
verursachende Mutation Q1178R im  
Sulfonylharnstoffrezeptor SUR1  
und deren Auswirkungen auf die  
Ligandbindungseigenschaften**

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

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

**vorgelegt von  
Benjamin Johannes Rüdiger  
aus  
Dresden**

**2011**

**Aus dem Department für Experimentelle und Klinische  
Pharmakologie und Toxikologie der Universität Tübingen  
Abteilung Pharmakologie und Experimentelle Therapie  
Direktor: Prof. Dr. Dr. B. Nürnberg**

**Die einen permanenten neonatalen Diabetes  
verursachende Mutation Q1178R im  
Sulfonylharnstoffrezeptor SUR1  
und deren Auswirkungen auf die  
Ligandbindungseigenschaften**

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

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

**vorgelegt von  
Benjamin Johannes Rüdiger  
aus  
Dresden**

**2011**

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. U. Quast

2. Berichterstatter: Professor Dr. F. Lang

*Für Andrea*

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis .....	V
1. Einleitung.....	1
1.1 Die Zellmembran .....	1
1.2 Ionenkanäle .....	2
1.3 Kaliumkanäle .....	2
1.3.1 Spannungsabhängige Kaliumkanäle.....	4
1.3.2 Ca <sup>2+</sup> -aktivierte Kaliumkanäle.....	5
1.3.3 Tandem-Kaliumkanäle .....	5
1.3.4 Einwärtsgleichrichtende Kaliumkanäle.....	6
1.4 ATP-empfindliche Kaliumkanäle .....	7
1.5 Regulation von K <sub>ATP</sub> -Kanälen.....	13
1.5.1 Regulation von K <sub>ATP</sub> -Kanälen durch Nukleotide .....	13
1.5.2 Regulation von K <sub>ATP</sub> -Kanälen durch negativ geladene langkettige Lipide.....	14
1.5.3 Regulation von K <sub>ATP</sub> -Kanälen durch Phosphorylierung und G-Proteine .....	16
1.6 Funktion der K <sub>ATP</sub> -Kanäle.....	16
1.6.1 β-Zelle im Pankreas .....	16
1.6.2 Zentrales Nervensystem .....	18
1.6.3 Kardiomyozyten.....	18
1.6.4 Gefäßmuskulatur.....	19
1.6.5 Skelettmuskelzellen.....	20
1.7 K <sub>ATP</sub> -Kanalopathien.....	21
1.7.1 Kongenitaler Hyperinsulinismus im Kindesalter (HI).....	21
1.7.2 Permanenter Neonataler Diabetes (PNDM).....	23
1.7.3 Die Mutante SUR1(Q1178R).....	24
1.7.4 MODY (Maturity-onset diabetes of the young) .....	25
1.7.5 Diabetes mellitus Typ 2 (NIDDM).....	25
1.8 Pharmakologie der K <sub>ATP</sub> -Kanäle .....	26

## Inhaltsverzeichnis

---

1.8.1 K <sub>ATP</sub> -Kanal-Inhibitoren: Sulfonylharnstoffe und Glinide .....	26
1.8.2 K <sub>ATP</sub> -Kanal-Öffner: Diazoxid und NNC 55-0462 .....	30
1.9 Fragestellung der Arbeit.....	34
2. Material und Methoden.....	35
2.1 Chemikalien .....	35
2.2 Synthetische K <sub>ATP</sub> -Kanal-Modulatoren.....	36
2.2.1 K <sub>ATP</sub> -Kanal-Blocker.....	36
2.2.2 K <sub>ATP</sub> -Kanal-Öffner.....	36
2.3 Radioliganden.....	37
2.4 Geräte.....	37
2.5 Puffer .....	38
2.5.1 Hypotoner Lysepuffer .....	38
2.5.2 Isotoner Inkubationspuffer.....	38
2.5.3 Waschpuffer .....	39
2.6 Medien .....	39
2.6.1 Standard-Kulturmedium .....	39
2.6.2 Medium zum Einfrieren von Zellen.....	40
2.6.3 Stammlösungen für die Proteinbestimmung nach Lowry .....	40
2.6.4 Luria Bertani Medium (LB-Medium), Angaben für 100 ml Medium...	41
2.6.5 Medium zur Lagerung der transformierten Bakterien .....	42
2.7 HEK 293-Zellen .....	42
2.7.1 Kultivierung .....	42
2.7.2 Einfrieren.....	43
2.7.3 Auftauen.....	43
2.7.4 Transiente Transfektion mittels Lipofectamin2000 <sup>®</sup> -Methode .....	44
2.7.5 Herstellung einer mikrosomalen Membranfraktion .....	45
2.7.6 Proteinbestimmung .....	45
2.8 Radioligandbindungsstudien.....	47
2.8.1 Vorbemerkungen.....	47
2.8.2 Durchführung von Radioligandbindungsstudien.....	50
2.8.3 Modell der Rezeptorbindungsstudien .....	54
2.8.3.1 Sättigungsexperiment .....	55

## Inhaltsverzeichnis

---

2.8.3.2 Hemmexperiment .....	57
2.8.3.3 Verallgemeinerung der Bindungsisotherme nach Hill .....	59
2.9 Datenauswertung und Statistik .....	60
2.9.1 Analyse der Hemmversuche .....	60
2.9.2 Statistik.....	62
3. Ergebnisse .....	64
3.1 Sättigung der [ <sup>3</sup> H]GBC-Bindung in Abwesenheit von MgATP.....	64
3.1.1 Bindung an Kir6.2/SUR1(WT) .....	64
3.1.2 Bindung an Kir6.2/SUR1(QR) .....	66
3.1.3 [ <sup>3</sup> H]GBC-Bindung von Kir6.2/SUR1(WT) und Kir6.2/SUR1(Q1178R) in Abwesenheit von MgATP .....	69
3.2 Hemmung der [ <sup>3</sup> H]GBC-Bindung durch MgATP .....	70
3.2.1 Bindung an Kir6.2/SUR1(WT) .....	70
3.2.2 Bindung an Kir6.2/SUR1(QR) .....	70
3.2.3 Hemmung der [ <sup>3</sup> H]GBC-Bindung durch MgATP an Kir6.2/SUR1(WT) und Kir6.2/SUR1(QR).....	74
3.3 Sättigung der [ <sup>3</sup> H]GBC-Bindung in Anwesenheit von MgATP.....	75
3.3.1 Bindung an Kir6.2/SUR1(WT) .....	75
3.3.2 Bindung an Kir6.2/SUR1(QR) .....	77
3.3.3 Vergleich des Effektes von MgATP auf die [ <sup>3</sup> H]GBC-Bindung von Kir6.2/SUR1(WT) und Kir6.2/SUR1(QR).....	80
3.4 Hemmung der [ <sup>3</sup> H]GBC-Bindung durch Benzothiadiazine .....	82
3.4.1 Einleitende Bemerkungen .....	82
3.4.2 Bindung an Kir6.2/SUR1(WT) .....	83
3.4.2.1 Bei Abwesenheit von MgATP .....	83
3.4.2.2 Bei Anwesenheit von MgATP .....	84
3.4.3 Bindung an Kir6.2/SUR1(QR) .....	87
3.4.3.1 Bei Abwesenheit von MgATP .....	88
3.4.3.2 Bei Anwesenheit von MgATP .....	88
3.4.4 Hemmung der spezifischen [ <sup>3</sup> H]GBC-Bindung an Kir6.2/SUR1(WT)und Kir6.2/SUR1(Q1178R) durch Diazoxid und NNC ...	91
4. Diskussion .....	92

## Inhaltsverzeichnis

---

4.1 Auswirkung der Mutation SUR1(Q1178R) auf die GBC-Bindung in Abwesenheit von MgATP.....	94
4.2 Drei-Zustandsmodell des $K_{ATP}$ -Kanals.....	94
4.3 Auswirkung der Mutation SUR1(Q1178R) auf Modulation der GBC-Bindung durch MgATP.....	96
4.4 Auswirkung der Mutation SUR1(Q1178R) auf die GBC-Bindung in Anwesenheit von MgATP.....	97
4.5 Auswirkung der Mutation SUR1(Q1178R) auf die Bindung von Benzothiadiazinen .....	98
5. Zusammenfassung.....	100
Literaturverzeichnis .....	102
Danksagung .....	116
Lebenslauf.....	117

## Abkürzungsverzeichnis

[ <sup>3</sup> H]GBC	Tritium-markiertes Glibenclamid
A <sub>260</sub>	Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm
Abb.	Abbildung
ABC-Protein	Protein mit ABC-Motiv
Abt. Molpharm	Abteilung Molekularpharmakologie der Universität Tübingen
Acyl-CoA	Acyl-Coenzym A
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
B <sub>max</sub>	Maximale Bindungskapazität
B <sub>s</sub>	Spezifische Bindung
BSA	Rinderserumalbumin („bovine serum albumine“)
B <sub>tot</sub>	Gesamte („totale“) Bindung, d.h. die Summe aus B <sub>s</sub> und NSB
c	Konzentration eines Stoffes
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	„complementary DNA“: Mittels reverser Transkription von mRNA hergestellte intronlose DNA
CGRP	Calcitonin gene related peptide
CHI	Angeborener Hyperinsulinismus („congenital hyperinsulinism“)
CK	Creatinkinase
Cl <sup>-</sup>	Chlorid
CMV	Cytomegalie-Virus
CoA	Coenzym A
Cr	Creatin
D	Deutschland
DEND	Developmental delay, epilepsy, neonatal diabetes
DM II	Diabetes mellitus Typ 2
DMSO	Dimethylsulfoxid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(β-amino-ethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
E <sub>m</sub>	Ruhemembranpotential
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
FBS	Fötales Kälberserum („fetal bovine serum“)
GABA	γ-Aminobuttersäure
GBC	Glibenclamid

## Abkürzungsverzeichnis

GLUT	Glucose-Transporter
GTP	Guanosintriphosphat
HEK-293	Zelllinie aus humanen embryonalen Nierenzellen („human embryonic kidney“)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure
HI	Hyperinsulinismus im Säuglingsalter
I	Stromstärke, SI-Einheit Ampere (A)
IC <sub>50</sub>	Konzentration, bei der eine Substanz 50% ihrer maximal möglichen inhibitorischen Wirkung hervorruft
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-Triphosphat
IPC	Ischämische Präkonditionierung
K <sup>+</sup>	Kalium
K <sub>2P</sub> -Kanäle	Tandem-K <sup>+</sup> -Kanäle
Kap.	Kapitel
K <sub>ATP</sub> -Kanäle	ATP-empfindliche Kaliumkanäle
K <sub>CA</sub> -Kanäle	Ca <sup>2+</sup> -aktivierte Kaliumkanäle
KCO	K <sub>ATP</sub> -Kanal-Öffner
kD	Kilodalton
K <sub>D</sub>	Dissoziationskonstante
K <sub>I</sub>	Inhibitionskonstante
K <sub>ir</sub>	Einwärtsgerichtete Kaliumkanäle
K <sub>v</sub> -Kanäle	Spannungsgesteuerte Kaliumkanäle
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LDH	Lactatdehydrogenase
Leu	L-Leucin
MDR1	Multidrug resistance protein 1
MEM	Minimum essential medium
MeOH	Methanol
mitoK <sub>ATP</sub>	Mitochondrialer K <sub>ATP</sub> -Kanal
MRP1	Multidrug resistance-associated protein 1
n	Anzahl der ausgewerteten Einzelexperimente
Na <sup>+</sup>	Natrium
NAD <sup>+</sup> /NADH	Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
NADP <sup>+</sup> /NADPH	Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NBD	Nukleotidbindungsdomäne
NBF	Nukleotidbindungsfalte
NDP	Nukleosiddiphosphat
n <sub>H</sub>	Hill-Koeffizient
NNC	NNC 55-0462 (6-Chloro-3-(1-Methyl-Cyclobutyl)Amino-4H-Thieno[3,2-e]-1,2,4-Thiadiazin1,1-dioxid)
NSB	Nicht-spezifische Bindung
OCoA	Oleoyl-CoA
OD <sub>546</sub>	„Optische Dichte“ bei einer Wellenlänge von 546 nm
P1075	N-Cyano-N'-(1,1Dimethylpropyl)-N''-3-pyridylguanidin
PCR	„polymerase chain reaction“: Polymerase-Kettenreaktion zur Amplifizierung von DNA
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der

## Abkürzungsverzeichnis

	Wasserstoffionen-Aktivität
PHHI	Persistierende hyperinsulinämische Hypoglykämie im Säuglingsalter
P <sub>i</sub>	Orthophosphat
pIC <sub>50</sub>	= -lg IC <sub>50</sub>
PK	Pyruvatkinase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PNDM	Permanenter neonataler Diabetes mellitus
QR	K <sub>ATP</sub> -Kanal-Mutation Kir6.2/SUR(Q1178R)
R	Elektrischer Widerstand
RT	Raumtemperatur (~22°C)
SA	Spezifische Aktivität, SI-Maßeinheit ist das Becquerel (Bq); eine veraltete Maßeinheit das Curie (Ci); Es gilt: 1 Ci = 3.7*10 <sup>10</sup> Bq
SEM	Standardabweichung („standard error of the mean“)
SUR	Sulfonylharnstoffrezeptor
Tab.	Tabelle
TM	Transmembranhelix
TMD	Transmembrandomäne
TMS	Transmembransegment
TNDM	Transienter neonataler Diabetes mellitus
Tris	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan
U	Elektrische Spannung, SI-Einheit Volt (V)
UAW	Unerwünschte Arzneimittelwirkung
WT	K <sub>ATP</sub> -Kanal-Wildtyp Kir6.2/SUR1

# 1. Einleitung

## 1.1 Die Zellmembran

Das Zytosol eukaryoter Zellen wird durch eine Plasmamembran vom Extrazellularraum abgegrenzt. Diese Membran besteht aus einer kontinuierlichen, etwa fünf nm dicken Lipiddoppelschicht. Diese entsteht durch die Zusammenlagerung einzelner Phospholipidmoleküle. Phospholipide sind amphiphile Moleküle. In der Membranmitte stehen sich die apolaren, hydrophoben Kohlenwasserstoffketten gegenüber, wohingegen die negativ geladenen, hydrophoben Kopfgruppen die Grenzflächen zu den angrenzenden wässrigen Lösungen bilden.

An dem Aufbau der Membran werden die beiden Hauptaufgaben deutlich: Zum einen trennen Membranen Intra- und Extrazellularraum und damit wässrige Lösungen unterschiedlicher Zusammensetzung voneinander ab. Zum anderen ist die Membran für die Kommunikation zwischen diesen beiden Räumen notwendig. Hydrophile Moleküle wie Wasser und Elektrolyte ( $\text{Cl}^-$ ;  $\text{Na}^+$ ;  $\text{K}^+$ ;  $\text{Ca}^{2+}$ ) können die Zellmembran aufgrund der Hydrophobizität kaum passieren. Der Übergang eines polaren Teilchens in die hydrophobe Zellmembran erfordert die Ablösung aus seiner Hydrathülle. Die dafür notwendige Energie steht der Zelle aber nicht zur Verfügung (vgl. Born'sche Barriere). Infolge dieser Impermeabilität führt die Aktivität der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase zur Bildung von Konzentrationsgradienten der Ionen entlang der Membran zwischen Intra- und Extrazellularraum. Um den Austausch geladener Teilchen zwischen den beiden Räumen zu ermöglichen, befinden sich in der Membran eine Vielzahl verschiedener Ionenkanäle und Transportermoleküle. Diese integralen Membranproteine sind in der Zellmembran frei beweglich und unterliegen einem dynamischen Prozess ständiger Regeneration (Hille, 2001).

### **1.2 Ionenkanäle**

Elektrische Prozesse an Zellmembranen sind die Grundlage zahlreicher physiologischer Vorgänge im menschlichen Körper wie der Erregungsbildung und -weiterleitung in Nerven, dem Herz- und Skelettmuskel oder neurosekretorischen Zellen. Diese werden durch den Fluss von Ionen durch spezielle integrale Membranproteine, die Ionenkanäle vermittelt.

Ionenkanäle- aus mehreren Untereinheiten bestehende Transmembranproteine- bilden hydrophobe Poren in der Zellmembran und ermöglichen so den Ionenaustausch zwischen Intra- und Extrazellularraum. Darüber hinaus verfügen sie über lipophile Anteile, die in Kontakt mit der Zellmembran stehen. Spezifische Konformationsänderungen des Ionenkanals führen zu einer Änderung der Transportrate der Ionen. Die Kanäle können hochfrequent zwischen dem geöffneten und geschlossenen Zustand hin und her schalten. Dieses Kanalschaltverhalten (gating) wird durch verschiedene Reize, wie z.B. durch eine Änderung der Membranspannung, der Konzentration von Transmittern oder durch mechanische Kräfte (Zug) beeinflusst. Im offenen Zustand erfolgt die Ionenbewegung durch passive Diffusion entlang des elektrochemischen Gradienten.

Ionenkanäle zeigen eine unterschiedliche Selektivität bezüglich der permeierenden Ionen. Man unterscheidet Anionen- und Kationenkanäle, die jeweils eine hohe Selektivität und hohe Flussraten ( $>10^9$  Ionen/s) für bestimmte Ionen aufweisen. So werden  $K^+$ -Kanäle überwiegend von Kaliumionen permeiert.

### **1.3 Kaliumkanäle**

Offene Kaliumkanäle stabilisieren das Membranpotential der Zelle nahe dem Gleichgewichtspotential für Kalium ( $E_K \approx -90$  mV). Diese Eigenschaft bedingt die vielfältigen Funktionen dieser Kanäle, z.B. die Einstellung des Membranruhepotentials, die Begrenzung schneller Aktionspotentiale, die Beendigung von Perioden erhöhter Aktivität, die Regulierung der Ruheintervalle

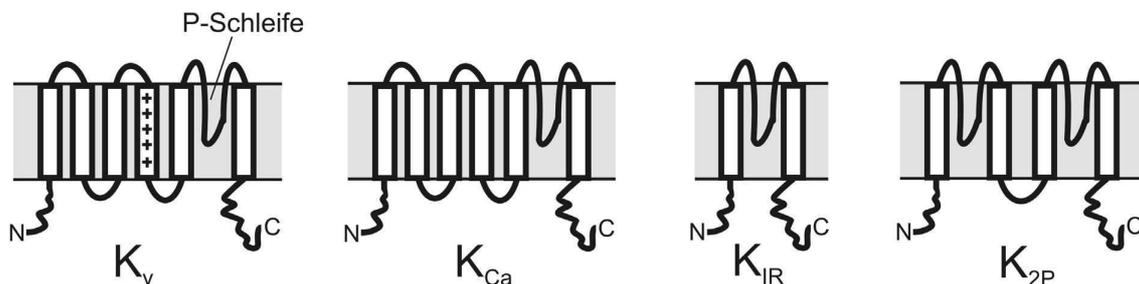
## 1. Einleitung

---

bei wiederholten Aktionspotentialen und generell die Herabsetzung der Wirkung von erregenden Impulsen auf Zellen. Die ubiquitär sowohl in Pflanzen als auch Tieren vorkommenden Kaliumkanäle bilden eine sehr heterogene Gruppe von insgesamt mehr als 70 verschiedenen Typen (Hille, 2001).

Kaliumkanäle werden anhand der Struktur ihrer  $\alpha$ -Untereinheit in vier verschiedene Gruppen eingeteilt (vgl. Abbildung 1):

- a) spannungsabhängige Kaliumkanäle ( $K_v$ ) mit porenbildenden Untereinheiten aus sechs Transmembranhelices (TM)
- b)  $Ca^{2+}$ -aktivierte Kaliumkanäle mit porenbildenden Untereinheiten aus sechs ( $IK_{Ca}$ ;  $SK_{Ca}$ ) oder sieben ( $BK_{Ca}$ ) Transmembranhelices
- c) Einwärtsgleichrichtende Kaliumkanäle ( $K_{IR}$ ) aus porenbildenden Untereinheiten mit zwei TM
- d) Tandem-Kaliumkanäle ( $K_{2PX}$ ) aus vier TM mit zwei porenbildenden Untereinheiten



**Abbildung 1: Schema der Topologie der  $\alpha$ -Untereinheiten der verschiedenen  $K^+$ -Kanalfamilien (entnommen Dissertation Dr. Marcus Winkler)**

Bei allen Kaliumkanälen macht die Aminosäuresequenz TXGYG in der P-Schleife den Selektivitätsfilter für Kalium aus (Hille, 2001). Für die Ausbildung einer Kanalpore sind vier P-Schleifen notwendig. Bei Tandem-Kaliumkanälen ist demzufolge ein Dimer, bei allen anderen Gruppen ein Tetramer aus  $\alpha$ -Untereinheiten zur Bildung funktionstüchtiger Kaliumkanäle notwendig. An die  $\alpha$ -Untereinheiten können regulatorische  $\beta$ -Untereinheiten assoziiert sein (z.B. Sulfonylharnstoffrezeptoren in  $K_{ATP}$ -Kanälen). Nachfolgend werden die verschiedenen Kaliumkanalklassen kurz vorgestellt.

### 1.3.1 Spannungsabhängige Kaliumkanäle

Die größte der vier benannten Kaliumkanalklassen ist die der spannungsabhängigen Kaliumkanäle. Durch diese Kanäle in den Extrazellularraum ausströmendes Kalium ermöglicht die Repolarisierung der Zelle. Die Kanalpore ist ein Tetramer aus vier  $\alpha$ -Untereinheiten mit je sechs Transmembranhelices. Die P-Schleife befindet sich zwischen TM5 und TM6. In der TM4 treten gehäuft positiv geladene Aminosäuren auf; dies bildet den Spannungssensor. Typisch für diese Gruppe ist die ausgeprägte verzögerte Auswärtsgleichrichtung. Man kann zwischen langsamen und schnellen verzögerten Auswärtsgleichrichtern unterscheiden. Letztere sind verantwortlich für die kurze Dauer der Aktionspotentiale in myelinfreien Axonen, Motorneuronen und im Skelettmuskel. Bei der Repolarisation von Myokardzellen spielen die langsamen, verzögernden Gleichrichter aus der KCNQ- und EAG/ERG-Familie eine wichtige Rolle. Werden diese Ströme pharmakologisch (z.B. Klasse-III-Antiarrhythmika; Neuroleptika; Erythromycin) oder durch Mutationen beeinflusst, kann dies zu einer verzögerten Repolarisation und in der Folge zu stark verlängerten Aktionspotentialen am Herzen (Long-QT-Syndrom) und zum plötzlichen Herztod führen. Durch die Etablierung molekularbiologischer Methoden ist heute eine Vielzahl verschiedener Mutationen bekannt. Dem Romano-Ward-Syndrom werden bspw. die autosomal-dominant vererbten Long-QT-Syndrome 1 (KvLQT1/KCNQ1), 2 (HERG/ KCNH2) und 7 (Kir2.1/ KNCJ2) zugerechnet. Dem 1957 beschriebenen autosomal-rezessiv vererbten Jervell- und Lange-Nielsen-Syndrom liegt eine Mutation auf KvLQT1 (KCNQ1) oder MinK (KCNE1) zugrunde. Charakteristisch für dieses Syndrom ist neben der QT-Verlängerung die Innenohrschwerhörigkeit (Schmidt et al., 2004).

### 1.3.2 Ca<sup>2+</sup>-aktivierte Kaliumkanäle

Ca<sup>2+</sup>-aktivierte Kaliumkanäle finden sich auf fast allen Zelltypen und werden nach ihrer Leitfähigkeit in **BigK<sub>Ca</sub>** ( $\sigma = 100\text{-}250\text{ pS}$ ), **IntermediateK<sub>Ca</sub>** ( $\sigma = 20\text{-}80\text{ pS}$ ) und **SmallK<sub>Ca</sub>** ( $\sigma = 4\text{-}20\text{ pS}$ ) eingeteilt.

BK<sub>Ca</sub>-Kanäle bestehen aus porenbildenden 7TM- $\alpha$ -Untereinheiten sowie regulatorischen  $\beta$ -Untereinheiten. Neben der Regulation durch Kalzium besitzen sie eine ausgeprägte Spannungsabhängigkeit. Physiologisch spielen sie bei der Repolarisation der Zellmembran sowie bei der Entstehung schneller hyperpolarisierender Nachpotentiale eine wichtige Rolle (fast AHP; Storm, 1990). Pharmakologisch sind sie von erhöhtem Interesse, da sie wichtige Regulatoren des Nervensystems (Sausbier et al., 2004; Sausbier et al., 2006), des kardiovaskulären Systems (Brenner et al., 2000; Sausbier et al., 2005) und des Immunsystems (Ahluwalia et al., 2004) sind.

SK<sub>Ca</sub>-Kanäle besitzen keine nennenswerte Spannungsabhängigkeit (Hille, 2001). Ihre Kalziumabhängigkeit wird über die Assoziation ihrer 6TM- $\alpha$ -Untereinheiten mit dem Protein Calmodulin vermittelt. SK<sub>Ca</sub>-Kanäle spielen bei der langsamen Nachpolarisation eine Rolle und können durch Apamin (neurotoxisches Peptid; Bestandteil des Bienengiftes) und Scyllatoxin (Gift des Gelben Mittelmeer Skorpion) inhibiert werden.

### 1.3.3 Tandem-Kaliumkanäle

Wie der Name bereits verrät, sind bei den Tandem-Kaliumkanälen zur Porenbildung lediglich zwei 4TM- oder 8TM- $\alpha$ -Untereinheiten notwendig, wobei jede Untereinheit über zwei P-Schleifen verfügt. Sie haben eine geringe Auswärtsgleichrichterfunktion und zeigen keine Spannungsabhängigkeit. Als Beispiele seien die TOK1- (**T**wo P-region-containing **o**utwardly rectifying **K**<sup>+</sup>-channel) und die TWIK1-Kanäle (**T**andem of P-domains in a **w**weak **i**nwardly rectifying **K**<sup>+</sup>-channel) erwähnt. Einige der Tandem-Kaliumkanäle zeigen eine pH-Abhängigkeit, andere werden durch second messenger oder mechanische

Reize in ihrer Aktivität beeinflusst (Hille, 2001). Medizinische Relevanz haben sie bei der Wirkung der volatilen Anästhetika Halothan, Isofluran und Chloroform (Patel et al., 1999; Sirois et al., 2000).

### **1.3.4 Einwärtsgleichrichtende Kaliumkanäle**

Kalium inwardly rectifying Channels (Kir) sind einwärtsgleichrichtende Kanäle, die insgesamt sieben Unterfamilien (Kir1-7) umfassen (Lopatin und Nichols, 2001). Sie sind maßgeblich an der Stabilisierung des Membranruhepotentials von Zellen nahe des  $K^+$ -Ruhepotentials ( $E_K \approx -90$  mV) beteiligt (Isomoto und Kurachi, 1997).

Die einwärtsgleichrichtende Wirkung der Kir ist besonders stark bei den Kir2.x- und Kir3.x-Unterfamilien ausgeprägt. Der nach der elektrochemischen Triebkraft für Kalium zu vermutende Auswärtsstrom wird verhindert, indem die Pore spannungsabhängig durch die intrazellulär vorhandenen Polyamine Spermin und Spermidin blockiert wird. Definierende Bereiche für diesen Mechanismus sind zum einen auf dem zytoplasmatischen C-Terminus, zum anderen auf den negativ geladenen Aminosäuren Glutamat und Aspartat im zweiten Transmembransegment lokalisiert. Kir-Kanäle setzen sich aus vier porenbildenden Strukturelementen (P-Loop mit anschließendem TMS) zusammen, wobei jede Untereinheit zwei Transmembransegmente umfasst. Gemeinsam mit der inneren Helix des TMS2 bildet der extrazellulär, zwischen TMS1 und TMS2 gelegene P-Loop die Pore für den Kaliumflux. Je nach Stärke der Gleichrichtung unterteilt man die Kir in schwache (Kir1, Kir6, Kir7) und starke (Kir2, Kir3, Kir4)  $K^+$ -Einwärtsgleichrichter. Zwischen den verschiedenen Kir-Unterfamilien gibt es strukturelle Unterschiede. So sind z.B. die bei den Experimenten für diese Dissertation verwendeten Kir6.2-Kanäle mit einer  $\beta$ -Untereinheit, dem Sulfonylharnstoffrezeptor (SUR) verknüpft und werden u.a. von dem ADP/ATP-Verhältnis maßgeblich beeinflusst (Nichols und Lopatin, 1997).

## 1.4 ATP-empfindliche Kaliumkanäle

ATP-empfindliche Kaliumkanäle oder  $K_{ATP}$ -Kanäle gehören zur Klasse der einwärtsgerichteten Kaliumkanäle, besitzen aber nur eine sehr schwache Gleichrichterwirkung. Erstmals beschrieben wurden die  $K_{ATP}$ -Kanäle in Kardiomyozyten durch Noma (1983) und kurz darauf von Trube und Hescheler (1984). Später entdeckte man  $K_{ATP}$ -Kanäle in den verschiedensten Geweben. Zunächst in den  $\beta$ -Zellen der Bauchspeicheldrüse (Cook und Hales, 1984; Ashcroft et al., 1984), dann im Skelettmuskel (Spruce et al., 1985), im Gehirn (Ashford et al., 1988) und in glatten Muskelzellen (Beech et al., 1993; vgl. Tabelle 1).

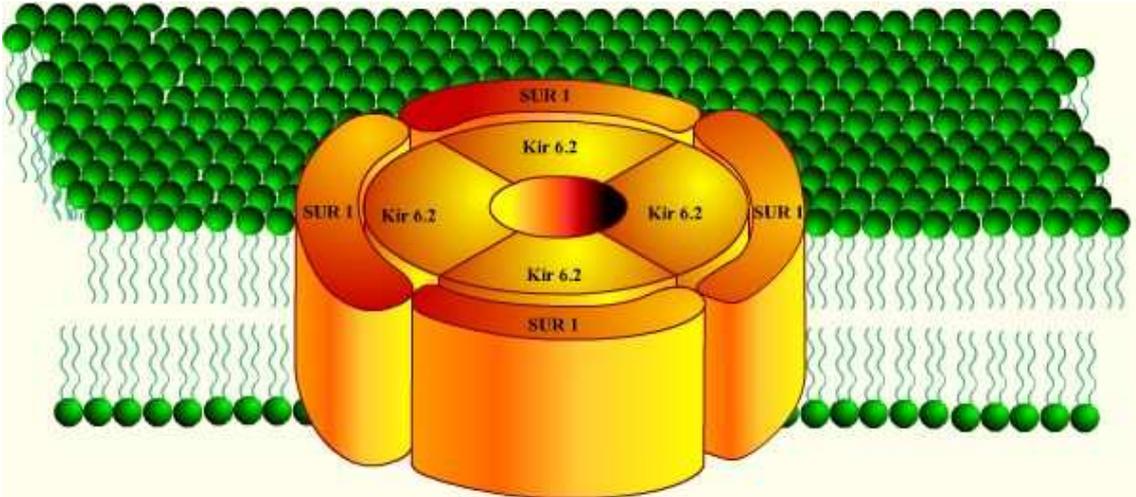
**Tabelle 1: Natürliches Vorkommen der Kir6.x/SURx Kombinationen**

<b>Kir6.x/ SURx Kombination</b>	<b>Natürliches Vorkommen</b>
Kir6.2/SUR1	$\beta$ -Zellen im Pankreas (Inagaki et al., 1995)
Kir6.2/SUR2A	Kardiomyozyten (Inagaki et al., 1996)
Kir6.2/SUR2B	Glatte Muskulatur, außer vaskulär (Isomoto et al., 1996)
Kir6.1/SUR2B	Gefäßmuskulatur (Yamada et al., 1997)

Das Hauptcharakteristikum der  $K_{ATP}$ -Kanäle ist die Nukleotidempfindlichkeit: Intrazelluläres Adenosintri-phosphat (ATP) führt zum Schließen, das ATP-Abbauprodukt ADP und andere Magnesiumnukleosiddiphosphate dagegen zum Öffnen der Kanäle. Durch  $K_{ATP}$ -Kanäle werden der metabolische Zustand der Zelle und die elektrische Aktivität der Zellmembran verknüpft.

## 1. Einleitung

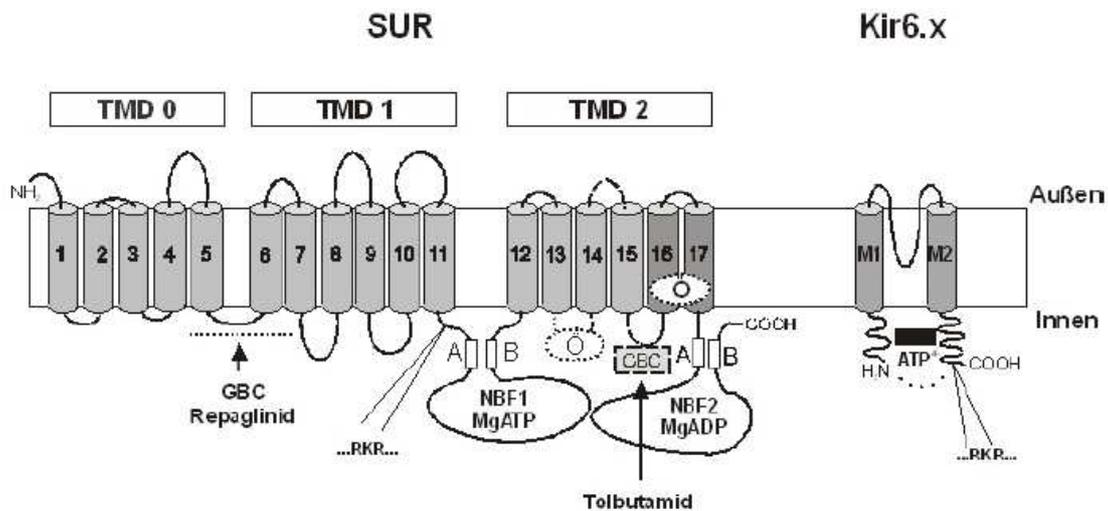
---



**Abbildung 2:** Schema der Struktur eines  $K_{ATP}$ -Kanals (entnommen [www.chemgapedia.de](http://www.chemgapedia.de); 20.11.2010). Allerdings ist die SUR-Untereinheit  $\approx 5x$  grösser als die Kir-Untereinheit

$K_{ATP}$ -Kanäle sind Heterooctamere, die sich aus zwei Untereinheiten mit einer 4:4 Stöchiometrie zusammensetzen (Aguilar-Bryan et al., 1998; vgl. Abbildung 2): Die kleinere, porenbildende  $\alpha$ -Untereinheit aus einer Kir-Unterfamilie (Kir6.1 oder Kir6.2) und die größere  $\beta$ -Untereinheit SUR (SUR1 oder SUR2), die ATP und Sulfonylharnstoffe bindet und zu den ABC-Proteinen gehört. Jeweils eine  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit bilden ein Dimer (vgl. Abbildung 2). Der funktionsfähige  $K_{ATP}$ -Kanal setzt sich aus vier dieser Dimere zusammen und hat eine Masse von etwa 950 kDa. Die Expression verschiedener Kombinationen aus Kir6.1, Kir6.2, SUR1 und SUR2 führt zur Bildung unterschiedlicher  $K_{ATP}$ -Kanäle, die sich außer in ihrer Lokalisation (vgl. Tabelle 1) deutlich in ihren elektrophysiologischen Eigenschaften und in ihrer Sensitivität für Nukleotide und Pharmaka unterscheiden (Seino und Miki, 2003). Ein Retentionsmotiv aus den Aminosäuren Arg-Lys-Arg sorgt dafür, dass immer nur vollständige, aus jeweils vier  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten zusammengesetzte  $K_{ATP}$ -Kanäle aus dem rauen endoplasmatischen Retikulum in die Plasmamembran eingebaut werden (Zerangue et al., 1999).

## 1. Einleitung



**Abbildung 3: Schema des Aufbaus eines  $K_{ATP}$ -Kanals mit funktionell wichtigen Regionen:** TMD = Transmembrandomäne; 1 – 17 = Transmembranhelices des SUR; M1, M2 = Transmembranhelices des Kir6.x; NBF = Nukleotidbindungsfalte; A,B = Walker A- und B-Motiv; RKR = Retentionsmotiv; Ö = Öffnerbindungsstellen; GBC, Repaglinid, Tolbutamid, ATP, MgATP, MgADP = Bindungsstellen der jeweiligen Substanzen

Die  $\alpha$ -Untereinheiten Kir6.1 (424 AS; 48 kDa) und Kir6.2 (390 AS; 45 kDa) gehören zur Familie der einwärtsgleichrichtenden Kaliumkanäle und besitzen je zwei Transmembransegmente. Bezüglich ihrer Aminosäuresequenz weisen die beiden Subtypen eine Homologie von 71% auf (Inagaki et al., 1995). In der Region H5 befindet sich bei beiden Typen die Sequenz Gly-Phe-Gly, die für die Selektivität von Kaliumionen verantwortlich ist. Kir6.x hat auch eine Bindungsstelle für ATP, deren Besetzung den Kanal schließt (Antcliff et al., 2005).

Das Gen KCNJ8 für Kir6.1 liegt auf Chromosom 12, Position 12p11.23, umfasst 9.7 kb und besitzt drei Exons, aber kein Intron. Kir6.1 kann mit den  $\beta$ -Untereinheiten SUR1 (Ämmälä et al., 1996) und SUR2B funktionelle Kanäle ausbilden (Aguilar-Bryan et al., 1998). Das intronlose, 390 Aminosäuren umfassende Gen für Kir6.2 liegt in der Nähe des SUR1-Gens auf dem kurzen Arm von Chromosom 11. Kir6.2 kann mit allen drei Isoformen des SUR funktionelle  $K_{ATP}$ -Kanäle ausbilden (Inagaki et al., 1996; Isomoto et al., 1996) und anders als Kir6.1- sind Kir6.2-enthaltende Kanäle sehr ATP-empfindlich. Sie sind z. B. im Pankreas, Herzen, Muskulatur, Gehirn zu finden (Seino und Miki, 2003; vgl. Tabelle 1).

Die  **$\beta$ -Untereinheit SUR** (Sulfonylharnstoffrezeptor) gehört zur Gruppe der ABC-Proteine (Higgins, 1995), der auch der Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) und die Multidrug Resistance Proteine (MRP) zuzurechnen sind. Anders als für den CFTR und die MRP konnte für die SUR-Proteine bisher keine Transporterfunktion nachgewiesen werden.

Der SUR besteht aus den drei Transmembrandomänen TMD0, TMD1 und TMD2, wobei TMD0 fünf und TMD1 sowie TMD2 jeweils sechs Transmembransegmente (TMS) umfassen. Zwischen der TMD1 und der TMD2 liegt die Nukleotidbindungsfalte 1 (NBF1), zwischen der TMD2 und dem C-Terminus des SUR die NBF2. Jede NBF enthält drei Motive: Das Walker-A-Motiv (GXXGXGKS; X= beliebige AS), ein konserviertes Motiv als Linker-Sequenz und das Walker-B-Motiv (YYYYD; Y= hydrophober Rest; Walker et al., 1982). Die Linker-Sequenz, die den Besetzungszustand des NBFs registriert, unterscheidet sich zwischen NBF1 (LSGGQ) und NBF2 (FSQGQ; Ashcroft, 2000; vgl. Abbildung 3).

Die beiden Isoformen SUR1 und SUR2 leiten sich von zwei unterschiedlichen Genen ab und zeigen eine 67%ige Sequenzhomologie (Gribble et al., 2000). **SUR1** besitzt eine größere Affinität für SU, wird in pankreatischen  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\delta$ -Zellen, im Gehirn und anderen neuroendokrinen Geweben exprimiert (Inagaki et al., 1996; Isomoto et al., 1996) und ist durch das 39 Exons umfassende Gen ABCC8 auf Chromosom 11 (11p15.1) codiert (Thomas et al., 1995). Das humane SUR1-Protein hat ein Molekulargewicht von 176 kDa und besteht aus 1581 Aminosäuren (Seino, 1999, Babenko et al., 1998).

Zellen, die **SUR2** enthaltende  $K_{ATP}$ -Kanäle exprimieren, wie z.B. Kardiomyozyten, Skelett- und glatte Muskelzellen haben eine geringere Affinität für SUs. SUR2 wird durch das 38 Exons umfassende Gen ABCC9 auf Chromosom 12 (12p12.1) codiert (Chutkow et al., 1996).

Sowohl von SUR1 (Sakura et al., 1999; Hambrock et al., 2002), als auch von SUR2 existieren durch alternatives Spleißen mehrere Varianten, wobei die bekannteste SUR2B ist. Sie unterscheidet sich von SUR2A lediglich durch 42

## 1. Einleitung

---

Aminosäuren am C-Terminus (Isomoto et al., 1996; Chutkow et al., 1996, Chutkow et al., 1999). Die Proteine SUR2A und SUR2B haben ein Molekulargewicht von 174 kDa (1549 AS; Seino, 1999, Babenko et al., 1998).

Zu der Quartärstruktur von  $K_{ATP}$ -Kanälen gibt es bisher kein endgültiges Modell. Das auf der Grundlage der Arbeiten von Babenko und Bryan (2003) und Mikhailov et al. (2005) erstellte Modell von Babenko (2005), gilt als das zur Zeit aktuellste und umfassendste 3D-Modell für  $K_{ATP}$ -Kanäle (vgl. Abbildung 4). Wenngleich einige Strukturfragen, wie z.B. der Aufbau der TMD0-L0 Region weiterhin ungeklärt bleiben, so vermittelt die Abbildung doch einen Eindruck von der Komplexität des Kanals.

# 1. Einleitung

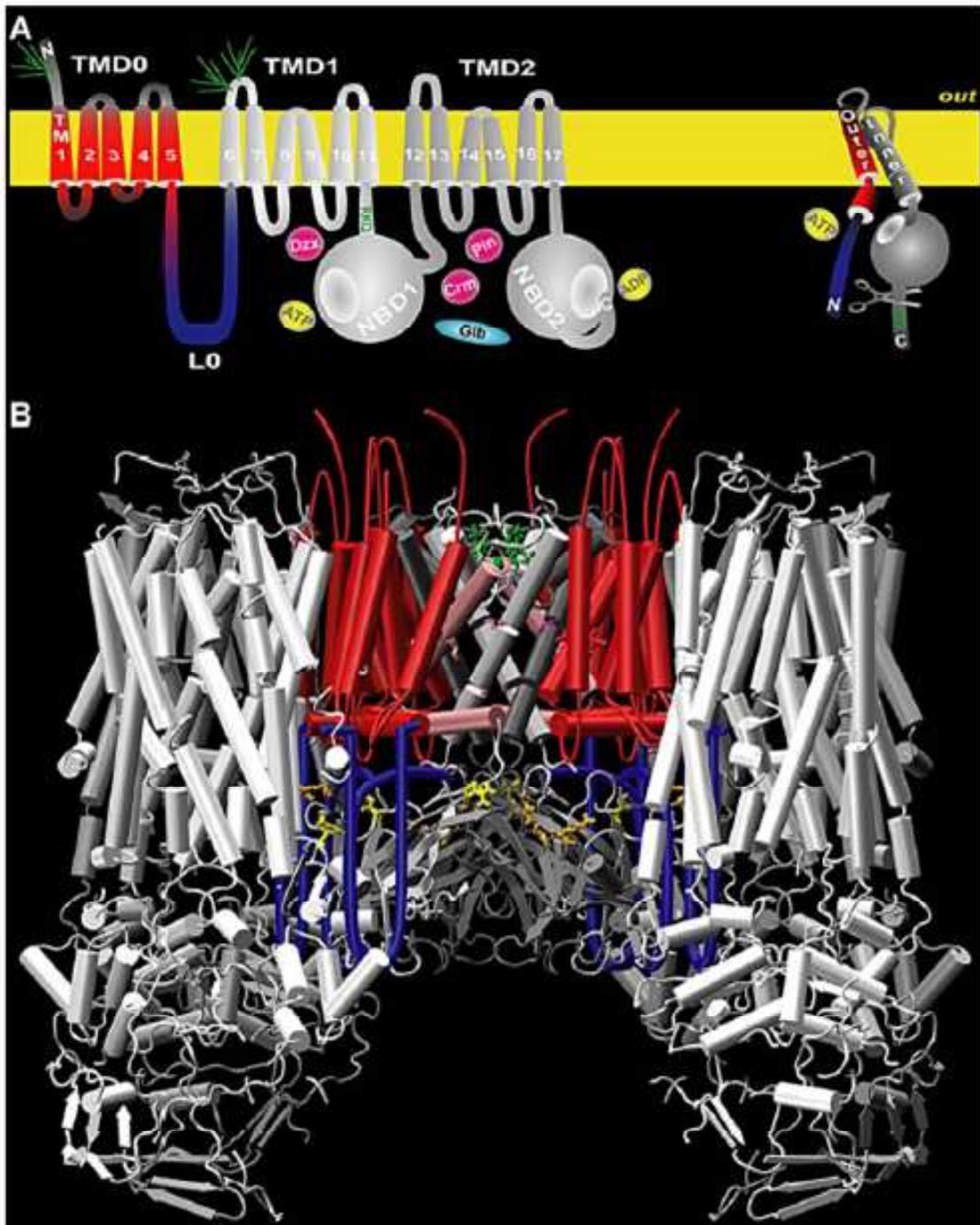


Abbildung 4: Humaner kardialer  $K_{ATP}$ -Kanal: A: Aufbau des  $K_{ATP}$ -Kanals: Dimer aus SUR2 und Kir6.2; zu sehen sind die BINDUNGSSTELLEN für folgende Substanzen: Dzx-Diazoxid, Pin-Pinacidil, Crm-Cromakalim und Glib-Glibenclamid; RKR- Motiv für den Transport vom RER zur Zellmembran; B: Strukturmodell des  $K_{ATP}$ -Kanals (Kir6.2/SUR2) auf Basis eines Homologievergleiches zwischen VC-MsbA und KirBac1.1.; Als rot und blau sind interagierende Proteinsegmente dargestellt, welche die Offenheitswahrscheinlichkeit  $P_o$  des Kanals vermindern oder erhöhen. (Babenko, 2005)

### **1.5 Regulation von $K_{ATP}$ -Kanälen**

Die Aktivität von  $K_{ATP}$ -Kanälen unterliegt einer komplexen Regulation, die durch eine Vielzahl von Faktoren bestimmt wird. Dominierend sind die Nukleotide MgATP und MgADP sowie Membranphospholipide, daneben spielen auch die Proteinkinasen A und C, langkettige AcylCoA Ester, G-Proteine, pH usw. (Seino und Miki, 2003) eine wichtige Rolle. Diskutiert wird auch ein Einfluss der Kreatinkinase (Crawford et al., 2002), der Adenylatkinase (Carrasco et al., 2001) und der Laktatdehydrogenase (Crawford et al., 2002).

#### **1.5.1 Regulation von $K_{ATP}$ -Kanälen durch Nukleotide**

$K_{ATP}$ -Kanäle werden durch ATP/MgATP inhibiert und durch MgATP/MgADP aktiviert, wobei die Hemmung über Kir6.x und die Aktivierung über SURx vermittelt wird (Nichols, 2006). Ist intrazellulär ausreichend Potential zur Phosphorylierung von Nukleotiden vorhanden, wird die Kanalaktivität gehemmt und der Kaliumefflux sehr stark reduziert. Ein schlechterer metabolischer Zustand der Zelle führt dagegen zur Aktivierung der Kanäle mit erhöhter Offenheitswahrscheinlichkeit.

Der Effekt von Nukleotiden an  $K_{ATP}$ -Kanälen ist ambivalent, je nachdem, an welche Untereinheit des Kanals sie binden. Tucker et al. (1997) entdeckten, dass ATP auf Kir6.2 (Kir6.2 $\Delta$ C) mit entferntem C-Terminus auch ohne SUR einen inhibierenden Effekt zeigt. Wichtige Regionen für die Vermittlung des Effektes sind die N- und C-terminalen Regionen des Kir6.2 (Tanabe et al., 2000).  $Mg^{2+}$ -Ionen sind für die Vermittlung des Effektes an Kir6.2 nicht notwendig (Ashcroft und Kakei, 1989).

Der  $K_{ATP}$ -Kanal weist vier hemmende Bindungsstellen auf; bereits die Bindung eines ATP-Moleküls an einer der vier Bindungsstellen genügt, um den Verschluss des Kanals zu induzieren (Markworth et al., 2000). Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass an der Ausbildung einer ATP-Bindungsstelle zwei Kir6.2-Untereinheiten beteiligt sind (Antcliff et al., 2005).

Andererseits übt die Bindung von MgATP bzw. ATP an NBF1 und MgADP an NBF2 eine aktivierende Wirkung auf den Kanal aus (Ueda et al., 1999, Matsuo et al., 2000). Die NBFs, v.a. NBF2, besitzen eine (recht langsame) ATPase-Aktivität (Ueda et al., 1997; Ueda et al., 1999; Bienengraeber et al., 2000; de Wet et al., 2007). Zingman et al. (2001) lieferten erste Beweise, dass die Steuerung der Kanalaktivität durch den SUR mit der ATPase-Aktivität verknüpft ist und der posthydrolytische Zustand den offenen Kanalzustand hervorruft. Es bleiben aber noch viele Fragen offen.

Zwischen den verschiedenen SUR-Isoformen gibt es deutliche Unterschiede bei den Nukleotidbindungseigenschaften: Die Bindung von MgADP an die NBF2 zeigt bei SUR1 eine deutlich höhere Magnesiumabhängigkeit als bei SUR2. Auch die Affinität der NBF1 für ATP ist bei SUR1 wesentlich höher als bei SUR2. Die NBF2 von SUR2B weist eine signifikant höhere Affinität für MgADP auf als die von SUR2A (Matsuo et al., 2000).

### **1.5.2 Regulation von $K_{ATP}$ -Kanälen durch negativ geladene langkettige Lipide**

Im Gegensatz zu den frei im Zytoplasma zirkulierenden Nukleotiden entfalten die nun zu besprechenden Lipide ihre Wirkung durch Wechselwirkung zwischen Zellmembran und  $K_{ATP}$ -Kanal. Sie binden an die Kir6.2 Untereinheit, an welcher sie infolge der engen Nachbarschaft zu der ATP-Bindungsstelle die ATP-Sensitivität des Kanals beeinflussen (Enkvetchakul und Nichols, 2003). Eine wichtige Rolle spielen die beiden negativ geladenen, langkettigen Lipide Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ( $PIP_2$ ) und Acyl-Coenzym A Ester (AcylCoA).

Das fast ausschließlich in der zytosolischen Membranseite vorkommende  $PIP_2$  setzt sich aus einer hydrophilen, polaren Kopfgruppe und einem langen, hydrophoben Fettsäurerest zusammen. Besondere Bedeutung hat  $PIP_2$  für die Weiterleitung extrazellulärer Signale in die Zelle. Das membranständige Enzym Phospholipase C hydrolysiert  $PIP_2$  in Diacylglycerin

(DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat ( $IP_3$ ), die wichtige intrazelluläre second messenger sind. Die Konzentration von  $PIP_2$  in der Membran wird durch Enzyme wie Phospholipase, Phospholipid-Phosphatase und Phospholipid-Kinase gesteuert und verknüpft dadurch den Phospholipidmetabolismus mit der  $K_{ATP}$ -Kanalregulation (Baukrowitz und Fakler, 2000).  $PIP_2$  öffnet  $K_{ATP}$ -Kanäle (Hilgemann und Ball, 1996) und vermindert deren ATP-Empfindlichkeit (Baukrowitz et al., 1998; Shyng et al., 1998).

Langkettige AcylCoA (z.B. OleoylCoA) sind Fettsäuren, die an der  $\beta$ -Oxidation beteiligt sind. Sie setzen sich aus einer hydrophilen, anionischen Kopfgruppe (Coenzym A) und einem langen hydrophoben Fettsäurerest zusammen. Sie sind potente  $K_{ATP}$ -Kanal-Aktivatoren, vermindern wie  $PIP_2$  die ATP-Empfindlichkeit der  $K_{ATP}$ -Kanäle und koppeln so den Fettsäurestoffwechsel an das Membranpotential der Zelle (Gribble et al., 1998; Liu et al., 2001). Aus verschiedenen Versuchen geht hervor, dass die Bindungsstelle der langkettigen Acyl-CoA wohl im Bereich des Kir6.2 liegt (Schulze et al., 2003; Bränström et al., 1998).

Bei Adipositas oder Hyperglykämie nimmt der Gehalt frei zirkulierender Fettsäuren in der Zelle zu, was in der pankreatischen  $\beta$ -Zelle zu einem Anstieg der langkettigen Acyl-CoA führt (Larsson et al., 1996). Durch die aktivierende Wirkung werden die  $\beta$ -Zellen hyperpolarisiert und die Insulinsekretion vermindert. Eine protektive Wirkung entfalten die langkettigen Acyl-CoA im Herzen, wo sie physiologisch Fettsäuren für die  $\beta$ -Oxidation liefern. Im Falle einer Ischämie akkumulieren die Acyl-CoA im Zytosol, aktivieren die  $K_{ATP}$ -Kanäle und führen so zur Hyperpolarisation der Zellen, was einen energiesparenden, protektiven Effekt haben könnte (Liu et al., 2001).

Umstritten ist allerdings weiterhin, ob  $PIP_2$  und AcylCoA den  $K_{ATP}$ -Kanal über den gleichen Mechanismus regulieren. Liu et al. (2001) haben postuliert, dass die Wirkung von OleoylCoA vom Zellmetabolismus abhängt, während  $PIP_2$  vermutlich über einen elektrostatischen Mechanismus wirkt. In Frage gestellt wird diese Annahme jedoch von Schulze et al. (2003), der sowohl für  $PIP_2$  als auch für OleoylCoA einen elektrostatischen Wirkmechanismus annimmt.

### **1.5.3 Regulation von $K_{ATP}$ -Kanälen durch Phosphorylierung und G-Proteine**

Über die bereits erläuterten Regulationsmechanismen hinaus werden  $K_{ATP}$ -Kanäle auch durch die Proteinkinase A und verschiedene trimere GTP-Bindungsproteine beeinflusst. Die Proteinkinase A (PKA) ist ein cAMP-abhängiges Schlüsselenzym des zellulären Energiestoffwechsels. PKA wirkt stimulierend auf  $K_{ATP}$ -Kanäle (Ribalet et al., 2000; Wellman et al., 1998). Am  $K_{ATP}$ -Kanal der Gefäße (Kir6.1/SUR2B) gilt die Phosphorylierung durch PKA als das eigentlich öffnende Prinzip (Quinn et al., 2004).

Trimere G-Proteine können direkt die Aktivität von  $K_{ATP}$ -Kanälen beeinflussen. Dabei hat  $G_{\alpha 1}$  sowohl auf Kir6.2/SUR1 als auch Kir6.2/SUR2A eine stimulierende Wirkung;  $G_{\alpha 2}$  jedoch nur auf Kir6.2/SUR2A. Die Untereinheit  $G_{\beta \gamma}$  reduziert die ATP-induzierte Inhibition an Kir6.2/SUR (Seino und Miki, 2003).

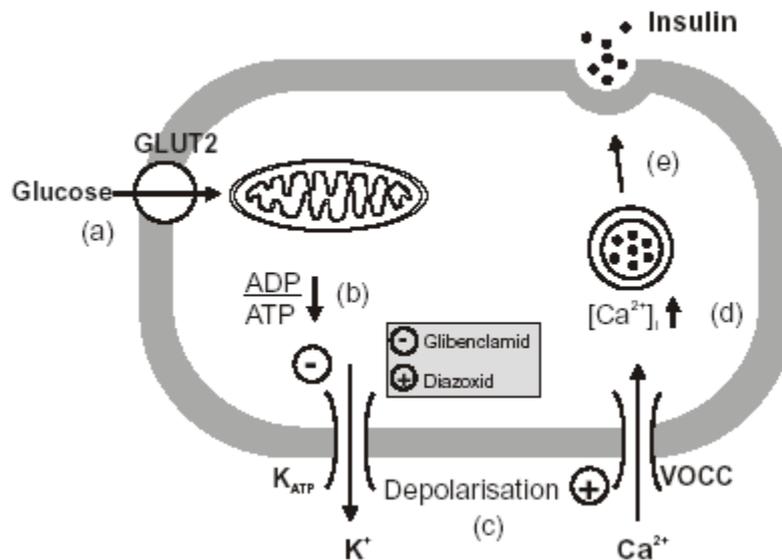
## **1.6 Funktion der $K_{ATP}$ -Kanäle**

### **1.6.1 $\beta$ -Zelle im Pankreas**

Unter 1.4 wurde ausgeführt, dass die Verknüpfung des metabolischen Zustandes der Zelle und deren Membranpotential eine wesentliche Funktion der  $K_{ATP}$ -Kanäle ist. In Abhängigkeit von verschiedenen Gewebelokalisationen findet man unterschiedliche Expressionsraten der separaten Gene der  $K_{ATP}$ -Kanaluntereinheiten und deren Spleißvarianten (vgl. Tabelle 1).

## 1. Einleitung

Am genauesten untersucht ist die Funktion der  $K_{ATP}$ -Kanäle bei der Insulinsekretion in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas'. Wie aus Abbildung 5 hervorgeht, sind an dem Mechanismus der Insulinsekretion vier Schlüsselemente beteiligt:



**Abbildung 5: Konsensusmodell der Insulinfreisetzung aus den  $\beta$ -Zellen des Pankreas' (aus Quast, DMW 2002)**

Der Glucosetransporter GLUT2, die Glukose-6-Kinase, der  $K_{ATP}$ -Kanal Kir6.2/SUR1 und der spannungsgesteuerte L-Typ- $Ca^{2+}$ -Kanal (L-VOCC = voltage-operated-calcium-channel). Der  $K_{ATP}$ -Kanal kontrolliert in erster Linie das Membranruhepotential der  $\beta$ -Zelle. Indirekt erfasst er über den ATP/ADP-Quotienten auch die intrazelluläre Glucosekonzentration. Liegt die Glucosekonzentration unter 5 mmol/l (= 90 mg/dl), stabilisiert der  $K^+$ -Efflux durch den offenen  $K_{ATP}$ -Kanal Kir6.2/SUR1 das Ruhemembranpotential der Zelle bei etwa  $-70$  mV. Unterhalb eines Membranpotentials von  $-40$  mV bleibt der L-Typ- $Ca^{2+}$ -Kanal geschlossen. Kommt es postprandial zu einem Anstieg der Glucosekonzentration im Plasma, so wird die Glucose durch den insulinunabhängigen GLUT2 in die Zelle aufgenommen. Dieser Transporter hat eine geringe Glucoseaffinität und kommt außer im Pankreas auch noch in der Leber, in der Darmmukosa und in der Niere vor. Die aufgenommene Glucose wird glykosyliert, was den ATP/ADP-Quotienten erhöht. Wie unter 1.5.1 beschrieben, führt freies ATP durch Interaktion mit der SUR1-Untereinheit zu

einer verringerten Offenheitswahrscheinlichkeit des  $K_{ATP}$ -Kanals. Infolge der verminderten  $K^+$ -Leitfähigkeit steigt das Membranpotential und die Depolarisation führt zur Aktivierung der L-Typ- $Ca^{2+}$ -Kanäle. Das nun einströmende  $Ca^{2+}$  führt zur Erhöhung der  $Ca^{2+}$ -Konzentration in der Zelle und stimuliert so die Exozytose der Insulingranula.

### 1.6.2 Zentrales Nervensystem

Über den Pankreas hinaus gibt es  $K_{ATP}$ -Kanäle auch im Zentralen Nervensystem, z.B. in der Substantia nigra (Sakura et al., 1995), im Cortex (Ohno-Shosaku und Yamamoto, 1992), im Hippocampus (Zawar et al., 1999) und im Hypothalamus (Ashcroft und Ashcroft, 1990). Im ventromedialen Hypothalamus konnte der  $K_{ATP}$ -Kanal Kir6.2/SUR1 in glucoseempfindlichen Neuronen (glucose-responsive-neurons (GRN)) identifiziert werden (Miki et al., 2001; Liss et al., 1999). Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass dem  $K_{ATP}$ -Kanal eine Funktion bei der Regulation des Blutzuckerspiegels in diesen Arealen zukommt. Miki et al. (2001) postulierten, dass die GRN die Glucagonsekretion in den  $\alpha$ -Zellen des Pankreas' und ferner Appetit und Nahrungsaufnahme modulieren. Steigt die Glucosekonzentration im Blut, schließen die  $K_{ATP}$ -Kanäle im Pankreas und die konsekutive Insulinsekretion führt zu einer Verminderung der zirkulierenden Glucose. Infolgedessen werden  $K_{ATP}$ -Kanäle in den GRN aktiviert, die durch das autonome Nervensystem die  $\alpha$ -Zellen des Pankreas' zur Glucagonsekretion stimulieren. Dadurch steigt die Glucosekonzentration im Blut wieder an.

### 1.6.3 Kardiomyozyten

Unter physiologischen Bedingungen inhibieren hohe ATP/ADP-Quotienten die Kir6.2/SUR2A-Kanäle in Kardiomyozyten. Eine starke Aktivierung erfahren die  $K_{ATP}$ -Kanäle bei einem fallenden ATP/ADP-Quotienten und steigenden Oleoyl-Coenzym A Ester Konzentrationen, z.B. bei Ischämie oder Hypoxie. Der zunehmende  $K^+$ -Efflux führt zu einer Verkürzung der

Aktionspotentialdauer im Kardiomyozyt und infolgedessen zu einem verminderten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom. Dieser negativ inotrope Effekt hilft dem Gewebe Energie zu sparen und führt darüber hinaus zu einer verminderten Erregbarkeit der Zelle. Die Aktionspotentialverkürzung bzw. entstehende Kreisströme um unerregbare Herzareale können jedoch auch zu Arrhythmien, Herzflimmern und plötzlichem Herztod führen. Die Verkürzung des Aktionspotentials kann, zumindest am Anfang der ischämischen Periode, durch Sulfonylharnstoffe oder den Thiosulfonylharnstoff HMR1883 aufgehoben werden (Gögelein et al., 1999). Länger anhaltende Episoden von Ischämie oder Hypoxie führen zu apoptotischen und nekrotischen Prozessen (Nichols und Lederer, 1991).

Die Auswirkungen eines länger andauernden  $\text{O}_2$ -Mangels können durch vorausgegangene kurze ischämische oder hypoxische Episoden mit anschließender Reperfusion des Myokards begrenzt werden. Dieses Phänomen ist als ischämische Präkonditionierung (ischemic preconditioning-IPC) des Myokards bekannt und führt zu einer reduzierten Infarktgröße. Als Auslöser des Prozesses gelten verschiedene Substanzen, wie z.B. Adenosin, Bradykinin, Noradrenalin, Opioide und NO. Es ist z.Zt. noch nicht klar, welche Bedeutung mitochondriale (mito $\text{K}_{\text{ATP}}$ ) und plasmalemmale  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanäle für die IPC haben (Quast et al., 2004). Eine entscheidende Rolle spielen die sarkolemmalen  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanäle bei der Gewöhnung des Herzens an adrenergen Stress (Zingman et al., 2002).

### **1.6.4 Gefäßmuskulatur**

Der  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanal Kir6.1/SUR2B in der Gefäßmuskulatur spielt über die Beeinflussung des Gefäßtonus eine wichtige Rolle bei der Blutdruckregulation. Die Aktivierung der  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanäle führt durch die Hyperpolarisation der Zellmembran zu einer Vasodilatation, was zu einer Blutdrucksenkung führt (Quast und Cook, 1989). Im Gehirn, dem Herzen und an der Niere sind  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanäle unmittelbar an der Regulation des Gefäßtonus' beteiligt (Quast, 1996). Der im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen signifikant erhöhte systolische wie diastolische Blutdruck in  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanal-Knock-Out-Mäusen weist auf die wichtige

physiologische Rolle der  $K_{ATP}$ -Kanäle bei der Blutdruckregulation hin. Eine zentrale Rolle spielen die  $K_{ATP}$ -Kanäle der Koronarien bei der Rekrutierung der Koronarreserve bei Stress und Ischämie (Quast et al., 2004). Pathophysiologisch scheint der  $K_{ATP}$ -Kanal bei der essentiellen Hypertonie und der vasospastischen (Prinzmetal) Angina von Bedeutung zu sein (Chutkow et al., 2002, Miki et al., 2002; Quast et al., 2004). Die Mäuse ohne den vaskulären  $K_{ATP}$ -Kanal sterben den plötzlichen Herztod (Chutkow et al., 2002, Seino, 2003).

### 1.6.5 Skelettmuskelzellen

Der  $K_{ATP}$ -Kanal Kir6.2/SUR2A wird verstärkt in der Skelettmuskulatur exprimiert. Die Kontraktion der Muskelzellen erfordert einen hohen Energieumsatz. In Ruhe bleiben die  $K_{ATP}$ -Kanäle geschlossen, bei einem Anstieg des ATP/ADP-Quotienten öffnen die  $K_{ATP}$ -Kanäle, der  $K^+$ -Efflux steigt und die Aktionspotentiale werden verkürzt. Ähnlich dem Effekt der  $K_{ATP}$ -Kanäle am Herzen schützen sie so die Skelettmuskelzellen vor einer schädigenden  $Ca^{2+}$ -Überladung (Burton und Smith, 1997; Light et al., 1994). Rajan et al. (2000) zeigten, dass Wildtyp-Mäuse im Vergleich zu Kir6.2<sup>-/-</sup>-Knock-Out-Mäusen eine wesentlich geringere Restspannung des Muskels nach Kontraktion und auch mit zunehmendem Alter noch eine wesentlich bessere Muskelfunktion aufwiesen. Darüber hinaus spielen die  $K_{ATP}$ -Kanäle auch eine wichtige Rolle bei der Glucosehomöostase des Skelettmuskels (Miki et al., 2002; Minami et al., 2003).

### **1.7 $K_{ATP}$ -Kanalopathien**

*“With few exceptions, diabetes in childhood knows no cure, no matter how mild it may appear in the beginning, nor how gradual its development in the first months or even years.”*

*Carl von Noorden, great European authority, 1913*

#### **1.7.1 Kongenitaler Hyperinsulinismus im Kindesalter (HI)**

Der kongenitale Hyperinsulinismus im Kindesalter (HI) oder ‘persistent hyperinsulinemic hypo-glycemia of infancy’ (PHHI) ist charakterisiert durch eine Unterfunktion bis hin zum Funktionsverlust von  $K_{ATP}$ -Kanälen im Pankreas. Die fehlende Aktivierung der  $K_{ATP}$ -Kanäle mit normalerweise folgender Hyperpolarisation der Zellmembranen der  $\beta$ -Zellen des Pankreas führt zu einer persistierenden Depolarisation mit gesteigerter Insulinfreisetzung (Bryan und Aguilar-Bryan, 1999). Die konstant erhöhte Insulinsekretion führt zu schweren Hypoglykämien mit gravierender, irreversibler neurologischer Symptomatik bis hin zum Tod. Der HI manifestiert sich in der Regel in den ersten zwölf Lebensmonaten und tritt mit einer Inzidenz von 1 : 50000 Lebendgeburten in der Normalbevölkerung auf. In geografisch isolierten Populationen weist dieser jedoch eine deutlich höhere Inzidenz, von z.B. 1 : 2500 Lebendgeburten auf der arabischen Halbinsel auf (Dunne et al., 2004). Der größere Teil des HI tritt sporadisch auf. Bei der hereditären Variante wurden zwar auch autosomal-dominante Vererbungsmodi beschrieben, die Mehrzahl folgt jedoch einem autosomal-rezessiven Erbgang (Huopio et al., 2000). Bei 50% der Erkrankungen liegen Mutationen im SUR1 Gen (ABCC8, vgl. 1.4) vor, wovon bisher mehr als 100 Varianten identifiziert wurden (Dunne et al., 2004; Glaser et al., 2000). Diese werden in zwei Klassen eingeteilt: Mutationen der Klasse 1 weisen eine verminderte Oberflächenexpression von  $K_{ATP}$ -Kanälen in der Zellmembran auf. Gründe dafür können Probleme bei der Produktion, Reifung, dem Transport oder dem Einbau der Proteine in die Zellmembran sein (Taschenberger et al., 2002). Mutationen der Klasse 2 zeichnen sich durch

korrekt in die Zellmembran eingebaute  $K_{ATP}$ -Kanäle aus, die durch eine Entkopplung vom Zellmetabolismus aber lediglich über eine verminderte bis aufgehobene Funktion verfügen. Insbesondere die Sensitivität der Kanäle für MgADP ist herabgesetzt (Huopio et al., 2000). Ein Großteil der Klasse 2-Mutationen konnte im Bereich der NBF (vgl. 1.4) lokalisiert werden. Wesentlich seltener konnte HI als Folge von Mutationen im Gen für Kir6.2 (KCNJ11, vgl. 1.4) beobachtet werden.

Ein leichteres Krankheitsbild stellt die familiäre Leuzin-sensitive HI dar, die durch bestimmte Mutationen im SUR1 (z.B. R1353H) verursacht wird und bei der es nach der Aufnahme proteinreicher Kost bzw. der essentiellen Aminosäure Leuzin zu einer reaktiven Hypoglykämie kommt (Magge et al., 2004).

Darüber hinaus können auch 'Gain-of-function'-Mutationen in der Glucokinase (GCK) und der Glutamat-Dehydrogenase (GDH) Ursachen einer milden HI-Form sein. Die Glucokinase, ein intrazelluläres Enzym mit starker Glucose-Affinität ist für die Phosphorylierung der Glucose zu Glucose-6-Phosphat notwendig (vgl. 1.6.1). Aufgrund dieser Funktion wird die GCK auch als „Glucose Sensor“ bezeichnet (Bryan et al., 2005). Bei einer übermäßigen Aktivierung dieser Enzyme kommt es zu einer gesteigerten ATP-Synthese, in deren Folge die Inhibition der  $K_{ATP}$ -Kanäle zu einer gesteigerten Insulinfreisetzung führt (Stanley et al., 1998; Gloyn et al., 2003).

Bei der Therapie der HI spielt die Funktionsfähigkeit der  $K_{ATP}$ -Kanäle eine Rolle: Bei HI, die durch Mutationen in GCK und GDH ausgelöst wurde, kann mit dem Kaliumkanalöffner Diazoxid (vgl. 1.8.2) adäquat therapiert werden (Dunne et al., 2004). Bei schwereren Verläufen, wie sie bei Mutationen im SUR1 oder im Kir6.2 auftreten, stellt die Pankreatektomie die Therapie der Wahl dar (Cook und Bryan, 1998).

### 1.7.2 Permanenter Neonataler Diabetes (PNDM)

Diese Stoffwechselstörung ist gekennzeichnet durch die Entwicklung einer insulinpflichtigen Hyperglykämie innerhalb der ersten drei Lebensmonate. Von dem permanenten ist der transiente neonatale Diabetes abzugrenzen, der sich innerhalb von drei bis sechs Monaten wieder zurückbildet. Mildere Erscheinungsformen des PNDM zeichnen sich durch minimale Insulinantwort auf intravenöse Glucosegabe, aber adäquate Insulinfreisetzung nach Sulfonylharnstoffgabe aus (Proks et al., 2005). Bei der schwersten Verlaufsform des PNDM, dem 'DEND-Syndrom' (developmental delay, epilepsy and neonatal diabetes) treten zusätzlich Entwicklungsverzögerungen, Myasthenie, Epilepsie und kraniofaziale Dismorphien auf (Gloyn et al., 2004; Sagen et al., 2004). Im Gegensatz zu dem, unter 1.7.1 besprochenen kongenitalen Hyperinsulinismus im Kindesalter weisen 50% der an PNDM erkrankten Patienten heterozygot Kir6.2-Mutationen auf (Gloyn et al., 2004; Sagen et al., 2004). Mutationen im Kir6.2 treten gehäuft im Bereich der ATP-Bindungsstelle auf, wobei insbesondere die Aminosäurereste V59 und R201 betroffen sind. Bei allen bisher bekannten PNDM-Formen konnte eine verminderte ATP-Empfindlichkeit der  $K_{ATP}$ -Kanäle festgestellt werden. Kir6.2-Mutationen innerhalb der ATP-Bindungsstelle (z.B. R201H, R201C, Y330C) beeinträchtigen zwar die ATP-Affinität, nicht jedoch die Offenheitswahrscheinlichkeit der Kanäle, weshalb diese mit der milden Verlaufsform des PNDM assoziiert werden (Gloyn et al., 2004; Sagen et al., 2004; Antcliff et al., 2005). Therapeutisch kommen  $K_{ATP}$ -Kanal-Inhibitoren in Frage.

Von der ATP-Bindungsstelle weiter entfernt liegende Mutationen wie z.B. Q52R, V59M oder V59G erhöhen die Offenheitswahrscheinlichkeit der  $K_{ATP}$ -Kanäle und verursachen schwerwiegendere Krankheitsverläufe (DEND). In diesem Falle muss die Therapie um Insulin ergänzt werden (Proks et al., 2005).

Der unterschiedliche Einfluss einerseits der ATP-Affinität und andererseits der Offenheitswahrscheinlichkeit lässt sich folgendermaßen erklären: Die  $K_{ATP}$ -Kanal Untereinheit Kir6.2 besteht aus vier Monomeren, von denen bei einer heterozygoten Kir6.2-Mutation zwischen null und vier von

dieser betroffen sein können. Ein Defekt der ATP-Bindung wirkt sich erst dann aus, wenn alle vier Monomere die Mutation aufweisen. Deshalb ist die Änderung der ATP-Empfindlichkeit in der durchschnittlichen Kanalpopulation nur gering ausgeprägt. Anders verhält es sich jedoch bei Mutationen, welche die Kanalsteuerung betreffen. Der Offenzustand des Kanals wird durch die zunehmende Anzahl der mutierten Untereinheiten energetisch stabilisiert. Davon ist die ATP-Empfindlichkeit von über 90% der in der heterozygoten Population vorkommenden  $K_{ATP}$ -Kanäle betroffen.

### 1.7.3 Die Mutante SUR1(Q1178R)

2005 wurde ein Patient mit PNDM beschrieben, bei dem die heterozygote Expression der Mutanten SUR1(Q1178) gefunden wurde (Christesen et al., 2005, *Horm Res.* 64, **135**). Die Aminosäure Glutamin 1178, die in der Mutanten gegen Arginin ausgetauscht ist, liegt im TMS15 am Ende des oberen Drittels (Babenko, 2008). Babenko zeigte, dass die Mutation die Offenwahrscheinlichkeit und die Leitfähigkeit des Kanals in der Abwesenheit von MgATP nicht ändert, aber zu einer Überaktivierung des Kanals durch MgATP führt. Quantitativ heißt das, dass der mutierte Kanal, wenn heterozygot mit dem Wildtyp exprimiert, durch 1 mM MgATP zweimal stärker aktiviert wird als der Wildtyp, der homozygote Kanal sogar siebenmal. Dies führt zu einer Schwächung der hemmenden Wirkung von MgATP durch Bindung an Kir6.2 (vgl. 1.5.1): Bei 5 mM MgATP ist der Wildtyp zu >99% geschlossen, die (homozygote) Mutante jedoch nur zu 92%. Ferner ist die hemmende Wirkung von Tolbutamid stark abgeschwächt und die beim Wildtyp so wichtige aktivierende Wirkung MgADP bei der Mutanten funktionell bedeutungslos (Babenko, 2008).

Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass die Mutation den MgATP-gebundenen Zustand des SUR stabilisiert, der den Kanal öffnet. Nach der Hypothese von Zingman et al. (2001) ist dies der posthydrolytische Zustand, in dem MgADP (und  $P_i$ ) noch an die NBF2 gebunden ist (sind). Dieser Zustand wird durch Kaliumkanalöffner stabilisiert (vgl. 1.8.2), wohingegen sowohl

Affinität als auch Kapazität der GBC-Bindung vermindert sind. Die Charakterisierung des Einflusses der Mutation SUR1(Q1178) auf das Ligandenbindungsverhalten steht im Mittelpunkt dieser Arbeit und wird in Kapitel 1.9 ausführlich besprochen.

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

Diese Diabetesform folgt einem autosomal-dominanten Erbgang, tritt häufig im jungen Erwachsenenalter auf und beruht auf einer Dysfunktion der  $\beta$ -Zellen des Pankreas'. Heterozygote Mutationen mit einem Funktionsverlust der Glucokinase rufen den MODY2 hervor, welcher oft asymptomatisch verläuft und zu nur mäßig erhöhten Blutzuckerwerten führt. Im Gegensatz hierzu verursachen homozygote Mutationen dieses Enzyms eine ausgeprägtere Störung des  $\beta$ -Zellmetabolismus mit konsekutiver Entstehung eines permanenten neonatalen Diabetes (PNDM). Fünf weitere MODY-Gene kodieren für verschiedene Transkriptionsfaktoren, die sowohl für die Entwicklung der  $\beta$ -Zellen als auch für die Expression von den Glucosestoffwechsel regulierenden Genen verantwortlich sind. Dabei kommt es über den gestörten Glucosestoffwechsel zu einem ATP-Mangel und konsekutiv zu einer erhöhten Offenheitswahrscheinlichkeit der Kanäle. Schließlich können auch Mutationen im Kir6.2 selbst einen MODY auslösen (Yorifuji et al., 2005).

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

Als Ursache für die Entstehung des Nicht-Insulinabhängigen Diabetes mellitus (NIDDM = non insulin dependent diabetes mellitus = Typ 2-Diabetes) gilt eine Insulinresistenz, gepaart mit Störungen der Insulinsekretion. Das Manifestationsalter liegt meist jenseits des 40. Lebensjahres, weshalb man den DM Typ 2 in Abgrenzung zum Typ 1-Diabetes häufig auch als Altersdiabetes bezeichnet. Prädispositionsfaktoren dieser Erkrankung sind v.a. Adipositas zusammen mit erhöhten Blutfettwerten. In der Population der europäischen

Kaukasier ist häufig der heterozygote (45%) bzw. der homozygote (13%) Polymorphismus E23K im Kir6.2 identifizierbar (Gloyn et al., 2001; Sakura et al., 1996). Dieser Polymorphismus ist mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko für DM2 verbunden und begünstigt auch einen erhöhten BMI (body mass index; Gloyn et al., 2003; Nielsen et al., 2003; Vaxillaire et al., 2004; Riedel et al., 2005). Die E23K-Mutation erhöht die Offenheitswahrscheinlichkeit, vermindert die ATP-Empfindlichkeit und verstärkt die MgADP-Aktivierung der Kir6.2/SUR1-Kanäle (Schwanstecher et al., 2002a; Schwanstecher et al., 2002b).

### **1.8 Pharmakologie der $K_{ATP}$ -Kanäle**

In der Pharmakologie der  $K_{ATP}$ -Kanäle werden die Klassen der Öffner (z.B. Diazoxid, P1075, Cromakalim) und Schließer (z.B. Glibenclamid, Repaglinid) unterschieden. Aufgrund der physiologischen und pathophysiologischen Bedeutung der  $K_{ATP}$ -Kanäle in verschiedenen Geweben kommt den gewebsspezifischen  $K_{ATP}$ -Kanalmodulatoren ein großes therapeutisches Potential zu.

#### **1.8.1 $K_{ATP}$ -Kanal-Inhibitoren: Sulfonylharnstoffe und Glinide**

Sulfonylharnstoffe (SU) wie z.B. Glibenclamid und Glinide wie z.B. Repaglinid binden an den Sulfonylharnstoffrezeptor (SUR, vgl. 1.4) und hemmen dadurch die Aktivität des  $K_{ATP}$ -Kanals. Die resultierende Depolarisation und konsekutive Insulinsekretion der  $\beta$ -Zellen des Pankreas' wird pharmakotherapeutisch zur Behandlung von hyperglykämischen Zuständen genutzt. Die Blockade von  $K_{ATP}$ -Kanälen in anderen Geweben (vgl. 1.6) im Zuge der DM2-Therapie kann mit kardiovaskulären Risiken verbunden sein und ist deshalb unerwünscht (Quast et al., 2004). Es gilt sowohl bei der Entwicklung als auch beim therapeutischen Einsatz von insulinotropen Pharmaka, die Konzentrations-Wirkungs- bzw. Konzentrations-Bindungs-

Beziehungen der Substanzen an den jeweiligen  $K_{ATP}$ -Kanalsubtypen (vgl. 1.4) zu berücksichtigen.

Der Mechanismus der Bindung der  $K_{ATP}$ -Kanal-Inhibitoren an SUR1 und SUR2A ist komplex und noch nicht im Detail geklärt. Struktur-Funktionsanalysen zeigen, dass die Bindungstasche des SUR in zwei Kompartimente, die „A-site“ und die „B-site“ unterteilt werden kann (Übersichten Bryan et al., 2005; Vila-Carriles et al., 2007; Winkler et al., 2007).

Als wichtig für die hochaffine Tolbutamidbindung, die s.g. „A-site“, kann die TMD2 (vgl. 1.4; Abbildung 3), insbesondere das Serin an Position 1237 im intrazellulären Loop zwischen den TMS15 und TMS16 betrachtet werden (Ashfield et al., 1999). Mit dieser Bindungsstelle interagiert z.B. der Sulfonylharnstoffrest bei GBC und Tolbutamid. Es konnte aber gezeigt werden, dass für diese Bindung nicht unbedingt ein SU-Rest notwendig ist, sondern dass lediglich der aromatische Ring der Phenylethylgruppe entsprechend mit einer sauren Gruppe (z.B. Sulfonylharnstoff-, Carboxylgruppe), die bei physiologischen pH-Werten deprotoniert vorliegen, substituiert sein muss, wie das z.B. bei Meglitinid der Fall ist (Brown und Foubister, 1984).

Bei dem  $K_{ATP}$ -Kanal-Inhibitor Glibenclamid, der bei der Erstellung dieser Arbeit Verwendung fand, gibt es neben dem SU-Rest auch noch einen Benzamido-Rest. Deshalb nimmt man an, dass GBC außer an der A-site auch noch an einer B-site bindet. Mehrere Arbeiten legen nahe, dass für diese Bindungsstelle die Region L0 auf dem SUR und der N-Terminus auf dem Kir6.2 eine wichtige Rolle spielen (Bryan et al., 2005; Vila-Carriles et al., 2007).

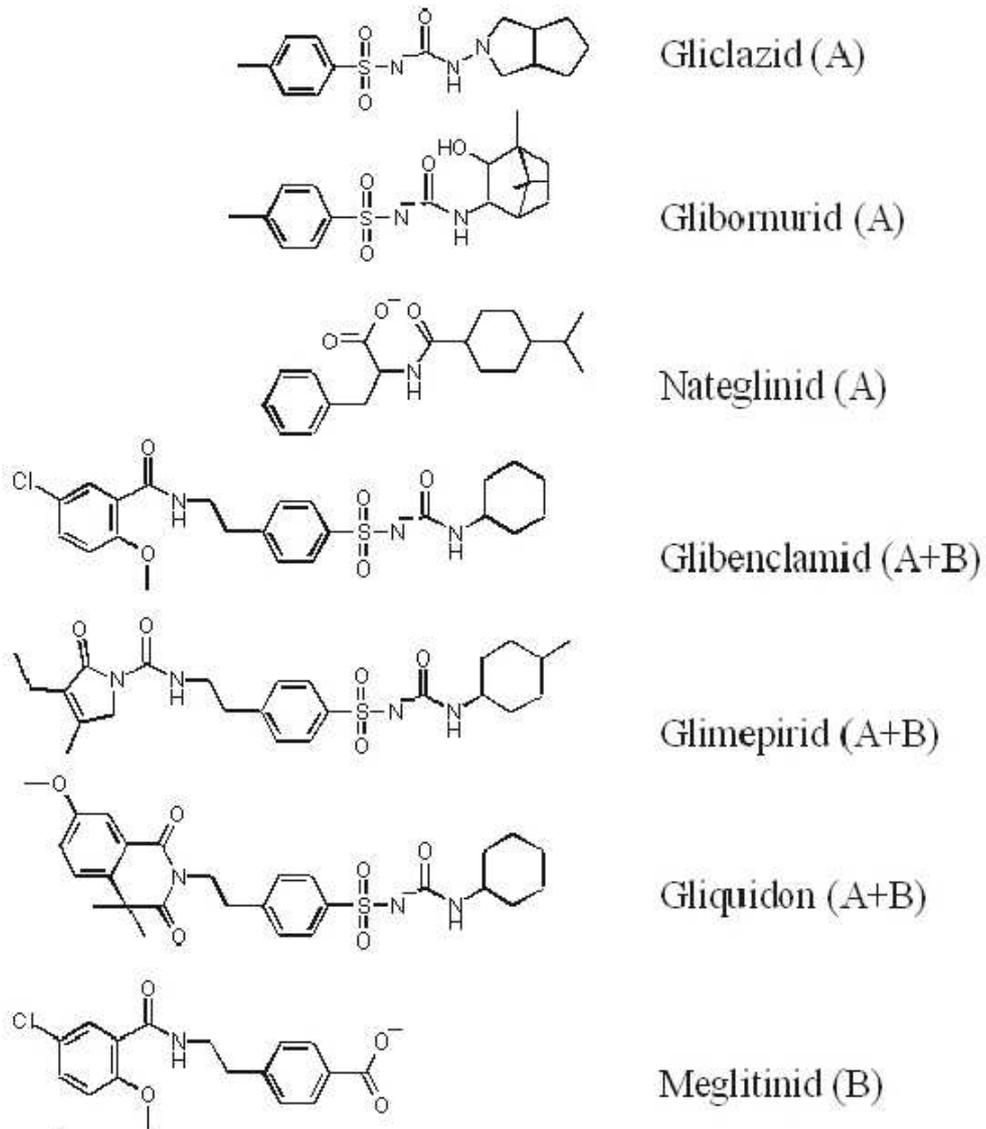
Man kann die unterschiedlichen Substanzen je nach Bindungsverhalten in A-Liganden (z.B. Tolbutamid, Glibornurid; „kurze“ SU), A+B-Liganden (z.B. Glibenclamid, Glimepirid; „lange SU“) und B-Liganden (z.B. Meglitinid, Repaglinid) einteilen (Winkler et al., 2007). Die A-Liganden sind SUR1-selektiv (Chachin et al., 2003; Reimann et al., 2001; Meyer et al., 1999; Winkler et al., 2007). Es wird vermutet, dass SUR1, jedoch nicht SUR2 eine Bindungstasche mit lipophilem Charakter besitzt, die mit dem Butylrest von Tolbutamid oder den analogen lipophilen Zentren anderer A-Liganden interagiert.

Bei den Substanzen der neuesten Gruppe der insulinsteigernden Antidiabetika, den Gliniden Repaglinid, Nateglinid und Mitiglinid, ist die negativ geladene Sulfonylharnstoffgruppe durch eine Carboxylgruppe ersetzt (Bryan et al., 2005; Winkler et al., 2007). Sie enthalten zwei lipophile Gruppen und binden somit als reine A-Liganden (Nateglinid, Mitiglinid) oder B-Liganden (Repaglinid, Meglitinid). Glinide besitzen im Gegensatz zu Sulfonylharnstoffen eine geringe Halbwertszeit (2 - 4 Stunden) und sind demnach kurzwirksame Antidiabetika. B-Liganden haben nur eine eingeschränkte Selektivität für den pankreatischen Kir6.2/SUR1-Kanal (Proks et al., 2002; Stephan et al., 2006).

Neben den Sulfonylharnstoffen und Gliniden wurden Blocker auch mit anderen Leitstrukturen z.B. Cyanoguanidine (PNU-99963) oder Dihydropyridine (A184209) entwickelt, die ebenso über den SUR den Kanal schließen. Sie haben jedoch bisher keine therapeutische Bedeutung. Weiterhin ist man auf der Suche nach SUR2A-Subtyp-spezifischen  $K_{ATP}$ -Kanalblockern, die ein antiarrhythmisches Potential haben (vgl.1.6.3, Gögelein et al., 1999).

## 1. Einleitung

---



**Abbildung 6:** Strukturformeln ausgewählter  $K_{ATP}$ -Kanal-Blocker; nach Ligandgruppen (A, A+B und B-Liganden) geordnet. Die Ausrichtung der Strukturen erfolgte nach der zentralen, allen Verbindungen gemeinsamen Phenylgruppe mit dem benachbarten Träger der negativen Ladung. A-Liganden besitzen rechts, B-Liganden links ein weiteres lipophiles Zentrum. A+B-Liganden verfügen über alle drei lipophile Zentren.

### 1.8.2 $K_{ATP}$ -Kanal-Öffner: Diazoxid und NNC 55-0462

Die  $K_{ATP}$ -Kanal-Öffner (KCO) bilden eine strukturell sehr heterogene Substanzgruppe (Cyanoguanidine, z.B. P1075 und Pinacidil; Benzopyrane, z.B. Bimakalim und Cromakalim; Thioformamide, z.B. Aprikalim; Pyridylnitrate, z.B. Nicorandil; Pyrimidinsulfate, z.B. Minoxidilsulfat oder Benzothiadiazine, z.B. Diazoxid), die an verschiedenen  $K_{ATP}$ -Kanälen-Typen ein charakteristisches, selektives Bindungsverhalten aufweisen (vgl. Abbildung 7). Im Allgemeinen verfügen SUR2-haltige  $K_{ATP}$ -Kanäle über eine hohe Öffneraffinität und -empfindlichkeit. Geringe Unterschiede zwischen den SUR2-Isoformen, wie die etwa vierfach höhere Öffneraffinität zum SUR2B als zum SUR2A (Hambrock et al., 1999; Schwanstecher et al., 1998) beruhen auf Unterschieden in den letzten 42 Aminosäuren (vgl. 1.4). Dagegen besteht bei SUR1-haltigen  $K_{ATP}$ -Kanälen mit Ausnahme des Benzothiadiazin Diazoxid eine eher geringe Öffneraffinität.

Uhde et al. (1999) konnte mithilfe von SUR1/SUR2B-Chimären zwei Bereiche in der TMD2 identifizieren, die für die Bindung von KCO (außer den Benzothiadiazinen) entscheidend sind: KCO I (Thr1059-Leu1087) und KCO II (Arg1218-Asn1320). Die KCO I liegt im Bereich der cytoplasmatischen Schleife (CL 7) zwischen TMS 13 und 14 (vgl. 1.4). Die KCO II erstreckt sich vom TMS 16 über TMS 17 hinaus bis in NBF2 (Uhde et al., 1999). Eine entscheidende Rolle kommt dabei einer Aminosäure im TMS17 des SUR2 zu (Moreau et al., 2000; Moreau et al., 2005). Anders als bei der Bindung der SUs an den Kanalkomplex Kir/SUR (vgl. 1.8.1), kommt der Interaktion von SUR und Kir kein nennenswerter Einfluss auf die Öffnerbindung zu (Schwanstecher et al., 1998; Russ et al., 1999; Hambrock et al., 2001). Die Bindungsregionen der Öffner und Blocker der  $K_{ATP}$ -Kanäle liegen benachbart und sind miteinander negativ allosterisch gekoppelt (Löffler-Walz et al., 2002; Bray und Quast, 1992).

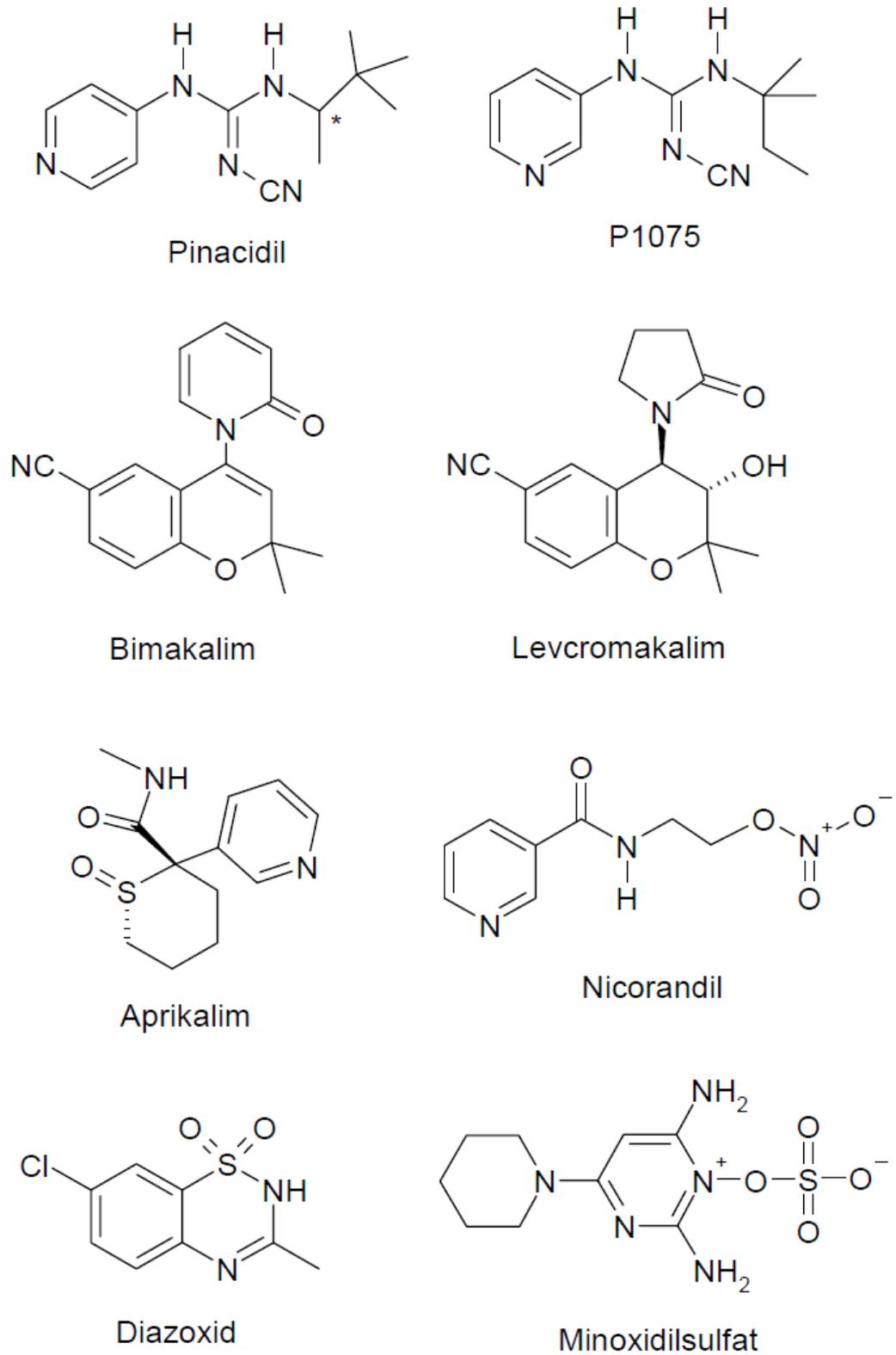


Abbildung 7: Strukturformeln ausgewählter KCOs

Der Wirkmechanismus der KCOs ist bisher nicht vollständig verstanden. Die Bindung und Wirkung der Öffner erfordert die Anwesenheit hydrolysierbarer  $Mg^{2+}$ -Nukleotide (Quast et al., 1993; Schwanstecher et al., 1998). Liegen die Öffner in sehr hohen Konzentrationen vor, können diese auch in Abwesenheit von  $Mg^{2+}$  wirksam sein (Russ et al., 2003). Mutation in beiden NBFs, welche die Nukleotidbindung und ATP-Hydrolyse stören, führen zur Schwächung der Öffnerbindung an dem SUR (Schwanstecher et al., 1998; Amann et al., 2010). Die gegenseitige allosterische Kopplung der Öffner- und NBF-Regionen wird durch den Einfluss der Öffner auf die ATPase-Aktivität bestätigt (Bienengraeber et al., 2000). Weitere Untersuchungen der Gruppe um Terzic zeigen, dass die Öffner den posthydrolytischen Zustand des SUR, der mit dem Offenzustand des Kanals assoziiert wird, stabilisieren (Zingman et al., 2001)

Dem Benzothiadiazid Diazoxid (vgl. Abbildung 7) und seinen Derivaten kommt eine Sonderrolle unter den KCOs zu. Diazoxid bindet mit gleicher Wirksamkeit an  $K_{ATP}$ -Kanäle in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas' (Kir6.2/SUR1) und in glatten Muskelzellen, z. B. in Gefäßen (Kir6.1/SUR2B) (Ashcroft und Gribble, 2000, Quast und Cook, 1989). Die Bindungsstelle für Diazoxid an den SUR konnte bisher nur eingegrenzt werden. Elektrophysiologischen Daten nach liegt sie wahrscheinlich in der TMD1 (Babenko et al., 2000; Moreau et al., 2000). Für das verwandte NN-414 ist hingegen TMD2 wichtig (Dabrowski et al., 2003).

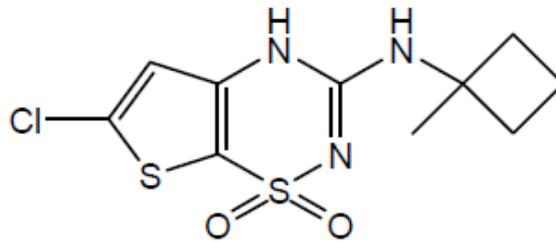
Im Tierversuch führte Diazoxidgabe neben der Senkung des Insulinspiegels zu einer Verminderung des Gefäßtonus mit konsekutiver Blutdruckverminderung (Quast und Cook, 1989). Diese Nebenwirkung konnte dagegen beim Menschen nicht beobachtet werden. Vielmehr kann es laut Roter Liste<sup>®</sup> bei Einnahme von Diazoxid zu einer vorübergehenden Hypertonie kommen. Lediglich bei hypotensiver Vorerkrankung konnten hypotensive Krisen infolge Diazoxideinnahme beobachtet werden.

Die unselektive Wirkung von Diazoxid beschränkt seine Anwendung bei der Behandlung von bspw. inoperablen Insulinomen; hier wäre ein  $\beta$ -Zell-spezifischer KCO zielführender. Ein möglicher Wirkstoff ist das Diazoxidanalogon NNC 55-0462 (6-Chloro-3-(1-Methyl-Cyclobutyl)Amino-4*H*-Thieno[3,2-*e*]-1,2,4-Thiadiazin-1,1-dioxid; im Weiteren NNC; vgl. Abbildung 8),

## 1. Einleitung

---

das selektiv Kir6.2/SUR1 öffnet (Nielsen et al., 2002; Hansen, 2006). Diese Eigenschaft birgt ein erhebliches therapeutisches Potential, da die insulin-senkende Wirkung erreicht werden kann, ohne dass dabei  $K_{ATP}$ -Kanäle außerhalb des Pankreas' geöffnet werden und es bspw. durch die Relaxation glatter Muskelzellen in Gefäßwänden zu einer ungewollten hypotensiven Wirkung kommen kann (Dabrowski et al., 2002).



**Abbildung 8: NNC 55-0462 (Lachenicht et al., 2009)**

Das Diazoxid Analogon NNC 55-0462 aktiviert *in vitro* und *in vivo* selektiv Kir6.2/SUR1-Kanäle ( $EC_{50} = 0.023 \mu\text{M}$ , d.h. 1000x höhere Potenz als Diazoxid), ist aber an Kir6.2/SUR2A oder Kir6.2/SUR2B nur schwach wirksam (1-10  $\mu\text{M}$ ). Die Bindung benötigt MgATP (Nielsen et al., 2002). Das etwa zehnfach schwächere Derivat NNC 55-0118, bei dem anstelle des Cyclobutyl-Restes ein Methyl steht, zeigte in präklinischen Studien, dass es die Entwicklung eines Typ-2 Diabetes bei Ratten verhindern oder zumindest verzögern konnte. Eine dermatologische Bedeutung kommt der Substanz als Stimulator des Haarwachstums zu (Dabrowski et al., 2003).

### **1.9 Fragestellung der Arbeit**

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die Charakterisierung der Bindungseigenschaften der  $K_{ATP}$ -Kanal-Mutanten Kir6.2/SUR1(Q1178R). Als Radioliganden wurde Tritium-markiertes Glibenclamid ( $[^3H]GBC$ ; vgl. 2.3) verwendet. Diese Mutation stabilisiert den posthydrolytischen Zustand des SUR, der mit dem Offenzustand des Kanals assoziiert ist (vgl. 1.7.3). Alle Bindungsversuche zur Charakterisierung des mutierten Kanals wurden zur Vergleichbarkeit auch an Wildtypkanälen Kir6.2/SUR1(WT) durchgeführt.

Die Bindung von  $[^3H]GBC$  an den Rezeptorkomplex wurde in Sättigungsexperimenten untersucht. Ziel war es, die maximale Konzentration der durch  $[^3H]GBC$  besetzten Bindungsstellen und die  $K_D$ , d.h. die Konzentration, bei der die halbmaximale Sättigung erreicht wird, zu bestimmen.

MgATP bewirkt eine negativ allosterische Hemmung der  $[^3H]GBC$ -Bindung an  $K_{ATP}$ -Kanäle. Von besonderem Interesse dabei ist der Einfluss der Mutation auf die  $IC_{50}$  (Konzentration von MgATP bei halbmaximaler Hemmung) und auf die Amplitude der  $[^3H]GBC$ -Bindung in Anwesenheit von MgATP. Sollte sich dabei eine geänderte Amplitude der Bindung zeigen, muss geklärt werden, ob diese auf die Änderung der Affinität ( $K_D$ ), der Kapazität ( $B_{max}$ ) oder auf eine Änderung beider Bindungsparameter zurückzuführen ist. Zur Klärung dieser Frage können Sättigungsversuche an beiden  $K_{ATP}$ -Kanälen in Anwesenheit von MgATP durchgeführt werden.

Darüber hinaus ist von Interesse, wie sich die Mutation Kir6.2/SUR1(Q1178R) auf das Bindungsverhalten von Kaliumkanalöffnern an den Kanal auswirkt. Exemplarisch sollen für diese heterogene Gruppe die Öffner Diazoxid und der SUR1-selektive Öffner NNC 55-0462 untersucht werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien

Folgende Chemikalien fanden in den Versuchen für diese Dissertation Verwendung (vgl. Tabelle 2):

**Tabelle 2: Chemikalien**

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
Ampicillin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe,
DMSO	Merck, Darmstadt, D
EDTA-Na <sub>2</sub>	Fluka, Buchs SG, CH
EndoFree Plasmid MegaKit	Qiagen, Hilden, D
Ethanol 99% p.a.	Merck, Darmstadt, D
FBS	Invitrogen, Auckland, UK
Gentamycin	Invitrogen, Auckland, UK
HCl	Fluka, Buchs SG, CH
Hefeextrakt	ICN Biomedicals, Ohio, USA
HEPES (N-(2-Hydroxyethyl) piperazin-N (2-Ethansulfonsäure))	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe,
KCl	Merck, Darmstadt, D
Lipofectamin2000©	Invitrogen, Auckland, UK
MEM+L-Glutamin+Earle's Salzen	Invitrogen, Auckland, UK
MgCl <sub>2</sub> *6 H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt, D
NaCl	Merck, Darmstadt, D
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Merck, Darmstadt, D
NaHCO <sub>3</sub>	Merck, Darmstadt, D

## 2. Material und Methoden

NaOH	Merck, Darmstadt, D
OptiMEM I	Invitrogen, Auckland, UK
TRIS (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	Fluka, Buchs SG, CH
Trypton (Pepton)	Invitrogen, Auckland, UK
Ultima Gold	Packard Instruments, USA
Zeocin	InvivoGen, San Diego, USA

### 2.2 Synthetische $K_{ATP}$ -Kanal-Modulatoren

#### 2.2.1 $K_{ATP}$ -Kanal-Blocker

Tabelle 3:  $K_{ATP}$ -Kanal-Blocker

Glibenclamid	Sigma Aldrich, Taufkirchen, D
--------------	-------------------------------

#### 2.2.2 $K_{ATP}$ -Kanal-Öffner

Tabelle 4:  $K_{ATP}$ -Kanal-Öffner

Diazoxid	Sigma Aldrich, Taufkirchen, D
NNC 55-0462 (6-Chloro-3-(1-Methyl- Cyclobutyl)Amino-4 <i>H</i> -Thieno[3,2- <i>e</i> ]- 1,2,4-Thiadiazin1,1-dioxid)	Novo Nordisk, Bagsværd, Dänemark

Aus den Substanzen wurden Stammlösungen verschiedener Konzentrationen (Verdünnungsreihe) in Ethanol/ DMSO hergestellt (1 : 1). Aliquote dieser Lösungen wurden- je nach geforderter Konzentration- direkt oder über eine Zwischenverdünnung in die Reaktionsansätze pipettiert.

### 2.3 Radioliganden

Tabelle 5: Radioliganden

[ <sup>3</sup> H]-Glibenclamid (SA = 50.2 Ci*mmol <sup>-1</sup> ; c = 20 µM in EtOH)	PerkinElmer Life Science, USA
---	-------------------------------

### 2.4 Geräte

Tabelle 6: Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklav	2540 MK; Tuttnauer, Wesel, D
Brutschrank	B5060EC/CO; Heraeus, Stuttgart, D
Feinwaage	Precisa 100°-300M; PAG Oerlikon, CH
Filtrationsapparatur	H. Hölzer Laborgeräte, Dorfen, D
Filtrationsvakuumpumpe	N 026.3; KNF Neuberger, Freiburg, D
Homogenisator PT 3000	Kinematika AG, Littau, CH
Kryoröhrchen (Cryos)	Greiner, Frickenhausen, D
Membranpumpe (Typ N 026.3 AN.18)	KNF Neuberger, D
Petrischalen, steril (Durchmesser 94 mm 94/16)	Greiner, Frickenhausen; D
Photometer	Bio Photometer; Eppendorf, Hamburg, D
pH-Meter pH 525	WTW, Weilheim, D
Sterilbank (Laminar Flow)	Hera Safe; Heraeus, Stuttgart, D
Stickstofftank	XLC 511-FD; Chart Europe, Solingen, D
Szintillationszähler 2000CA TRI-CARB	Packard/ PerkinElmer, Waltham, USA
Tiefkühltruhe	GFL 6384; GFL, Burgwedel, D
Tischzentrifuge	Biofuge Primo, Heraeus, Stuttgart, D
Ultrazentrifuge	Optima L-70; Beckman, USA

Wasserbad	W12;P-D Industriegesellschaft, Dresden,D
-----------	---

### **2.5 Puffer**

Alle verwendeten Puffer wurden bei 6°C aufbewahrt.

#### **2.5.1 Hypotoner Lysepuffer**

HEPES:	10mM
EGTA:	1 mM

Dieser Puffer wurde bei der Membranpräparation (vgl. 2.7.5) zur Lyse von HEK 293-Zellen verwendet. Nachdem sich die Substanzen in Aqua bidest gelöst hatten, wurde bei 6°C der pH-Wert auf 7.4 eingestellt.

#### **2.5.2 Isotoner Inkubationspuffer**

HEPES:	5 mM
KCl:	5 mM
NaCl:	139 mM

Die Substanzen wurden zunächst in Aqua bidest gelöst. Die nachfolgende pH-Werteinstellung richtete sich nach der Verwendung des Puffers. Bei der Verwendung als Puffer zur Inkubation der Reaktionsansätze bei Radioligandbindungsstudien sowie bei der Herstellung wässriger Verdünnungsreihen wurde der pH 7.4 bei 37°C eingestellt. Wurde der Puffer zur Herstellung einer Membransuspension verwendet, so wurde der pH 7.4 bei 0°C eingestellt.

### 2.5.3 Waschpuffer

NaCl:	154 mM
TRIS:	50 mM

Dieser Puffer wurde zur Trennung von gebundenem und ungebundenem Radioliganden bei Bindungsexperimenten verwendet. Der Puffer wurde aus einer Stammlösung durch Verdünnung mit Aqua dest. im Verhältnis 1 : 10 hergestellt. Nach Abkühlung wurde bei 6°C der pH 7.4 eingestellt.

## 2.6 Medien

### 2.6.1 Standard-Kulturmedium

Das **Standard-Kulturmedium** (SKM) für die HEK 293-Zelllinie setzte sich folgendermaßen zusammen:

MEM (Minimum essential Medium):	90%
Hitzeinaktiviertes FKS:	10%
Gentamycin:	20 µg/ml

Die einzelnen Komponenten (500 ml MEM + 56 ml FBS + 5.6 ml Gentamycin) wurden unter sterilen Bedingungen (Sterilbank) zusammen pipettiert (MEM auf 37°C temperiert) und anschließend bei 6 °C gelagert.

**Hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum (FKS)** enthält für das Wachstum der HEK 293-Zellen notwendige mitogene Faktoren. Vor der Hitzeinaktivierung wurde das FKS bei -30°C aufbewahrt. Nach dem Auftauen wurde das FKS für anderthalb Stunden bei 55°C im Wasserbad hitzeinaktiviert. Dadurch sollten eventuelle Restaktivitäten von Serumproteasen unterbunden werden. Nach der Hitzeinaktivierung wurde das FKS bei 6°C gelagert.

**Gentamycin** ist ein Antibiotikum vom Aminoglykosidtyp. Es hemmt die Proteinsynthese in Bakterien. Wirksam ist Gentamycin gegen ein breites Spektrum grampositiver und gramnegativer Erreger sowie gegen Mycoplasmenaktivität, aber nicht gegen Hefen, Schimmelpilze und Protozoen. Gentamycin ist bei 37°C und bei einem pH-Wert zwischen zwei und zehn ca. zwei Wochen stabil. Es besitzt eine geringe Zelltoxizität bei HEK 293-Zellen und behält zudem nach dem Autoklavieren seine Wirksamkeit und ist so insbesondere für den Einsatz in der Zellkultur von Interesse. Die gelieferte Stammlösung hat eine Konzentration von 50 mg/ml. Durch Verdünnung mit bidestilliertem Wasser wurden 6 ml Aliquote (c = 2 mg/ml) hergestellt und bei -20°C gelagert.

### 2.6.2 Medium zum Einfrieren von Zellen

Gefriermedium A: MEM mit 40% (v/v) FKS

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

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

### 2.6.3 Stammlösungen für die Proteinbestimmung nach Lowry

*Lowry A:* 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in 0.1 M NaOH  
10 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (wasserfrei)  
50 ml NaOH 1 M

Mit Aqua bidest. auf 500 ml aufgefüllt und bei Raumtemperatur gelagert.

*Lowry B:* 1% CuSO<sub>4</sub> in Aqua bidest.  
0.5 g CuSO<sub>4</sub> (wasserfrei)

In 50 ml Aqua bidest. gelöst und bei Raumtemperatur gelagert.

## 2. Material und Methoden

---

*Lowry C:* 2% K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> -Tartrat in Aqua bidest.  
1.35 g K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> -Tartrat (x 4H<sub>2</sub>O)

In 50 ml Aqua bidest. gelöst und bei Raumtemperatur gelagert.

*Lowry D:* Folin-Ciocalteu-Reagenz (2 M)

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

*Lowry E:* 98 Teile Lowry A + 1 Teil Lowry C + 1 Teil  
Lowry B (Die Reihenfolge ist zu beachten, da  
es sonst zur Ausflockung kommt)

*Lowry F:* 1 Teil Lowry D + 1 Teil Aqua. bidest.

Die Substanzen Lowry E und Lowry F wurden für jede Proteinbestimmung frisch angesetzt.

### **2.6.4 Luria Bertani Medium (LB-Medium), Angaben für 100 ml Medium**

Trypton (Pepton):	1 g
Hefeextrakt:	0.5 g
NaCl:	0.5 g
Aqua bidest.:	ad 100 ml

Nach Lösung der Substanzen in Aqua dest. wurde der pH = 7.0 eingestellt. Anschließend wurde das Medium autoklaviert und konnte anschließend zur Kultivierung transformierter *E-coli* Zellen genutzt werden. Um die Selektion der transformierten Zellen zu ermöglichen, wurde dem Medium 100 µg/ml Ampicillin zugesetzt. Die Ampicillin-Stammlösung hatte eine Konzentration von 50 mg/ml.

### 2.6.5 Medium zur Lagerung der transformierten Bakterien

Bakteriensuspension in LB-Medium:	850 $\mu$ l
Glycerin:	150 $\mu$ l

In diesem Medium wurden transformierte Bakterien bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Aliquote daraus wurden entnommen (150  $\mu$ l), um jeweils 150 ml frisches LB-Medium und Antibiotikum anzuzupfen und die Bakterien zu vermehren.

## 2.7 HEK 293-Zellen

Die HEK 293-Zellen stammen aus humanen, embryonalen Nierenzellen. Sie wurden durch das DNA-haltige Adenovirus Typ 5 tumorös transfiziert und dadurch immortalisiert (Graham et al., 1977). Die HEK 293-Zelllinie wurde käuflich bei der Firma DSMZ, Braunschweig, Deutschland erworben.

### 2.7.1 Kultivierung

Alle Arbeiten mit den lebenden Zellen wurden unter der Sterilbank durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in sterilen Petrischalen in 10 ml Standard Kulturmedium (vgl. 2.6.1) bei  $37^{\circ}\text{C}$  in mikroaerophiler Atmosphäre (Luft/  $\text{CO}_2$ -Verhältnis von  $\sim 5\%$ ; 95% relative Luftfeuchte) des Brutschrankes. Bei einer Konfluenz der Zellen einer Schale von 60 bis 80% (3 - 4 Tage nach letzter Passage) erfolgte unter keimfreien Bedingungen (Sterilbank) eine Zellpassage im Verhältnis 1 : 4. Dabei wurde zunächst das hinsichtlich der enthaltenen Nährstoffe „verbrauchte“ Standard-Kulturmedium abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen mit 4 ml frischem und auf  $37^{\circ}\text{C}$  temperierten Standard-Kulturmedium unter Verwendung einer 1 ml-Pipette durch Auf- und Abpipettieren vom Boden der Kulturschale abgelöst. Jeweils 1 ml der entstandenen Zellsuspension wurde in neue Kulturschalen (vier neue Schalen) überführt und auf ein Endvolumen von 10 ml mit Standard-Kulturmedium angeglichen.

### 2.7.2 Einfrieren

Zum Einfrieren wurden ausschließlich Kulturschalen mit einer Zelldichte von >70% (7 - 10 Millionen Zellen pro Schale) verwendet, wobei pro Kryoröhrchen das Zellmaterial einer Kulturschale eingefroren wurde. Nach Entfernen des Mediums aus einer Kulturschale wurden die Zellen mit 4 ml Gefriermedium A (vgl. 2.6.2) von deren Boden abgelöst, in ein Falcon-Tube überführt und für die Dauer von 2 - 3 Minuten bei 500x g ( $g = 9.81 \text{ m}\cdot\text{s}^{-2}$ ) zentrifugiert. Unterdessen wurden 500  $\mu\text{l}$  Gefriermedium B (vgl. 2.6.2) in ein Kryoröhrchen vorgelegt. Aus dem zentrifugierten Röhrchen wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet mit 500  $\mu\text{l}$  Gefriermedium A resuspendiert, in das Kryoröhrchen überführt und vorsichtig mit dem vorgelegten Medium B vermischt. Um den Kontakt der Zellen mit dem bei Raumtemperatur zytotoxisch wirkenden Detergens DMSO so gering wie möglich zu halten, mussten die Zellen nach Zugabe der Zellsuspension zum Gefriermedium B sofort herabgekühlt werden. Danach wurde das Kryoröhrchen zunächst bei  $-80^\circ\text{C}$  vorgefroren. Die endgültige Aufbewahrung der Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff bei  $-196^\circ\text{C}$ .

### 2.7.3 Auftauen

Die konservierten Zellen wurden aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und im Wasserbad bei  $37^\circ\text{C}$  angetaut, bis nur noch ein kleiner Eiskern im Kryoröhrchen zu erkennen war. Der Inhalt des Kryoröhrchens wurde zügig in ein vorbereitetes 50 ml Falcon-Tube mit 20 ml Standard-Kulturmedium ( $37^\circ\text{C}$ , vgl. 2.6.1) überführt und 2 - 3 min bei 500x g zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstandes erfolgte die Resuspension des Bodenstandes aus aufgetauten HEK 293-Zellen in 10 ml Standard-Kulturmedium ( $37^\circ\text{C}$ ) und die Überführung der Zellsuspension in eine Petrischale (Durchmesser 9.4 cm). Am darauf folgenden Tag wurde das Standard-Kulturmedium gewechselt. Sobald die Zellkonfluenz 60 - 80% erreichte (im Allgemeinen nach 3 - 4 Tagen), konnten die Zellen erstmals passagiert werden.

### 2.7.4 Transiente Transfektion mittels Lipofectamin2000<sup>®</sup>-Methode

Zur Transfektion mittels Lipofectamin2000<sup>®</sup>-Reagenz wurden Schalen mit einer Zellkonfluenz >90% verwendet. Am Vortag der Transfektion wurde das Standard-Kulturmedium durch Gentamycin-freies Nährmedium (MEM + 10% FKS) ersetzt. Am Transfektionstag wurden in der Sterilbank pro Zellschale zwei 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße mit jeweils 750 µl vorgewärmtem (37°C) OptiMEM befüllt. In das eine Reaktionsgefäß wurden die DNA-Komponenten und in das andere 37.5 µl Lipofectamin2000<sup>®</sup>-Reagenz zugegeben und fünf Minuten inkubiert. Nach Ablauf der Vorinkubation wurde das DNA-Gemisch zum Lipofectamin-Gemisch gegeben (nicht umgekehrt!), vorsichtig gemischt und weitere zwanzig Minuten inkubiert, um die Bildung der DNA-Lipofectamin2000<sup>®</sup>-Mizellen zu ermöglichen. Im Anschluss an die Inkubation wurde die Kulturschale mit den zu transfizierenden Zellen aus dem Brutschrank entnommen, das Volumen des Nährmediums um 4 ml reduziert und mit dem inkubierten Transfektionsgemisch versetzt. Für die Herstellung von Zellmembranen wurden die transfizierten Schalen anschließend 48 Stunden inkubiert.

Die DNA für die SUR-Untereinheiten lag auf einem pECE Vektor. Erfahrungsgemäß werden die auf pECE-DNA-codierten Proteine schlechter exprimiert als bspw. auf pcDNA codierte. Die Ergebnisse von Damian Stephan (Abt. MolPharm) suggerieren, dass die optimale Transfektions-Ratio zwischen Kir und SUR bei 1 : 100 liegt. Mit dieser Transfektions-Ratio wurden auch alle Transfektionen für diese Dissertation durchgeführt.

**Tabelle 7: Transfektionen**

<b>cDNA</b>	<b>Spezies</b>	<b>Vektor</b>	<b>Vektorgröße [kb]</b>	<b>Ursprungslabor</b>
Kir6.2[D50581]	Maus	pcDNA3.1	6,692	Y. Kurachi & Y. Horio (Osaka)
SUR1(Q1178R)	Hamster	pECE	7,95	J. Bryan (Seattle)

## 2. Material und Methoden

---

SUR1(WT)	Hamster	pECE	7,95	Abt. MolPharm
----------	---------	------	------	---------------

### 2.7.5 Herstellung einer mikrosomalen Membranfraktion

Zur Herstellung einer mikrosomalen Membranfraktion aus den transfizierten Zellen mussten diese eine Zellkonfluenz von mindestens 60% aufweisen. Mit dem in der Schale vorhandenen Nährmedium wurden die Zellen vom Schalenboden abgelöst und in den temperierten (37°C) 50 ml Falcon-Tube überführt. Dieser wurde bei Raumtemperatur zentrifugiert (500x g; 5 min.). Danach wurde der Überstand abgesaugt, das durch Zentrifugation entstandene Zellpellet (Bodensatz) mit hypotonem Puffer (vgl. 2.5.1) lysiert (4 ml Puffer/Schale) und die Suspension bei 0°C und 100.000x g 45 Minuten lang ultrazentrifugiert (Optima L-70; Beckman, USA). Das entstandene Pellet wurde anschließend in isotonem Inkubationspuffer (vgl. 2.5.2) resuspendiert (0.5 ml/Schale), in 2 ml Eppendorf-Cups aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

### 2.7.6 Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der in Bindungsexperimenten untersuchten Membranpräparation erfolgte nach Lowry et al. (1951). Die Methode beruht auf zwei Reaktionen: Im ersten Schritt (= Biuretreaktion) kommt es im alkalischen Milieu zur Ausbildung eines blauvioletten Komplexes zwischen den Peptidbindungen und den Kupferionen (Lowry E; vgl. 2.6.3). Im zweiten Schritt reduzieren die  $\text{Cu}^{2+}$ -Proteinkomplexe das Folin-Ciocalteau-Reagenz (Lowry F; vgl. 2.6.3). Dabei entsteht ein blauer Farbstoff, dessen Extinktion photometrisch bestimmt werden kann. Für die Proteinbestimmung wurde während der Bindungsversuche eine Probe aus der homogenisierten und auf endgültiges Volumen ergänzten Membransuspension entnommen und mit wässriger 0.1 M NaOH-Lösung 1 : 10 verdünnt. Ein Aliquot gleichen Volumens vom reinen Inkubationspuffer wurde gleichermaßen mit 0.1 M NaOH verdünnt

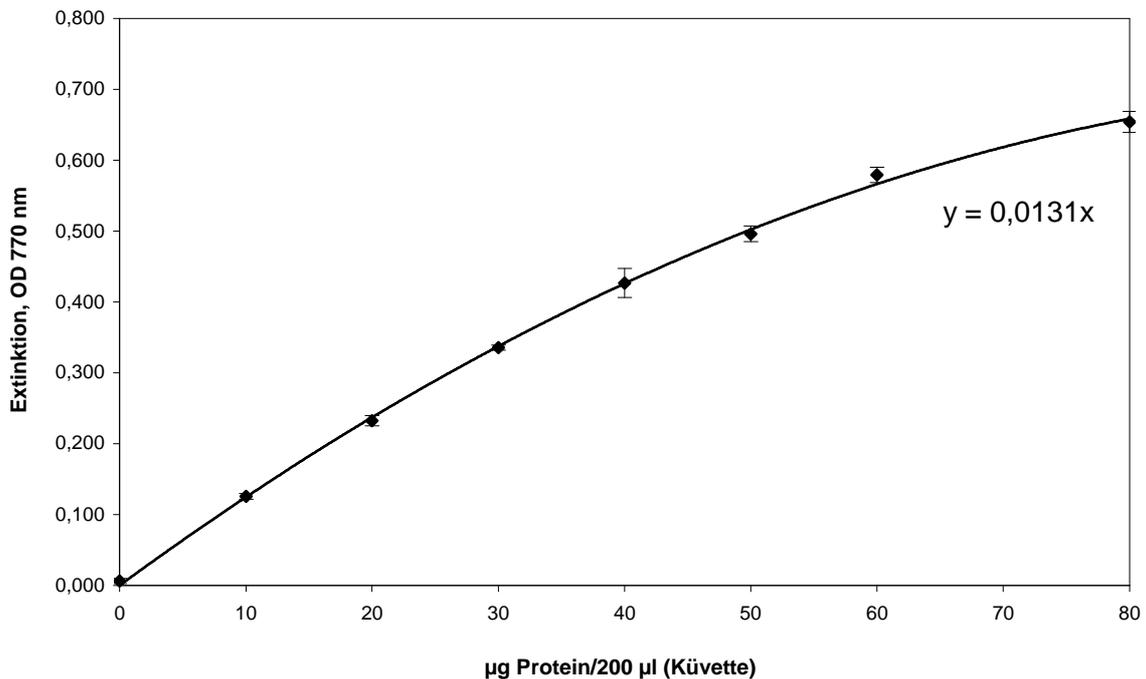
## 2. Material und Methoden

---

und zur Leerwertbestimmung herangezogen. Dies war notwendig, da die freien Stickstoffgruppen von HEPES im Inkubationspuffer mit den Lowry-Reagenzien erheblich interferierten. Zu Beginn der Proteinbestimmung wurden jeweils 200 µl der NaOH-verdünnten Membranen- bzw. Inkubationspufferprobe in Halbmikroküvetten überführt und mit 1 ml Lowry E-Lösung versetzt. Nach fünfminütiger Inkubation erfolgte die Zugabe von 100 µl Lowry F-Lösung (vgl. 2.6.3), wonach die Inhalte der Küvetten gemischt und geschützt vor direkter Lichteinstrahlung bis zur Messung 20 min inkubiert wurden. Danach konnte in einem Spektralphotometer (Hitachi U-3.000) die optische Dichte ( $OD_{770}$ ) der Membransuspension und des Inkubationspuffers gemessen werden. Dabei betrug die Wellenlänge der Wolfram-Lampe 770 nm und die Spaltbreite 5 nm. Der Null-Abgleich erfolgte mit einer Lösung aus 200 µl 0.1 M NaOH + 1 ml Lowry E + 100 µl Lowry F. Der resultierende Unterschied zwischen der Extinktion der Membransuspension und des Inkubationspuffers ( $\Delta OD_{770}$ ) wurde nach der folgenden Formel zur Bestimmung der Proteinkonzentration herangezogen:

$$\Delta OD_{770} = 0.0132 * m_{Prot} (\mu g/Küvette)$$

Voraussetzung dafür war, dass sich die gemessenen Extinktionswerte im linearen Bereich der Kalibrierkurve befanden (Abbildung 9). War dies nicht der Fall, so kam eine höhere Verdünnung der Proben zum Einsatz. Als Grundlage für die Berechnung der Proteinkonzentration in den Bindungsexperimenten diente eine Standardmesskurve, die mit Rinderserumalbumin (BSA) erstellt wurde (Abt. MolPharm). Dafür wurde eine Verdünnungsreihe von BSA in 0.1 M NaOH hergestellt, analog zu den Protein- und Pufferproben aus den Bindungsversuchen mit Lowry E und Lowry F inkubiert und die Extinktionen der einzelnen Verdünnungen photometrisch gemessen. Die Auftragung der resultierenden  $OD_{770}$ -Werte gegen die vorgegebene BSA-Konzentration ergab die Kalibrierkurve. Die durchgezogene Linie gibt dabei den linearen Bereich bis 30 µg wieder. In diesem Bereich sollten sich auch die Werte der Bestimmungen des Proteins aus den Bindungsversuchen bewegen.



**Abbildung 9: Kalibrierkurve für die Proteinbestimmung nach Lowry. Bis 30 µg Protein verläuft die Kurve linear, bei Berücksichtigung aller Messpunkte handelt es sich um eine Sättigungsfunktion**

## 2.8 Radioligandbindungsstudien

### 2.8.1 Vorbemerkungen

Die Untersuchung der Radioligand-Rezeptor-Bindung gehört zu den unentbehrlichen Methoden der Rezeptorforschung. Mit Hilfe dieser Methode gelingt es, Rezeptoren zu identifizieren, isolieren und charakterisieren. Alle Ergebnisse dieser Dissertation wurden mit Hilfe dieser Methode erzielt. Zur Beantwortung der Fragestellung dieser Arbeit (vgl. 1.9) war die Durchführung von Gleichgewichtsexperimenten zielführend. Bei diesem Versuchstyp wird vorausgesetzt, dass die Radioligand-Rezeptor-Bindung dem Massenwirkungsgesetz unterliegt. Nach einer gewissen Zeit befindet sich dabei das Reaktionssystem (Assoziation und Dissoziation von Rezeptor und Ligand) im Gleichgewicht, sodass sich die Bindung im weiteren Verlauf nicht mehr

ändert. In Gleichgewichtsexperimenten wird diese Zeit als Inkubationszeit gewählt; sie ist von den kinetischen Konstanten  $k_+$  und  $k_-$  sowie von der Konzentration der Reaktionsteilnehmer abhängig. Gleichgewichtsbindungsstudien können in Sättigungs- und Hemmexperimente unterteilt werden:

**Sättigungsexperimente:** Mit diesen Experimenten kann die Gleichgewichtsdissoziationskonstante  $K_D$  des Radioliganden und die maximale Konzentration der Rezeptorbindungsstellen (Bindungskapazität  $B_{max}$ ) der Rezeptorpräparation technisch relativ einfach bestimmt werden. Dabei wird im Allgemeinen die Konzentration des Rezeptors konstant gehalten und durch steigende Konzentrationen des Radioliganden zunehmend gesättigt. Dabei sollten etwa 70 - 80% des Bindungsbereiches abgedeckt werden. Alle Radioliganden binden je nach Lipophilie und Reinheit der Rezeptorpräparation auch mehr oder weniger an unspezifische Bindungsstellen. Um die spezifische ( $B_S$ ) von der unspezifischen Bindung (NSB) zu unterscheiden, wird gewöhnlich parallel zur Bestimmung der eigentlichen Bindungskurve (totale Bindung,  $B_{tot}$ ) zusätzlich die Radioligandbindung in Anwesenheit eines ausreichenden Überschusses (100 - 1000fach) an nicht-markiertem Liganden untersucht. Der unmarkierte Ligand soll dabei den Radioliganden aus allen Rezeptor-Bindungsstellen, nicht jedoch aus der unspezifischen Bindung verdrängen.

**Hemmexperimente:** Bei diesem Typ von Gleichgewichtsexperimenten verdrängen sich ein markierter und ein unmarkierter Ligand gegenseitig aus den Rezeptor-Bindungsstellen (Kompetition um die gleiche Bindungsstelle). Verursacht die Bindung eines Liganden eine Veränderung der Raumstruktur des Rezeptors, sodass der andere Ligand nicht mehr oder nur mit niedriger Affinität binden kann, so spricht man von einer allosterischen Hemmung. Um Chancengleichheit bei der Kompetition um die Bindung zu gewährleisten, werden der Radioligand und der unmarkierte Ligand gleichzeitig dem Inkubationsmedium zugegeben. Bei Hemmexperimenten wird die Konzentration des Labels konstant gehalten und die des nicht-markierten Liganden innerhalb

einer sinnvollen Spanne variiert. Aus diesen Experimenten werden der Konzentrationswert der halbmaximalen Hemmung ( $IC_{50}$ ), die maximale Verdrängung (Amplitude  $A$ , in %) und die Steilheit der Verdrängungskurve (Hill Koeffizient  $n_H$ ) bestimmt. Im Falle einer kompetitiven Hemmung kann bei bekannter Konzentration und Affinität ( $K_D$ -Wert) des Radiolabels aus dem  $IC_{50}$ -Wert nach der Cheng-Prusoff-Korrektur (Cheng und Prusoff, 1973, Gleichung 16) die Inhibitionskonstante ( $K_i$ ) des unmarkierten Liganden ermittelt werden; ferner sind  $A = 100 \%$  und  $n_H = 1.0$ . Im Falle negativ-allosterischer Wechselwirkungen ist die Anwendung der Cheng-Prusoff-Korrektur als Näherung zu betrachten. Desweiteren können flache Hemmkurven aus diesem Typ der Bindungsversuche auf potentielle Heterogenität der Bindungsstellen hinweisen.

**[<sup>3</sup>H]Glibenclamid:** Glibenclamid (GBC) bindet an SUR1- ( $K_D \approx 1 \text{ nM}$ ) wesentlich stärker als an SUR2-Isoformen ( $K_D \approx 30 \text{ nM}$ ) (Hambrock et al., 1998; Hambrock et al., 2002; Schwanstecher et al., 1998). Der mit Tritium radioaktiv markierte Sulfonylharnstoff [<sup>3</sup>H]Glibenclamid wurde mit einer spezifischen Aktivität von 50.2 Ci/mmol und einer Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  in Ethanol geliefert. Beim Einsatz dieses Labels war seine ausgeprägte Amphiphilie zu beachten, die sich im Haften der Substanz an den Oberflächen der Aufbewahrungs- und Reaktionsgefäße und des Filters bemerkbar machte. Um zuverlässig reproduzierbare Konzentrationen des Radioliganden pipettieren zu können, enthielten alle Labelstammlösungen 10% Ethanol. Höhere Ethanolkonzentrationen bargen allerdings das Risiko der Denaturierung der Rezeptorproteine. In Experimenten an SUR1 wurde 100 nM unmarkiertes GBC zur Bestimmung der unspezifischen Bindung herangezogen. Bei dieser Konzentration wird [<sup>3</sup>H]GBC nahezu vollständig aus der hochaffinen SUR1-Bindung verdrängt, die niedrigaffine unspezifische Radioligandbindung bleibt hingegen im Wesentlichen unverändert.

### 2.8.2 Durchführung von Radioligandbindungsstudien

**Gewinnung des Rezeptormaterials:** Die Membranpräparation erfolgte wie in Kapitel 2.7.5 beschrieben. Unmittelbar vor Beginn der Inkubation mit den Radioliganden und ggf. unmarkierten Kompetitoren wurden die Membranen aufgetaut und mit einem Polytron-Homogenisator unter Eiskühlung bei 12000 U/min homogenisiert, mit isotonem Inkubationspuffer (pH 7.4 bei 0°C; vgl. 2.5.2) auf das gewünschte Volumen aufgefüllt und bis zum Inkubationsstart auf Eis gehalten.

**Inkubation:** Gestartet wurde die Rezeptor-Ligand-Bindungsreaktion durch Zugabe von 25 µl des Radioliganden [<sup>3</sup>H]GBC zu dem vorbereiteten und auf Eis stehenden Reaktionsgemisch. Dieses setzte sich folgendermaßen zusammen:

#### Hemmexperimente

Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes von 1010 µl, im Einzelnen:

Isotoner Inkubationspuffer:	750 µl
Rezeptorprotein:	200 µl
MgATP <sup>+</sup> :	25 µl
Radioligand <sup>++</sup> :	25 µl
100 µM Glibenclamid <sup>+++</sup> :	10 µl

<sup>+</sup> = Endkonzentrationen: Mg<sup>2+</sup> = 1 mM; ATP = 0.3 mM; bei Versuchen in der Abwesenheit von MgATP 25 µl: EDTA (1mM) als Volumenersatz

<sup>++</sup> = Endkonzentrationen: [<sup>3</sup>H]GBC ~ 1 nM

<sup>+++</sup> = Ansatz zur Bestimmung der nichtspezif. Bindung oder Lösungsmittelausgleich (A. z.B. der totalen Bindung von [<sup>3</sup>H]GBC) oder hemmender Ligand (z.B. Diazoxid; NNC, vgl. 3.4)

## 2. Material und Methoden

---

### Sättigungsexperimente

Gesamtvolumen der Reaktionsansätze von 1313  $\mu\text{l}$ , im Einzelnen:

Inkubationspuffer:	1012 $\mu\text{l}$
Rezeptorprotein:	260 $\mu\text{l}$
ATP:	13.13 $\mu\text{l}$
Mg <sup>2+</sup> :	2.61 $\mu\text{l}$
Radioligand in aufsteigender Konzentration:	13 $\mu\text{l}$
100 $\mu\text{M}$ Glibenclamid*:	13 $\mu\text{l}$

\* = Ansatz zur Bestimmung der nichtspezifischen Bindung oder Lösungsmittelausgleich (Ansatz zur Bestimmung der totalen Bindung von [<sup>3</sup>H]GBC)

Sowohl die Radioligand-Stammlösungen als auch die Lösungen der unmarkierten Liganden enthielten Lösungsmittelanteile. Die Reaktionsansätze wurden so zusammengesetzt, dass die Lösungsmittelkonzentration 1% des Gesamtvolumens der Ansätze nicht überstieg. Die Inkubation erfolgte unter standardisierten Bedingungen hinsichtlich Temperatur, Zeit und Zusammensetzung des Inkubationsmediums.

**Inkubationstemperatur:** Die Temperatur des Wasserbades wurde mit 37°C an die physiologische Körpertemperatur des menschlichen Organismus angepasst.

**Inkubationszeit:** Bei Gleichgewichtsexperimenten wird entsprechend dem Massenwirkungsgesetz (MWG) eine Gleichgewichtslage erreicht, deren Einstellung sowohl von der kinetischen Konstanten als auch von der Konzentration der Reaktionsteilnehmer abhängig ist. Für die Festlegung der Inkubationszeit sind somit die kleinsten im Versuch vorkommenden Konzentrationen von Rezeptor und Ligand massgeblich. Die Inkubationszeit wurde so gewählt, dass eine Einstellung des Gleichgewichtes zwischen der

Assoziation und Dissoziation der Liganden am Rezeptor erfolgen konnte. Die notwendige Inkubationszeit wurde von der Abt. MolPharm in Assoziationsexperimenten ermittelt. Sie variiert je nach Radioligand, Rezeptortyp und Rezeptorpräparation. Bei den für diese Dissertation durchgeführten Versuchen wurden folgende Inkubationszeiten genutzt:

- Membranen mit [ $^3\text{H}$ ]GBC als Radioligand (Hemmungsexperimente), alle Rezeptortypen **15 min**
- Membranen mit [ $^3\text{H}$ ]GBC als Radioligand (Sättigungsexperimente), alle Rezeptortypen **30 min** (aufgrund z.T. sehr geringer [ $^3\text{H}$ ]GBC-Konzentrationen)

**Inkubationsmedium:** Als Inkubationsmedium diente der in seiner Zusammensetzung in Kapitel 2.5.2 erläuterte isotone Inkubationspuffer, der auf den physiologischen pH-Wert von 7.4 bei einer Temperatur von 37°C eingestellt wurde. Im Allgemeinen wurde bei Membranversuchen die Bindungsreaktion durch Zugabe der Rezeptorpräparation zum Reaktionsansatz (Label + ggf. unmarkierter Ligand + ggf. MgATP im Inkubationspuffer) gestartet. Die Reaktion verlief in 2 ml Eppendorfgefäßen. Gemäß den oben gegebenen Inkubationszeiten wurde der Reaktionsansatz anschließend inkubiert.

**Trennung von gebundenem und freiem Radioliganden:** Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte die Abtrennung des Radioligand-Rezeptor-Komplexes von dem noch im Inkubationsmedium enthaltenen ungebundenen (freien) Radioliganden. Dies geschah durch Filtration. Aus den einzelnen Reaktionsansätzen wurden nach gründlicher Durchmischung auf dem Vortex drei Aliquots zu je 300 µl entnommen und in ein vorbereitetes, mit eiskaltem Waschpuffer gefülltes Reagenzglas überführt. Dadurch wurde die während der Inkubation ausgebildete Gleichgewichtslage fixiert. Sofort danach erfolgte die Filtration in einer geeigneten Apparatur über Glasfaserfilter (Whatman GF/B) mithilfe des von einer Membranpumpe erzeugten Vakuums. Die Poren des Glasfaserfilters sind in ihrer Größe so gewählt, dass der für die spätere

Messung wichtige Radioligand-Rezeptor-Komplex im Filter zurückbleibt. Um die unspezifisch im Präparat gebundene Radioaktivität möglichst vollständig zu entfernen, wurden die Filter unmittelbar danach zweimal mit 8 ml Waschpuffer (0°C) nachgewaschen. Jeder Messpunkt wurde auf diese Art dreimal bestimmt. Aus den Ergebnissen der drei Einzelmessungen (radioaktive Zerfälle pro Minute = dpm) wurde im Anschluss der arithmetische Mittelwert gebildet (vgl. 2.9).

**Messung der Radioaktivität:** Die quantitative Erfassung der Tritium-Betastrahlen des Radioliganden erfolgte mittels eines Flüssigszintillators (Ultima Gold; 4,5 ml/Filter) im Szintillationszähler. Da sich die Radioaktivität erst langsam von den Glasfaserfiltern lösen musste, wurden für die Auswertung nur Messungen herangezogen, die mindestens acht Stunden nach dem Kontakt der Filter mit dem Flüssigszintillator stattgefunden hatten. Die Whatman GF/B-Filter für die Membranexperimente wurden unmittelbar vor Zugabe von je 4,5 ml Szintillationsflüssigkeit (Ultima Gold) mit 200 µl destilliertem Wasser benetzt, um das Herauslösen der Radioaktivität aus den Filtern zu fördern. Der Szintillationszähler detektierte 54% der radioaktiven Zerfälle pro Minute (dpm).

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

Gleichung 1

Als Einheiten wurden bei der Auswertung von Bindungsexperimenten Konzentrationseinheiten verwendet, die Werte mussten also aus dpm in eine molare oder submolare Einheit überführt werden:

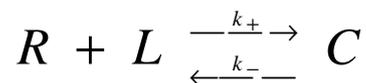
$$c = \frac{\text{gezählte dpm}}{2.2 \cdot 10^{12} (\text{dpm/Ci}) \cdot SA(\text{Ci/mmol}) \cdot V(\text{ml})} = \frac{\text{mol}}{\text{l}}$$

Gleichung 2

c	Konzentration in mol/l
SA	Spezifische Aktivität des Radioliganden in Ci/mmol
V	Filtrationsvolumen des Aliquots aus dem Reaktionsansatz in ml (0.3 ml)
1 Curie (Ci)	= $2.2 \cdot 10^{12}$ dpm/min

### 2.8.3 Modell der Rezeptorbindungsstudien

Es wird die Bindung eines Radioliganden an eine Klasse von nicht miteinander wechselwirkenden Rezeptoren angenommen. Dabei entsteht ein Radioligand-Rezeptor-Komplex:



Gleichung 3

R	freie Rezeptorkonzentration
L	freie Ligandkonzentration
C	Radioligand-Rezeptor-Komplex Konzentration
$k_+$	Assoziationsgleichgewichtskonstante ( $M^{-1} s^{-1}$ )
$k_-$	Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante ( $s^{-1}$ )

Im Gleichgewicht gilt das Massenwirkungsgesetz:

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

Gleichung 4

Dabei beschreibt  $K_D$  die Gleichgewichtskonstante (mol/l).

Weiterhin gelten die Massenbilanzen:

$$R_0 = R + C$$

Gleichung 5

und

$$L_0 = L + C$$

Gleichung 6

Der Index 0 bezeichnet die totale Konzentration, die sich als Summe aus der freien und gebundenen Konzentration ergibt (total = frei + gebunden).

Die gesamte Bindung eines Radioliganden ( $B_{tot}$ ) beinhaltet die spezifische Bindung an Rezeptoren ( $B_s$ ), sowie die unspezifische Bindung (NSB) an andere Bestandteile der Rezeptorpräparation und den Glasfaserfilter. Die NSB wird gesondert bestimmt, indem ein Überschuss an unmarkiertem Liganden den Radioliganden aus der  $B_s$ , nicht jedoch aus der NSB verdrängt. Die spezifische Bindung errechnet sich dann folgendermaßen:

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

Gleichung 7

### **2.8.3.1 Sättigungsexperiment**

Gemessen wird die gesamte ( $B_{tot}$ ) und die unspezifische (NSB) Bindung, dargestellt als Funktion der freien Radioligandkonzentration  $L$ . Die NSB beschreibt die niedrigaffine Bindung des Liganden an eine grosse Anzahl unspezifischen Bindungsstellen, so dass im niedrigen Konzentrationsbereich des Radioliganden ein linearer Anstieg von NSB mit wachsender Ligandkonzentration angenommen wird:

$$NSB = a \cdot L$$

**Gleichung 8**

Aus Gleichung 4, 5 und 6 ergibt sich unter der Annahme, dass  $L_0 \gg R_0$  und daher  $L_0 \approx L$  (vgl. Gleichung 15):

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

**Gleichung 9**

Dabei ist  $C$  gleich der spezifischen Bindung ( $B_s$ ) und es errechnet sich die spezifische Bindung  $B_s \equiv C$  zu:

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

**Gleichung 10**

Daraus wird ersichtlich, dass die spezifische Bindung  $B_s \equiv C$ , mit der freien Radioligandkonzentration in Form einer rechtwinkligen Hyperbel wächst, ihre Sättigung für  $C \rightarrow R_0$  erreicht und die Halbsättigung bei  $L = K_D$  vorliegt.

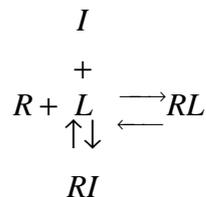
$B_{tot}$ ,  $NSB$  und  $L_0$  werden in Sättigungsversuchen experimentell bestimmt. Die freie Ligandkonzentration  $L$  errechnet sich aus  $L = L_0 - B_s - NSB$ . Die Bindungsisotherme ergibt sich dann als Summe der spezifischen und der unspezifischen Interaktionen des Liganden mit dem Rezeptor.

$$B_{tot} = R_0 \cdot \frac{L}{L + K_D} + a \cdot L$$

**Gleichung 11**

### 2.8.3.2 Hemmexperiment

Ausgangspunkt ist das folgende Reaktionsschema, das einen kompetitiven Mechanismus beschreibt:



Gleichung 12

Der Radioligand L und der Rezeptor R bilden den Rezeptor-Radioligand-Komplex RL. Der Inhibitor I und der Rezeptor R formieren sich zu einem Rezeptor-Inhibitor-Komplex RI. In der Präparation kommt dabei nur eine Rezeptorklasse vor. L und I konkurrieren um diese Bindung. Im Experiment wird die Abnahme von RL bei steigender Konzentration von I als Signal gemessen. Die Datenauswertung ergibt eine charakteristische Hemmkurve. Befinden sich die beiden Reaktionen im Gleichgewicht, so gilt nach dem Massenwirkungsgesetz

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

Gleichung 13 + 14

Die Experimente werden so angelegt, dass die gesamte Radioligandkonzentration viel größer ist, als die gesamte Rezeptorkonzentration (vgl. Gleichung 15). In der experimentellen Praxis bedeutet dies, dass der gebundene Anteil des Radioliganden stets unter 5% liegen sollte:

$$R_0 \ll L_0 \rightarrow L_0 \approx L$$

Gleichung 15

## 2. Material und Methoden

---

Die Berücksichtigung der Massenbilanzen unter der Bedingung  $R_0 \ll L_0$ ,  $I_0$  führt zu folgender Umformung:

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

**Gleichung 16**

Der Term  $K_i(1 + L/K_D)$  beschreibt den Mittelpunkt der Kurve, da bei einer Inhibitorkonzentration von  $I = K_i(1 + L/K_D)$  die Amplitude der Kurve um 50% gefallen ist. Dieser Term wird nach Cheng und Prusoff, 1973c als  $IC_{50}$  bezeichnet. Mit der  $IC_{50}$  lässt sich mit dieser Korrektur danach die Hemmkonstante der Inhibition ( $K_i$ ) errechnen:

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

**Gleichung 17**

Für die homologe 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 18**

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

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

**Gleichung 19**

Der Sättigungsgrad  $y$  steht für die Fraktion der Rezeptoren, die im Bindungsversuch mit Ligand besetzt sind. Er wird ausgedrückt als

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

**Gleichung 20**

Somit resultiert für die maximale Bindungskapazität ( $B_{\max}$ ), d.h. die Gesamtrezeptorzahl  $B_{\max} \equiv R_0$  folgender Ausdruck:

$$B_{\max} = \frac{1}{y} \cdot B_S = \frac{L + K}{L} \cdot C$$

**Gleichung 21**

### **2.8.3.3 Verallgemeinerung der Bindungsisotherme nach Hill**

Zeigt ein Radioligand ein komplexeres Bindungsverhalten oder gibt es keine Konkurrenz zwischen dem unmarkierten Liganden und dem Radioliganden, so äußert sich das in einem steileren oder flacheren Verlauf der Bindungsisotherme, als es der Gleichung 18 entspricht. Tritt dieser Fall auf, werden die beiden Gleichungen durch die Einführung eines Exponenten (Hill-Koeffizient =  $n_H$ ) verallgemeinert. Für die Inhibitionskurve gilt:

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

**Gleichung 22**

Es gilt:  $B_s(0) = B_s$  bei Inhibitorkonzentration  $I = 0$

Der Hill-Koeffizient erlaubt folgende Aussagen über die Radioligandbindung:

- $n_H = 1$ : Übliche Bindungsisotherme. Es liegt nur eine Klasse von Bindungsstellen vor, die Bindungsstellen interagieren nicht miteinander
- $n_H > 1$ : Positive Kooperativität. Mehrere Ligandmoleküle binden mit steigender Affinität an den Rezeptor
- $n_H < 1$ : Negative Kooperativität. Die Bindung des ersten Liganden erschwert die Bindung weiterer Ligandmoleküle. In der experimentellen Praxis ist jedoch wahrscheinlicher, dass die Präparation mehrere Rezeptorklassen enthält. Diese unterscheiden sich in ihrer Affinität für den Liganden nicht stark genug (weniger als ein Faktor 100), können daher nicht deutlich aufgelöst werden, sodass die Hemmkurve flach abfällt.

## **2.9 Datenauswertung und Statistik**

### **2.9.1 Analyse der Hemmversuche**

Die einzelnen Hemmexperimente wurden durch die Anpassung der logarithmierten Hill-Gleichung an die aus den drei Einzelbestimmungen gemittelten Messwerte ausgewertet (Modell mit einer Klasse an Bindungsstellen). Dabei gilt:

## 2. Material und Methoden

---

$$\% B_{tot} = 100 - \frac{A}{1 + 10^{n(pX - pIC_{50})}}$$

**Gleichung 23**

A	Amplitude der spezifischen Bindung
pX	-logX, wobei X für die Konzentration des Inhibitors in mol/l steht
pIC <sub>50</sub>	-logIC <sub>50</sub> ; IC <sub>50</sub> ist die halbmaximale Inhibitionskonzentration und markiert den Mittel- bzw. Wendepunkt der Kurve
n	n <sub>H</sub> = Hill-Koeffizient

Die Kurven in den Abbildungen (vgl. 3) wurden aus gemittelten Daten der Einzelexperimente und deren SEM gebildet, an die geeignete Modellgleichungen angepasst wurden (Gleichung 23 bei Konkurrenz; Gleichung 10 bei Sättigung). Hierbei wurden die Einzelexperimente auf Prozent der spezifischen Bindung in der Abwesenheit des Inhibitors normiert (% B<sub>s</sub>(0)) (vgl. Gleichung 22). Die Parameter dieser Kurven stimmten im Allgemeinen gut mit den gemittelten Parametern der Einzelversuche überein.

Die Anpassung der Modellgleichung an die Daten erfolgte nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate mit Hilfe der SigmaPlot 9.0-Software (Statistical Product & Service Solutions Inc; Chicago; USA)

### 2.9.2 Statistik

Die Amplituden der Bindungskurven und deren  $pIC_{50}$ -Werte folgen einer Normalverteilung (Christopoulos, 1998). Zur Auswertung einer Versuchsreihe wurden deshalb die arithmetischen Mittel dieser Parameter  $\pm$  SEM (standard error of the mean) gebildet. Die Konfidenzintervalle der  $IC_{50}$ -Werte wurden nährungsweise berechnet nach der Formel:

$$10^{-y} \quad \text{mit} \quad y = pK_D \pm 2 SEM$$

**Gleichung 24**

Die so gewonnenen Werte sind in der Ergebnistabelle (vgl. Tabelle 12) dargestellt. Zum Vergleich von Meßserien wurden die Amplituden und die  $pIC_{50}$ -Werte als normalverteilte Variablen (Smirnow-Kolmogorow-Test) einer einfachen Varianzanalyse unterzogen und eventuelle Unterschiede mit geeigneten Tests (z.B. student's t-test) auf ihr Signifikanzniveau hin untersucht, insofern die beiden Stichproben aus der gleichen Grundgesamtheit stammten und demzufolge die gleiche Varianz aufwiesen. (Für alle durchgeführten statistischen Tests wurde das Programm SigmaStat 3.1 der Firma Statistical Product and Service Solutions Inc, Chicago, USA verwendet.). Die Abbildungen zeigen jeweils die Mittelwertskurven (gemittelte Daten der Einzelexperimente  $\pm$  SEM). An diese Mittelwertskurven wurden die entsprechenden Modellgleichungen angepasst.

## 2. Material und Methoden

---

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

Summe und Differenzbildung (absolute Fehlerquadrate):

$$y = a \pm b \rightarrow \sigma_y = \sqrt{\sigma_a^2 + \sigma_b^2}$$

**Gleichung 25**

Produkt und Quotient (relative Fehlerquadrate):

$$y = a \cdot b \quad \text{bzw.} \quad y = \frac{a}{b} \rightarrow \frac{\sigma_y}{y} = \sqrt{\frac{\sigma_a^2}{a^2} + \frac{\sigma_b^2}{b^2}}$$

**Gleichung 26**

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Sättigung der [<sup>3</sup>H]GBC-Bindung in Abwesenheit von MgATP

#### 3.1.1 Bindung an Kir6.2/SUR1(WT)

Für Bindungsversuche an K<sub>ATP</sub>-Kanälen mit der Untereinheit SUR1 verwendet man als Radioliganden Tritium-markiertes Glibenclamid ([<sup>3</sup>H]GBC; vgl. 2.3). Um das Bindungsverhalten von Glibenclamid an dem Rezeptorkomplex Kir6.2/SUR1(WT) zu charakterisieren, führten wir Sättigungsexperimente (n = 4) an Membranen transient transfizierter HEK 293-Zellen (Plasmid -Ratio Kir/ SUR = 1/ 100) durch (vgl. 2.7). Dabei wurde die Zunahme der spezifischen Bindung mit steigender GBC-Konzentration bestimmt und als Bindungsparameter die Konzentration der Bindungsstellen (B<sub>max</sub>) sowie die K<sub>D</sub>, d.h. die Konzentration, bei der die halbmaximale Sättigung erreicht wird durch Regressionsanalyse ermittelt (vgl. 2.8.3.1).

**Typisches Einzelexperiment:** Exemplarisch soll hier der Versuch V19 (Abbildung 10) kurz dargestellt werden. Für Einzelheiten zur Durchführung von Sättigungsexperimenten siehe Kap. 2.8.2.

Um die spezifische Bindung (B<sub>s</sub>) von [<sup>3</sup>H]GBC an Kir6.2/SUR1(WT) zu ermitteln, benötigt man zum einen die totale Bindung (= B<sub>tot</sub> = spezifische + nichtspezifische Bindung), zum anderen die nichtspezifische Bindung (NSB), um anschließend aus der Differenz B<sub>tot</sub> - NSB = B<sub>s</sub> die spezifische Bindung zu berechnen. Zur Auswertung wurde zunächst für die drei NSB-Werte (Abbildung 10) die Regressionsgerade nach der Gleichung

$$f(x) = m \cdot x$$

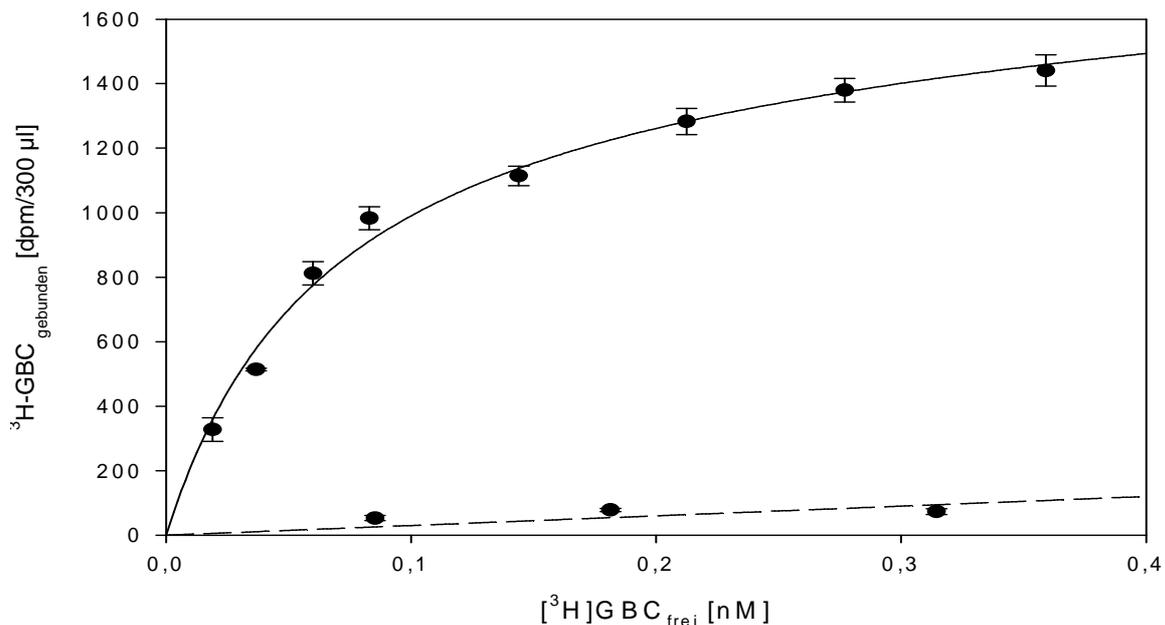
berechnet und ergab  $m = 300 \text{ dpm}/(300\mu\text{l} \cdot \text{nM})$ . Die Einheit dpm/300 $\mu$ l ist bedingt durch das Filtrationsvolumen von 300 $\mu$ l pro Ansatz.

### 3. Ergebnisse

Für die totale Bindung  $B_{\text{tot}}$  als die Summe der spezifischen und der nichtspezifischen Bindung wurde anschließend eine nichtlineare Regressionsanalyse (vgl. 2.8.3.1) durchgeführt nach der Gleichung

$$f(x) = a \cdot x / (x+k) + 300 \cdot x.$$

Diese ergab die Amplitude  $a = 1600 \pm 60 \text{ dpm}/300\mu\text{l}$  und die  $K_D = 0.07 \pm 0.01 \text{ nM}$ .



**Abbildung 10: Versuch V19; Sättigung [<sup>3</sup>H]GBC-Bindung an Kir6.2/SUR1(WT) in Abwesenheit von MgATP. Die Werte wurden einer Regressionsanalyse nach der Gleichung  $f=a \cdot x / (x+k) + 300 \cdot x$  unterzogen; die ermittelte Amplitude  $a$  beträgt  $1600 \pm 60 \text{ dpm}/300\mu\text{l}$ ;  $K_D = 0.07 \pm 0.01 \text{ nM}$ . Die Gleichung der Regressionsgeraden für die Nichtspezifische Bindung (NSB) lautet  $f=300 \cdot x$ ; Proteinkonzentration:  $0.0256 \text{ mg}/300\mu\text{l}$**

**Gemeinsame Auswertung:** Bei der gemeinsamen Auswertung der Einzelversuche ergab sich das Problem, dass die absoluten Messwerte für  $B_{\text{max}}$  in dpm (decays per minute) zwischen den Einzelversuchen variierten. Um die verschiedenen Einzelerperimente gemeinsam auswerten zu können, wurden die Werte für die spezifische Bindung ( $B_s$ ) in Prozent der maximalen Bindung ( $B_{\text{max}}$ ) des jeweiligen Experimentes ausgedrückt. Nach dieser Normierung konnten die verschiedenen Versuche ( $n = 4$ ) miteinander verglichen und einer gemeinsamen Auswertung unterzogen werden (Abbildung 11; vgl. 2.8.3.1 und 2.9). Die normierten Werte in Prozent  $B_{\text{max}}$  wurden über der freien

### 3. Ergebnisse

Konzentration des Radioliganden aufgetragen und es wurde eine Regressionsanalyse durchgeführt. Bei der Anpassung an das Massenwirkungsgesetz (vgl. 2.8.3) in Form der Gleichung

$$f(x) = 100 \cdot x / (x + k)$$

mit  $k = K_D$  konnten die  $K_D$  und die  $B_{max}$  ermittelt werden. Die  $K_D$  betrug für Kir6.2/SUR1(WT) ohne MgATP  $0.073 \pm 0.003$  nM. Die Anzahl der maximal verfügbaren Bindungsstellen ( $B_{max}$ ) betrug  $370 \pm 30$  fmol/mg Protein (Wert gemittelt aus  $n = 4$  Einzelversuchen; vgl. Abbildung 11).

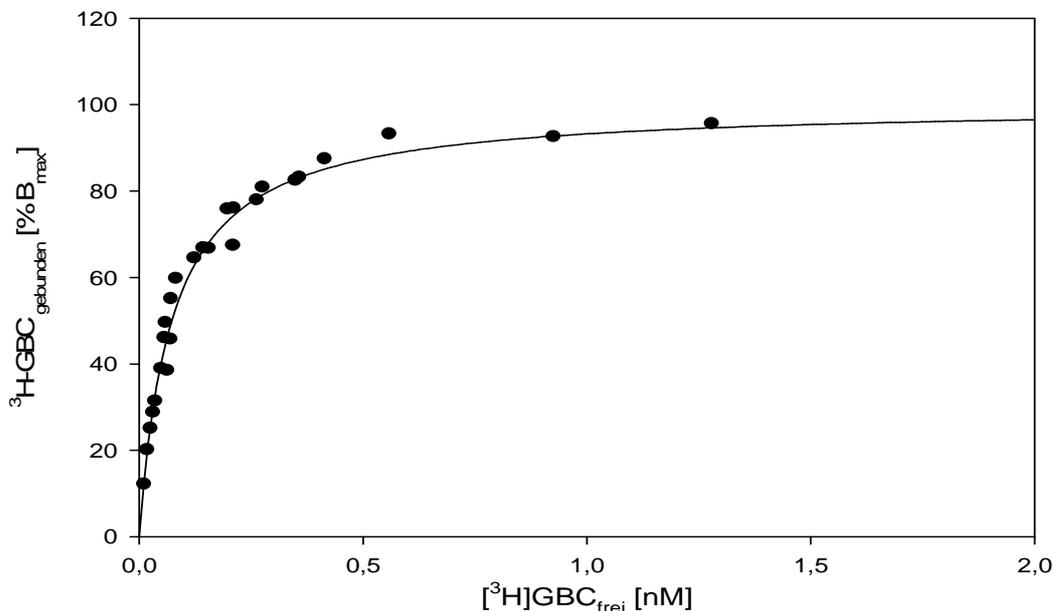


Abbildung 11: Sättigung der spezifischen [<sup>3</sup>H]GBC-Bindung unter Abwesenheit von MgATP an den Rezeptorkomplex Kir6.2/SUR1(WT); dargestellt sind die normierten Werte der  $n = 4$  Einzelversuchen. 100%  $B_{max}$  entsprechen einer  $B_{max}$  von  $370 \pm 30$  fmol/mg Protein.  $K_D = 0.073 \pm 0.003$  nM. Die Werte wurden einer Regressionsanalyse nach  $f = 100 \cdot x / (x + k)$  unterzogen.

#### 3.1.2 Bindung an Kir6.2/SUR1(QR)

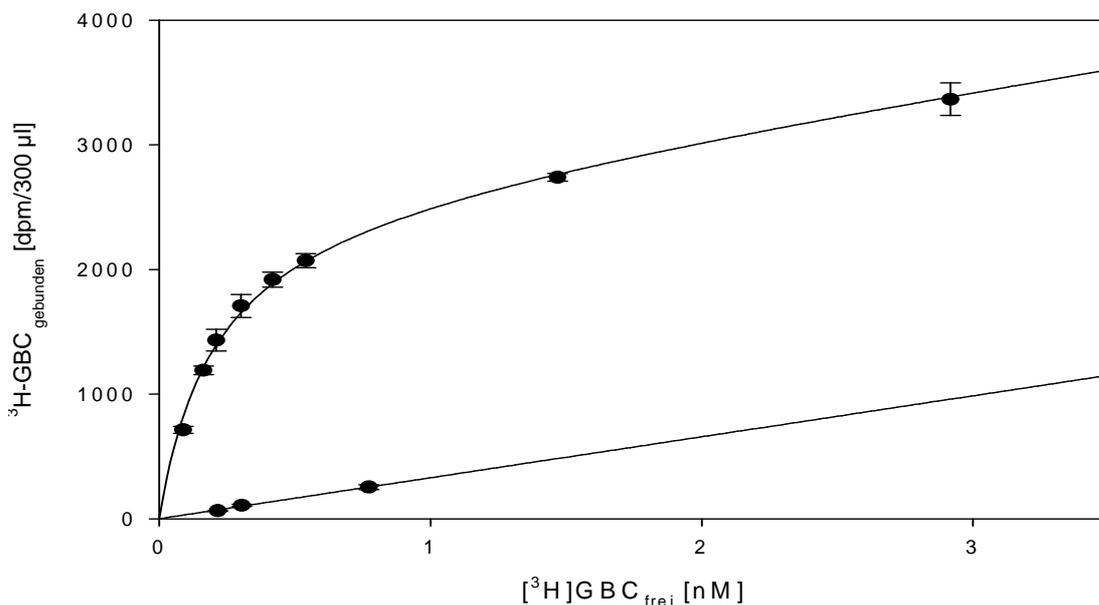
**Typisches Einzelexperiment:** Wie bereits unter 3.1.1 für den  $K_{ATP}$ -Kanal Wildtyp Kir6.2/SUR1(WT) beschrieben, wurde auch für die  $K_{ATP}$ -Kanal-Mutation Kir6.2/SUR1(QR) sowohl die  $K_D$  als auch die  $B_{max}$  ermittelt. Dafür wurden drei Sättigungsversuche in Abwesenheit von MgATP durchgeführt.

### 3. Ergebnisse

Exemplarisch soll hier der Versuch V15 dargestellt werden. Analog zu 3.1.1 sollte die spezifische Bindung ( $B_s$ ) von [ $^3\text{H}$ ]GBC an Kir6.2/SUR1(QR) ermittelt werden. Das Vorgehen experimentell und rechnerisch orientierte sich an 3.1.1. Bei der Regressionsanalyse für die nichtspezifische Bindung (NSB) wurde für die Gradengleichung

$$f(x) = m \cdot x$$

der Anstieg  $m = 330 \text{ dpm}/(300\mu\text{l} \cdot \text{nM})$  berechnet (vgl. Abbildung 12).



**Abbildung 12: Versuch V15; Sättigung [ $^3\text{H}$ ]GBC-Bindung an Kir6.2/SUR1(QR) in Abwesenheit von MgATP. Die Werte wurden einer Regressionsanalyse nach der Gleichung  $f = a \cdot x / (x + k) + 330 \cdot x$  unterzogen; die ermittelte Amplitude  $a$  beträgt  $2600 \pm 50 \text{ dpm}/300\mu\text{l}$ ;  $K_D = 0.20 \pm 0.01 \text{ nM}$ . Die Gleichung der Regressionsgeraden für die Nichtspezifische Bindung (NSB) lautet  $f = 330 \cdot x$ ; Proteinkonzentration:  $0.10 \text{ mg}/300\mu\text{l}$**

Für die totale Bindung  $B_{\text{tot}}$  wurde anschließend eine nichtlineare Regressionsanalyse nach der Gleichung

$$f(x) = a \cdot x / (x + k) + 330 \cdot x$$

durchgeführt und ergab für die Amplitude  $a = 2600 \pm 50 \text{ dpm}/300\mu\text{l}$  sowie für die  $K_D = 0.20 \pm 0.01 \text{ nM}$ .

**Gemeinsame Auswertung:** Wie unter 3.1.1 für den Wildtypen dargestellt, wurden auch für die  $K_{\text{ATP}}$ -Kanal Mutation Kir6.2/SUR1(QR) die Meßwerte der Einzelerperimente ( $n = 3$ ) auf Prozent der maximalen Bindung ( $\% B_{\text{max}}$ )

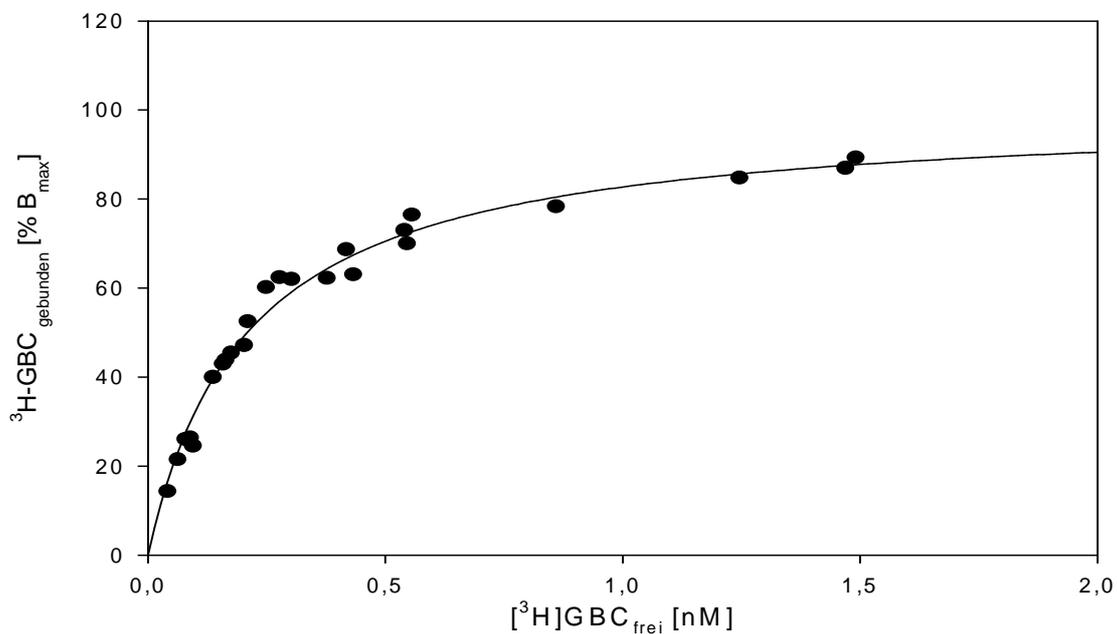
### 3. Ergebnisse

normiert. Bei der anschließend durchgeführten Regressionsanalyse nach der Gleichung

$$f(x) = 100 \cdot x / (x + k)$$

wurde die  $K_D = 0.21 \pm 0.01$  nM ermittelt. Die Anzahl der maximal verfügbaren Bindungsstellen ( $B_{max}$ ) betrug  $280 \pm 40$  fmol/mg Protein (vgl. Abbildung 13).

Zsfg. V13;15;21  
Sättigung an Kir6.2/SUR1(QR)  
mit EDTA



**Abbildung 13: Sättigung der spezifischen [<sup>3</sup>H]GBC-Bindung unter Abwesenheit von MgATP an den Rezeptorkomplex SUR1(Q1178R)/Kir6.2; dargestellt sind die normierten ( $S_B = \% B_{max}$ ) Werte aus  $n = 3$  Einzelversuchen. 100%  $B_{max}$  entsprechen  $B_{max} = 280 \pm 40$  fmol/mg Protein.  $K_D = 0.21 \pm 0.01$  nM. Die Kurve ist nach der Gleichung  $f = 100 \cdot x / (x + k)$  gefittet.**

### 3. Ergebnisse

---

#### 3.1.3 [<sup>3</sup>H]GBC-Bindung von Kir6.2/SUR1(WT) und Kir6.2/SUR1(Q1178R) in Abwesenheit von MgATP

Tabelle 8: [<sup>3</sup>H]GBC-Bindung von Kir6.2/SUR1(WT) und Kir6.2/SUR1(Q1178R) in Abwesenheit von MgATP

Rezeptor	K <sub>D</sub> [nM]	Bmax [fmol/mg]	n
Kir6.2/SUR1(WT)	0.073 ± 0.003	370 ± 30	4
Kir6.2/SUR1(QR)	0.21 ± 0.01	280 ± 40	3

## **3.2 Hemmung der [<sup>3</sup>H]GBC-Bindung durch MgATP**

Unter physiologischen Bedingungen beträgt die intrazelluläre MgATP Konzentration 3 – 5 mM und die Nukleotid-Bindungsstellen in den beiden Nukleotid-Bindungsfalten (NBFs) des Sulfonylharnstoffrezeptors (SUR; vgl. 1.4) sind durch MgATP besetzt, wobei in erster Linie die NBF2 eine ATPase-Aktivität besitzt. Dies führt zu einer negativ-allosterischen Hemmung der GBC-Bindung (Schwanstecher und Schwanstecher, 2002; Hambrock et al., 2002). In dem folgenden Kapitel wird die Konzentrationsabhängigkeit dieser Hemmung beschrieben.

### **3.2.1 Bindung an Kir6.2/SUR1(WT)**

Zuerst betrachteten wir den  $K_{ATP}$ -Kanal-Wildtyp Kir6.2/SUR1(WT). Bei den dazu durchgeführten Versuchen ( $n = 7$ ; [<sup>3</sup>H]GBC-Konzentration =  $1.4 \pm 0.1$  nM) betrug die Amplitude bei einer MgATP Konzentration von 1 mM  $a = 13 \pm 3$  Prozent der spezifischen Bindung ( $B_s$ ). Auf die Bestimmung der  $IC_{50}$  (Konzentration von MgATP bei halbmaximaler Hemmung) wurde aufgrund der geringen Amplitude verzichtet (vgl. Abbildung 15). Für Einzelheiten zur Durchführung und Auswertung von Hemmversuchen siehe Kap. 2.8.3.1.

### **3.2.2 Bindung an Kir6.2/SUR1(QR)**

**Typisches Einzelexperiment:** Exemplarisch wird hier der Versuch V7 kurz dargestellt (Abbildung 14). Um die Hemmung der spezifischen [<sup>3</sup>H]GBC-Bindung an Kir6.2/SUR1(QR) durch MgATP zu bestimmen, benötigt man zum einen die totale Bindung (=  $B_{tot} = \text{unspezifische (NSB)} + \text{spezifische (} B_s \text{) Bindung}$ ), zum anderen die nichtspezifische Bindung (NSB), um aus der Differenz von  $B_{tot}$  und NSB die spezifische Bindung  $B_s$  zu berechnen. Da sich die Konzentration des Radioliganden nicht änderte, war auch keine

### 3. Ergebnisse

---

Veränderung der nichtspezifischen Bindung zu erwarten Die nichtspezifische Bindung wurde in Gegenwart von nicht markiertem Glibenclamid (100 nM) bestimmt und der Verlauf der NSB-Werte wurde durch eine Gerade, die parallel zur Abszisse verläuft, mit der Gleichung

$$f(x) = y$$

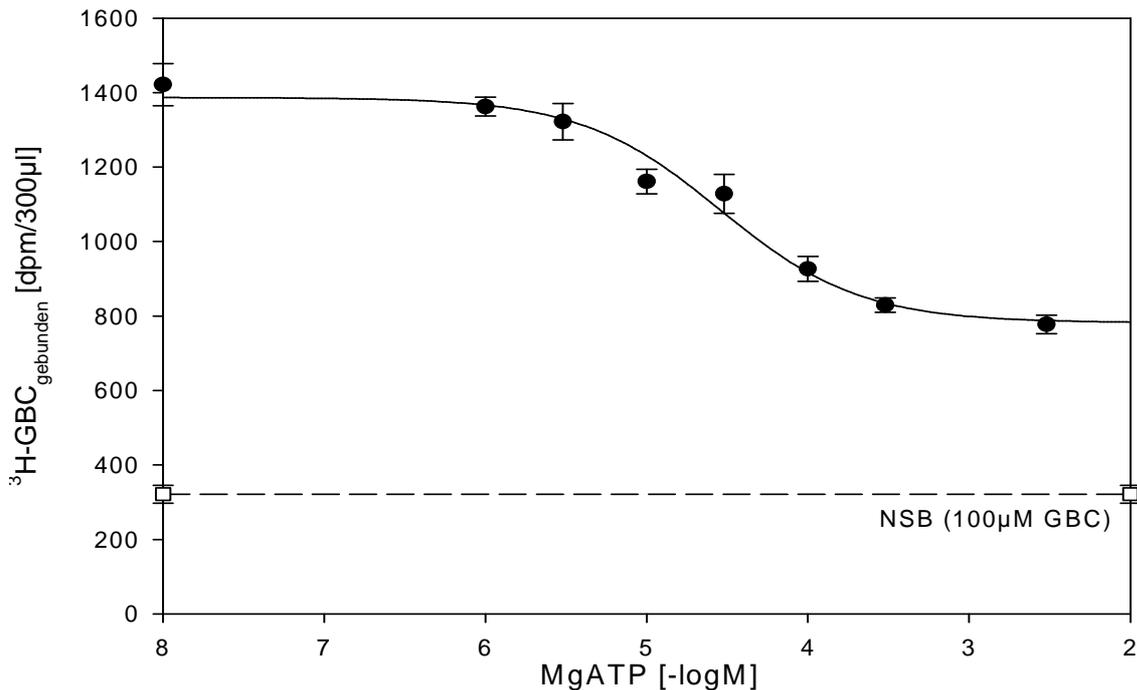
beschrieben und ergab für Versuch V7 den Wert NSB =  $f(x) = y = 320 [\pm 25]$  dpm/300 $\mu$ l, was 23%  $B_{\text{tot}}$  entsprach. Die totale Bindung ( $B_{\text{tot}}$ ) betrug  $1400 \pm 60$  dpm/300 $\mu$ l (vgl. Abbildung 14).

Zur Beschreibung der konzentrationsabhängigen Hemmung der [ $^3\text{H}$ ]GBC-Bindung wurde anschließend eine Regressionsanalyse (vgl. 2.8.3.2) nach der Gleichung

$$f(x) = a \cdot 10^{-(pk \cdot x)} / (10^{-(pk \cdot x)} + 10^{-(x \cdot 1)}) + b$$

durchgeführt. Die Variable  $a$  beschreibt die Amplitude der Hemmkurve und gibt die Hemmung der spezifischen [ $^3\text{H}$ ]GBC-Bindung an Kir6.2/SUR1(QR) durch MgATP wieder. Die Amplitude betrug in Versuch V7  $a = 605 \pm 40$  dpm/300 $\mu$ l (= 57%  $B_s$ ). Die  $IC_{50}$  (= Variable  $pk$ ) gibt die MgATP-Konzentration wieder, bei der die spezifische [ $^3\text{H}$ ]GBC-Bindung halbmaximal gehemmt wird und betrug in Versuch V7  $IC_{50} = 29 \mu\text{M}$  (vgl. Abbildung 14).

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 14:** Versuch V7; Hemmung der spezifischen [<sup>3</sup>H]GBC-Bindung an Kir6.2/SUR1(QR) durch MgATP; Regressionsanalyse nach der Gleichung  $f = a \cdot 10^{(-pk \cdot 1)} / (10^{(-pk \cdot 1)} + 10^{(-x \cdot 1)}) + b$ ;  $pIC_{50} = 4.54 \pm 0.13$ ;  $IC_{50} = 29 \mu M$ ;  $a = 605 \pm 40 \text{ dpm}/300\mu l = 55\% B_s$ .  $L_o^* = 1.46 \text{ nM}$ ;  $B_{tot} = 1400 \pm 60 \text{ dpm}/300\mu l$ ,  $NSB = 321 \pm 25 \text{ dpm}$ ; Proteinkonzentration:  $0.05 \text{ mg}/300\mu l$

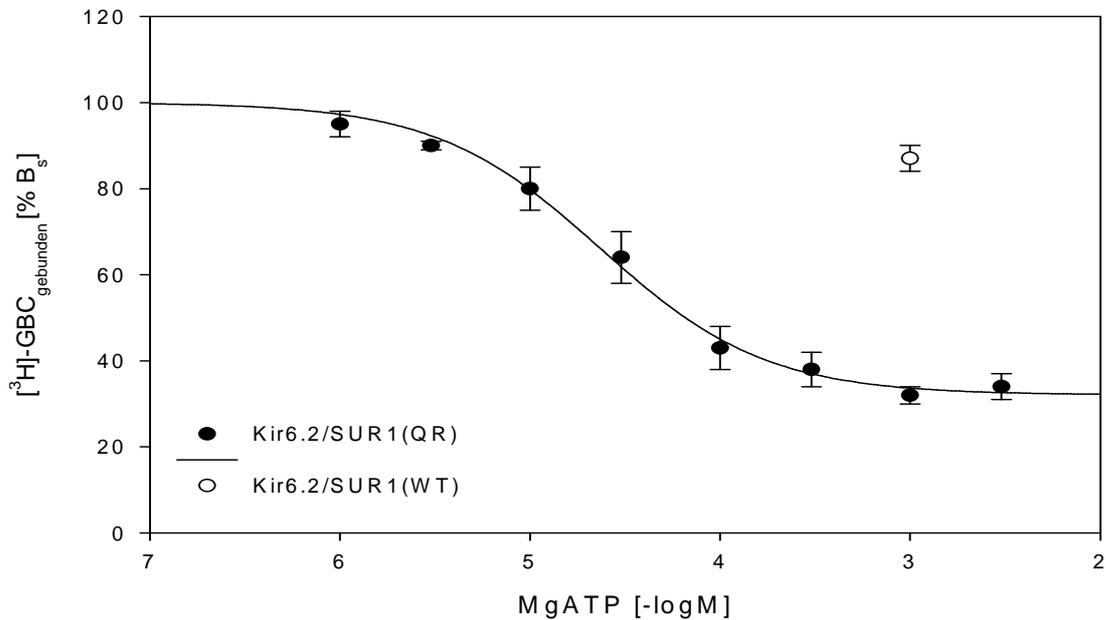
**Gemeinsame Auswertung:** Für die gemeinsame Auswertung der durchgeführten Einzelversuche ( $n = 4$ ) ergab sich wie beschrieben (vgl. 3.1.1) das Problem, dass die absoluten Meßwerte für die totale Bindung ( $B_{tot}$ ) in dpm zwischen den Versuchen variierten. Um die verschiedenen Einzelerperimente gemeinsam auswerten zu können, wurden die Werte für die totale Bindung ( $B_{tot}$ ) von [<sup>3</sup>H]GBC in Prozent der spezifischen Bindung ( $B_s$ ) des jeweiligen Experimentes ausgedrückt (vgl. 2.8.3.2). Die gemittelten und normierten Werte in Prozent  $B_s$  wurden zur Beschreibung der konzentrationsabhängigen Hemmung über der Konzentration von MgATP aufgetragen und es wurde, unter Anpassung an das Massenwirkungsgesetz (vgl. 2.8.3) eine Regressionsanalyse mit der Gleichung

$$f(x) = a \cdot 10^{(-pk \cdot 1)} / (10^{(-pk \cdot 1)} + 10^{(-x \cdot 1)}) + (100 - a)$$

durchgeführt. Es entspricht  $a$  der Amplitude der Hemmkurve und  $pk$  der  $pIC_{50}$  von MgATP. Für die Hemmung der spezifischen [<sup>3</sup>H]GBC-Bindung an

### 3. Ergebnisse

Kir6.2/SUR1(QR) durch MgATP ergab sich die Amplitude  $a = 68 \pm 1\% B_s$  und  $pIC_{50} = 4.63 \pm 0.04$ , was einer  $IC_{50} = 23 \mu M$  [19; 28] entspricht. (vgl. Abbildung



**Abbildung 15: Hemmung der [<sup>3</sup>H]GBC-Bindung an (○)Kir6.2/SUR1(WT); (●) Kir6.2/SUR1(QR) durch MgATP: Daten aus n = 4 Versuchen gemittelt und auf Prozent der spezifischen Bindung normiert, anschließende Regressionsanalyse nach der Gleichung:  $f(x) = a \cdot 10^{-(pk \cdot x)} / (10^{-(pk \cdot x)} + 10^{-x}) + (100 - a)$ ;  $pIC_{50} = 4.63 \pm 0.04$ ;  $IC_{50} = 23 \mu M$  [19; 28];  $L_o^* = 1.4 \pm 0.1 nM$ ;  $a = 68 \pm 1\% B_s$ ;  $100\% B_s = 189 fmol/mg Protein$ .  $NSB = 25 \pm 1\% B_{tot}$ .  $B_{tot} = 250 \pm 20 fmol/mg Protein$ .**

15)

### 3.2.3 Hemmung der [<sup>3</sup>H]GBC-Bindung durch MgATP an Kir6.2/SUR1(WT) und Kir6.2/SUR1(QR)

Tabelle 9: Hemmung der [<sup>3</sup>H]GBC-Bindung durch MgATP an Kir6.2/SUR1(WT) und Kir6.2/SUR1(QR); mit <sup>+</sup> gekennzeichnete, kursivgeschriebene Werte entnommen Hambrock et al., 2002

Rezeptor	pIC <sub>50</sub>	IC <sub>50</sub> [μM]	A [% Bs]	n
Kir6.2/SUR1(WT)		<i>56 (31, 102)<sup>+</sup></i>	<i>13 ± 3 20 ± 6<sup>+</sup></i>	7
Kir6.2/SUR1(QR)	4.60 ± 0.04	23 (19, 28)	68 ± 1	4

Wie man Tabelle 9 entnehmen kann, hemmt die Anwesenheit von MgATP (1 mM) die spezifische [<sup>3</sup>H]GBC-Bindung an Kir6.2/SUR1(QR) deutlich stärker als an Kir6.2/SUR1(WT). Unklar blieb hingegen, ob diese Hemmung primär auf eine Änderung der Affinität ( $K_D$ ) oder auf einer Änderung der Kapazität ( $B_{max}$ ) oder auf eine Änderung beider Bindungsparameter zurückzuführen war. Diese Fragestellung konnte auf dem Wege der Durchführung von Sättigungsversuchen an beiden  $K_{ATP}$ -Kanälen in Anwesenheit von MgATP geklärt werden, die im folgenden Kapitel betrachtet werden.

### **3.3 Sättigung der [<sup>3</sup>H]GBC-Bindung in Anwesenheit von MgATP**

#### **3.3.1 Bindung an Kir6.2/SUR1(WT)**

In 3.2 wurde gezeigt, dass MgATP die Bindung von [<sup>3</sup>H]GBC an Kir6.2/SUR1(WT) hemmt. Die Natur dieser Hemmung wurde nun genauer untersucht, indem bei einer sättigenden MgATP Konzentration (1 mM) die [<sup>3</sup>H]GBC-Bindung in drei Sättigungsversuchen bestimmt wurde, um zu sehen, inwiefern MgATP die Affinität ( $K_D$ ) oder die Kapazität ( $B_{max}$ ) der Bindung beeinflusst.

**Typisches Einzelexperiment:** Exemplarisch soll der Versuch V17 (Abbildung 16) kurz dargestellt werden. Analog zu 3.1.1 sollte die spezifische Bindung ( $B_s$ ) von [<sup>3</sup>H]GBC an Kir6.2/SUR1(WT) bestimmt werden. Das Vorgehen experimentell und rechnerisch orientierte sich an 3.1.1 (vgl. auch 2.8.3.1 und 2.9).

Mit den Messwerten der nichtspezifischen Bindung (NSB) wurde eine lineare Regressionsanalyse durchgeführt, die für die Gleichung

$$f(x) = m \cdot x$$

den Anstieg  $m = 400 \text{ dpm}/(300\mu\text{l} \cdot \text{nM})$  ergab. Für die totale Bindung  $B_{tot}$  ( $= \text{NSB} + B_s$ ) wurde anschließend eine nichtlineare Regressionsanalyse (vgl. 2.8.3.1) nach der Gleichung

$$f(x) = a \cdot x / (x + k) + 400 \cdot x$$

durchgeführt und ergab für die Amplitude  $a = 2370 \pm 80 \text{ dpm}/300\mu\text{l}$  und für die  $K_D = 0.13 \pm 0.01 \text{ nM}$ . (vgl. Abbildung 16)

### 3. Ergebnisse

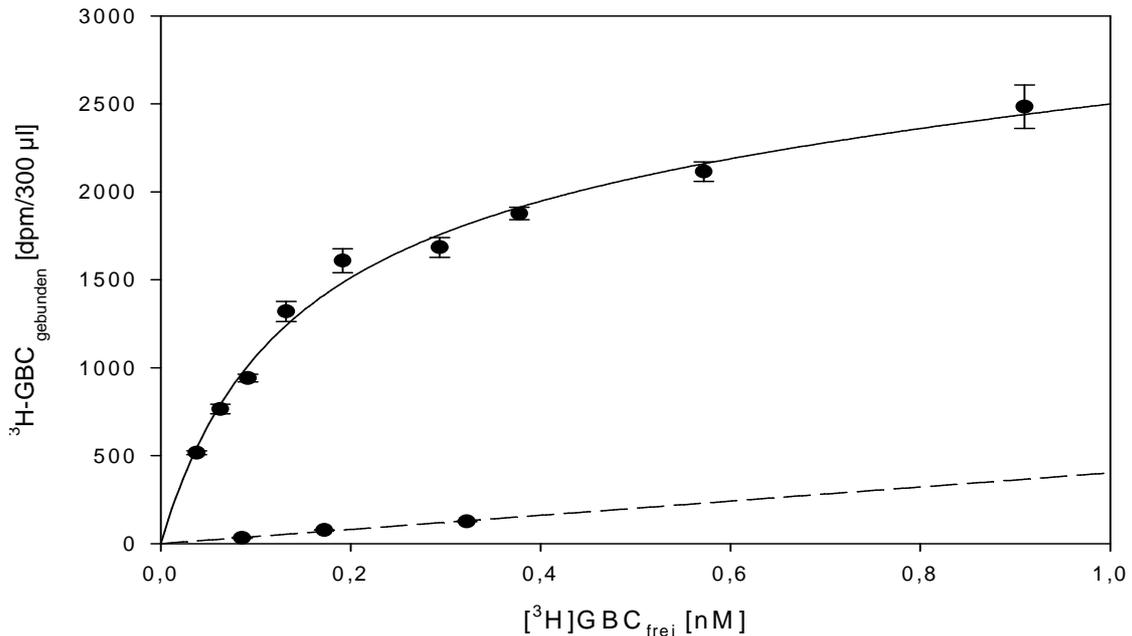


Abbildung 16: Versuch V17; Sättigung der [<sup>3</sup>H]GBC-Bindung an Kir6.2/SUR1(WT) in Anwesenheit von MgATP. Die Werte wurden einer Regressionsanalyse nach der Gleichung  $f = a \cdot x / (x + k) + 400 \cdot x$  unterzogen; die ermittelte Amplitude  $a$  beträgt  $2370 \pm 80$  dpm/300µl;  $K_D = 0.13 \pm 0.01$  nM. Die Gleichung der Regressionsgeraden für die Nichtspezifische Bindung (NSB) lautet  $f = 400 \cdot x$ ; Proteinkonzentration: 0.10mg/ 300 µl.

**Gemeinsame Auswertung:** Wie unter 3.1.1 dargestellt (vgl. 2.8.3.1), wurden die Meßwerte der Einzelerperimente ( $n = 3$ ) auf Prozent der maximalen Bindung ( $B_{\max}$ ) normiert. Bei der anschließend durchgeführten nichtlinearen Regressionsanalyse (vgl. 2.8.3.1) nach der Gleichung

$$f(x) = 100 \cdot x / (x + k)$$

wurde eine  $K_D = 0.13 \pm 0.01$  nM ermittelt. Die Konzentration der maximal verfügbaren Bindungsstellen betrug  $B_{\max} = 230 \pm 30$  fmol/mg Protein (vgl. Abbildung 17).

### 3. Ergebnisse

#### Zsfg. V17;18;20 Sättigung an Kir6.2/SUR1(WT) mit MgATP

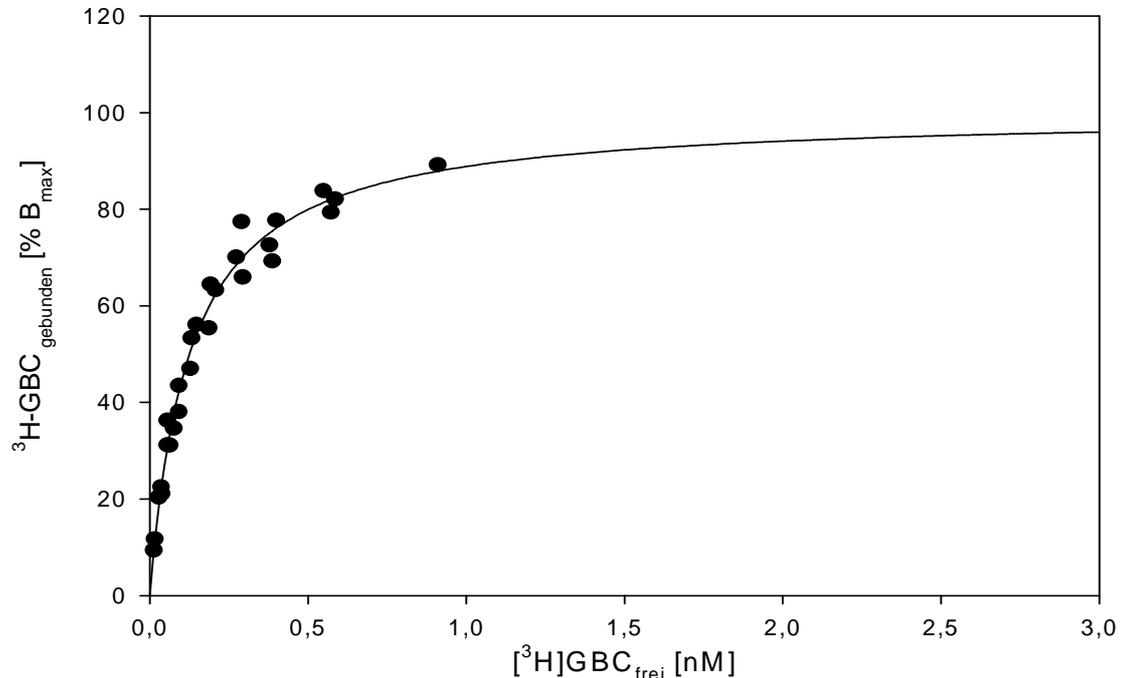


Abbildung 17: Sättigung der spezifischen [<sup>3</sup>H]GBC-Bindung in Anwesenheit von MgATP an den Rezeptorkomplex Kir6.2/SUR1(WT); dargestellt sind die normierten Werte aus n = 3 Einzelversuchen. 100% B<sub>max</sub> entsprechen B<sub>max</sub> = 230 ± 30 fmol/mg Protein. K<sub>D</sub> = 0.13 ± 0.01 nM. Die Kurve ist nach der Gleichung  $f = 100 \cdot x / (x + k)$  gefittet.

#### 3.3.2 Bindung an Kir6.2/SUR1(QR)

**Typisches Einzelexperiment:** Bei einer sättigenden MgATP Konzentration (1 mM) wurden vier Sättigungsversuche durchgeführt (experimentelles und rechnerisches Vorgehen vgl. 3.1.1).

Bei der Regressionsanalyse für die nichtspezifische Bindung (NSB) wurde für die Gradengleichung

$$f(x) = m \cdot x$$

der Anstieg  $m = 200 \text{ dpm}/(300\mu\text{l} \cdot \text{nM})$  ermittelt. Die nichtlineare Regressionsanalyse für die totale Bindung nach der Gleichung

$$f(x) = a \cdot x / (x + k) + 200 \cdot x$$

ergab für die Amplitude  $a = 670 \pm 40 \text{ dpm}/300\mu\text{l}$  und für die  $K_D = 0.91 \pm 0.14 \text{ nM}$  (vgl. Abbildung 18).

### 3. Ergebnisse

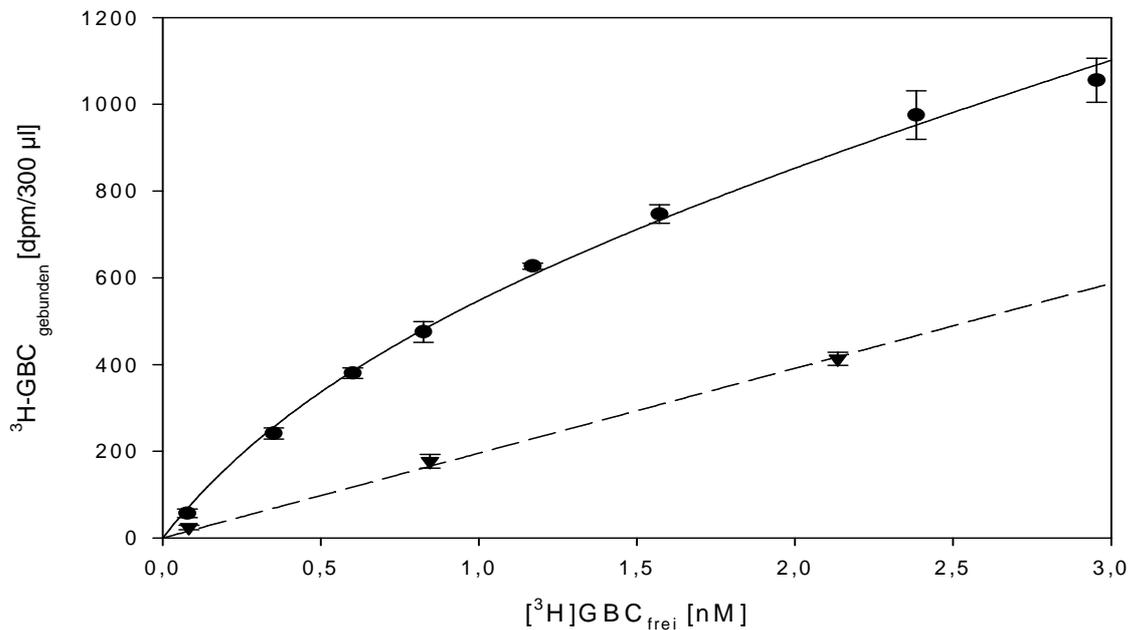


Abbildung 18: Versuch V8; Sättigung [<sup>3</sup>H]GBC-Bindung an Kir6.2/SUR1(QR) in Anwesenheit von MgATP. Die Werte wurden einer Regressionsanalyse nach der Gleichung  $f = a \cdot x / (x + k) + 200 \cdot x$  unterzogen; die ermittelte Amplitude  $a$  beträgt  $670 \pm 40$  dpm/300µl;  $K_D = 0.91 \pm 0.14$  nM. Die Gleichung der Regressionsgeraden für die Nichtspezifische Bindung (NSB) lautet  $f = 200 \cdot x$ ; Proteinkonzentration: 0.05mg/ 300 µl

**Gemeinsame Auswertung:** Bei der, für die auf Prozent der maximalen Bindung ( $B_{max}$ ) normierten Messwerte der Einzelexperimente (vgl. 3.1.1) durchgeführte Regressionsanalyse (vgl. 2.8.3.1) nach der Gleichung

$$f(x) = 53 \cdot x / (x + k)$$

wurde die  $K_D = 0.94 \pm 0.05$  ermittelt. Die Konzentration der maximal verfügbaren Bindungsstellen betrug  $B_{max} = 130 \pm 10$  fmol/mg Protein. (vgl. Abbildung 19).

Die ermittelten  $B_{max}$  Werte wurden bei allen Sättigungen auf die  $B_{max}$  der Sättigung der [<sup>3</sup>H]GBC-Bindung an Kir6.2/SUR1(WT) ohne MgATP normiert. Da die  $B_{max}$  für die [<sup>3</sup>H]GBC-Bindung an Kir6.2/SUR1(QR) mit MgATP exakt 53% davon beträgt, wurde in der Regressionsgleichung anstelle einer Amplitude = 100 die Amplitude = 53 verwendet.

### 3. Ergebnisse

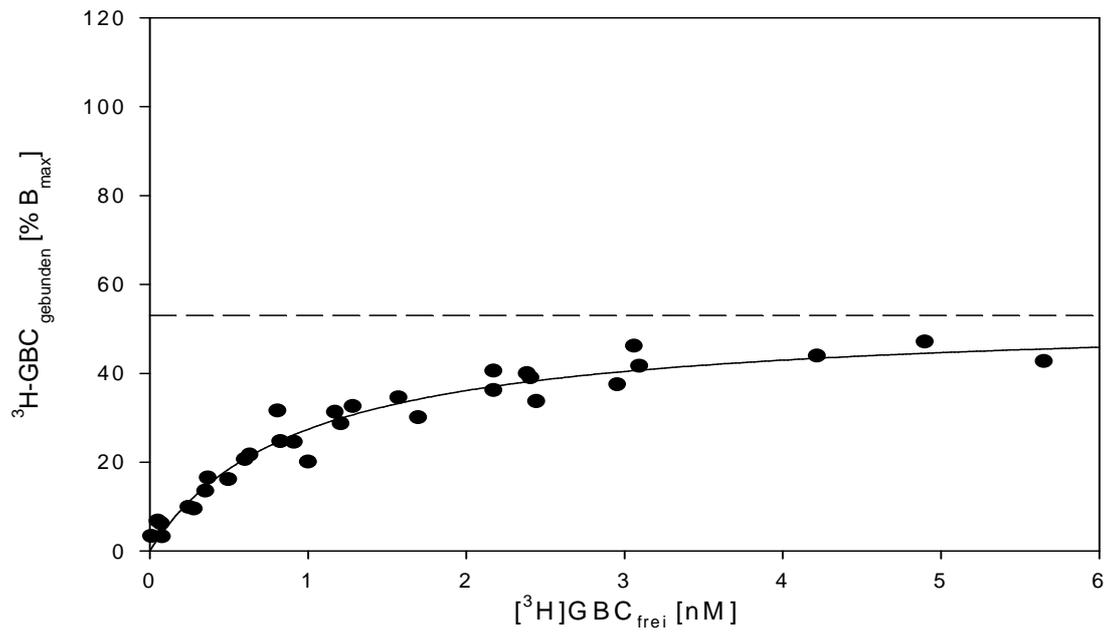


Abbildung 19: Sättigung der spezifischen [<sup>3</sup>H]GBC-Bindung in Anwesenheit von MgATP an den Rezeptorkomplex Kir6.2/SUR1(Q1178R); dargestellt sind die normierten Werte aus  $n = 4$  Einzelversuchen.  $K_D = 0.94 \pm 0.05$ . Die Kurve ist nach der Gleichung  $f = 53 \cdot x / (x + k)$  gefittet. 100%  $B_{max}$  entsprechen  $B_{max} = 250 \pm 50$  fmol/mg Protein.

### 3.3.3 Vergleich des Effektes von MgATP auf die [<sup>3</sup>H]GBC-Bindung von Kir6.2/SUR1(WT) und Kir6.2/SUR1(QR)

Tabelle 10: Vergleich des Effektes von MgATP auf die [<sup>3</sup>H]GBC-Bindung von Kir6.2/SUR1(WT) und Kir6.2/SUR1(QR)

Rezeptorkomplex	MgATP [mM]	K <sub>D</sub> [nM]	B <sub>max</sub> [fmol/mg]
Kir6.2/SUR1(WT)	0	0.073 ± 0.004	250 ± 50
Kir6.2/SUR1(WT)	1	0.13 ± 0.01	230 ± 30
Kir6.2/SUR1(QR)	0	0.21 ± 0.01	240 ± 4
Kir6.2/SUR1(QR)	1	0.94 ± 0.05	130 ± 10

Mit den Ergebnissen aus Tabelle 10 konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit von MgATP (1mM) die Affinität der [<sup>3</sup>H]GBC-Bindung an Kir6.2/SUR1(WT) signifikant um den Faktor 1.6 [1.4; 1.8] (P = 0,001) auf die K<sub>D</sub> = 0.13 ± 0.01 nM verringert (K<sub>D</sub> = 0.073 ± 0.004 nM in Abwesenheit von MgATP; vgl.3.1.1). Die Kapazität (B<sub>max</sub>) der [<sup>3</sup>H]GBC-Bindung verringert sich unter der Anwesenheit von MgATP nicht signifikant (P = 0.288) auf 91 ± 21% (B<sub>max</sub> = 230 ± 30 fmol/mg Protein) des Wertes von B<sub>max</sub> = 250 ± 50 fmol/ mg Protein, der unter 3.1.1 für die [<sup>3</sup>H]GBC-Bindung an Kir6.2/SUR1(WT) in Abwesenheit von MgATP bestimmt wurde. Das Verhältnis der ermittelten Werte für die maximale Konzentration der Bindungsstellen (B<sub>max</sub>) ist konsistent mit der, in 3.2 ermittelten Amplitude der Hemmung der [<sup>3</sup>H]GBC-Bindung durch MgATP mit a = 13 ± 3 Prozent der spezifischen Bindung (B<sub>s</sub>; vgl. 2.8.3) an Kir6.2/SUR1(WT).

Deutlicher fällt der Einfluss von MgATP auf die [<sup>3</sup>H]GBC-Bindung an Kir6.2/SUR1(QR) aus (Tabelle 10): Die Affinität der Bindung wird durch MgATP signifikant um den Faktor 4.5 [4.2; 4.8] verringert (P < 0,001) (vgl. Tabelle 10). Die Kapazität der Bindung wird durch die Anwesenheit von MgATP

### 3. Ergebnisse

---

( $B_{\max} = 128 \pm 11$  fmol/mg Protein) signifikant ( $P = 0.005$ ) auf  $53 \pm 5\%$  der Kapazität ( $B_{\max}$ ) bei der [ $^3\text{H}$ ]GBC-Bindung ohne MgATP gehemmt ( $B_{\max} = 243 \pm 4$ ). Diese Hemmung der Kapazität durch MgATP wurde bereits unter 3.2 angedeutet. Die ermittelte Amplitude  $a = 68 \pm 1\%$   $B_s$  (vgl. 3.2.2) ist konsistent mit der hier ermittelten Hemmung der  $B_{\max}$ .

Für die weitergehende Diskussion der Ergebnisse siehe Kap. 4.

## **3.4 Hemmung der [<sup>3</sup>H]GBC–Bindung durch Benzothiadiazine**

### **3.4.1 Einleitende Bemerkungen**

In den bisherigen Betrachtungen haben wir uns ausschließlich auf die  $K_{ATP}$ -Kanal-Inhibitoren konzentriert. Von erheblichem Interesse war aber auch das Bindungsverhalten der sog.  $K_{ATP}$ -Kanal-Öffner (Kalium-Channel-Opener = KCO). Binden diese Substanzen an einen  $K_{ATP}$ -Kanal, erhöhen sie dessen Offenheitswahrscheinlichkeit. Kaliumionen können vermehrt in die Zelle einströmen und es kommt zur Hyperpolarisation der Zellmembran. Infolge dessen verringert sich die Insulinsekretion oder bleibt ganz aus.

Je nach Zusammensetzung des Rezeptorkomplexes Kir/SUR fällt die hyperpolarisierende Wirkung der verschiedenen KCOs unterschiedlich stark aus. Der „klassische“ KCO für den Rezeptorkomplex Kir6.2/SUR1 ist das Benzothiadiazin Diazoxid. Diazoxid bindet mit gleicher Wirksamkeit an  $K_{ATP}$ -Kanäle in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas' (Kir6.2/SUR1) und in glatten Muskelzellen z. B. in Gefäßen (Kir6.1/SUR2B und Kir6.2/SUR2B) (Ashcroft, 2000; Quast und Cook, 1989) und mit geringer Wirksamkeit an  $K_{ATP}$ -Kanäle im Herzen (Kir6.2/SUR2A; Hansen, 2006; Vivaudou und Forestier, 1995). Die unselektive Wirkung von Diazoxid beschränkt seine Anwendung. Zur Behandlung von bspw. inoperablen Insulinomen wäre ein  $\beta$ -Zell-spezifischer KCO zielführender. Ein möglicher Wirkstoff ist das Diazoxidanalogon NNC 55-0462 (nachfolgend: NNC; vgl. 1.8.2), das selektiv Kir6.2/SUR1 öffnet (Dabrowski et al., 2002). Diese Eigenschaft birgt ein großes pharmakologisches Potential, da die insulinsenkende Wirkung erreicht werden kann, ohne dass dabei  $K_{ATP}$ -Kanäle außerhalb des Pankreas' geöffnet werden und es bspw. durch die konsekutive Relaxation glatter Muskelzellen in Gefäßwänden zu einer ungewollten hypotensiven Wirkung kommen kann (Dabrowski et al., 2002).

$K_{ATP}$ -Kanal-Öffner im Allgemeinen und Benzothiadiazine im speziellen benötigen für ihre hyperpolarisierende Wirkung die Anwesenheit von hydrolysierbarem ATP (Dunne und Petersen, 1986). Ein möglicher Grund für

diese Abhängigkeit ist die räumliche Nähe der Bindungsstellen für Diazoxid und ATP innerhalb der Rezeptorstruktur. Elektrophysiologische Experimente mit chimären Rezeptorkomplexen legen nahe, dass auf SUR1 insbesondere die Transmembrandomäne (TMD) 1 (entspricht Transmembransegmenten (TMS) 6-11; vgl.1.4) und die erste Nukleotid-Bindungsfalte NBF1 für die Regulation von Benzothiadiazinen von Bedeutung sind (Babenko et al., 2000). Da die NBF1 in diesem Segment liegt, ist ein unmittelbarer Einfluss der Nukleotidbindung, bzw. Hydrolyse auf die KCO-Wirkung wahrscheinlich (Babenko et al., 2000). Das Segment der TMD 2 (TMS 12-17) ist für die KCOs von großer Bedeutung und spielt ebenfalls eine Rolle bei der Bildung der Bindungsstellen. In SUR1 befindet sich diese Region in Nachbarschaft zu der Sulfonylharnstoff Bindungstasche. Diese lokale Nähe könnte der Grund für die allosterische Hemmung der [<sup>3</sup>H]GBC-Bindung durch Benzothiadiazine sein (Babenko et al., 2000).

#### **3.4.2 Bindung an Kir6.2/SUR1(WT)**

##### **3.4.2.1 Bei Abwesenheit von MgATP**

Die Bindung und Wirkung von KCOs an SUR erfordert die Anwesenheit hydrolysierbarer Mg<sup>2+</sup>-Nukleotide (Babenko et al., 2000). Unter Abwesenheit von MgATP ist daher weder durch Diazoxid noch durch NNC eine signifikante Hemmung der [<sup>3</sup>H]GBC-Bindung an den K<sub>ATP</sub>-Kanal-Wildtyp zu erwarten.

**Diazoxid:** An dem Rezeptorkomplex Kir6.2/SUR1(WT) wurden vier Einzelversuchen durchgeführt. Nach Normierung der Meßwerte auf Prozent der spezifischen Bindung und anschließender Mittelwertbildung aller Einzelversuche konnte gezeigt werden, dass Diazoxid in Abwesenheit von MgATP die [<sup>3</sup>H]GBC-Bindung nicht hemmen kann (bei 500 µM Diazoxid  $a = 102 \pm 10\% B_s$ ; vgl. Abbildung 20; Tabelle 11). Die NSB betrug  $24 \pm 1\% B_{tot}$  mit  $B_{tot} = 203 \pm 12$  fmol/mg Protein.

**NNC:** Die gemeinsame Auswertung (s.o.) der Einzelversuche ( $n = 4$ ) ergab, dass NNC in Abwesenheit von MgATP keinen hemmenden Effekt auf die [ $^3\text{H}$ ]GBC-Bindung an Kir6.2/SUR1(WT) ( $a = 102 \pm 2\% B_s$ ; vgl. Abbildung 20; Tabelle 11) hat. Die nichtspezifische Bindung betrug  $25 \pm 1\% B_{\text{tot}}$ , bei  $B_{\text{tot}} = 266$  fmol/mg Protein.

#### **3.4.2.2 Bei Anwesenheit von MgATP**

Die Anwesenheit von MgATP führt zu einer Aktivierung des  $K_{\text{ATP}}$ -Kanals. Durch die Konformationsänderung des Kanals können die KCOs mit deutlich erhöhter Affinität an die SUR-Untereinheiten binden und so die Offenheitswahrscheinlichkeit erhöhen (Schwanstecher et al., 1992; Schwanstecher et al., 1998; Quast, 1993). Um diesen Effekt von Diazoxid auf die [ $^3\text{H}$ ]GBC-Bindung an den  $K_{\text{ATP}}$ -Kanal-Wildtyp nachweisen zu können, wurden Einzelversuche unter Anwesenheit von MgATP (1mM) durchgeführt. Zur gemeinsamen Auswertung wurden die Messwerte der Einzelexperimente jeweils auf Prozent der spezifischen Bindung ( $\% B_s$ ) normiert. Für die normierten Werte gleicher Benzothiadiazin-Konzentrationen wurden nachfolgend die arithmetischen Mittelwerte in Prozent  $B_s$  gebildet (vgl. 2.8). Die gemittelten und normierten Werte in Prozent  $B_s$  wurden zur Beschreibung der konzentrationsabhängigen Hemmung über der Konzentration des Benzothiadiazin aufgetragen und es wurde, unter Anpassung an das Massenwirkungsgesetz, eine Regressionsanalyse mit der Gleichung

$$f(x) = a \cdot 10^{-(pk \cdot x)} / (10^{-(pk \cdot x)} + 10^{-x}) + (100 - a)$$

durchgeführt. Dabei steht  $a$  für die Amplitude der Hemmung der spezifischen [ $^3\text{H}$ ]GBC-Bindung und  $pk$  für die  $pIC_{50}$ , den negativen dekadischen Logarithmus der Konzentration der halbmaximalen Hemmung der [ $^3\text{H}$ ]GBC-Bindung durch das Benzothiadiazin.

**Diazoxid:** Mithilfe der Regressionsanalyse konnte die Amplitude  $A = 40 \pm 5\% B_s$  und die  $pIC_{50} = 4.12 \pm 0.17$  ermittelt werden.

### 3. Ergebnisse

---

Die Hemmkonstante  $K_i$  wird nach dem Massenwirkungsgesetz (vgl. 2.8.3.2) von der Konzentration des Radioliganden beeinflusst. Unter Berücksichtigung der mittleren Konzentration des Radioliganden  $L = 1.23 \pm 0.03$  nM und der unter 3.3. ermittelte  $K_D = 0.13 \pm 0.01$  nM hinzu, ließ sich durch Anwendung der Korrektur nach Cheng und Prusoff (1973; vgl. 2.8.3.2)

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

die Hemmkonstante  $K_i$  berechnen. Diese betrug  $K_i = 7.2$  (3.3; 15.8)  $\mu$ M ( $pK_i = 5.14 \pm 0.17$ ). Da die Korrektur nach Cheng und Prusoff nur für kompetitive Hemmungen gilt, es sich aber bei der Bindung der Benzothiadiazine Diazoxid und NNC um eine allosterische Hemmung handelt, sind die, mit der Korrektur nach Cheng und Prusoff berechneten Werte als Näherungswerte zu betrachten (vgl. 2.8.3.2).

Zusätzlich wurden sowohl die Amplitude  $A$  als auch die  $pK_i$  durch Bestimmung des arithmetischen Mittelwertes und des SEM der Einzelversuche ( $n = 6$ ) bestimmt. Dabei ergab die Amplitude für Diazoxid  $A = 42 \pm 1\%$   $B_s$  und die  $pK_i = 5.07 \pm 0.12$ . Dies entspricht einer Hemmkonstante  $K_i = 8.5$  (6.5; 11)  $\mu$ M. Die Werte für die Amplitude  $A$  und die Hemmkonstante  $K_i$ , die einerseits über Mittelwertbildung der Parameter aus den Einzelversuchen und andererseits über die Regressionsanalyse der gemittelten Daten und anschließende Korrektur nach Cheng und Prusoff ermittelt werden konnten, zeigten eine sehr gute Übereinstimmung.

Die nichtspezifische Bindung (NSB) blieb während der Einzelversuche konstant und betrug (bei  $n = 6$ )  $16 \pm 1\%$   $B_{tot}$  (mit  $B_{tot} = 187 \pm 12$  fmol/mg).

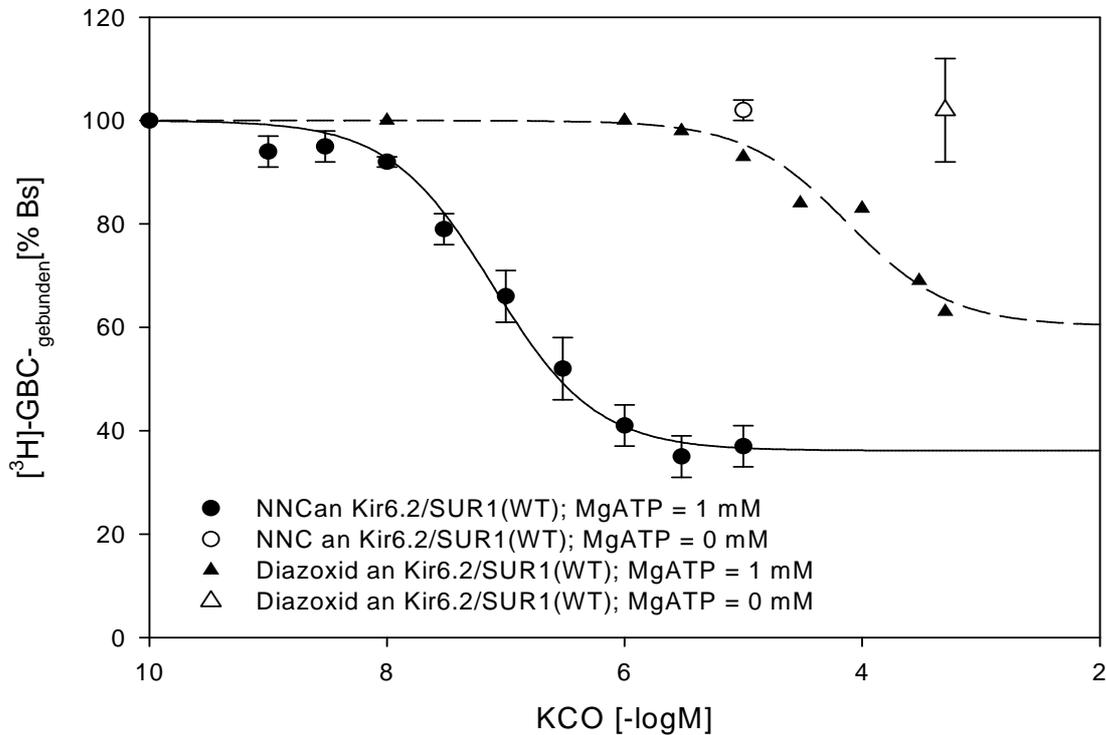
**NNC:** Die Auswertung der sechs Einzelversuche orientierte sich an der für Diazoxid. Rechnerisch konnten anhand der Regressionskurve die Amplitude  $A = 64 \pm 2\%$   $B_s$  und die  $pIC_{50} = 7.10 \pm 0.10$  nM ermittelt werden (vgl. Abbildung 20). Mit der ermittelten  $pIC_{50}$  ließ sich bei einer Konzentration des Radioliganden  $L = 0.9 \pm 0.1$  nM und mit der unter 3.3 ermittelten  $K_D = 0.13 \pm 0.01$  nM durch Anwendung der Korrektur nach Cheng und Prusoff, 1973b (vgl. 2.8.3.2) die Hemmkonstante  $K_i$  berechnen. Diese betrug  $K_i = 10$  (6.5; 16) nM ( $pK_i = 7.99 \pm 0.1$ ). Zusätzlich wurden sowohl die Amplitude  $A$  als auch die  $pK_i$

### 3. Ergebnisse

---

durch Bestimmung des arithmetischen Mittelwertes und des SEM der Einzelversuche ( $n = 6$ ) bestimmt. Dabei ergab die Amplitude  $A = 59 \pm 4\% B_s$  und die  $pK_i = 7.99 \pm 0.06$ . Dies entspricht einer Hemmkonstante der Inhibition  $K_i = 10 (8; 13) \text{ nM}$ . Die Werte für die Amplitude  $A$  und die Hemmkonstante  $K_i$ , die einerseits über Mittelwertbildung und andererseits über die Regressionsanalyse und anschließende Korrektur nach Cheng und Prusoff ermittelt werden konnten, zeigten eine sehr gute Übereinstimmung. Die nichtspezifische Bindung (NSB) blieb während der Einzelversuche konstant und betrug (bei  $n=6$  Einzelversuchen)  $23 \pm 4\% B_{\text{tot}}$  (mit  $B_{\text{tot}} = 230 \pm 30 \text{ fmol/mg}$ ).

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 20: Hemmung der spezifischen [<sup>3</sup>H]GBC-Bindung an Kir6.2/SUR1(WT) durch Diazoxid. (Δ) MgATP = 0mM. (▲) MgATP = 1mM: Daten aus n = 6 Versuchen gemittelt und auf Prozent spezifische Bindung normiert; anschließende Regressionsanalyse nach der Gleichung:  $f(x) = a \cdot 10^{(-pk \cdot 1)} / (10^{(-pk \cdot 1)} + 10^{(-x \cdot 1)}) + (100 - a)$ ;  $pIC_{50} = 4.12 \pm 0.17$ ;  $A = 40 \pm 5\% B_s$ ;  $L_o^* = 1.23 \pm 0.03$  nM;  $NSB = 16 \pm 1\% B_{tot}$ ;  $B_{tot} = 187 \pm 12$  fmol/mg Protein. Hemmung der spezifischen [<sup>3</sup>H]GBC-Bindung an Kir6.2/SUR1(WT) durch NNC; (○) MgATP = 0mM.; (●) MgATP = 1mM: Daten aus n = 6 Versuchen, Vorgehen wie bei Diazoxid;  $pIC_{50} = 7.10 \pm 0.06$ ;  $a = 64 \pm 2\% B_s$ ;  $L_o^* = 0.9 \pm 0.1$  nM;  $NSB = 23 \pm 4\% B_{tot}$ ;  $B_{tot} = 230 \pm 30$  fmol/mg Protein.**

#### 3.4.3 Bindung an Kir6.2/SUR1(QR)

Unter 3.4.2 wurde gezeigt, dass weder Diazoxid noch NNC ohne MgATP einen hemmenden Einfluss auf die [<sup>3</sup>H]GBC-Bindung an Kir6.2/SUR1(WT) hatten. Im folgenden Kapitel sollte ermittelt werden, inwiefern die Amplitude der Hemmung und die Hemmkonstante der beiden KCOs durch die Mutation Kir6.2/SUR1(QR) beeinflusst wird.

#### **3.4.3.1 Bei Abwesenheit von MgATP**

**Diazoxid:** Zur Bestimmung der [<sup>3</sup>H]GBC-Bindung an Kir6.2/SUR1(QR) ohne MgATP wurden vier Einzelversuche durchgeführt und, wie unter 3.4.2 beschrieben, ausgewertet. Bei einer Diazoxid Konzentration von 500 µM bewirkte Diazoxid eine geringe Hemmung der [<sup>3</sup>H]GBC-Bindung auf  $A = 7 \pm 3\%$   $B_s$  (vgl. Abbildung 21). Auf die Bestimmung der  $IC_{50}$  wurde aufgrund der geringen Amplitude verzichtet. Die nichtspezifische Bindung (NSB) betrug  $26 \pm 1\%$   $B_{tot}$ , bei einer totalen Bindung (=nichtspezifische Bindung (NSB) + spezifische Bindung ( $B_s$ ))  $B_{tot} = 185$  fmol/mg Protein.

**NNC:** Die gemeinsame Auswertung der Einzelversuche ( $n = 7$ ) ergab für die Amplitude  $A = 15 \pm 5\%$   $B_s$  (vgl. Abbildung 21). Auf die Bestimmung der  $IC_{50}$  wurde aufgrund der geringen Amplitude verzichtet. Die nichtspezifische Bindung (NSB) betrug  $24 \pm 1\%$   $B_{tot}$ , bei einer totalen Bindung  $B_{tot} = 180 \pm 10$  fmol/mg Protein.

#### **3.4.3.2 Bei Anwesenheit von MgATP**

**Diazoxid:** Anders als bei dem  $K_{ATP}$ -Kanal-Wildtyp bewirkte Diazoxid auch ohne MgATP eine geringe Hemmung der [<sup>3</sup>H]GBC-Bindung an Kir6.2/SUR1(QR). Noch nicht geklärt war dagegen, ob, und wenn ja in welchem Maße die Mutation die Amplitude der Hemmung bzw. die Inhibitionskonstante  $K_i$  von Diazoxid bei Anwesenheit von MgATP (1 mM) beeinflusst. Dazu wurden fünf Einzelversuche durchgeführt (vgl. Abbildung 21). Die gemeinsame Auswertung orientierte sich an 3.4.2.2.

Diese ergab für die Amplitude  $A = 58 \pm 3\%$   $B_s$  und die  $pIC_{50} = 4.56 \pm 0.10$ . Unter Hinzuziehung der mittleren Radioliganden Konzentration  $L = 1.27 \pm 0.03$  nM sowie der ermittelten  $K_D = 0.94 \pm 0.05$  nM (vgl. 3.3) ergab sich bei der Korrektur nach Cheng und Prusoff (vgl. 2.8.3.2) die Hemmkonstante  $K_i = 12$  (7.4; 19) µM ( $pK_i = 4.93 \pm 0.1$ ). Zusätzlich wurden sowohl die Amplitude  $A$  als auch die  $pK_i$  durch Bestimmung des arithmetischen Mittelwertes dieser

### 3. Ergebnisse

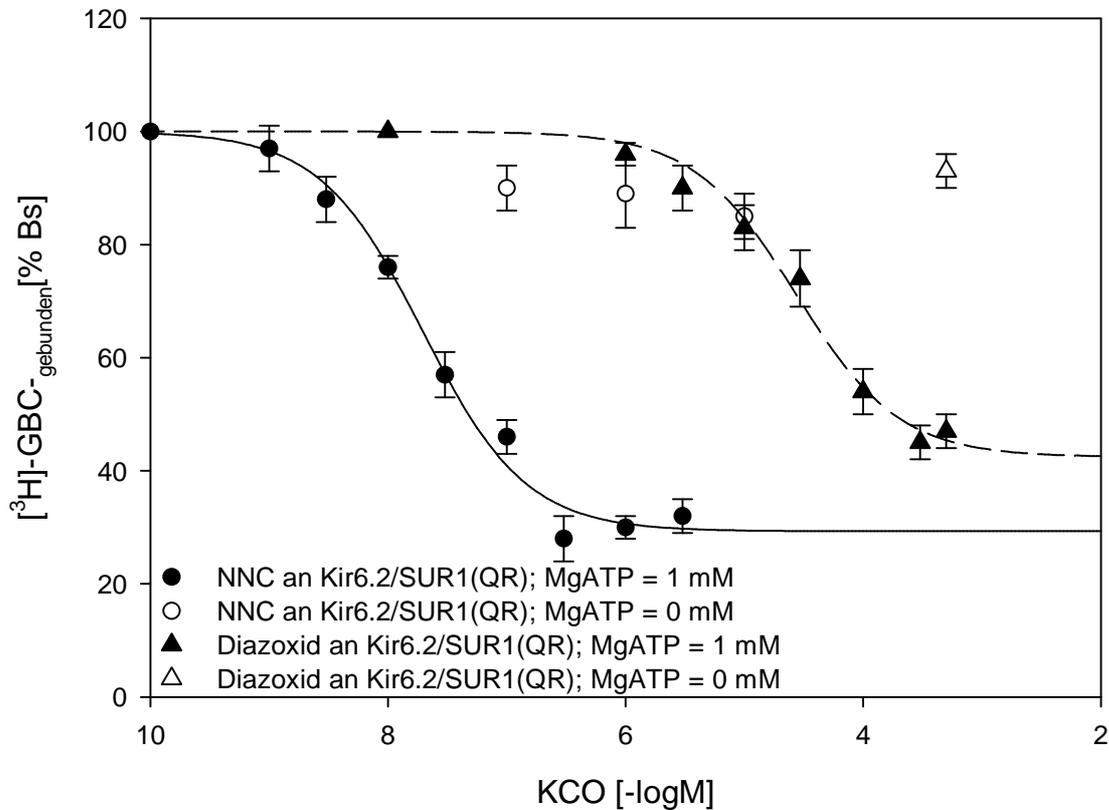
---

Parameter aus der Auswertung der Einzelversuche und des SEM der Einzelversuche ( $n = 5$ ) bestimmt. Dabei ergab die Amplitude  $A = 59 \pm 4\% B_s$  und die  $pK_i = 4.92 \pm 0.18$ . Dies entspricht einer Hemmkonstante  $K_i = 12 \pm 4 \mu\text{M}$ . Die Werte für die Hemmkonstante  $K_i$  und die Amplitude  $A$ , die einerseits über Mittelwertbildung und andererseits über die Regressionsanalyse und anschließende Korrektur nach Cheng und Prusoff ermittelt werden konnten, zeigten eine sehr gute Übereinstimmung. Die nichtspezifische Bindung (NSB) blieb während der Einzelversuche konstant und betrug (bei  $n = 5$  Einzelversuchen)  $47 \pm 2\% B_{\text{tot}}$  (mit  $B_{\text{tot}} = 60 \pm 3 \text{ fmol/mg}$ ).

**NNC:** Die Auswertung (vgl. 3.4.2.2) ergab eine Amplitude  $A = 71 \pm 2\% B_s$  und eine  $pIC_{50} = 7.70 \pm 0.06$ . Mit der ermittelten  $pIC_{50}$  ließ sich bei einer Konzentration des Radioliganden  $L = 1.4 \pm 0.2 \text{ nM}$  und mit der unter 3.3. ermittelten  $K_D = 0.94 \pm 0.05 \text{ nM}$  durch Anwendung der Korrektur nach Cheng und Prusoff (vgl. 2.8.3.2) die Hemmkonstante  $K_i$  berechnen, welche  $K_i = 8 (6; 10) \text{ nM}$  ( $pK_i = 8.1 \pm 0.1$ ) betrug.

Wie unter 3.4.2.2 beschrieben, wurde  $A$  und  $pK_i$  zudem als Mittelwert der Einzelversuche ( $n = 6$ ) ermittelt. Dabei ergab sich die Amplitude  $A = 72 \pm 2\% B_s$  und die  $pK_i = 8.02 \pm 0.12$ , was einer  $K_i = 9.5 \text{ nM} (5.5; 17)$  entspricht. Somit konnten sowohl die Amplitude  $A$  als auch die  $K_i$ , die durch Mittelwertbildung der Einzelexperimente bestimmt wurde durch die Werte bestätigt werden, die aus der Regressionsanalyse der gemittelten und normierten Werte bestimmt wurde. Die nichtspezifische Bindung (NSB) blieb während der Einzelversuche konstant und betrug (bei  $n = 6$  Einzelversuchen)  $46 \pm 2\% B_{\text{tot}}$  (mit  $B_{\text{tot}} = 95 \pm 7 \text{ fmol/mg}$ ).

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 21: Hemmung der spezifischen [<sup>3</sup>H]GBC-Bindung an Kir6.2/SUR1(Q1178R) durch Diazoxid (Δ) MgATP = 0mM: A = 7 ± 3% B<sub>s</sub>; (▲) MgATP = 1mM: Daten aus n = 6 Versuchen gemittelt und auf Prozent spezifische Bindung normiert; anschließende Regressionsanalyse nach der Gleichung:  $f(x) = a \cdot 10^{-(pk*1)} / (10^{-(pk*1)} + 10^{-(x*1)}) + (100 - a)$ ; pIC<sub>50</sub> = 4.56 ± 0.10; a = 58 ± 3% B<sub>s</sub>; L<sub>o</sub>\* = 1.27 ± 0.03nM; NSB = 47 ± 2% B<sub>tot</sub>; B<sub>tot</sub> = 60 ± 3 fmol/mg Protein. Hemmung der spezifischen [<sup>3</sup>H]GBC-Bindung an Kir6.2/SUR1(Q1178R) durch NNC (○) MgATP = 0mM: A = 28 ± 2% B<sub>s</sub>. (●) MgATP = 1mM: Daten aus n = 6 Versuchen, Vorgehen wie bei Diazoxid; pIC<sub>50</sub> = 7.70 ± 0.06; a = 71 ± 2; L<sub>o</sub>\* = 1.4 ± 0.2 nM; NSB = 46 ± 2% B<sub>tot</sub>; B<sub>tot</sub> = 95 ± 7 fmol/mg Protein.**

### 3. Ergebnisse

#### 3.4.4 Hemmung der spezifischen [<sup>3</sup>H]GBC-Bindung an Kir6.2/SUR1(WT) und Kir6.2/SUR1(Q1178R) durch Diazoxid und NNC

In der Tabelle 11 sind die Werte genannt, die durch die Bildung des arithmetischen Mittelwertes und des SEM der Werte für A und pK<sub>i</sub> aus den Einzelversuchen ermittelt wurden.

Tabelle 11: Hemmung der spezifischen [<sup>3</sup>H]GBC-Bindung an Kir6.2/SUR1(WT) und Kir6.2/SUR1(Q1178R) durch Diazoxid und NNC ; \* = Kir6.2/SUR1(Q1178R) signifikant (P<0.05) verschieden von Kir6.2/SUR1(WT) (t-test über Amplituden der Einzelversuche); + = signifikant (P<0.05) verschieden vom jeweiligen Wert für Diazoxid (t-test über Amplituden der Einzelversuche)

Rezeptor	MgATP [1mM]	Öffner	pK <sub>i</sub>	K <sub>i</sub>	A [%B <sub>s</sub> ]	n
Kir6.2/SUR1(WT)	0	Diazoxid	-	-	0 ± 10	4
		NNC	-	-	0 ± 2	4
	1	Diazoxid	5.07 ± 0.12	8.5 (6.5; 11) μM	42 ± 1	6
		NNC	7.99 ± 0.06	10 (8; 13) nM	60 ± 4 <sup>+</sup>	6
Kir6.2/SUR1(QR)	0	Diazoxid	-	-	7 ± 3	4
		NNC	-	-	15 ± 5 <sup>*</sup>	7
	1	Diazoxid	4.92 ± 0.18	12 (8; 16) μM	59 ± 4 <sup>*</sup>	6
		NNC	8.02 ± 0.10	9.5 (5.5; 17) nM	72 ± 2 <sup>**</sup>	6

### 4. Diskussion

Wie unter Kapitel 1.9 ausgeführt war es das Ziel dieser Arbeit, die Auswirkungen der Mutation Q1178R in der  $\beta$ -Untereinheit SUR1 auf die Bindungseigenschaften des Kanals Kir6.2/SUR1 zu charakterisieren. Beim Menschen führt diese Mutation zu einem ND (vgl. 1.7.3). Babenko konnte mit elektrophysiologischen Experimente zeigen, dass diese Mutation den offenen Zustand des Kanals stabilisiert (Babenko, 2008).

Die Bindungsmessungen wurden mit dem Radioliganden [ $^3\text{H}$ ]GBC durchgeführt und, um die Vergleichbarkeit mit den elektrophysiologischen Experimenten zu gewährleisten, wurde am vollständigen Kanal (d.h. nach Koexpression von SUR mit Kir6.2; vgl. 2.7.4 und Babenko, 2008) gemessen.

In Tabelle 12 sind alle Ergebnisse zusammengefasst. Im Weiteren werden die Ergebnisse in Gegenwart von MgATP im Rahmen eines (stark simplifizierten) Drei-Zustandsmodell des Kanals diskutiert.

#### 4. Diskussion

**Tabelle 12: Bindungsprofil für die K<sub>ATP</sub>-Kanäle Kir6.2/CRICRSUR1(WT) und Kir6.2/SUR1(QR); Radioligand: [<sup>3</sup>H]GBC; Cave: Maus Kir6.2 in pcDNA3.1; Hamster SUR1 (WT) und (Q1178R) liegen in pECE DNA vor; → molares Transfektionsverhältnis Kir:SUR = 1: 100**

Ligand		Kir6.2/SUR1(QR)			Kir6.2/SUR1(WT)			Bemerkungen
		IC <sub>50</sub> / K <sub>D</sub> /K <sub>i</sub> [nM /μM]	A [% Bs]/ B <sub>max</sub> [fmol/mg]	n	IC <sub>50</sub> / K <sub>D</sub> / K <sub>i</sub> [nM]	A [% Bs]/ B <sub>max</sub> [fmol/mg]	n	
<b>MgATP</b>		23 (19, 28) μM	68 ± 1%	4	Nicht ermittelt, da Amplitude zu gering	13 ± 3% at 1 mM MgATP	7	[ <sup>3</sup> H]GBC Konz. war 1.4 ± 0.1 (bei WT und QR)  >SUR1(WT): Daten von Hambrock. et al., 2002 >(QR) verschiebt niedrigaffine Bindung von (WT) zu hochaffiner ⇒ monophasische Bindungskurve mit hoher Affinität!!
<b>SUR1(QR) allein</b>		1.6 (1.2, 2.2) μM	83 ± 3%	4	<b>SUR1 WT allein</b> (nM) IC <sub>50,1</sub> = 3.9 (2.0, 7.4) IC <sub>50,2</sub> = 220 (200, 250)	A1 = 34 ± 4% A2 = 38 ± 2%		
<b>[<sup>3</sup>H]GBC</b>	<b>+MgATP (1 mM)</b>	0.92 (0.89, 0.95) nM	128 ± 11	4	0.12 (0.10, 0.13) nM	229 ± 24	3	1. (QR) vermindert K <sub>D</sub> 7.9 (7.0, 8.9)x (+MgATP) 2. MgATP vermindert a) K <sub>D</sub> 4.5 (4.2, 4.8)x (QR); 1.6 (1.4, 1.8)x (WT) b) B <sub>max</sub> zu 53 ± 5% (QR); 91 ± 21% (WT)
	<b>-MgATP (100 μM EDTA)</b>	0.21 (0.20, 0.22) nM	243 ± 4	3	0.074 (0.068, 0.081) nM	252 ± 51	4	
<b>NNC</b>	<b>+MgATP</b>	K <sub>i</sub> = 9.5 (5.5, 17) nM	72 ± 2%	6	K <sub>i</sub> = 10 (7.8, 13) nM	59 ± 4%	6	In Anwesenheit von MgATP erhöht (QR) die Amplitude aber nicht K <sub>i</sub> ; bei (QR)-Versuchen war die SB gering → schwierige Auswertung  Schwache Bindung an (QR) bei sehr hohen c, aber nicht an (WT)
	<b>-MgATP</b>	@ 1 μM: Bs = 89 ± 6 @ 10 μM: Bs = 85 ± 4		4	@ 10 μM: Bs = 102 ± 2		4	
<b>Diazoxid</b>	<b>+MgATP</b>	K <sub>i</sub> = 11 (7.9, 17) μM	58 ± 2%	5	K <sub>i</sub> = 6.7 (3.1, 15) μM	40 ± 4%	6	(QR) erhöht Amplitude aber nicht K <sub>i</sub> (s. NNC)
	<b>-MgATP</b>	@ 500 μM: Bs = 93 ± 3		4		@ 500 μM: Bs = 102 ± 10%	4	Vgl. mit NNC -MgATP

### **4.1 Auswirkung der Mutation SUR1(Q1178R) auf die GBC-Bindung in Abwesenheit von MgATP**

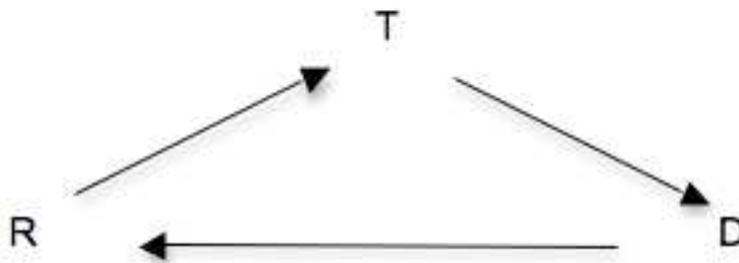
In Abwesenheit von MgATP (und Anwesenheit von EDTA, vgl. 3.1) ist der Kanal im Geschlossenenzustand, denn es findet keine Hydrolyse von MgATP statt und die NBFs am SUR sind unbesetzt. In Sättigungsexperimenten mit [<sup>3</sup>H]GBC wurden die Gleichgewichtsdissoziationskonstante  $K_D$  und die maximale Konzentration der Rezeptorbindungsstellen (Bindungskapazität  $B_{max}$ ) des Radioliganden bestimmt (vgl. 3.1 und 3.3). Die  $B_{max}$ -Werte für den Wildtyp und den mutierten Kanal unterscheiden sich nicht ( $252 \pm 51$  und  $243 \pm 4$  fmol/mg Protein), während die  $K_D$ -Werte signifikant unterschiedlich sind (0.074 (0.068, 0.081) nM für Kir6.2/SUR1(WT) und 0.21 (0.20, 0.22) nM für die Mutante; vgl. Tabelle 12). Dies zeigt, dass die Mutation auf das Level der verfügbaren Bindungsstellen des Rezeptors keinen signifikanten Einfluss hat, wohl aber auf den  $K_D$ -Wert und damit auf die Affinität für [<sup>3</sup>H]GBC, die leicht aber signifikant um den Faktor 2.8 (2.4, 3.2) gesenkt wird. Die Mutation SUR1(Q1178R) liegt im Transmembransegment 15 (TMS15) etwa in der Mitte der Membran (Babenko, 2008; Abbildung 4). TMS15 liegt in der Wand der GBC-Bindungstasche (Ashfield et al., 1999; Uhde et al., 1999; Bryan et al., 2005; Stephan et al., 2006); und es zeigt sich, dass diese Mutation die Konfiguration der Bindungstasche leicht verändert und die Bindung leicht erschwert (vgl. 1.4).

### **4.2 Drei-Zustandsmodell des $K_{ATP}$ -Kanals**

$K_{ATP}$ -Kanäle unterliegen einer dualen Steuerung durch MgATP (vgl. 1.5.1): Die Bindung von ATP an die porenbildende  $\alpha$ -Untereinheit Kir6.2 (ohne nennenswerten Einfluss von  $Mg^{2+}$ ; Ashcroft und Kakei, 1989) schließt den Kanal, wobei bereits die Bindung eines ATP-Moleküls an das Kir6.2-Tetramer mit vier ATP-Bindungsstellen genügt um den Geschlossenenzustand zu induzieren (Markworth et al., 2000). Dieser Hemmung durch ATP steht die stimulierende Wirkung der Bindung und Hydrolyse von MgATP an den beiden NBFs des SUR entgegen, wobei NBF1 überwiegend ATP bindet und NBF2 die

größere Hydrolyseaktivität besitzt (Ueda et al., 1999 ; vgl. 1.4). Insgesamt handelt es sich dabei um ein gleichermaßen genau ausbalanciertes wie störungsanfälliges System von inhibierender und stimulierender Wirkung des ATP.

Zingman et al. (2001) postulierten ein Modell, demzufolge die ATPase-Aktivität des SUR-Moleküls die Kanalkonformation maßgeblich bestimmt. Sie unterschieden zwischen einem prähydrolytischen, geschlossenen Kanalzustand und einem posthydrolytischen, offenen Kanalzustand. Diese beiden Zustände können experimentell stabilisiert werden, prähydrolytisch mit Berylliumfluorid und posthydrolytisch mit Orthovanadat (Zingman et al., 2001). Mindestens drei Zustände sind zu unterscheiden (vgl. Abbildung 22): Der Grundzustand (R, kein Nukleotid gebunden, Kanal geschlossen), der prähydrolytische Zustand (T, ATP gebunden, Kanal geschlossen) und der posthydrolytische Zustand (D, ADP gebunden, Kanal offen).



**Abbildung 22: 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)**

Diese Zustände haben verschiedene Affinitäten für GBC: Im Grundzustand ist die Affinität für GBC hoch (Abwesenheit von MgATP). Im prähydrolytischen Zustand liegt vermutlich eine mittlere Affinität vor und der posthydrolytische Zustand ist wahrscheinlich sehr niederaffin (Hambrock et al., 2002). Andererseits benötigen die Öffner für eine hoch affine Bindung MgATP (Quast, 1993; Russ et al., 2003) und neuere Untersuchungen deuten darauf hin, dass die Öffner den posthydrolytischen Zustand stabilisieren (Zingman et al., 2001).

Es sei noch angefügt, dass das Drei-Zustandsschema in Abbildung 22 eine grobe Vereinfachung darstellt. Der Kanal (Kir6.2/SUR1)<sub>4</sub> ist ein Tetradimer mit vier MgATP-Bindungsstellen an (Kir6.2)<sub>4</sub> und acht an (SUR1)<sub>4</sub> für MgATP, was für viele Zwischenzustände spricht. Zudem sind bei der Hydrolyse von MgATP mehr als nur drei enzymatische Zustände zu erwarten.

### **4.3 Auswirkung der Mutation SUR1(Q1178R) auf Modulation der GBC-Bindung durch MgATP**

Bei den Versuchen (n = 7) wurde eine Hemmung der [<sup>3</sup>H]-GBC-Bindung durch MgATP von 13 ± 3% am Wildtyp ermittelt. Aufgrund dieser geringen Amplitude wurde auf die Bestimmung der Konzentration IC<sub>50</sub> verzichtet. Dies stimmt weitgehend mit den Ergebnissen von Hambrock et al., 2002 überein, in denen die Glibenclamidbindung an Kir6.2/SUR1(WT) durch MgATP um 20% gehemmt wurde mit einer Konzentration der halbmaximalen Hemmung IC<sub>50</sub> = 56 µM. Deutlich signifikanter fiel dagegen der Einfluss von MgATP auf die Glibenclamidbindung an den mutierten Kanal aus: Die [<sup>3</sup>H]GBC-Bindung an Kir6.2/SUR1(Q1178R) wurde durch MgATP um 68 ± 1% gehemmt mit einer IC<sub>50</sub> = 23 (19, 28) µM.

Dies zeigt, dass die Mutation den Kanal für den Effekt von MgATP sensibilisiert (Linksverschiebung der Hemmkurve) und zugleich den maximalen Effekt von MgATP verstärkt (Zunahme der maximalen Hemmung). Diese Ergebnisse passen sehr gut zu der Publikation von Babenko (2008) in der gezeigt wurde, dass die Mutation die Hemmwirkung von GBC drastisch verringert und stehen im Einklang mit der von Babenko aufgestellten Hypothese, dass die Mutation den posthydrolytischen Zustand des Kanals stabilisiert.

### **4.4 Auswirkung der Mutation SUR1(Q1178R) auf die GBC-Bindung in Anwesenheit von MgATP**

Aus den bisherigen Versuchen konnte ermittelt werden, dass der hemmende Effekt von MgATP auf die [<sup>3</sup>H]GBC-Bindung an Kir6.2/SUR1(Q1178R) stärker ist als beim Wildtyp-Kanal. Nun war die Frage zu klären, ob diese Hemmung auf eine Abnahme der Affinität (Zunahme des  $K_D$ -Werts), eine Abnahme der Kapazität ( $B_{max}$ ) oder auf eine Änderung beider Bindungsparameter zurückzuführen ist. Dazu wurde bei einer sättigenden MgATP Konzentration von 1 mM die Bindung bei steigenden [<sup>3</sup>H]GBC Konzentrationen gemessen.

Beim Wildtyp Kir6.2/SUR1(WT) war bereits bei den unter 3.2.1 beschriebenen Hemmversuchen mit MgATP kein starker Effekt von MgATP auf die [<sup>3</sup>H]GBC-Bindung beobachtet worden, und so konnte auch bei den Sättigungsversuchen nur ein geringer Einfluss festgestellt werden. Die  $K_D$  erhöhte sich leicht aber signifikant um den Faktor 1.6 (1.4, 1.8) auf 0.12 (0.10, 0.13) nM bei einer unveränderten Bindungskapazität  $B_{max} = 229 \pm 24$  fmol/ mg Protein (vgl. Tabelle 12). Für den Wildtyp-Kanal kann man zusammenfassen, dass MgATP im Fließgleichgewicht der Hydrolyse die [<sup>3</sup>H]GBC-Bindung an Kir6.2/SUR1(WT) kaum hemmt - lediglich die Affinität  $K_D$  nimmt um den Faktor 1.6 ab - und daher der niederaffine posthydrolytische Zustand D unter diesen Bedingungen im Steady State der Zustände nicht viel beiträgt; der Kanal hält sich im wesentlichen in den Zuständen R und T auf (vgl. Abbildung 22).

Am mutierten Kanal zeigte sich hingegen der Effekt von MgATP (1 mM) auf die [<sup>3</sup>H]GBC-Bindung deutlich ausgeprägter. Die  $B_{max}$  verringert sich dramatisch auf ~54% der  $B_{max}$  ohne MgATP. Darüber hinaus verringert sich auch die Affinität um den Faktor 4.5 (4.2, 4.8) von einer  $K_D = 0.21$  (0.20, 0.22) auf 0.92 (0.89, 0.95) nM (vgl. Tabelle 12).

Der massive Verlust an Bindungsstellen ist so zu deuten, dass in der Gegenwart von MgATP eine neue Klasse von Bindungsstellen entstanden ist mit 46% der Gesamtkapazität und einer  $K_D$  für die [<sup>3</sup>H]GBC-Bindung, die mindestens das Zehnfache der maximal verwendeten Konzentration (6 nM, vgl.

3.3.2) beträgt, also  $K_D > 60$  nM. Es liegt nahe, diese Bindung als Bindung an den posthydrolytischen Zustand (D) zu betrachten. Dies bedeutet, dass im Fließgleichgewicht der MgATP-Hydrolyse der mutierte Kanal Kir6.2/SUR1(Q1178R) ~46% der Zeit im D-Zustand vorliegt mit  $K_D > 60$  nM und 54% in R und T mit einer mittleren  $K_D = 0.92$  nM (vgl. Abbildung 22). Im Vergleich zum Wildtyp stabilisiert die Substitution Q1178R offensichtlich sehr stark den posthydrolytischen (D-) Zustand. Diese Deutung steht im Einklang mit der Hypothese von Babenko (2008).

### **4.5 Auswirkung der Mutation SUR1(Q1178R) auf die Bindung von Benzothiadiazinen**

Die  $K_{ATP}$ -Kanalöffner (KCO), eine strukturell heterogene Substanzgruppe, weisen an den verschiedenen SUR-Subtypen ein charakteristisches, selektives Bindungsverhalten auf. Dabei verfügen insbesondere SUR2-haltige  $K_{ATP}$ -Kanäle über eine erhöhte Öffneraffinität. SUR1-haltige  $K_{ATP}$ -Kanäle haben mit Ausnahme des Benzothiadiazins Diazoxid für KCOs eine eher geringe Öffneraffinität, allerdings wurden in den vergangenen Jahren auf der Basis der Benzothiadiazine neue SUR1-selektive Öffner synthetisiert (Nielsen et al., 2002; Hansen, 2006). Für weitergehende Ausführungen zu KCOs siehe Kapitel 1.8.2.  $K_{ATP}$ -Kanalöffner benötigen für hochaffine Bindung und ihre hyperpolarisierende Wirkung die Anwesenheit von hydrolysierbarem ATP (Quast, 1993; Schwanstecher et al., 1992; Nielsen et al., 2002). Die KCOs stabilisieren den offenen Kanalzustand und es erscheint plausibel, dass der SUR in der posthydrolytischen Konformation die höchste Affinität für die Öffner besitzt. Da für die Durchführung von Bindungsexperimenten am SUR1 kein radioaktiv markierter KCO vom Benzothiadiazin-Typ zur Verfügung steht, wurde [ $^3$ H]GBC als Radioligand verwendet; die GBC-Bindung an SUR wird von Benzothiadiazinen durch einen allosterischen Mechanismus gehemmt (Nielsen et al., 2002; Russ et al., 2003).

In der Abwesenheit von MgATP zeigten weder Diazoxid noch NNC 55-0462 (NNC) eine signifikante Hemmung der [ $^3$ H]GBC-Bindung an den Wildtyp-

Kanal Kir6.2/SUR1(WT). In der Gegenwart von MgATP (1 mM) jedoch wurden deutliche Hemmkurven beobachtet. Diazoxid hemmte die [<sup>3</sup>H]GBC-Bindung maximal um 40 ± 4% mit  $K_i = 8.5$  (6.5; 11) μM; NNC um maximal 60 ± 4% mit  $K_i = 10$  (8; 13) nM (vgl. 3.4 und Tabelle 12). Die größere maximale Hemmung durch NNC bedeutet, dass die negative allosterische Wechselwirkung zwischen NNC und GBC stärker ist als die zwischen Diazoxid und GBC. Die Ergebnisse dieser Bindungsversuche stimmen gut mit den Ergebnissen von Nielsen et al. (2002) überein.

Im Falle des mutierten Kanals Kir6.2/SUR1(Q1178R) und in der Abwesenheit von MgATP waren Diazoxid und NNC jedoch in der Lage, bei hohen Konzentrationen die [<sup>3</sup>H]GBC-Bindung leicht zu hemmen, Diazoxid (500 μM) um 7 ± 3% und NNC (10 μM) um 15 ± 4%. Dies zeigt, dass die Mutation die Bindungstasche des SUR1 für die Benzothiadiazine auch in Abwesenheit von MgATP so verändert, dass diese Öffner leichter binden können und/oder dass sie die negativ allosterische Kopplung zwischen GBC und den Benzothiadiazinen verstärkt.

In der Gegenwart von MgATP zeigten die Hemmkurven für Diazoxid und NNC eine größere maximale Hemmung als beim Wildtyp (Diazoxid 59 ± 4%; NNC 72 ± 2%); die  $K_i$  Werte waren gegenüber dem Wildtyp unverändert. Dies deutet darauf hin, dass die Mutation die negativ allosterische Kopplung zwischen GBC und den Benzothiadiazinen verstärkt.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die Mutation SUR1(Q1178R) in der Abwesenheit von MgATP die Bindungstasche des SUR1 leicht verformt, so dass GBC etwas schlechter und die Benzothiadiazine etwas besser binden als beim Wildtyp. MgATP, zusammen mit MgADP der zentrale Regulator der Kanäle, wirkt am mutierten Kanal mit größerer Potency und Efficacy. Die in der Gegenwart von MgATP stark verschlechterte Bindung von GBC und die stark verbesserte Bindung der Benzothiadiazine an den mutierten Kanal ist mit der von Babenko (2008) aufgestellten Hypothese zu erklären, dass die Mutation SUR1(Q1178R) zu einer deutlichen Stabilisierung des posthydrolytischen Zustandes des SUR führt.

### 5. Zusammenfassung

Die ATP-empfindlichen Kaliumkanäle ( $K_{ATP}$ -Kanäle) sind schwach einwärts gleichrichtende Kaliumkanäle. Sie setzen sich aus zwei Untereinheiten mit einer 4 : 4 Stöchiometrie zusammen: Der porenbildenden Untereinheit Kir6.x und der Steueruntereinheit SURx, einem ABC-Protein. Das Hauptcharakteristikum der  $K_{ATP}$ -Kanäle ist ihre Steuerung durch Nukleotide: Intrazelluläres ATP führt zum Schließen, das ATP-Abbauprodukt ADP in der Form von MgADP hingegen zur Öffnung der Kanäle. Durch  $K_{ATP}$ -Kanäle werden der metabolische Zustand der Zelle und die elektrische Aktivität der Zellmembran miteinander verknüpft. Am besten bekannt sind die  $K_{ATP}$ -Kanäle in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas', wo sie als indirekter Glukosesensor die Kopplung der Insulinsekretion an den Blutzuckerspiegel gewährleisten. Synthetische Schließer des Kanals (z.B. Glibenclamid, Repaglinid) haben ihren Platz als orale Antidiabetika in der Therapie des Typ 2-Diabetes mellitus. Öffner (z.B. Diazoxid, Cromakalim, Minoxidilsulfat) können je nach Selektivität bei Hyperinsulinämie oder Bluthochdruck eingesetzt werden. Sowohl die Kanalschließer als auch die Öffner binden an den SUR.

Mutationen des Kanals führen oft zu Störungen der Insulinsekretion. Die hier untersuchte Mutation Kir6.2/SUR1(Q1178R), bei der im SUR1 an der Stelle 1178 die Aminosäure Glutamin gegen Arginin ausgetauscht ist, führt zu einer Überaktivität des Kanals, die beim Menschen (heterozygot) eine kongenitale Hypoinsulinämie und einen permanenten neonatalen Diabetes herbeiführt. Gegenstand dieser Arbeit war die Charakterisierung der Ligand-Bindungseigenschaften des mutierten Kanals im Vergleich zum Wildtyp. Dazu wurden beide Kanäle transient in HEK 293-Zellen exprimiert und in Membranen aus diesen Zellen wurden Radioligandenbindungsstudien mit Tritium-markiertem Glibenclamid ( $[^3H]GBC$ ) bei 37 °C durchgeführt.

In Abwesenheit von MgATP war in Sättigungsversuchen mit  $[^3H]GBC$  die Affinität von GBC für die Mutante leicht geringer als die für den Wildtyp. Die Bindungskapazität war unverändert, was darauf hindeutet, dass die Mutation die Expression des Kanals nicht beeinträchtigt. Die Hemmung der  $[^3H]GBC$ -

Bindung durch den Öffner NNC 55-0462 (NNC, ein hochaffines Diazoxid-Analog) war leicht verstärkt. Zusammengefasst deuten diese Veränderungen darauf hin, dass die Mutation Konformationsänderungen in der Bindungstasche des SUR herbeiführt.

Die Gegenwart von MgATP hemmt die Bindung von GBC und fördert die der Öffner. Die Mutation sensibilisiert den Kanal für die Hemmung durch MgATP (Linksverschiebung der Hemmkurve) und verstärkt die maximale Hemmung. In Sättigungsversuchen bei 1 mM MgATP war die [<sup>3</sup>H]GBC-Bindung an die Mutante signifikant in Affinität und Bindungskapazität verschlechtert; hingegen war die negativ allosterische Hemmung der [<sup>3</sup>H]GBC-Bindung durch Benzothiadiazine (Diazoxid und NNC) verstärkt

Im Kontext eines stark vereinfachten Dreistufenschemas der Kanalaktivität, das zwischen Ruhe-, prähydrolytischen und posthydrolytischen Zustand unterscheidet, kann jedem Zustand eine Kanalkonformation mit veränderten Bindungseigenschaften zugeordnet werden. Die Ergebnisse stehen im Einklang mit der von Babenko (2008) aufgestellten Hypothese, dass die Mutation SUR1(Q1178R) zu einer deutlichen Stabilisierung des posthydrolytischen Zustandes des SUR führt; dieser ist mit einer Kanalöffnung assoziiert. Die verstärkte Kanalaktivität führt zu einer Hyperpolarisation der  $\beta$ -Zellen und damit einer stark verminderten Insulinsekretion auch bei hohen Blutzuckerspiegeln.

## Literaturverzeichnis

### Referenzen

- Aguilar-Bryan L, Clement IV JP, Gonzalez G, Kunjilwar K, Babenko A und Bryan J (1998) Toward understanding the assembly and structure of  $K_{ATP}$  channels. *Physiol Rev* **78**:227-245.
- Ahluwalia J, Tinker A, Clapp LH, Duchon MR, Abramov AY, Pope S, Nobles M und Segal AW (2004) The large-conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channel is essential for innate immunity. *Nature* **427**:853-858.
- Amann T, Schell S, Kuhner P, Winkler M, Schwanstecher M, Ruß U und Quast U (2010) Substitution of the Walker A lysine by arginine in the nucleotide-binding domains of sulphonylurea receptor SUR2B: effects on ligand binding and channel activity. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **381**:507-516.
- Ämmälä C, Moorhouse A, Gribble F, Ashfield R, Proks P, Smith PA, Sakura H, Coles B, Ashcroft SJH und Ashcroft FM (1996) Promiscuous coupling between the sulphonylurea receptor and inwardly rectifying potassium channels. *Nature* **379**:545-548.
- Antcliff JF, Haider S, Proks P, Sansom MSP und Ashcroft F (2005) Functional analysis of a structural model of the ATP-binding site of the  $K_{ATP}$  channel Kir6.2 subunit. *EMBO J* **24**:229-239.
- Ashcroft FM, Harrison DE und Ashcroft SJH (1984) Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic  $\beta$ -cells. *Nature* **312**:446-448.
- Ashcroft FM und Kakei M (1989) ATP-sensitive  $K^+$  channels in rat pancreatic  $\beta$ -cells: modulation by ATP and  $Mg^{2+}$  ions. *J Physiol* **416**:349-367.
- Ashcroft SJH und Ashcroft FM (1990) Properties and functions of ATP-sensitive K-channels. *Cell Signal* **2**:197-214.
- Ashcroft SJH (2000) The  $\beta$ -cell  $K_{ATP}$  channel. *J Membrane Biol* **176**:187-206.
- Ashcroft FM und Gribble FM (2000) New windows on the mechanism of action of  $K_{ATP}$  channel openers. *Trends Pharmacol Sci* **21**:439-445.
- Ashfield R, Gribble FM, Ashcroft SJH und Ashcroft FM (1999) Identification of the high-affinity tolbutamide site on the SUR1 subunit of the  $K_{ATP}$  channel. *Diabetes* **48**:1341-1347.

- Ashford MLJ, Sturgess NC, Trout NJ, Gardner NJ und Hales CN (1988) Adenosine-5'-triphosphate-sensitive ion channels in neonatal rat cultured central neurones. *Pflügers Arch* **412**:297-304.
- Babenko AP, Aguilar-Bryan L und Bryan J (1998) A view of SUR/K<sub>IR6.X</sub>, K<sub>ATP</sub> channels. *Annu Rev Physiol* **60**:667-687.
- Babenko AP, Gonzalez G und Bryan J (2000) Pharmacology of sulfonylurea receptors - Separate domains of the regulatory subunits of K<sub>ATP</sub> channel isoforms are required for selective interaction with K<sup>+</sup> channel openers. *J Biol Chem* **275**:717-720.
- Babenko AP und Bryan J (2003) SUR domains that associate with and gate K<sub>ATP</sub> pores define a novel gatekeeper. *J Biol Chem* **278**:41577-41580.
- Babenko AP (2005) K<sub>ATP</sub> channels "vingt ans apres": ATG to PDB to Mechanism. *J Mol Cell Cardiol* **39**:79-98.
- Babenko AP (2008) A novel ABCC8 (SUR1)-dependent mechanism of metabolism-excitation uncoupling. *J Biol Chem* **283**:8778-8782.
- Baukowitz T, Schulte U, Oliver D, Herlitze S, Krauter T, Tucker SJ, Ruppertsberg JP und Fakler B (1998) PIP<sub>2</sub> and PIP as determinants for ATP inhibition of K<sub>ATP</sub> channels. *Science* **282**:1141-1144.
- Baukowitz T und Fakler B (2000) K-ATP channels gated by intracellular nucleotides and phospholipids. *Eur J Biochem* **267**:5842-5848.
- Beech DJ, Zhang H, Nakao K und Bolton TB (1993) K channel activation by nucleotide diphosphates and its inhibition by glibenclamide in vascular smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* **110**:573-582.
- Bevington PR (1969) *Data reduction and error analysis for the physical sciences* McGraw-Hill, New York.
- 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<sub>ATP</sub> channel complex. *FASEB J* **14**:1943-1952.
- Bränström R, Leibiger IB, Leibiger B, Corkey BE, Berggren P-O und Larsson O (1998) Long chain coenzyme A esters activate the pore-forming subunit (Kir6.2) of the ATP-regulated potassium channel. *J Biol Chem* **273**:31395-31400.
- Bray KM und Quast U (1992) A specific binding site for K<sup>+</sup> channel openers in rat aorta. *J Biol Chem* **267**:11689-11692.

- Brenner R, Peréz GJ, Bonev AD, Eckman DM, Kosek JC, Wiler SW, Patterson AJ, Nelson MT und Aldrich RW (2000) Vasoregulation by the  $\beta 1$  subunit of the calcium-activated potassium channel. *Nature* **407**:870-876.
- Brown GR und Foubister AJ (1984) Receptor binding sites of hypoglycemic sulfonylureas and related [(acylamino)alkyl]benzoic acids. *J Med Chem* **27**:79-81.
- Bryan J und Aguilar-Bryan L (1999) Sulfonylurea receptors: ABC transporters that regulate ATP-sensitive  $K^+$  channels. *Biochim Biophys Acta* **1461**:285-303.
- Bryan J, Crane A, Vila-Carriles WH, Babenko AP und Aguilar-Bryan L (2005) Insulin secretagogues, sulfonylurea receptors and  $K_{ATP}$  channels. *Curr Pharm Design* **11**:2699-2716.
- Burton FL und Smith GL (1997) The effect of cromakalim on intracellular  $[Ca^{2+}]$  in isolated rat skeletal muscle during fatigue and metabolic blockade. *Exp Physiol* **82**:469-483.
- Carrasco AJ, Dzeja PP, Alekseev AE, Pucar D, Zingman LV, Abraham MR, Hodgson D, Bienengraeber M, Puceat M, Janssen E, Wieringa B und Terzic A (2001) Adenylate kinase phosphotransfer communicates cellular energetic signals to ATP-sensitive potassium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:7623-7628.
- 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. *J Pharmacol Exp Ther* **304**:1025-1032.
- 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.
- Christopoulos A (1998) Assessing the distribution of parameters in models of ligand-receptor interaction: to log or not to log. *Trends Pharmacol Sci* **19**:351-357.
- 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.
- 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. *J Biol Chem* **274**:13656-13665.

- Chutkow WA, Pu J, Wheeler MT, Wada T, Makielski JC, Burant CF und McNally EM (2002) Episodic coronary artery vasospasm and hypertension develop in the absence of Sur2  $K_{ATP}$  channels. *J Clin Invest* **110**:203-208.
- Cook DL und Hales CN (1984) Intracellular ATP directly blocks  $K^+$  channels in pancreatic B-cells. *Nature* **311**:271-273.
- Cook DL und Bryan J (1998) ATP-sensitive  $K^+$  channels come of age. *Trends Pharmacol Sci* **19**:477-478.
- Crawford RM, Budas GR, Jovanovic S, Ranki HJ, Wilson TJ, Davies AM und Jovanovic A (2002a) M-LDH serves as a sarcolemmal  $K_{ATP}$  channel subunit essential for cell protection against ischemia. *EMBO J* **21**:3936-3948.
- Crawford RM, Ranki HJ, Botting CH, Budas GR und Jovanovic A (2002b) Creatine kinase is physically associated with the cardiac ATP-sensitive  $K^+$  channel in vivo. *FASEB J* **16**:102-104.
- Dabrowski M, Ashcroft FM, Ashfield R, Lebrun P, Pirotte B, Egebjerg J, Hansen JB und Wahl P (2002) The novel diazoxide analog 3-isopropylamino-7-methoxy-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide is a selective Kir6.2/SUR1 channel opener. *Diabetes* **51**:1896-1906.
- Dabrowski M, Larsen T, Ashcroft FM, Hansen JB und Wahl P (2003) Potent and selective activation of the pancreatic beta-cell type  $K_{ATP}$  channel by two novel diazoxide analogues. *Diabetologia* **46**:1375-1382.
- de Wet H, Mikhailov MV, Fotinou C, Dreger M, Craig TJ, Vénien-Bryan C und Ashcroft FM (2007) Studies of the ATPase activity of the ABC protein SUR1. *FEBS J* **274**:3532-3544.
- Dunne MJ und Petersen OH (1986) Intracellular ADP activates  $K^+$  channels that are inhibited by ATP in an insulin-secreting cell line. *FEBS Lett* **208**:59-62.
- Dunne MJ, Cosgrove KE, Shepherd RM, Aynsley-Green A und Lindley KJ (2004) Hyperinsulinism in infancy: from basic science to clinical disease. *Physiol Rev* **84**:239-275.
- Enkvetchakul D und Nichols CG (2003) Gating mechanism of  $K_{ATP}$  channels: function fits form. *J Gen Physiol* **122**:471-480.
- Glaser B, Thornton P, Otonkoski T und Junien C (2000) Genetics of neonatal hyperinsulinism. *Archives of Disease in Childhood* **82**:F79-F86.
- 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). *Diabet Med* **18**:206-212.
- Gloyn AL, Weedon MN, Owen KR, Turner MJ, Knight BA, Hitman G, Walker M, Levy JC, Sampson M, Halford S, McCarthy MI, Hattersley AT und Frayling TM (2003) Large-scale association studies of variants in genes encoding the pancreatic  $\beta$ -cell  $K_{ATP}$  channel subunits Kir6.2 (*KCNJ11*) and SUR1 (*ABCC8*) confirm that the *KCNJ11* E23K variant is associated with type 2 diabetes. *Diabetes* **52**:568-572.
- 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, Gorman S, Aisenberg J, Ellard S, Njølstad PR, Ashcroft FM und Hattersley AT (2004) Activating mutations in the gene encoding the ATP-sensitive potassium-channel subunit Kir6.2 and permanent neonatal diabetes. *N Engl J Med* **350**:1838-1849.
- Gögelein H, Hartung J und Englert HC (1999) Molecular basis, pharmacology and physiological role of cardiac  $K_{ATP}$  channels. *Cell Physiol Biochem* **9**:227-241.
- Graham FL, Smiley J, Russell WC und Nairn R (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* **36**:59-74.
- Gribble FM, Proks P, Corkey BE und Ashcroft FM (1998) Mechanism of cloned ATP-sensitive potassium channel activation by oleoyl-CoA. *J Biol Chem* **273**:26383-26387.
- Gribble FM, Reimann F, Ashfield R und Ashcroft FM (2000) Nucleotide modulation of pinacidil stimulation of the cloned  $K_{ATP}$  channel Kir6.2/SUR2A. *Mol Pharmacol* **57**:1256-1261.
- Hambrock A, Löffler-Walz C, Kurachi Y und Quast U (1998)  $Mg^{2+}$  and ATP dependence of  $K_{ATP}$  channel modulator binding to the recombinant sulfonylurea receptor, SUR2B. *Br J Pharmacol* **125**:577-583.
- Hambrock A, Löffler-Walz C, Kloor D, Delabar U, Horio Y, Kurachi Y und Quast U (1999) ATP-sensitive  $K^+$  channel modulator binding to sulfonylurea receptors SUR2A and SUR2B: opposite effects of MgADP. *Mol Pharmacol* **55**:832-840.
- Hambrock A, Löffler-Walz C, Russ U, Lange U und Quast U (2001) Characterization of a mutant sulfonylurea receptor SUR2B with high affinity for sulfonylureas and openers: Differences in the coupling to Kir6.x subtypes. *Mol Pharmacol* **60**:190-199.

- 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, 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 receptor 1. *Am J Physiol Cell Physiol* **283**:C587-C598.
- Hansen JB (2006) Towards selective Kir6.2/SUR1 potassium channel openers, medicinal chemistry and therapeutic perspectives. *Curr Med Chem* **13**:361-376.
- Higgins CF (1995) The ABC of channel regulation. *Cell* **82**:693-696.
- Hilgemann DW und Ball R (1996) Regulation of cardiac Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> exchange and K<sub>ATP</sub> potassium channels by PIP<sub>2</sub>. *Science* **273**:956-959.
- Hille B (2001) *Ion channels of excitable membranes*, 3rd Edition, Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts.
- Huopio H, Reimann F, Ashfield R, Komulainen J, Lenko HL, Rahier J, Vauhkonen I, Kere J, Laakso M, Ashcroft F und Otonkoski T (2000) Dominantly inherited hyperinsulinism caused by a mutation in the sulphonylurea receptor type 1. *J Clin Invest* **106**:897-906.
- Inagaki N, Gono T, Clement IV JP, Namba N, Inazawa J, Gonzalez G, Aguilar-Bryan L, Seino S und Bryan J (1995a) Reconstitution of I<sub>KATP</sub>: an inward rectifier subunit plus the sulphonylurea receptor. *Science* **270**:1166-1170.
- Inagaki N, Tsuura Y, Namba N, Masuda K, Gono T, Horie M, Seino Y, Mizuta M und Seino S (1995b) Cloning and functional characterization of a novel ATP-sensitive potassium channel ubiquitously expressed in rat tissues, including pancreatic islets, pituitary, skeletal muscle, and heart. *J Biol Chem* **270**:5691-5694.
- Inagaki N, Gono T, Clement IV JP, Wang CZ, Aguilar-Bryan L, Bryan J und Seino S (1996) A family of sulphonylurea receptors determines the pharmacological properties of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *Neuron* **16**:1011-1017.
- Isomoto S, Kondo C, Yamada M, Matsumoto S, Higashiguchi O, Horio Y, Matsuzawa Y und Kurachi Y (1996) A novel sulphonylurea receptor forms with BIR (KIR6.2) a smooth muscle type ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel. *J Biol Chem* **271**:24321-24324.
- Isomoto S und Kurachi Y (1997) Function, regulation, pharmacology, and molecular structure of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in the cardiovascular system. *J Cardiovasc Electrophysiol* **8**:1431-1446.

- Larsson O, Deeney JT, Bränström R, Berggren P-O und Corkey BE (1996) Activation of the ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel by long chain acyl-CoA. A role in modulation of pancreatic  $\beta$ -cell glucose sensitivity. *J Biol Chem* **271**:10623-10626.
- Light PE, Comtois AS und Renaud JM (1994) The effect of glibenclamide on frog skeletal muscle: evidence for K<sup>+ATP</sup> channel activation during fatigue. *J Physiol* **475**:495-507.
- Liss B, Bruns R und Roeper J (1999) Alternative sulfonylurea receptor expression defines metabolic sensitivity of K-ATP channels in dopaminergic midbrain neurons. *EMBO J* **18**:833-846.
- Liu GX, Hanley PJ, Ray J und Daut J (2001) Long-chain acyl-coenzyme A esters and fatty acids directly link metabolism to K<sub>ATP</sub> channels in the heart. *Circ Res* **88**:918-924.
- Löffler-Walz C, Hambrock A und Quast U (2002) Interaction of K<sub>ATP</sub> channel modulators with sulfonylurea receptor SUR2B: implication for tetramer formation and allosteric coupling of subunits. *Mol Pharmacol* **61**:407-414.
- Lopatin AN und Nichols CG (2001) Inward rectifiers in the heart: an update on I<sub>K1</sub>. *J Mol Cell Cardiol* **33**:625-638.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL und Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**:265-275.
- Magge SN, Shyng S-L, MacMullen C, Steinkrauss L, Ganguly A, Katz LEL und Stanley CA (2004) Familial leucine-sensitive hypoglycemia of infancy due to a dominant mutation of the  $\beta$ -cell sulfonylurea receptor. *J Clin Endocrinol Metab* **89**:4450-4456.
- 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.
- Matsuo M, Tanabe K, Kioka N, Amachi T und Ueda K (2000) Different binding properties and affinities for ATP and ADP among sulfonylurea receptor subtypes, SUR1, SUR2A, and SUR2B. *J Biol Chem* **275**:28757-28763.
- Meyer M, Chudziak F, Schwanstecher C, Schwanstecher M und Panten U (1999) Structural requirements of sulphonylureas and analogues for interaction with sulphonylurea receptor subtypes. *Br J Pharmacol* **128**:27-34.
- Mikhailov MV, Campbell JD, de Wet H, Shimomura K, Zadek B, Collins RF, Sansom MSP, Ford RC und Ashcroft FM (2005) 3-D structural and functional characterization of the purified K<sub>ATP</sub> channel complex Kir6.2-SUR1. *EMBO J* **24**:4166-4175.

- Miki T, Liss B, Minami K, Shiuchi T, Saraya A, Kashima Y, Horiuchi M, Ashcroft F, Minokoshi Y, Roeper J und Seino S (2001) ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in the hypothalamus are essential for the maintenance of glucose homeostasis. *Nat Neurosci* **4**:507-512.
- Miki T, Minami K, Zhang L, Morita M, Gono T, Shiuchi T, Minokoshi Y, Renaud J-M und Seino S (2002a) ATP-sensitive potassium channels participate in glucose uptake in skeletal muscle and adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **283**:E1178-E1184.
- Miki T, Suzuki M, Shibasaki T, Uemura H, Sato T, Yamaguchi K, Koseki H, Iwanaga T, Nakaya H und Seino S (2002b) Mouse model of Prinzmetal angina by disruption of the inward rectifier Kir6.1. *Nat Med* **8**:466-472.
- Minami K, Morita M, Saraya A, Yano H, Terauchi Y, Miki T, Kuriyama T, Kadowaki T und Seino S (2003) ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel-mediated glucose uptake is independent of IRS-1/phosphatidylinositol 3-kinase signaling. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **285**:E1289-E1296.
- Moreau C, Jacquet H, Prost A-L, D'hahan N und Vivaudou M (2000) The molecular basis of the specificity of action of K<sub>ATP</sub> channel openers. *EMBO J* **19**:6644-6651.
- Moreau C, Gally F, Jacquet-Bouix H und Vivaudou M (2005) The size of a single residue of the sulfonylurea receptor dictates the effectiveness of K<sub>ATP</sub> channel openers. *Mol Pharmacol* **67**:1026-1033.
- Nichols CG und Lederer WJ (1991) Adenosine triphosphate-sensitive potassium channels in the cardiovascular system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **261**:H1675-H1686.
- Nichols CG und Lopatin AN (1997) Inward rectifier potassium channels. *Annu Rev Physiol* **59**:171-191.
- Nichols CG (2006) K<sub>ATP</sub> channels as molecular sensors of cellular metabolism. *Nature* **440**:470-476.
- Nielsen FE, Bodvarsdottir TB, Worsaae A, MacKay P, Stidsen CE, Boonen HCM, Pridal L, Arkhammar POG, Wahl P, Ynddal L, Junager F, Dragsted N, Tagmose TM, Mogensen JP, Koch A, Treppendahl SP und Hansen JB (2002) 6-Chloro-3-alkylamino-4H-thieno[3,2-e]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxide derivatives potently and selectively activate ATP sensitive potassium channels of pancreatic  $\beta$ -cells. *J Med Chem* **45**:4171-4187.
- Nielsen E-M, Hansen L, Carstensen B, Echwald SM, Drivsholm T, Glümer C, Thorsteinsson B, Borch-Johnsen K, Hansen T 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.

- Noma A (1983) ATP-regulated K<sup>+</sup> channels in cardiac muscle. *Nature* **305**:147-148.
- Ohno-Shosaku T und Yamamoto C (1992) Identification of an ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel in rat cultured cortical neurons. *Pflugers Arch* **422**:260-266.
- Patel AJ, Honoré E, Lesage F, Fink M, Romey G und Lazdunski M (1999) Inhalational anesthetics activate two-pore-domain background K<sup>+</sup> channels. *Nat Neurosci* **2**:422-426.
- Proks P, Reimann F, Green N, Gribble F und Ashcroft F (2002) Sulfonylurea stimulation of insulin secretion. *Diabetes* **51**:S368-S376.
- Proks P, Girard C und Ashcroft FM (2005) Functional effects of KCNJ11 mutations causing neonatal diabetes: enhanced activation by MgATP. *Hum Mol Genet* **14**:2717-2726.
- Quast U und Cook NS (1989a) In vitro and in vivo comparison of two K<sup>+</sup> channel openers, diazoxide and cromakalim, and their inhibition by glibenclamide. *J Pharmacol Exp Ther* **250**:261-271.
- Quast U und Cook NS (1989b) Moving together: K<sup>+</sup> channel openers and ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *Trends Pharmacol Sci* **10**:431-435.
- Quast U, Bray KM, Andres H, Manley PW, Baumlin Y und Dosogne 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. *Mol Pharmacol* **43**:474-481.
- Quast U (1993) Do the K<sup>+</sup> channel openers relax smooth muscle by opening K<sup>+</sup> channels. *Trends Pharmacol Sci* **14**:332-337.
- Quast U (1996) Effects of potassium channel activators in isolated blood vessels, in *Potassium Channels and their Modulators: From Synthesis to Clinical Experience* (Evans JM, Hamilton TC, Longman SD und Stemp G eds) pp 173-195, Taylor & Francis, London.
- 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 und Tinker A (2004) Multisite phosphorylation mechanism for protein kinase A activation of the smooth muscle ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel. *Circ Res* **94**:1359-1366.
- Rajan S, Wischmeyer E, Liu GX, Preisig-Müller R, Daut J, Karschin A und Derst C (2000) TASK-3, a novel tandem pore domain acid-sensitive K<sup>+</sup> channel. An extracellular histidine as pH sensor. *J Biol Chem* **275**:16650-16657.

- Reimann F, Proks P und Ashcroft FM (2001) Effects of mitiglinide (S 21403) on Kir6.2/SUR1, Kir6.2/SUR2A and Kir6.2/SUR2B types of ATP-sensitive potassium channel. *Br J Pharmacol* **132**:1542-1548.
- Ribalet B, John SA und Weiss JN (2000) Regulation of cloned ATP-sensitive K channels by phosphorylation, MgADP, and phosphatidylinositol bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) - A study of channel rundown and reactivation. *J Gen Physiol* **116**:391-409.
- Riedel MJ, Steckley DC und Light PE (2005) Current status of the E23K Kir6.2 polymorphism: implications for type-2 diabetes. *Hum Genet* **116**:133-145.
- Russ U, Hambrock A, Artunc F, Löffler-Walz C, Horio Y, Kurachi Y und Quast U (1999) Coexpression with the inward rectifier K<sup>+</sup> channel Kir6.1 increases the affinity of the vascular sulfonylurea receptor SUR2B for glibenclamide. *Mol Pharmacol* **56**:955-961.
- Russ U, Lange U, Löffler-Walz C, Hambrock A und Quast U (2003) Binding and effect of K<sub>ATP</sub> channel openers in the absence of Mg<sup>2+</sup>. *Br J Pharmacol* **139**:368-380.
- Sagen JV, Ræder H, Hathout E, Shehadeh N, Gudmundsson K, Bævre H, Abuelo D, Phornphutkul C, Molnes J, Bell GI, Gloyn AL, Hattersley AT, Molven A, Søvik O und Njølstad PR (2004) Permanent neonatal diabetes due to mutations in KCNJ11 encoding Kir6.2: patient characteristics and initial response to sulfonylurea therapy. *Diabetes* **53**:2713-2718.
- Sakura H, Ämmälä C, Smith PA, Gribble FM und Ashcroft FM (1995) Cloning and functional expression of the cDNA encoding a novel ATP-sensitive potassium channel subunit expressed in pancreatic β-cells, brain, heart and skeletal muscle. *FEBS 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.
- Sakura H, Trapp S, Liss B und Ashcroft FM (1999) Altered functional properties of K<sub>ATP</sub> channel conferred by a novel splice variant of SUR1. *J Physiol* **521**:337-350.
- Sausbier M, Hu H, Arntz C, Feil S, Kamm S, Adelsberger H, Sausbier U, Sailer CA, Feil R, Hofmann F, Korth M, Shipston MJ, Knaus HG, Wolfer DP, Pedroarena CM, Storm JF und Ruth P (2004) Cerebellar ataxia and Purkinje cell dysfunction caused by Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:9474-9478.

- Sausbier M, Arntz C, Bucurenciu I, Zhao H, Zhou X-B, Sausbier U, Feil S, Kamm S, Essin K, Sailer CA, Abdullah U, Krippeit-Drews P, Feil R, Hofmann F, Knaus H-G, Kenyon C, Shipston MJ, Storm JF, Neuhuber W, Korth M, Schubert R, Gollasch M und Ruth P (2005) Elevated blood pressure linked to primary hyperaldosteronism and impaired vasodilation in BK channel-deficient mice. *Circulation* **112**:60-68.
- Sausbier U, Sausbier M, Sailer CA, Arntz C, Knaus H-G, Neuhuber W und Ruth P (2006) Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels of the BK-type in the mouse brain. *Histochem Cell Biol* **125**:725-741.
- Schmidt RF, Lang F und Thews G (2004) *Physiologie des Menschen* Springer-Verlag GmbH,
- 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 the same mechanism. *J Physiol* **552**:357-367.
- Schwanstecher M, Behrends S, Brandt C und Panten U (1992) The binding properties of the solubilized sulfonylurea receptor from a pancreatic B-cell line are modulated by the Mg<sup>++</sup>-complex of ATP. *J Pharmacol Exp Ther* **262**:495-502.
- Schwanstecher M, Löser S, Brandt Ch, Scheffer K, Rosenberger F und Panten U (1992) Adenine nucleotide-induced inhibition of binding of sulphonylureas to their receptor in pancreatic islets. *Br J Pharmacol* **105**:531-534.
- Schwanstecher M, Sieverding C, Dörschner H, Gross I, Aguilar-Bryan L, Schwanstecher C und Bryan J (1998) Potassium channel openers require ATP to bind to and act through sulfonylurea receptors. *EMBO J* **17**:5529-5535.
- Schwanstecher C und Schwanstecher M (2002a) Nucleotide sensitivity of pancreatic ATP-sensitive potassium channels and type 2 diabetes. *Diabetes* **51**:S358-S362.
- Schwanstecher C, Meyer U und Schwanstecher M (2002b) K<sub>IR6.2</sub> polymorphism predisposes to type 2 diabetes by inducing overactivity of pancreatic  $\beta$ -cell ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *Diabetes* **51**:875-879.
- Schwanstecher C, Neugebauer B, Schulz M und Schwanstecher M (2002c) The common single nucleotide polymorphism E23K in K<sub>IR6.2</sub> sensitizes pancreatic  $\beta$ -cell ATP-sensitive potassium channels toward activation through nucleoside diphosphates. *Diabetes* **51**:S363-S367.
- Seino S (1999) ATP-sensitive potassium channels: A model of heteromultimeric potassium channel/receptor assemblies. *Annu Rev Physiol* **61**:337-362.

- Seino S (2003) Physiology and pathophysiology of  $K_{ATP}$  channels in the pancreas and cardiovascular system. A review. *J Diabetes Complications* **17**:2-5.
- Seino S und Miki T (2003) Physiological and pathophysiological roles of ATP-sensitive  $K^+$  channels. *Prog Biophys Mol Biol* **81**:133-176.
- Shyng S-L, Ferrigni T, Shepard JB, Nestorowicz A, Glaser B, Permutt MA und Nichols CG (1998) Functional analyses of novel mutations in the sulfonylurea receptor 1 associated with persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Diabetes* **47**:1145-1151.
- Sirois JE, Lei Q, Talley EM, Lynch C, III und Bayliss DA (2000) The TASK-1 two-pore domain  $K^+$  channel is a molecular substrate for neuronal effects of inhalation anesthetics. *J Neurosci* **20**:6347-6354.
- Spruce AE, Standen NB und Stanfield PR (1985) Voltage-dependent ATP-sensitive potassium channels of skeletal muscle membrane. *Nature* **316**:736-738.
- 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. *N Engl J Med* **338**:1352-1357.
- Stephan D, Winkler M, Kühner P, Russ U und Quast U (2006) Selectivity of repaglinide and glibenclamide for the pancreatic over the cardiovascular  $K_{ATP}$  channels. *Diabetologia* **49**:2039-2048.
- Storm JF (1990) Potassium currents in hippocampal pyramidal cells. *Prog Brain Res* **83**:161-187.
- Tanabe K, Tucker SJ, Ashcroft FM, Proks P, Kioka N, Amachi T und Ueda K (2000) Direct photoaffinity labeling of Kir6.2 by [ $\gamma$ - $^{32}P$ ]ATP-[ $\gamma$ ]4-azidoanilide. *Biochem Biophys Res Commun* **272**:316-319.
- Taschenberger G, Mougey A, Shen S, Lester LB, LaFranchi S und Shyng SL (2002) Identification of a familial hyperinsulinism-causing mutation in the sulfonylurea receptor 1 that prevents normal trafficking and function of  $K_{ATP}$  channels. *J Biol Chem* **277**:17139-17146.
- Thomas PM, Cote GJ, Wohlk N, Haddad B, Matthew PM, Rabl W, Aguilar-Bryan L, Gagel RF und Bryan J (1995) Mutations in the sulphonylurea receptor gene in familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Science* **268**:426-429.
- Trube G und Hescheler J (1984) Inward-rectifying channels in isolated patches of the heart cell membrane: ATP-dependence and comparison with cell-attached patches. *Pflügers Arch* **401**:178-184.

- 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.
- Ueda K, Inagaki N und Seino S (1997) MgADP antagonism to Mg<sup>2+</sup>-independent ATP binding of the sulphonylurea receptor SUR1. *J Biol Chem* **272**:22983-22986.
- Ueda K, Komine J, Matsuo M, Seino S und Amachi T (1999) Cooperative binding of ATP and MgADP in the sulphonylurea receptor is modulated by glibenclamide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:1268-1272.
- Uhde I, Toman A, Gross I, Schwanstecher C und Schwanstecher M (1999) Identification of the potassium channel opener site on sulphonylurea receptors. *J Biol Chem* **274**:28079-28082.
- 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 a large cohort of French patients. *Diabetes* **53**:2719-2722.
- Vila-Carriles WH, Zhao G und Bryan J (2007) Defining a binding pocket for sulphonylureas in ATP-sensitive potassium channels. *FASEB J* **21**:18-25.
- Vivaudou M und Forestier C (1995) Modification by protons of frog skeletal muscle K<sub>ATP</sub> channels: effects on ion conduction and nucleotide inhibition. *J Physiol* **486**:629-645.
- Walker JE, Saraste M, Runswick MJ und Gay NJ (1982) Distantly related sequences in the  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J* **1**:945-951.
- Wellman GC, Quayle JM und Standen NB (1998) ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel activation by calcitonin gene-related peptide and protein kinase A in pig coronary arterial smooth muscle. *J Physiol* **507**:117-129.
- Winkler M, Stephan D, Bieger S, Kühner P, Wolff F und Quast U (2007) Testing the bipartite model of the sulphonylurea receptor binding site: binding of A-, B-, and A+B-site ligands. *J Pharmacol Exp Ther* **322**:701-708.
- Yamada M, Isomoto S, Matsumoto S, Kondo C, Shindo T, Horio Y und Kurachi Y (1997) Sulphonylurea receptor 2B and Kir6.1 form a sulphonylurea-sensitive but ATP-insensitive K<sup>+</sup> channel. *J Physiol* **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. *J Clin Endocrinol Metab* **90**:3174-3178.

- Zawar C, Plant TD, Schirra C, Konnerth A und Neumcke B (1999) Cell-type specific expression of ATP-sensitive potassium channels in the rat hippocampus. *Journal of Physiology-London* **514**:327-341.
- Zerangue N, Schwappach B, Jan YN und 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-Terzic C, Gumina RJ, Pucar D, Bienengraeber M, Dzeja PP, Miki T, Seino S, Alekseev AE und Terzic A (2002) Kir6.2 is required for adaptation to stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:13278-13283.

## Danksagung

Diese Dissertation wurde am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Tübingen unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. phil. nat. Ulrich Quast angefertigt. Nach Fertigstellung dieser Arbeit möchte ich die Gelegenheit nutzen und mich bei all jenen bedanken, die diese Arbeit möglich gemacht oder mich dabei unterstützt haben.

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Tübingen für die Hilfsbereitschaft und Freundlichkeit, die ich während meiner Arbeit erlebt habe.

Weiterhin gilt mein besonderer Dank meinem Doktorvater Prof. Dr. phil. nat. Quast für die stete Unterstützung, Hilfsbereitschaft, Geduld und Mühe, die er mir und unserem gemeinsamen Projekt jederzeit gewidmet hat.

Darüber hinaus danke ich den Mitarbeitern der Abteilung Molekularpharmakologie des Institutes, namentlich Frau Petra Kühner, Herrn PD Dr. Ulrich Russ, Frau Elke Schenk und Herrn Dr. Marcus Winkler, die mir in jedem Bereich der täglichen Laborarbeit mit Rat, Tat, Witz und Verstand zur Seite standen und maßgeblich zum Gelingen dieses Projektes beitrugen.

Danken möchte ich auch meinen Zweitkorrektoren Frau Anne Schuster und Herrn Dr. med. Christopher Schmelter für ihre Mühe und Geduld bei der Korrektur dieser Arbeit.

Schließlich möchte ich mich bei meinen Eltern, Schwiegereltern und Geschwistern für ihre Geduld und fortwährende Unterstützung bedanken. Ein besonderer Dank gilt meiner geliebten Frau Andrea, die mich während der gesamten Zeit der Labor- und Schreiarbeit unterstützte, motivierte und mir Muse war.

Diese Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) finanziert.

Dresden im Dezember 2010

Benjamin Johannes Rüdiger

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

---

Name	Benjamin Johannes Rüdiger, geb. Schuster
Geburtsdatum	5. März 1986
Geburtsort	Dresden

### Akademische Ausbildung

---

20.10.2011	Mündlich-praktischer Teil des Zweiten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung (Note: Gut)
06.10.2011	Schriftlicher Teil des Zweiten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung (Note: Gut)
09/2010	Beginn des Praktischen Jahres, mit Aufhalten an der Université catholique de Louvain/ Belgien, Kings und University College London/ UK, Ruit/ Ostfildern
08/2009-03/2010	Auslandsstudium an der University of Stellenbosch/ Südafrika
03/2008	Beginn der Dissertation am Institut für Pharmakologie und Toxikologie Tübingen bei Herrn Prof. Dr. Quast
08/2007	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: Gut)
Seit 10/2006	Studium der Humanmedizin an der Universität Tübingen
10/2005–09/2006	Studium der Humanmedizin an der TU Dresden

### Schulbildung

---

07/2004	Allgemeine Hochschulreife am Gymnasium Coswig (Note: Sehr Gut)
---------	--

## Lebenslauf

---

### Stipendien

---

2010	ERASMUS-Stipendium für Praktisches Jahr an der UCL/ Belgien
Seit 2008	Vollstipendium der Konrad-Adenauer-Stiftung

