

Bindung und Wirkung von Modulatoren der ATP-empfindlichen Kaliumkanäle

Dissertation

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2007

vorgelegt von

Damian Makary Stephan

| | |
|-------------------------|-----------------------|
| Tag der mündl. Prüfung: | 30.03.2007 |
| Dekan: | Prof. Dr. L. Wesemann |
| 1. Berichterstatter: | Prof. Dr. U. Quast |
| 2. Berichterstatter: | Prof. Dr. P. Ruth |

Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Ulrich Quast am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Eberhard Karls Universität Tübingen dank der finanziellen Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft erstellt.

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, ohne die es mir unmöglich gewesen wäre, die Arbeit erfolgreich zu vollenden.

Allen voran gilt der Dank meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Ulrich Quast für die Vergabe des interessanten und fruchtbaren Promotionsthemas, die fachliche und zielgerichtete Betreuung sowie sein menschliches Engagement.

Ferner sei Herrn Prof. Dr. Peter Ruth recht herzlich für die Vertretung meiner Arbeit in der Fakultät für Chemie und Pharmazie, Erstellung des Zweitgutachtens und die wertvollen Anregungen während der Institutskolloquien mein Dank ausgesprochen.

Ein ganz besonderes Dankeschön gilt Herrn PD Dr. Ulrich Ruß. Die kompetente Einführung in die hohe Kunst des "Patchens", stetige Diskussionsbereitschaft und Hilfe bei Computerproblemen aller Art waren fürs Gelingen meiner wissenschaftlichen Anstrengungen unverzichtbar.

Herrn Dr. Ulf Lange und Herrn Dr. Jochen Lichtenberg, den Mitkämpfern der ersten Stunde, danke ich für die aus den Höhen und Tiefen des Laboralltags gewachsene Freundschaft. Es freut mich, dass wir nun alle auf eine erfolgreiche Zusammenarbeit zurückblicken können.

Ich möchte Herrn Marcus Winkler für die kreativen Diskussionen, das aufmerksame Korrekturlesen und die zusammen unternommenen Freizeitaktivitäten danken. Seinen einzigartigen Humor werde ich immer schätzen.

Frau Petra Kühner danke ich für ihre uneingeschränkte Hilfsbereitschaft und die freundschaftliche moralische Unterstützung. Von Ihrer großen Laborerfahrung habe ich sehr profitiert.

Frau Cornelia Löffler-Walz, Frau Dr. Eva Stauß und Herrn Dr. Alexander Klein bin ich für die Einweisung in die Praxis der Radioligandbindungsstudien zum Dank verpflichtet.

Allen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Prof. Quast, Alexander Stehle, Marc Chmielnicki, Felix Wolf, Susanne Bieger, Anke Leichtle, Frau Elke Schenk danke ich für ihren Beitrag zur produktiven und angenehm humorvollen Arbeitsatmosphäre.

Bei allen weiteren Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der Uni Tübingen, insbesondere bei Frau Dr. Annette Hambrock, Frau PD Dr. Doris Kloor, Frau Dr. Ursula Delabar und Frau Dr. Almut Grenz bedanke ich mich ebenfalls für die gute Zusammenarbeit.

Ein weiterer Dank richtet sich an die Kooperationspartner unserer Arbeitsgruppe; an Herrn Prof. Dr. Horst Lemoine und Herrn Prof. Dr. Horst Weber für die Überlassung der Bimakalimsulfonsäure, sowie an Herrn Prof Dr. Joseph Bryan für die Überlassung der Kir6.2-N-Terminus-Mutanten.

Meinen Eltern danke ich herzlich für ihre fortwährende Unterstützung, meiner Frau Marcella Cagnetta und meinen Töchtern Luisa, Olivia und Valentina für ihre Ausdauer, Geduld und Liebe, für mich die größte Motivation.

Für meine Familie

I Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------------|--|-----------|
| I | Inhaltsverzeichnis. | I |
| II | Abkürzungsverzeichnis. | X |
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Kaliumkanäle | 1 |
| 1.1.1 | Spannungsabhängige Kaliumkanäle | 2 |
| 1.1.2 | Ca²⁺-aktivierte Kaliumkanäle | 3 |
| 1.1.3 | Tandem-Kaliumkanäle | 4 |
| 1.1.4 | Einwärtsgleichrichtende Kaliumkanäle | 4 |
| 1.2 | ATP empfindliche Kaliumkanäle | 5 |
| 1.2.1 | Elektrisches Verhalten, Aufbau und Oberflächenexpression von K_{ATP}-Kanälen | 6 |
| 1.2.2 | Kir6.x: die -Untereinheit der K_{ATP}-Kanäle | 8 |
| 1.2.3 | Der Sulfonylharnstoffrezeptor (SUR): die -Untereinheit der K_{ATP}-Kanäle | 9 |
| 1.2.4 | Regulierung der K_{ATP}-Kanäle | 11 |
| 1.2.4.1 | Regulierung der K_{ATP}-Kanäle durch Nukleotide | 11 |
| 1.2.4.2 | Regulierung der K_{ATP}-Kanäle durch Lipide | 14 |
| 1.2.4.3 | Regulierung der K_{ATP}-Kanäle durch Phosphorylierung und andere Mechanismen | 16 |
| 1.2.5 | Gewebsspezifische Expression und Kombination der K_{ATP}- Kanaluntereinheiten | 16 |
| 1.2.6 | Physiologische und pathophysiologische Rolle der K_{ATP}-Kanäle | 17 |
| 1.2.7 | K_{ATP}-Kanalopathien | 20 |
| 1.2.7.1 | Kongenitaler Hyperinsulinismus im Kindesalter (HI) | 20 |
| 1.2.7.2 | Permanenter Neonataler Diabetes (PNDM) | 21 |
| 1.2.7.3 | Diabetes Mellitus Typ 2 (NIDDM) | 22 |
| 1.2.8 | Pharmakologie der K_{ATP}-Kanäle | 23 |
| 1.2.8.1 | K_{ATP}-Kanal-Inhibitoren: Sulfonylharnstoffe und Glinide | 23 |
| 1.2.8.2 | K_{ATP}-Kanal-Öffner | 29 |
| 1.2.9 | Fragestellungen der Arbeit | 34 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 1.2.9.1 | Selektivität von Sulfonylharnstoffen und Gliniden in Bindung und Wirkung für die drei wichtigsten K_{ATP}-Kanalsubtypen Kir6.2/SUR1 (Pankreas), Kir6.2/SUR2A (Herz) und Kir6.1/SUR2B (Gefäßmuskel) . | 34 |
| 1.2.9.2 | Einfluss der Koexpression mit Kir6.x auf die Bindung von Sulfonylharnstoffen und Gliniden an SUR1 | 35 |
| 1.2.9.3 | Einfluss der Mutation Y1206S auf den Sulfonylharnstoffrezeptor SUR2A und den K_{ATP}-Kanal Kir6.2/SUR2A | 36 |
| 1.2.9.4 | Der Zugang der K_{ATP}-Kanal-Öffner vom Benzopyran-Typ an ihre Bindungsstelle: Vergleich der Bindungs- und Wirkungseigenschaften von Bimakalim-sulfonsäure (BMSA) und Bimakalim am Kir6.2/SUR2B . . | 38 |
| 2 | Material und Methoden | 39 |
| 2.1 | Material | 39 |
| 2.1.1 | Chemikalien | 39 |
| 2.1.2 | Synthetische K_{ATP}-Kanal-Modulatoren | 40 |
| 2.1.2.1 | K_{ATP}-Kanal-Blocker: Sulfonylharnstoffe und Glinide | 40 |
| 2.1.2.2 | K_{ATP}-Kanal-Öffner | 41 |
| 2.1.2.3 | Radioliganden | 41 |
| 2.1.3 | Geräte | 41 |
| 2.1.3.1 | Geräte für Zellkultur und Radioligandbindung | 41 |
| 2.1.3.2 | Geräte für Elektrophysiologie | 42 |
| 2.1.4 | Puffer und Medien | 43 |
| 2.1.4.1 | Puffer und Medien für die HEK293-Zellkultur und Radioligandbindungsstudien | 43 |
| 2.1.4.1.1 | Hypotoner Lysepuffer | 43 |
| 2.1.4.1.2 | Isotoner Inkubationspuffer für Radioligandbindungsstudien an Membranen . . . | 43 |
| 2.1.4.1.3 | Inkubationspuffer für Radioligandbindungsstudien an ganzen Zellen | 44 |

| | | |
|-------------|--|-----------|
| 2.1.4.1.4 | Modifizierter Inkubationspuffer für Radioligandbindungsstudien an ganzen Zellen .. | 44 |
| 2.1.4.1.5 | Waschpuffer | 45 |
| 2.1.4.1.6 | Standard-Kulturmedium (SKM) für die HEK293- Zelllinie | 45 |
| 2.1.4.1.7 | Gefriermedium | 46 |
| 2.1.4.1.8 | Stammlösungen für die Proteinbestimmung nach Lowry | 46 |
| 2.1.4.2 | Medien zur Kultivierung von Bakterien | 47 |
| 2.1.4.2.1 | Luria Bertani Medium (LB-Medium); Angaben für 100 ml Medium | 47 |
| 2.1.4.2.2 | Medium zur Lagerung der transformierten Bakterien | 47 |
| 2.1.4.3 | Lösungen für elektrophysiologische Experimente | 47 |
| 2.1.4.3.1 | Badlösungen | 47 |
| 2.1.4.3.1.1 | Na⁺-HEPES-Badlösung | 47 |
| 2.1.4.3.1.2 | K⁺-HEPES-Badlösung | 48 |
| 2.1.4.3.2 | Pipettenlösung für Ganzzell-Experimente | 48 |
| 2.1.4.3.3 | Perfusionslösung für Inside-out-Experimente | 49 |
| 2.1.4.3.4 | Lösung für die Agarbrücke | 49 |
| 2.2 | Methoden | 50 |
| 2.2.1 | Methoden der Zellkultur | 50 |
| 2.2.1.1 | Kultivierung von HEK293-Zellen | 50 |
| 2.2.1.1.1 | Einsatz von Selektions-Antibiotika bei der Kultivierung permanent transfizierter HEK293- Zellen | 51 |
| 2.2.1.2 | Einfrieren von HEK293-Zellen | 52 |
| 2.2.1.3 | Auftauen von HEK293-Zellen | 52 |
| 2.2.1.4 | Transiente Transfektion von HEK293-Zellen | 53 |
| 2.2.1.4.1 | Verwendete Plasmide | 53 |
| 2.2.1.4.2 | Transiente Transfektion mittels LipofectaminTM- Methode | 54 |

| | | |
|-------------|---|----|
| 2.2.1.4.3 | Transiente Transfektion mittels Lipofectamin2000™- Methode | 54 |
| 2.2.1.4.4 | Anwendung von GFP | 55 |
| 2.2.1.5 | Herstellung einer mikrosomalen Membranfraktion aus HEK293-Zellen | 56 |
| 2.2.1.6 | Proteinbestimmung der Membranfraktion nach Lowry .. | 56 |
| 2.2.2 | Radioligandbindungsstudien | 58 |
| 2.2.2.1 | Auswahl des Radioliganden | 59 |
| 2.2.2.2 | Durchführung von Radioligandbindungsstudien | 61 |
| 2.2.2.2.1 | Gewinnung des Rezeptormaterials | 61 |
| 2.2.2.2.2 | Inkubation | 61 |
| 2.2.2.2.3 | Trennung von gebundenem und freiem Radioliganden | 63 |
| 2.2.2.2.4 | Messung der Radioaktivität | 63 |
| 2.2.2.3 | Modell der Rezeptorbindungsstudien | 64 |
| 2.2.2.3.1 | Sättigungsexperiment | 66 |
| 2.2.2.3.2 | Kompetitionsexperiment | 67 |
| 2.2.2.3.3 | Verallgemeinerung der Bindungsisotherme nach Hill | 69 |
| 2.2.3 | Elektrophysiologische Experimente | 70 |
| 2.2.3.1 | Aufbau des elektrophysiologischen Messplatzes | 72 |
| 2.2.3.1.1 | Optisches System | 72 |
| 2.2.3.1.2 | Messkammer | 72 |
| 2.2.3.1.3 | Perfusionssystem | 73 |
| 2.2.3.1.4 | Mess- und Speichersystem | 74 |
| 2.2.3.1.4.1 | Patch-Pipetten | 74 |
| 2.2.3.1.4.2 | Pipettenhalter, Elektroden, Mikromanipulator | 74 |
| 2.2.3.1.4.3 | Verstärkersystem | 75 |
| 2.2.3.2 | Experimenteller Ablauf | 76 |
| 2.2.3.2.1 | Präparation der Zellen | 76 |
| 2.2.3.2.2 | Ausführung der Patch-Clamp-Versuche | 77 |
| 2.2.3.2.2.1 | Messungen in der Cell-attached-Konfiguration | 77 |
| 2.2.3.2.2.2 | Messungen in der Ganzzell-Konfiguration | 78 |

| | | |
|-------------|---|----|
| 2.2.3.2.2.3 | Messungen in der Inside-out-Konfiguration | 79 |
| 2.2.3.3 | Vorzeichenkonvention | 79 |
| 2.3 | Datenauswertung und Statistik | 80 |
| 2.3.1 | Analyse der Wettbewerbsversuche | 80 |
| 2.3.2 | Erstellung und Analyse der Konzentrations-Wirkungs-Kurven | 81 |
| 2.3.3 | Statistik | 82 |
| 3 | Ergebnisse | 84 |
| 3.1 | Selektivität der insulinotropen Substanzen für die K_{ATP} -Kanalsubtypen | 84 |
| 3.1.1 | Bestimmung der Affinität ausgewählter Sulfonylharnstoffe und Glinide zum Kir6.2/SUR1 und Kir6.2/SUR2A in Radioligandbindungsstudien | 84 |
| 3.1.1.1 | Homologe Verdrängung der 3H -GBC Bindung an Kir6.2/SUR1 und Kir6.2/SUR2A | 85 |
| 3.1.1.2 | Verdrängung der 3H -GBC Bindung an Kir6.2/SUR2A durch Glimепирид | 88 |
| 3.1.1.3 | Verdrängung der 3H -GBC Bindung an Kir6.2/SUR1 und Kir6.2/SUR2A durch Glibornurid | 89 |
| 3.1.1.4 | Verdrängung der 3H -GBC Bindung an Kir6.2/SUR1 und Kir6.2/SUR2A durch Nateglinid | 91 |
| 3.1.1.5 | Verdrängung der 3H -GBC Bindung an Kir6.2/SUR1 und Kir6.2/SUR2A durch Repaglinid | 92 |
| 3.1.1.6 | Verdrängung der 3H -GBC Bindung an Kir6.2/SUR1 und Kir6.2/SUR2A durch (-)-AZ-DF 265 | 94 |
| 3.1.1.7 | Verdrängung der 3H -GBC Bindung an Kir6.2/SUR1 und Kir6.2/SUR2A durch Meglitinid | 95 |
| 3.1.1.8 | Verdrängung der 3H -GBC Bindung an Kir6.2/SUR1 durch UL-DF 9 | 97 |
| 3.1.2 | Wirkung von Repaglinid und Glibenclamid auf die rekombinanten K_{ATP} -Kanäle der Bauchspeicheldrüse und des kardiovaskulären Systems | 98 |
| 3.1.2.1 | Inhibition des Kir6.2/SUR1 durch Repaglinid und Glibenclamid | 99 |

| | | |
|-----------|--|-----|
| 3.1.2.1.1 | Inhibition des Kir6.2/SUR1 durch Repaglinid und Glibenclamid in der Ganzzellkonfiguration | 99 |
| 3.1.2.1.2 | Inhibition des Kir6.2/SUR1 durch Repaglinid und Glibenclamid in der Inside-out-Konfiguration | 100 |
| 3.1.2.2 | Inhibition des Kir6.2/SUR2A durch Repaglinid und Glibenclamid in der Ganzzellkonfiguration | 102 |
| 3.1.2.3 | Inhibition des Kir6.1/SUR2B durch Repaglinid und Glibenclamid in der Ganzzellkonfiguration | 105 |
| 3.2 | Einfluss der Koexpression mit Kir6.x auf die Bindung von Sulfonylharnstoffen und Gliniden an SUR1 | 107 |
| 3.2.1 | Bestimmung der Affinität von Glibenclamid, Repaglinid und (-)-AZ-DF 265 zum SUR1 nach Koexpression mit Kir6.2 Mutanten bzw. Kir6.1 in Radioligandbindungsstudien an ganzen Zellen | 107 |
| 3.2.1.1 | Bestimmung des molaren Kir/SUR-Plasmidverhältnisses, das zur vollständigen Kanalkomplexbildung notwendig ist | 107 |
| 3.2.1.2 | Homologe Verdrängung der ³ H-GBC-Bindung an Kir6.x/SUR1-Zellen | 109 |
| 3.2.1.3 | Verdrängung der ³ H-GBC-Bindung an Kir6.x/SUR1- Zellen durch Repaglinid | 111 |
| 3.2.1.4 | Verdrängung der ³ H-GBC-Bindung an Kir6.x/SUR1- Zellen durch (-)-AZ-DF 265 | 113 |
| 3.2.2 | Bestimmung der Affinität von Glibenclamid und Repaglinid zum SUR1 alleine und nach Koexpression mit Kir6.2 bzw. Kir6.2- Mutanten in Radioligand-bindungsstudien an Membranen in Abwesenheit von MgATP | 115 |
| 3.2.2.1 | Sättigung der ³ H-GBC-Bindung an SUR1, Kir6.2/SUR1, Kir6.2 N5/SUR1 und Kir6.2(RK,4,5,AA)/SUR1 in HEK293-Zellmembranen in Abwesenheit von MgATP | 115 |

| | | |
|---------|---|-----|
| 3.2.2.2 | Verdrängung der ³ H-GBC-Bindung an SUR1, Kir6.2/SUR1, Kir6.2 N5/SUR1 und Kir6.2(RK,4,5,AA)/SUR1 durch Repaglinid in HEK293-Zellmembranen in Abwesenheit von MgATP .. | 116 |
| 3.3 | Einfluss der Mutation Y1206S auf den Sulfonylharnstoffrezeptor SUR2A und den K _{ATP} -Kanal Kir6.2/SUR2A | 119 |
| 3.3.1 | Glibenclamid-Bindung an SUR2A und SUR2A(Y1206S) alleine bzw. nach Koexpression mit Kir6.x | 119 |
| 3.3.1.1 | Homologe Verdrängung der ³ H-GBC-Bindung an SUR2A in HEK-Zellmembranen in Abwesenheit von MgATP ... | 119 |
| 3.3.1.2 | Homologe Verdrängung der ³ H-GBC-Bindung an Kir6.2/SUR2A in HEK-Zellmembranen in Abwesenheit von MgATP | 121 |
| 3.3.1.3 | Sättigung der ³ H-GBC-Bindung an Kir6.2/SUR2A(Y1206S) und Kir6.1/SUR2A(Y1206S) in Ganzzellversuchen | 122 |
| 3.3.1.4 | Sättigung der ³ H-GBC-Bindung an Kir6.2/SUR2A(Y1206S) in HEK293-Zellmembranen, bei 23 °C in Abwesenheit von MgATP | 123 |
| 3.3.2 | P1075-Bindung an SUR2A und SUR2A(Y1206S) alleine bzw. nach Koexpression mit Kir6.2. Ergebnisse aus Membranexperimenten in Anwesenheit von MgATP bei 37 °C | 124 |
| 3.3.3 | Allosterische Wechselwirkungen zwischen Glibenclamid und P1075 | 127 |
| 3.3.3.1 | Verdrängung der ³ H-GBC-Bindung durch P1075 an SUR2A-Membranen in Abwesenheit von MgATP | 127 |
| 3.3.3.2 | Verdrängung der ³ H-GBC-Bindung an Kir6.2/SUR2A(Y1206S) durch P1075 in Membranen und in Anwesenheit von 1 mM MgATP | 129 |
| 3.3.3.3 | Verdrängung der ³ H-P1075-Bindung an Kir6.2/SUR2A(Y1206S) durch Glibenclamid in Membranen in Anwesenheit von 1 mM MgATP | 130 |

| | | |
|---------|---|-----|
| 3.3.4 | Einfluss der Y1206S-Mutation von SUR2A auf die Affinität von Glimpirid und Meglitinid zum Kir6.2/SUR2A(Y1206S)-Kanal in intakten Zellen | 132 |
| 3.3.4.1 | Verdrängung der ³H-GBC-Bindung an Kir6.2/SUR2A(Y1206S) durch Glimpirid | 132 |
| 3.3.4.2 | Verdrängung der ³H-GBC-Bindung an Kir6.2/SUR2A(Y1206S) durch Meglitinid | 133 |
| 3.4 | Der Zugangsweg der K_{ATP}-Kanal-Öffner vom Benzopyran-Typ an ihre Bindungsstelle: Charakterisierung der Bindungs- und Wirkungseigenschaften von Bimakalimsulfonsäure (BMSA) und Bimakalim | 135 |
| 3.4.1 | Bindungseigenschaften von BMSA und Bimakalim an Kir6.2/SUR2B in Membranen | 135 |
| 3.4.2 | Verdrängung der ³H-P1075 Bindung an Kir6.2/SUR2B in intakten HEK-Zellen durch BMSA und Bimakalim; Abhängigkeit von der Inkubationszeit | 136 |
| 3.4.3 | Hemmung der ³H-P1075-Bindung an SUR2B (exprimiert ohne Kir6.2) durch BMSA und Bimakalim in Ganzzellversuchen | 139 |
| 3.4.4 | BMSA und Bimakalim als K_{ATP}-Kanal Öffner | 141 |
| 3.4.4.1 | Wirkung von BMSA und Bimakalim auf den Kir6.2/SUR2B-Kanal in der inside-out-Konfiguration .. | 142 |
| 3.4.4.2 | Wirkung von BMSA und Bimakalim auf den Kir6.2/SUR2B-Kanal in der Ganzzell-Konfiguration | 144 |
| 3.4.4.3 | Wirkung von Bimakalim auf den Kir6.2/SUR2B-Kanal in der Cell-attached-Konfiguration | 145 |
| 4 | Diskussion | 147 |
| 4.1 | Selektivität der insulinotropen Substanzen für die K_{ATP}-Kanalsubtypen .. | 147 |
| 4.1.1 | Vergleich der Affinität der Sulfonylharnstoffe und Glinide zu Kir6.2/SUR1 (Pankreas) und Kir6.2/SUR2A (Myokard) | 149 |

| | | |
|---------|--|-----|
| 4.1.2 | Vergleich der Wirkung von Repaglinid und Glibenclamid an Kir6.2/SUR1 (Pankreas), Kir6.2/SUR2A (Myokard) und Kir6.1/SUR2B(Gefäßmuskel) | 152 |
| 4.1.2.1 | Wirkung von Repaglinid und Glibenclamid am pankreatischen K_{ATP} -Kanal (Kir6.2/SUR1) | 152 |
| 4.1.2.2 | Wirkung von Repaglinid und Glibenclamid am K_{ATP} -Kanal des Herzmuskels (Kir6.2/SUR2A) | 153 |
| 4.1.2.3 | Wirkung von Repaglinid und Glibenclamid am K_{ATP} -Kanal der Gefäßmuskulatur (Kir6.1/SUR2B) | 154 |
| 4.1.3 | Vergleich der Bindung mit der Wirkung von Repaglinid und Glibenclamid an Kir6.2/SUR1 (Pankreas), Kir6.2/SUR2A (Myokard) und Kir6.1/SUR2B (Gefäßmuskel) | 155 |
| 4.1.4 | Bedeutung der Selektivitätsdaten für den klinischen Einsatz von Repaglinid und Glibenclamid | 156 |
| 4.2 | Einfluss der Koexpression mit Kir6.x und dessen N-Terminus-Mutanten auf die K_{ATP} -Kanal-Inhibitor-Bindung an SUR | 157 |
| 4.2.1 | Koexpression mit Kir6.2 und Kir6. | 158 |
| 4.2.2 | Bedeutung des N-Terminus von Kir6.2 für die Bindung der SU und Glinide an den Kir6.2/SUR1-Kanal | 159 |
| 4.3 | Einfluss der Mutation Y1206S auf die Ligandbindungseigenschaften des Sulfonylharnstoffrezeptors SUR2A und des K_{ATP} -Kanals Kir6.2/SUR2A | 162 |
| 4.3.1 | Bindungseigenschaften von SUR2A und Kir6.2/SUR2A; Auswirkungen der Y1206S-Mutation am SUR2A | 162 |
| 4.3.2 | Effekt der Koexpression mit Kir6.x auf die Bindungseigenschaften des SUR2A und SUR2A(Y1206S) | 165 |
| 4.3.3 | Allosterische Wechselwirkungen zwischen Glibenclamid und P1075 | 167 |
| 4.3.4 | Glibenclamid-Bindung und K_{ATP} -Kanal-Inhibition | 169 |
| 4.4 | Zugang zur Bindungsregion der K_{ATP} -Kanal-Öffner vom Benzopyrantyp . | 170 |
| 5 | Zusammenfassung | 175 |
| 6 | Literaturverzeichnis | 178 |

II Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------|---|
| a | Amplitude |
| Abb. | Abbildung |
| ABC | ATP-Bindungs-Kassette (ATP-binding-cassette) |
| ADP | Adenosindiphosphat (MgADP für magnesium-gebundenes ADP) |
| Aqua bidest. | bidestilliertest Wasser |
| Aqua dest. | demineralisiertes Wasser |
| AS | Aminosäure |
| ATP | Adenosintriphosphat (MgATP für magnesium-gebundenes ATP) |
| B_{MAX} | maximale Bindungskapazität |
| B_S | spezifische Bindung |
| B_{TOT} | totale Bindung |
| BM | Bimakalim |
| BMI | body mass index |
| BMSA | Bimakalimsulfonsäure |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| C_{MAX} | maximale Wirkstoffkonzentration im Plasma |
| cDNA | copy DNA = DNA-Kopie eines RNA-Stücks erhalten mit Hilfe einer Reversen Transkriptase |
| C-Terminus | Carboxy-Terminus eines Proteins |
| CFTR | Cystic Fibrosis Transmembran Regulator |
| CL | zytosolische Schleife |
| DAG | Diacylglycerol |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| dpm | Zerfälle pro Minute (decays per minute) |
| E_K | Gleichgewichtspotential für K^+ |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| EGTA | Ethylenglycol-bis (2-Aminoethylether)-N,N,N',N',-tetraacetat |
| GBC | Glibenclamid |
| GCK | Glucokinase |
| GDP | Guanosindiphosphat (MgGDP für magnesium-gebundenes GDP) |

| | |
|---------------|--|
| GDH | Glutamat-Dehydrogenase |
| GFP | Green Fluorescence Protein |
| GLIB | Glibornurid |
| GLIC | Gliclazid |
| GLIM | Glimepirid |
| GLIQ | Gliquidon |
| i/o | Inside-out-Konfiguration der Saugelektrodenteknik |
| $I_{K_{ATP}}$ | Strom durch den K_{ATP} -Kanal |
| IC_{50} | Konzentration eines Liganden, welche die halbmaximale Bindung/Wirkung zeigt [M] |
| IONA | Impact Of Nicorandil in Angina (IONA)-Studie |
| IP_3 | Inositol-1,4,5-trisphosphat |
| IPC | ischämische Präkonditionierung |
| HEK293 | humane embryonale Nierenzellen (<u>H</u> uman <u>E</u> mbryonal <u>K</u> idney cells) |
| HEPES | N-(2-Hydroxyethyl) piperazin-N-(2-ethansulfonsäure) |
| HI | kongenitaler Hyperinsulinismus im Kindesalter |
| HWZ | Halbwertszeit |
| K_{2P} | Tandem-Kaliumkanal |
| K_{ATP} | ATP-empfindlicher Kaliumkanal |
| K_{ca} | Ca^{2+} aktivierter Kaliumkanal |
| K_D, K_i | Gleichgewichts- dissoziationskonstante, Gleichgewichts- Inhibitions- konstante |
| K_{ir} | einwärts gleichrichtender Kaliumkanal (inward rectifying K^+ -channel) |
| K_v | spannungsabhängiger Kaliumkanal (voltage dependent K^+ -channel) |
| k_{app} | scheinbare Diffusionsgeschwindigkeitskonstante |
| k_{off} | Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante |
| k_{on} | Assoziationsgeschwindigkeitskonstante |
| Kap. | Kapitel |
| kb | kilo-Basen |
| KCO | K_{ATP} -Kanal-Öffner |
| L_0^* | Konzentration des Radioliganden im Inkubationansatz |
| L_{frei} | Konzentration des freien (= ungebundenen) Liganden |
| LB-Medium | Luria Bertani Medium |

| | |
|------------------|---|
| LC-Acyl-CoA | langkettiger Acyl-Coenzym A Ester |
| MEG | Meglitinid |
| MEM | Minimal Essential Medium |
| n | Anzahl der Einzelversuche |
| n_H | Hill-Koeffizient |
| N-Terminus | Amino-Terminus eines Proteins |
| NAT | Nateglinid |
| NBF | Nukleotid-Bindungsfalte eines ABC-Proteins |
| NIDDM | Nichtinsulinabhängiger Diabetes Mellitus (Typ 2) |
| NSB | unspezifische Bindung |
| OPA | Operationsverstärker |
| P_O | Offenwahrscheinlichkeit eines Kanals |
| P1075 | N-Cyano-N'-(1,1-Dimethylpropyl)-N''-3-pyridylguanidin |
| PHHI | Persistierende hyperinsulinämische Hypoglykämie des Kindesalters |
| PIP ₂ | (C ₄₇ H ₉₄ N ₃ O ₁₉ P ₃) L- α -Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate |
| PNDM | Permanenter Neonataler Diabetes |
| REP | Repaglinid |
| RT | Raumtemperatur (ca. 22 °C) |
| SA | spezifische Aktivität |
| SEM | standard error of the mean |
| SKM | Standard-Kulturmedium für HEK293-Zellen (Kap. 2.1.4.1.6) |
| SU | Sulfonylharnstoffe (sulfonylureas) |
| SUR | Sulfonylharnstoffrezeptor |
| $t_{1/2}$ | Eliminations-Halbwertszeit |
| Tbl. | Tablette |
| TM | Transmembranelix |
| TMD | Transmembrandomäne |
| TOK1 | Two P-region-containing Outwardly rectifying K ⁺ -channel |
| TRIS | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan |
| UDP | Uridindiphosphat (MgUDP für magnesium-gebundenes UDP) |
| UKPDS | UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group |
| wc | Ganzzellkonfiguration (whole-cell) der Saugelkrodotentechnik |
| WT | Wildtyp-Form |

1 Einleitung

1.1 Kaliumkanäle

Ionen wie z.B. Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^- können die Zellmembran nur über die in die Lipiddoppelschicht integrierten Transportproteine, z.B. Ionenkanäle passieren. Offene Kanäle erlauben einen selektiven Ionenfluss mit sehr hohen Flussraten ($> 10^9$ Ionen / s), der von dem elektrochemischen Gradienten zwischen dem Zytosol und dem Außenraum der Zelle angetrieben wird. Diese Eigenschaft verleiht den Ionenkanälen, neben deren Beitrag bei der Herstellung und Aufrechterhaltung des Membranruhepotentials, auch eine zentrale Bedeutung bei der Erregung von erregbaren Zellen wie z.B. Nerven und Muskeln sowie bei der Steuerung der Funktion endokriner Zellen (z.B. β -Zellen des Pankreas).

Die ubiquitär in Pflanzen und Tieren vorkommende sehr heterogene Gruppe der Kaliumkanäle (über 70 bekannte Typen) hat dabei eine stabilisierende Aufgabe, das Potential der Membran möglichst nahe des Gleichgewichtspotentials für Kaliumionen (E_K bei $37^\circ\text{C} = -98 \text{ mV}$) und somit weit von der Erregungsschwelle zu halten. Die Regulierung der Kaliumkanäle kann über Änderungen des Membranpotentials, Transmitter und Hormone, oder den metabolischen Zustand der Zelle erfolgen (Hille, 2001). Pharmakologische Modulation dieser Kanäle kann anti-ischämische, antiarrhythmische, antihypertensive, anti-asthmatische Wirkungen hervorrufen und auch bei der Behandlung der Blaseninkontinenz ausgenutzt werden (Lynch, Jr. et al., 1992; Katz et al., 1993; Grover, 1994; Li et al., 1995; Quast et al., 1995).

Die Architektur der porenbildenden α -Untereinheiten (Abb. 1) erlaubt eine Unterteilung der Kaliumkanäle in 4 Hauptfamilien (Salkoff und Jegla, 1995; Gutman et al., 2003)

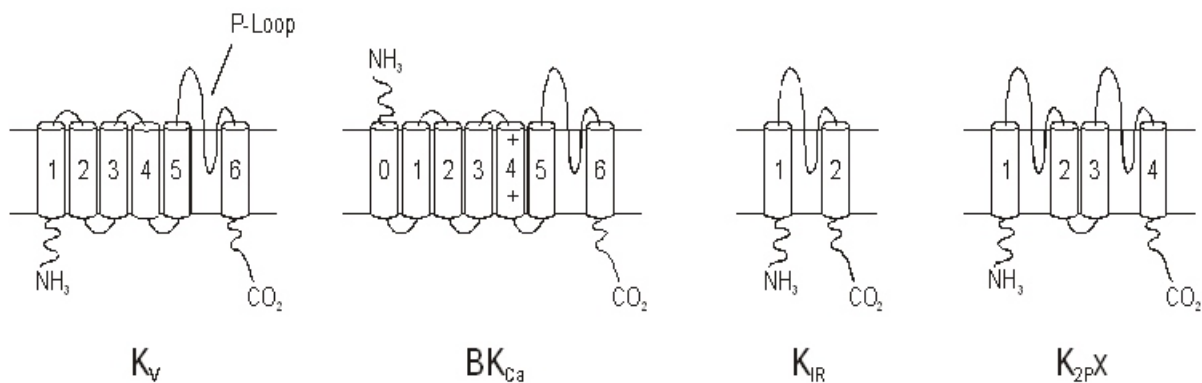


Abbildung 1 Schema der Topologie der α -Untereinheiten von verschiedenen K^+ -Kanalfamilien

- 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}) TM.
- c.) Tandem-Kaliumkanäle (K_{2pX}) aus vier TM mit zwei porenbildenden Untereinheiten.
- d.) einwärtsgerichtete Kaliumkanäle (K_{ir}) aus porenbildenden Untereinheiten mit zwei TM.

Alle Kaliumkanäle besitzen in der P-Schleife (auch H5-Schleife genannt), einer Region die unmittelbar an der Porenbildung beteiligt ist, die gemeinsame "Signatur-Sequenz" - TXXTXGYGD- (Heginbotham et al., 1992). Die Aminosäurefolge TXGYG in der P-Schleife macht den Selektivitätsfilter für K^+ aus (Hille, 2001). Vier P-Schleifen sind obligatorisch an der Ausbildung der Kanalpore beteiligt. Somit besteht ein funktionsfähiger Kaliumkanal aus einem Homo- bzw. Heterotetramer (bei einem P-Loop pro 2TM-, 6TM- bzw. 7TM-Untereinheit) oder aus einem Dimer (bei zwei P-Loops pro Untereinheit in den Tandem-Kaliumkanälen). An die - Untereinheiten können regulatorische -Untereinheiten assoziiert sein (z.B. Sulfonylharnstoffrezeptoren in K_{ATP} -Kanälen, oder Calmodulin in SK_{Ca} -Kanälen). In den folgenden Unterkapiteln werden die vier Kaliumkanalklassen kurz vorgestellt.

1.1.1 Spannungsabhängige Kaliumkanäle

Unter den bisher charakterisierten Kaliumkanälen stellen die spannungsabhängigen Kaliumkanäle die größte Gruppe dar. Der K^+ -Ausstrom durch diese Kanäle ermöglicht die Repolarisierung der Zellmembran. Die Pore der Kanäle besteht aus tetramerisierten 6TM-Untereinheiten, wobei sich die P-Schleife zwischen TM5 und TM6 befindet. Die Spannungsempfindlichkeit erhalten die Kanäle durch eine Häufung positiv geladener Aminosäuren in der TM4. Sie weisen eine ausgeprägte verzögerte Auswärtsgleichrichtung auf, d.h. der Ionenfluss aus der Zelle heraus erfolgt hier wesentlich leichter als in die Zelle hinein. Es wird dabei zwischen schnellen und langsamen verzögerten Gleichrichtern unterschieden (Hille, 2001). Schnelle verzögerte Gleichrichter (K_v -Superfamilie) sind für die kurze Dauer der Aktionspotentiale in myelinfreien Axonen, Motoneuronen und im Skelettmuskel verantwortlich (Hille, 2001). Herzmuskelzellen nutzen bei der Repolarisierung verzögerte Gleichrichter aus der KCNQ- und eag/erg-Familie, deren Kinetik wesentlich langsamer ist, als die der K_v -Kanäle (Sanguinetti und Jurkiewicz, 1990). Zwei wichtige Ströme (I_{Ks} und I_{Kr}) durch Kanäle mit porenbildenden

Untereinheiten dieser Familie sind dabei von entscheidender Bedeutung. Inhibierung dieser K^+ -Flüsse (z.B. durch Klasse-III-Antiarrhythmika) oder Mutationen der betreffenden Kanäle (Romano-Ward-Syndrom) kann stark verlängerte Aktionspotentiale am Herzen zu Folge haben (verlängerte QT-Intervalle im EKG = long QT-Syndrom) und zum plötzlichen Herztod führen (Sanguinetti und Spector, 1997; Abbott et al., 1999).

1.1.2 Ca^{2+} -aktivierte Kaliumkanäle

Fast alle Zelltypen verfügen über K^+ -Kanäle, die durch Ca^{2+} -Ionen aktiviert werden. Man unterscheidet K_{Ca} -Kanäle mit hoher (**Big** K_{Ca} : 100-250 pS), mittlerer (**I**ntermediate K_{Ca} : 20-80 pS) und niedriger (**S**mall K_{Ca} : 4-20 pS) Leitfähigkeit (Hille, 2001).

BK_{Ca} -Kanäle, bestehend aus porenbildenden 7TM-Untereinheiten und regulatorischen -Untereinheiten (Garcia-Calvo et al., 1994), besitzen zusätzlich zu der Regulation durch Ca^{2+} , eine ausgeprägte Spannungsabhängigkeit (Latorre et al., 1989). Skorpiongifte wie Iberiotoxin und Charybdotoxin können BK_{Ca} -Ströme inhibieren (Hille, 2001). Zusammen mit Kv -Kanälen tragen sie zur Repolarisation der Zellmembran und Entstehung der schnellen hyperpolarisierenden Nachpotentiale (fast AHP) bei (Storm, 1990). Sie kontrollieren so die Dauer und Frequenz der Aktionspotentiale und stellen deshalb als wichtige Regulatoren u.a. 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) vielversprechende Zielstrukturen für Pharmaka dar (Curran, 1998).

SK_{Ca} -Kanäle besitzen keine nennenswerte Spannungsabhängigkeit (Hille, 2001). Im Gegensatz zu den BK_{Ca} -Kanälen, deren 7 -Untereinheiten Ca^{2+} -Ionen über "calcium bowls" direkt binden können (Schreiber et al., 1999), wird den SK_{Ca} -Kanälen die Ca^{2+} -Empfindlichkeit durch die Assoziation ihrer 6TM-Untereinheiten mit Calmodulin vermittelt. SK_{Ca} -Kanäle helfen bei der Entstehung der langsamen Nachhyperpolarisierung (slow AHP; Hille, 2001). Ihre Ströme können z.B. durch Apamin and Scyllatoxin inhibiert werden und auch sie werden als Target für zukünftige Medikamente angesehen (Blank et al., 2004).

1.1.3 Tandem-Kaliumkanäle

Die Pore der Tandem-Kanäle besteht aus dimerisierten 4TM- bzw 8TM-Untereinheiten die auf einer Polypeptidkette liegen und jeweils über zwei P-Schleifen verfügen (K_{2P} ; s. Abb. 1). K^+ -selektiver Strom durch einen solchen Kanal in Hefen wurden bereits von Gustin et al., 1986 charakterisiert und im Zuge der Entschlüsselung des Hefegenoms dem TOK1 zugeordnet (Ketchum et al., 1995). Es folgte die Entdeckung von acht K_{2P} -Kanälen (KCNK1-8) bei Säugern (Übersicht bei Buckingham et al., 2005). Die Tandem-Kaliumkanäle zeigen eine schwache Auswärtsgleichrichtung, jedoch keine Spannungsabhängigkeit. Manche von ihnen sind pH-abhängig, andere wiederum werden durch intrazelluläre Second messenger oder mechanische Reize beeinflusst (Hille, 2001). Inhalationsnarkotika wie z.B. Chloroform, Halothan, Isofluran können bestimmte Tandem-Kaliumkanäle aktivieren (Patel et al., 1999; Sirois et al., 2000). Vermutlich stabilisiert die ubiquitäre K_{2P} -Hintergrundleitfähigkeit das Membranruhepotential nahe dem E_K , reguliert die Erregung der Zellen, oder ermöglicht einen K^+ -Transport (Hille, 2001).

1.1.4 Einwärtsgleichrichtende Kaliumkanäle

Die Gleichrichtung durch einen Kanal bedeutet eine Abweichung von einer linearen Strom-Spannungs-Kurve. Im Fall der einwärtsgleichrichtenden K^+ -Kanäle (K_{ir} = inwardly rectifying K^+ channels) bedeutet dies, dass Ionenfluss ins Zellinnere, gegenüber dem Ionenfluss nach außen begünstigt wird. In der Physiologie des Menschen sind Membranpotentiale negativer als das K^+ -Gleichgewichtspotential selten. Jedoch ist nur in solchen Zuständen ein K^+ -Einstrom durch Kanäle in die Zelle denkbar. Trotz ihres Namens zeigen auch starke K^+ -Einwärtsgleichrichter leicht oberhalb des E_K einen signifikanten K^+ -Ausstrom. Dieser ist sogar physiologisch von großer Bedeutung, er hilft nämlich das Membranpotential zu stabilisieren (Hille, 2001). Erst im Bereich der positiver als -70 mV ist, versiegt der K^+ -Strom. Mechanistisch wird dieses Verhalten durch einen Verschluss der Kanalpore durch positiv geladene Substanzen wie Mg^{2+} und Polyamine (Spermin, Spermidin) erklärt (Doupnik et al., 1995). Die Inaktivierung der K_{ir} -Kanäle bei depolarisierter Zellmembran begrenzt vor allem im Herzmuskel den Kaliumverlust während der langen Depolarisationsphase (100-600 ms), minimiert dadurch indirekt die gegenläufigen Ströme und hilft somit die Aktion des Herzens ökonomisch zu gestalten (Hille, 2001).

Die Pore der K^+ -Einwärtsgleichrichter wird von einem Tetramer aus K_{ir} -Untereinheiten gebildet, die nur aus zwei Transmembranhelices bestehen (s. Abb. 1). Die K_{ir} 's verfügen über die

P-Schleife mit dem K^+ -Selektivitätsfilter, jedoch nicht über einen Spannungssensor (Nichols und Lopatin, 1997). Es wurden bisher sieben Kir-Unterfamilien beschrieben (Kir1-7). Je nach Stärke der Gleichrichtung unterscheidet man zwischen starken (Kir2, Kir3, Kir4) und schwachen (Kir1, Kir6, Kir7) K^+ -Einwärtsgleichrichtern (Hille, 2001). Was die Regulierungswege betrifft, stellen die Kir-Kanäle eine sehr heterogene Gruppe dar. Während einige Kir-Kanäle, darunter auch Kir2.1 des Skelettmuskels, keine bekannte Regulierung aufweisen (Hille, 2001), wird die Kir3-Kanalklasse durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren gesteuert (GIRK = G-protein-linked Inwardly Rectifying K^+ -channel). Dazu gehören Kaliumkanäle, die Schrittmacherzellen des Herzens unter Acetylcholineinfluss (K_{ACH} , reguliert über M2-Rezeptor; Pfaffinger et al., 1985; Yatani et al., 1990) hyperpolarisieren und dadurch die Schlagfrequenz herabsetzen.

Im Fokus dieser Arbeit stehen Kaliumkanäle, deren Pore aus schwachen Gleichrichtern des Kir6-Typs gebildet und durch das intrazelluläre ATP/ADP-Verhältnis reguliert wird (K_{ATP} -Kanäle).

1.2 ATP empfindliche Kaliumkanäle

Die ersten Beschreibungen der ATP-sensitiven Kanäle in Herzmuskelzellen durch Trube und Hescheler, 1984 und Noma, 1983 erschienen nahezu gleichzeitig. Es folgten Entdeckungen der K_{ATP} -Kanäle in β -Zellen der Bauchspeicheldrüse (Cook und Hales, 1984; Ashcroft et al., 1984), im Skelettmuskel (Spruce et al., 1985), in glatten Muskelzellen (Beech et al., 1993), im Gehirn (Ashford et al., 1988), in der Blase (Bernardi et al., 1993), in der Niere (Hunter und Giebisch, 1988) und in den Mitochondrien (Inoue et al., 1991). Heute blicken wir auf eine über zwanzigjährige Geschichte intensiver elektrophysiologischer, molekularbiologischer und pharmakologischer Erforschung dieser Kanäle zurück, die weiterhin spannend ist und noch viele unbeantwortete Fragen aufweist. Die Einleitung zu der vorliegenden Dissertation kann nur einen begrenzten Überblick über das verfügbare Wissen liefern.

1.2.1 Elektrisches Verhalten, Aufbau und Oberflächenexpression von K_{ATP} -Kanälen

Die charakteristische elektrische Aktivität eines ATP-empfindlichen Kanals ist in der Abbildung 2 dargestellt. Sie ist gekennzeichnet durch "Burst" (= Ausbruch)-Phasen, in denen der Kanal hochfrequent zwischen dem offenen und geschlossenen ("Gaps") Zustand "flackert" (Aguilar-Bryan und Bryan, 1999). Die "Bursts" werden durch Ruheintervalle ("Interbursts") unterbrochen. Kanal-Modulatoren wie ATP, MgADP (s. Kap. 1.2.4.1) sowie synthetische Kanal-Blocker und- Öffner (s. Kap. 1.2.8) beeinflussen die Dauer der Aktivitätsphasen und somit die Offenwahrscheinlichkeit (P_o) der Kanäle.

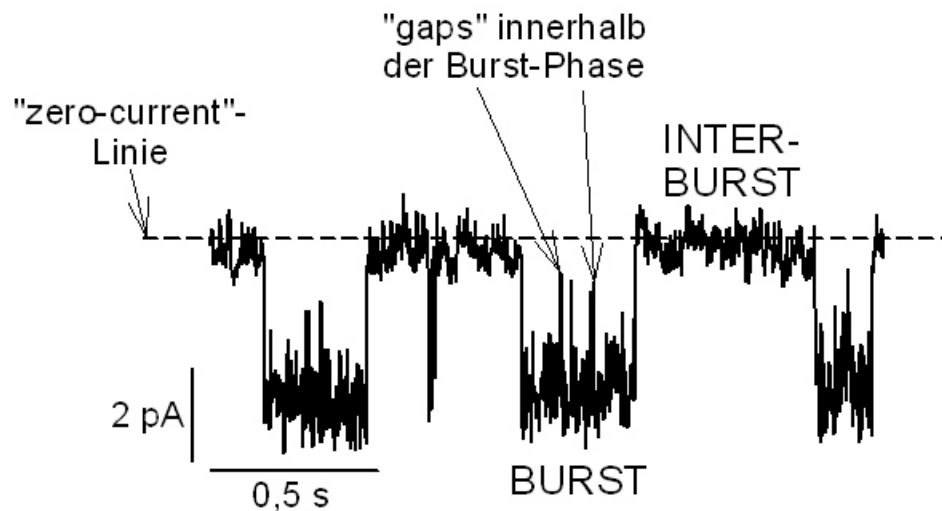


Abbildung 2 Phasen der elektrischen Aktivität eines K_{ATP} -Kanals

2-Sekunden-Spur aus der Untersuchung des Kir6.2/SUR2B in der Outside-out-Konfiguration der Saugelektrode (s. Kap. 2.2.3): bei symmetrischer K^+ -Konzentration und einer Klemmspannung von -50 mV, zeigt sich unter Einfluss eines Kanal-Öffners (1 μ M Bimakalim; s. Kap., 1.2.8.2) ein charakteristischer K_{ATP} -Einzelkanalstrom (Burst- und Interburst-Phasen) von ca. 4 pA (in Übereinstimmung mit der Kir6.2-Einzelkanalleitfähigkeit von ca. 80 pS; Seino und Miki, 2003).

K_{ATP} -Kanäle sind Heterooktamere aus zwei Arten von Untereinheiten, mit einer 4:4 Stöchiometrie (Abb. 3) und der relativen Molekülmasse von ca. 950 kDa. Es handelt sich dabei um eine kompakte Proteinstruktur mit ca. 18 nm Durchmesser und ca. 13 nm Höhe (Mikhailov et al., 2005). Die Pore der Kanäle besteht aus vier γ -Untereinheiten aus der Familie der schwachen Einwärtsgleichrichter Kir6.x. Mit ihr assoziiert sind vier regulatorische Sulfonylharnstoffrezeptoren SUR, die zu ABC-Proteinen gehören (Aguilar-Bryan et al., 1995; Inagaki et al., 1995a; Sakura et al., 1995; Clement IV et al., 1997). Die erste verfügbare 3-D Struktur des K_{ATP} -Kanals von Mikhailov et al., 2005 bestätigt die sehr enge Nachbarschaft der zytosolischen und transmembraneren Strukturen von Kir und SUR, die bereits in zahlreichen Kir/SUR-Interaktionsstudien postuliert wurde (u.a. Giblin et al., 1999; Mikhailov et al., 2000; Schwappach et al., 2000; Babenko und Bryan, 2002; Chan et al., 2003a; Bryan et al., 2004; Rainbow et al., 2004).

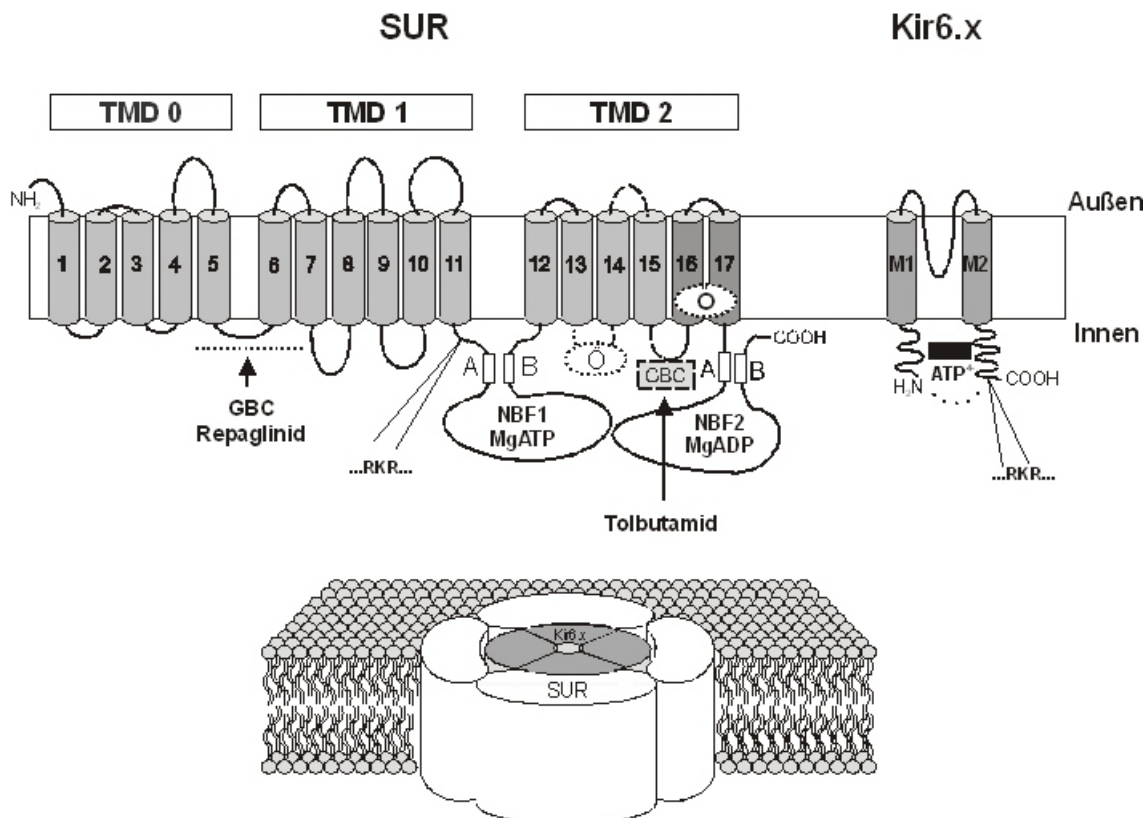


Abbildung 3 Schema des Aufbaus und der Struktur eines K_{ATP} -Kanals
funktionell wichtige Regionen: TMD = Transmembrandomäne; M1, M2 = Transmembranhelices des Kir6.x; 1-17 = Transmembranhelices des SUR; NBF = Nukleotidbindungsfalten; A, B = Walker A- und B-Motiv; RKR = Retentionsmotiv; Ö = Öffnerbindungsstellen;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

Der Einbau unvollständiger Kanalkomplexe in die Zytoplasmamembran wird durch das ER-Retentionsmotiv -RKR-, welches sowohl in der Kir6.x- (C-Terminus) als auch in der SUR-Sequenz (zytoplasmatische Schleife zwischen TM11 und NBF1) vorhanden ist, verhindert (Zerangue et al., 1999). C-terminal verkürzter Kir6.2 (C36, C26) bildet auch in Abwesenheit der regulatorischen Untereinheit funktionsfähige Kanäle und erweist sich somit als wertvolles Werkzeug in den K_{ATP} -Kanal-Studien (Tucker et al., 1997). Die korrekte Glykosylierung des SUR scheint beim Transport der K_{ATP} -Kanäle an die Zelloberfläche ebenfalls von Bedeutung zu sein (Conti et al., 2002). Darüber hinaus sind Mutationen (z.B. Deletionen, Punktmutationen) bekannt, die eine Oberflächenexpression der Kanäle inhibieren (Sharma et al., 1999; Cartier et al., 2001). Crane und Aguilar-Bryan, 2004 beschreiben eine Verlangsamung des Kir6.2-Abbaus durch die Komplexbildung mit SUR1. Ferner postulieren diese Autoren eine schnelle Kir6.2/SUR1-Heterodimerbildung und anschließende langsame Komplexierung zum vollständigen Heterooktamer.

Unsere Arbeitsgruppe stellte vor kurzem ein SUR2B-Tetramermodell auf (Löffler-Walz et al., 2002; Hambrock et al., 2001). Es existieren starke experimentelle Hinweise darauf, das SUR2B-Untereinheiten in Abwesenheit von Kir6.x zu einem Tetramer komplexieren können.

1.2.2 Kir6.x: die -Untereinheit der K_{ATP} -Kanäle

Kir6.x-Untereinheiten bilden als Tetramer die Pore der K_{ATP} -Kanäle. Typisch für einen Einwärtsgleichrichter, verfügen die einzelnen Untereinheiten über zwei Transmembranhelices M1 und M2, die durch die P-Schleife (H5) verbunden sind. Sowohl der N-, als auch der C-Terminus befinden sich im Zytosol. Das für einen K^+ -Kanal charakteristische -GYG-Motiv in der P-Schleife (entscheidend für die K^+ -Selektivität; Jan und Jan, 1994) ist im Kir6.x nicht konserviert, sondern durch -GFG- ersetzt (Seino, 1999). Hochaufgelöste 3D-Strukturen von Kir6.x liegen bisher nicht vor. Antcliff et al., 2005 erarbeiteten mit Hilfe von Strukturen bakterieller Kir-Homologa (Kuo et al., 2003) und zytoplasmatischer Domänen verwandter eukariotischer Kir-Kanäle (Nishida und MacKinnon, 2002; Pegan et al., 2005) ein aktuelles Modell einer Kir6.x-Pore, welches sich gut mit der niedrig aufgelösten Struktur eines K_{ATP} -Kanals vereinbaren lässt (Mikhailov et al., 2005). Demnach wird das Vestibül der Pore durch die M2-Helices des Tetramers trichterförmig ausgekleidet. Der K^+ -Selektivitätsfilter entsteht durch die räumliche Nähe der P-Schleifen der einzelnen -Untereinheiten des K_{ATP} -Kanals (Capener et al., 2003). Der zytosolische Zugang zur

Porenöffnung ist verengt und es wird vorgeschlagen, dass M2-Bewegungen für die Öffnung bzw. Schließung der Pore verantwortlich sind (Loussouarn et al., 2001). Die intrazellulären Domänen der Kir-Untereinheiten zeigen untereinander ein komplexes Wechselwirkungsverhalten und tragen dadurch zur Stabilisierung des Porentetramers, sowie zur Ausbildung von Bindungstaschen für Kanalregulatoren (ATP) bei (Antcliff et al., 2005).

Beim Menschen sind zwei Subtypen der Kir6.x-Familie bekannt: Kir6.1 und Kir6.2. Die beiden Subtypen zeigen eine 71%ige Homologie (Seino, 1999).

Das intronlose Gen des Kir6.2 (KCNJ11) befindet sich auf dem kurzen Arm des Chromosoms 11. Das resultierende Protein ist 390 Aminosäuren lang und wird auf hohem Niveau im Pankreas (, , -Zellen) exprimiert (Suzuki et al., 1997a). Darüber hinaus findet man Kir6.2 am Herzen, in Skelettmuskelzellen, im Gehirn und in der Blase (Seino, 1999).

Das ca. 9,7 kb lange, humane Gen für Kir6.1 (KCNJ8) konnte dem Chromosom 12, in Position 12p11.23 zugeordnet werden. Es besitzt 3 Exons und kodiert für ein Protein aus 424 Aminosäuren, welches zu 98% mit dem murinen Kir6.1 übereinstimmt. Mit Ausnahme von insulinsezernierenden Zellen, wird Kir6.1 ubiquitär exprimiert (Seino, 1999). Die Studie von Suzuki et al., 1997b weist auf ein mögliches Vorkommen von Kir6.1 in der inneren Membran der Mitochondrien hin. Die Einzelkanalleitfähigkeit der Kir6.1-Kanäle ist im Vergleich zu Kir6.2-Kanälen (~ 80 pS; Seino und Miki, 2003) kleiner und liegt im Bereich von 15-30 pS (Quayle et al., 1997).

1.2.3 Der Sulfonylharnstoffrezeptor (SUR): die -Untereinheit der K_{ATP} -Kanäle

Die Sulfonylharnstoffrezeptoren dienen als -Untereinheit der Regulierung der K_{ATP} -Kanäle. Zwei unterschiedliche Gene: ABCC8 auf Chromosom 11 (11p15.1; mit Kir6.2-Gen geclustert) und ABCC9 auf Chromosom 12 (12p12.1) (Chutkow et al., 1996) kodieren für zwei SUR-Isoformen: SUR1 und SUR2 (Inagaki et al., 1996; Isomoto et al., 1996). SUR1 und SUR2 zeigen eine 67%ige Sequenzhomologie (Ashcroft und Gribble, 2000). Es existieren zwei Spleißvarianten des SUR2 (SUR2A und SUR2B), die sich nur in 42 C-terminalen Aminosäuren unterscheiden (Inagaki et al., 1996; Isomoto et al., 1996), wobei der C-Terminus des SUR2B der entsprechenden Region des SUR1 mehr ähnelt (74% Homologie), als dem C-Terminus des SUR2A (33% Homologie; Ashcroft und Gribble, 2000). Die SURs sind wesentlich größer als die Kir6.x-Untereinheiten (SUR1: 1581 Aminosäuren, SUR2: 1549 AS; Bryan und Aguilar-Bryan, 1999).

Tusnady et al., 1997 schlugen das bis heute gultige Modell der molekularen SUR-Struktur

mit 3 Transmembrandomänen (TMD) und insgesamt 17 Transmembranhelices (TM) vor (siehe Abb. 3). Die TMD0 folgt mit 5 TM (TM1-5) auf den extrazellulär liegenden N-Terminus des SUR und ist mit einer kurzen (ca. 100 AS) zytosolischen Schleife Nr. 3 (CL3) mit der TMD1 verbunden. Im Anschluss an die TMD1 (TM6-11) befindet sich die erste intrazelluläre Nukleotidbindungsfalte (NBF1) die gleichzeitig das Verbindungsstück zwischen TMD1 und TMD2 (TM12-17) darstellt. Die zweite Nukleotidbindungsfalte (NBF2) liegt intrazellulär zwischen der TMD2 und dem SUR-C-Terminus

Die Anwesenheit der NBFs ordnet die Sulfonylharnstoffrezeptoren in die Familie der ABC (= ATP binding cassette) Proteine ein. Als Charakteristikum der NBFs können die unter den ABC-Proteinen hochkonservierten Walker A (GXXGXXGKS/T; X = beliebige AS)- und Walker B (YYYYD; Y = hydrophobe AS)-Motive (Walker et al., 1982), das ABC-Signaturmotiv (= "Linkersequenz" LSGGQ), sowie die invarianten Aminosäuren Glutamin und Histidin (Q-Loop bzw. H-Loop) genannt werden. Während Walker A- und B-Motive unmittelbar an der Nukleotidbindung beteiligt sind (s. Kap. 1.2.4.1), ist die Aufgabe der "Linkersequenz" nicht vollständig aufgeklärt (Matsuo et al., 2005). Diskutiert wird ihre Beteiligung an der Transduktion der Nukleotidbindung in die Kanalaktivierung (Matsuo et al., 2005; Hewitt und Lehner, 2003).

Die meisten eukaryotischen ABC-Proteine besitzen eine Transporterfunktion. Als Beispiel wäre das MRP1 (multidrug resistance-associated protein; ABCC1) zu nennen, das ebenso wie SUR aus der ABCC-Unterfamilie der ABC-Proteine stammt (Kruh et al., 2001). Es handelt sich dabei um eine ATP-getriebene Auswärtspumpe, die in der Lage ist zytotoxische Substanzen aus dem Zytoplasma zu befördern (Leslie et al., 2001). CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator; ABCC7), dessen Mutationen zystische Fibrose hervorrufen, ist dagegen ein spannungsunabhängiger Cl⁻-Kanal und Chaperon (Riordan, 1993; Gadsby et al., 1995) und verfügt ähnlich wie SUR über keine bekannte Transportfunktion (Gadsby et al., 1995).

Es sind bisher keine hochaufgelösten Quartärstrukturen vollständiger ABC-Proteine von Säugern veröffentlicht. Bei der Erstellung der SUR-Modelle muss die Wissenschaft daher auf verfügbare Hilfskonstrukte wie z.B. die Homologien zu Strukturen bakterieller ABC-Transporter BtuCD (Locher et al., 2002) und MsbA (Reyes und Chang, 2005), die Röntgenstruktur der NBF1 von CFTR (Lewis et al., 2004), oder die niedrigaufgelösten CFTR- und P-Glykoprotein-Strukturen (Rosenberg et al., 2004, Rosenberg et al., 2003) zurückgreifen. Die Tatsache, dass SUR-Untereinheiten ein Bestandteil der Heterooktamerstruktur von K_{ATP}-Kanälen sind, verleiht der Modellfindung zusätzliche Schwierigkeiten. Die erste Annäherung an die 3D-Struktur eines K_{ATP}-Kanals stammt von (Babenko und Bryan, 2003) und basiert auf dem Homologievergleich mit

MsbA (Chang, 2003) und KirBac1.1 (Kuo et al., 2003). Obgleich die Positionierung vieler Strukturbestandteile (darunter auch SUR-TMD0) mangels verwertbarer Vorlagen sehr vage ist, wird aus diesem Modell die Komplexität des Kanalaufbaus ersichtlich. Einen großen Fortschritt stellt die bereits erwähnte 3D-Struktur von Kir6.2/SUR1 (Mikhailov et al., 2005) dar. Trotz niedriger Auflösung (18 Å) bietet sie eine gute Vorlage für die Anpassung und den Vergleich bisher bekannter Modelle. Diese Arbeit bekräftigt unter anderem die Hypothese, dass die NBFs einer Untereinheit in Abwesenheit von Nukleotiden voneinander entfernt sind und sich im Zuge der Nukleotidbindung aufeinander zu bewegen (Locher et al., 2002; Chen et al., 2003; Higgins und Linton, 2004; Reyes und Chang, 2005). Die räumliche Nähe der NBFs benachbarter Untereinheiten spricht für gegenseitige strukturelle und funktionelle Einflussnahme. Ferner wird die TMD0 im Mikhailov-Modell in Übereinstimmung mit Studien von Babenko und Bryan, 2002 und Chan et al., 2003a neben die M1-Helix des Kir6.2 positioniert. Die enge Nachbarschaft zwischen TMD0+CL3 des SUR und M1+N-Terminus des Kir dient nicht nur der Stabilisierung des Kanalkomplexes, sondern auch der funktionellen Kopplung der Pore mit den regulatorischen Untereinheiten (Babenko und Bryan, 2003).

Die Struktur der Sulfonylharnstoffrezeptoren bietet Bindungsstellen für endogene und pharmakologische K_{ATP} -Kanal-Modulatoren, deren Bindung und Wirkung, sowie der Einfluss auf die Physiologie/Pathophysiologie im Mittelpunkt der folgenden Unterkapitel steht.

1.2.4 Regulierung der K_{ATP} -Kanäle

1.2.4.1 Regulierung der K_{ATP} -Kanäle durch Nukleotide

Die Aktivität der K_{ATP} -Kanäle wird entscheidend durch das intrazelluläre ATP/ADP-Verhältnis beeinflusst. Die Schließung der Kanäle erfolgt über direkte und selektive Wechselwirkungen von ATP oder ADP ($ATP > ADP$) mit den porenbildenden Untereinheiten Kir6.x. Dafür spricht die ATP-Hemmung der K^+ -Kanäle, die lediglich aus C-terminal verkürzten Kir6.2-Untereinheiten bestehenden (IC_{50} von ca. 100 μ M; Tucker et al., 1997), sowie die Fotoaffinitätsmarkierung des Kir6.2 mit ATP-Analoga (Tanabe et al., 1999; Tanabe et al., 2000; Wang et al., 2002). Mg^{2+} -Ionen sind für die Interaktionen der Nukleotide mit Kir6.x nicht notwendig (Ashcroft und Kakei, 1989). Die genaue Position der ATP-Bindungsstelle im Kir6.x-Tetramer ist aufgrund fehlender Kristallstruktur noch nicht eindeutig. Mit Hilfe von Mutationsanalysen wurde einzelnen Aminosäuren eine Beteiligung an der ATP-Bindung

zugeordnet. Beispielsweise sollen R50 und K185 mit dem γ - bzw. β -Phosphat von ATP wechselwirken (Trapp et al., 2003). Auch G334 befindet sich wahrscheinlich in der Nähe des β -Phosphats und beeinflusst die ATP-Bindung (Antcliff et al., 2005; Drain et al., 1998). R201 dagegen interagiert vermutlich mit dem α -Phosphat (Gloyn et al., 2004; Antcliff et al., 2005). In nächster Nachbarschaft zum Adeninring eines gebundenen Nukleotides könnte laut Modell der ATP-Bindungsregion von Antcliff et al., 2005 I182 liegen. In diesem Modell wird die ATP-Bindung in die Grenzregion zwischen dem C- und N-Terminus benachbarter Kir-Untereinheiten positioniert und unterliegt komplexen Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen den Kir-Untereinheiten. An der Nukleotid-bedingten Kanalschließung könnte laut Antcliff et al., 2005 die Wechselwirkung zwischen dem C-Terminus einer Kir-Untereinheit und der Gleithelix ("slide helix") der benachbarten Untereinheit beteiligt sein. Die SUR-Präsenz im Kanalkomplex hat ebenfalls Auswirkungen auf die ATP-Bindung an Kir. Die β -Untereinheit erhöht die Empfindlichkeit des Kir6.2 auf ATP ca. 10-fach (Tucker et al., 1997). Die niedrig aufgelöste Kristall-Struktur des Kir6.2/SUR1-Kanals weist eine Spalte zwischen zwei benachbarten SUR1-Untereinheiten auf, die als Korridor möglicherweise den ATP-Zugang zum Kir erleichtert (Mikhailov et al., 2005).

MgADP stimuliert Kir6.2/SUR1, blockiert aber Kir6.2 K_{ATP} -Kanäle (Tucker et al., 1997). Ferner heben Mutationen im Walker A- (K719A und K1385M), oder Walker B (D853N, D1506A und D1506N) der beiden NBFs des SUR1 die aktivierende MgADP Wirkung auf (Gribble et al., 1997c; Gribble et al., 1997b; Shyng et al., 1997). Auch MgATP ist in der Lage, Kir6.2/SUR1, genauer die ATP-unempfindliche Kir6.2R50G/SUR1-Mutante zu aktivieren. Dies spricht dafür, dass sowohl MgATP wie auch MgADP über die Wechselwirkungen mit den NBFs des SURs die K_{ATP} -Kanäle aktivieren können. Dabei stellt NBF1 die Mg^{2+} -unabhängige Hochaffinitätsbindungsseite für ATP dar (Ueda et al., 1997). NBF2 hingegen bindet Nukleotide Mg^{2+} -abhängig und mit niedrigerer Affinität. Beide NBFs kooperieren miteinander. So begünstigt die MgATP- oder MgADP-Bindung an NBF2 die ATP-Bindung an NBF1 (Ueda et al., 1999). Zingman et al., 2002a berichteten, dass diese Kooperativität für die aktivierende Wirkung auf den Kanal von essentieller Bedeutung ist. Die K_{ATP} -Kanäle verfügen über ATPase-Aktivität (Mikhailov et al., 2005), die ebenfalls an isolierten SUR-NBFs gezeigt werden konnte (Zingman et al., 2001; Masia et al., 2005). Ohne die ATP-Hydrolyse an der NBF2 kann keine Kanalaktivierung erfolgen (Zingman et al., 2001). Matsuo et al., 2005 schlugen ein Modell der K_{ATP} -Kanalaktivierung durch Wechselwirkungen der Nukleotide mit den NBFs vor. Im aktivierten (= posthydrolytischen) Zustand ist an NBF1 ATP und an NBF2 MgADP gebunden. Der ATPase-Zyklus von NBF2

fungiert als Sensor des metabolischen Zellzustands. Ist der metabolische Zustand der Zelle gut (= hohe Kreatin-Kinase-katalysierte Phosphorylierungsrate von ADP), dissoziiert MgADP von NBF2 und wird durch MgATP ersetzt. Diese Entwicklung begünstigt den geschlossenen Kanalzustand, bei dem die ATP-Hydrolyse beschleunigt ist. Steigt jedoch die intrazelluläre MgADP-Konzentration infolge einer Verschlechterung des metabolischen Zustandes der Zelle an, so verlangsamt sich die ADP-Dissoziation von NBF2, die ATPase-Aktivität wird gedrosselt und der Kanal geht in den aktivierten (= posthydrolytischen) Zustand über.

Die K_{ATP} -Kanal-Subtypen variieren beträchtlich in ihren Nukleotidbindungseigenschaften und in ihrer Nukleotidempfindlichkeit (Matsuo et al., 2005). SUR1 z.B. bindet ATP und ADP stärker als SUR2A und SUR2B. Unter den SUR2-Subtypen zeigt NBF1 des SUR2B die höhere ATP-Affinität. Ebenso ist die ADP-Affinität von SUR2B-NBF2 besser als die von SUR2A (Matsuo et al., 2000; vgl. auch Hambrock et al., 2002a). Da sich bekanntlich die beiden SUR2-Spleißvarianten nur in ihrer C-terminalen Region unterscheiden, muss davon ausgegangen werden, dass der C-Terminus die Nukleotidbindung an beide NBFs beeinflusst. Vorstellbar ist dabei sowohl ein Einfluss auf die Nukleotidaffinität, als auch auf die ATPase-Aktivität. Darüber hinaus wurde berichtet, dass am Kir6.2/SUR2A viel höhere MgADP-Konzentrationen notwendig sind um den Kanal zu aktivieren als am Kir6.2/SUR1 oder Kir6.2/SUR2B (Matsuoka et al., 2000). Sieben Aminosäuren im SUR-C-Terminus, die in SUR-Strukturmodellen in die Nähe des Walker-A-Motivs von NBF2 positioniert werden sind für diesen Unterschied ausschlaggebend (Matsushita et al., 2002).

Kir6.1-haltige Kanäle (z.B. Kir6.1/SUR2B der Gefäßmuskulatur) galten zunächst als relativ ATP-unempfindlich (= nicht hemmbar) und aktivierten nur in Nukleotid-Anwesenheit (K_{NDP} -Kanäle; Beech et al., 1993; Yamada et al., 1997; Satoh et al., 1998). Neue Untersuchungen deuten jedoch auf eine ATP-Empfindlichkeit (= Hemmung) hin, die mit Kir6.2-Kanälen vergleichbar ist (Babenko et al., 2000b).

1.2.4.2 Regulierung der K_{ATP} -Kanäle durch Lipide

Negativ geladene, langkettige Lipide wie L- -Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP_2) oder Acyl-Coenzym A Ester (LC-Acyl-CoA) übernehmen bei der Regulation der K_{ATP} -Kanäle eine wichtige Rolle. Sie binden an Kir6.2 in enger Nachbarschaft der ATP-Bindungsregion und verändern dadurch die ATP-Empfindlichkeit eines K_{ATP} -Kanals (Enkvetchakul und Nichols, 2003; Schulze et al., 2003; Trapp et al., 2003).

Das Membranphospholipid PIP_2 besitzt eine hydrophile, negativgeladene Kopfgruppe und einen langen, hydrophoben Fettest (siehe Abb. 4). Es ist ein Vorläufer wichtiger Second messenger wie DAG, IP3 und PIP_3 . Die Membrankonzentration von PIP_2 unterliegt einer Regulation durch Enzyme wie Phospholipasen, Phospholipid-Phosphatasen und Phospholipid-Kinasen. Dies ermöglicht eine Steuerung der K_{ATP} -Kanäle über Signaltransduktionswege, die an den Metabolismus der Phospholipide gekoppelt sind (Baukrowitz und Fakler, 2000). Die K_{ATP} -Regulation durch PIP_2 beruht auf der Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle (Hilgemann und Ball, 1996) und Senkung der ATP-Empfindlichkeit (Baukrowitz et al., 1998; Shyng und Nichols, 1998).

LC-Acyl-CoA (z.B. Oleoyl-CoA) weisen ebenfalls eine hydrophile, anionische Kopfgruppe (Coenzym A) und eine lange hydrophobe Kette (Fettsäurerest; siehe Abb. 4) auf. Auch sie sind in der Lage die ATP-Empfindlichkeit der K_{ATP} -Kanäle zu reduzieren (Gribble et al., 1998a; Liu et al., 2001) und koppeln so das Membranpotential der Zelle an den Fettsäuremetabolismus. Übergewicht und Hyperglykämie (z.B. beim Diabetes mellitus Typ 2) steigern den Umlauf an freien Fettsäuren. In der β -Zelle des Pankreas führt dies zu einem Anstieg der LC-Acyl-CoA (Larsson et al., 1996). Die daraus resultierende Aktivierung der K_{ATP} -Kanäle könnte die Insulinsekretion vermindern. Am Herzen liefern LC-Acyl-CoA freie Fettsäuren für die β -Oxidation in den Mitochondrien. Diese Form der Energiegewinnung ist auf eine gute Sauerstoffversorgung angewiesen. Während einer Ischämie akkumulieren LC-Acyl-CoA im Zytoplasma. Die daraus resultierende mögliche Aktivierung der K_{ATP} -Kanäle und Hyperpolarisation der Zellmembran könnte einen energiesparenden Zellschutzmechanismus darstellen (Liu et al., 2001; s. auch Kap. 1.2.6).

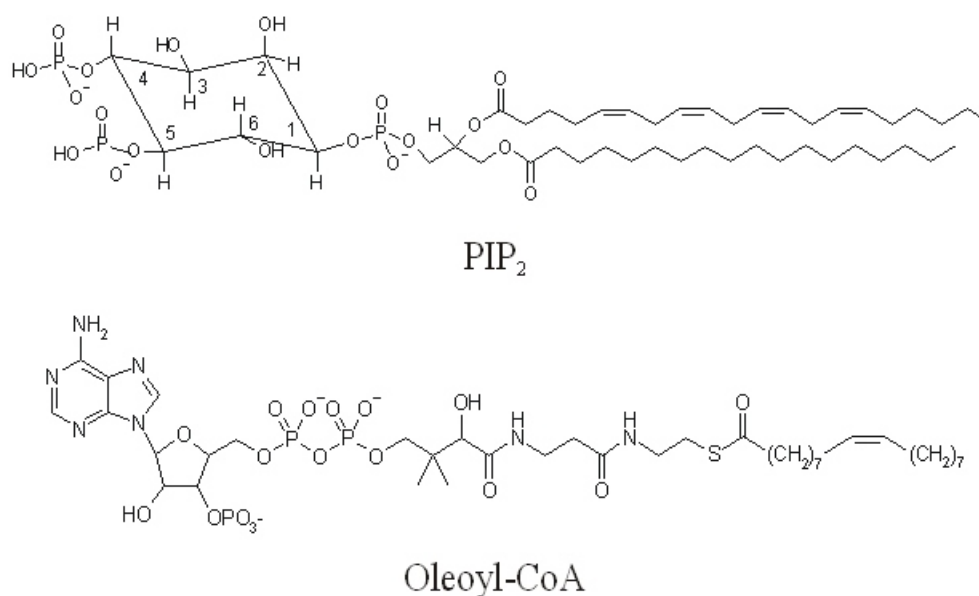


Abbildung 4 Strukturformeln der Phospholipide PIP₂ und Oleoyl-CoA

Zusätzlich zu den Effekten auf die ATP-Empfindlichkeit, heben Membranphospholipide und LC-Acyl-CoA die Wirkung synthetischer K_{ATP}-Kanal-Modulatoren (GBC und KCO; s. Kap. 1.2.8) auf (Koster et al., 1999; Krauter et al., 2001; Liu et al., 2001; Schulze et al., 2003; Klein et al., 2005). Man geht davon aus, dass der Antagonismus zwischen den Lipiden und ATP größtenteils allosterischer Natur ist (Koster et al., 1999; Enkvetchakul und Nichols, 2003; Schulze et al., 2003). Hinter der Unempfindlichkeit der K_{ATP}-Kanäle auf die an SUR-bindenden Öffner und Blocker steht jedoch vermutlich eine der Lipidbindung folgende funktionelle Entkopplung zwischen Kir6.2 und SUR (Koster et al., 1999). Für den unterschiedlichen Inhibitionsmechanismus spricht auch die Tatsache, dass Polykationen wie Polylysin und Neomycin die PIP₂-Wirkung auf die ATP-Empfindlichkeit (Fan und Makielski, 1997; Shyng und Nichols, 1998; Schulze et al., 2003), nicht jedoch die Lipid-induzierte Unempfindlichkeit gegen pharmakologische Modulatoren aufzuheben vermögen (Krauter et al., 2001).

Lipide besitzen darüber hinaus die Fähigkeit, den K_{ATP}-Kanal-Rundown aufheben zu können (Ribalet et al., 2000; Liu et al., 2001). Unter "Rundown" versteht man den spontanen Verlust an Kanalaktivität in elektrophysiologischen Experimenten, nach dem Herausreißen eines isolierten Membranstückes aus seiner zellulären Umgebung (= Inside-out-Messungen; s. Kap. 2.2.3.2.2.3). Ebenfalls in Ganzzellmessungen kann während der Dialyse der untersuchten Zelle mit der Pipettenlösung (s. Kap. 2.2.3.2.2.2) "Rundown" beobachtet werden. Die dahinterstehenden Mechanismen sind nicht vollständig geklärt. Ca²⁺- und Mg²⁺-Ionen beschleunigen den Prozess,

MgATP/MgADP können die Kanalaktivität wieder herstellen (= "Refreshment"; Ribalet et al., 2000). Wird der Rundown zum Teil als Reaktion auf Anwesenheit oder Mangel an Kanal-Modulatoren verstanden, so bestätigt sich im Effekt von Oleoyl-CoA und PIP₂ die Hypothese über die Abschirmung des Kanals von der Ligandbindung durch Lipide (Ribalet et al., 2000).

1.2.4.3 Regulierung der K_{ATP}-Kanäle durch Phosphorylierung und andere Mechanismen

Endogene Vasodilatoren (z.B. Adenosin, Calcitonin) aktivieren über Phosphorylierung durch Proteinkinase A die Kir6.1/SUR2B-Kanäle der Gefäßmuskulatur (Quinn et al., 2004). Die Proteinkinase C hingegen hemmt die Kir6.1/SUR2B-Kanäle (Thorneloe et al., 2002) und ist dadurch in die Regulierung des Vasotonus durch Vasokonstriktoren involviert (Nelson und Quayle, 1995; Standen et al., 1989; s. auch Kap. 1.2.6). Öffnung der sarcK_{ATP}-Kanäle (Kir6.2/SUR2A) vermittelt durch die Proteinkinase C (und Adenosin) gilt als essentiell bei der ischämischen Präkonditionierung (Gross und Peart, 2003; s. auch Kap. 1.2.6).

Die 3D-Struktur des K_{ATP}-Kanals von Mikhailov et al., 2005 besitzt vor allem im Bereich der SUR-Nukleotidbindungsdomänen eine zytosolische "Andockplattform" für weitere Modulatorproteine wie z.B. Kreatin-Kinase (Crawford et al., 2002b), Lactat-Dehydrogenase (Crawford et al., 2002a), oder Syntaxin (Cui et al., 2004). Ferner wäre die Beeinflussung der K_{ATP}-Kanalaktivität durch G-Proteine (Sánchez et al., 1998) und Endosulfine (Heron et al., 1998) zu nennen.

1.2.5 Gewebsspezifische Expression und Kombination der K_{ATP}-Kanaluntereinheiten

Man findet unterschiedliche Expressionsraten der separaten Gene der K_{ATP}-Kanaluntereinheiten sowie deren Spleißvarianten (SUR2A, SUR2B) in verschiedenen Geweben.

Kir6.1 wird reichlich im Herz-, Ovarial- und Nebennierengewebe exprimiert. Moderates Vorkommen an Kir6.1 wurde am Skelettmuskel, im Lungen-, Gehirn-, Magen-, Dickdarm-, Hoden-, Schilddrüsen- und Pankreasgewebe beschrieben. Nur geringes Kir6.1-Vorkommen konnte dagegen in der Niere, in der Leber, im Dünndarm und in der Hypophyse nachgewiesen werden (Inagaki et al., 1995b). Ein hohes Expressionsniveau an Kir6.2 findet man im Skelettmuskel, am Herzen, in den Inselzellen des Pankreas, in der Lunge, in der Leber, im Gehirn und im Magen, wohingegen in der Niere, im Dick- und Dünndarm, in den Ovarien, in den Hoden, im Schilddrüsen- und Nebennierengewebe Kir6.2 nur schwach exprimiert wird (Inagaki et al., 1995b).

Die regulatorische Untereinheit SUR1 ist stark in Neuronen, im Gehirn und in den β -Zellen des Pankreas (Aguilar-Bryan et al., 1995) präsent. SUR2 wird hauptsächlich im Herz- und Skelettmuskel exprimiert. Vor allem in der glatten Muskulatur findet man den ubiquitär vorkommenden SUR2B. (Inagaki et al., 1996; Isomoto et al., 1996; Chutkow et al., 1996; Chutkow et al., 1999).

In rekombinanten Expressionssystemen lassen sich alle Kir6.x.- und SUR-Subtypen beliebig zu funktionsfähigen K_{ATP} -Kanälen kombinieren. Die prominentesten Kanalkombinationen in vivo sind samt Expressionsschwerpunkt in der Tabelle 1 vorgestellt.

Tabelle 1 Natürliches Vorkommen der K_{ATP} -Kanäle

| Kanalkombination | Vorkommen | Referenzen |
|------------------|--------------------------|--|
| Kir6.1/SUR2B | glatte Gefäßmuskulatur | Yamada et al., 1997 |
| Kir6.2/SUR2B | glatte Muskulatur | Isomoto et al., 1996 |
| Kir6.2/SUR1 | Pankreas, Neurone | Inagaki et al., 1995a Gribble et al., 1997a |
| Kir6.2/SUR2A | Herz-, und Skelettmuskel | Inagaki et al., 1996 Okuyama et al., 1998 |

1.2.6 Physiologische und pathophysiologische Rolle der K_{ATP} -Kanäle

Im Konzert der Membranpotential-regulierenden Kanäle fällt den K_{ATP} -Kanälen eine wichtige Rolle zu. Sie koppeln das Membranpotential an den metabolischen Zustand der Zelle über den ATP/ADP-Quotienten, oder den Lipidstoffwechsel (siehe Kap. 1.2.4). Die verschiedenen K_{ATP} -Kanalsubtypen weichen in ihren elektrophysiologischen Eigenschaften voneinander ab und reagieren unterschiedlich auf endogene bzw. pharmakologische Regulierungseinflüsse. Je nach Expressionsschwerpunkt, variiert dadurch die Rolle der K_{ATP} -Kanäle in unterschiedlichen Geweben. Untersuchungen an nativen Gewebepreparaten, genetisch veränderten Mäusen und Patienten mit K_{ATP} -Kanalmutationen tragen dabei zur Entschlüsselung der K_{ATP} -Kanalbedeutung bei.

Am besten untersucht ist die Beteiligung der K_{ATP} -Kanäle an der Regulierung der Insulinsekretion in den β -Zellen des Pankreas (Abb. 5). Das Membranruhepotential der β -Zellen wird in erster Linie über die Aktivität der K_{ATP} -Kanäle kontrolliert. Der Kir6.2/SUR1-Subtyp fungiert dort zudem indirekt über den ATP/ADP-Quotienten als Glukosesensor. Bei substimulatorischen Glukosekonzentrationen (< 3 mM) stabilisiert der K^+ -Efflux durch offene Kir6.2/SUR1-Kanäle das Ruhepotential bei ca. -70 mV. Bei diesem Potential sind spannungsgesteuerte L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle (L-VOCC=voltage operated calcium channels) geschlossen. Steigt die Plasmakonzentration an Glukose an, so wird der Zucker über die Transporter GLUT (GLUT2 bei Nagern, GLUT1 beim Menschen) vermehrt in die β -Zellen aufgenommen und im Zuge der Glykolyse metabolisiert (1). In der Folge steigt der ATP/ADP-Quotient der Zelle an (2), wodurch die K_{ATP} -Kanäle inaktiviert werden. Durch verminderte K^+ -Leitfähigkeit wird nun die Zellmembran depolarisiert (3). Dies führt zur Öffnung der spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle, zum Einstrom von Ca^{2+} in die Zelle, zur Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (4) und schließlich zur damit verbundenen Exozytose der Insulingranula (5).

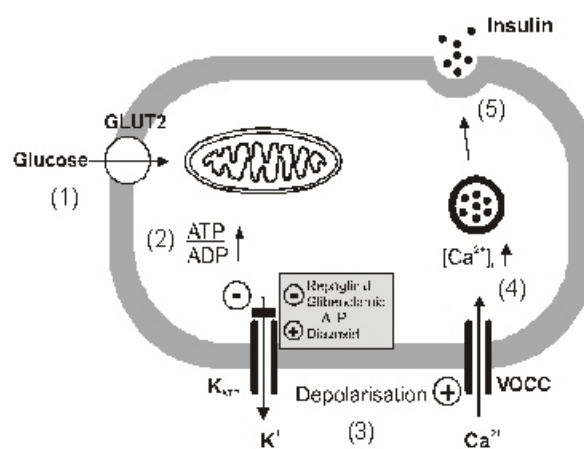


Abbildung 5 Modell der Insulinfreisetzung aus den β -Zellen der Bauchspeicheldrüse. (nach Cook und Hales, 1984; Löffler-Walz und Quast, unveröffentlicht)

K_{ATP} -Kanäle (Kir6.2/SUR1) werden stark im Hypothalamus exprimiert (Miki und Seino, 2005). Dieses Organ ist entscheidend in die Regulation des Energiemetabolismus, Kontrolle des Körpergewichts und des Blutzuckerspiegels involviert (Levin et al., 1999). Untersuchungen der Kir6.2^(-/-)-Mäuse deuten darauf hin, dass an diesen Prozessen (u.a. über Regulierung der Glukagon-Freisetzung) K_{ATP} -Kanäle beteiligt sind (Miki und Seino, 2005).

Unter physiologischen Bedingungen halten hohe intrazelluläre ATP-Konzentrationen die Kir6.2/SUR2A-Kanäle des Herzmuskels geschlossen (Nichols und Lederer, 1991). Dennoch zeigen Studien an Kir6.2^(-/-)-Mäusen die Notwendigkeit einer intakten K_{ATP}-Kanalfunktion bei der Anpassung des Herzens an physischen und adrenergen Stress (Zingman et al., 2002b). Eine massive Öffnung der Herz-K_{ATP}-Kanäle erfolgt im allgemeinen während einer Ischämie und Hypoxie, wenn das intrazelluläre ATP/ADP-Verhältnis fällt (Gögelein, 2001) und die Konzentration an Lipiden steigt (Liu et al., 2001). Die darauffolgende Hyperpolarisierung der Zellmembran reduziert die Erregbarkeit der Zelle. Die resultierende Verkürzung des Aktionspotentials hilft dem Gewebe Energie zu sparen (= negativ inotrope Wirkung durch verminderten Ca²⁺-Einstrom), die potentiell gestörte elektrische Homogenität des Herzens kann jedoch zu Arrhythmien führen (Gögelein, 2001). Länger andauernde Ischämie verursacht den Untergang der Kardiomyozyten durch nekrotische und apoptotische Prozesse. Vorangegangene kurze ischämische Perioden können das Ausmaß des Schadens durch lange O₂-Mangelversorgung begrenzen. Dieses Phänomen ist als ischämische Präkonditionierung des Myokards (IPC) bekannt (Murry et al., 1986; Cohen et al., 2000; Gross und Fryer, 1999). Als Auslöser des Prozesses gilt die Freisetzung von u.a. Adenosin, Bradykinin, Norepinephrin, Opioiden und NO. Der genaue Mechanismus ist bisher nicht vollständig aufgeklärt, dennoch scheint die Öffnung von K_{ATP}-Kanälen einen entscheidenden Beitrag zu leisten (Hanley und Daut, 2005). Kir6.2^(-/-)- und SUR2^(-/-)-Mäuse zeigen keine IPC (Seino und Miki, 2003). Selektive Blockade der Kir6.2/SUR2A-Kanäle durch HMR-1883 konnte die IPC nicht aufheben (Jung et al., 1995). Statt dessen erwies sich ein angeblich selektiver Blocker der mitochondrialen K_{ATP}-Kanäle (mitoK_{ATP}) 5-Hydroxydecanoat (5-HD) diesbezüglich als wirksam (Munch-Ellingsen et al., 2000). Es wird deshalb die Beteiligung der wenig erforschten mitoK_{ATP}-Kanäle an der IPC postuliert (Yellon und Downey, 2003; Gross und Peart, 2003).

Außer am Myokard werden Kir6.2/SUR2A-Kanäle ebenfalls verstärkt in Skelettmuskelzellen exprimiert. Die Muskelkontraktion erfordert einen hohen Energieumsatz. Tritt Ermüdung ein (ATP/ADP-Ratio fällt), öffnen sich die K_{ATP}-Kanäle (Light et al., 1994), der K⁺-Ausstrom steigt und die Aktionspotentiale werden kürzer (Gramolini und Renaud, 1997). Dies schützt auch die Skelettmuskelzelle vor schädlicher Ca²⁺-Überladung (Burton und Smith, 1997). Desweiteren sind die K_{ATP}-Kanäle der Skelettmuskulatur in den Mechanismus der Glukoseaufnahme in die Muskelzelle involviert und spielen somit eine bedeutende Rolle bei der Glukosehomöostase (Miki et al., 2002a; Minami et al., 2003).

Die K_{ATP}-Kanäle der glatten Gefäßmuskulatur (Kir6.1/SUR2B) dienen über ihren Einfluss

auf den Gefäßmuskeltonus der Regulation des Blutdrucks (Edwards und Weston, 1993; Nelson und Quayle, 1995). An den Koronarien wird mit ihrer Hilfe die Koronarreserve mobilisiert (Miki et al., 2002b; Chutkow et al., 2002; Farouque et al., 2002). Die Öffnung der Kir6.1/SUR2B-Kanäle führt über die Hyperpolarisation der sarkolemmalen Membranen der Gefäßmuskelzellen zur Vasodilatation (Quast und Cook, 1989). In Kir6.1^(-/-) und SUR2^(-/-)-Knock-Out-Mäusen kommt es zu transienten Vasospasmen der Koronarien, die in ihrem Phänotyp der Prinzmetal-Angina ähneln (Miki et al., 2002b; Chutkow et al., 2002).

In juxtaglomerulären Zellen der Niere sind die K_{ATP}-Kanäle an der Regulation der Reninsekretion und im Tubulusepithel an der Ionenrückresorption beteiligt (Quast, 1996).

1.2.7 K_{ATP}-Kanalopathien

1.2.7.1 Kongenitaler Hyperinsulinismus im Kindesalter (HI)

Der kongenitale Hyperinsulinismus im Kindesalter (HI) auch bekannt als "persistierende hyperinsulinämische Hypoglykämie im Kindesalter" (PHHI) ist eine seltene, angeborene Funktionsstörung, die sich durch unangepasste dauerhafte Insulinfreisetzung auszeichnet (Dunne et al., 2004). Die Krankheit manifestiert sich bereits kurz nach der Geburt durch eine schwere Hypoglykämie und führt unbehandelt zu gravierenden, irreversiblen, neurologischen Ausfällen bis hin zum Tod. Obgleich auch dominante Vererbungsmodi beschrieben wurden, wird HI in den meisten Familien autosomal-rezessiv vererbt (Huopio et al., 2000). Mutationen in fünf Genen können HI verursachen, jedoch ist genetisch veränderter SUR1 (Mutationen im ABCC8-Gen) für etwa 50 % der Erkrankungsfälle verantwortlich (Thomas et al., 1995). HI resultiert auch aus einigen KCNJ11-Mutationen (KCNJ11-Gen kodiert für Kir6.2) (Dunne et al., 2004).

HI-assoziierte SUR1-Mutationen können in zwei Klassen eingeteilt werden. In die erste Klasse werden Mutationen eingeordnet die Oberflächenexpression der K_{ATP}-Kanäle verhindern. Beeinträchtigt wird dabei entweder die Produktion der Proteine, oder deren Reifung, Transport und Einbau in die Plasmamembran (Taschenberger et al., 2002). Nach Mutationen der Klasse 2 entstehen Kanäle die in der Zellmembran präsent sind, jedoch, vom Metabolismus der Zelle entkoppelt, im Zustand verminderter bzw. aufgehobener Aktivität vorliegen. Im Allgemeinen ist das Vermögen von MgADP, diese K_{ATP}-Kanäle zu aktivieren, beeinträchtigt (Huopio et al., 2000; Nichols et al., 1996). Viele Klasse 2-Mutationen befinden sich im Bereich der Nukleotidbindungsdomänen (NBF). HI als Folge von Mutationen im Kir6.2 sind seltener. Auch sie reduzieren bzw. heben die Kanalaktivität auf (Nestorowicz et al., 1997; Thomas et al., 1996;

Henwood et al., 2005). Bedingt durch den Ausfall der Membranpotentialstabilisierung durch die K_{ATP} -Kanäle kommt bei HI-Patienten zur Depolarisation der β -Zellmembran verbunden mit kontinuierlicher Insulinsekretion.

Gain-of-function Mutationen in der Glucokinase (GCK) und Glutamat-Dehydrogenase der Mitochondrien (GDH) werden ebenfalls mit milden HI-Formen assoziiert (Gloyn, 2003; Stanley et al., 1998). Werden diese Schlüsselenzyme des β -Zellmetabolismus übermäßig aktiviert, kommt es bei vergleichsweise niedrigen Glukosekonzentrationen zur verstärkten ATP-Synthese und dadurch zur unverhältnismäßigen K_{ATP} -Kanal-Blockade und Insulinfreisetzung. Weitere milde HI-Formen können durch proteinreiche Kost bzw. die Aminosäure Leucin hervorgerufen werden. Leucin kann über allosterische Stimulierung der Glutamat-Dehydrogenase (GDH) erhöhte ATP-Bildung induzieren. Bei Patienten mit GDH-Mutationen mit heraufgesetzter Leucinempfindlichkeit (Stanley et al., 1998) und/oder SUR1-Mutationen mit leicht reduzierter MgADP-Empfindlichkeit (Magge et al., 2004) kann das Überangebot an ATP HI manifest machen.

Mutationen an SUR1 und Kir6.2, die HI auslösen sind meistens schwerer Natur und können durch K_{ATP} -Kanal-öffnende Pharmaka (Diazoxid) nicht therapiert werden (Dunne et al., 2004; Henwood et al., 2005). In diesen Fällen befinden sich entweder keine/zu wenige aktivierbare Kanäle in der Plasmamembran, oder die vorhandenen Kanäle erweisen sich als medikamentresistent. Die subtotale Pankreatektomie stellt hier die einzige, lebensrettende Therapeutische Maßnahme dar (Cook und Bryan, 1998). Sind jedoch die K_{ATP} -Kanäle in ihrer Funktion intakt (HI ausgelöst durch Mutationen in GCK, GDH, SCHAD), so können milde HI-Formen adäquat mit Diazoxid therapiert werden (Dunne et al., 2004).

1.2.7.2 Permanenter Neonataler Diabetes (PNDM)

Permanenter Neonataler Diabetes (PNDM) ist gekennzeichnet durch die Entwicklung von Hyperglykämie innerhalb der ersten drei Lebensmonate. Etwa 50 % dieser Erkrankungen wird durch Kir6.2-Mutationen verursacht; dabei sind bis heute ausschließlich heterozygote Formen bekannt (Gloyn et al., 2004; Sagen et al., 2004; Vaxillaire et al., 2004). Milde Erscheinungsformen von PNDM sind durch minimale Insulinantwort auf intravenöse Glukosegabe, jedoch adäquate Insulinfreisetzung nach Verabreichung von Sulfonylharnstoffen gekennzeichnet (Haider et al., 2005). Entwicklungsverzögerungen, Muskelschwäche, Epilepsie und kraniofaziale Dysmorphien gehören neben neonatalem Diabetes zu den phenotypischen Erscheinungsformen des schwerwiegenden PNDM. Es ist davon auszugehen, dass diese schweren Symptome direkt durch

Kir6.2-Mutationen verursacht werden und nicht eine Folge der Hyperglykämie sind (Gloyn et al., 2004; Sagen et al., 2004; Vaxillaire et al., 2004).

Alle bisher bekannten PNDM-verursachenden Mutationen erniedrigen die ATP-Empfindlichkeit der Kir6.2/SUR1-Kanäle (Gloyn et al., 2004). Mutationen innerhalb der ATP-Bindungsregion wie z.B. R201H, R201C (Gloyn et al., 2004), oder Y330C, F333I (Sagen et al., 2004) beeinträchtigen die ATP-Affinität, ohne die Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle wesentlich zu beeinflussen. Sie sind mit der milden PNDM-Form assoziiert (Antcliff et al., 2005; Gloyn et al., 2004; Ribalet et al., 2003). Die betroffenen Patienten sprechen meistens gut auf die Behandlung mit K_{ATP} -Kanal-Inhibitoren an (Gloyn et al., 2004; Sagen et al., 2004; Zung et al., 2004). Hingegen liegen Mutationen wie z.B. Q52R, V59M, V59G und I296L von der ATP-Bindungsstelle weiter entfernt. Sie erhöhen die intrinsische Offenwahrscheinlichkeit der K_{ATP} -Kanäle und verursachen schwerwiegende Krankheitsausprägungen (Gloyn et al., 2004; Sagen et al., 2004; Vaxillaire et al., 2004). Die Empfindlichkeit dieser Kanäle den Blockern gegenüber ist verringert, sodass die Therapie der Hyperglykämie durch Insulin ergänzt werden muss (Proks et al., 2004).

Nach Markworth et al., 2000 reicht die Bindung eines ATP-Moleküls pro Kir6.2-Tetramer aus, um den Kanal zu schließen. In einem heterozygoten System (s.o.) aus wildtypischen Kir6.2-Untereinheiten und Kir6.2-Mutanten mit erniedrigter ATP-Affinität sollten somit nur die seltenen Mutanten-Homomere eine verminderte ATP-Empfindlichkeit aufwiesen. Die Auswirkungen einer P_0 -beeinflussenden Mutation machen sich dagegen bereits bei einer mutierten Untereinheit im Tetramer bemerkbar und nehmen mit der Anzahl der mutierten Untereinheiten zu. Dieses Verhalten liefert die theoretische Erklärung, weshalb sich Kir6.2-Mutationen mit Einfluss auf die intrinsische Kanalkinetik gravierender auswirken, als Mutanten mit geringerer ATP-Affinität (Haider et al., 2005).

1.2.7.3 Diabetes Mellitus Typ 2 (NIDDM)

Insulinresistenz gepaart mit Insulinsekretionsdefekten gelten als Ursache für das Entstehen des Nichtinsulinabhängigen Diabetes Mellitus (NIDDM = Typ 2-Diabetes). Diese Glukosetoleranzstörung manifestiert sich meist jenseits des 40. Lebensjahres. Über 80 % der betroffenen sind adipös. Darüber hinaus ist eine genetische Prädisposition, darunter auch Mutationen des pankreatischen K_{ATP} -Kanals, beim Typ 2-Diabetes anzunehmen. In der Population der europäischen Kaukasier ist häufig der heterozygote (45 %), bzw. homozygote (13 %) Kir6.2-

Polymorphismus E23K anzutreffen (Gloyn et al., 2001; Sakura et al., 1996; Inoue et al., 1997). Es häufen sich die Anzeichen dafür, dass dieser Polymorphismus mit einem höheren Risiko für Typ 2-Diabetes verbunden ist (Hani et al., 1998; Gloyn et al., 2003; Barroso et al., 2003). Zudem konnten Nielsen et al., 2003 einen Zusammenhang zwischen dem E23K-Polymorphismus und einem erhöhten BMI beobachten. Ein stiller Polymorphismus AGG1273AGA des SUR1-Gens kann in Kombination mit der E23K-Mutation am Kir6.2 das Diabetes Risiko noch zusätzlich steigern (Laukkanen et al., 2004). Die E23K-Mutation erhöht die intrinsische Offenwahrscheinlichkeit, vermindert die ATP-Empfindlichkeit und verstärkt die MgADP-Aktivierung der Kir6.2/SUR1-Kanäle (Schwanstecher et al., 2002a; Schwanstecher et al., 2002b). Ferner soll die E23K-Mutation die Empfindlichkeit der betroffenen Kanäle gegenüber dem Lipid Oleoyl-CoA verstärken (Riedel et al., 2003). Die beobachteten Unterschiede zwischen dem Wildtyp-Kanal und der E23K-Mutante waren gering und konnten nicht immer reproduziert werden (Haider et al., 2005). Breiter angelegte Funktionsstudien erscheinen daher notwendig, um den molekularen Hintergrund des Effekts vom E23K-Polymorphismus auf die Glukosehomöostase aufzuklären.

1.2.8 Pharmakologie der K_{ATP} -Kanäle

1.2.8.1 K_{ATP} -Kanal-Inhibitoren: Sulfonylharnstoffe und Glinide

Sulfonylharnstoffe (z.B. Tolbutamid und Glibenclamid; s. Abb. 6) und Glinide (z.B. Repaglinid, Nateglinid; s. Abb. 6) binden an den SUR und hemmen dadurch die Aktivität des K_{ATP} -Kanals. Die daraus resultierende Depolarisation der insulinsezernierenden β -Zellen der Bauchspeicheldrüse wird zur Stimulierung der Insulinfreisetzung pharmakotherapeutisch genutzt. Die Blockade der K_{ATP} -Kanäle in anderen Geweben (z.B. Kardiomyozyten, Vaskulatur) im Zuge einer Typ 2-Diabetestherapie ist mit potentiellen kardiovaskulären Komplikationen verbunden und daher unerwünscht (siehe z.B. Quast et al., 2004). Somit gilt, es bei der Entwicklung und beim therapeutischen Einsatz von insulinotropen Pharmaka, die Konzentrations-Wirkungs-, bzw. Konzentrations-Bindungs-Beziehungen der Substanzen an den jeweiligen K_{ATP} -Kanalsubtypen zu berücksichtigen (s. Fragestellung der Arbeit).

Verbindungen wie Tolbutamid, Glibornurid und Gliclacid (Abb. 6) gehören zu den kurzkettigen Sulfonylharnstoffen der ersten Generation. Sie besitzen zwei, über eine anionische Gruppe miteinander verbundene, hydrophobe Zentren. Der Träger der negativen Ladung muss

nicht obligatorisch die NH-azide Struktur eines Sulfonylharnstoffs sein. Im D-Phenylalanin-Derivat Nateglinid (Abb. 6), welches aufgrund vorhandener Strukturähnlichkeiten zur gleichen Ligandgruppe (A-Liganden) wie die kurzketigen Sulfonylharnstoffe gehört, fungiert eine Carboxylgruppe als Protonendonator. Die Bindungsregion für die A-Liganden ist im Bereich der TMD2 des SUR anzunehmen (s. Abb. 3). Ashfield et al., 1999 zeigten die Bedeutung der SUR-Transmembransegmente 14 bis 16 beim Hochaffinitätsblock der K_{ATP} -Kanäle durch Tolbutamid. Insbesondere ist dabei eine Aminosäure in der CL 8 zwischen TM15 und 16 zu nennen. Der Austausch von Serin in Position 1237 des SUR1 durch Tyrosin (korespondierende Aminosäure in SUR2-Isoformen) hebt die SUR-vermittelte Hemmung des Kanals durch Tolbutamid vollständig auf. Als Erklärung kommt dabei entweder eine direkte Behinderung des Zugangs der A-Liganden zur Bindungsregion durch das verhältnismäßig sperrige Tyrosin oder eine allosterische Konformationsänderung mit einem negativen Einfluss auf die Affinität der A-Liganden in Frage. Die A-Liganden gelten als SUR1-selektiv (Chachin et al., 2003; Reimann et al., 2001b; Meyer et al., 1999), und es wird vermutet, dass SUR1, jedoch nicht SUR2, eine Bindungstasche mit vorwiegend lipophilem Charakter besitzt, die mit dem Butylrest von Tolbutamid oder den analogen lipophilen Zentren anderer A-Liganden interagiert.

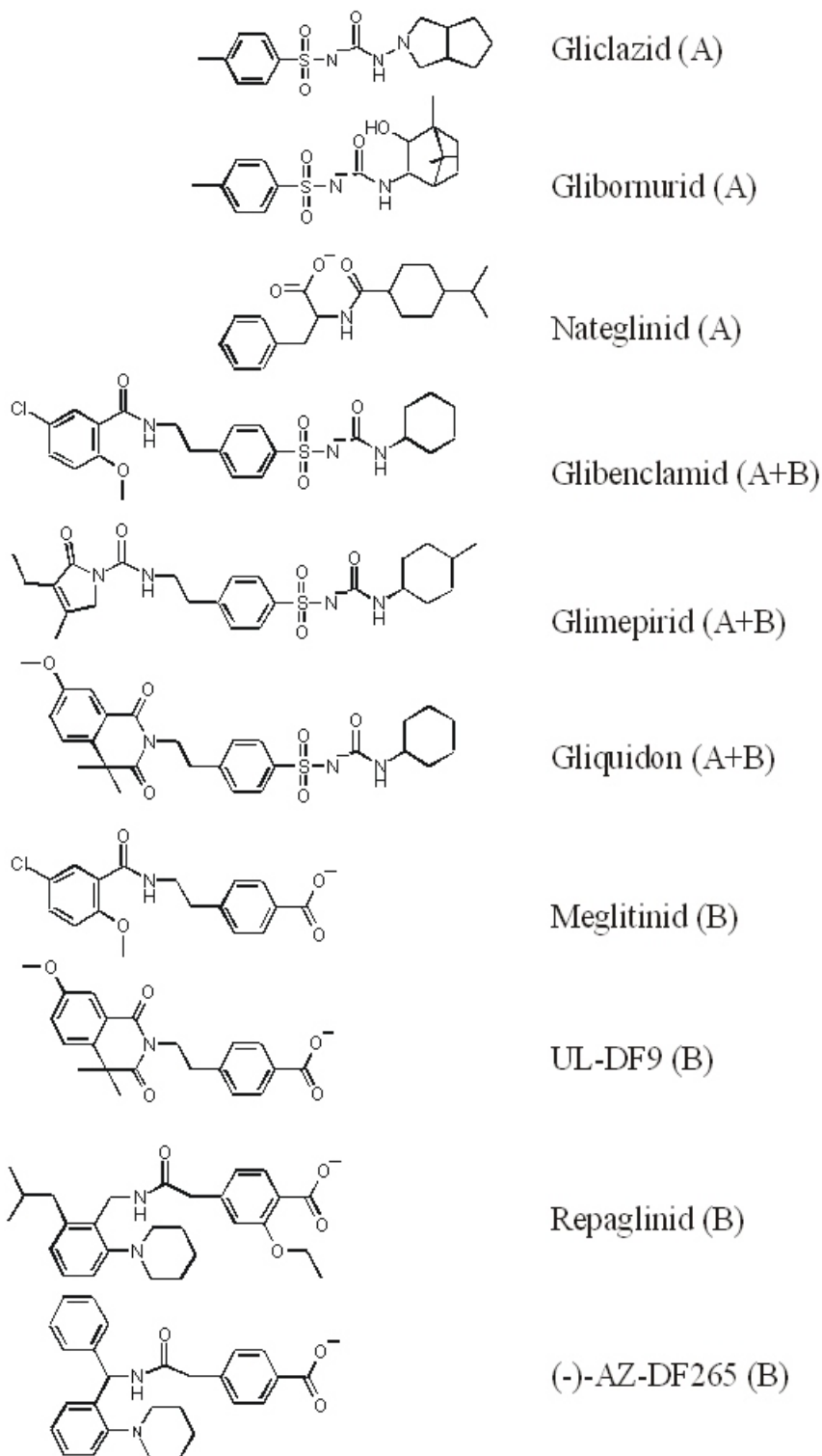


Abbildung 6 Strukturformeln ausgewählter K_{ATP} -Kanal-Blocker; nach Ligandgruppen (A, A+B und B-Liganden) geordnet.

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.

Die Erweiterung der kurzkettigen Sulfonylharnstoffe um ein weiteres, über ein Amid verknüpftes lipophiles Zentrum, führte zu Sulfonylharnstoffen der zweiten Generation wie z.B. Glibenclamid (GBC), Glimepirid und Gliquidon (Abb. 6). Die Affinität dieser Verbindungen zum SUR1 ist im Vergleich zu den kurzkettigen Sulfonylharnstoffen ca. 1000-fach höher. Die Transmembransegmente (TM) 14-16 sind ebenfalls an der Bindung der langkettigen Sulfonylharnstoffe beteiligt. Die Affinität von GBC zur SUR1(S1237Y)-Mutante ist geringer, als zum wildtypischen Rezeptor. Darüber hinaus wird Kir6.2/SUR1 durch GBC irreversibel, Kir6.2/SUR1(S1237Y) jedoch reversibel geblockt (Ashfield et al., 1999). Umgekehrt wird an Kanälen, die SUR2B als regulatorische Untereinheit enthalten, die Affinität der GBC-Bindung und die Potenz des GBC-Blocks durch die Substitution von Tyrosin durch Serin in Position 1206 erhöht (Hambrock et al., 2001). Erkenntnisse, dass ¹²⁵I-GBC SUR1-Proteinabschnitte innerhalb der TMD0 und der CL3 photomarkieren kann (Aguilar-Bryan et al., 1995) und die CL3 einen essentiellen Beitrag zur Ausbildung der Hochaffinitätsbindungsstelle für ³H-GBC leistet (Mikhailov et al., 2001), bekräftigten die ca. 30 Jahre alte Theorie über zwei Bindungsregionen (A und B) für Sulfonylharnstoffe der zweiten Generation innerhalb einer großen Substratbindungstasche am SUR (Gutsche et al., 1974; Rufer et al., 1974; Biere et al., 1974; s. auch Abb. 7). Die gleichzeitige Bindung der langkettigen SU an zwei Bindungsregionen (A: CL8, B: CL3) erklärt die hohe Affinität der Bindung, sowie die starke Potenz und die geringe Reversibilität des GBC-Blocks an Kir6.2/SUR1 (Ashcroft und Gribble, 1999; Ashfield et al., 1999). Interessanterweise konnte auch ein 38 kDa-Protein, welches später als Kir6.2 identifiziert wurde in Anwesenheit von SUR1 mit ¹²⁵I-Azidoglibenclamid photomarkiert werden (Schwanstecher et al., 1994b). Offenbar liegen Kir6.2-Strukturen in der Nähe der Bindungsregion B, oder sind gar ihr struktureller Bestandteil (vgl. 3D-Struktur von Mikhailov et al., 2005). Dieses Modell wird durch Untersuchungen, in denen die Koexpression mit Kir6.1 bzw. Kir6.2 zur Affinitätserhöhung von GBC zum SUR2B führte, bekräftigt (Russ et al., 1999; Hambrock et al., 2001). Sequenzvergleich der CL3-Region von SUR1 und SUR2, welche vermutlich mit den Benzamidostrukturen der langkettigen Sulfonylharnstoffe interagiert, zeigt keine großen Unterschiede zwischen den SUR-Subtypen (Bryan et al., 2005). In der Tat gelten die SU der zweiten Generation (= A+B-Liganden), als weniger SUR1-selektiv als die kurzkettigen SU der ersten Generation (= reine A-Liganden) (Überblick bei Proks et al., 2002).

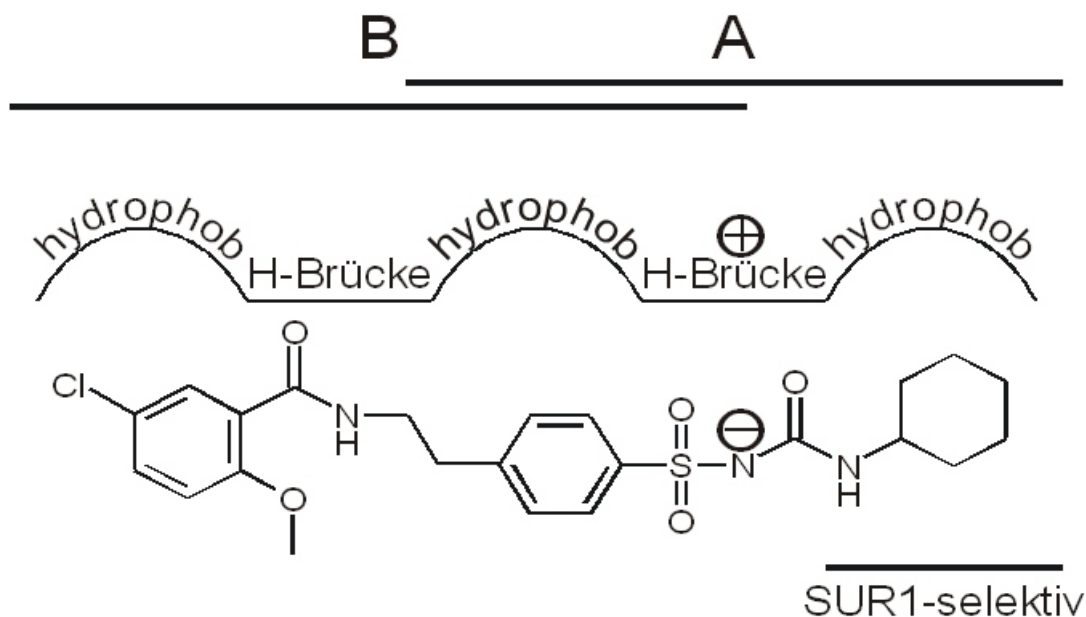


Abbildung 7 Modell der Blocker-Bindungstasche am SUR

Analyse der Ligandstrukturen erlaubt Vorhersagen über die Beschaffenheit der Bindungstasche. Sie besteht aus zwei sich überlappenden Bindungsregionen A und B. Die drei lipophilen Strukturen eines A+B-Liganden (hier GBC) interagieren mit drei hydrophoben Taschen des Rezeptors. Das Molekül kann zusätzlich über H-Brücken bzw. ionische Wechselwirkungen fixiert werden. Die rechte hydrophobe Tasche ist SUR1-exklusiv und befindet sich vermutlich im Bereich der CL8 (S1237). Die CL3 soll Bestandteil der linken hydrophoben Tasche sein. Über die Überlappungsregion ist bisher wenig bekannt.

Folgerichtig gelten die reinen B-Liganden wie z.B. Repaglinid und Meglitinid (s. Abb. 6) als im Wesentlichen unselektiv (Proks et al., 2002; Dabrowski et al., 2001). Als Benzoesäurederivate verfügen diese Verbindungen, zu denen auch (-)-AZ-DF265 und UL-DF9 (s. Abb. 6) gezählt werden, über den allen K_{ATP} -Kanal-Inhibitoren gemeinsamen zentralen Phenylring und eine benachbarte negative Ladung. Diese Struktur interagiert mit SUR-Regionen, die bisher nicht näher spezifiziert wurden. Zusätzlich werden die reinen B-Liganden durch die Anwesenheit einer Benzamidostruktur charakterisiert. Der lipophile Teil des Benzamids kann dabei sehr komplex ausfallen und Strukturen aufweisen, die aus der gemeinsamen Pharmakophore hinausragen (Piperidinogruppe bei Repaglinid und (-)-AZ-DF265; Hansen et al., 2002). Der konservierte Abstand zwischen dem Amidstickstoff und der anionischen Gruppe (deprotonierte Benzoesäure) scheint für die hypoglykämische Aktivität der B-, sowie A+B-Liganden entscheidend zu sein (Bryan et al., 2005). Das Fehlen einer lipophilen Struktur, welche die A-Liganden auszeichnet (Abb. 6: lipophiles Zentrum rechts), erklärt das Ausbleiben eines Effektes der S1237Y-Mutation am SUR1 auf den Meglitinid- und Repaglinid-Block (Ashfield et al., 1999; Hansen et al., 2002).

Die insulinotropen Verbindungen aller Ligandgruppen sind schwache organische Säuren mit pK_S -Werten zwischen $\sim 3,5$ und $6,5$ und liegen daher in wässrigen Lösungen bei physiologischen pH-Werten größtenteils deprotoniert vor (Bryan et al., 2005). Schwanstecher et al., 1994a zeigten,

dass die deprotonierte Form der Substanzen die tatsächlich wirksame Form darstellt und ihren Zugang zur Bindungsstelle vom Zytosol aus findet. Als Eintrittsweg in die Zelle wird von Kamp et al., 2003 ein Flip-Flop-Mechanismus postuliert, bei dem die protonierten Moleküle schnell durch die Zellmembran diffundieren und im Inneren der Zelle dissoziieren.

Eine charakteristische Konzentrations-Wirkungs-Kurve für den Tolbutamid-Block am Kir6.2/SUR1 in der Inside-out-Konfiguration der Saugelektrode zeigt eine hochaffine und eine niedrigaffine Blockkomponente (Ashcroft und Gribble, 1999). Die niedrigaffine Inhibition (millimolarer Bereich) kann auch in homomeren Kir6.2 C36-Kanälen beobachtet werden (Tucker et al., 1997), so dass diese Komponente des SU-Effekts auf direkte Interaktionen mit der Pore zurückzuführen ist. Diese Substanzwirkung ist klinisch von untergeordneter Bedeutung, da die therapeutischen Plasmakonzentrationen wesentlich niedriger sind (Sartor et al., 1980).

Der Mechanismus des hochaffinen Kir6.2/SUR1-Blocks kann als zweistufiger Prozess verstanden werden (Bryan und Aguilar-Bryan, 1999). In Abwesenheit von Mg-Nukleotiden verändert die SU-Bindung an den SUR die Konformation des K_{ATP} -Kanalkomplexes und führt dadurch zur Schließung der Pore. Dieser Vorgang erfordert die Intaktheit des Kir6.2-N-Terminus, da eine Verkürzung dieser Kir6.2-Region um mehr als 10 Aminosäuren den inhibitorischen SU-Effekt aufhebt (Reimann et al., 1999; Babenko et al., 1999). Sind Mg-Nukleotide anwesend, so wird deren aktivierende Wirkung (vermittelt durch die Bindung an SUR; siehe Kap. 1.2.4) auf den K_{ATP} -Kanal durch die SU-Interaktion mit dem SUR1 aufgehoben. Möglicherweise kann die Beobachtung von Ueda et al., 1999, dass GBC die Kooperativität zwischen der MgATP-Bindung an NBF1 und der MgATP/MgADP-Bindung an NBF2 stört, dieses Verhalten erklären. Da die kanalinhibierende Wirkung der Mg-Nukleotide (über Kir) unbeeinflusst bleibt, verstärkt sich insgesamt der SU-Block (Ashcroft und Gribble, 1999; Züncler et al., 1988; Schwanstecher et al., 1992a).

Die Verstärkung des SU-Blocks am Kir6.2/SUR1 durch die Präsenz der Mg-Nukleotide konnte an SUR2A-haltigen K_{ATP} -Kanälen nicht beobachtet werden. Im Gegenteil, scheinen hier Mg-Nukleotide die SU-Effekte zu antagonisieren (Gribble et al., 1998b; Dabrowski et al., 2001). Die so resultierende niedrigere Effektivität der SU an kardialen K_{ATP} -Kanälen, vor allem während ischämischer Phasen, bei erniedrigtem ATP/ADP-Quotienten (Venkatesh et al., 1991; Findlay, 1993), ist aus klinischer Sicht bei der Beurteilung der Selektivität insulinotroper Substanzen von erheblicher Bedeutung.

Die Sicherheit der Diabetes Typ-2-Therapie mit SU und Gliniden wird bis heute kontrovers diskutiert (Übersicht bei Quast et al., 2004). Besorgniserregende Beobachtungen aus der klinischen

Praxis dürfen dabei nicht ignoriert werden. So existieren zum Beispiel Anzeichen für reduzierte ST-Streckenerhöhung im EKG von Patienten mit akutem Myokardinfarkt bei gleichzeitiger Therapie mit SU (Huizar et al., 2003). Dadurch könnte die Aussagekraft des EKG bei der Infarktdiagnose beeinträchtigt werden. Eine mögliche Minderung der ischämischen Präkonditionierung (Cleveland, Jr. et al., 1997), sowie eine Reduktion des koronaren Blutflusses in Ruhe (Farouque et al., 2002) und während einer Hypoxie (Miura et al., 2003) gehören zu weiteren potentiellen unerwünschten Nebenwirkungen der Diabetesbehandlung mit K_{ATP} -Kanal-Inhibitoren. Obgleich kleinere Studien (Garratt et al., 1999; Aronow und Ahn, 2001) in der Tat Hinweise auf Gefahren des SU-Einsatzes bei Patienten mit erhöhtem kardiovaskulärem Risiko erbrachten, zeigten ausgedehnte Studien wie die UKPDS (Autoren der UKPDS-Studie, 1998) keine Häufung bzw. Verschlimmerung kardiovaskulärer Ereignisse unter einer SU-Therapie, auch nicht bei Hochrisikopatienten (Stevens et al., 2004). Trotz der ausgeprägten SUR1-Selektivität von Tolbutamid (Proks et al., 2002), gibt es überraschende Anzeichen für erhöhte Sterblichkeit bei Typ 2-Diabetikern, die mit dem A-Liganden behandelt wurden (Meinert et al., 1970; Simpson et al., 2006). Möglicherweise könnte eine potentielle Wechselwirkung von Tolbutamid mit den wenig erforschten $mitoK_{ATP}$ -Kanälen und die daraus resultierende Störung der ischämischen Präkonditionierung die Mortalitätserhöhung erklären.

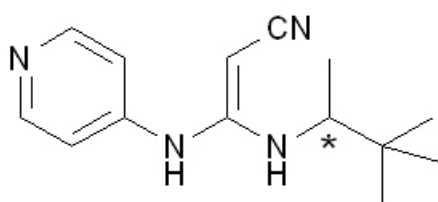
Vor diesem Hintergrund erscheint es wünschenswert, möglichst viele SU/Glinid-behandelte Patienten im Rahmen klinischer Studien zu überwachen. Darüber hinaus ist es sinnvoll, die Daten über die Selektivität der insulinotropen Verbindungen in geeigneten *in vitro*-Systemen zu ergänzen (siehe Fragestellung der vorliegenden Arbeit), sowie die Übertragbarkeit dieser Resultate auf physiologische/pathophysiologische Gegebenheiten zu überprüfen.

1.2.8.2 K_{ATP} -Kanal-Öffner

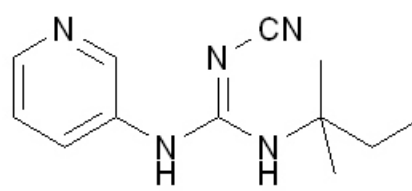
K_{ATP} -Kanal-Öffner binden wie die bereits beschriebenen Kanal-Blocker an die Sulfonylharnstoffrezeptoren. Zu der chemisch sehr heterogenen Substanzgruppe (siehe Abb. 8) gehören Cyanoguanidine (z.B. (-)Pinacidil und P1075), Benzopyrane (z.B. Bimakalim Levromakalim), Thioformamide (z.B. Aprikalim), Pyridylnitrate (z.B. Nicorandil), Pyrimidinsulfate (Minoxidilsulfat), oder Benzothiadiazine (z.B. Diazoxid). Die K_{ATP} -kanalaktivierende Wirkung dieser Verbindungen und die dadurch induzierte Hyperpolarisation der Zellmembranen ist mit breitem pharmakotherapeutischem Potential verbunden.

Trotz schwerer Nebenwirkungen werden Diazoxid und Minoxidil (wird im Organismus zur

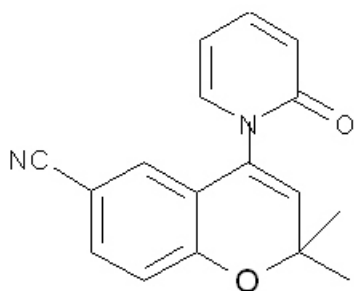
Wirkform Minoxidilsulfat sulfatiert) zur Behandlung hypertensiver Krisen bzw. therapierefraktärer Hypertonie eingesetzt. Diazoxid kann darüber hinaus als Öffner der pankreatischen K_{ATP} -Kanäle zur Behandlung von Hyperinsulinämien (siehe Kap. 1.2.7) herangezogen werden. Der duale Wirkmechanismus von Nicorandil (Aktivierung der K_{ATP} -Kanäle + NO-Freisetzung) qualifiziert diese Substanz für die Therapie der Angina Pectoris (Karow und Lang, 2002; Autoren der IONA-Studie, 2002). Darüber hinaus versucht die Pharmaindustrie, K_{ATP} -Kanal-Öffner für weitere Indikationen zu entwickeln. SDZ-217-744 (Benzopyranstruktur) könnte bei der Linderung bronchialer Hyperreaktivität zum Einsatz kommen (Buchheit und Fozard, 1999). Die Relaxation der glatten Muskulatur der Blase durch K_{ATP} -Kanal-Öffner des Cabinol- (ZD-6169) und Dihydropyridin-Typs (ZM-244085 und A-310110), sowie die kardioprotektive Wirkung der Benzopyrane wie BMS-191095 oder BMS-180448 stehen ebenfalls im Fokus der Forschung (Yu und de Groat, 1998; Trivedi et al., 1995; Atwal et al., 1993; Grover et al., 1995).



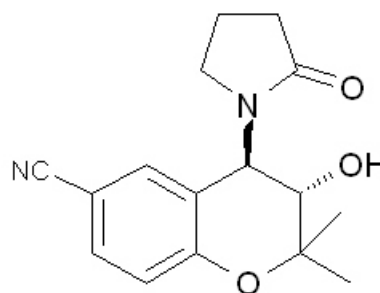
(-)Pinacidil



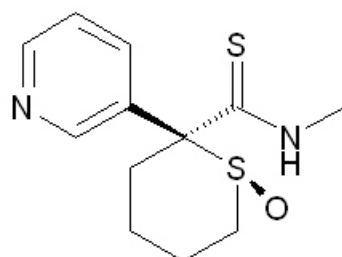
P1075



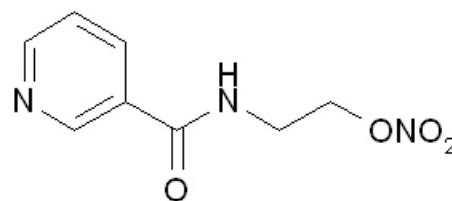
Bimakalim



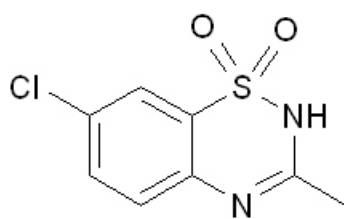
Levcromakalim



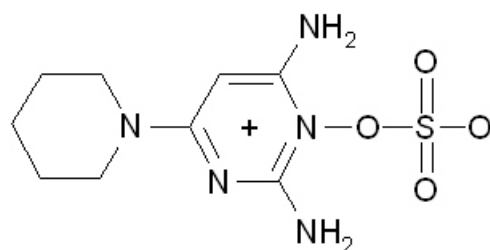
Aprikalim



Nicorandil



Diazoxid



Minoxidil-Sulfat

Abbildung 8 Strukturformeln ausgewählter K_{ATP} -Öffner

Leider limitiert bisher die unzureichende Gewebsspezifität und das daraus resultierende ungünstige Nebenwirkungsprofil der K_{ATP} -Kanal-Öffner deren klinische Bedeutung. Mit Ausnahme von Diazoxid zeigt SUR1 eine sehr geringe Affinität zu den klassischen Öffnern. Vor kurzem wurden jedoch Substanzen mit exzellenter SUR1-Selektivität entwickelt (Nielsen et al., 2002). SUR2-haltige K_{ATP} -Kanäle verfügen dagegen im Allgemeinen über hohe Öffneraffinität und -Empfindlichkeit. Geringe Unterschiede zwischen den Isoformen, wie zum Beispiel die im Vergleich zu Kir6.2/SUR2B niedrigere Diazoxid- und Nicorandil-Empfindlichkeit von Kir6.2/SUR2A (Isomoto et al., 1996 ; Shindo et al., 1998), sowie die ca. vierfach höhere Öffneraffinität zum SUR2B als zum SUR2A (Hambrock et al., 1999; Schwanstecher et al., 1998), sind auf Unterschiede in den letzten 42 Aminosäuren zurückzuführen (s. Kap. 1.2.3).

Bedingt durch das Fehlen hochaffiner Bindungsstellen für klassische Öffner am SUR1, konnten Untersuchungen der SUR1/SUR2-Chimären zur Charakterisierung der Öffnerbindungstasche beitragen (s. Abb. 3). Uhde et al., 1999 identifizierten innerhalb der SUR2B-TMD2 zwei Regionen (KCOI und KCOII), die für die Ausbildung der Hochaffinitätsbindung der Öffner essentiell sind. KCOI (Thr1059 bis Leu1087; Nummerierung des SUR2B der Ratte) soll im Bereich der zytosolischen Schleife liegen, welche die TM13 und TM14 verbindet (CL7). KCOII (Arg1218 bis Asn1320; ebenfalls SUR2B der Ratte) umfasst TM16 und TM17, sowie ein kurzes Segment der NBF2. Moreau et al., 2000 und Moreau et al., 2005a erkannten die Bedeutung einer Aminosäure in der SUR-TM17 für die Öffnerempfindlichkeit der K_{ATP} -Kanäle. Die Substitution von Methionin1290 im SUR1 durch Threonin (korrespondierende Aminosäure in der Position 1253 des SUR2A) konnte den Kir6.2/SUR1-Kanälen eine Kir6.2/SUR2A-ähnliche Öffnerempfindlichkeit verleihen. Radioligandbindungsstudien bestätigten die Rolle dieser Aminosäure bei der Öffnerbindung (Hambrock et al., 2004). Dem Bindungsmodell der Arbeitsgruppe um Michel Vivaudou nach, könnte an den SUR2-Isoformen das relativ kompakte Threonin1253 als Tor ("gate") zur Öffnerbindungsregion fungieren. Hochkonservierte aromatische Aminosäuren in der unmittelbaren Nachbarschaft sind vermutlich ebenfalls über Wechselwirkungen an der Ligandbindung beteiligt. Am SUR1 verhindert dagegen das verhältnismäßig sperrige Methionin den Zugang zur Bindungsregion (Moreau et al., 2005a). Obgleich bisher kein direkter Hinweis auf den Weg der Öffner zur Bindungsstelle vorliegt (siehe Fragestellungen der Arbeit), gehen die Autoren des Modells davon aus, dass die Öffnerbindungsstelle von außen (extrazellulär) zugänglich ist (Moreau et al., 2005b; Fig. 7b). Ergänzend sollte erwähnt sein, dass die Interaktionen zwischen SUR und Kir im Kanalkomplex keinen nennenswerten Einfluss auf die Bindung der Öffner haben (Schwanstecher et al., 1998;

Russ et al., 1999; Hambrock et al., 2001). Dies steht im Gegensatz zum Einfluss der Koexpression mit Kir6.x auf die SU- und Glinid-Bindung an SUR (s. Kap. 1.2.8.1 und Fragestellung der Arbeit).

Diazoxid und seine Derivate nehmen unter den K_{ATP} -Kanal-Öffnern eine Sonderstellung ein. Alle bekannten K_{ATP} -Kanalsubtypen können durch Diazoxid aktiviert werden (Moreau et al., 2005b); obgleich für die Öffnung der Kir6.2/SUR2A-Kanäle ADP-Konzentrationen von über 10 μ M notwendig sind (D'ahan et al., 1999). Die geringe Selektivität erschwert die Aufklärung der Diazoxid-Bindungsregionen mittels SUR1/SUR2-Chimären, sodass man die Diazoxid-Bindungsstelle am SUR nur ungefähr eingrenzen konnte. Es ist jedoch klar, dass Diazoxid und die restlichen Öffner an unterschiedliche SUR-Regionen binden (Babenko et al., 2000a; Moreau et al., 2000), sich aber gegenseitig aus dem Rezeptor verdrängen können (Hambrock et al., 1998). TM8-11 könnten einen Teil der Diazoxid-Bindungsregion ausmachen (Dabrowski et al., 2002).

Die Bindungsregionen der Öffner und Blocker der K_{ATP} -Kanäle sind benachbart, aber nicht identisch. Sie sind miteinander negativ allosterisch gekoppelt (Löffler-Walz et al., 2002; Schwanstecher et al., 1992b; Bray und Quast, 1992). Die Fähigkeit der Kanal-Modulatoren, sich gegenseitig aus den Bindungsstellen zu verdrängen ist klinisch nicht ohne Bedeutung. Aus *in vitro*-Studien geht hervor, dass die Nicorandil-Aktivierung der Kir6.2/SUR2A- und Kir6.2/SUR2B-Kanäle durch GBC aufgehoben werden kann. SUR1-selektive SU wie Gliclazid zeigten dagegen erwartungsgemäß diesen Effekt nicht (Reimann et al., 2001a). Die NO-Freisetzung (s.o.) sollte dagegen durch Blocker nicht beeinflussbar sein (Hata et al., 2001). Nichtsdestotrotz ist das Wechselwirkungspotential zwischen Blockern und Öffnern beim gleichzeitigen klinischen Einsatz zu berücksichtigen.

Während die Chimärenforschung große Fortschritte bei der Identifizierung der Öffnerbindungsregionen brachte, ist der Wirkungsmechanismus der Substanzen noch unvollständig verstanden. Die Bindung und Wirkung der Öffner erfordert die Anwesenheit hydrolysierbarer Mg-Nukleotide (Schwanstecher et al., 1992b; Schwanstecher et al., 1998; Quast et al., 1993). Dabei führen Mutationen in beiden NBF, welche die Nukleotidbindung und die ATP-Hydrolyse stören, zur Schwächung der Öffnerbindung an den SUR (Schwanstecher et al., 1998). Die gegenseitige allosterische Kopplung der Öffner- und Nukleotidbindungsregionen wird durch den Einfluss der Öffner auf die ATPase-Aktivität bestätigt (Bienengraeber et al., 2000) und liefert vermutlich den Schlüssel zum Verständnis der Öffnerwirkung. Im Zuge der Nukleotidbindung und Hydrolyse an den NBF durchläuft der SUR zyklische Zustandsänderungen, vergleichbar mit Prozessen in verwandten, bakteriellen ABC-Proteinen (Locher et al., 2002; Davidson und Chen, 2005). Dabei wird der posthydrolytische Zustand mit der Aktivierung des Kanals in Verbindung gebracht

(Zingman et al., 2001; Matsuo et al., 2005; siehe auch Kap. 1.2.4.1). Denkbar ist, dass die Öffnerbindung einen solchen Zustand induziert, und/oder stabilisiert (Moreau et al., 2005b). Die Aktivität der Kanalpore alleine, bestehend nur aus den Kir-Untereinheiten, wird dagegen durch die Öffner nicht reguliert (Tucker et al., 1997).

1.2.9 Fragestellungen der Arbeit

Die vorliegende Arbeit verfolgte vier Hauptfragestellungen:

- Selektivität von Sulfonylharnstoffen und Gliniden in Bindung und Wirkung für die drei wichtigsten K_{ATP} -Kanalsubtypen Kir6.2/SUR1, Kir6.2/SUR2A und Kir6.1/SUR2B.
- Einfluss der Koexpression mit Kir6.x auf die Bindung von Sulfonylharnstoffen und Gliniden an SUR1.
- Einfluss der Mutation Y1206S auf den Sulfonylharnstoffrezeptor SUR2A und den K_{ATP} -Kanal Kir6.2/SUR2A.
- Zugang der K_{ATP} -Kanal-Öffner vom Benzopyran-Typ an ihre Bindungsstelle: Vergleich der Bindungs- und Wirkungseigenschaften von Bimakalimsulfonsäure (BMSA) und Bimakalim am Kir6.2/SUR2B.

1.2.9.1 Selektivität von Sulfonylharnstoffen und Gliniden in Bindung und Wirkung für die drei wichtigsten K_{ATP} -Kanalsubtypen Kir6.2/SUR1 (Pankreas), Kir6.2/SUR2A (Herz) und Kir6.1/SUR2B (Gefäßmuskel)

K_{ATP} -Kanäle sind in der Physiologie und Pathophysiologie wichtiger Organe von großer Bedeutung (s. Kap. 1.2.6). Kir6.2/SUR1-Kanäle in den β -Zellen des Pankreas regulieren die Insulinfreisetzung, Kir6.2/SUR2A-Kanäle des Herzmuskels schützen das Myokard vor Schädigung durch den adrenergen Stress oder durch Ischämie, Kir6.1/SUR2B-Kanäle sind an der Regulierung des Vasotonus und somit u.a. bei der Mobilisierung der Koronarreserve beteiligt. Die als Diabetes Typ 2-Therapeutika zugelassenen Sulfonylharnstoffe und Glinide forcieren die Insulinfreisetzung über die Blockade des pankreatischen K_{ATP} -Kanals. Um mögliche unerwünschte Nebenwirkungen zu vermeiden, sollten die blutzuckersenkenden Arzneimittel möglichst selektiv den Kir6.2/SUR1-Kanal, nicht jedoch die kardiovaskulären K_{ATP} -Kanäle inhibieren.

Bisher verfügbare Daten zur Selektivität der Sulfonylharnstoffe und Glinide resultieren meist

aus elektrophysiologischen Experimenten und ergeben folgendes Bild: die A-Liganden (kurzkettige SU, Nateglinid, Mitiglinid) sind stark Kir6.2/SUR1-selektiv; A+B-Liganden (langkettige SU) weisen gewisse Selektivität zum pankreatischen K_{ATP} -Kanal auf, die aber weniger ausgeprägt ist als, die der reinen A-Liganden; B-Liganden (Repaglinid und andere nicht als Arzneimittel zugelassene Benzoesäurederivate wie z.B. Meglitinid) sind nicht selektiv (s. Kap. 1.2.8.1).

Vor diesem Hintergrund verwundert es, dass Substanzen mit beschränkter (z.B. GBC) und sogar nicht vorhandener (z.B. Repaglinid) Selektivität therapeutisch erfolgreich, d.h. ohne gravierende Nebenwirkungen hervorzurufen, eingesetzt werden können. Ist etwa der regulatorische Beitrag der K_{ATP} -Kanäle zur Funktion des kardiovaskulären Systems von untergeordneter Bedeutung? Oder bedürfen die Erkenntnisse über die Selektivität der insulinotropen Substanzen einer Überprüfung?

In dieser Arbeit wurde der zweite Aspekt dieser Frage untersucht. Mit dem Ziel homogene Datensätze zu erhalten sollten repräsentative Vertreter der Ligandgruppen (s. Abb. 6) in einem einheitlichen, möglichst physiologischen System (HEK293-Ganzzelluntersuchungen bei 37°C) untersucht werden. In Bindungsstudien mit ^3H -GBC als Radioligand wurde daher die Affinität (Inhibitionskonstante K_i) ausgewählter Inhibitoren (A+B-Liganden: GBC, Glimepirid, Gliquidon; A-Liganden: Gliclazid, Glibornurid, Nateglinid; B-Liganden: Meglitinid, UL-DF9, Repaglinid, AZ-DF265) zu den wichtigsten rekombinanten K_{ATP} -Kanälen (Kir6.2/SUR1, Kir6.2/SUR2A und Kir6.1/SUR2B) bestimmt. Ferner erfolgte die Untersuchung der Wirkung von GBC und Repaglinid auf die genannten Kanalsubtypen mit Hilfe der Saugelektrode-technik. Die auf diesem Wege erhaltenen Daten können, zusammen mit Ergebnissen klinischer Studien, bei der Risikobeurteilung des therapeutischen Einsatzes der insulinotropen Substanzen dienen. Potentielle Regelmäßigkeiten, d.h. gruppenspezifische Gemeinsamkeiten bzw. Abweichungen im Ligandverhalten (Bindung + Wirkung) sollten ferner unser Wissen über die Struktur-Wirkungs- bzw. Struktur-Bindungs-Beziehungen an K_{ATP} -Kanälen erweitern.

1.2.9.2 Einfluss der Koexpression mit Kir6.x auf die Bindung von Sulfonylharnstoffen und Gliniden an SUR1

Im K_{ATP} -Kanalkomplex sind die Kir- und SUR-Untereinheiten strukturell und funktionell eng miteinander assoziiert (s. Kap. 1.2.1). Beispielsweise verleihen die regulatorischen Untereinheiten (SURs) der Kanalpore (Kir) die Empfindlichkeit gegenüber Pharmaka wie SU und Gliniden (Tucker et al., 1997). Welchen Einfluss jedoch die Koexpression mit Kir6.x auf die Bindung der

SU und Glinide an den SUR hat, ist weitgehend unklar.

Russ et al., 1999 berichteten über eine Erhöhung der GBC-Affinität zum SUR2B infolge der Koexpression mit Kir6.1. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Effekte der Koexpression mit Kir6.x auf die SU- und Glinidbindung an den SUR1 zu untersuchen. Zunächst wurde die Affinität der ausgesuchten Blocker zum SUR1 (aus der Dissertation von Frau Susanne Bieger) mit der Affinität zum vollständigen Kir6.2/SUR1 verglichen. Die dabei resultierenden, eventuellen Unterschiede sollten uns als Signal bei der Identifizierung und eventuell auch Charakterisierung der Kir-Region dienen, welche für die Veränderung der SU- bzw. Glinidbindung an den SUR1 essentiell ist.

Aus einer Publikation von Reimann et al., 1999 geht hervor, dass Modifikationen (Sequenzänderungen und Verkürzungen) des Kir6.2-N-Terminus zur Schwächung des SU-Blocks, bis hin zur vollständigen funktionellen Entkopplung von Kir6.2 und SUR1 führen können. Wir transfizierten deshalb HEK293-Zellen mit SUR1 und Kir-Mutanten, die N-terminal um 5, 10 und 20 Aminosäuren verkürzt, bzw. in welchen die basischen Aminosäuren Arginin und Lysin in Position 4,5 jeweils durch Alanin substituiert wurden, um in ^3H -GBC-Bindungsversuchen herauszufinden ob und in welchem Ausmaß sich durch diese Mutationen der potentielle Einfluss der porenbildenden Untereinheiten auf die Blockerbindung ändert. Die Experimente wurden sowohl an intakten Zellen (MgATP in der Zelle anwesend), als auch an Zellmembranen in Abwesenheit von MgATP durchgeführt. Dadurch sollte eine Abschätzung des Einflusses von MgATP sowie der Rezeptorpräparation auf die untersuchten Effekte möglich werden.

Hambrock et al., 2001 weisen auf eine leichte Kir6.x-Subtypabhängigkeit des affinitätserhöhenden Effektes der Koexpression auf die SU-Bindung an SUR2B(Y1206S) hin. Ob dies ebenfalls für SUR1 gilt war bisher nicht bekannt und sollte deshalb ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit geklärt werden.

1.2.9.3 Einfluss der Mutation Y1206S auf den Sulfonylharnstoffrezeptor SUR2A und den K_{ATP} -Kanal Kir6.2/SUR2A

Die SUR2-Spleißvarianten 2A und 2B unterscheiden sich lediglich innerhalb der letzten 42 Aminosäuren (Inagaki et al., 1996; Isomoto et al., 1996). In dieser Abweichung liegt die Ursache für diverse funktionelle Unterschiede zwischen den beiden SUR2-Isoformen. Darunter fällt z.B. die unterschiedliche Empfindlichkeit auf MgADP, Nicorandil und Diazoxid (Shindo et al., 1998; Matsuoka et al., 2000; Matsushita et al., 2002), unterschiedliche Stabilisierung des Öffner (P1075,

Pinacidil)-Kanalkomplexes (Kir6.2/SUR2A vs. Kir6.2/SUR2B) (Reimann et al., 2000), oder unterschiedliche Schwächung der ^3H -GBC-Bindung durch MgATP (Hambrock et al., 2002a).

Im Fokus der Arbeit unserer Arbeitsgruppe stand u.a. die Untersuchung der Ligandbindungseigenschaften an SUR2A. Insbesondere sollte dabei der Einfluss der Y1206S-Mutation auf die Bindung des Blockers GBC (s. Abb. 6) und des Öffners P1075 (s. Abb. 8) an SUR2A untersucht werden, einschließlich der allosterischen Wechselwirkung zwischen den beiden Kanal-Modulatoren. Ferner galt es den Effekt der Koexpression mit Kir6.2 auf die GBC- und P1075-Bindung an SUR2A bzw. SUR2A(Y1206S) zu bestimmen. Eventuelle Differenzen zu den Ergebnissen vergleichbarer Studien am SUR2B (Hambrock et al., 2001; Löffler-Walz et al., 2002) wären dann ebenfalls auf die Unterschiede im C-Terminus zurückzuführen.

Der Umfang dieses Projektes erforderte die Mitarbeit mehrerer Mitglieder der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. U. Quast. In dieser Dissertation wurden folgende Fragestellungen in Radioligandbindungsstudien an permanent bzw. transient exprimierten rekombinanten K_{ATP} -Kanaluntereinheiten untersucht:

- Einfluss der Koexpression mit Kir6.2 auf die GBC-Bindung an SUR2A in HEK293-Membranversuchen in Abwesenheit von MgATP.
- Einfluss der Koexpression mit Kir6.x auf die GBC-Bindung an SUR2A(Y1206S) in Ganzzellversuchen.
- Einfluss der Koexpression mit Kir6.2 und der Y1206S-Mutation auf die P1075-Bindung an SUR2A in Membranversuchen in Anwesenheit von MgATP.
- Wie äußert sich die allosterische Kopplung zwischen GBC und P1075 am Kir6.2/SUR2A(Y1206S)-Kanal in Membranversuchen unter Verwendung von ^3H -GBC (in Abwesenheit von MgATP) und ^3H -P1075 (in Anwesenheit von MgATP) als Radioligand?
- Wie verdrängt P1075 den Radioliganden ^3H -GBC aus der SUR2A-Bindung in Membranversuchen in Abwesenheit von MgATP?

Die Bestimmung des Effektes der Koexpression mit Kir6.2 auf die Glimepirid- und Meglitinid-Bindung an SUR2A(Y1206S) in Ganzzellversuchen ergänzt die Arbeit an diesem Projekt.

1.2.9.4 Der Zugang der K_{ATP} -Kanal-Öffner vom Benzopyran-Typ an ihre Bindungsstelle: Vergleich der Bindungs- und Wirkungseigenschaften von Bimakalimsulfonsäure (BMSA) und Bimakalim am Kir6.2/SUR2B

Es war bis heute nicht geklärt, ob die K_{ATP} -Kanal-Öffner von der Innen- oder Außenseite der Zellmembran an den Sulfonylharnstoffrezeptor binden (s. Kap. 1.2.8.2). Vorausgesetzt, dass das im Labor von Prof. Dr. Horst Weber (Uni Düsseldorf) synthetisierte, unserer Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Horst Lemoine (Uni Düsseldorf) zur Verfügung gestellte saure Bimakalim-Analogen Bimakalimsulfonsäure (BMSA, s. Abb. 9) bei den gewählten Versuchsbedingungen deprotoniert vorliegt und somit wenig membrangängig ist, sollte die Analyse seines Bindungsverhaltens (untersucht als Verdrängung von ^3H -P1075) an Kir6.2/SUR2B-Membranen bzw. ganzen Zellen sowie des Aktivierungspotentials am rekombinanten K_{ATP} -Kanal der glatten, nicht vaskulären Muskulatur (Kir6.2/SUR2B) in verschiedenen elektrophysiologischen Konfigurationen (i/o vs. wc) die Art des Zugangs der Benzopyran-Öffner zu ihrer Bindungsregion offenlegen.

An Kir6.2/SUR2B-Membranen ist, vorausgesetzt BMSA bindet überhaupt, mit regulärer Verdrängungskurve zu rechnen, da hier die SUR-Bindungsstelle für Benzopyranöffner, unabhängig von ihrer Lokalisation, zugänglich ist. Ist jedoch die Bindungsstelle ausschließlich von der Innenseite der Membran aus zugänglich, so sollte sie für ein geladenes Molekül an intakten, Kir6.2/SUR2B-exprimierenden Zellen schlecht erreichbar sein. In diesem Fall wird BMSA nicht in der Lage sein ^3H -P1075 mit hoher Affinität vom Rezeptor zu verdrängen. Kann jedoch BMSA von der Membranaußenseite aus binden, so wird sowohl an Zellen wie auch an Membranen ähnliche ^3H -P1075-Verdrängung erwartet.

In der Elektrophysiologie wird der Einsatz von BMSA in der Inside-out-Konfiguration nur dann zur Kanalaktivierung führen, wenn diese Substanz ein ausreichendes Öffnerpotential besitzt und von der zytosolischen Seite aus ihre Bindungsstelle erreicht. Entsprechend ist ein Effekt in den Ganzzellexperimenten nur bei einer von außen erreichbaren Bindungsregion möglich.

Das Benzopyran Bimakalim (s. Abb. 8) sollte als ungeladene membrangängige Kontrollsubstanz in Membran- und Zellversuchen ^3H -P1075 mit ähnlicher Affinität verdrängen, sowie eine Öffnerwirkung in allen elektrophysiologischen Konfigurationen zeigen.

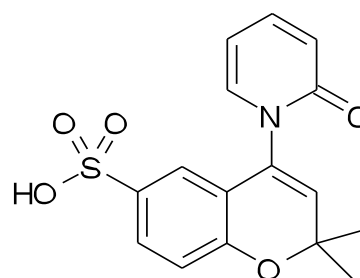


Abbildung 9 Strukturformel der Bimakalimsulfonsäure (BMSA)

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

| | |
|--|---------------------------------------|
| Ampicillin | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D |
| ATP-Na ₂ | Boehringer, Mannheim, D |
| BaCl ₂ | Fluka, Buchs SG, CH |
| CaCl ₂ | Merck, Darmstadt, D |
| CuSO ₄ | Merck, Darmstadt, D |
| DMSO | Merck, Darmstadt, D |
| EDTA-Na ₂ | Fluka, Buchs SG, CH |
| EGTA | Sigma Aldrich, Taufkirchen, D |
| EndoFree Plasmid MaxiKit | Qiagen, Hilden, D |
| EndoFree Plasmid MegaKit | Qiagen, Hilden, D |
| Ethanol 99% p.a. | Merck, Darmstadt, D |
| FBS | Invitrogen, Auckland, UK |
| Folin-Ciocalteau-Reagenz (2M) | Fluka, Buchs SG, CH |
| GDP-Na | Sigma Aldrich, Taufkirchen, D |
| Geneticinsulfat | Invitrogen, Auckland, UK |
| Gentamicin | Invitrogen, Auckland, UK |
| D(+)-Glukose*H ₂ O | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D |
| Glycerin | Merck, Darmstadt, D |
| HCl | Fluka, Buchs SG, CH |
| Hefeextrakt | ICN Biomedicals, Ohio, USA |
| HEPES | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D |
| K ⁺ /Na ⁺ -Tartrat | Merck, Darmstadt, D |
| KCl | Merck, Darmstadt, D |
| K ⁺ -Glutamat | Fluka, Buchs SG, CH |

| | |
|---------------------------------------|-------------------------------|
| Lipofectamin | Invitrogen, Auckland, UK |
| Lipofectamin2000 | Invitrogen, Auckland, UK |
| MEM+L-Gln+Earle's Salze | Invitrogen, Auckland, UK |
| MgCl ₂ *6 H ₂ O | Merck, Darmstadt, D |
| NaCl | Merck, Darmstadt, D |
| Na ₂ CO ₃ | Merck, Darmstadt, D |
| NaHCO ₃ | Merck, Darmstadt, D |
| NaOH | Merck, Darmstadt, D |
| OptiMEM I | Invitrogen, Auckland, UK |
| Poly-D-Lysin | Sigma Aldrich, Taufkirchen, D |
| TRIS | Fluka, Buchs SG, CH |
| Trypton (Pepton) | Invitrogen, Auckland, UK |
| UDP-Na | Sigma Aldrich, Taufkirchen, D |
| Ultima Gold | Packard Instruments, USA |
| Zeocin | InvivoGen, San Diego, USA |

2.1.2 Synthetische K_{ATP}-Kanal-Modulatoren

2.1.2.1 K_{ATP}-Kanal-Blocker: Sulfonylharnstoffe und Glinide

| | |
|---------------|------------------------------------|
| (-)-AZ-DF 265 | Thomae, Biberach, D |
| Glibenclamid | Sigma Aldrich, Taufkirchen, D |
| Glibornurid | Hoffmann-La Roche, Basel, CH |
| Glimepirid | Sanofi Aventis, Frankfurt a. M., D |
| Meglitinid | Sanofi Aventis, Frankfurt a. M., D |
| Nateglinid | Novartis, CH |
| Repaglinid | Novo Nordisk, DK |
| UL-DF 9 | Thomae, Biberach, D |

Von den Substanzen wurden Stammlösungen verschiedener Konzentrationen (Verdünnungsreihe) in Ethanol/DMSO (1:1; vol % : vol %) hergestellt. Aliquote dieser Lösungen wurden direkt oder über eine Zwischenverdünnung mit Inkubationspuffer je nach geforderter

Konzentration in die Reaktionsansätze pipettiert.

2.1.2.2 K_{ATP} -Kanal-Öffner

| | |
|-------------------------------|------------------------------------|
| Bimakalim | Prof. H. Lemoine (Uni Düsseldorf) |
| BMSA (Bimakalimsulfonsäure) | Prof. H. Weber (Uni Düsseldorf) |
| Cromakalim | GlaxoSmithKline, UK |
| S853951 (Cromakalim-Tetrazol) | Sanofi Aventis, Frankfurt a. M., D |
| P1075 | Leo Pharmaceuticals, DK |

Mit Ausnahme von BMSA und S853951 wurden aus den Substanzen Stammlösungen verschiedener Konzentrationen (Verdünnungsreihe) in Ethanol/DMSO (1:1; vol % : vol %) hergestellt. Aliquote dieser Lösungen wurden direkt, oder über eine Zwischenverdünnung im Inkubationspuffer je nach geforderter Konzentration in die Reaktionsansätze pipettiert.

BMSA und S853951 wurden als saure Verbindungen direkt im HEPES (0,1 M)-Puffer gelöst und mit NaOH neutralisiert.

2.1.2.3 Radioliganden

| | |
|----------------------------|-------------------------------|
| ^3H -Glibenclamid | PerkinElmer Life Science, USA |
| ^3H -P1075 | Amersham Buchler, D |

2.1.3 Geräte

2.1.3.1 Geräte für Zellkultur und Radioligandbindung

| | |
|----------------|---|
| Autoklav | 2540 MK; Tuttnauer, Wesel, D |
| Brutschrank | B5060EC/CO ₂ ; Heraeus, Stuttgart, D |
| Tiefkühltruhe | GFL 6384; GFL, Burgwedel, D |
| Laminar Flow | Hera Safe; Heraeus, Stuttgart, D |
| Photometer | Bio Photometer; Eppendorf, Hamburg, D |
| Stickstofftank | XLC 511-FD; Chart Europe, Solingen, D |

| | |
|------------------------|--|
| Wasserbad | W12; P-D Industriegesellschaft, Dresden, D |
| Tischzentrifuge | Biofuge Primo, Heraeus, Stuttgart, D |
| Ultrazentrifuge | Optima L-70; Beckman, USA |
| Filtrationsapparatur | H. Hölzer Laborgeräte, Dorfen, D |
| Filtrationsvakuumpumpe | N 026.3; KNF Neuberger, Freiburg, D |
| Feinwaage | Precisa 100A-300M; PAG Oerlikon, CH |

2.1.3.2 Geräte für Elektrophysiologie

| | |
|--|--|
| Elektrodenziehgerät | DMZ-Universalpuller, Zeitz-Instrumente, Augsburg, D |
| Elektroden Glas | GC150T-7.5 und GC150-7.5, Harvard Apparatus LTD, Edenbridge (Kent), GB |
| Mikromanipulator | PatchMan, Eppendorf, Hamburg, D DC3K, Märzhäuser, Wetzlar, D |
| Mikroskop | Axiovert 100, Zeiss, Stuttgart, D Nikon ECLIPSE TS 100, Düsseldorf, D |
| Filtersatz (für Fluoreszenz- anregung) | Filtersatz 13, Zeiss Stuttgart, D B-2A, Nikon, Düsseldorf, D |
| Oszilloskop | MH 205-3, HAMEG GmbH, Frankfurt a. M., D PM 3305 35 MHz, Koninklijke Philips Electronics, N.V, Eindhoven, NL |
| Software | Pulse, HEKA Elektronik, Lamprecht/Pfalz, D Chart, ADInstruments, Castle Hill (NSW), AUS Clamfit, Axon Instruments, Union City, USA |
| Verstärker | EPC 9, HEKA Elektronik, Lamprecht/Pfalz, D EPC10, HEKA Elektronik, Lamprecht/Pfalz, D GeneClamp 500, Axon Instruments, Union City, USA |

| | |
|---|--|
| AD-Wandler | ITC-16 (EPC 9), InstruTECH, Port Washington (NY), USA ITC-1600 (EPC 10), InstruTECH, Port Washington (NY), USA MacLab/2e, ADInstruments, Castle Hill (NSW), AU |
| Ventile / Spule des Perfusionssystem | Sirai S10407 / Z030A, Elettromeccanica S.r.l. Bussero (MI) Italien (0,76 mm ID; 1,65 mm OD; 0,4 mm) |

2.1.4 Puffer und Medien

2.1.4.1 Puffer und Medien für die HEK293-Zellkultur und Radioligandbindungsstudien

Sämtliche Puffer wurden gekühlt (2-8°C) aufbewahrt.

2.1.4.1.1 Hypotoner Lysepuffer

HEPES: 10 mM

EGTA: 1 mM

Dieser Puffer wurde bei der Herstellung der Zellmembranpräparationen zur Lyse von HEK293-Zellen verwendet. Nach Auflösung der Substanzen in aqua bidest und Abkühlung des Puffers auf 6°C erfolgte die pH-Werteinstellung auf 7,4.

2.1.4.1.2 Isotoner Inkubationspuffer für Radioligandbindungsstudien an Membranen

HEPES: 5 mM

NaCl: 139 mM

KCl: 5 mM

Die Substanzen wurden in aqua bidest gelöst, der Puffer auf 37°C temperiert und auf pH 7,4 eingestellt. Derart präparierter Puffer diente in den Radioligandbindungsstudien zur Inkubation der Reaktionsansätze, sowie zur Herstellung wässriger Substanzverdünnungsreihen. Ein Puffer gleicher Zusammensetzung wurde auch zur Suspendierung und Aufbewahrung der

Zellmembranpräparation benutzt. Für diese Anwendung wurde jedoch der pH-Wert von 7,4 bei 0°C eingestellt.

2.1.4.1.3 Inkubationspuffer für Radioligandbindungsstudien an ganzen Zellen

| | |
|---------------------|---------|
| HEPES: | 5 mM |
| NaCl: | 139 mM |
| KCl: | 5 mM |
| MgCl ₂ : | 1,2 mM |
| D(+)-Glucose: | 11 mM |
| CaCl ₂ : | 1,25 mM |

Zuerst wurden HEPES, NaCl, KCl und MgCl₂ in aqua bidest gelöst und ca. 30 min bei 37°C mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) begast. Nach der Begasung erfolgte die pH-Einstellung auf 7,4 und der Zusatz restlicher Pufferkomponenten (D(+)-Glucose, CaCl₂).

Dieser Puffer wurde in Experimentreihen verwendet, die in den Kapiteln 3.1.1, und 3.3.1.3 vorgestellt werden. Eine dauerhafte und zuverlässige pH-Werteinstellung erwies sich bei diesem Carbogen-begasteten Puffer als problematisch. Aus diesem Grund wurde in Versuchsreihen aus den Kapiteln 3.2.1, 3.3.4, 3.4.2 und 3.4.3 ein modifizierter O₂-begaster Inkubationspuffer mit folgender Zusammensetzung verwendet:

2.1.4.1.4 Modifizierter Inkubationspuffer für Radioligandbindungsstudien an ganzen Zellen

| | |
|----------------------|---------|
| HEPES: | 10 mM |
| NaCl: | 129 mM |
| KCl: | 5 mM |
| MgCl ₂ : | 1,2 mM |
| NaHCO ₃ : | 5 mM |
| D(+)-Glucose: | 11 mM |
| CaCl ₂ : | 1,25 mM |

Der Puffer wurde wie unter 2.1.4.1.3. beschrieben hergestellt.

2.1.4.1.5 Waschpuffer

TRIS: 50 mM

NaCl: 154 mM

Dieser Puffer wurde während der Bindungsexperimente zur Trennung von gebundenem und ungebundenem Radioliganden herangezogen. Der Puffer wurde durch Aqua dest.-Verdünnung einer zehnfach konzentrierten Stammlösung der Substanzen hergestellt. Die Einstellung des pH-Wertes 7,4 erfolgte bei ca. 6°C.

2.1.4.1.6 Standard-Kulturmedium (SKM) für die HEK293-Zelllinie

MEM mit Earles-Salzen und L-Glutamin: 90 %

hitzeinaktiviertes FBS (s.u.): 10 %

Gentamycin: 20 µg/ml

Die einzelnen Komponenten des Mediums wurden unter keimfreien Bedingungen (Laminar Flow) zusammenpipettiert (500 ml MEM + 56 ml FBS + 5,6 ml Gentamycin (2 mg/ml)) und bis zur Verwendung bei 2-8°C aufbewahrt. Unmittelbar vor der Zugabe zu den Zellen wurde das Medium auf 37°C temperiert.

Das fötale Kälberserum (FBS) enthält für das Wachstum von HEK293-Zellen wichtige mitogene Faktoren. Um mögliche Restaktivität von Serumproteasen zu eliminieren wurde das FBS 1 bis 2 Stunden im Wasserbad bei 55°C hitzeinaktiviert. Vor der Inaktivierung wurde FBS bei -20°C, nach der Inaktivierung bei 6°C aufbewahrt.

Gentamycin stört als Aminoglykosid-Antibiotikum die bakterielle Proteinsynthese und wirkt auf ein breites Spektrum grampositiver und gramnegativer Bakterien. Die Substanz ist gegen mehrere Mykoplasmen-Stämme, jedoch nicht gegen Hefen, Schimmelpilze und Protozoen einsetzbar. Die HEK293-Zelltoxizität ist gering. Das Aminoglykosid ist bei 37°C und pH 2-10 lange (ca. 2 Wochen) stabil, darüber hinaus kann es autoklaviert werden und eignet sich daher gut für den Einsatz in der Zellkultur. Die käuflich erwerbliche Stammlösung hat die Konzentration von 50 mg/ml. Aus dieser Lösung wurden durch Verdünnen mit sterilem bidestilliertem Wasser 6 ml-Aliquote (c = 2 mg/ml) angesetzt, bei -20°C aufbewahrt und zur Herstellung von SKM (Gentamycin-Konzentration von 20 µg/ml) verwendet.

2.1.4.1.7 Gefriermedium

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

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

Die Mischung aus Gefriermedium A und Gefriermedium B wurde zur Kryokonservierung von HEK293-Zellen verwendet (s. Kap. 2.2.1.2).

2.1.4.1.8 Stammlösungen für die Proteinbestimmung nach Lowry

Lowry A: 2 % (w/v) Na_2CO_3 in 0,1 NaOH

Lowry B: 1 % (w/v) CuSO_4 in aqua bidest

Lowry C: 2 % (w/v) K^+/Na^+ -Tartrat in aqua bidest

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

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

Lowry E: 98 Teile Lowry A + 1 Teil Lowry C + 1 Teil Lowry B (bei der Herstellung ist die Reihenfolge einzuhalten, da es sonst zur Ausflockung kommt)

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

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

2.1.4.2 Medien zur Kultivierung von Bakterien

2.1.4.2.1 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 |

Das Medium wurde mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt und autoklaviert. Danach konnte es zur Kultivierung (Vermehrung) von transformierten E. coli verwendet werden. Zur Selektion der transformierten Bakterien wurde dem LB-Medium eine geeignete Menge an Antibiotikum (100 µg/ml Ampicillin bei der Gewinnung von Plasmid-DNA, die für SUR und Kir kodiert, 30 µg/ml Kanamycin bei der Gewinnung von Plasmid-DNA, die für GFP kodiert) zugesetzt. Ampicillin wurde aus einer 50 mg/ml-Stammlösung pipettiert; die Kanamycin-Stammlösung hatte eine Konzentration von 10 mg/ml.

2.1.4.2.2 Medium zur Lagerung der transformierten Bakterien

| | |
|-----------------------------------|--------|
| Bakteriensuspension in LB-Medium: | 850 µl |
| Glycerin: | 150 µl |

In diesem Gemisch wurden transformierte Bakterien bei -80°C gelagert. Aliquote daraus wurden entnommen (150 µl), um 150 ml frisches LB-Medium + Antibiotikum (s. Kap. 2.2.1.1.1) anzuimpfen und die Bakterien zu vermehren.

2.1.4.3 Lösungen für elektrophysiologische Experimente

2.1.4.3.1 Badlösungen

2.1.4.3.1.1 Na⁺-HEPES-Badlösung

| | |
|-------|--------|
| NaCl: | 142 mM |
| KCl: | 2,8 mM |

| | |
|---------------------|-------|
| CaCl ₂ : | 1 mM |
| MgCl ₂ : | 1 mM |
| HEPES: | 10 mM |
| D(+)-Glukose: | 11 mM |

Der pH-Wert des Puffers wurde bei Raumtemperatur auf 7,4 eingestellt. Diese Lösung wurde als Badpuffer in Ganzzellexperimenten verwendet.

2.1.4.3.1.2 K⁺-HEPES-Badlösung

| | |
|---------------------|--------|
| KCl: | 142 mM |
| NaCl: | 2,8 mM |
| CaCl ₂ : | 1 mM |
| MgCl ₂ : | 1 mM |
| HEPES: | 10 mM |
| D(+)-Glukose: | 11 mM |

Der pH-Wert des Puffers wurde bei Raumtemperatur auf 7,4 eingestellt. Diese Lösung wurde als Badpuffer in Inside-out- und Cell-attached-Versuchen verwendet. Darüber hinaus diente sie in Inside-out- und Cell-attached-Versuchen als Pipettenlösung.

2.1.4.3.2 Pipettenlösung für Ganzzell-Experimente

| | |
|---------------------------|--------|
| K ⁺ -Glutamat: | 132 mM |
| NaCl: | 10 mM |
| MgCl ₂ : | 2 mM |
| EGTA: | 1 mM |
| HEPES: | 10 mM |
| Nukleotide: | s.u. |

Der pH-Wert wurde bei Raumtemperatur auf 7,2 eingestellt. In der Ganzzellkonfiguration wurde entweder 1 mM MgATP + 0,3 mM MgGDP (Versuchsreihen im Kap. 3.1.2), oder 3 mM MgATP (Versuchsreihen im Kap 3.4.4.2) als Nukleotid-Komponente eingesetzt.

2.1.4.3.3 Perfusionslösung für Inside-out-Experimente

| | |
|---------------------|---------|
| KCl: | 143 mM |
| CaCl ₂ : | 1 mM |
| MgCl ₂ : | 0,85 mM |
| EGTA: | 5 mM |
| HEPES: | 10 mM |
| D(+)-Glukose: | 11 mM |

Dieser Lösung wurden nach Bedarf Nukleotide zugesetzt (0,3 mM UDP + 0,03 mM ATP bzw. 1 mM ATP in Versuchsreihen aus Kap. 3.1.2.1.2; keine Nukleotide bzw. 1 mM ATP in Versuchsreihen aus Kap. 3.4.4.1). Beim Nukleotideinsatz wurde der Puffer um äquimolares Mg²⁺ ergänzt. Damit betrug die Konzentration an freiem Mg²⁺ 0,7 mM (1,5 mM Mg²⁺ wurden durch EGTA komplexiert). Vollständige Perfusionslösungen wurden bei Raumtemperatur auf pH7,2 eingestellt.

2.1.4.3.4 Lösung für die Agarbrücke

| | |
|-------|------------------------------------|
| KCl: | 200 mM |
| Agar: | 1,5 % in entmineralisiertem Wasser |

Zur Herstellung von Agarbrücken wurden Glaskapillaren (Kimble Products, Vineland, New Jersey USA) mit einem Durchmesser von 1,2-1,5 mm verwendet. Diese lagen als Meterware vor, wurden in 7,5 cm lange Stücke geschnitten, in der Bunsenbrennerflamme U-förmig gebogen und mit klar gekochter, heißer Agarlösung durch Kapillarkräfte gefüllt. Gelagert wurden die Agarbrücken in wässriger 200 mM KCl-Lösung bei 4-8°C.

2.2 Methoden

2.2.1 Methoden der Zellkultur

2.2.1.1 Kultivierung von HEK293-Zellen

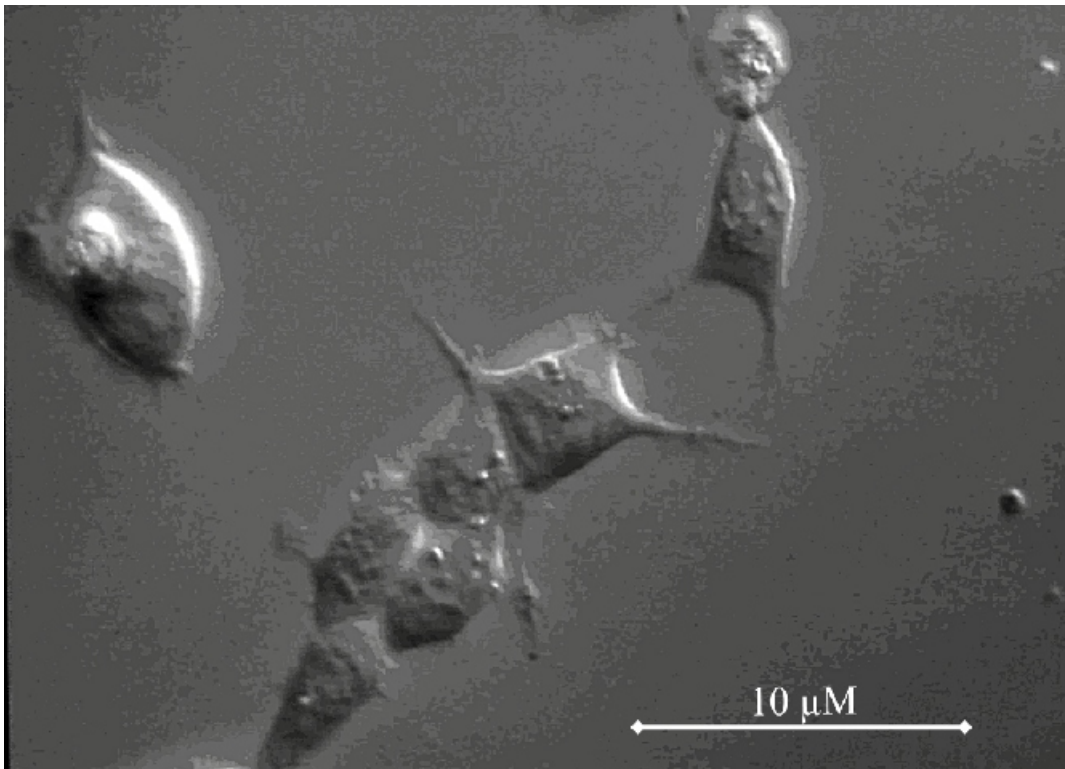


Abbildung 10 Lichtmikroskopische Abbildung der HEK293-Zellen.
400-fache Vergrößerung im Differenz-Interferenz-Kontrastmodus

Die HEK293-Zelllinie (s. Abb. 10) wurde von der Firma DSMZ, Braunschweig, Deutschland (Kat.-Nr. DMSACC305) erworben. Sie stammt aus humanen embryonalen Nierenzellen, die durch das DNA-haltige Adenovirus Typ5 tumorös transformiert und dadurch immortalisiert wurden (Graham et al., 1977).

Die Zellen wurden in sterilen Petrischalen aus Plastik (Durchmesser 9,4 cm; Greiner 94/16) in 10 ml Standard-Kulturmedium (Kap. 2.1.4.1.6) bei 37°C in der mikroaerophilen Atmosphäre (Luft/CO₂-Verhältnis von ~5 %, 95 % relative Luftfeuchtigkeit) des Brutschanks (Heraeus Instruments, Deutschland) kultiviert. Nachdem die Konfluenz der Zellen pro Schale 60-80 % erreicht hatte (3-4 Tage nach letzter Passage), erfolgte unter keimfreien Bedingungen (Verwendung von sterilem Material unter der Laminar-Flow-Box) eine Zellpassage im Verhältnis 1:2 bis 1:5.

Dabei wurde zunächst das alte Standard-Kulturmedium abgesaugt. Die Zellen wurden anschließend mit 2-5 ml (je nach Passageverhältnis) frischem Standard-Kulturmedium (temperiert auf 37°C) unter Verwendung einer 1 ml-Pipette durch Auf- und Abpipettieren (kein Trypsin notwendig) vom Boden der Kulturschale abgelöst. Jeweils 1 ml der entstandenen Zellsuspension wurde in neue Kulturschalen überführt und auf ein Endvolumen von 10 ml mit Standard-Kulturmedium (37°C) ergänzt.

2.2.1.1.1 Einsatz von Selektions-Antibiotika bei der Kultivierung permanent transfizierter HEK293-Zellen

In Radioligandbindungsstudien wurden u.a. HEK293-Zellen verwendet, die verschiedene SUR-Subtypen permanent exprimierten. Diese Zelllinien wurden in unserer Arbeitsgruppe von Frau Dr. Hambrock wie in Hambrock et al., 1998 beschrieben hergestellt. Außer der cDNA, die für den jeweiligen SUR kodierte, befand sich auf dem Plasmid (pcDNA3.1; Invitrogen), mit dem die HEK293-Zellen transfiziert wurden, auch ein Resistenz-Gen für das Aminoglykosid-Antibiotikum Geneticin. Die erfolgreiche permanente Aufnahme dieser Plasmide in die Zelle gewährleistete somit nicht nur die permanente Expression der gewünschten SUR-Subtypen sondern ermöglichte ebenfalls das Überleben unter Geneticin-Selektionsdruck (Geneticin wirkt auch auf Säugerzellen toxisch). Um transfizierte von untransfizierten Zellen zu selektionieren wurde eine Geneticin-Konzentration von 300 µg/ml Standard-Kulturmedium (Kap. 2.1.4.1.6) eingesetzt.

In elektrophysiologischen Experimenten wurden HEK293-Zellen untersucht, die den rekombinanten Kir6.1/SUR2B-Kanal permanent exprimierten (s. Kap. 3.1.2.3). Die permanente Kotransfektion der HEK293-Zellen mit Kir6.1- und SUR2B-DNA wurde von Herrn Marcus Winkler nach dem Protokoll von Giblin et al., 1999 durchgeführt. Das dabei verwendete SUR2B-kodierende Plasmid (pcDNA3.1; Invitrogen) trug auch ein Resistenz-Gen für Geneticin (s.o.). Das Kir6.1-kodierende Plasmid (pcDNA3.1/Zeo; Invitrogen) exprimierte zusätzlich das SH ble-Gen, welches den transfizierten Zellen die Resistenz gegen das Glykopeptidantibiotikum Zeocin verlieh. Erfolgreich permanent kotransfizierte Zellen konnten somit unter gleichzeitigem Einsatz von 300 µg Geneticin/ml Standard-Kulturmedium und 0,15 mg Zeocin/ml Standard-Kulturmedium kultiviert werden.

2.2.1.2 Einfrieren von HEK293-Zellen

Eingefroren wurden nur Zellen, die in der Kulturschale eine Konfluenz von 70-80 % erreicht hatten. Dabei wurde der Zellinhalt einer Schale in einem Kryoröhrchen (Cryo.s, Greiner Labortechnik) konserviert und eingefroren.

Nach dem Absaugen des Standard-Kulturmedium wurden die Zellen mit 4 ml auf 37°C erwärmtem Gefriermedium A (Kap. 2.1.4.1.7) vom Schalenboden abgelöst, in ein 50 ml-Falcon-Tube überführt und 2-3 min bei 500 g und Raumtemperatur zentrifugiert (Biofuge primo, Heraeus). Unterdessen wurden 500 µl Gefriermedium B (Kap. 2.1.4.1.7) in ein Kryoröhrchen pipettiert. Im Anschluss an das Zentrifugieren wurde der Überstand eines Falcon-Behälters entfernt und der Bodensatz (= Zellmaterial) in 500 µl Gefriermedium A (RT) resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde dann mit dem vorgelegten Gefriermedium B (RT) im Kryoröhrchen vorsichtig vermischt. Da das DMSO im Gefriermedium B zwar eine Zellschädigung beim Einfrieren oder Auftauen verhindert, jedoch bei Raumtemperatur zytotoxisch wirkt, wurden die Zellen schnellstmöglich nach dem Kontakt mit dem Detergens auf Eis herabgekühlt. Das fertig präparierte Kryoröhrchen wurde nun über Nacht bei -80°C aufbewahrt und anschließend in flüssigem Stickstoff dauergelagert.

2.2.1.3 Auftauen von HEK293-Zellen

Die konservierten Zellen wurden aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und im Wasserbad bei 37°C angetaut, bis nur noch ein kleiner Eiskern im Kryoröhrchen zu erkennen war. Der Inhalt des Kryoröhrchens wurde nun in ein zuvor vorbereitetes 50 ml-Falcon-Tube mit 20 ml Standard-Kulturmedium (37°C) schnell überführt und 2-3 min bei 500 * g zentrifugiert (Biofuge primo, Heraeus). Nach dem Absaugen des Überstandes erfolgte die Resuspendierung des Bodenstandes aus aufgetauten HEK293-Zellen in 10 ml Standard-Kulturmedium (37°C) und die Überführung der Zellsuspension in eine Petrischale (Durchmesser 9,4 cm). Am darauf folgenden Tag wurde das Standard-Kulturmedium gewechselt. Sobald die Zell-Konfluenz 60-80 % erreichte (im Allgemeinen nach 3-4 Tagen), konnten die Zellen erstmals passagiert und gegebenenfalls (bei permanent transfizierten Zellen) der Einwirkung von Geneticin bzw. Geneticin und Zeocin (s.o.) ausgesetzt werden.

2.2.1.4 Transiente Transfektion von HEK293-Zellen

2.2.1.4.1 Verwendete Plasmide

Die Amplifikation der Plasmid-DNA erfolgte in hitzetransformierten E. coli-Bakterien (XL1 Blue MRF's supercompetent cells, Stratagene; Max Efficiency DH 5 Competent Cells, Invitrogen) unter Verwendung von Qiagen-Maxiprep- (bei pcDNA3.1-Vektoren), bzw. Qiagen-Megaprep-Kit (bei pECE-Vektoren). Verfahren wurden nach den Standard-Herstellerprotokollen.

Tabelle 2 Folgende Plasmide wurden bei transienten Transfektionen von HEK293-Zellen verwendet:

| cDNA (GenBank Nr.) | Spezies | Vektor | Vektor-Größe in kb | Ursprungslabor |
|--------------------|---------|-----------------|--------------------|-------------------------------|
| - | - | pcDNA3.1(+) | 5.428 | |
| - | - | pcDNA3.1/Zeo(+) | 5.015 | |
| - | - | pECE | 2.891 | |
| GFP | - | pEGFP-C1 | 4.7 | |
| Kir6.1 [D88159] | Maus | pcDNA3.1(+) | 7.1 | Y. Kurachi & Y. Horio (Osaka) |
| “ | “ | pcDNA3.1/Zeo(+) | 6,7 | Y. Kurachi & Y. Horio (Osaka) |
| Kir6.2 [D50581] | Maus | pcDNA3.1(+) | 6,692 | Y. Kurachi & Y. Horio (Osaka) |
| Kir6.2 [NM000525] | Mensch | pECE | | J. Bryan (Houston) |
| Kir6.2- N-Mutanten | “ | “ | | J. Bryan (Houston) |
| SUR1 [X97279] | Ratte | pcDNA3.1(+) | 10,15 | C. Derst (Marburg) |
| SUR2A [D86037] | Maus | pcDNA3.1(+) | 11,6 | Y. Kurachi & Y. Horio (Osaka) |
| SUR2A(Y1206S) | “ | “ | “ | U. Quast / A. Hambrock* |
| SUR2B [D86038] | Maus | pcDNA3.1(+) | 11,4 | Y. Kurachi & Y. Horio (Osaka) |
| SUR2B(Y1206S) | “ | “ | “ | U. Quast / A. Hambrock* |

In den ersten 3 Reihen sind leere Vektoren aufgeführt, die für keine Funktionseinheit kodieren. Diese Vektoren werden zur Scheintransfektionen der Kontrollzellen verwendet.

* Die Mutanten SUR2A(Y1206S) und SUR2B(Y1206S) wurden mit Hilfe des QuickChange Site-Directed Mutagenesis System (Stratagene, Amsterdam NL) von Frau Dr. A. Hambrock hergestellt.

2.2.1.4.2 Transiente Transfektion mittels LipofectaminTM-Methode

Transfiziert wurden Zellen, die nach ihrem Auftauen mindestens zwei, jedoch nicht mehr als 40 mal passagiert wurden und deren Konfluenz in Petrischalen 60-80 % betrug.

Bei der Transfektion wurde zunächst ein Transfektionsmedium, bestehend aus den DNA-Komponenten (Vektoren mit Kir- und/oder SUR-cDNA; s. Tab. 2) und LipofectaminTM-Reagenz (25 µl Lipofectamin/DNA-Komponente) in 1,6 ml OptiMEM I hergestellt, 20 min vorinkubiert und mit weiteren 6,3 ml OptiMEM I verdünnt. Während der 20-minütigen Vorinkubation des Transfektionsmediums wurden die zu transfizierenden Zellen mit 10 ml OptiMEM I gewaschen. Danach wurde das Transfektionsmedium auf die Zellen gegeben. Während der anschließenden 5-stündigen Inkubation im Brutschrank erfolgte die Aufnahme der DNA-Liposomen-Komplexe in die HEK293-Zellen. Das Transfektionsmedium wurde nach der Inkubation mit 10 ml Nährmedium (80 % MEM + 20 % FBS) ergänzt. Ein Mediumwechsel gegen das Standard-Kulturmedium erfolgte nach 24 Stunden.

Etwa zwei Tage nach Beginn der Transfektion erreicht die Expression der gewünschten K_{ATP}-Kanaluntereinheiten das Maximum. Ab diesem Zeitpunkt eignen sich die transfizierten Zellen somit optimal für Radioligandbindungsversuche oder die Präparation von Zellmembranen.

Für die Transfektion wurden insgesamt 10 µg DNA pro Zellkulturschale verwendet. Die Kotransfektion der Zellen mit Kir- und SUR-DNA wurde mit dem Ziel durchgeführt, vollständige Kanalkomplexe mit möglichst wenig an freiem SUR zu erhalten. Das in der Kotransfektion eingesetzte molare Kir/SUR-Verhältnis betrug deshalb mindestens 1. Die genaue photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration in den verwendeten DNA-Stammlösungen sowie die Berücksichtigung der jeweiligen Plasmidgröße (s. Tab. 2) sind zur korrekten Ermittlung der notwendigen DNA-Mengen zwingend erforderlich.

2.2.1.4.3 Transiente Transfektion mittels Lipofectamin2000TM-Methode

Diese Transfektionsmethode erwies sich im Laufe der Promotionsarbeit als die effizientere und wurde seitdem als Standard angewandt. Zur Transfektion mit Lipofectamin2000TM-Reagenz wurden Schalen mit Zellkonfluenz > 90 % verwendet. Am Vortag der Transfektion wurde das Standard-Kulturmedium gegen Gentamycin-freies Nährmedium (MEM + 10 % FBS) ausgetauscht.

Am Transfektionstag wurden pro Zell-Schale zwei 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße mit jeweils 750 µm vorgewärmtem (37°C) OptiMEM I gefüllt. In eins der Reaktionsgefäße wurden die

DNA-Komponenten und in das andere 37,5 μl Lipofectamin2000TM-Reagenz zugegeben und 5 min vorinkubiert. Nach Ablauf der Vorinkubation wurde das DNA-Gemisch zum Lipofectamin-Gemisch gegeben (nicht umgekehrt!), vorsichtig gemischt und weitere 20 min inkubiert, um die Bildung der DNA-Lipofectamin2000-Mizellen zu ermöglichen. Im Anschluss an die Inkubation wurde die Kulturschale mit den zu transfizierenden Zellen aus dem Brutschrank entnommen, das Volumen des Nährmedium um 4 ml reduziert und mit dem inkubierten Transfektionsgemisch versetzt. Bis zur experimentellen Verwendung (Radioligandbindungsversuche) bzw. bis zur Herstellung von Zellmembranen wurden die transfizierten Zellen zwei Tage im Brutschrank inkubiert. Zellen, die elektrophysiologisch untersucht werden sollten, wurden bereits ca. 24 Stunden nach Beginn der Transfektion mit frischem Standard-Kulturmedium abgelöst und, entsprechend verdünnt, auf kleine sterile Petrischalen (35 mm Durchmesser) mit Poly-D-Lysin-beschichteten Deckgläsern verteilt (s. Kap. 2.2.3.2.1).

Für alle experimentellen Untersuchungen mit Ausnahme der Ganzzellkonfiguration der Saugelektrodeentechnik wurden bei der Transfektion insgesamt 10 μg DNA pro Schale (d.h. auch pro 37,5 μl Lipofectamin2000TM-Reagenz) verwendet. Um zu starke Kanalexpression und in der Folge zu starke Ströme in der Ganzzellkonfiguration der Saugelektrodeentechnik zu vermeiden, wurden Transfektionen für diese Anwendung mit einer maximalen DNA-Menge von 1 μg pro Schale durchgeführt (s. Kap. 3.1.2 und 3.4.4). Bei Kotransfektionen mit Kir- und SUR-DNA wurden molare Plasmidverhältnisse angestrebt, die nach der Expression der einzelnen Kanaluntereinheiten vollständige Kanalkomplexbildung mit möglichst wenig freiem SUR gewährleisten (Kir/SUR-Verhältnisse ≥ 1).

2.2.1.4.4 Anwendung von GFP

Das grün fluoreszierende Protein (GFP) verfügt über ein aus der Tripeptidsequenz Ser⁶⁵-Tyr⁶⁶-Gly⁶⁷ bestehendes Chromophor welches im UV-Licht grüne Fluoreszenz erzeugt. Die Anregungsmaxima des Proteins liegen bei 395 nm und 470 nm; die Emission hat ein Hauptmaximum bei 509 nm und ein Nebenmaximum bei 540 nm (Chalfie, 1995). Das Protein kann in eukaryotischen Zellen exprimiert werden. Sein Leuchten im UV-Licht wurde daher als Hilfsmittel bei der Identifizierung von erfolgreich transfizierten HEK293-Zellen in elektrophysiologischen Experimenten genutzt. Zu diesem Zweck wurden die HEK293-Zellen zusätzlich mit pEGFP-C1-Vektoren in einer Konzentration von 1 μg /Schale kotransfiziert.

2.2.1.5 Herstellung einer mikrosomalen Membranfraktion aus HEK293-Zellen

Aus HEK293-Zellen, die infolge einer permanenten bzw. transienten Transfektion die gewünschten rekombinanten K_{ATP} -Kanäle oder deren Untereinheiten exprimierten, konnten Zellmembranen präpariert werden.

Für die Präparation wurden Zellen verwendet, die eine Konfluenz von mindestens 60 % erreicht hatten. Als erstes wurde etwa die Hälfte des Standard-Kulturmedium aus der Schale abgesaugt. Das restliche Medium diente zum Ablösen der Zellen vom Schalenboden durch wiederholtes Aufsaugen und Rückpipettieren. Die Zellsuspension wurde in 50 ml-Falcon-Tube überführt und 5 min bei Raumtemperatur und 500 * g zentrifugiert (Tischzentrifuge Biofuge Primo, Heraeus, Stuttgart, D). Im Anschluss wurde der Überstand abgesaugt und der aus HEK293-Zellen bestehende Bodensatz im gekühlten (~0°C) hypotonen Puffer (Kap. 2.1.4.1.1; 4 ml/Schale) aufgenommen und dadurch lysiert. Es folgte die Zentrifugation des Lysats für 30 min bei 100 000 * g und 4°C (Ultrazentrifuge Optima L-70; Beckman, USA). Nach dem Entfernen des Überstandes wurde das Pellet im gekühlten isotonen Inkubationspuffer (pH 7,4 bei 0°C; Kap. 2.1.4.1.2) durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert (0,3 -1,0 ml/Schale), in 2-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -80°C eingefroren. Derart hergestellte Membranpräparationen wurden für Radioligandbindungsstudien verwendet.

2.2.1.6 Proteinbestimmung der Membranfraktion nach Lowry

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 blau-violetten Komplexes zwischen den Peptidbindungen und den Cu^{2+} -Ionen (Lowry E; Kap. 2.1.4.1.8). Im zweiten Schritt reduzieren die Cu^{2+} -Proteinkomplexe das Folin-Ciocalteau-Reagenz (Lowry F; Kap. 2.1.4.1.8). 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 je nach verwendeter Membrankonzentration mit wässriger 0,1 M NaOH-Lösung 1:10 oder 1:20 verdünnt. Ein Aliquot gleichen Volumens vom reinen Inkubationspuffer (Kap. 2.1.4.1.2, 2.1.4.1.3 und 2.1.4.1.4) wurde gleichermaßen mit 0,1 M NaOH verdünnt und zur Leerwertbestimmung herangezogen. Dies war notwendig, da die freien Stickstoffgruppen von HEPES im

Inkubationspuffer mit den Lowry-Reagenzien erheblich interferieren.

Zu Beginn der Proteinbestimmung wurden jeweils 200 μl der NaOH-verdünnten Membranen- bzw. Inkubationspuffer-Probe in Halbmikroküvetten überführt und mit 1 ml Lowry E-Lösung (Kap. 2.1.4.1.8) versetzt. Nach 5-minütiger Inkubation erfolgte die Zugabe von 100 μl Lowry F-Lösung, wonach die Inhalte der Küvetten gemischt und fern von 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

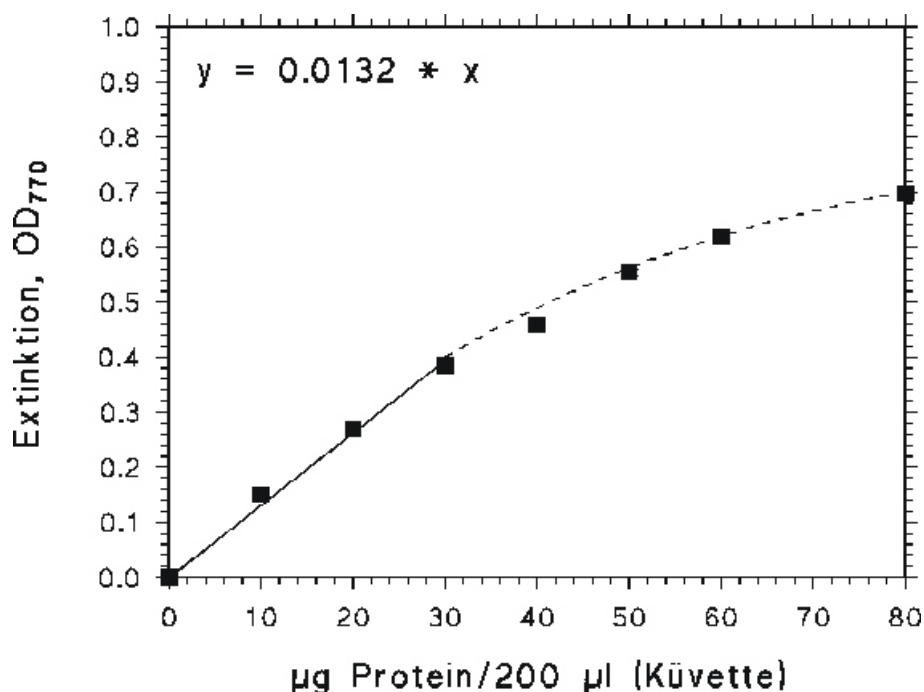


Abbildung 11:

Kalibrierkurve für die Proteinbestimmung nach Lowry. Die durchgezogene Linie gibt den linearen Bereich bis 30 μg Protein wieder, bei Berücksichtigung aller Messpunkte erhält man eine Sättigungsfunktion (gestrichelt).

der Membransuspension und des Inkubationspuffers (OD_{770}) wurde nach der folgenden Formel:

$$\text{OD}_{770} = 0,0132 * m_{\text{Prot}} (\mu\text{g}/\text{Küvette})$$

zur Bestimmung der Proteinkonzentration herangezogen. Voraussetzung dafür war, dass sich die gemessenen Extinktionswerte im linearen Bereich der Kalibrierkurve aus der Abbildung 11 befanden. 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. 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 Extinktion der einzelnen Verdünnungen photometrisch gemessen. Die Auftragung der resultierenden OD₇₇₀-Werte gegen die vorgegebene BSA-Konzentration ergab die Kalibrierkurve in der Abbildung 11. Die durchgezogene Linie gibt dabei den linearen Bereich bis 30 µg wider. In diesem Bereich sollten sich auch die Werte der Bestimmungen des Protein aus den Bindungsversuchen bewegen.

2.2.2 Radioligandbindungsstudien

Die Untersuchung der Radioligand-Rezeptor-Bindung gehört zu den unentbehrlichen Methoden der Rezeptorforschung. Mit ihrer Hilfe gelingt es Rezeptoren zu identifizieren, isolieren und charakterisieren. Ein großer Teil der Ergebnisse dieser Dissertation wurde mit Hilfe dieser Methode erzielt. Für die Untersuchung der Fragestellungen (Kap. 1.2.9) eigneten sich Gleichgewichtsexperimente. Bei diesem Versuchstyp wird vorausgesetzt, dass die Radioligand-Rezeptor-Bindung dem Massenwirkungsgesetz unterliegt. Nach einer gewissen Zeit befindet sich dabei das Reaktionssystem (Rezeptor-Ligand-Assoziation und -Dissoziation) im Gleichgewicht, so dass keine Änderung der Bindung mit der Zeit beobachtet werden kann. Diese Zeit wird in Gleichgewichtsexperimenten als Inkubationszeit gewählt und ist von den kinetischen Konstanten k_{on} und k_{off} sowie von der Konzentration der Reaktionsteilnehmer abhängig. Gleichgewichtsbindungsstudien können in Sättigungs- und Konkurrenzexperimente unterteilt werden:

Sättigungsexperimente:

In diesen Experimenten kann die Gleichgewichtsdissoziationskonstante (K_D) des Radioliganden und die gesamte Bindungskapazität (B_{max}) der Rezeptorpräparation technisch relativ einfach bestimmt werden (vgl. Kap. 2.2.2.3.1). Dabei wird im Allgemeinen die Konzentration des Rezeptors konstant gehalten und durch steigende Konzentrationen des Radioliganden immer mehr gesättigt. Im günstigsten Fall soll etwa 70-80 % des Bindungsbereiches abgedeckt werden. Alle Radioliganden binden je nach Lipophilie und je nach Reinheit der Rezeptorpräparation auch mehr oder weniger an unspezifische Bindungsstellen. Um die spezifische von der unspezifische Bindung zu unterscheiden, wird gewöhnlich parallel zur Bestimmung der eigentlichen Bindungskurve (totale Bindung) 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.

Kompetitionsexperimente:

Bei diesem Typ von Gleichgewichtsexperimenten verdrängen sich ein markierter und ein unmarkierter Ligand gegenseitig aus den Rezeptor-Bindungsstellen (Kompetition um ein und dieselbe Bindungsstelle). Verursacht die Bindung eines Liganden eine Veränderung der Raumstruktur des Rezeptors für den anderen Liganden so, dass dieser nicht mehr oder nur mit niedriger Affinität binden kann, so spricht man von einer negativ allosterischer Hemmung (vgl. Kopplung der K_{ATP} -Kanal-Öffner- und Blockerbindungsstellen; Kap. 1.2.8.2). Um Chancengleichheit bei dem "Wettstreit" um die Bindung zu gewährleisten sollten der Radioligand und der unmarkierte Ligand gleichzeitig dem Inkubationsmedium zugegeben werden. Meistens wird dabei die Konzentration des Labels konstant gehalten und die des nicht-markierten Liganden innerhalb einer sinnvollen Spanne variiert. Das Ergebniss der Kompetitionsexperimente ist in erster Linie der Wert von halbmaximaler Inhibitionskonzentration (IC_{50}), mit der ein unmarkierter Ligand den Radioliganden verdrängt (vgl. Kap. 2.2.2.3.2). Bei bekannter Konzentration und Affinität (K_D -Wert) des Radiolabels kann aus dem IC_{50} -Wert nach Cheng-Prusoff-Korrektur (Cheng und Prusoff, 1973) (Gleichung 16) die Gleichgewichtsdissoziationskonstante (K_D) des unmarkierten Liganden abgeleitet werden. Desweiteren können Hemmkurven aus diesem Typ der Bindungsversuche auf potentielle Heterogenität der Bindungsstellen hinweisen.

2.2.2.1 Auswahl des Radioliganden

In den Bindungsexperimenten der vorliegenden Dissertation wurden nur tritiierte Liganden 3H -Glibenclamid und 3H -P1075 eingesetzt. Die spezifische Aktivität von Tritium ist zwar verhältnismäßig gering (~ 30 Ci/mmol), nimmt jedoch über die Zeit weniger ab (HWZ von $^3H = 12,26$ Jahre vs. HWZ von $^{125}I = 59,39$ Tage).

³H-Glibenclamid:

GBC bindet an SUR1 wesentlich stärker als an SUR2-Isoformen (Hambrock et al., 1998; Hambrock et al., 2002a; Schwanstecher et al., 1998).

Der radioaktiv markierte SU ³H-GBC wurde uns von der Firma PerkinElmer Life Science (USA) mit einer spezifischen Aktivität von 47-52 Ci/mmol und einer Konzentration von 20 µM in Ethanol geliefert.

Beim Einsatz dieses Labels ist seine ausgeprägte Amphiphilie zu beachten, die sich in der Haftung der Substanz an Kunststoffoberflächen der Aufbewahrungs- und Reaktionsgefäße bemerkbar machte. Um zuverlässig reproduzierbare Konzentrationen des Radioliganden pipettieren zu können, enthielten deshalb alle Labelstammlösungen 10 % Ethanol.

Desweiteren bereitet die Anwesenheit vieler endogener niedrigaffiner Nicht-SUR-Bindungsstellen für ³H-GBC im Proteinmaterial oft experimentelle Schwierigkeiten. Dies gilt vor allem für Untersuchungen der SUR2-Spleißvarianten. Hier ist wegen der relativ niedrigen ³H-GBC-Affinität (s.o.) das Signal-Rausch-Verhältnis besonders ungünstig. Bei der Quantifizierung der unspezifischen Bindung in SUR2-Experimenten wurde die Eigenschaft des unmarkierten Öffners P1075 ausgenutzt, in sättigenden Konzentrationen (100 µM) den Radioliganden vollständig aus der spezifischen, jedoch nicht aus der unspezifischen Bindung verdrängen zu können (Löffler und Quast, 1997; Russ et al., 1999; Hambrock et al., 2001). In Experimenten an SUR1 wurde 100 nM unmarkiertes GBC zur Bestimmung der unspezifischen Bindung herangezogen. Bei dieser Konzentration wird ³H-GBC praktisch vollständig aus der hochaffinen SUR1-Bindung verdrängt, die niedrigaffine unspezifische Radioligandbindung bleibt hingegen im Wesentlichen unverändert.

³H-P1075:

Der radiomarkierte K_{ATP}-Kanal-Öffner vom Cyanguanidintyp bindet mit relativ hoher Affinität an SUR2-Subtypen, jedoch kaum an SUR1 (Felsch et al., 2004). Der Radioligand wurde von Amersham Buchler (Deutschland) mit einer spezifischen Aktivität von 117-121 Ci/mmol, einer Konzentration von ~0,5 µM, gelöst in Ethanol erworben.

Im Vergleich zu ³H-GBC bindet ³H-P1075 weniger an unspezifische Komponenten der Proteinpräparation, wodurch man ein günstiges Signal-Rausch-Verhältnis erhält. Die Bestimmung der unspezifischen Bindung erfolgte hier mit 100 µM unmarkiertem P1075.

2.2.2.2 Durchführung von Radioligandbindungsstudien

Die Bindungsexperimente wurden an Membranpräparationen aus HEK293-Zellen sowie an intakten HEK293-Zellen durchgeführt.

2.2.2.2.1 Gewinnung des Rezeptormaterials

Die Membranpräparation erfolgte wie in Kapitel 2.2.1.5 beschrieben. Unmittelbar vor Beginn der Inkubation mit den Radioliganden und ggf. unmarkierten Kompetitoren wurden die Membranen aufgetaut und mit einem Polytron-Homogenisator (PT 3000, Kinematika AG, CH) unter Eiskühlung bei 12000 U/min homogenisiert, mit isotonem Inkubationspuffer (pH 7,4 bei 0°C; Kap. 2.1.4.1.2) auf das gewünschte Volumen aufgefüllt und bis zum Inkubationsstart auf Eis gehalten.

Bei Experimenten an intakten Zellen wurde zuerst der Inkubationspuffer vorbereitet (s. Kap. 2.1.4.1.3 und 2.1.4.1.4). Nach dem Absaugen des Standard-Kulturmediums wurden die zu untersuchenden Zellen mit dem fertigen Inkubationspuffer (begast, pH 7,4 bei 37°C) vom Schalenboden abgelöst, in ein 50 ml -Falcon-Tube überführt und auf ein Volumen von 20 ml mit Inkubationspuffer ergänzt. Diese Zellsuspension wurde 5 min bei 500 * g zentrifugiert. Der Überstand wurde im Anschluss abgesaugt, das Zellpellet in frischen 20 ml des Inkubationspuffers vorsichtig aufgenommen (=gewaschen) und erneut 5 min bei 500 * g zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstandes erfolgte die Resuspendierung der Zellen in einem dem Umfang des Bindungsversuchs angepassten Volumen an Inkubationspuffer (= x (Anzahl der Reaktionsansätze) * V (Volumen der Zellsuspension pro Reaktionsansatz; vgl. Kap. 2.2.2.2.2) + ~10 %). Diese fertige Zellpräparation wurde bis unmittelbar vor Inkubationsbeginn im Wasserbad bei 37°C gehalten und gelegentlich vorsichtig gemischt.

2.2.2.2.2 Inkubation

Im Allgemeinen wurde sowohl in Membran- als auch in Ganzzellversuchen die Bindungsreaktion durch Zugabe der Rezeptorpräparation zum Reaktionsansatz (Label + ggf. unmarkierter Ligand + ggf. MgATP im Inkubationspuffer) gestartet. Die Reaktion verlief in 2 ml-Eppendorf-Gefäßen. Mit Ausnahme von Experimenten, die im Kapitel 3.3.1.4 vorgestellt werden (Inkubation bei 22°C) erfolgte die Inkubation der Ansätze im Wasserbad bei physiologischer Temperatur von 37°C. 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 Frau C. Löffler-Walz in Assoziationsexperimenten ermittelt. Sie variierte je nach Radioligand, Rezeptortyp und Rezeptorpräparation:

Membranen, mit ^3H -GBC als Radioligand:

- alle Rezeptortypen : 15 min

Membranen, mit ^3H -P1075 als Radioligand:

- SUR2A: 13 min
- SUR2B: 30 min

Zellen, mit ^3H -GBC als Radioligand:

- alle Rezeptortypen : 30 min

Zellen, mit ^3H -P1075 als Radioligand:

- SUR2A: 13 min
- SUR1+SUR2B: 30 min

Ebenfalls Versuchstyp-abhängig war die quantitative Zusammensetzung der Reaktionsansätze:

Membranen, mit ^3H -GBC als Radioligand:

- 25 μl Radioligand-Stammlösung + 10 μl unmarkierter Ligand + 765 μl Inkubationspuffer (Kap. 2.1.4.1.2; +/- 1 mM MgATP) + 200 μl Membranpräparation

Membranen, mit ^3H -P1075 als Radioligand:

- 100 μl Radioligand-Stammlösung + 10 μl unmarkierter Ligand + 690 μl Inkubationspuffer (Kap. 2.1.4.1.2; + 1 mM MgATP) + 200 μl Membranpräparation

intakte Zellen, mit ^3H -GBC als Radioligand:

- 25 μl Radioligand-Stammlösung + 10 μl unmarkierter Ligand + 465 μl Inkubationspuffer (Kap. 2.1.4.1.3 oder 2.1.4.1.4) + 500 μl Zellpräparation

intakte Zellen, mit ^3H -P1075 als Radioligand:

- 50 μl Radioligand-Stammlösung + 10 μl unmarkierter Ligand + 440 μl Inkubationspuffer (Kap. 2.1.4.1.3 oder 2.1.4.1.4) + 500 μl Zellpräparation

Sowohl die Radioligand-Stammlösungen, wie auch Lösungen der unmarkierten Liganden enthielten Lösungsmittelanteile. Die Reaktionsansätze wurden so zusammengesetzt, dass die Lösungsmittelkonzentration 1 % nicht überstieg.

2.2.2.2.3 Trennung von gebundenem und freiem Radioliganden

Nach Ablauf der Inkubation wurde der Radioligand-Rezeptor-Komplex durch Filtration vom ungebundenen Radioliganden getrennt. Aus jedem Reaktionsansatz (Volumen = 1 ml) wurden dafür nacheinander drei Aliquote von 300 μ l entnommen, jeweils in ein vorbereitetes Reagenzglas mit 8 ml eiskaltem Waschpuffer (Kap. 2.1.4.1.5) überführt und sofort mit Hilfe der Vakuumkraft (erzeugt von einer Membranpumpe KNF Neuberger Typ N 026.3 AN.18) durch Glasfaserfilter (bei Membranversuchen: Whatman GF/B; bei Ganzzellversuchen: Whatman GF/C) gesaugt. Im kalten Waschpuffer wurde dabei die Reaktion gestoppt, der Filter hielt die partikulären Radioligand-Rezeptor-Komplexe zurück. Um die unspezifisch gebundene Radioaktivität möglichst vollständig zu entfernen, wurden die Filter jeweils zweimal mit 8 ml Waschpuffer (0°C) nachgewaschen. Jeder Messpunkt wurde auf diese Weise dreifach bestimmt. Aus den Ergebnissen der drei einzelnen Messungen (radioaktive Zerfälle pro Minute = dpm, siehe nachfolgendes Kapitel) wurde das arithmetische Mittel gebildet.

2.2.2.2.4 Messung der Radioaktivität

Die quantitative Erfassung der Tritium-Betastrahlen der Radioliganden erfolgte mittels eines Flüssigszintillators (Ultima Gold; 4,5 ml/Filter) im Szintillationszähler (TRICARBTM Liquid Scintillation Analyser 2000CA, Packard).

Da sich die Radioaktivität erst langsam von den Glasfaserfilter lösen muss, wurden für die Auswertung nur Messungen herangezogen, die mindestens 8 Stunden nach dem Kontakt der Filter mit dem Flüssigszintillator stattgefunden haben. Die dickeren Whatman GF/B-Filter aus den Membranexperimenten wurden unmittelbar vor Zugabe der Szintillationsflüssigkeit mit 200 μ l destilliertem Wasser benetzt. Dadurch wurde das Herauslösen der Radioaktivität aus den Filtern gefördert.

Der Szintillationszähler detektiert 54 % der radioaktiven Zerfälle pro Minute (dpm).

$$f = 0.54 = \frac{\text{gemessene Impulse / min}}{\text{Zerfälle / min}} = \frac{\text{cpm}}{\text{dpm}} \quad \text{Gleichung (1)}$$

Die dpm wurden nach folgender Umrechnung in Konzentrationseinheiten ausgedrückt:

$$c = \frac{\text{gezählte dpm}}{2,2 \cdot 10^{12} (\text{dpm / Ci}) \cdot \text{SA}(\text{Ci / mmol}) \cdot \text{V}(\text{ml})} = \frac{\text{mol}}{\text{l}} \quad \text{Gleichung (2)}$$

c = Konzentration in mol/l

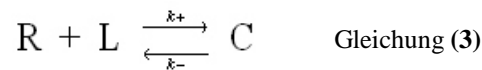
SA = spezifische Aktivität des Radioliganden in Ci/mmol

V = Filtrationsvolumen des Aliquotes aus dem Reaktionsansatz in ml (0,3 ml)

1 Curie (Ci) = $2,2 \cdot 10^{12}$ dpm/min

2.2.2.3 Modell der Rezeptorbindungsstudien

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



In der Gleichung 3 stellt R die freie Rezeptorkonzentration, L die freie Ligandkonzentration, C den Radioligand-Rezeptor-Komplex, k_+ die Assoziationsgleichgewichtskonstante ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) und k_- die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante (s^{-1}) dar.

Im Gleichgewicht gilt das Massenwirkungsgesetz:

$$K_D = \frac{k_-}{k_+} = \frac{\text{R} \cdot \text{L}}{\text{C}} \quad \text{Gleichung (4)}$$

Dabei ist K_D die Gleichgewichtsdissoziationskonstante (mol/l).

Ferner gelten auch die Massenbilanzen

$$R_0 = R + C \quad \text{Gleichung (5)}$$

und

$$L_0 = L + C \quad \text{Gleichung (6)}$$

Der Index $_0$ bezeichnet die gesamte Konzentration als Summe aus der freien und gebundenen Konzentration.

Die Experimente werden wenn möglich so angelegt, dass die gesamte Ligandkonzentration viel größer ist, als die gesamte Rezeptorkonzentration (s. Gleichung 7). In der experimentellen Praxis bedeutet dies, dass der gebundene Anteil des Radioliganden stets unter 5 % liegen sollte.

$$R_0 \ll L_0 \Rightarrow L_0 \approx L \quad \text{Gleichung (7)}$$

Die gesamte Bindung eines Radioliganden (B_{TOT}) beinhaltet die Bindung an spezifische 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:

$$B_s = B_{\text{TOT}} - \text{NSB} ; B_s \equiv C \quad \text{Gleichung (8)}$$

2.2.2.3.1 Sättigungsexperiment

Gemessen wird die gesamte (B_{TOT}) und die unspezifische (NSB) Bindung, dargestellt als Funktion der freien Ligandkonzentration L . Die NSB steht zwar für niedrigaffine Bindung des Liganden, die Anzahl der unspezifischen Bindungsstellen ist jedoch sehr hoch, so dass ein linearer Anstieg von NSB mit wachsender Ligandkonzentration angenommen wird:

$$\text{NSB} = a \cdot L \quad \text{Gleichung (9)}$$

Aus Gleichung 4 und 5 bzw. 6 ergibt sich

$$K_D = \frac{R \cdot L}{C} = \frac{(R_0 - C) \cdot L}{C} \quad \text{Gleichung (10)}$$

Dabei ist C gleich der spezifischen Bindung B_S

Unter der Bedingung von 7 errechnet sich somit die spezifische Bindung $B_S \equiv C$ aus

$$C = R_0 \cdot \frac{L}{L + K_D} \quad \text{Gleichung (11)}$$

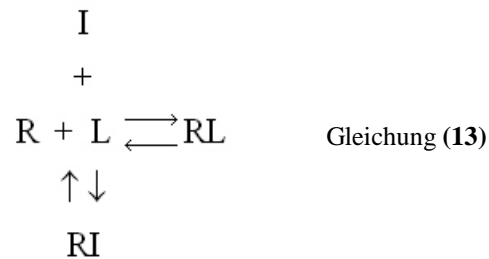
Daraus wird ersichtlich, dass die spezifische Bindung $B_S \equiv C$, mit der freien Ligandkonzentration in Form einer rechtwinkligen Hyperbel wächst, ihre Sättigung für $C \rightarrow R_0$ erreicht und die Halbsättigung bei $L = K_D$ vorliegt.

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

$$B_{\text{TOT}} = R_0 \cdot \frac{L}{L + K_D} + a \cdot L \quad \text{Gleichung (12)}$$

2.2.2.3.2 Konkurrenzexperiment

Ausgegangen wird von folgendem Reaktionsschema:



Der Radioligand L und der Rezeptor R, bilden den Rezeptor-Radioligand-Komplex RL. Ebenfalls 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

$$K_D = \frac{\text{R} \cdot \text{L}}{\text{RL}} \quad \text{bzw.} \quad K_i = \frac{\text{R} \cdot \text{I}}{\text{RI}} \quad \text{Gleichung (14) a bzw. b}$$

Nach Berücksichtigung der Massenbilanzen unter der Bedingung, dass $R_0 \ll L_0, I_0$ erhält man nach Umformung

$$\text{RL} = R_0 \underbrace{\frac{\text{L}/K_D}{1 + \text{L}/K_D}}_{\text{RL}(I=0)} \cdot \underbrace{\frac{K_i (1 + \text{L}/K_D)}{K_i (1 + \text{L}/K_D) + I}}_{\xrightarrow{I \rightarrow 0} 1} \quad \text{Gleichung (15)}$$

Der Term $K_i(1+L/K)$ gibt den Mittelpunkt der Kurve dar, da bei einer InhibitorKonzentration von $I = K_i(1+L/K_D)$ die Kurve um 50 % abgefallen ist. Daher wird nach Cheng und Prusoff, 1973 dieser Term IC_{50} genannt. Damit lässt sich aus der IC_{50} die Hemmkonstante der Inhibition (K_i) berechnen.

$$IC_{50} = K_i \cdot \left(1 + \frac{L}{K_D}\right) \quad \text{Gleichung (16)}$$

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

$$IC_{50} = K_D + L_0 \quad \text{bzw.} \quad K_D = IC_{50} - L_0 \quad \text{Gleichung (17) a und b}$$

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

$$RL = RL(0) \cdot \frac{IC_{50}}{IC_{50} + I} \quad \text{logarithmiert} \quad RL = \frac{RL(0)}{1 + 10^{pIC_{50} - pI}} \quad \text{Gleichung (18) a und b}$$

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

$$y \equiv \frac{C}{R_0} = \frac{L}{L + K} \quad \text{Gleichung (19)}$$

Somit resultiert für die maximale Bindungskapazität, d.h. Gesamt-rezeptorzahl $B_{MAX} \equiv R_0$ folgender Ausdruck:

$$B_{MAX} = \frac{1}{y} \cdot B_S = \frac{L + K}{L} \cdot C \quad \text{Gleichung (20)}$$

2.2.2.3.3 Verallgemeinerung der Bindungsisotherme nach Hill

Zeigt ein Radioligand komplexeres Bindungsverhalten, oder ist der unmarkierte Ligand mit dem Radioliganden nicht kompetitiv, so äußert sich dies in einem steileren oder flacheren Verlauf der Bindungsisotherme als es der Gleichung 18a bzw. 18b entspricht. In diesem Fall werden die beiden Gleichungen durch die Einführung eines Exponenten (Hill-Koeffizient = n_H) verallgemeinert. Für die Inhibitionskurve gilt dann:

$$B_S = \frac{B_S(0)}{1 + 10^{n(pIC_{50} - pI)}} \quad (21)$$

Dabei gilt: $B_S(0) = B_S$ zum Zeitpunkt $t = 0$

Für die Sättigungsisotherme gilt:

$$RL = R_0 \cdot \frac{L^n}{\underbrace{L^n + K^n}_y} \quad \text{logarithmiert} \quad RL = \frac{R(0)}{1 + 10^{n(pL - pK)}} \quad \text{Gleichung (22) a und b}$$

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 experimenteller 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, so dass die Hemmkurve flach abfällt.

2.2.3 Elektrophysiologische Experimente

Die Wirkung der K_{ATP} -Kanal-Modulatoren auf unterschiedliche K_{ATP} -Kanalsubtypen wurde in dieser Arbeit mit Hilfe der Saugelektrodenteknik (Patch-Clamp-Technik) untersucht. Bei den Messungen wurde die Spannungsklemme (Voltage-Clamp-Verfahren) verwendet. Dabei wird das Membranpotential der untersuchten Zelle vorgegeben ("geklemmt") und jede Änderung des Potentials durch die Applikation eines entgegengerichteten Stroms ausgeglichen. Dieser Kompensationsstrom wird gemessen und liefert Informationen über die Leitfähigkeit der Zellmembran und somit auch der Ionenkanäle in der Membran.

Die theoretische Grundlage für die Messungen liefert das Ohmsche Gesetz

$$U = R \cdot I \quad \text{Gleichung (23)}$$

U: Stromspannung (V)

R: Widerstand ()

I: Stromstärke (A)

Aus dem Kehrwert des Widerstandes resultiert die Leitfähigkeit $g (S) = 1/R$, so dass das Ohmsche Gesetz auch folgendermaßen ausgedrückt werden kann:

$$U = I / g \quad \text{oder} \quad I = U \cdot g \quad \text{Gleichung (24) a und b}$$

Definiert man nun die Spannung U als Abstand der vorgegebenen Klemmspannung U_{soll} vom Gleichgewichtspotential E_m für Ionen, die den untersuchten Strom (z.B. K_{ATP} -Strom) erzeugen: $U = U_{\text{soll}} - E_m$, so lautet die Gleichung 24b jetzt

$$I = (U_{\text{soll}} - E_m) \cdot g \quad \text{Gleichung (25)}$$

Das Gleichgewichtspotential E_m kann als diejenige Spannung bei der für die gegebenen Bedingungen kein Strom fließt, bestimmt werden. Somit kann aus dem gemessenen Strom I und der vorgegebenen Klemmspannung U_{soll} die aktuelle Leitfähigkeit g berechnet werden. Resultieren

die gemessenen Ströme I_m aus der Aktivität einer Kanalart und ist zudem der Einzelkanalstrom I_{Ek} dieser Kanäle bekannt, so kann auch die Anzahl N der gleichzeitig aktiven Kanäle ermittelt werden

$$N = I_m / I_{Ek} \quad \text{Gleichung (26)}$$

Für die Entwicklung der Patch-Clamp-Technik wurden Erwin Neher und Bert Sakmann mit dem Nobelpreis für Physiologie und Medizin ausgezeichnet (entscheidende Veröffentlichung: Hamill et al., 1981). Die Saugelektrodenteknik ermöglicht rauscharme Strommessungen mit sehr hoher Auflösung, sogar auf Einzelkanalniveau. Dies gelingt durch die Erzeugung eines Abdichtwiderstandes zwischen der mit Salzlösung gefüllten Messpipette und der Zellmembran, der im Gigaohm-Bereich (Gigaseal) liegt. Erforderlich ist dabei der Gebrauch unbenutzter, sehr sauberer Pipetten. Das Anlegen eines leichten Unterdrucks an die Pipette erleichtert das "Sealen". Die dichte Verbindung zwischen der Pipette und der Zellmembran ist ausreichend stabil um durch bestimmte Manipulationen verschiedene Messkonfigurationen erreichen zu können (Abb. 12; Abb. nach Numberger M. und Draguhn A., 1996).

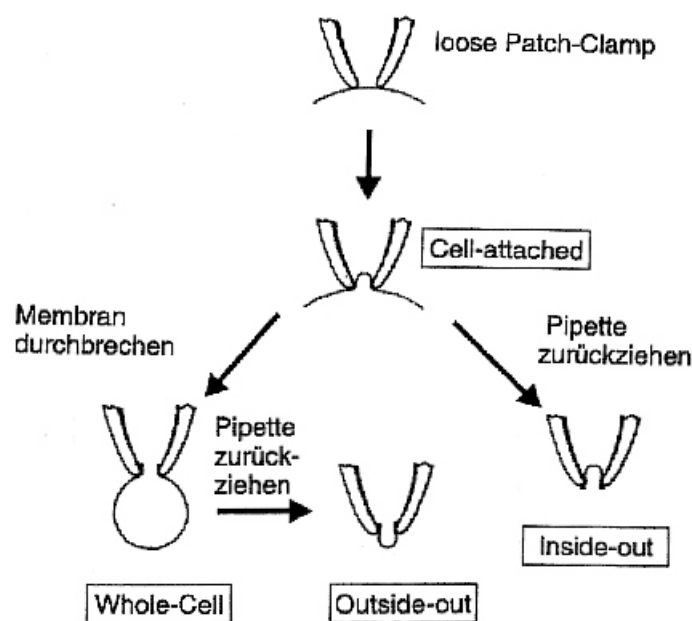


Abbildung 12 Messkonfigurationen der Saugelektrodenteknik

Nach dem Aufsetzen der Pipette auf die Zellmembran und dem Zustandekommen eines Abdichtwiderstandes können Ströme durch das Membranstück in der Pipettenöffnung gemessen werden (Cell-attached-Konfiguration). Zieht man die Pipette dann zurück, so löst sich das Membranstück in der Pipette von der Zelle ab und die zytoplasmatische Seite der Zellmembran

wird zugänglich (Inside-out-Konfiguration). Wird jedoch das Membranstück unter der Pipettenöffnung nach dem Herstellen der Cell-attached-Konfiguration durch Unterdruck und einen hochamplitudigen Spannungspuls (in unseren Messungen 500 mV über 1 ms) zerstört, erhält man eine Verbindung zwischen dem Zytoplasma und der Pipettenlösung und es werden Ströme durch die gesamte Zellmembran messbar (Ganzzellkonfiguration). Aus der Ganzzellkonfiguration kann durch Zurückziehen der Pipette die Outside-out-Konfiguration erreicht werden, in der eine kleine extrazelluläre Membranoberfläche nach außen zeigt und daher der Bad- oder Perfusionslösung ausgesetzt werden kann.

2.2.3.1 Aufbau des elektrophysiologischen Messplatzes

2.2.3.1.1 Optisches System

Das inverse Mikroskop steht in einem Faradaykäfig auf einem pneumatisch betriebenen schwingungsgedämpften Tisch. Es verfügt über ein Okular mit 10-facher und Objektiv mit 10- und 40-facher Vergrößerung. Der Differenzinterferenzkontrast beim Gebrauch des 40-fachen Objektivs liefert ein pseudo-dreidimensionales Bild und eine maximale Auflösung, bei der der Pipettenausgang gerade so als runde Pipettenöffnung (Durchmesser von ca. 1 μm) identifiziert werden kann. Die angeschlossene Videokamera ermöglicht die Betrachtung des Mikroskopbildes auf einem Bildschirm. Erfolgreich transient transfizierte Zellen exprimierten die zu untersuchenden K_{ATP} -Kanäle und konnten durch grüne Fluoreszenz des GFP identifiziert werden (Kap. 2.2.1.4.4). Zur Anregung des GFP-Chromophors wird aus dem Licht einer Quecksilberdampflampe durch einen Anregungssperfilter und Farbfilter Licht der Wellenlänge von 450-490 nm auf die Zellen geleitet. Das von GFP emittierte Licht zeigt sich nach der Filtration durch einen Farbteiler und Emissionssperfilter (Zeiss: 505-530 nm; Nikon: $> 520 \text{ nm}$) als grüne Fluoreszenz.

2.2.3.1.2 Messkammer

Das Deckglas mit dem zu untersuchenden Zellmaterial wurde zwischen einem Petrischalendeckel (35 mm \varnothing ; Falcon 353801) und einem Plexiglaseinsatz (Anfertigung von PD. Dr. U. Russ aus unserer Arbeitsgruppe) eingeklemmt. Zwischen das Deckglas und den Petrischalendeckel wurde ein dünner Laborfett-Film (Glisseal, Borer Chemie, Zuchwil, CH) aufgetragen, um die Messkammer gegen Flüssigkeitsaustritt abzudichten. In der Mitte des Schalendeckels sowie des Plexiglaseinsatzes befand sich ein ausgefrästes Loch (\varnothing ca. 10 mm).

Somit führte der Strahlengang des Mikroskops direkt durch das Deckglas und die Badflüssigkeit. Der Einsatz verfügte über zwei Aussparungen für Zu- und Ablauf des Badpuffers. Positioniert wurde die Messkammer auf dem Objektisch des Mikroskops.

2.2.3.1.3 Perfusionssystem

Der Badpuffer (simulierte extrazelluläre Lösung; Kap. 2.1.4.3.1) und, darin gelöst, auch die Testsubstanzen wurden bei Whole-Cell- und Cell-Attached-Experimenten schwerkraftgetrieben über die Perfusionsapparatur auf die zu untersuchenden Zellen appliziert. Als Vorratsgefäße für den Puffer dienten acht 50-ml-Luer-Lock Spritzen, die über ein Schlauchsystem mit der Messkammer verbunden waren. Dieses Schlauchsystem führte durch ein Wasserbad, wodurch die Pufferlösungen temperiert werden konnten. Die Temperatur des Puffers in der Messkammer betrug 37°C. Der Wechsel zwischen den Lösungen in den Vorratsgefäßen erfolgte über elektrische Schlauchklemmventile. Die Perfusionsgeschwindigkeit wurde über eine Schlauchklemme reguliert und betrug zwischen 0,5 und 1 Tropfen pro Sekunde. Für die Strecke zwischen den Vorratsgefäßen und der Messkammer benötigten die Lösungen ca. 1 min. Kontrollierte Perfusions- und Absauggeschwindigkeit gewährleisteten während der Experimente einen gleichmäßigen Badpufferpegel in der Messkammer.

In Inside-out-Versuchen floss der Badpuffer (Kap. 2.1.4.3.1) aus einem 500-ml-Vorratsbehälter über einen Schlauch direkt in die Messkammer. Die Lösung wurde nicht temperiert, somit fanden die Experimente bei Raumtemperatur statt. Die Flussgeschwindigkeit wurde hier ebenfalls mittels einer Schlauchklemme auf ca. 1Tropfen/sec eingestellt. Nach dem Ablösen eines Membranstücks (Patch) von der Zelle wurde die nun zugängige Innenseite der Zellmembran zur künstlichen intrazellulären Lösung hin exponiert. Diese Lösung strömte aus einem getrennten Perfusionssystem, welches aus acht Vorratsgefäßen (10 ml-Luer-Lock Spritzen) und daraus ausgehenden durch elektrische Ventile abklemmbaren Schläuchen bestand, die in einem Sammelrohr (Pipe) mündeten. Das Sammelrohr wurde aus einem Microloader (Eppendorf, Hamburg,D) hergestellt. Seine Spitze wurde so abgeschnitten, dass die Messpipette mit dem Membranstück in die Öffnung hinein gefahren werden konnte. Der Totraum der Pipe betrug nur wenige Mikroliter und gewährleistete so einen sekundenschnellen (1-5 sec) Lösungswechsel.

2.2.3.1.4 Mess- und Speichersystem

2.2.3.1.4.1 Patch-Pipetten

Für die Herstellung der Messpipetten wurden Clark Borsilikat Glas-Kapillaren (ohne Filament) verwendet. Die Glasrohlinge der Länge von 7,5 cm wurden in der Flamme des Bunsenbrenners an beiden Enden abgerundet und mit dem DMZ-Universalpuller (Zeitz-Instrumente, Augsburg) in zwei gebrauchsfertige Pipetten gezogen und hitzepoliert. Die Pipetten wurden staubgeschützt gelagert und innerhalb von 48 Stunden aufgebraucht.

Bei der Herstellung der Patch-Pipetten für Ganzzellmessungen wurden Rohlinge ohne Filament mit einem Außendurchmesser von 1,5 mm und einem Innendurchmesser von 0,86 mm verwendet. Der Widerstand fertiger Pipetten variierte zwischen 3 und 5 M Ω .

Pipetten für Messungen in der Inside-out- und Cell-attached-Konfiguration wurden aus filamentlosen Borsilikat Glas-Kapillaren mit Außen- und Innendurchmesser von 1,5 bzw. 1,17 mm gezogen. Der gewünschte Pipettenwiderstand lag nach Füllung mit Puffer (2.1.4.3) im Bereich von ~ 1 M Ω .

2.2.3.1.4.2 Pipettenhalter, Elektroden, Mikromanipulator

Die mit entsprechender Lösung (s. Kap. 2.1.4.3.2) gefüllten Pipetten wurden in Standard-Pipettenhalter von Heka bzw. Axon eingesetzt. Über einen seitlichen Eingang und daran angeschlossenen Schlauch war der Pipettenhalter mit einem wassergefüllten U-Rohr verbunden. Durch Veränderungen des Wassersäulenstandes im U-Rohr konnte ein Über- bzw. Unterdruck ans Pipetteninnere angelegt werden. Der Überdruck bewirkte einen Ausstrom der Lösung aus der Pipette und verhinderte so eine Ablagerung von Schmutz an der Pipettenspitze vor dem Kontakt mit der Zellmembran. Nach dem Aufsetzen der Pipette an der Zelloberfläche half das Anlegen eines Unterdrucks beim Erreichen des Gigaseals.

Als Mess- und Referenzelektrode dienen Silberdrähte (0,5 mm; Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen), die nach dem Anrauen der Oberfläche in 3M KCl-Lösung bei $\sim 0,7$ V ca. 10 min elektrolytisch chloriert wurden. Elektroden mit gleichmäßiger, intakter Ag/AgCl-Schicht zeichneten sich durch geringe Drift im Pipettenpotential aus. Die ca. 4 cm langen, chlorierten Messelektroden wurden in die Pipettenhalter eingelötet und tauchten während eines Experiments mit dem chlorierten Ende in der Pipettenlösung ein.

Der Pipettenhalter wurde am Vorverstärker befestigt. Die Referenzelektrode wurde ebenfalls

mit dem Vorverstärker verbunden. Der Vorverstärker wiederum wurde, isoliert durch eine Kunststoffplatte, am Mikromanipulator angebracht. Somit konnte die Position des Vorverstärkers und der Messpipette über einen Joystick unter mikroskopischer Kontrolle genauestens reguliert werden.

2.2.3.1.4.3 Verstärkersystem

Ein Voltage-Clamp-Verstärker erfüllt zwei Hauptaufgaben: 1) das Potential der untersuchten Zellmembran (U_{Pipette}) muss stets an die vom Experimentator vorgegebene Spannung (U_{soll}) angeglichen werden und 2) der dafür notwendige Kompensationsstrom (U_{aus}) wird gemessen.

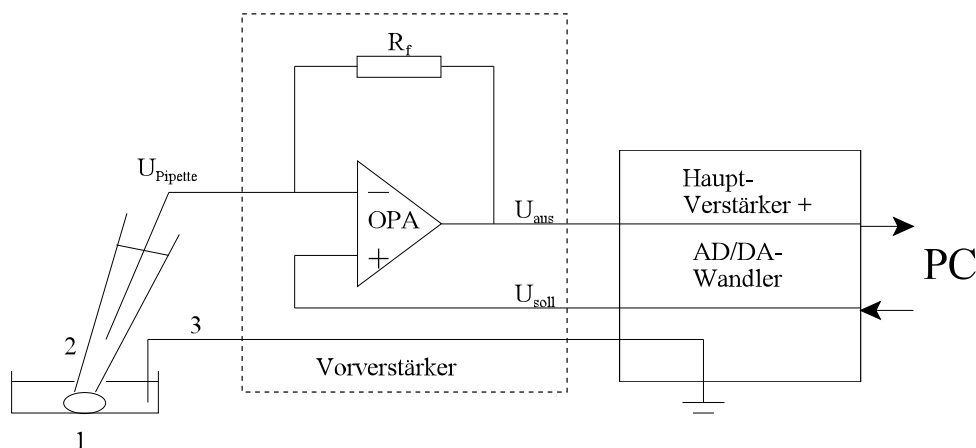


Abbildung 13 Vereinfachtes Schema eines Patch-Clamp-Messstandes

(1) Messkammer mit einer Zelle; (2) auf der Zellmembran ist die Messpipette aufgesetzt (hier: Cell-Attached-Konfiguration); (3) Referenzelektrode; weitere Erläuterungen im Text.

In der Abb. 13 wird ein stark vereinfachtes Schaltbild eines Patch-Clamp-Verstärkers dargestellt. Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe des Verstärkersystems EPC-9 und EPC-10 (HEKA, Lambrecht, D) aufgenommen. Das Kernstück der Messelektronik bildete der Vorverstärker mit dem Strom-Spannungs-Wandler. Trat an den Poleingängen des Operationsverstärkers (OPA) eine Abweichung zwischen der vorgegebenen Kommandospannung (U_{soll}) und der Pipettenspannung (U_{pipette}) auf, so entstand am Ausgang des OPA (Spitze des Dreiecks) eine dieser Differenz proportionale, jedoch extrem verstärkte Spannung. Diese Spannung war die Triebkraft für den Strom, der dann zwischen dem OPA-Ausgang und der Pipette über den

Rückkopplungswiderstand (R_f) floss, und zwar so lange bis keine Potentialdifferenzen an den OPA-Poleingängen mehr bestand (d.h. $U_{\text{soll}} = U_{\text{Pipette}}$). Gleichzeitig wurde die Spannung am OPA-Ausgang registriert und in Strom umgerechnet (Größe von R_f als Kalibrierungsfaktor).

Die Signale aus dem Vorverstärker gelangten zum Hauptverstärker, wurden dort verstärkt und mit einem integrierten 4-pol-Bessel-Tiefpassfilter mit 200 Hz gefiltert. Die über einen Analog-Digital-Wandler digitalisierten Signale wurden dann mit einer Samplingrate von 1 kHz aufgenommen. Als Aufnahme- und Speichermedium diente ein konventioneller PC. Dazu wurde die Pulse-Software (HEKA Elektronik, Lamprecht/Pfalz, D) benutzt.

Der Computer fungierte ebenfalls als Stimulusgenerator. Auf dem umgekehrten Wege wurden vorprogrammierte Befehlssequenzen an den Verstärker gesendet, dort die entsprechenden Spannungen generiert und über den Vorverstärker sowie die Messelektrode an die Zellmembran weitergeleitet.

2.2.3.2 Experimenteller Ablauf

2.2.3.2.1 Präparation der Zellen

Für die elektrophysiologischen Experimente wurden HEK293-Zellen verwendet, die den zu untersuchenden K_{ATP} -Kanal permanent oder transient exprimierten.

Einen Tag vor Versuchsbeginn wurden die Zellen vom Boden der Standard-Kulturschalen (Durchmesser 9,4 cm; s. Kap. 2.2.1.1) abgelöst, die Zellsuspension mit frischem Kulturmedium (SKM; Kap. 2.1.4.1.6) ca. 1:100 verdünnt, in 3 ml-Aliquoten auf kleine, mit UV C-Licht sterilisierte Petrischalen (Falcon 353801; 35 mm \varnothing) aufgeteilt und weiter im Brutschrank kultiviert. In diesen kleinen Schalen befanden sich Deckgläser (Assistent; Stärke 1; 30 mm \varnothing), die mit Poly-D-Lysin beschichtet (durch Einwirkung einer 0,1 %-iger, wässriger Poly-D-Lysin-Lösung über mindestens 5 h) und ebenfalls UV-sterilisiert wurden.

Unmittelbar vor Versuchsbeginn wurden die Deckgläser aus den Kulturschalen entnommen, in die Messkammer eingesetzt (s. Kap. 2.2.3.1.2), die Messkammer auf dem Objektisch im Strahlengang des Mikroskops platziert und mit Badpuffer gefüllt. Dank der Beschichtung hafteten die HEK-Zellen besser auf den Deckgläsern und wurden nicht vom Perfusionsfluss weggespült.

2.2.3.2.2 Ausführung der Patch-Clamp-Versuche

Unter mikroskopischer Kontrolle wurde eine geeignete Zelle ausgesucht. Dabei wurden folgende Kriterien berücksichtigt: einzelnliegend und zugänglich für die Messpipette; mittlere Größe (Membrankapazität von 10-20 pF); gleichmäßige, runde Oberfläche; grüne Fluoreszenz im UV-Licht bei transient transfizierten Zellen (Beobachtung: die Intensität der Fluoreszenz korreliert sehr häufig mit der Kanaldichte und somit der zu erwartenden Stromstärke). Nachfolgend erfolgte die blasenfreie Füllung der Messpipette mit entsprechender Pipettenlösung (s. Kap. 2.1.4.3). Im Pipettenhalter fixiert und am Vorverstärker angebracht wurde die Pipette mit Hilfe des Mikromanipulators in den Badpuffer eingetaucht (Überdruck in der Pipette verhindert eine Verschmutzung/Verstopfung der Öffnung). Das dabei entstehende Offsetpotential (aus Elektrodenpotentialen und Übergangspotentialen zwischen verschiedenen Elektrolytlösungen = "liquid junction potential") wurde immer kurz vor dem Kontakt mit der Zelle durch den Verstärker korrigiert (10 mV). Durch Applikation einer definierten Spannung und der Registrierung des resultierenden Stroms wurde der Pipettenwiderstand vor jeder Messung bestimmt (s. Kap. 2.2.3.1.4.1).

Im Anschluss wurde die Messpipette an die Zelle herangeführt, der Kontakt mit der Zellmembran ("Seal") hergestellt und der Überdruck in der Pipette abgelassen. Ein nachfolgender kurzer Unterdruckpuls (erzeugt durch leichtes Saugen am Verbindungsschlauch), bewirkte in der Regel die Ausbildung eines hohen Abdichtwiderstandes zwischen der Pipette und Membran ("Gigaseal"). Die Stromantwort auf den Kommandospannungspuls wurde dadurch vernachlässigbar klein; darüber hinaus zeigten sich jeweils am Anfang und am Ende des Spannungspulses kurze kapazitive Artefakte, die vom Verstärker kompensiert wurden. Es folgte nun das Anlegen eines negativen Haltepotentials (Whole-cell-Konfiguration: -60 mV; Cell-attached- und Inside-out-Konfiguration: -50 mV).

2.2.3.2.2.1 Messungen in der Cell-attached-Konfiguration

Das gerade geschilderte Vorgehen führte zur Herstellung der sogenannten Cell-attached-Konfiguration. Bei dieser Messanordnung blieb die ganze Zellmembran intakt. Eine direkte Verbindung zwischen dem Zellinneren und der Pipettenlösung bestand nicht.

Die untersuchten K_{ATP} -Kanäle zeigten in dieser Konfiguration kaum Spontanaktivität, so dass sich messbare Ströme nur unter Einwirkung von K_{ATP} -Kanal-Öffnern entwickelten.

Messungen in der Cell-attached-Konfiguration wurden bei 37°C durchgeführt. Im Bad und

in der Pipette befand sich die K^+ -HEPES-Lösung (s. Kap. 2.1.4.3.1.2). Bei einem Haltepotential von -50 mV wurden Ströme durch das Membranstück in der Pipettenöffnung gemessen. Pro Sekunde wurden 1000 Werte aufgezeichnet und mit 1 kHz digitalisiert. So entstand aus je 1000 Messpunkten ein Mittelwert, der zur weiteren Auswertung herangezogen wurde (s. unten).

2.2.3.2.2.2 Messungen in der Ganzzell-Konfiguration

Wurde nach dem Zustandekommen der Cell-attached-Konfiguration die Zellmembran unter der Pipette durchbrochen (s. Abb. 12) , so konnten Kanal-Ströme durch die gesamte restliche Membran außerhalb der Pipette gemessen werden. Die Stromantwort auf die Kommando-Spannungspulse änderte sich: die kapazitiven Ströme nahmen stark zu und der Widerstand unterhalb der Pipette verringerte sich. Das Zellinnere wurde nach und nach durch die Pipettenlösung (Kap. 2.1.4.3.2) dialysiert.

Während dieser Dialyse trat spontan ein Anstieg des gemessenen K^+ -Summenstroms auf, der nach einigen Minuten ein stabiles Niveau erreichte. Oft setzte dann im Anschluss einen ebenfalls spontane Abnahme der Kanalaktivität ("Rundown") ein. War der Rundown überschaubar, oder blieb er gar aus, so konnte die Applikation der Testsubstanzen über das Bad (Na^+ -HEPES-Lösung; Kap. 2.1.4.3.1.1) beginnen.

Die Durchführung der Messungen im Ganzzellmodus erfolgte bei 37°C mit Na^+ -HEPES-Lösung als Badpuffer. Die Spannungspulse wurden nach folgendem Protokoll generiert: ausgehend vom festen Haltepotential (-60 mV) erfolgten alle 12 Sekunden sieben rechteckige Spannungssprünge in 10 mV-Schritten, im Bereich von -110 bis 10 mV und einer Dauer von 500 ms. Die Spannungspotentiale wurden um +10 mV (liquid junction potential) korrigiert. Vor jeder Pulsfolge wurde die Kapazität der Zelle (bewegte sich im Bereich von 7-22 pF) und der Serienwiderstand (5-20 M Ω) bestimmt. Der Verstärker kompensierte 70 % des Serienwiderstandes. Die Stromsignale wurden mit einer Frequenz von 1 kHz aufgezeichnet.

Zwar erfolgte die Auswertung der Effekte der Testsubstanzen ausschließlich anhand der Stromspur bei -50 mV, jedoch erlaubte die Analyse der restlichen Spuren eine Beurteilung der Experimentqualität (Umkehrpotential, Leckströme).

2.2.3.2.2.3 Messungen in der Inside-out-Konfiguration

Ausgehend von der Cell-attached-Konfiguration nach der Ausbildung eines Gigaseals wurde zur Erzeugung eines Inside-out-Patches die Messpipette schnell zurückgezogen und dadurch ein Membranstück von der Zelle abgelöst (s. Abb. 12). Die nun zugängliche intrazelluläre Seite der Membran wurde vor das Sammelrohr gefahren, aus dem die künstliche intrazelluläre Lösung (s. Kap. 2.1.4.3.3) ausströmte. Das Bad und die Pipette wurden mit K^+ -HEPES-Lösung (s. Kap. 2.1.4.3.1.2) gefüllt.

Die Größe des Abdichtwiderstandes veränderte sich nach dem Herausreißen des Patches nicht. Dagegen wurde bei erfolgreich transfizierten, d.h. K_{ATP} -Kanäle-exprimierenden Zellen, innerhalb von Sekunden ein spontaner Summenstromanstieg beobachtet, der sich durch 1 mM MgATP hemmen ließ (= Bestimmung der Nullstrom-Basislinie). Auch hier konnte häufig, abhängig von der Zusammensetzung der Perfusionslösung (Nukleotidanwesenheit reduziert den Rundown), ein mehr oder weniger starker Rundown beobachtet werden. Er war in sehr guten Experimenten gering und ließ sich zuverlässig abschätzen (s. Abb. 23).

Analog zu den Versuchen in der Cell-attached-Konfiguration wurden während der i/o-Versuche die Membranstücke in der Pipette auf ein Haltepotential von -50 mV geklemmt. Die Daten wurden mit einer Rate von einem kHz aufgezeichnet. Pro Sekunde wurde aus 1000 Messpunkten ein Mittelwert gebildet und für die endgültige, graphische Auswertung herangezogen (s. Kap. 2.3.2).

2.2.3.3 Vorzeichenkonvention

Generell wird die Richtung des Stroms aus der Sicht der Zelle betrachtet. Somit wird ein Einstrom positiver Kaliumionen in die Zelle hinein als negativer Strom dargestellt (s. z.B. Abb. 23). Entsprechend wird der Ausstrom dieser Kationen aus der Zelle als positiver Strom verbildlicht (z.B. in der Abb. 22).

2.3 Datenauswertung und Statistik

2.3.1 Analyse der Wettbewerbsversuche

Die einzelnen Wettbewerbsversuche wurden durch die Anpassung der logarithmierten Hill-Gleichung an die gemittelten Messwerte ausgewertet (Modell mit einer Klasse an Bindungsstellen): Dabei gilt:

$$\% B_{\text{TOT}} = 100 - \frac{A}{1+10^{n(\text{pX}-\text{pIC}_{50})}} \quad \text{Gleichung (27)}$$

- A = Amplitude der spezifischen Bindung
 pX = $-\log X$, wobei X für die Konzentration des Inhibitors in mol/l steht
 pIC₅₀ = $-\log \text{IC}_{50}$; IC₅₀ ist die halbmaximale Inhibitionskonzentration und markiert den Mittel- bzw. Wendepunkt der Hemmkurve
 n = n_H = Hill-Koeffizient

Resultierte dabei ein Hill-Koeffizient der signifikant kleiner als 1 war, wurden die Versuchsdaten mit Hilfe des Bindungsmodells mit zwei Klassen an Bindungsstellen gefittet mit n_H = 1, pIC₅₀1 = Mittelpunkt der Hochaffinitätskomponente, pIC₅₀2 = Mittelpunkt der Niedrigaffinitätskomponente und A₁ = Amplitude der Hochaffinitätskomponente und A₂ = Amplitude der Niedrigaffinitätskomponente

$$\% B_{\text{TOT}} = 100 - \frac{A_1}{1+10^{\text{pX}-\text{pIC}_{50}1}} - \frac{A_2}{1+10^{\text{pX}-\text{pIC}_{50}2}} \quad \text{Gleichung (28)}$$

| | |
|---------------|---|
| $A_1 =$ | Amplitude der Hochaffinitätskomponente |
| $A_2 =$ | Amplitude der Niedrigaffinitätskomponente |
| $pX =$ | $-\log X$, wobei X für die Konzentration des Inhibitors in mol/l steht |
| $pIC_{501} =$ | $-\log IC_{501}$; IC_{501} ist die Inhibitionskonzentration bei der die Bindung an die Hochaffinitätskomponente halbmaximal ist |
| $pIC_{502} =$ | $-\log IC_{502}$; IC_{502} ist die Inhibitionskonzentration bei der die Bindung an die Niedrigaffinitätskomponente halbmaximal ist |
| $n_H:$ | der Hill-Koeffizient der beiden Komponenten ist auf 1 festgesetzt |

Die Kurven in den Abbildungen wurden aus gemittelten Daten der Einzelexperimente und deren SEM gebildet, an die geeignete Modellgleichungen angepasst wurden (Gleichung 27 und Gleichung 28 bei Kompetition; Gleichung 12 bei Sättigung). Die Parameter dieser Kurven stimmten im Allgemeinen gut mit den gemittelten Parametern der Einzelversuche überein. Die Anpassung der Modell-Gleichung an die Daten erfolgte mit Hilfe der SigmaPlot 9.0-Software (Statistical Product & Service Solutions Inc; Chicago; USA)

2.3.2 Erstellung und Analyse der Konzentrations-Wirkungs-Kurven

Die elektrophysiologischen Einzelexperimente wurden graphisch ausgewertet. Die Stromantwort auf die Testpulse während der Applikation einer Testsubstanz wurde, nach Erreichen der Gleichgewichtsbedingungen, zur Stromentwicklung in Abwesenheit der Testsubstanz (ebenfalls bei Gleichgewichtsbedingungen) in Bezug gesetzt. Mit Sorgfalt wurde dabei die Basislinie (Nullstrom-Linie) bestimmt. In Ganzzelleexperimenten diente dazu die Applikation von 10 mM $BaCl_2$, oder einer ausreichend hohen Konzentration eines K_{ATP} -Kanal-Inhibitors (GBC bzw. Repaglinid). In Inside-out-Versuchen wurde 1 mM MgATP zur vollständiger Inhibierung der K_{ATP} -Kanäle herangezogen. Der Abstand zwischen der Zero-current-Linie und der Stromspur in Abwesenheit eines Kanal-Modulators stand für 100 % des K_{ATP} -Stroms (I_{KATP}). Die Stromspur in Anwesenheit einer Testsubstanz wurde in % I_{KATP} ausgedrückt.

Die Auswirkungen jeder Konzentration einer Testsubstanz wurden mindestens in $n = 3$ Experimenten untersucht. An die resultierenden gemittelten Werte wurde die logarithmische Form der Hill-Gleichung (29) angepasst; es ergaben sich so charakteristische Konzentrations-Wirkungs-Kurven.

$$y = \frac{100}{1 + 10^{nH(pX - pIC_{50})}} \quad \text{Gleichung (29)}$$

y steht für die Wirkung der Testsubstanz (in % I_{KATP}), nH ist der Hill-Koeffizient, x die Konzentration der Testsubstanz in mol/l, IC_{50} der Wendepunkt der Konzentrations-Wirkungskurve mit $pX = -\log x$ und $pIC_{50} = -\log IC_{50}$.

2.3.3 Statistik

Die Amplituden A (Gleichung 27) bzw. y (Gleichung 29) sowie die pIC_{50} bzw. pK_D -Werte (aus den pIC_{50} -Werten nach Cheng-Prusoff-Korrektur) sind normalverteilt (Christopoulos, 1998). Bei der Auswertung einer Versuchsreihe konnten deshalb aus diesen Werten arithmetische Mittel und die Standardabweichungen der Mittelwerte (SEM = standard error of the mean) gebildet werden. Die Konfidenzintervalle der K_D -Werte bzw. der IC_{50} wurden wie folgt berechnet:

$$10^{-y} \quad \text{mit} \quad y = pK_D \pm 2 \text{ SEM} \quad \text{Gleichung (30)}$$

Die so gewonnenen Parameter sind in den Ergebnistabellen dargestellt.

Die normalverteilten Variablen (Smirnow-Kolmogorow-Test) können einer einfachen Varianzanalyse unterzogen und potentielle Unterschiede mit geeigneten Tests (z.B. student's t-test) auf statistische Signifikanz untersucht werden. Bei der Ermittlung des Fehlers der pK -, bzw. pIC_{50} -Werte wurden die Regeln der Fehlerrechnung angewandt (Bevington, 1969). Bei zwei Parametern mit Fehlern $a \pm \sigma_a$, $b \pm \sigma_b$ ($\sigma = \text{SEM}$) wurden die Fehler wie folgt berechnet:

Summe und Differenzbildung:

$$y = a \pm b \quad \rightarrow \quad \sigma_y = \sqrt{\sigma_a^2 + \sigma_b^2} \quad \text{Gleichung (31)}$$

(absolute Fehlerquadrate)

Produkt und Quotient:

$$y = a \cdot b \text{ bzw. } y = \frac{a}{b} \rightarrow \frac{\sigma_y}{y} = \sqrt{\frac{\sigma_a^2}{a^2} + \frac{\sigma_b^2}{b^2}} \quad \text{Gleichung (32)}$$

(relative Fehlerquadrate)

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

3 Ergebnisse

3.1 Selektivität der insulinotropen Substanzen für die K_{ATP} -Kanalsubtypen

Sulfonylharnstoffe und Glinide inhibieren die K_{ATP} -Kanäle und können daher zur Stimulierung der Insulinsekretion als Diabetes-Typ 2-Therapeutika eingesetzt werden. Dabei ist es wichtig, dass die insulinotropen Verbindungen selektiv am pankreatischen Kir6.2/SUR1-Kanal, nicht jedoch an den kardiovaskulären Kanäle (Kir6.2/SUR2A und Kir6.1/SUR2B) wirken. Die bisherige Datenlage zur Selektivität der SU und Glinide ist nicht vollständig und zum Teil widersprüchlich (s. Kap. 1.2.8.1). Im folgenden Kapitel werden Radioligandbindungsstudien vorgestellt, die mit dem Ziel durchgeführt wurden die Affinität ausgewählter SU und Glinide zu den wichtigsten K_{ATP} -Kanaltypen Kir6.2/SUR1, Kir6.2/SUR2A und Kir6.1/SUR2B in einem einheitlichen, möglichst physiologischen *in vitro*-System zu bestimmen. Die Bindungsdaten werden durch Ergebnisse von Untersuchungen der Wirkung von GBC und Repaglinid auf die genannten Kanalsubtypen mit Hilfe der Saugelektrodeentechnik ergänzt.

3.1.1 Bestimmung der Affinität ausgewählter Sulfonylharnstoffe und Glinide zum Kir6.2/SUR1 und Kir6.2/SUR2A in Radioligandbindungsstudien

Die Inhibitionskonstanten der A+B-Liganden (GBC, Glimepirid), A-Liganden (Glibornurid, Nateglinid), sowie der B-Liganden (Repaglinid, (-)-AZ-DF265, Meglitinid, UL-DF9) wurden in homologen bzw. heterologen Verdrängungsversuchen von ^3H -GBC als Radioligand an intakten HEK293-Zellen, transient transfiziert mit Kir6.2 und SUR1 bzw. Kir6.2 und SUR2A bestimmt.

Um möglichst physiologische Bedingungen zu simulieren, wurden die Versuche bei 37°C und an intakten Zellen durchgeführt. Der carbogenbegaste Inkubationspuffer (siehe Kap. 2.1.4.1.3) hatte einen pH-Wert von 7,4. Um Gleichgewichtsbedingungen zu gewährleisten, betrug die Inkubationszeit in allen Experimenten 30 min. Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung diente die Verdrängung des Radioliganden durch 100 nM GBC (Kir6.2/SUR1) bzw. 100 μM P1075 (Kir6.2/SUR2A) (Hambrock et al., 2001; Stephan et al., 2005).

Die Kotransfektion der HEK-Zellen mit Kir6.2 (cDNA der Maus im pcDNA3.1(+)-Vektor) und SUR1 (cDNA der Ratte im pcDNA3.1(+)-Vektor) erfolgte für die Versuchsreihen mit GBC, Repaglinid und Nateglinid nach der Lipofectamin-Methode (siehe Kap. 2.2.1.4.2). Im Verlauf des Projektes zeigte sich bezüglich der Transfektionsrate eine klare Überlegenheit des Lipofectamin2000-Reagenz (vgl. die B_{TOT} -Werte in den Ergebnistabellen). Um das Signal-

Rausch-Verhältnis zugunsten der spezifischen Bindung zu verschieben, wurden die restlichen Transfektionen, darunter die meisten (Ausnahme: GBC-Studien) Kotransfektionen mit Kir6.2 und SUR2A (cDNA der Maus im pcDNA3.1(+)-Vektor) mit Hilfe der effizienteren Lipofectamin2000-Methode (Kap. 2.2.1.4.3) durchgeführt. Das molare Plasmidverhältnis Kir/SUR lag bei 1:1.

Um zu verhindern, dass mehr als 5 % des Radioliganden gebunden werden, und somit die Bedingung $R_0 \ll I_0$ des Bindungsmodells (siehe Kap. 2.2.2.3) zu erfüllen, wurde bei den Experimenten an Kir6.2/SUR1, wegen der erwarteten hohen $^3\text{H-GBC}$ -Affinität, möglichst wenig Protein eingesetzt (siehe Proteinspalte in den Ergebnistabellen). Eine Erhöhung der Labelkonzentration hätte diesbezüglich zwar den gleichen Effekt wie die Senkung der Proteinkonzentration, würde aber einen unnötig großen Cheng-Prusoff-Korrekturfaktor (Gleichung 16) nach sich ziehen.

3.1.1.1 Homologe Verdrängung der $^3\text{H-GBC}$ Bindung an Kir6.2/SUR1 und Kir6.2/SUR2A

Glibenclamid (s. Abb. 6) gehört zu den langkettigen Sulfonylharnstoffen und somit zur Klasse der A+B-Liganden (siehe Kap. 1.2.8.1). Der Abbildung 14 und Tabelle 3 können die Versuchsparameter und die Ergebnisse der homologen $^3\text{H-GBC}$ -Kompetition an Kir6.2/SUR1 und Kir6.2/SUR2A entnommen werden.

So beträgt die Dissoziationskonstante ($K_D = K_i$) am rekombinanten K_{ATP} -Kanal der Bauchspeicheldrüse 0,45 nM ($\text{p}K_i = 9,35 \pm 0,08$). Sie ergab sich aus den IC_{50} -Werten der 4 Einzelexperimente nach Abzug der eingesetzten Radioligandkonzentration ($\ll 1,92 \pm 0,05$ nM). Der mittlere Hill-Koeffizient von $1,07 \pm 0,03$ lässt auf Homogenität der Verdrängung schließen. Der Anteil der spezifischen $^3\text{H-GBC}$ Bindung (B_S) an der Gesamtbindung (B_{TOT}) lag im Schnitt bei 77 ± 2 %.

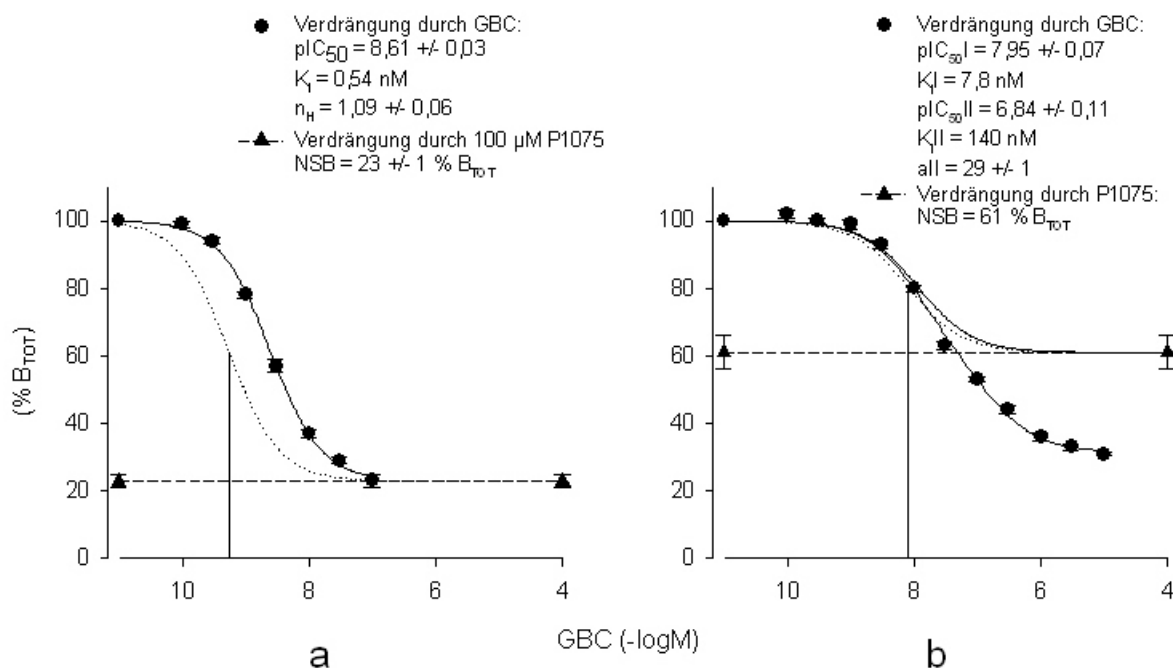


Abbildung 14 Homologe Konkurrenz der ³H-GBC Bindung an Kir6.2/SUR1 (a) und Kir6.2/SUR2A (b). Anpassung des Bindungsmodells mit einer bzw. zwei Bindungsstellen (s. Kap. 2.3.1) an die gemittelten gemessenen Werte.

Kir6.2/SUR1: Kurvengleichung: $f = 100 - B_s / (1 + 10^{n \cdot (x - pIC_{50})})$; Die Cheng-Prusoff-korrigierte Inhibitionskurve (Korrekturfaktor: 4,5) ist gepunktet dargestellt. Der Mittelpunkt dieser Kurve, extrapoliert auf die x-Achse, ergibt den pK_i-Wert.

Kir6.2/SUR2A: Kurvengleichung: $f = 100 - 39 / (1 + 10^{(x - pIC_{50I})}) - aII / (1 + 10^{(x - pIC_{50II})})$ Die Hochaffinitätskomponente ist als durchgezogene, gegen 61% strebende Kurve dargestellt. Aus der Cheng-Prusoff-Korrektur (Korrekturfaktor: 1,4) dieser Kurve (gepunktet dargestellt) resultiert der pK_i-Wert.

Die Inhibitionskurve am Kir6.2/SUR2A (rechte Graphik der Abbildung 14) zeigt einen biphasischen Verlauf ($n_H = 0,81 \pm 0,07$). Unter der Annahme, dass es sich bei dem Hochaffinitätsabschnitt der Kurve um spezifische, durch 100 μM P1075 vollständig verdrängbare ³H-GBC Bindung an Kir6.2/SUR2A handelt (Hambrock et al., 2001; Stephan et al., 2005), resultiert aus der Auswertung der 4 durchgeführten Versuche eine Gleichgewichtsdissoziationskonstante der ersten Komponente von 6,2 nM ($pK_i = 8,21 \pm 0,02$) mit einer Amplitude von 39 ± 1 % der totalen Radioligandbindung. Die Ergebnisse zeigen somit eine 14 [10;20]-fach höhere Affinität von Glibenclamid ($pK_i = 1,14 \pm 0,08$) zum pankreatischen Kanalsubtyp Kir6.1/SUR1 als zum Kir6.2/SUR2A des Myokards.

Tabelle 3 Homologe Verdrängung der ^3H -GBC Bindung an Kir6.2/SUR1 bzw. Kir6.2/SUR2AMittelwerte \pm SEM aus je 4 Einzelexperimenten.

| Rezeptor | ^3H -GBC (nM) | $\text{pK}_i /$ K_i (nM) | n_H | B_S (% B_{TOT}) | B_{TOT} (fmol/mg) | Protein (mg/ml) | ΔpK_i^* |
|------------------|---------------------------|---|--------------------|--------------------------------|-------------------------------|--------------------|-----------------------|
| Kir6.2/ SUR1 | 1,92 $\pm 0,05$ | 9,35 \pm 0,08/ 0,45 [0,31;0,65] | 1,07 $\pm 0,03$ | 77 ± 2 | 241 ± 18 | 0,20 $\pm 0,02$ | 1,14 $\pm 0,08$ |
| Kir6.2/ SUR2A | 3,42 $\pm 0,08$ | 8,21 \pm 0,02 6,2 [5,6;6,8] | 1 (fix) | 39 ± 1 | 186 ± 6 | 0,39 $\pm 0,05$ | |

* $\text{pK}_i = \text{pK}_i$ (Kir6.2/SUR1) - pK_i (Kir6.2/SUR2A)

Aus der Analyse der zweiten Komponente können Aussagen über die ^3H -GBC Bindung an endogene Nicht-SUR-Rezeptoren abgeleitet werden. Für diesen Teil der Kurve ergibt sich ein K_D -Wert von 135 nM ($\text{pK}_i = 6,87 \pm 0,07$) und eine Amplitude von 31 ± 1 % der totalen Bindung. Die restlichen 30 % der Verdrängungskurve repräsentieren den Anteil der Radioligandbindung an niedrigaffine endogene Komponenten, die in den dargestellten Experimenten nicht genau quantifiziert wurden, sowie das "Kleben" des Labels an die GF/C-Filter.

Generell ist festzustellen, dass in allen Kir6.2/SUR2A-Versuchen die geringere ^3H -GBC-Affinität eine größere Amplitude der unspezifischen Bindung und somit ein schlechteres Signal-Rausch-Verhältnis nach sich zog.

Zwischen den gemittelten Parametern der Einzelversuche (Tab. 3) und den Daten, die sich aus den gemeinsamen Fits ergeben (Abb. 14), gibt es hier und bei den nachfolgend vorgestellten Verbindungen keinen wesentlichen Unterschied.

Die ermittelten GBC-Dissoziationskonstanten wurden in folgenden Experimentreihen zur Cheng-Prusoff-Korrektur der IC_{50} -Werte herangezogen.

3.1.1.2 Verdrängung der ^3H -GBC Bindung an Kir6.2/SUR2A durch Glimepirid

Glimepirid (s. Abb. 6) ist ein weiterer Vertreter der langkettigen Sulfonylharnstoffe. Die Affinität der Substanz zum Kir6.2/SUR1 wurde von Frau Petra Kühner aus unserer Arbeitsgruppe bestimmt und beträgt 0,58 nM ($\text{pK}_i = 9,24 \pm 0,02$).

Die Verdrängungsversuche ($n = 4$) des Radioliganden durch Glimepirid an Kir6.2/SUR2A erbrachten einen K_i -Wert von 11,2 nM ($\text{pK}_i = 7,95 \pm 0,02$; s. Tab. 4) bei einem Hill-Koeffizienten von $1,22 \pm 0,07$. Aus pK_i von $1,29 \pm 0,02$ ergibt sich also für diese Verbindung ein Affinitätsunterschied zum Kir6.2/SUR1 von Faktor 19 [18;21].

Bei der Auswertung der Einzelexperimente wurden nur Glimepirid-Konzentrationen berücksichtigt die oberhalb der NSB-Linie (gestrichelte Gerade auf dem 61 % B_{TOT} -Niveau in der Abbildung 15; bestimmt mit $100 \mu\text{M}$ P1075) lagen und daher im Wesentlichen nur spezifische ^3H -GBC Bindung verdrängten. In der eingesetzten Fit-Gleichung wurde die Amplitude der spezifischen Bindung (im Schnitt $39 \pm 2\%$ B_{TOT}) festgesetzt. Sie errechnete sich aus dem Wert der totalen Bindung abzüglich der unspezifischen (d.h. P1075-unempfindlichen Bindung).

Abbildung 15 Heterologe Kompetition der ^3H -GBC Bindung an Kir6.2/SUR2A durch Glimepirid. Anpassung des Bindungsmodells mit einer Bindungsstelle (s. Kap. 2.3.1) an die gemittelten gemessenen Werte

Kurvengleichung: $f = 100 \cdot B_s / (1 + 10^{n \cdot (x - \text{pIC}_{50})})$, wobei $B_s = 39\%$ festgesetzt wurde; Die Cheng-Prusoff-korrigierte Inhibitionskurve (Korrekturfaktor = 1,6) ist gepunktet dargestellt. Der Mittelpunkt dieser Kurve extrapoliert auf die Abszisse ergibt den pK_i -Wert.

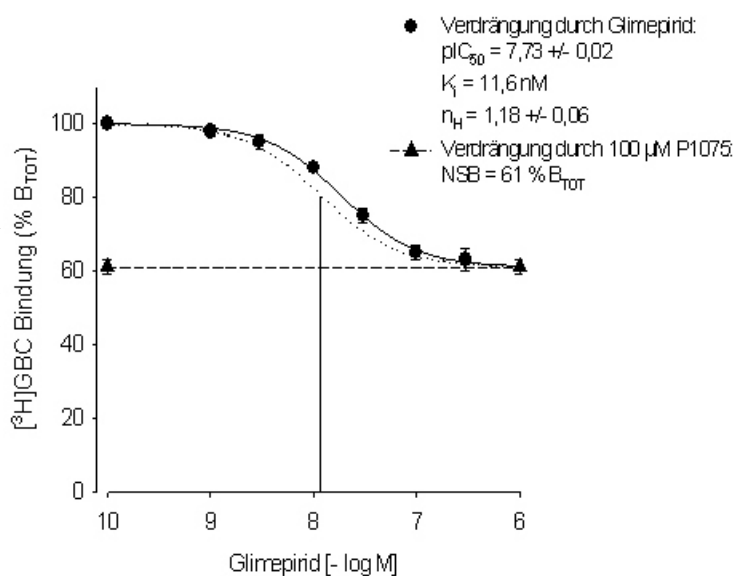


Tabelle 4 Heterologe Verdrängung der ^3H -GBC Bindung an Kir6.2/SUR2A durch GlimperidMittelwerte \pm SEM aus 4 Einzelexperimenten.

| Rezeptor | ^3H -GBC (nM) | pK_i / K_i (nM) | n_H | B_S (% B_{TOT}) | B_{TOT} (fmol/mg) | Protein (mg/ml) | ΔpK_i^* |
|--------------|------------------------|-----------------------------------|-----------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------|-----------------------|
| Kir6.2/SUR2A | 3,71 \pm 0,34 | 7,95 \pm 0,02/ 11 [10;12] | 1,22 \pm 0,07 | 61 \pm 2 | 209 \pm 10 | 0,18 \pm 0,01 | 1,29 \pm 0,02** |

* $\text{pK}_i = \text{pK}_i(\text{Kir6.2/SUR1}) - \text{pK}_i(\text{Kir6.2/SUR2A})$ ** $\text{pK}_{i\text{Kir6.2/SUR1}} = 9,24 \pm 0,02$ (Experimente wurden von Frau P. Kühner durchgeführt)

3.1.1.3 Verdrängung der ^3H -GBC Bindung an Kir6.2/SUR1 und Kir6.2/SUR2A durch Glibornurid

Die Selektivität der kurzkettigen Sulfonylharnstoffe wurde u.a. am Beispiel von Glibornurid (s. Abb. 6) getestet.

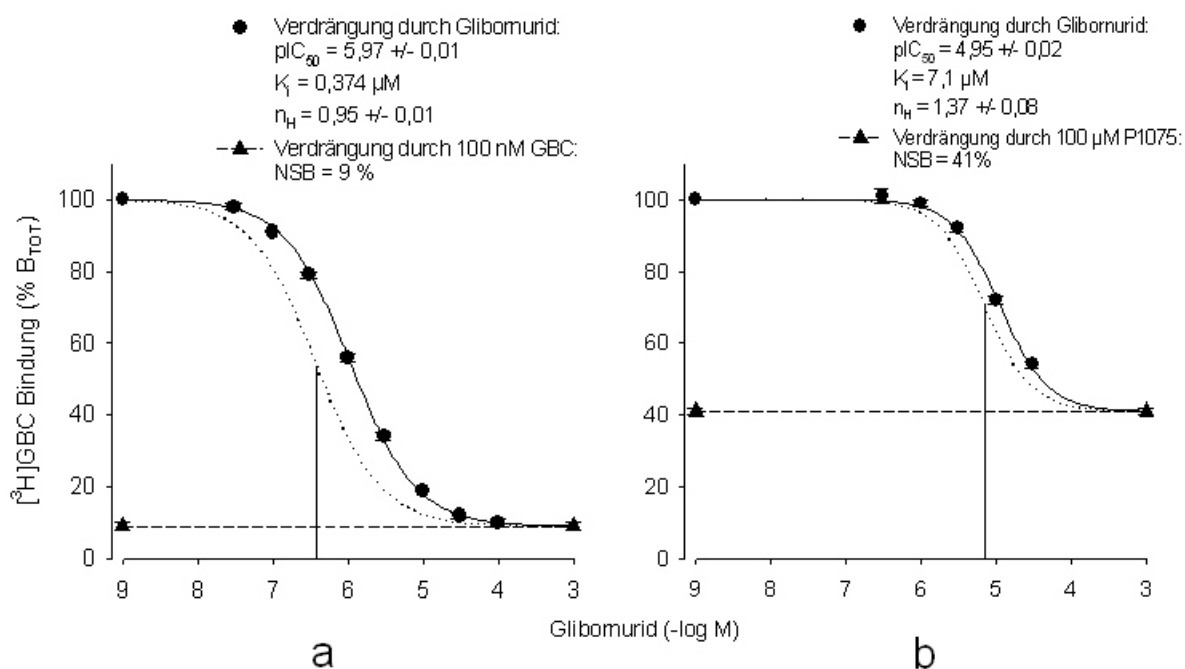


Abbildung 16 Heterologe Konkurrenz der ^3H -GBC Bindung an Kir6.2/SUR1 (a) und Kir6.2/SUR2A (b) durch Glibornurid. Anpassung des Bindungsmodells mit einer Bindungsstelle (s. Kap. 2.3.1) an die gemittelten gemessenen Werte.

Kurvengleichung: $f = 100 \cdot B_S / (1 + 10^{n \cdot (x - \text{pIC}_{50})})$, die B_S -Werte (91 bzw. 59 %) wurden festgesetzt; Die Cheng-Prusoff-korrigierten Inhibitionskurven (Korrekturfaktoren: Kir6.2/SUR1 = 2,9; Kir6.2/SUR2A = 1,6) sind gepunktet dargestellt. Die Mittelpunkte dieser Kurven extrapoliert auf die Abszisse ergeben die jeweiligen pK_i -Werte.

Die Konkurrenzkurven der einzelnen Versuche an Kir6.2/SUR1 waren homogen ($n_H = 0,95 \pm 0,03$). Die Inhibitionskonstante von Glibornurid lag bei $0,36 \mu\text{M}$ ($pK_i = 6,44 \pm 0,02$). Am myokardialen Subtyp des Kanals ergab sich ein K_i -Wert von $6,8 \mu\text{M}$ ($pK_i = 5,17 \pm 0,02$), bei einem Hill-Koeffizienten von $1,30 \pm 0,08$. Es ist denkbar, dass Glibornurid beim Einsatz höherer Konzentrationen ($> 10 \mu\text{M}$) in der Lage ist den Radioliganden aus der unspezifischen Bindung mit relativ hoher Affinität zu verdrängen, wodurch die gesamte Konkurrenzkurve einen steileren Verlauf nimmt. Die unspezifische Komponente wurde nicht genauer untersucht.

Ein Vergleich der Inhibitionskonstanten zeigt, dass Glibornurid den Radioliganden $^3\text{H-GBC}$ vom Kir6.2/SUR1 mit 19 [16,22] mal höherer Affinität verdrängte, als vom Kir6.2/SUR2A ($pK_i = 1,27 \pm 0,03$). Die weiteren Versuchsparameter können der Tabelle 5 und der Abbildung 16 entnommen werden.

Tabelle 5 Heterologe Verdrängung der $^3\text{H-GBC}$ Bindung an Kir6.2/SUR1 bzw. Kir6.2/SUR2A durch Glibornurid

Mittelwerte \pm SEM aus je 3 Einzelexperimenten.

| Rezeptor | $^3\text{H-GBC}$ (nM) | $pK_i /$ K_i (μM) | n_H | B_S (% B_{TOT}) | B_{TOT} (fmol/mg) | Protein (mg/ml) | ΔpK_i^* |
|------------------|--------------------------|--|-----------------|-------------------------|------------------------|--------------------|-----------------|
| Kir6.2/ SUR1 | $0,84 \pm 0,02$ | $6,44 \pm 0,02 /$ $0,36$ [0,33;0,40] | $0,95 \pm 0,03$ | 91 ± 1 | 572 ± 140 | $0,09 \pm 0,02$ | $1,27 \pm 0,03$ |
| Kir6.2/ SUR2A | $3,72 \pm 0,04$ | $5,17 \pm 0,02$ $6,8$ [6,2;7,4] | $1,30 \pm 0,08$ | 59 ± 1 | 230 ± 8 | $0,37 \pm 0,01$ | |

* $pK_i = pK_i$ (Kir6.2/SUR1) - pK_i (Kir6.2/SUR2A)

3.1.1.4 Verdrängung der ^3H -GBC Bindung an Kir6.2/SUR1 und Kir6.2/SUR2A durch Nateglinid

Das D-Phenylalanin-Derivat Nateglinid (s. Abb. 6) wird aufgrund der Strukturähnlichkeiten mit den Sulfonylharnstoffverbindungen der ersten Generation in die Gruppe der A-Liganden eingeordnet (siehe Kap. 1.2.8.1).

In drei ^3H -GBC-Kompetitionsexperimenten wurde die Inhibitionskonstante von Nateglinid am Kir6.2/SUR1 ermittelt. Beim homogenen Kurvenverlauf ($n_H = 1,02 \pm 0,03$) ergab sich ein K_i -Wert von $0,35 \mu\text{M}$ ($pK_i = 6,46 \pm 0,01$).

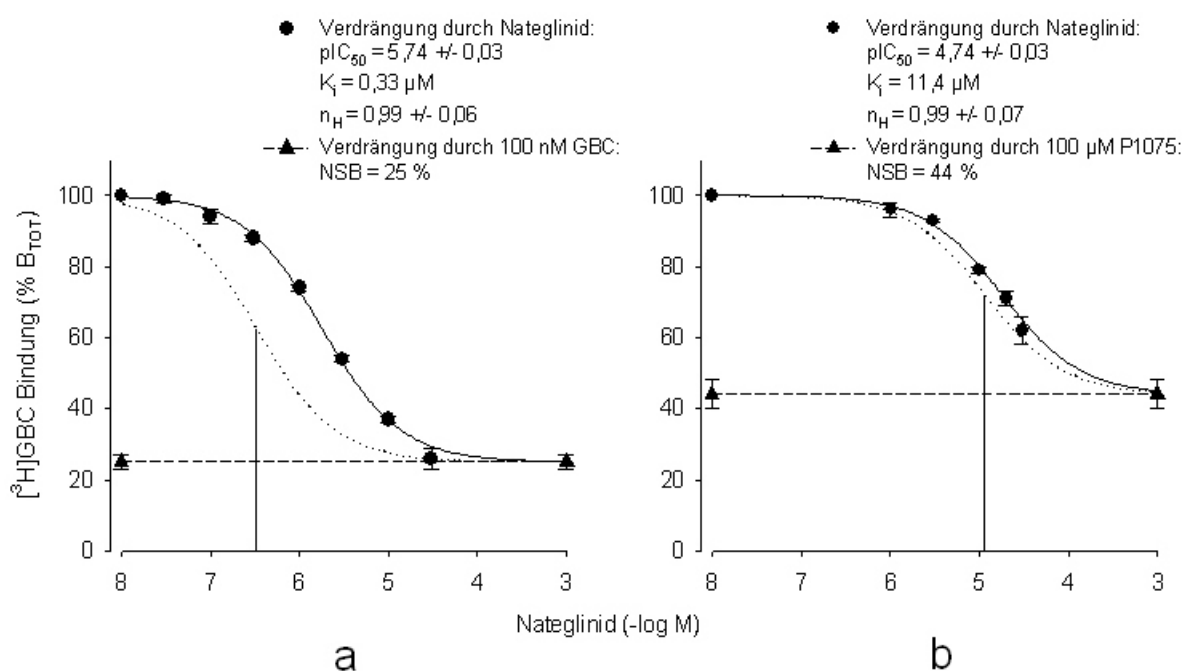


Abbildung 17 Heterologe Konkurrenz der ^3H -GBC Bindung an Kir6.2/SUR1 (a) und Kir6.2/SUR2A (b) durch Nateglinid. Anpassung des Bindungsmodells mit einer Bindungsstelle (s. Kap. 2.3.1) an die gemittelten gemessenen Werte.

Kurvengleichung: $f = 100 - B_s / (1 + 10^{n(x - pIC_{50})})$, die B_s -Werte (75 bzw. 56 %) wurden festgesetzt; Die Cheng-Prusoff-korrigierten Inhibitionskurven (Korrekturfaktoren: Kir6.2/SUR1 = 5,5; Kir6.2/SUR2A = 1,6) sind gepunktet dargestellt. Die Mittelpunkte dieser Kurven extrapoliert auf die Abszisse ergeben die jeweiligen pK_i -Werte.

Ebenfalls monophasisch ($n_H = 1,05 \pm 0,01$) verlief die Verdrängung des Radioliganden vom Kir6.2/SUR2A. Die aus 6 Einzelversuchen resultierende Nateglinid-Affinität war jedoch, mit $10 \mu\text{M}$ ($pK_i = 4,99 \pm 0,04$), 30 [25,35]-fach niedriger als am pankreatischen Kanalsubtyp ($pK_i = 1,47 \pm 0,04$; s. Tab. 6).

Tabelle 6 Heterologe Verdrängung der ^3H -GBC Bindung an Kir6.2/SUR1 bzw. Kir6.2/SUR2A durch Nateglinid

Mittelwerte \pm SEM aus 3 (Kir6.2/SUR1) bzw. 6 (Kir6.2/SUR2A) Einzelexperimenten.

| Rezeptor | ^3H -GBC (nM) | pK_i / K_i (μM) | n_H | B_S (% B_{TOT}) | B_{TOT} (fmol/mg) | Protein (mg/ml) | ΔpK_i^* |
|--------------|------------------------|--|-----------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------|-----------------------|
| Kir6.2/SUR1 | 2,02 \pm 0,06 | 6,46 \pm 0,01/ 0,35 [0,33;0,36] | 1,02 \pm 0,03 | 75 \pm 2 | 262 \pm 20 | 0,18 \pm 0,01 | 1,47 \pm 0,04 |
| Kir6.2/SUR2A | 3,66 \pm 0,12 | 4,99 \pm 0,04 10 [8,5;12] | 1,05 \pm 0,01 | 56 \pm 4 | 186 \pm 27 | 0,35 \pm 0,04 | |

* $\text{pK}_i = \text{pK}_i$ (Kir6.2/SUR1) - pK_i (Kir6.2/SUR2A)

3.1.1.5 Verdrängung der ^3H -GBC Bindung an Kir6.2/SUR1 und Kir6.2/SUR2A durch Repaglinid

Nur ein reiner B-Ligand, nämlich Repaglinid (s. Abb. 6), ist zur Zeit für die Therapie des Typ-II-Diabetes zugelassen.

Die ^3H -GBC-Verdrängung durch dieses Benzoesäure-Derivat verlief im Bereich der spezifischen Bindung an beiden untersuchten Rezeptorsubtypen monophasisch. Aus $n = 4$ Experimenten an Kir6.2/SUR1-Zellen resultierte ein K_i -Wert von 0,72 nM ($\text{pK}_i = 9,14 \pm 0,04$).

Eine Inhibitionskonstante von 1,55 nM ($\text{pK}_i = 8,81 \pm 0,02$) war das Ergebnis aus 3 Versuchen am Kir6.2/SUR2A.

Die geringe Differenz der pK_i -Werte von $0,33 \pm 0,04$ ist ein Ausdruck der, im Vergleich zu den A-, bzw. A+B-Liganden, mäßigen Selektivität zwischen den untersuchten Rezeptoren. Am rekombinanten System bindet Repaglinid an den K_{ATP} -Kanal der Bauchspeicheldrüse 2,1 [1,8;2,6] mal affiner als an den Kir6.2/SUR2A-Kanal des Herzmuskels.

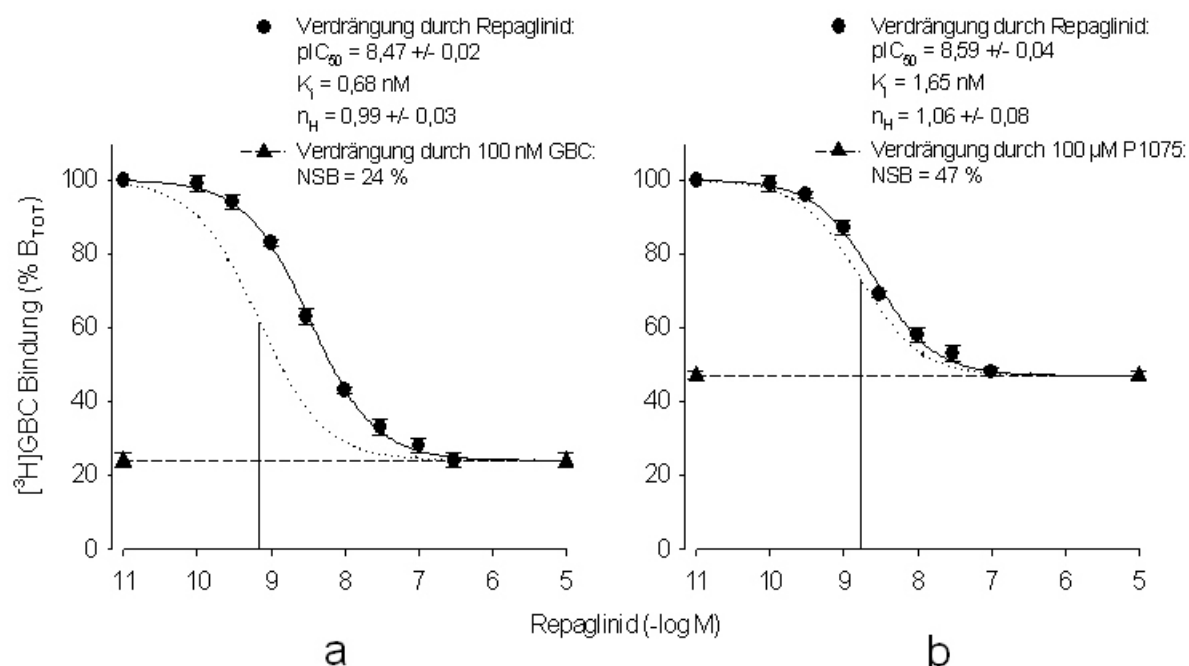


Abbildung 18 Heterologe Konkurrenz der ^3H -GBC Bindung an Kir6.2/SUR1 (a) und Kir6.2/SUR2A (b) durch Repaglinid. Anpassung des Bindungsmodells mit einer Bindungsstelle (s. Kap. 2.3.1) an die gemittelten gemessenen Werte.

Kurvengleichung: $f = 100 - B_s / (1 + 10^{n \cdot (x - pIC_{50})})$, die B_s -Werte (76 bzw. 53 %) wurden festgesetzt; Die Cheng-Prusoff-korrigierten Inhibitionskurven (Korrekturfaktoren: Kir6.2/SUR1 = 5,0; Kir6.2/SUR2A = 1,6) sind gepunktet dargestellt. Die Mittelpunkte dieser Kurven extrapoliert auf die Abszisse ergeben die jeweiligen pK_i -Werte.

Tabelle 7 Heterologe Verdrängung der ^3H -GBC Bindung an Kir6.2/SUR1 bzw. Kir6.2/SUR2A durch Repaglinid.

Mittelwerte \pm SEM aus 4 (Kir6.2/SUR1) bzw. 3 (Kir6.2/SUR2A) Einzelexperimenten.

| Rezeptor | ^3H -GBC (nM) | pK_i / K_i (nM) | n_H | B_s (% B_{TOT}) | B_{TOT} (fmol/mg) | Protein (mg/ml) | ΔpK_i^* |
|--------------|------------------------|---|-----------------|----------------------|---------------------|-----------------|-----------------|
| Kir6.2/SUR1 | 1,78 \pm 0,04 | 9,14 \pm 0,04/ 0,72 [0,60;0,87] | 0,95 \pm 0,01 | 76 \pm 2 | 269 \pm 103 | 0,17 \pm 0,01 | 0,33 \pm 0,04 |
| Kir6.2/SUR2A | 3,48 \pm 0,13 | 8,81 \pm 0,02 1,55 [1,41;1,70] | 1,05 \pm 0,03 | 53 \pm 1 | 193 \pm 28 | 0,31 \pm 0,08 | |

* $pK_i = pK_i$ (Kir6.2/SUR1) - pK_i (Kir6.2/SUR2A)

3.1.1.6 Verdrängung der ^3H -GBC Bindung an Kir6.2/SUR1 und Kir6.2/SUR2A durch (-)-AZ-DF 265

Nicht als Arzneimittel zugelassen ist ein weiterer B-Ligand (-)-AZ-DF 265 (s. Abb. 6). Dieses Benzoessäurederivat weist große Strukturähnlichkeiten mit Repaglinid auf; darunter auch den Piperidin-Substituenten.

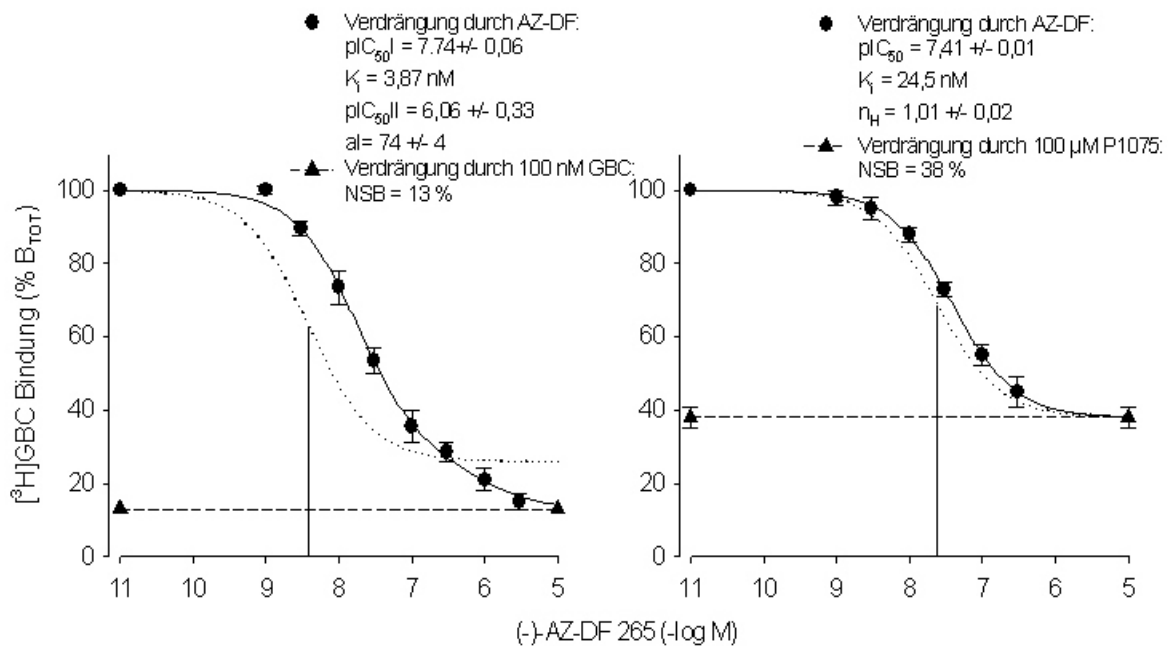


Abbildung 19 Heterologe Konkurrenz der ^3H -GBC Bindung an Kir6.2/SUR1 (a) und Kir6.2/SUR2A (b) durch (-)-AZ-DF 265. Anpassung des Bindungsmodells mit zwei bzw. einer Bindungsstelle an die gemittelten Messdaten.

Kir6.2/SUR1: Kurvengleichung: $f = 100 - aI / (1 + 10^{(x - pIC_{50I})}) - (87 - aI) / (1 + 10^{(x - pIC_{50II})})$; Die Cheng-Prusoff-korrigierte Auflösung der Hochaffinitätskomponente (Korrekturfaktor = 4,7, $n_H = 1$) ist gepunktet dargestellt. Der Mittelpunkt dieser Kurve extrapoliert auf die x-Achse ergibt den pK_I -Wert.

Kir6.2/SUR2A: Kurvengleichung: $f = 100 - B_S / (1 + 10^{(n \cdot (x - pIC_{50}))})$, der B_S -Wert = 62 % wurden festgesetzt; Die Cheng-Prusoff-korrigierte Inhibitionskurve (Korrekturfaktor = 1,6) ist gepunktet dargestellt. Der Mittelpunkt dieser Kurve extrapoliert auf die Abszisse ergibt den pK_I -Wert.

In vier Bindungsversuchen am Kir6.2/SUR1 mit (-)-AZ-DF 265 als ^3H -GBC-Kompetitor fiel im Bereich der spezifischen Bindung ein leicht biphasischer Verlauf der Verdrängungskurven auf. Die Auswertung der Experimente mit Hilfe des Zwei-Komponenten-Bindungsmodells, unter Berücksichtigung der Konzentration und des K_D -Wertes des Radioliganden, führte zur Ermittlung einer AZ-DF-Hochaffinitätsinhibitionskonstante von 3,7 nM ($pK_I = 8,43 \pm 0,06$). Diese Komponente machte 83 ± 2 % der spezifischen Bindung aus. Der niedrigaffine Bereich (K_{II} von ~ 180 nM) erstreckte sich über 17 ± 1 % B_S . In ähnlicher Größenordnung (91 nM) liegt auch die ^3H -GBC-Inhibitionskonstante von (-)-AZ-DF 265 an HEK293-Zellen die den SUR1 alleine

exprimieren (Daten aus der Dissertation von Frau Susanne Bieger). Möglicherweise ist der niedrigaffine Kurvenanteil auf den nicht komplexierten Sulfonylharnstoffrezeptor zurückzuführen.

Bei einem durchschnittlichen Hill-Koeffizienten von $1,06 \pm 0,05$ ist am Kir6.2/SUR2A von Homogenität der Competition auszugehen. Die Hemmung der Radioligandbindung durch (-)-AZ-

Tabelle 8 Heterologe Verdrängung der ^3H -GBC Bindung an Kir6.2/SUR1 bzw. Kir6.2/SUR2A durch (-)-AZ-DF 265.

Mittelwerte \pm SEM aus 4 (Kir6.2/SUR1) bzw. 3 (Kir6.2/SUR2A) Einzelexperimenten.

| Rezeptor | ^3H -GBC (nM) | pK_i / K_i (nM) | n_H | B_S (% B_{TOT}) | B_{TOT} (fmol/mg) | Protein (mg/ml) | ΔpK_i^* |
|--------------|------------------------|--------------------------------------|-----------------|----------------------|---------------------|-----------------|-----------------------|
| Kir6.2/SUR1 | 1,67 \pm 0,05 | 8,43 \pm 0,06/ 3,7 [2,8;4,9] | 1 (fest) | 87 \pm 2 | 409 \pm 89 | 0,13 \pm 0,03 | 0,83 \pm 0,06 |
| Kir6.2/SUR2A | 3,78 \pm 0,01 | 7,60 \pm 0,02 25 [22;27] | 1,06 \pm 0,05 | 62 \pm 3 | 247 \pm 53 | 0,33 \pm 0,06 | |

* $\text{pK}_i = \text{pK}_i$ (Kir6.2/SUR1) - pK_i (Kir6.2/SUR2A)

DF 265 an diesem Rezeptor geschah im Mittel mit einer Affinität von 25 nM ($\text{pK}_i = 7,60 \pm 0,02$), folglich 6,7 [5,1;8,9] mal schwächer als am Kir6.2/SUR1. Im Vergleich der Piperidino-Verbindungen zeigt (-)-AZ-DF 265 somit eine ca. 3-fach höhere SUR1-Selektivität als Repaglinid.

3.1.1.7 Verdrängung der ^3H -GBC Bindung an Kir6.2/SUR1 und Kir6.2/SUR2A durch Meglitinid

Der Austausch einer Teilstruktur (Sulfonylharnstoffgruppe + lipophiles, A-Ligand-charakteristisches Zentrum) in Glibenclamid durch einen Carboxylrest liefert die Strukturformel eines weiteren B-Liganden in unseren Selektivitätsstudien: Meglitinid (s. Abb. 6).

Die gemeinsamen Anpassungskurven der Abbildung 20 sind monophasisch. Dies entspricht den Gegebenheiten in den Einzelexperimenten (vgl. die Hill-Koeffizienten in der Tabelle 9) aus denen für Meglitinid ein K_i -Wert von 3,2 μM (Kir6.2/SUR1; $\text{pK}_i = 5,50 \pm 0,03$) bzw. 0,83 μM (Kir6.2/SUR2A; $\text{pK}_i = 6,08 \pm 0,05$) resultierte.

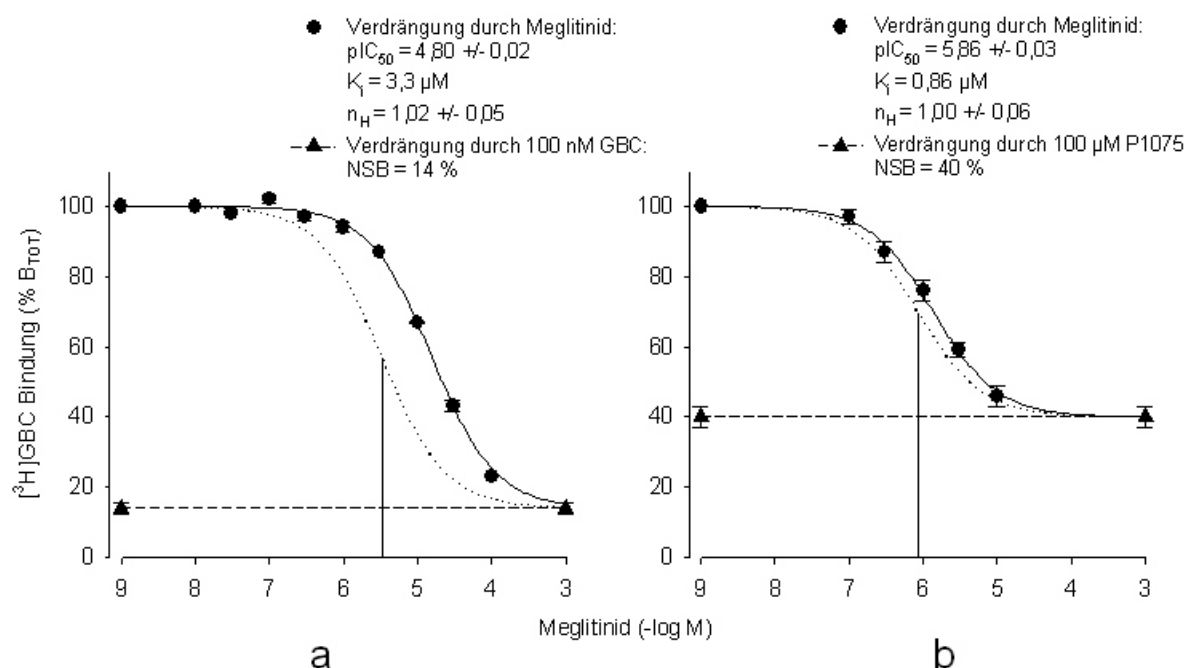


Abbildung 20 Heterologe Konkurrenz der ^3H -GBC Bindung an Kir6.2/SUR1 (a) und Kir6.2/SUR2A (b) durch Meglitinid. Anpassung des Bindungsmodells mit einer Bindungsstelle (s. Kap. 2.3.1) an die gemittelten gemessenen Werte.

Kurvengleichung: $f = 100 \cdot B_s / (1 + 10^{n \cdot (x - pIC_{50})})$, die B_s -Werte (86 bzw. 60 %) wurden festgesetzt; Die Cheng-Prusoff-korrigierten Inhibitionskurven (Korrekturfaktoren: Kir6.2/SUR1 = 4,8; Kir6.2/SUR2A = 1,6) sind gepunktet dargestellt. Die Mittelpunkte dieser Kurven extrapoliert auf die Abszisse ergeben die jeweiligen pK_i -Werte.

Wie der Tabelle 9 weiter zu entnehmen ist, zeigt der Selektivitätsindikator pK_i einen negativen Wert ($-0,58 \pm 0,06$). Ergo verdrängt Meglitinid ^3H -GBC vom Kir6.2/SUR2A-Rezeptor leichter als vom Kir6.2/SUR1-Komplex (Faktor der Pankreas/Herz-Selektivität: $10^{-0,58} = 0,26$ [0,20;0,35]).

Tabelle 9 Heterologe Verdrängung der ^3H -GBC Bindung an Kir6.2/SUR1 bzw. Kir6.2/SUR2A durch Meglitinid.

Mittelwerte \pm SEM aus 3 (Kir6.2/SUR1) bzw. 4 (Kir6.2/SUR2A) Einzelerperimenten.

| Rezeptor | ^3H -GBC (nM) | pK_i / K_i (μM) | n_H | B_s (% B_{TOT}) | B_{TOT} (fmol/mg) | Protein (mg/ml) | ΔpK_i^* |
|--------------|------------------------|--|-----------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------|------------------|
| Kir6.2/SUR1 | 1,72 \pm 0,04 | 5,50 \pm 0,03/ 3,2 [2,8;3,6] | 0,99 \pm 0,06 | 86 \pm 2 | 645 \pm 239 | 0,14 \pm 0,04 | -0,58 \pm 0,06 |
| Kir6.2/SUR2A | 3,75 \pm 0,07 | 6,08 \pm 0,05 0,83 [0,66;1,05] | 1,03 \pm 0,08 | 60 \pm 3 | 208 \pm 12 | 0,40 \pm 0,02 | |

* $pK_i = pK_i$ (Kir6.2/SUR1) - pK_i (Kir6.2/SUR2A)

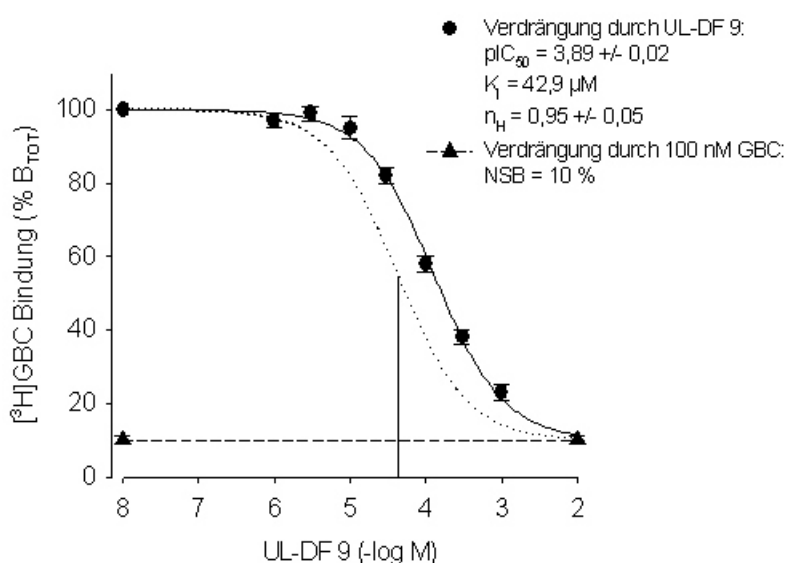
3.1.1.8 Verdrängung der ^3H -GBC Bindung an Kir6.2/SUR1 durch UL-DF 9

Nach (-)-AZ-DF 265 ist UL-DF 9 (s. Abb. 6) ein zweites Benzoesäure-Analogon, das im Rahmen unseres Selektivitätsprojekts getestet wurde.

Aus den pK_i -Werten der $n = 3$ durchgeführten Versuche ergab sich für UL-DF 9 am Kir6.2/SUR1 eine mittlere Gleichgewichtsinhibitionskonstante von $41 \mu\text{M}$ ($\text{pK}_i = 4,38 \pm 0,01$). Ein durchschnittlicher Hill-Koeffizient nahe 1 (siehe Tabelle 10) belegte die homogene Natur dieser ^3H -GBC Kompetition.

Abbildung 21 Heterologe Kompetition der ^3H -GBC Bindung an Kir6.2/SUR1 durch UL-DF 9 Anpassung des Bindungsmodells mit einer Bindungsstelle (s. Kap. 2.3.1) an die gemittelten gemessenen Werte

Kurvengleichung: $f = 100 \cdot B_s / (1 + 10^{n \cdot (x - \text{pIC}_{50})})$, wobei $B_s = 90\%$ festgesetzt wurde; Die Cheng-Prusoff-korrigierte Inhibitionskurve (Korrekturfaktor = 3) ist gepunktet dargestellt.



Da Frau Petra Kühner in analogen Experimenten an Kir6.2/SUR2A einen K_i -Wert von $3,0 \mu\text{M}$ ermittelte, zeigt sich, dass UL-DF 9 ähnlich wie Meglitinid eine signifikante Kardioselektivität besitzt. Der Selektivitätsfaktor liegt bei $0,07 [0,04;0,12]$.

Tabelle 10 Heterologe Verdrängung der ^3H -GBC Bindung an Kir6.2/SUR1 durch UL-DF 9

Mittelwerte \pm SEM aus 3 Einzelerperimenten.

| Rezeptor | ^3H -GBC (nM) | $\text{pK}_i / K_i (\mu\text{M})$ | n_H | B_s (% B_{TOT}) | B_{TOT} (fmol/mg) | Protein (mg/ml) | ΔpK_i^* |
|-------------|------------------------|-----------------------------------|-----------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------|-----------------------|
| Kir6.2/SUR1 | $0,90 \pm 0,02$ | $4,38 \pm 0,01 / 41 [39;43]$ | $0,94 \pm 0,10$ | 90 ± 1 | 695 ± 119 | $0,05 \pm 0,01$ | $-1,14 \pm 0,11^{**}$ |

* $\text{pK}_i = \text{pK}_i (\text{Kir6.2/SUR1}) - \text{pK}_i (\text{Kir6.2/SUR2A})$

** $\text{pK}_i_{\text{Kir6.2/SUR2A}} = 5,52 \pm 0,11$ (Experimente wurden von Frau P. Kühner durchgeführt)

Ergänzende Bemerkung:

Es ist nicht gelungen, mit transienter Transfektion der HEK293-Zellen ein ausreichend großes und stabiles Signal der spezifischen ^3H -GBC-Bindung am Kir6.1/SUR2B-Komplex zu erreichen. Erst die Etablierung eines permanent exprimierenden Systems durch den Diplombiochemiker Marcus Winkler ermöglichte die Ermittlung der Affinität der insulinotropen Substanzen zum rekombinanten, vaskulären K_{ATP} -Kanal (Winkler et al., in Vorbereitung).

3.1.2 Wirkung von Repaglinid und Glibenclamid auf die rekombinanten K_{ATP} -Kanäle der Bauchspeicheldrüse und des kardiovaskulären Systems

Repaglinid und Glibenclamid zeigten in den Radioligandbindungsstudien die geringste Pankreasselektivität ($\text{pK}_i = 0,33 \pm 0,04$ bzw. $1,14 \pm 0,08$) unter den untersuchten, zugelassenen Typ-II-Antidiabetika.

Mit Hilfe der Saugelektrode-technik wurden die Effekte der beiden Arzneistoffe auf Kir6.2/SUR1-, Kir6.2/SUR2A- und Kir6.1/SUR2B-Kanäle untersucht. Wie in den Bindungsstudien war es wichtig, die Experimente an einem der Physiologie des Menschen angepassten System durchzuführen. Gewählt wurde deshalb die Ganzzellkonfiguration bei einer Versuchstemperatur von 37°C und der Anwesenheit von 1 mM MgATP und $0,27\text{ mM MgGDP}$ in der Pipettenlösung (K^+ -Glutamat-Lsg.; siehe Kap. 2.1.4.3.2). Während der Dialyse der transfizierten HEK293-Zelle mit dieser Lösung war die Entwicklung eines stabilen, der Whole-cell-Konfiguration angemessenen ($40\text{ pA} < I_{\text{KATP}} < 1\text{ nA}$) K_{ATP} -Stroms möglich. Im Bad wurde Na^+ -HEPES-Lösung eingesetzt (siehe Kap. 2.1.4.3.1.1). Der Pipettenwiderstand lag zwischen 2 und 6 $\text{M}\Omega$.

Die Zelltransfektion mit Kir6.2 und SUR1 bzw. Kir6.2 und SUR2A erfolgte nach der Lipofactamin2000-Methode, bei einem molaren Kir/SUR-DNA-Verhältnis von 1,2:1. Die eingesetzte DNA wurde auf ein Zehntel der üblichen Konzentration reduziert (von $10\text{ }\mu\text{g/Schale}$ auf $1\text{ }\mu\text{g/Schale}$; s. Kap. 2.2.1.4.3). Erfolgreich transfizierte Zellen konnten aufgrund der grünen Fluoreszenz im UV Licht, als Folge der Kotransfektion mit GFP-DNA, erkannt werden (siehe Kap. 2.2.1.4.4). Untersuchungen am vaskulären K_{ATP} -Kanals wurden im rekombinanten, permanent exprimierenden HEK-Zellsystem durchgeführt.

Die Selektivität von Repaglinid und GBC sollte anhand der mittleren inhibitorischen Konzentration (IC_{50}) und der intrinsischen Effektivität aus den Konzentrations-Wirkungs-Kurven der Substanzen am jeweiligen Rezeptor beurteilt werden.

3.1.2.1 Inhibition des Kir6.2/SUR1 durch Repaglinid und Glibenclamid

3.1.2.1.1 Inhibition des Kir6.2/SUR1 durch Repaglinid und Glibenclamid in der Ganzzellkonfiguration

Abbildung 22 zeigt, dass 10 nM Repaglinid und 1 nM GBC den rekombinanten K_{ATP} -Kanal der Bauchspeicheldrüse vollständig inhibierten. Dies wurde in weiteren 4 (Repaglinid) bzw. 3 (GBC) Versuchen bestätigt.

Ferner wird aus dieser Graphik ersichtlich, dass eine genaue IC_{50} -Bestimmung der Verbindungen in der Ganzzellkonfiguration nicht möglich war. Die Kinetik der Hemmung hatte eine lange Halbwertszeit (10 nM REP: 2,7 min, aus $\langle \rangle k_{app} = 0,259 \pm 0,041$; 1 nM GBC: 6,5 min,

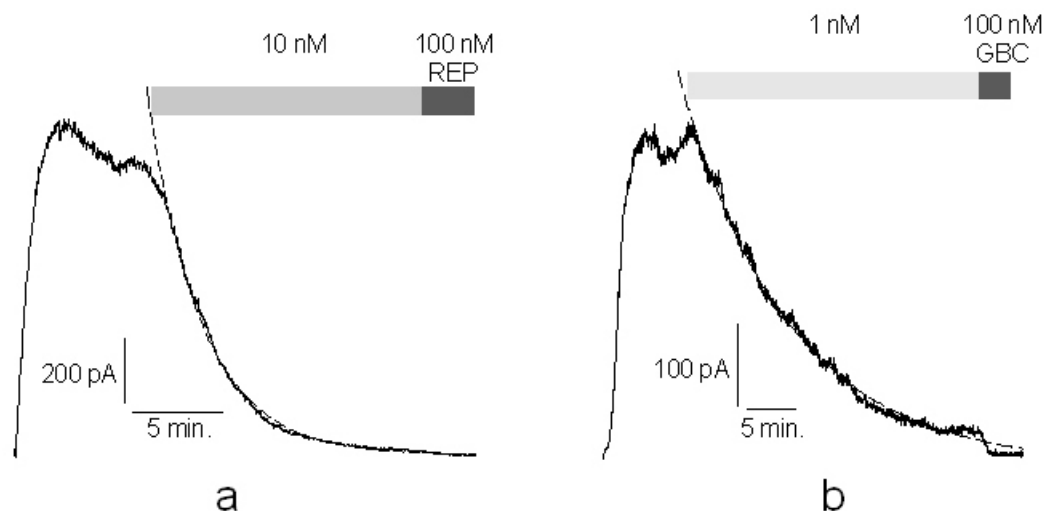


Abbildung 22 Hemmung des Kir6.2/SUR1 durch Repaglinid (a) und Glibenclamid (b) in der Ganzzelleableitung. Originalspuren bei einer Klemmspannung von -60 mV.

a.) Die Dialyse der Zelle mit der Pipettenlösung (s. Kap. 2.2.3.2.2.2) führt zur Entstehung eines K_{ATP} -Stroms. Dieser wird nach dem Erreichen eines stabilen Niveaus durch 10 nM Repaglinid vollständig inhibiert. Kumulative Gabe von 100 nM Repaglinid verstärkt diesen Effekt nicht. Aus der Anpassung einer Exponentialfunktion an den Inhibitionsverlauf ergibt sich eine Halbwertszeit von 2,0 min

b.) Aus der Applikation von 1 nM GBC resultiert eine Abnahme des $I_{K_{ATP}}$. Wegen der langsamen Kinetik (HWZ: 7,1 min) und mangels einer Rundown-Schätzung ist eine genaue Quantifizierung des Blocks schwierig. Nach der Extrapolation der Hemmkurve im Sinne einer exponentiell abnehmenden Funktion (gestrichelte Kurve), muss man von einer vollständigen Inhibition der Kanalaktivität durch 1 nM GBC ausgehen.

aus $\langle \rangle k_{app} = 0,106 \pm 0,032$) und war während der Auswaschphase (nicht gezeigt) irreversibel. Die K_{ATP} -Kanalinhibierung durch noch niedrigere Substanzkonzentrationen würde daher unverhältnismäßig langsam und vom spontanen Aktivität-Rundown überdeckt verlaufen. Anhand der vorliegenden Daten ist ein IC_{50} -Wert deutlich unter 10 nM (Repaglinid) bzw. 1 nM (GBC) anzunehmen.

3.1.2.1.2 Inhibition des Kir6.2/SUR1 durch Repaglinid und Glibenclamid in der Inside-out-Konfiguration

Die SU und Glinide erreichen ihre Bindungsregionen von der zytosolischen Seite der Zellmembran aus (Schwanstecher et al., 1994a). In der Inside-out-Konfiguration der Saugelektrodenteknik ist es möglich die Blocker direkt auf die Innenseite des isolierten Zellmembranstückes zu applizieren, wodurch eine schnellere Wirkung erzielt werden kann. Verbunden mit der Möglichkeit der Rundown-Schätzung durch sorgfältige Basisstrombestimmung (s. Abb. 23), bei Ausschluss der Versuche mit zu starkem Rundown, sollte dies eine quantitative Beurteilung der Wirkstärke und Effizienz von Repaglinid und GBC am Kir6.2/SUR1 ermöglichen.

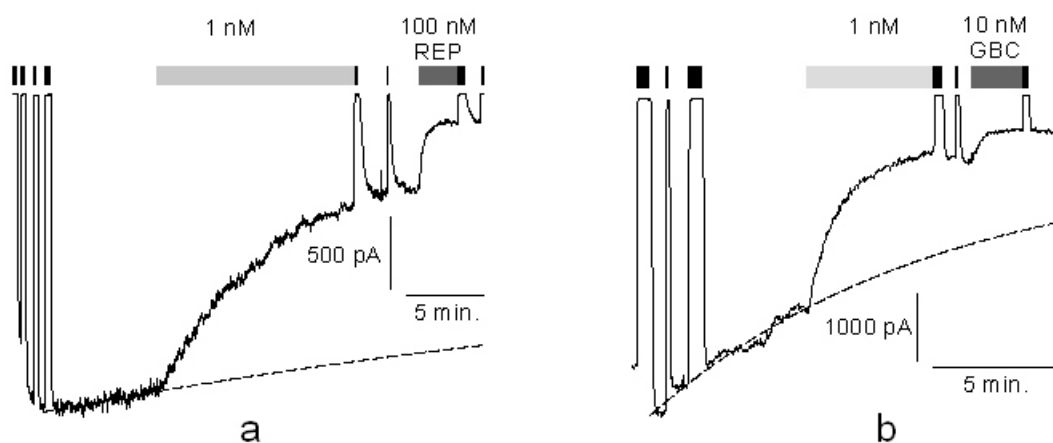


Abbildung 23 Hemmung der Kir6.2/SUR1-Kanäle durch Repaglinid (a) und Glibenclamid (b) in der Inside-out-Konfiguration. Originalspuren bei einer Klemmspannung von -50 mV.

a.) Nach dem Ausreißen des Membranstückes entwickelt sich unter dem Einfluss der nukleotidhaltigen Perfusionslösung (0,3 mM MgUDP + 0,03 mM MgATP) ein Strom von ca. 2000 pA, der durch 1 mM MgATP (schwarze Balken) vollständig inhibiert wird. Der MgATP-Block ist über die Zeit stabil. Zwecks Rundown-Schätzung folgt die Bestimmung des Basisstroms ohne Unterbrechungen durch 1 mM MgATP-Zugabe (kein "Refreshment" durch MgATP erwünscht). Der Rundown ist gering und kann über die Gesamtdauer des Versuchs extrapoliert werden (gestrichelte Linie mit der Kurvengleichung: $f=y_0+a*\exp(-k_{app}*x)$). Aus der Applikation von 1 nM REP (hellgrauer Balken) resultiert eine exponentielle Stromabnahme um 58 % des I_{KATP} . Die sättigende REP-Konzentration von 100 nM (dunkelgrauer Balken) verstärkt den Block auf 92 % I_{KATP} .

b.) Dieser Versuch verlief nach einem sehr ähnlichen Protokoll wie (a). Die gestrichelte Basisstromlinie offenbart einen relativ starken, gerade noch tolerierbaren Rundown. 1 nM GBC inhibiert 60 % des I_{KATP} . Vor der Zugabe von 10 nM GBC kommt es zum leichten Anstieg des Stroms. Es handelt sich vermutlich um "Kanal-Refreshment" durch MgATP und weniger um das "Auswaschen" von GBC aus dem Rezeptor. Die Basisstromlinie in diesem Bereich ist daher mit einer zusätzlichen Unsicherheit behaftet. Konsekutiv könnte der 74 %-Block durch 10 nM GBC in diesem Einzelexperiment unterbestimmt sein.

Der Perfusionslösung (Standard-Kalium Lösung; siehe Kap. 2.1.4.3.3) wurden Magnesiumnukleotide zugesetzt. 0,3 mM MgUDP und 0,03 mM MgATP sollten eine ausreichende und stabile Basisaktivität der K_{ATP} -Kanäle sicherstellen. In dieser Lösung erfolgte auch die Applikation der jeweiligen Pharmakonzentrationen. 1 mM MgATP in der Perfusionslösung diente zur vollständigen, über die Zeit beständigen I_{KATP} -Inhibierung. Die Pipetten, mit einem Widerstand um 1 M Ω , und das Bad wurden mit K^+ -HEPES-Puffer gefüllt. Die Durchführung der Experimente erfolgte bei Raumtemperatur (ca. 22°C).

Aus der Abbildung 24 geht hervor, dass anders als in Ganzzellversuchen, weder Repaglinid

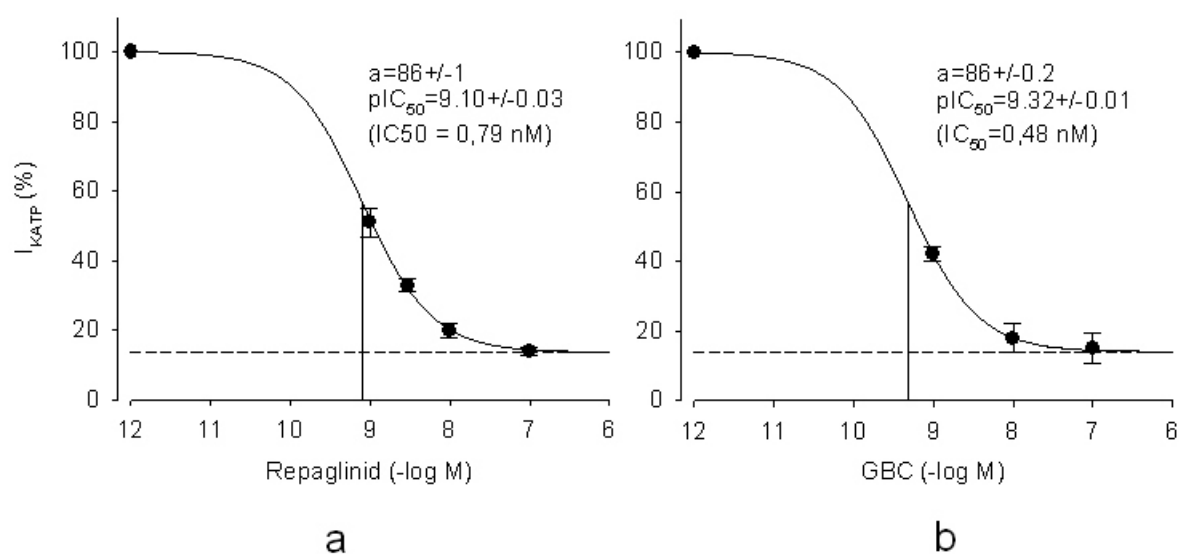


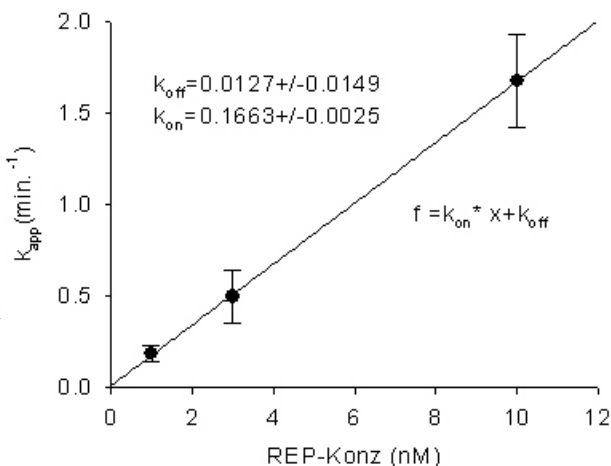
Abbildung 24 Hemmung der Kir6.2/SUR1-Kanäle durch Repaglinid (a) und Glibenclamid (b) in der Inside-out-Konfiguration. Konzentrations-Wirkungskurven mit der Formel: $f=100-a/(1+10^{(1*(x-pIC_{50}))})$.

Die Mittelpunkte der Kurven extrapoliert auf die Abszisse ergeben die IC_{50} -Werte. Die gestrichelten Linien stellen den durch die jeweilige Substanz maximal inhbierbaren I_{KATP} -Anteil dar.

noch GBC in der Lage waren einen vollständigen Block des MgATP-sensitiven Stroms hervorzurufen. Die maximale Kanalinhibierung lag in beiden Fällen bei ca. 86 %. Wie erhofft, erlaubte die ca. 7-fach schnellere Block-Kinetik (s. Abb. 25) die Bestimmung einer Konzentrations-Wirkungskurve anhand der Punkte im hohen Konzentrationsbereich. So resultieren für Repaglinid und GBC mittlere Hemmkonzentrationen von 0,79 nM [0,68;0,91] bzw. 0,48 nM. Die Ermittlung der Blockparameter wird in der Legende zur Abbildung 23 am Beispiel von zwei Originalexperimenten erläutert.

Abbildung 25 Kinetische Auswertung des Repaglinid-Blocks am Kir6.2/SUR1.

Dargestellt ist die lineare Beziehung zwischen den k_{app} -Werten und der Repaglinidkonzentration. Aus der Steigung der Geraden ergibt sich der k_{on} -Wert (Einheit: $nM \cdot min^{-1}$), aus dem Ordinatenabschnitt der k_{off} -Wert (Einheit: min^{-1}). Da in den Einzelversuchen die Blockkomponente und die Rundown-Komponente voneinander nicht getrennt werden können, sind die bestimmten k_{app} -Werte mit erheblicher Unsicherheit behaftet.



In der Abbildung 25 ist die Kinetische Auswertung des Repaglinid-Blocks dargestellt. Aus den resultierenden k_{off} - und k_{on} -Werten kann theoretisch die mittlere Hemmkonzentration (IC_{50}) bestimmt werden (k_{off}/k_{on}). Da jedoch der k_{off} -Wert experimentell nicht bestimmbar ist und seine indirekte Ermittlung aus dem Ordinatenabschnitt mit einem verhältnismäßig großen Fehler behaftet, und dadurch von Null nicht verschieden ist, ist diese Form der IC_{50} -Bestimmung hier nicht sinnvoll.

3.1.2.2 Inhibition des Kir6.2/SUR2A durch Repaglinid und Glibenclamid in der Ganzzellkonfiguration

In der Abbildung 26 sind zwei Experimentpaare dargestellt, in denen der rekombinante K_{ATP} -Kanal des Herzmuskels Schwankungen sowohl in der Repaglinid- wie auch in der Glibenclamidempfindlichkeit zeigte. Diese Schwankungen erwiesen sich als typisch für Versuche an Kir6.2/SUR2A-Kanälen in HEK-Zellen. Es ist daher sinnvoll eine Gruppierung in Experimente mit starker und schwacher Inhibitorsensitivität vorzunehmen.

Die gestrichelten Kurven der Abbildung 27 sind das Ergebniss der gruppierten Datenauswertung. 3 von 13 Zellen erwiesen sich als stark Repaglinid-empfindlich ($0,1 \mu M$ - und/oder $1 \mu M$ -Block vollständig; geschätzte IC_{50} von $1,6 nM$). Der Einsatz von $1 \mu M$ GBC war in 4 von 12 Versuchen besonders effektiv (durchschnittliche Kanalhemmung von $89 \pm 1 \%$) und potent ($IC_{50} = 40 nM$; s. Tab. in der Abb. 27). Die Beurteilung der Inhibitoreffekte an "starken Respondern" muss jedoch wegen der kleinen Anzahl an vorliegenden Daten mit Vorsicht erfolgen. "Schwache Responder" konnten durch Repaglinid zu $81 \pm 3 \%$ und durch GBC nur zu $53 \pm 4 \%$ gehemmt werden. Darüber hinaus wurden hier für den Maximalblock höhere Substanzkonzentrationen benötigt (IC_{50} für Repaglinid: $26 nM$; IC_{50} für GBC: $151 nM$).

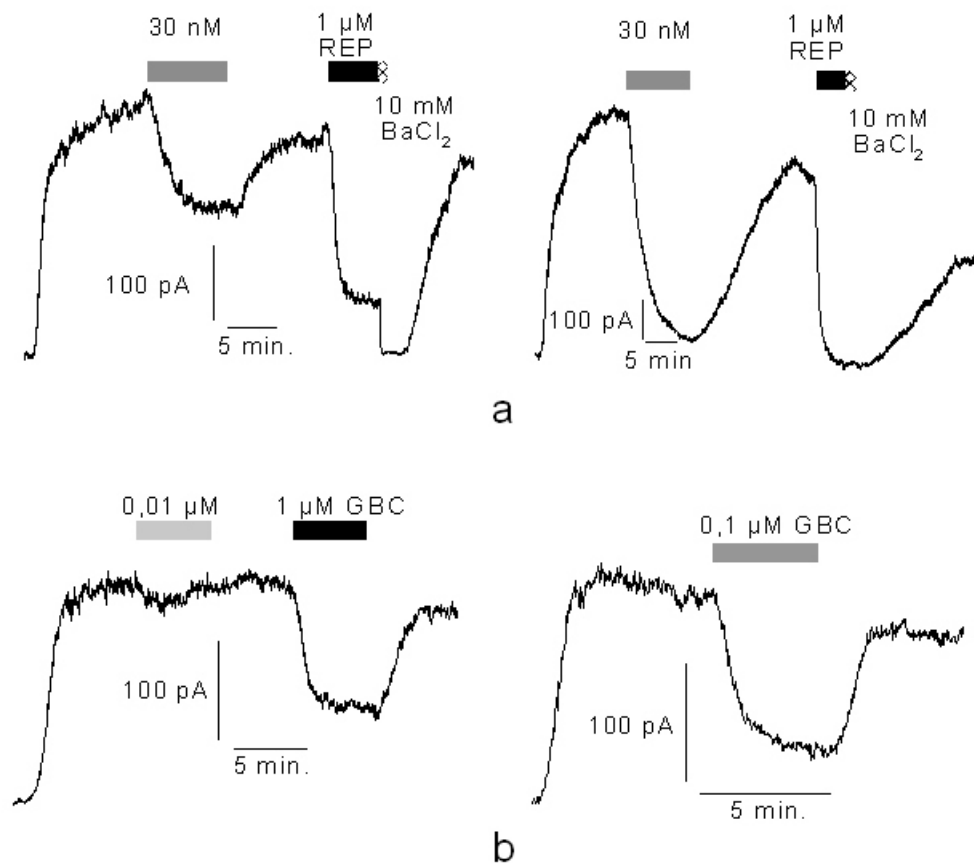


Abbildung 26 Hemmung der Kir6.2/SUR2A-Kanäle durch Repaglinid (a) und Glibenclamid (b) in der Ganzzell-Konfiguration. Originalspuren bei einer Klemmspannung von -60 mV.

a.) Diese beiden Experimente sind im Abstand von 1,5 h an Zellen aus der gleichen Präparation durchgeführt worden. Die Repaglinid-Empfindlichkeit war jedoch unterschiedlich.

In dem Versuch links inhibierten 30 nM Repaglinid 38 % des Stroms, der sich während der Dialyse der Zelle mit der Pipettenlösung entwickelte. 1 µM war nicht in der Lage die Kanalaktivität vollständig zu unterdrücken (77 %-Block). Höhere Repaglinid Konzentrationen würden die Pore blockieren und wurden deshalb nicht verwendet. 10 mM des unspezifischen K⁺-Inhibitors BaCl₂ (Rudy, 1988) diente zur Bestimmung der "Zero-current-Linie". Alle Konzentrationen der verwendeten Kanal-Modulatoren waren auswaschbar, somit konnte der Rundown gut abgeschätzt werden. Dieser Versuch wurde zu den "schwachen Respondern" gezählt.

Rechts daneben: ein "guter Responder". Die Applikation von 30 nM Repaglinid führte zu einer starken, 91 %-igen I_{KATP}-Hemmung. Der Block durch 1 µM Repaglinid unterschied sich nicht von dem Barium-Effekt und war daher vollständig.

b.) Kir6.2/SUR2A zeigte auch schwankende Empfindlichkeit gegenüber GBC. Im links dargestellten Versuch war 1 µM GBC weniger effektiv (54 %-Block) als 0,1 µM GBC im Experiment rechts (66 %-Block). Kaum Wirkung hatte der Einsatz von 0,01 µM GBC am "schwachen Responder" (3 %-Block).

In der Abbildung 27 repräsentieren die durchgezogenen Kurven die ungruppierte Datenbetrachtung. In diesem Fall wurden die Mittelwerte aus allen Einsätzen der entsprechenden Substanzkonzentration gebildet. Aus dieser Art der Auswertung ergibt sich für Repaglinid eine mittlere Inhibitionskonstante von 15 [11;20] nM, bei einem maximal erreichbaren Block von $86 \pm 2\%$. GBC hemmte die K_{ATP} -Ströme mit einer Potenz von 51 [32;81] nM und einer $56 \pm 3\%$ -igen Effizienz (s. Tab. in der Abb. 27). Zu beachten sind die großen Standardfehler der einzelnen Punkte dieser Kurven.

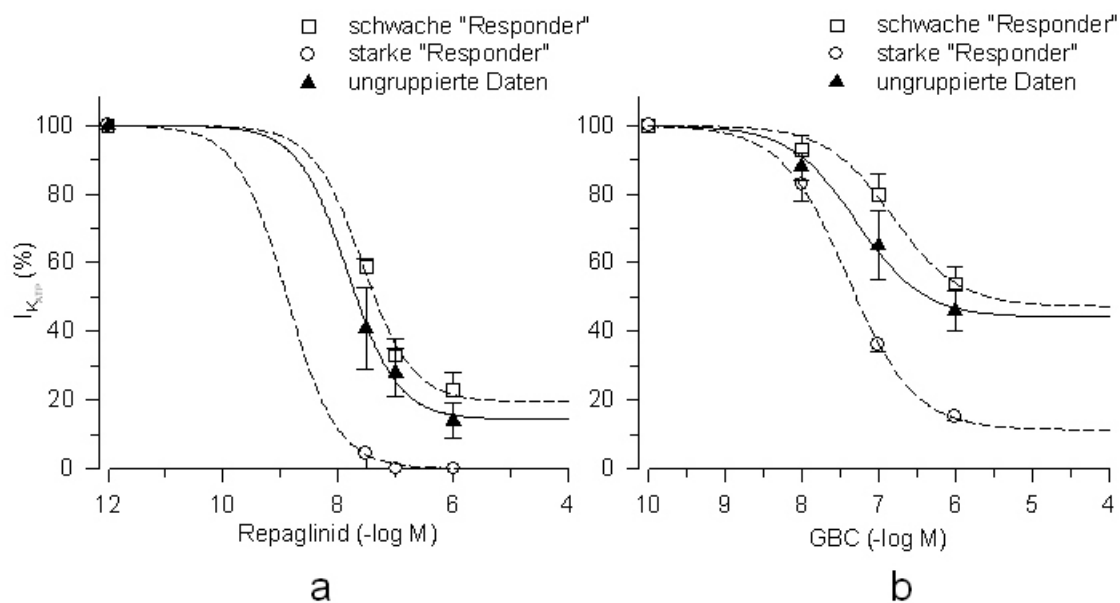


Abbildung 27 Hemmung der Kir6.2/SUR2A-Kanäle durch Repaglinid (a) und Glibenclamid (b) in der Ganzzell-Konfiguration. Konzentrations-Wirkungs-Kurven mit der Formel: $f=100-a/(1+10^{(1*(x-pIC_{50}))})$.

Die Kurvenparameter sind in der folgenden Tabelle aufgelistet (Erläuterungen: siehe Text):

| | Repaglinid | | Glibenclamid | |
|---|---|--------------------------|---|--------------------------|
| | pIC ₅₀ / IC ₅₀ (nM) | a (% I _{KATP}) | pIC ₅₀ / IC ₅₀ (nM) | a (% I _{KATP}) |
| ungruppiert | 7,83 ± 0,07 15 [11;20] | 86 ± 2 | 7,29 ± 0,1 51 [32;81] | 56 ± 3 |
| "schlechte Responder" (REP: 10 von 13; GBC: 8 von 10) | 7,58 ± 0,07 26 [19;36] | 81 ± 3 | 6,82 ± 0,13 151 [83;275] | 53 ± 4 |
| "gute Responder" (REP: 3 von 13; GBC: 4 von 12) | 8,80 ± 0,09 1,6 [1,0;2,4] | 100 | 7,40 ± 0,02 40 [36;44] | 89 ± 1 |

3.1.2.3 Inhibition des Kir6.1/SUR2B durch Repaglinid und Glibenclamid in der Ganzzellkonfiguration

In der Abbildung 28 ist jeweils ein Einzelexperiment aus Untersuchungen der Repaglinid- bzw. GBC-Wirkung auf die rekombinanten, in HEK293-Zellen exprimierten K_{ATP} -Kanäle der Vaskulatur gezeigt. Bei der in der Abbildung 29 vorgestellten Konzentrations-Wirkung-Kurve für Repaglinid handelt es sich um die erste derartige Studie dieser Substanz an diesem Kanal. Das Glibenclamid inhibierte $94 \pm 2 \%$ des I_{KATP} mit einer mittleren Hemmkonstante von 29 nM.

Vollständig war die Inhibition der Kanalaktivität beim Einsatz von GBC. Es ergab sich für diesen Sulfonylharnstoff ein IC_{50} -Wert von 56 nM.

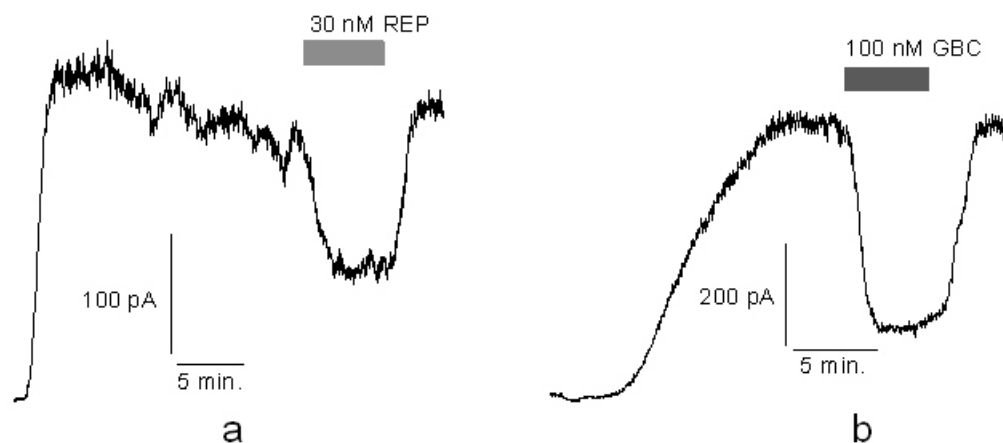


Abbildung 28 Hemmung der Kir6.1/SUR2B-Kanäle durch Repaglinid (a) und Glibenclamid (b) in der Ganzzell-Konfiguration. Originalspuren bei einer Klemmspannung von -60 mV.

a.) Während der Dialyse der Kir6.1/SUR2B-exprimierenden Zelle entwickelte sich ein Strom, der ein Maximum von etwa 300 pA erreichte, über eine ausgedehnte Periode ohne Modulatorzugabe relativ stabil blieb (Rundown von ca. 15 % in 20 min) und schließlich durch 30 nM Repaglinid zu 50 % gehemmt werden konnte. Dieser Inhibitoreffekt war vollständig reversibel.

b.) Ebenfalls zu 100 % reversibel war in diesem Versuch der 73 %- Block des I_{KATP} durch 100 nM GBC.

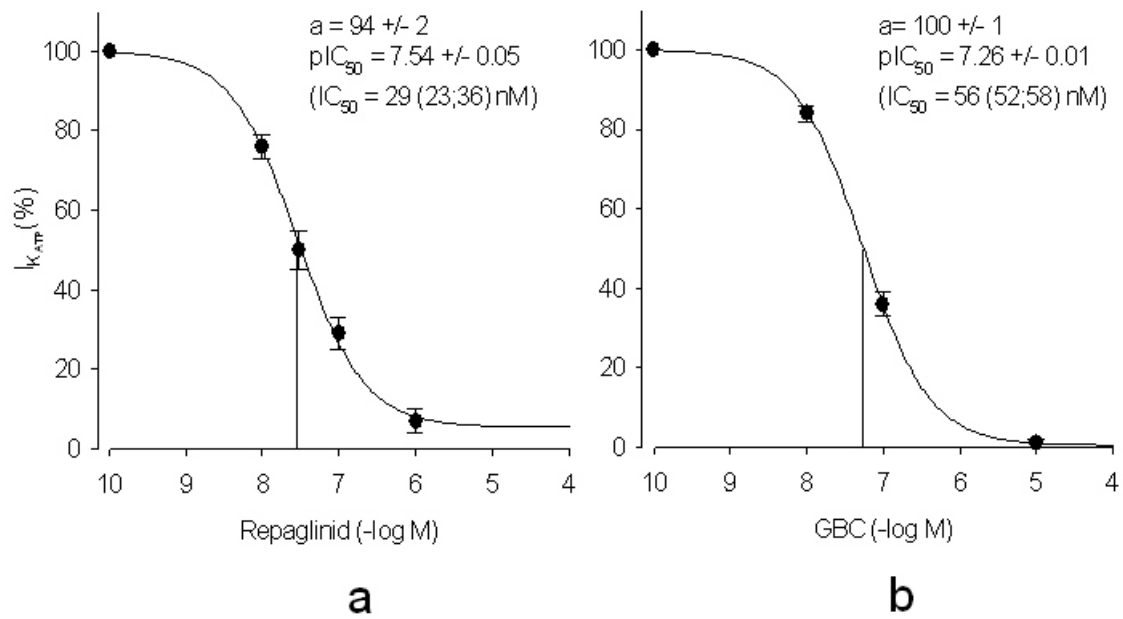


Abbildung 29 Hemmung der Kir6.1/SUR2B-Kanäle durch Repaglinid (a) und Glibenclamid (b) in der Ganzzell-Konfiguration. Konzentrations-Wirkungskurven mit der Formel: $f=100-a/(1+10^{(1*(x-pIC_{50}))})$.

Die Mittelpunkte der Kurven extrapoliert auf die Abszisse ergeben die IC_{50} -Werte.

3.2 Einfluss der Koexpression mit Kir6.x auf die Bindung von Sulfonylharnstoffen und Gliniden an SUR1

Die porenbildenden und regulatorischen Untereinheiten des K_{ATP} -Kanals beeinflussen sich gegenseitig über zwei vermutlich benachbarte K_{ATP} -Kanalregionen, TMD0 + CL3 des SUR und M1 + N-Terminus des Kir (Babenko und Bryan, 2003; Chan et al., 2003b, 2003; Reimann et al., 1999). Es ist jedoch kaum untersucht, welchen Einfluss der Kir auf die Bindung der K_{ATP} -Kanal-Inhibitoren an den SUR ausübt. In Radioligandbindungsstudien wurden deshalb die Folgen der Koexpression des SUR1 mit dem Kir6.2 und dessen Mutanten, die am N-Terminus modifiziert wurden (Verkürzungen um 5 = Kir6.2 N5, 10 = Kir6.2 N10 bzw. 20 = Kir6.2 N20 Aminosäuren; Substitution von Arg, Lys in Position 4,5 durch Ala = Kir6.2(RK,4,5,AA)) auf die Affinität der Blocker GBC, Repaglinid und (-)-AZ-DF 265 untersucht. Ferner wurde der Effekt der Koexpression mit Kir6.1 auf die SUR1-Bindung von GBC und Repaglinid untersucht.

3.2.1 Bestimmung der Affinität von Glibenclamid, Repaglinid und (-)-AZ-DF 265 zum SUR1 nach Koexpression mit Kir6.2-Mutanten bzw. Kir6.1 in Radioligandbindungsstudien an ganzen Zellen

Die Affinität der Blocker zum jeweiligen Rezeptor wurde in Form der Fähigkeit zur Verdrängung des Radioliganden ^3H -GBC untersucht. Die Durchführung der Experimente erfolgte an intakten HEK293-Zellen, ca. 48 h nach einer transienten Kotransfektion (Lipofectamin2000-Methode) mit Vektorplasmiden, die für die SUR bzw. Kir-Untereinheit kodierten. Die Radioligandverdrängungsreaktion verlief 30 min bei 37°C im sauerstoffgesättigten Inkubationspuffer mit pH 7,4. Der Anteil der unspezifischen Bindung wurde mit Hilfe von 100 nM unmarkiertem GBC bestimmt.

3.2.1.1 Bestimmung des molaren Kir/SUR-Plasmidverhältnisses, das zur vollständigen Kanalkomplexbildung notwendig ist

Der eingesetzte pcDNA3.1-Vektor, in dem sich die für SUR1 kodierende Sequenz befindet, verfügt über einen CMV-Promotor. Dieser ist stärker als der SV40-Promotor des pECE-Vektors. Im Labor von Dr. Joseph Bryan (Houston, Texas) wurden die DNA-Sequenzen der zu untersuchenden Kir6.2-Varianten in den pECE-Vektor kloniert. Die Kotransfektion der beiden Vektoren im niedrigen molaren Verhältnis führte in HEK293-Zellen zur unterschiedlichen

Expressionseffizienz der beiden K_{ATP} -Kanal-Untereinheiten, wobei SUR1 stärker als Kir6.x exprimiert wurde. Freier, nicht komplexierter SUR1 wurde als niedrigaffine Komponente ($K_i = 91$ nM; Daten aus der Dissertation von Frau Susanne Bieger) bei der Verdrängung von ^3H -GBC durch

Tabelle 11 Verdrängung der ^3H -GBC-Bindung durch Repaglinid an HEK293-Zellen, die mit wechselnden Kir6.2/SUR1-DNA-Verhältnissen (1. Spalte) transfiziert wurden.

Einzelversuchsdaten; a1, $B_{\max 1}$, $pK_i 1$: Bindungsdaten zur hochaffinen Komponente (Bindung an den Kir6.2/SUR1-Kanalkomplex); a2 $B_{\max 2}$: Bindungsdaten zur niedrigaffinen Komponente (Bindung an den unkomplexierten SUR1; $pK_i 2 = 7,04$ wurde der Arbeit von Frau S. Bieger entnommen und festgesetzt)

| DNA-Verhältnis** Kir/SUR | a1 [%] | a2 [%] | $B_{\max 1}$ [fmol/mg] | $B_{\max 2}$ [fmol/mg] | B_{\max} [fmol/mg] | $pK_i 1 / K_i 1$ |
|-----------------------------|-----------|-----------|---------------------------|---------------------------|-------------------------|--|
| 1,5 : 1 | 26 | 74 | 124 | 535 | 658 | 9,11 |
| 6,2 : 1 | 59 | 41 | 361 | 372 | 733 | 9,05 |
| 8 : 1 | 57 | 43 | 204 | 230 | 435 | 9,17 |
| 20 : 1 | 76 | 24 | 502 | 238 | 740 | 9,2 |
| 40 : 1 | 79 | 21 | 447 | 186 | 633 | 9,32 |
| 40 : 1 | 89 | 11 | 653 | 118 | 771 | 9,25 |
| 80 : 1 | 97 | 3 | 655 | 30 | 685 | 9,17 |
| 80 : 1 | 94 | 6 | 572 | 54 | 626 | 9,2 |
| - | - | - | - | - | $\diamond 660 \pm 37$ | $\diamond 9,18$ $\pm 0,03 /$ $\diamond 0,66$ nM (0,58,0,76) |

Repaglinid vom Kir6.2/SUR1 sichtbar (Abb. 30a). Die Hochaffinitätskomponente spiegelte die ^3H -GBC/Repaglinid-Kompetition am vollständigen Kanal wieder. Die resultierende mittlere Inhibitionskonstante von 0,66 nM [0,58;0,76] (s. Tab. 11) entspricht dem K_i -Wert von 0,72 nM aus Kapitel 3.1.1.5. Die Amplitude dieser Komponente vergrößerte sich mit steigendem Kir/SUR-Plasmidverhältnis. Bei der Ratio von 5,2:1 war das Amplitudenverhältnis ausgeglichen (Abb 30b). Um den Anteil an nichtkomplexiertem SUR1 möglichst gering zu halten wurden alle Kotransfektinen mit Vektoren unterschiedlicher Promotorstärke (SUR1 in pcDNA3.1 und Kir6.2-Mutanten in pECE) bei einem molaren Kir/SUR-Plasmidverhältnis $\geq 100:1$ durchgeführt (80:1 + Sicherheitspuffer).

Beim Variieren des Kir6.2/SUR1-Verhältnisses wurde die DNA-Menge pro zu transfizierende Schale (10 μg /Schale) konstant gehalten, während der SUR-Anteil kontinuierlich gesenkt wurde. Überraschenderweise blieb dabei die Gesamtausbeute des SUR1 (frei+komplexiert) stabil ($B_{\max} = 660 \pm 37$ fmol/mg; Einzelwerte normalverteilt; s. Tab. 11).

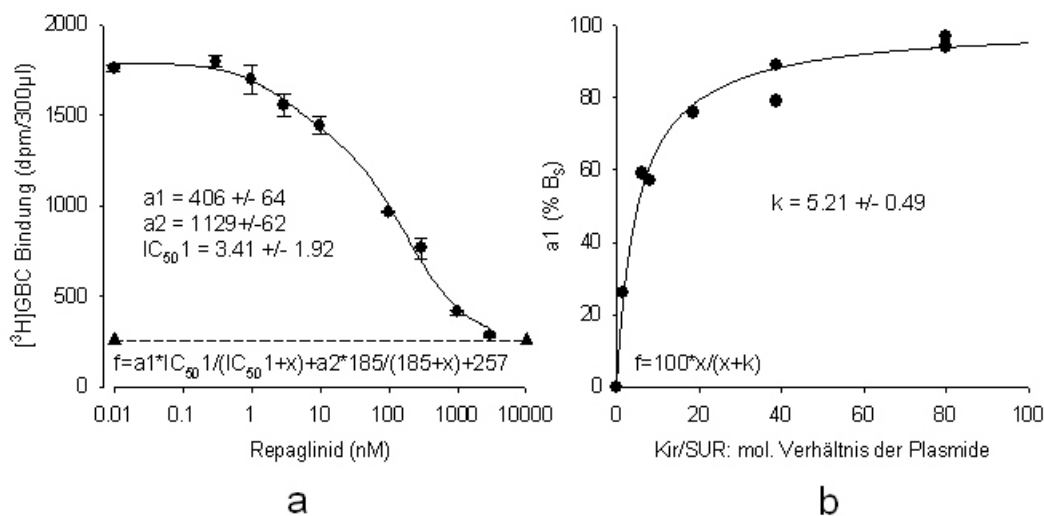


Abbildung 30 Abhängigkeit der vollständigen Kanalkomplexbildung von dem molaren Kir6.2 (in pECE) / SUR1 (in pcDNA3.1)-Plasmidverhältnis bei der Kotransfektion.

a.) Heterologe Verdrängung der ^3H -GBC-Bindung durch Repaglinid an Kir6.2/SUR1-Zellen (Einzelversuch beim Kir/SUR-Verhältnis 1,5:1). Die Amplitude der hochaffinen Komponente (a_1) beträgt 26 % B_5 ; für diese Komponente ergibt sich ein K_i -Wert (nach Cheng-Prusoff-Korrektur des IC_{50} -Wertes mit dem Faktor $1 + 1,51 / 0,45 = 4,4$) von 0,78 nM. Der IC_{50} -Wert der niedrigaffinen Komponente wurde festgesetzt (aus dem K_i -Wert = 91 nM von Repaglinid am SUR1; aus der Dissertation von Frau Susanne Bieger). Die unspezifisch Bindung beträgt 14 % B_{TOT} .

b.) Vergrößerung der Hochaffinitätskomponente (a_1) bei der heterologen Verdrängung der ^3H -GBC-Bindung durch Repaglinid an Kir6.2/SUR1-Zellen mit steigendem molarem Kir/SUR-Plasmidverhältnis im Sinne einer gegen 100 % strebenden Sättigungsfunktion; Daten aus der Tabelle 11 (gesondert umrahmter Bereich).

3.2.1.2 Homologe Verdrängung der ^3H -GBC-Bindung an Kir6.x/SUR1-Zellen

Die Bindung von GBC wurde jeweils an Kir6.2 N5/SUR1-, Kir6.2 N10/SUR1-, Kir6.2 N20/SUR1-, Kir6.2(RK,4,5,AA)/SUR1- und Kir6.1/SUR1-Zellen in homologen Konkurrenzexperimenten untersucht. Die resultierenden Daten sind in der Tabelle 12 dargestellt. Die Dissoziationskonstanten aus homologen ^3H -GBC-Verdrängungen wurden zur Cheng-Prusoff-Korrektur der IC_{50} -Werte aus den ^3H -GBC/Repaglinid- und ^3H -GBC/(-)-AZ-DF 265-Kompetitionen herangezogen.

Vergleicht man die Affinität von GBC, zum vollständigen rekombinanten K_{ATP} -Kanal der Bauchspeicheldrüse Kir6.2/SUR1 ($\text{pK}_D = 9,35 \pm 0,08$; s. Kap. 3.1.1) mit den Daten von Frau Susanne Bieger die am SUR1 alleine ermittelt wurden ($\text{pK}_D = 8,84$), stellt man fest, dass die Koexpression mit Kir6.2 die Affinität des SUR1 zu dem langkettigen Sulfonylharnstoff um den Faktor 3,2 [3,0;3,6] erhöht ($\text{pK}_D = 0,51 \pm 0,02$; siehe Kap. 4.2; Abb. 49).

Nicht markiertes GBC verdrängte ^3H -GBC vom Kir6.2 N5/SUR1 an intakten Zellen mit der Affinität von 1,07 [1,02;1,12] nM. Die Kompetitionskurven waren homogen ($n_H = 1,09 \pm 0,08$).

Tabelle 12 Ergebnisse der homologen ^3H -GBC-Verdrängung an Kir6.x/SUR1-Zellen

Mittelwerte \pm SEM aus n Einzelversuchen. Zur Ermittlung der Dissoziationskonstanten wurde an die Verdrängungsmesswerte in den einzelnen Versuchen das Bindungsmodell mit einer Bindungsstelle angepasst. Aus den Mittelpunkt der resultierenden Inhibitionskurven erhielten wir nach Abzug der Radioligandkonzentration die K_D -Werte.

| Rezeptor | Plasmid-ratio Kir/SUR | ^3H -GBC (nM) | pK_D/K_D (nM)** | n_H | ΔpK_D^* | B_S (% B_{TOT}) | B_{TOT} (fmol/mg) | Protein (mg/ml) | n |
|--------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------------|-----------------------|---------------------|----------------------|---------------------|--------------------|---|
| 6.1/2 (s. 3.1.1.1) | 1:1*** | 1,92 $\pm 0,05$ | 9,35 $\pm 0,08/$ 0,45 | 1,07 \pm 0,03 | 0,51 $\pm 0,08$ | 77 ± 2 | 241 ± 18 | 0,20 $\pm 0,02$ | 4 |
| 6.2 N5 /1 | 100:1 | 0,94 $\pm 0,12$ | 8,79 $\pm 0,01/$ 1,07 | 1,09 $\pm 0,08$ | 0,13 $\pm 0,02$ | 91 ± 1 | 481 ± 66 | 0,09 $\pm 0,01$ | 3 |
| 6.2 N10 /1 | 100:1 | 1,07 $\pm 0,14$ | 8,72 $\pm 0,05/$ 1,93 | 1,03 $\pm 0,06$ | -0,12 $\pm 0,05$ | 82 ± 4 | 234 ± 43 | 0,12 $\pm 0,03$ | 2 |
| 6.2 N20 /1 | 100:1 | 1,22 $\pm 0,04$ | 8,79 $\pm 0,05/$ 1,62 | 0,97 $\pm 0,01$ | -0,05 $\pm 0,05$ | 71 ± 1 | 307 ± 4 | 0,07 $\pm 0,01$ | 2 |
| 6.2 (RK,4,5,AA) /1 | 150:1 | 0,89 $\pm 0,01$ | 9,21 $\pm 0,02/$ 0,62 | 0,97 $\pm 0,03$ | 0,37 $\pm 0,02$ | 85 ± 3 | 495 ± 35 | 0,07 $\pm 0,01$ | 2 |
| 6.1/1 | 2:1*** | 1,01 $\pm 0,08$ | 9,03 $\pm 0,1/$ 0,96 | 1,02 $\pm 0,04$ | 0,19 $\pm 0,10$ | 85 ± 2 | 334 ± 71 | 0,12 $\pm 0,01$ | 3 |

* $\Delta pK = pK(\text{Kir6.x-Variante}/\text{SUR1}) - pK(\text{SUR1})$

**statistischer Unterschied (t-Test) zu SUR1 ($pK_D=8,84 \pm 0,02$; Dissertation von Frau S.Bieger):

Kir6.2/SUR1: gegeben ($P<0,05$); Kir6.2 N5/SUR1: gegeben ($P<0,05$); Kir6.2 N10/SUR1: nicht gegeben; Kir6.2 N20/SUR1: nicht gegeben; Kir6.2(RK,4,5,AA)/SUR1: gegeben ($P<0,05$); Kir6.1/SUR1: nicht gegeben

*** Kir6.1 und Kir6.2 im pcDNA3.1-Vektor

Die Affinitätserhöhung nach der Koexpression des SUR1 mit dem, am N-Terminus um 5 Aminosäuren verkürzten, Kir6.2 beträgt somit Faktor 1,3 ($pK_D = 0,13 \pm 0,02$) und ist folglich auf der logarithmischen Ebene 75 % geringer als nach der Kanalkomplexbildung zwischen den vollständigen Untereinheiten.

Keine Verbesserung der Bindung wurde infolge der Koexpression des SUR1 mit Kir6.2 N10 und Kir6.2 N20 beobachtet. Aus den, im Bereich der spezifischen Bindung, monophasischen

Verdrängungskurven ($n_H = 1,03 \pm 0,06$ bzw. $0,97 \pm 0,01$) resultierten für GBC K_D -Werte von 1,93 [1,51;2,40] nM bzw. 1,62 [1,29;2,04] nM. pK_D im negativen Bereich bedeutet eine leichte Affinitätserniedrigung, die jedoch nicht statistisch signifikant ist.

Die Substitution der beiden basischen Aminosäuren Arginin und Lysin in Position 4 und 5 am Kir6.2 verringerte den affinitätserhöhenden Effekt der Koexpression um 27 % ($pK_D = 0,37 \pm 0,02$). GBC band an Kir6.2(RK,4,5,AA)/SUR1 mit einer K_D von 0,62 [0,56;0,68] nM.

Nach der Koexpression mit Kir6.1 lag die GBC-Affinität, im Vergleich zum SUR1 alleine, um den Faktor 1,5 ($pK_D = 0,19 \pm 0,1$) höher bei 0,96 [0,59;1,48] nM. Dieser Effekt ist 63 % kleiner als beim Kir6.2-Subtyp.

3.2.1.3 Verdrängung der ^3H -GBC-Bindung an Kir6.x/SUR1-Zellen durch Repaglinid

In der Abbildung 31 sind die auf die spezifische Bindung normierten und nach Cheng-Prusoff korrigierten ^3H -GBC/Repaglinid-Verdrängungskurven dargestellt. Die Parameter der Verdrängungsversuche sind in Tabelle 13 aufgeführt.

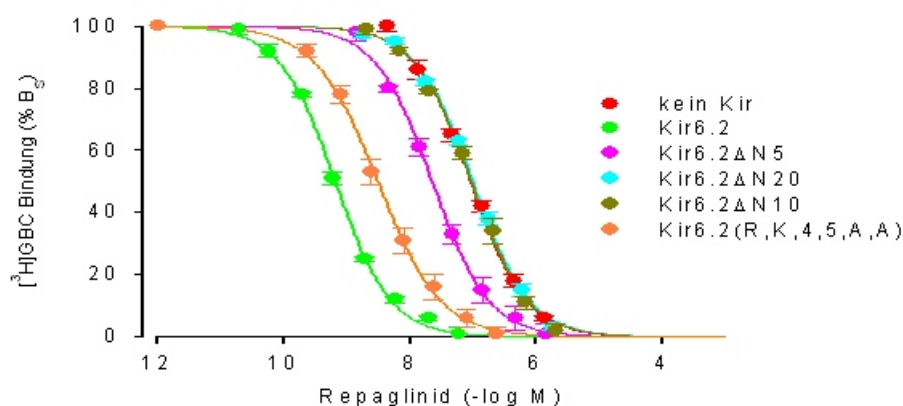


Abbildung 31 Heterologe Verdrängung der ^3H -GBC-Bindung an SUR1 bzw. Kir6.x/SUR1 durch Repaglinid. Die Kurven sind zur besseren Übersicht auf die spezifische Bindung normiert und mit folgenden Faktoren nach Cheng-Prusoff korrigiert: SUR1: 2,0 (Daten von S. Bieger); Kir6.2/SUR1: 5,0; Kir6.2 N5/SUR1: 2,1; Kir6.2 N10/SUR1: 1,5; Kir6.2 N20/SUR1: 1,7; Kir6.2(RK,4,5,AA)/SUR1: 2,9. An die gemittelten Messwerte wurde das Bindungsmodell mit einer bzw. zwei (Kir6.2(RK,4,5,AA)/SUR1) Bindungsstellen angepasst.

Verglichen mit dem moderaten Einfluss der Koexpression mit Kir6.2 auf die GBC-Affinität zum SUR1, fällt der Effekt für Repaglinid wesentlich stärker aus. Frau Susanne Bieger bestimmte den K_i -Wert der Piperidinoverbindung zum SUR1 alleine auf 91 nM. Die Repaglinidbindung verbesserte sich nach der Bildung des kompletten rekombinanten K_{ATP} -Kanal des Pankreas 126-fach ($pK_D = 2,1 \pm 0,6$) auf $K_i = 0,72$ nM (s. Kap. 3.1.1.5).

Die Verkürzung des Kir6.2-N-Terminus um 5 Aminosäuren reduzierte den beim Wildtypkanal gemessenen Effekt der Koexpression um 71 % auf $pK_i = 0,61 \pm 0,05$ (entspricht einer Affinitätserhöhung um Faktor 4,1 [3,2;5,1]). Repaglinid verdrängte den Radioliganden vom Kir6.2 N5/SUR1 homogen ($n_H = 0,93 \pm 0,03$) mit einer K_i von 22,4 [19,5;25,7] nM.

Die Koexpression des SUR1 mit einem um 10 bzw. 20 Aminosäuren verkürzten Kir6.2 verbesserte die Repaglinidbindung gegenüber SUR1 alleine nicht mehr ($K_i = 93,3$ [77,6;112,2] bzw. 100,0 [87,1;114,8] nM).

Die Koexpression mit der Kir6.2(RK,4,5,AA)-Mutante erhöhte die Repaglinidaffinität zum SUR1 um den Faktor 30 [21;40] ($pK_i = 1,47 \pm 0,07$). Dies ergibt sich aus dem K_i -Wert = 3,1 [2,3;4,1] nM der Hochaffinitätskomponente einer leicht biphasischen Verdrängungskurve, deren niedrigaffine Komponente mit der Amplitude von 12 ± 2 % B_S wohl auf den nicht komplexierten SUR zurückzuführen ist.

Ebenfalls biphasisch im Bereich der spezifischen Bindung zeigte sich die ^3H -GBC/Repaglinid-Kompetition an Kir6.1/SUR1-Zellen. Auch hier war vermutlich überschüssiger SUR1 in der Präparation vorhanden. Der überwiegende Teil des Rezeptors ($a_1 = 85 \pm 1$ %) lag jedoch in Form eines vollständigen Kanalkomplexes vor, aus dem ^3H -GBC durch Repaglinid mit einer K_i von 1,7 [1,6;1,8] nM verdrängt werden konnte. Dies entspricht einem Koexpressionseffekt von Faktor 54 [45;65] ($pK_i = 1,73 \pm 0,04$), der verglichen mit der Affinitätserhöhung durch Kir6.2, um 18 % kleiner ausfiel.

Tabelle 13 Ergebnisse der ^3H -GBC-Verdrängung durch Repaglinid an Kir6.x/SUR1-Zellen

Mittelwerte \pm SEM aus n Einzelexperimenten. Zur Ermittlung der Inhibitionskonstanten wurde das Bindungsmodell mit einer bzw. zwei Bindungsstellen an die gemessenen und gemittelten Werte aus den einzelnen Versuchen angepasst. Nach der Cheng-Prusoff-Korrektur der resultierenden IC_{50} -Werte erhielten wir die K_i -Werte.

| Rezeptor | Plasmid-ratio Kir/SUR | ^3H -GBC (nM) | pK_i/K_i (nM)** | n_H | ΔpK_i^* | B_S (% B_{TOT}) | B_{TOT} (fmol/mg) | Protein (mg/ml) | n |
|--------------------------|-----------------------|------------------------|---|--------------------|---------------------|----------------------|---------------------|--------------------|---|
| 6.1/2 (s. 3.1.1.5) | 1:1*** | 1,78 $\pm 0,04$ | 9,14 $\pm 0,04/$ 0,72 | 0,95 $\pm 0,01$ | 2,1 $\pm 0,06$ | 76 ± 2 | 269 ± 103 | 0,17 $\pm 0,01$ | 4 |
| 6.2 N5 /1 | 100:1 | 1,14 $\pm 0,01$ | 7,65 $\pm 0,03/$ 22,4 | 0,93 $\pm 0,03$ | 0,61 $\pm 0,05$ | 89 ± 3 | 382 ± 98 | 0,13 $\pm 0,03$ | 3 |
| 6.2 N10 /1 | 100:1 | 0,97 $\pm 0,09$ | 7,03 $\pm 0,04/$ 93,3 | 1,01 $\pm 0,05$ | -0,01 $\pm 0,06$ | 84 ± 2 | 512 ± 113 | 0,08 $\pm 0,02$ | 4 |
| 6.2 N20 /1 | 100:1 | 1,19 $\pm 0,06$ | 7,00 $\pm 0,03/$ 100,0 | 0,97 $\pm 0,01$ | -0,04 $\pm 0,05$ | 82 ± 3 | 456 ± 265 | 0,11 $\pm 0,07$ | 2 |
| 6.2 (RK,4,5,AA) /1 | 100:1 | 1,17 $\pm 0,04$ | 8,51 $\pm 0,06/$ 3,09 [†] | 1 (fix) | 1,47 $\pm 0,07$ | 85 ± 2 | 342 ± 54 | 0,12 $\pm 0,01$ | 3 |
| 6.1/1 | 2:1*** | 1,28 $\pm 0,16$ | 8,77 $\pm 0,01/$ 1,70 ^{††} | 1 (fix) | 1,73 $\pm 0,04$ | 88 ± 1 | 360 ± 43 | 0,14 $\pm 0,05$ | 2 |

* $\Delta pK = pK(\text{Kir6.x-Variante})/\text{SUR1} - pK(\text{SUR1})$

**statistischer Unterschied (t-Test) zu SUR1 ($pK_D = 7,04 \pm 0,04$; Dissertation von Frau S.Bieger):

Kir6.2/SUR1: gegeben ($P < 0,05$); Kir6.2 N5/SUR1: gegeben ($P < 0,05$); Kir6.2 N10/SUR1: nicht gegeben; Kir6.2 N20/SUR1: nicht gegeben; Kir6.2(RK,4,5,AA)/SUR1: gegeben ($P < 0,05$); Kir6.1/SUR1: gegeben ($P < 0,05$)

*** Kir6.2 und Kir6.1 im pcDNA3.1-Vektor

[†] K_{i1} da Kurve biphasisch: $a_1 = 88 \pm 2 \% B_S$, $a_2 = 12 \pm 2 \% B_S$; $K_{i2} = 91 \text{ nM}$ festgesetzt (REP an SUR1)

^{††} K_{i1} da Kurve biphasisch: $a_1 = 85 \pm 1 \% B_S$; $a_2 = 15 \pm 1 \% B_S$; $K_{i2} = 91 \text{ nM}$ festgesetzt (REP an SUR1)

3.2.1.4 Verdrängung der ^3H -GBC-Bindung an Kir6.x/SUR1-Zellen durch (-)-AZ-DF 265

(-)-AZ-DF 265, ein weiterer B-Ligand mit einer Piperidinogruppe (s. Abb. 6), band an den SUR1 alleine mit einer relativ niedrigen Affinität von $1,4 \mu\text{M}$ (Dissertation von Frau Susanne Bieger). Stark verbessert ($pK_i = 2,57 \pm 0,07$ entspricht dem Faktor 372 [269;407]) wurde die Bindung der Substanz durch die Anwesenheit von Kir6.2 ($K_i = 3,7 \text{ nM}$; s. Kap. 3.1.1.6). Diese Auswirkung der Koexpression erwies sich als sehr empfindlich gegenüber Modifikationen am Kir6.2-N-Terminus.

Tabelle 14 Ergebnisse der ^3H -GBC-Verdrängung durch (-)-AZ-DF 265 an Kir6.x/SUR1-Zellen

Mittelwerte \pm SEM aus n Einzelexperimenten. Zur Ermittlung der Inhibitionskonstanten wurde das Bindungsmodell mit einer bzw. zwei Bindungsstellen an die gemessenen und gemittelten Werte aus den einzelnen Versuchen angepasst. Nach der Cheng-Prusoff-Korrektur der resultierenden IC_{50} -Werte erhielten wir die K_i -Werte.

| Rezeptor | Plasmid-ratio Kir/SUR | ^3H -GBC (nM) | $\text{pK}_i/\text{K}_i(\mu\text{M})$ ** | n_H | ΔpK_i^* | B_S (% B_{TOT}) | B_{TOT} (fmol/mg) | Protein (mg/ml) | n |
|--------------------------|-----------------------|------------------------|--|--------------------|-----------------------|-----------------------------|----------------------------|--------------------|---|
| 6.1/2 (s. 3.1.1.6) | 1:1*** | 1,67 $\pm 0,05$ | 8,43 $\pm 0,06/$ 3,7 | 1 (fest) | 2,57 $\pm 0,07$ | 87 ± 2 | 409 ± 89 | 0,13 $\pm 0,03$ | 4 |
| 6.2 N5 /1 | 100:1 | 0,81 $\pm 0,01$ | 6,25 $\pm 0,02/$ 0,56 | 1,08 $\pm 0,02$ | 0,39 $\pm 0,04$ | 91 ± 0 | 374 ± 33 | 0,12 $\pm 0,02$ | 3 |
| 6.2 N10 /1 | 100:1 | 0,81 $\pm 0,02$ | 5,84 $\pm 0,04/$ 1,46 | 1,09 $\pm 0,07$ | -0,02 $\pm 0,05$ | 84 ± 2 | 228 ± 18 | 0,15 $\pm 0,03$ | 2 |
| 6.2 (RK,4,5,AA) /1 | 150:1 | 0,99 $\pm 0,03$ | 6,86 $\pm 0,02/$ 0,14 | 1,01 $\pm 0,02$ | 1,00 $\pm 0,04$ | 85 ± 1 | 580 ± 89 | 0,12 $\pm 0,04$ | 3 |

* $\Delta\text{pK} = \text{pK}(\text{Kir6.x-Variante}/\text{SUR1}) - \text{pK}(\text{SUR1})$

** statistischer Unterschied (t-Test) zu SUR1 ($\text{pK}_i=5,86 \pm 0,03$; Dissertation von Frau S.Bieger):

Kir6.2/SUR1: gegeben ($P<0,05$); Kir6.2 N5/SUR1: gegeben ($P<0,05$); Kir6.2 N10/SUR1: nicht gegeben;

Kir6.2(RK,4,5,AA)/SUR1: gegeben ($P<0,05$)

*** Kir6.2 und Kir6.1 im pcDNA3.1-Vektor

Kir6.2 N5 erhöhte die (-)-AZ-DF 265-Affinität zum SUR1 2,5-fach auf 0,56 [0,51;0,62] μM , was einer Reduzierung des Koexpressionseffektes um 85 % entspricht ($\text{pK}_i = 0,39 \pm 0,04$).

Aus den Verdrängungsversuchen an Kir6.2(RK,4,5,AA)/SUR1-Zellen ergab sich für (-)-AZ-DF 265 eine Inhibitionskonstante von 138 nM [126;151]. Nach der Neutralisation der basischen Aminosäuren in Position 4 und 5 durch Alanin schrumpfte somit die Affinitäts-erhöhung von Faktor 372 auf 10 [8;12] (aus $\text{pK}_i = 1,00 \pm 0,04$). Auf der logarithmischen Ebene entspricht es einer Abnahme um 61 %.

Ein vollständiger Effektverlust trat in Folge der Entfernung der ersten 10 Aminosäuren des Kir6.2 auf. Der K_i -Wert von (-)-AZ-DF 265 am Kir6.2 N10/SUR1 lag bei 1,5 μM [1,3;1,7].

Der Verlauf der ^3H -GBC/AZ-DF-Kompetitionskurven war, was die spezifische Bindung betrifft, in allen Fällen monophasisch (s. Tabelle 14).

3.2.2 Bestimmung der Affinität von Glibenclamid und Repaglinid zum SUR1 alleine und nach Koexpression mit Kir6.2 bzw. Kir6.2-Mutanten in Radioligandbindungsstudien an Membranen in Abwesenheit von MgATP

Um den Einfluss von MgATP auf die Affinitätserhöhung der K_{ATP} -Blocker zum SUR1 durch die Koexpression mit Kir6.2 und dessen N-Terminus-Mutanten zu untersuchen, wurden Radioligandbindungsstudien an Membranen ohne Zugabe von MgATP durchgeführt. Die Membranpräparation wurde aus HEK293-Zellen gewonnen, die transient mit SUR1 (in pcDNA3.1-Vektor) alleine, oder mit Kir6.2 (in pcDNA3.1-Vektor), Kir6.2 N5 (in pECE-Vektor) bzw. Kir6.2(RK,4,5,AA) (in pECE-Vektor) transfiziert wurden. Die molaren Plasmidverhältnisse ebenso wie die weiteren Versuchsdaten können der Tabelle 15 bzw. 16 entnommen werden. Die Durchführung der Bindungsversuche erfolgte bei ähnlichen Bedingungen wie an intakten Zellen. Die Reaktionsansätze wurden 30 min bei pH 7.4 und einer Temperatur von 37°C inkubiert. Im Inkubationspuffer befand sich 1 mM EDTA. Die unspezifische Bindung wurde mittels 100 nM GBC bestimmt.

3.2.2.1 Sättigung der ^3H -GBC-Bindung an SUR1, Kir6.2/SUR1, Kir6.2 N5/SUR1 und Kir6.2(RK,4,5,AA)/SUR1 in HEK293-Zellmembranen in Abwesenheit von MgATP

MgATP vermindert die GBC-Affinität zum SUR1 (Ueda et al., 1999; Hambrock et al., 2002a). In Abwesenheit von MgATP war daher eine Affinitätserhöhung zu erwarten deren zuverlässige Quantifizierung die Durchführung von Sättigungsexperimenten erforderte.

Die ^3H -GBC-Sättigung an SUR1 erbrachte eine Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D von 0,43 [0,42;0,46] nM. Demnach zeigte sich in dieser Rezeptorpräparation bei den gewählten Experimentbedingungen eine 3,4-fach höhere GBC-Affinität als an intakten den SUR1 permanent exprimierenden Zellen ($K_D = 1,45$ nM, Dissertation von Frau Susanne Bieger).

An Kir6.2/SUR1-Membranen band der Sulfonylharnstoff noch besser mit einer K_D von 0,089 [0,81;0,98] nM, was einer Affinitätserhöhung um den Faktor 4,9 ($pK_i = 0,69 \pm 0,02$) durch die Koexpression mit der porenbildenden Kanaluntereinheit entspricht.

Desweiteren untersuchten wir in diesem System die Bedeutung der N-terminalen Region des Kir6.2 bei der Affinitätserhöhung infolge der Kanalkomplexbildung. Beide dabei verwendeten Mutationen des Kir6.2, N5 und RK,4,5,AA schwächten diesen Effekt im ähnlichen Ausmaß (um 25 bzw. 22 %). So resultierte aus den Sättigungsversuchen an Kir6.2 N5/SUR1-Membranen für

GBC ein K_D -Wert von 0,126 [0,120;0,132] nM. Eine Dissoziationskonstante von 0,133 [0,115;0,151] nM erhielten wir nach der Kotransfektion des SUR1 mit Kir6.2(RK,4,5,AA).

Tabelle 15 Ergebnisse der ^3H -GBC Sättigungsexperimente an SUR1- bzw. Kir6.x/SUR1-Membranen; -MgATP

Mittelwerte \pm SEM aus n Einzelexperimenten. Zur Ermittlung der Dissoziationskonstanten wurde die Sättigungsfunktion ($y = B_{\text{MAX}} * x / (x + K_D) + a * x$) an die gemessenen Werte (x-Werte = freie Radioligandkonzentrationen; y-Werte = totale Radioligandbindung) aus den einzelnen Versuchen. angepasst. Dabei steht a für die Steigung der Geraden, welche den Anstieg der unspezifischen Bindung mit zunehmender Konzentration des freien Radioliganden (L_{frei}) beschreibt.

| Rezeptor | Plasmid-ratio Kir/SUR | pK_i / K_i (nM) | ΔpK_i^* | NSB (fmol/mg * L_{frei}) | B_{MAX} (fmol/mg) | Protein (mg/ml) | n |
|-------------------|-----------------------|-----------------------------|--------------------|------------------------------------|----------------------------|--------------------|---|
| SUR1 | - | 9,36 $\pm 0,01 / 0,43$ | - | 207 $\pm 0,01$ | 2208 ± 298 | 0,04 $\pm 0,02$ | 2 |
| 6.2/1 | 2:1** | 10,05 $\pm 0,02 / 0,089$ | 0,69 $\pm 0,02$ | 59 ± 3 | 720 ± 12 | 0,15 $\pm 0,02$ | 2 |
| 6.2 N5/1 | 100:1 | 9,90 $\pm 0,01 / 0,126$ | 0,54 $\pm 0,01$ | 76 ± 16 | 873 ± 271 | 0,13 $\pm 0,01$ | 2 |
| 6.2 (RK,4,5,AA)/1 | 150:1 | 9,88 $\pm 0,03 / 0,133$ | 0,52 $\pm 0,03$ | 59 ± 1 | 373 ± 82 | 0,15 $\pm 0,02$ | 3 |

* $\Delta pK = pK(\text{Kir6.x-Variante})/\text{SUR1}) - pK(\text{SUR1})$

** Kir6.2 im pcDNA3.1-Vektor

3.2.2.2 Verdrängung der ^3H -GBC-Bindung an SUR1, Kir6.2/SUR1, Kir6.2 N5/SUR1 und Kir6.2(RK,4,5,AA)/SUR1 durch Repaglinid in HEK293-Zellmembranen in Abwesenheit von MgATP

Die Bindung der Piperidino-Blocker in Membranen ohne MgATP wurde am Beispiel von Repaglinid in Konkurrenzexperimenten mit ^3H -GBC als Radioligand untersucht. Die im vorigen Kapitel 3.2.2.1 ermittelten GBC-Dissoziationskonstanten dienten zur Berechnung der Repaglinid-Inhibitionskonstanten (K_i) aus den Mittelpunkten der Inhibitionskurven (IC_{50}) unter Verwendung der Cheng-Prusoff-Korrektur.

Ähnlich wie in Versuchen an intakten Zellen, wurde auch hier die Repaglinid-Affinität zum SUR1 durch die Kir6.2-Präsenz stark verbessert. Von der regulatorischen Untereinheit alleine wurde $^3\text{H-GBC}$ mit einer K_D von 35 [30;42] nM verdrängt. Der mittlere Hill-Koeffizient $n_H = 1,02 \pm 0,09$ erlaubt den Rückschluss, dass die Konkurrenz einen homogenen Verlauf hatte.

Tabelle 16 Ergebnisse der $^3\text{H-GBC}$ -Verdrängung durch Repaglinid an SUR1- bzw. Kir6.x/SUR1-Membranen; -MgATP

Mittelwerte \pm SEM aus n Einzelexperimenten. Zur Ermittlung der Inhibitionskonstanten wurde das Bindungsmodell mit einer bzw. zwei Bindungsstellen an die gemessenen und gemittelten Werte aus den einzelnen Versuchen angepasst

| Rezeptor | Plasmid-ratio Kir/SUR | $^3\text{H-GBC}$ (nM) | pK _i / K _i (nM) | n _H | ΔpK_i^* | B _S (% B _{TOT}) | B _{TOT} (fmol/mg) | Protein (mg/ml) | n |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--|--------------------|-----------------------|--|-------------------------------|--------------------|---|
| SUR1 | - | 0,90 $\pm 0,07$ | 7,45 $\pm 0,04$ / 35,5 | 1,02 $\pm 0,09$ | - | 86 ± 2 | 872 ± 113 | 0,03 ± 0 | 2 |
| 6.2/1 | 2:1** | 0,93 $\pm 0,03$ | 9,69 $\pm 0,03$ / 0,20*** | 1 (fix) | 2,24 $\pm 0,05$ | 85 ± 4 | 702 ± 77 | 0,06 $\pm 0,02$ | 2 |
| 6.2 N5/1 | 100:1 | 0,86 $\pm 0,01$ | 8,14 $\pm 0,03$ / 7,2 | 0,95 $\pm 0,09$ | 0,69 $\pm 0,05$ | 83 ± 2 | 519 ± 10 | 0,06 $\pm 0,01$ | 2 |
| 6.2 (RK,4,5,AA) /1 | 150:1 | 0,89 $\pm 0,05$ | 8,65 $\pm 0,02$ / 2,24 | 0,91 $\pm 0,03$ | 1,20 $\pm 0,04$ | 76 ± 6 | 324 ± 63 | 0,09 $\pm 0,02$ | 3 |

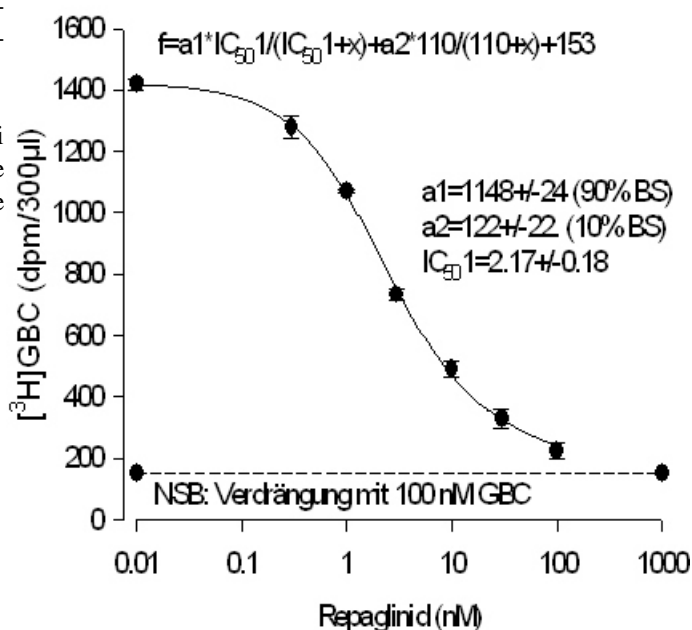
* $\Delta\text{pK} = \text{pK}(\text{Kir6.x-Variante}/\text{SUR1}) - \text{pK}(\text{SUR1})$

** Kir6.2 im pcDNA3.1-Vektor

*** K_{i1} da Kurve biphasisch: a1 = 90 \pm 0 % B_S; a2 = 10 \pm 0 % B_S; K_{i2} = 35 nM festgesetzt (REP an SUR1-Membr.; -MgATP)

Abbildung 32 Verdrängung der ^3H -GBC-Bindung an Kir6.2/SUR1-Membranen durch Repaglinid; -MgATP; Einzelexperiment zu Demonstrationszwecken

Anpassung des Bindungsmodells mit zwei Bindungsstellen an die gemessenen Werte (Gleichung: s. Graphik); eingesetzte Radioligandkonzentration: 0,9 nM



Nach der Koexpression des SUR1 mit Kir6.2 beobachteten wir eine Affinitätserhöhung um den Faktor 174 [138;219] ($\text{pK}_i = 2,24 \pm 0,05$) auf 0.20 [0,18;0,23] nM. Der Effekt der Koexpression nimmt also ähnliche Dimension an wie an ganzen Kir6.2/SUR2A-Zellen. Dies ergab sich aus der Analyse der Hochaffinitätskomponenten (\llcorner Amplitude von 90 % B_s) der biphasischen Inhibitionskurven der Einzelversuche (Beispielexperiment: s. Abb. 32). Die sichtbare Heterogenität der Bindungsstellen wurde auch hier als ein Hinweis auf das Vorliegen von freiem SUR1 in der Rezeptorpräparation gedeutet.

Kir6.2 N5 verbesserte die Repaglinidbindung zum SUR1 von 35 auf 7,2 [6,3;8,3] nM ($\text{pK}_i = 0,69 \pm 0,05$). Die ^3H -GBC/Repaglinid-Kompetition verlief im Schnitt monophasisch (\llcorner $n_H = 0,95 \pm 0,09$). In sehr guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen an Zellen verloren wir demnach durch diese Kir6.2-Mutation im Vergleich zum Wildtyp 69 % des Koexpressionseffektes.

Stärker als in Zellversuchen fiel die Minderung des Effektes durch die Kir6.2(RK,4,5,AA)-Mutation aus ($\text{pK}_i = \text{pK}_i(\text{WT}) - \text{pK}_i(\text{Mutante}) = 0,63 \pm 0,09$ vs. $\text{pK}_i = \text{pK}_i(\text{WT}) - \text{pK}_i(\text{Mutante}) = 1,04 \pm 0,06$). Repaglinid verdrängte ^3H -GBC vom Kir6.2(RK,4,5,AA)/SUR1 in Membranen ohne MgATP homogen und mit einer K_i von 2,24 [2,04;2,45] nM.

3.3 Einfluss der Mutation Y1206S auf den Sulfonylharnstoffrezeptor SUR2A und den K_{ATP} -Kanal Kir6.2/SUR2A

Hambrock et al., 2001 beschrieben den Einfluss der Mutation Y1206S in der zytoplasmatischen Schleife Nr. 8 des SUR2B (s. Abb. 3) auf die Bindung und Wirkung der K_{ATP} -Kanal-Modulatoren, sowie auf die Effekte der Koexpression des SUR2B bzw. SUR2B(Y1206S) mit den porenbildenden Untereinheiten Kir6.2 oder Kir6.1. Die Sulfonylharnstoffrezeptoren SUR2A und SUR2B unterscheiden sich nur in den letzten 42 Aminosäuren (Inagaki et al., 1996; Isomoto et al., 1996). Unsere Arbeitsgruppe untersuchte deshalb die Kanal-Modulator-Bindung an SUR2A alleine und im Kanalkomplex mit Kir6.x, sowie die Folgen der Y1206S-Mutation auf die Bindungseigenschaften der Kanalmodulatoren, um über den Vergleich mit den Daten aus den SUR2B-Studien neues über die Bedeutung des SUR2-C-Terminus zu erfahren. An diesem Projekt wirkten mehrere Mitglieder der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. U. Quast mit. Im folgenden Kapitel soll der Beitrag des Verfassers der vorliegenden Dissertation vorgestellt werden. Die gesamten Ergebnisse wurden in der Publikation Stephan et al., 2005 veröffentlicht.

3.3.1 Glibenclamid-Bindung an SUR2A und SUR2A(Y1206S) alleine bzw. nach Koexpression mit Kir6.x

Die Mutation Y1206S erhöhte die GBC-Affinität zum SUR2B. Die Bindung des Blockers an die SUR-Mutante wurde wiederum durch die Koexpression mit Kir6.x verbessert. Bei diesem Effekt zeigte sich eine leichte Kir-Subtyp-Abhängigkeit (Hambrock et al., 2001). Die Studien am SUR2A ergaben folgendes Bild:

3.3.1.1 Homologe Verdrängung der ^3H -GBC-Bindung an SUR2A in HEK-Zellmembranen in Abwesenheit von MgATP

Die Bestimmung der GBC-Affinität zum SUR2A erfolgte in 6 Experimenten an Membranen aus HEK 293-Zellen, die den Sulfonylharnstoffrezeptor infolge einer permanenten Transfektion exprimierten. Um optimale ^3H -GBC-Bindung zu ermöglichen, wurde auf die Anwesenheit von Mg-Nukleotiden im Reaktionsansatz verzichtet. Die Abbildung 33 zeigt den Verlauf der ^3H -GBC/GBC-Kompetition, als Anpassung des Bindungsmodells mit zwei Komponenten an die gemittelten Einzelversuchsdaten. Die Hochaffinitätskomponente ist beschrieben durch den $\text{pIC}_{50} = 7,63 \pm 0,08$ und die Amplitude von $19 \pm 2 \% B_{\text{TOT}}$. 100 μM P1075 verdrängte in gleichen Versuchen ebenfalls

im Mittel 19 ± 1 % der Radioligandbindung (B_{TOT}).

An Membranen aus HEK293-Zellen die mit einem leeren pcDNA3.1-Vektor transfiziert wurden, konnten Hambrock et al., 2002b keine entsprechende Hochaffinitätskomponente und P1075-Verdrängung wahrnehmen. Wir gehen daher davon aus, dass dieser Bereich der Kompetitionskurve die spezifische ^3H -GBC-Bindung an SUR2A darstellt. Nach Abzug der eingesetzten Radioligandkonzentration ergibt sich somit in diesem System eine GBC-Affinität von $K_D1 = 20$ [14;28] nM. Die niedrigeraffine Komponente ($K_D2 = 900$ [780;1100] nM; $a2 = 44 \pm 1$ % B_{TOT}) gibt die Radioligandbindung an andere endogene Strukturen der Zellmembranen wieder.

In analogen Versuchen am SUR2A(Y1206S), durchgeführt von Frau Eva Stauß, resultierte für GBC eine mittlere Dissoziationskonstante von 4,3 nM (Stephan et al., 2005). Die Y1206S-Mutation erhöht somit die GBC-Affinität zum SUR2A an Membranen und in Abwesenheit von MgATP um den Faktor 4,7.

Abbildung 33 Homologe Verdrängung der ^3H -GBC-Bindung an SUR2A-Membranen ohne MgATP:

Anpassung des Bindungsmodells mit zwei Komponenten an die gemittelten Messwerte; Kurvengleichung: $f=100-a1/(1+10^{(x-pIC_{50}1)})-a2/(1+10^{(x-pIC_{50}2)})$; die Auflösung der Hochaffinitätskomponente ist als gepunktete, gegen 81 % strebende Kurve dargestellt; die gestrichelte Linie repräsentiert die Verdrängung von ^3H -GBC aus 19 ± 1 % B_{TOT} durch 100 μM P1075.

Versuchsbedingungen: Inkubationstemperatur: 37°C; Inkubationszeit: 15 min bei pH 7,4.

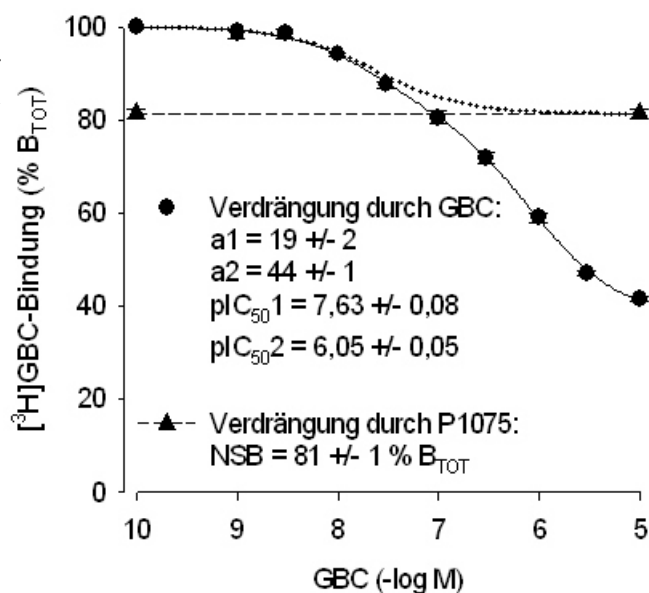


Tabelle 17 Homologe Verdrängung der ^3H -GBC-Bindung an SUR2A-Membranen ohne MgATP. Parameter aus n = 6 Einzelversuchen.

| Rezeptor | ^3H -GBC (nM) | pK_D1/K_D1 (nM) | pK_D2/K_D2 (μM) | a1 (% B_{TOT}) | a2 (% B_{TOT}) | B_{TOT} (fmol/mg) | Protein (mg/ml) |
|---------------------|------------------------|--------------------------------------|--|--------------------------|--------------------------|----------------------------|--------------------|
| SUR2A-Membr. -MgATP | 3,83 $\pm 0,04$ | 7,71 $\pm 0,08/$ 20 [14;28] | 6,05 $\pm 0,05/$ 0,89 [0,78;1,10] | 19 ± 2 | 44 ± 1 | 200 ± 16 | 0,43 $\pm 0,03$ |

3.3.1.2 Homologe Verdrängung der ^3H -GBC-Bindung an Kir6.2/SUR2A in HEK-Zellmembranen in Abwesenheit von MgATP

Die Bestimmung der GBC-Affinität zum transient exprimierten, vollständigen, rekombinanten K_{ATP} -Kanal des Herzmuskels erwies sich in Membranversuchen trotz Abwesenheit von MgATP als schwierig. Die Koexpression des SUR2A mit Kir6.2 (molares Verhältnis der pcDNA3.1-Plasmide bei der Koftransfektion = 1:1) führte im Vergleich zum SUR2A alleine zu einer Reduktion der totalen ^3H -GBC-Bindung um etwa 65 % (vgl. Russ et al., 1999). Zum einen könnte es ein Indiz für die Unterlegenheit des transient exprimierenden Systems (Transfektion mittels Lipofectamin-Methode, siehe Kap. 2.2.1.4.2; diese Methode wurde bei allen Transfektionen des im Kapitel 3.3 vorgestellten Projektes verwendet) bezüglich der SUR-Ausbeute sein, zum anderen wurde möglicherweise durch die Anwesenheit der Kir6.2-kodierenden DNA die SUR-Expression gedrosselt.

In zwei Testversuchen an Kir6.2/SUR2A-Membranen ohne MgATP unter Einsatz von ca. 1 mg/ml (!) an Protein und 3,6 nM Radioligand wurde die GBC-Affinität auf ~ 20 nM geschätzt. Somit konnte der Verlust der verfügbaren Bindungsstellen infolge der Koexpression nicht durch eine Affinitätserhöhung kompensiert werden. Eine quantitative K_D -Bestimmung für GBC war unter diesen Voraussetzungen nicht möglich.

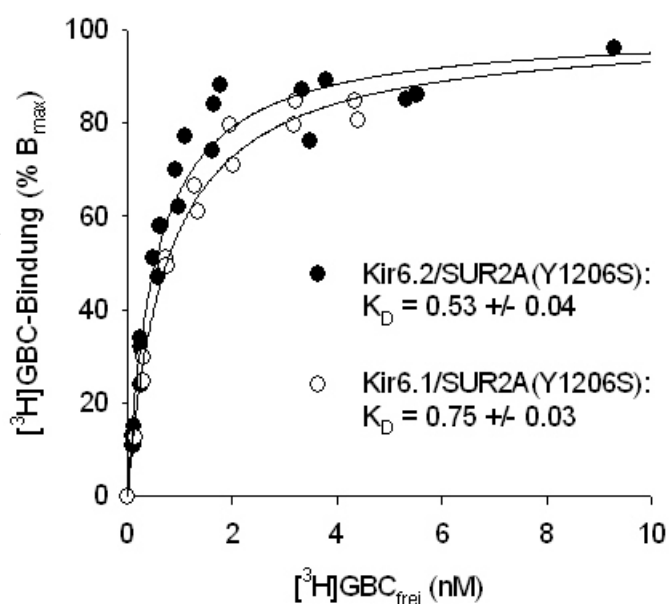
3.3.1.3 Sättigung der ^3H -GBC-Bindung an Kir6.2/SUR2A(Y1206S) und Kir6.1/SUR2A(Y1206S) in Ganzzellversuchen

In Experimenten an Zellen, welche die SUR2A-Untereinheit alleine exprimierten, war bedingt durch die Mg-Nukleotid-Anwesenheit im Zytosol die Amplitude der spezifischen ^3H -GBC-Bindung zu gering ($< 10\%$; bestimmt mit $100\ \mu\text{M}$ P1075) um aussagekräftige Kompetition von ^3H -GBC durchführen zu können. Der Einfluss der Koexpression mit Kir6.x auf die GBC-Affinität zum wildtypischen SUR2A konnte daher an intakten Zellen nicht untersucht werden. Die Y1206S-Mutation verbesserte die ^3H -GBC-Bindung an SUR2A, so dass Frau Eva Stauß in homologen Verdrängungsversuchen an intakten Zellen eine Dissoziationskonstante von $4,9\ \text{nM}$ ermitteln konnte (Dissertation von Frau Eva Stauß).

Abbildung 34 Sättigung der ^3H -GBC-Bindung an Kir6.2/SUR2A(Y1206S)- und Kir6.1/SUR2A(Y1206S)-Zellen.

Gemeinsame Darstellung der normierten ($\text{SB} = \% B_{\text{max}}$), gemittelten Daten aus $n = 3$ (Kir6.2/SUR2A(Y1206S)) bzw. $n = 2$ (Kir6.1/SUR2A(Y1206S)). Die Kurven sind nach der Gleichung $f = 100 \cdot x / (x + K_D)$ gefittet.

Versuchsbedingungen: Inkubationstemperatur: 37°C ; Inkubationszeit: 30 min; Inkubationspuffer wurde Carbogen-begast und auf pH 7,4 eingestellt. Weitere Parameter: siehe Tab. 18



Die transiente Koexpression mit Kir6.2 bzw. Kir6.1 (molares Plasmidverhältnis: 1:1; sowohl Kir- wie auch SUR-Sequenzen im pcDNA3.1-Vektor), erhöhte die GBC-Affinität zum SUR2A(Y1206S) ca. 9- bzw. 7-fach (siehe Abb. 34 und Tab. 18). Aus Sättigungsversuchen an Kir6.2/SUR2A(Y1206S)-Zellen ergab sich ein K_D -Wert von $0,53$ [$0,40; 0,69$] nM ($\text{p}K_D = 9,28 \pm 0,06$). An Kir6.1/SUR2A(Y1206S) band GBC geringfügig, jedoch statistisch signifikant ($P < 0,05$) schwächer, mit einer Dissoziationskonstante von $0,75$ [$0,66; 0,87$] nM ($\text{p}K_D = 9,12 \pm 0,03$).

Tabelle 18 Sättigung der ^3H -GBC-Bindung an Kir6.2/SUR2A(Y1206S)- und Kir6.1/SUR2A(Y1206S)-Zellen.

Gemittelte Parameter aus $n = 3$ (Kir6.2/SUR2A(Y1206S)) bzw. $n = 2$ (Kir6.1/SUR2A(Y1206S)) Versuchen

| Rezeptor | pK_D/K_D (nM) | B_{\max} (fmol/mg) | NSB* (fmol/mg*x) | Protein (mg/ml) |
|------------------------------|----------------------------------|----------------------|------------------|-----------------|
| Kir6.2/SUR2A (Y1206S)-Zellen | $9,28 \pm 0,06/0,53$ [0,40;0,69] | 310 ± 23 | 67 ± 2 | $0,66 \pm 0,01$ |
| Kir6.1/SUR2A (Y1206S)-Zellen | $9,12 \pm 0,03/0,75$ [0,66;0,87] | 180 ± 24 | 30 ± 1 | $0,52 \pm 0,01$ |

* Die Bestimmung der unspezifischen Radioligandbindung erfolgte mit 100 nM unmarkiertem GBC. NSB stieg proportional zur Konzentration an freiem ^3H -GBC; $x = L_{\text{frei}}$.

Im Bezug auf den vollständigen Kir6.2/SUR2A-Kanal ($K_{D \text{ GBC}} = 6,2$ nM; siehe 3.1.1.1) in Ganzzellexperimenten kann aus den Daten am Kir6.2/SUR2A(Y1206S) eine mutationsbedingte Erhöhung der GBC-Affinität um den Faktor 11,7 [8,9;15,5] abgeleitet werden.

3.3.1.4 Sättigung der ^3H -GBC-Bindung an Kir6.2/SUR2A(Y1206S) in HEK293-Zellmembranen, bei 23°C in Abwesenheit von MgATP

In der Inside-out-Konfiguration der Saugelkrodeutechnik bestimmte Herr Dr. Ulf Lange an Kir6.2/SUR2A(Y1206S) bei 23°C, in Abwesenheit von MgATP, für GBC einen mittleren IC_{50} -Wert von 0,83 nM (Stephan et al., 2005).

Tabelle 19 Sättigung der ^3H -GBC-Bindung an Kir6.2/SUR2A(Y1206S) in Versuchen an Membranen ohne MgATP.

Gemittelte Parameter aus $n = 2$ Versuchen

| Rezeptor | pK_D/K_D (nM) | B_{\max} (fmol/mg) | NSB* (fmol/mg*x) | Protein (mg/ml) |
|------------------------------|----------------------------------|----------------------|------------------|-----------------|
| Kir6.2/SUR2A (Y1206S)-Zellen | $9,06 \pm 0,03/0,88$ [0,76;1,00] | 463 ± 12 | 116 ± 8 | $0,10 \pm 0,01$ |

*Die unspezifische Bindung wurde in der Gegenwart von 100 nM unmarkiertem GBC ermittelt und stieg proportional zur Konzentration an freiem Radioliganden; $x = L_{\text{frei}}$.

Bei entsprechenden Bedingungen, d.h. in Membranversuchen bei 23°C und der Abwesenheit von MgATP wurde die Affinität von ^3H -GBC zum Kir6.2/SUR2A(Y1206S)-Kanal in Sättigungsexperimenten bestimmt. Um die Einstellung des Reaktionsgleichgewichtes zu ermöglichen wurde die Inkubationszeit auf 45 min verlängert. Die Membranpräparation wurde aus

HEK293-Zellen gewonnen, die transient, mit Hilfe des Lipofectamin2000-Reagenz kotransfiziert wurden. Sowohl Kir- wie auch SUR-DNA-Sequenz befand sich im pcDNA3.1-Vektor. Das molare Plasmidverhältnis betrug 1:1. Wie der Tabelle 19 zu entnehmen ist, ergab sich für GBC aus den Sättigungsexperimenten eine Dissoziationskonstante von 0,88 [0,76;1,00] nM, bei einer maximalen Bindungskapazität von 463 ± 12 fmol/mg. Somit ist die resultierende GBC-Affinität sehr ähnlich wie die oben erwähnte IC_{50} aus den Patch-clamp-Versuchen.

3.3.2 P1075-Bindung an SUR2A und SUR2A(Y1206S) alleine bzw. nach Koexpression mit Kir6.2. Ergebnisse aus Membranexperimenten in Anwesenheit von MgATP bei 37° C

Die Bindung des K_{ATP} -Kanal-Öffners P1075 an SUR2B wurde weder durch die Y1206S-Mutation, noch durch die Koexpression wesentlich beeinflusst (Hambrock et al., 2001). In homologen 3H -P1075-Kompetitionen an HEK-Zellmembranen in Anwesenheit von 1 mM MgATP erfolgte nun die Untersuchung potentieller Mutations- und Koexpressionseffekte am SUR2A. Die Ergebnisübersicht aus diesen Untersuchungen befindet sich in der Abbildung 35 und Tabelle 20.

An Membranen aus HEK-Zellen die SUR2A permanent exprimierten resultierte aus homogener Verdrängung ($n_H = 1,07 \pm 0,11$) eine mittlere Dissoziationskonstante von 20 [17;25] nM. Dieser Wert stimmt mit der publizierten (Stephan et al., 2005), von Frau Eva Stauß ermittelten $K_D = 17$ nM [15;20] gut überein (Dissertation von Frau Eva Stauß).

Infolge der Koexpression von SUR2A mit Kir6.2 (molares Plasmidverhältnis bei der transienten Transfektion: 1:1; beide Sequenzen im pcDNA3.1-Vektor) verringerte sich die P1075-Affinität im analogen Messsystem leicht ($pK_D = 0,13 \pm 0,04$) aber statistisch signifikant ($P < 0,05$) auf 28 [26;29] nM. Der durchschnittliche Hill-Koeffizient von $0,97 \pm 0,02$ lässt auf eine monophasische Kompetition schließen.

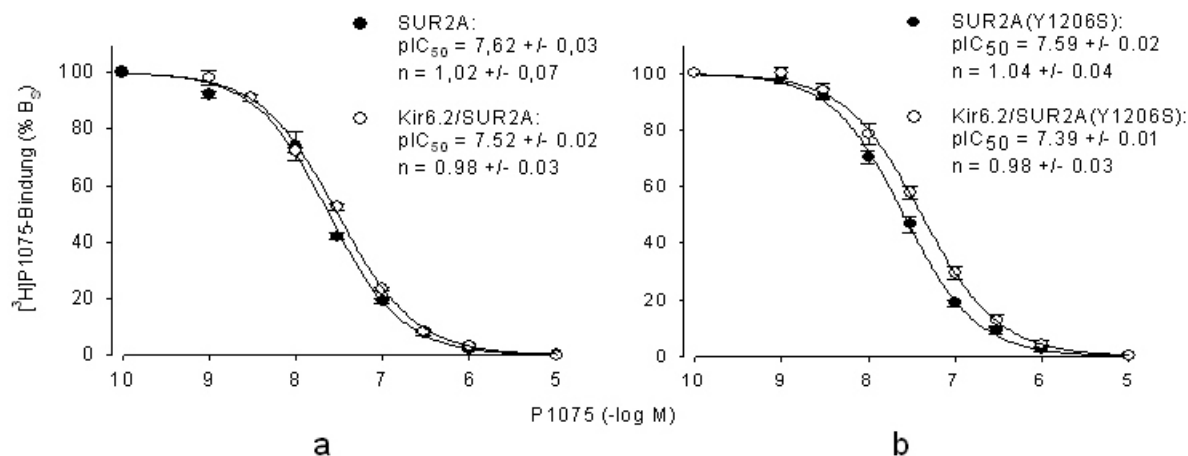


Abbildung 35 Homologe Verdrängung der ³H-P1075-Bindung an SUR2A und Kir6.2/SUR2A (a) bzw. SUR2A(Y1206S) und Kir6.2/SUR2A(Y1206S) (b).

Gemeinsame Darstellung der normierten (% B_S), gemittelten Daten aus n = 3 - 5 Versuchen an Membranen in Anwesenheit von 1mM MgATP. Die Kurven sind nach der Gleichung $f = 100 / (1 + 10^{-(n_H(x - pIC_{50}))})$ gefittet. Versuchsbedingungen: Inkubationstemperatur: 37°C; Inkubationszeit: 13 min; Inkubationspuffer mit 2,2 mM Mg²⁺ und 1 mM ATP bei pH 7,4; weitere Parameter: siehe Tab. 20

Tabelle 20 Homologe Verdrängung der ³H-P1075-Bindung an SUR2A, Kir6.2/SUR2A, SUR2A(Y1206S) und Kir6.2/SUR2A(Y1206S) in Membranen und in Anwesenheit von MgATP.

Gemittelte Parameter aus n = 3 - 5 Versuchen.

| Rezeptor | ³ H-P1075 (nM) | pK _D / K _D (nM) | n _H | B _S (% B _{TOT}) | B _{TOT} (fmol/mg) | Protein (mg/ml) | n |
|-----------------------|---------------------------|---------------------------------------|----------------|--------------------------------------|----------------------------|-----------------|---|
| SUR2A | 2,48 ± 0,04 | 7,69 ± 0,04 / 20 [17;25] | 1,07 ± 0,11 | 91 ± 2 | 100 ± 16 | 0,23 ± 0,01 | 4 |
| Kir6.2/SUR2A | 3,51 ± 0,06 | 7,56 ± 0,01 / 28 [26;29] | 0,97 ± 0,02 | 84 ± 3 | 28 ± 1 | 0,52 ± 0,03 | 4 |
| SUR2A (Y1206S) | 3,20 ± 0,11 | 7,67 ± 0,04 / 21 [18;26] | 1,00 ± 0,07 | 75 ± 3 | 24 ± 1 | 0,57 ± 0,07 | 3 |
| Kir6.2/SUR2A (Y1206S) | 3,67 ± 0,04 | 7,45 ± 0,04 / 35 [29;42] | 0,97 ± 0,05 | 83 ± 2 | 38 ± 3 | 0,53 ± 0,08 | 5 |

Die ³H-P1075/P1075-Verdrängungskurven an SUR2A(Y1206S)-Membranen waren ebenfalls monophasisch (1,00 ± 0,07) und erbrachten unter der Berücksichtigung der eingesetzten Radioligandkonzentration einen mittlereren K_D-Wert von 21 [18;26] nM. Die Membranen für die

Versuchsreihe stammten aus HEK 293-Zellen, die transient mit der SUR2A(Y1206S)-DNA transfiziert wurden.

Nach transienter Kotransfektion der HEK-Zellen mit Kir6.2- und SUR2A(Y1206S)-DNA (beide in pcDNA3.1; Verhältnis 1:1), Membranpräparation und homologer ^3H -P1075-Kompetition ergab sich ein K_D -Wert von 35 [29;42] nM. Verglichen mit SUR2A(Y1206S) alleine verschlechterte die Kir6.2-Anwesenheit somit die P1075-Affinität statistisch signifikant ($P < 0,05$) um den Faktor 1,7 ($pK_D = 0,22 \pm 0,06$).

Der Vergleich der Daten zeigt weiter, dass die Y1206S-Mutation keinen nennenswerten Einfluss auf die P1075-Affinität zum SUR2A hatte, unabhängig davon ob die regulatorische Untereinheit alleine, oder im vollständigen Kanalkomplex vorlag. Auffallend ist die ca. 74 % niedrigere maximale Rezeptorkonzentration (B_{\max}) an Kir6.2/SUR2A (215 fmol/mg), verglichen mit dem B_{\max} -Wert an SUR2A-Membranen (825 fmol/mg). Bei der Betrachtung dieses Unterschiedes ist zunächst zu beachten, dass die SUR2A-Membranen aus einer Zelllinie stammten, deren jede Einzelzelle den Rezeptor permanent exprimiert. Alle anderen, in diesem Kapitel genannten Rezeptorpräparationen wurden aus transient transfizierten Zellen gewonnen. Bei einer transienten Transfektion mittels Lipofectamin-Methode (s. Kap. 2.2.1.4.2) nehmen etwa 10 bis 20 % der Zellen die Plasmid-DNA auf (Kontrolle unter Fluoreszenzmikroskop nach Koexpression mit GFP-DNA). Die im Vergleich zum permanenten System deutlich geringere ^3H -P1075-Bindung in Rezeptorpräparationen aus transient exprimierenden Zellen überrascht daher nicht. Die Tatsache, dass die SUR2A-Ausbeute, erfasst als Radioligandbindung, aus permanenter Zelllinie nicht 10-fach, sondern nur ca. 3-fach höher ist, deutet auf eine, verglichen mit dem permanenten System, ergiebigere Rezeptorexpression einer transient transfizierten Einzelzelle hin. Da die maximale ^3H -P1075-Bindung an SUR2A(Y1206S) und Kir6.2/SUR2A(Y1206S) (beides aus transienten Systemen) ähnlich war (136 bzw. 337 fmol/mg), hat die Anwesenheit der Kir-DNA vermutlich keinen unterdrückenden Einfluss auf die Expression des SUR-Proteins (siehe auch Kapitel 3.3.1.2.).

3.3.3 Allosterische Wechselwirkungen zwischen Glibenclamid und P1075

Die Bindungsstellen der K_{ATP} -Kanal-Blocker und Öffner unterliegen einer komplexen negativ-allosterischen Kopplung. (SUR1: Schwanstecher et al., 1992b; SUR2B: Bray und Quast, 1992; Hambrock et al., 2001; Löffler-Walz et al., 2002; Russ et al., 2003). Die Wechselwirkungen zwischen GBC und P1075 am SUR2A bzw. SUR2A(Y1206S) wurden in Bindungsversuchen an Membranen mit Hilfe von ^3H -GBC und ^3H -P1075 als Radioligand untersucht. Dabei interessierte auch der Einfluss der Koexpression mit Kir6.2 auf die allosterischen Interaktionen.

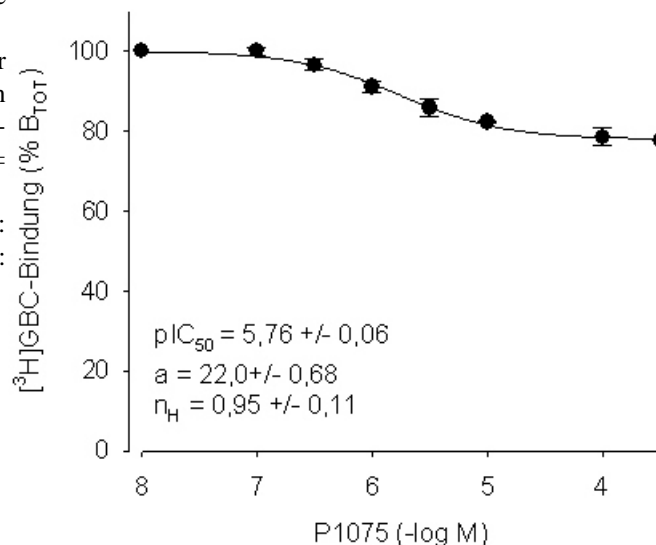
3.3.3.1 Verdrängung der ^3H -GBC-Bindung durch P1075 an SUR2A-Membranen in Abwesenheit von MgATP

Die Abbildung 36 zeigt, dass P1075 in Abwesenheit von MgATP in der Lage war, ^3H -GBC von SUR2A in Membranen, welche aus einer permanent exprimierenden Zelllinie gewonnen wurden zu verdrängen, jedoch mit einer stark erniedrigten Affinität. Berücksichtigt man die durchschnittlich eingesetzte Konzentration des Radioliganden ($3,50 \pm 0,18$ nM) sowie dessen Affinität bei den gewählten Versuchsbedingungen (20 nM; siehe 3.3.1.1), so ergab sich für den Cyanoguanidin-Öffner aus der monophasischen Kompetitionskurve ($n_H = 0,95 \pm 0,1$) ein K_i -Wert von $1,5 [1,1;2,0]$ μM . Insgesamt wurden 22 ± 1 % der totalen Radioligandbindung verdrängt. Dies ist ein nur unwesentlich höherer Wert als die 19 ± 1 % B_{TOT} , die in der im Kapitel 3.3.1.1 beschriebenen Versuchsreihe durch 100 μM P1075 verdrängt wurden. Dieser Wert stimmt ebenfalls gut mit der Amplitude der Hochaffinitätskomponente der homologen ^3H -GBC-Kompetition (19 ± 2 ; Kap. 3.3.1.1) überein. Wir gehen daher auch bei den hier beschriebenen Experimenten von einer vollständigen Hemmung der spezifischen ^3H -GBC-Bindung durch P1075 aus.

Abbildung 36 Verdrängung der ^3H -GBC-Bindung durch P1075 an SUR2A-Membranen ohne MgATP.

Anpassung des Bindungsmodells mit einer Bindungsstelle (s. Kap. 2.3.1) an die gemittelten gemessenen Werte; Kurvengleichung: $f = 100 \cdot a / (1 + 10^{(n_H \cdot (x - \text{pIC}_{50}))})$; Cheng-Prusoff-Faktor = 1,175 \rightarrow $K_i = 1,5 \mu\text{M}$

Versuchsbedingungen: Inkubationstemperatur: 37°C ; Inkubationszeit: 15 min; Inkubationspuffer: -MgATP, + 1 mM EDTA, bei pH 7,4.



Frau Eva Stauß führte analoge Versuche am SUR2A(Y1206S). Bedingt durch die bessere ^3H -GBC-Affinität zu dieser Mutante konnte P1075 einen höheren Anteil der totalen Radioligandbindung verdrängen (56 %; Dissertation von Eva Stauss); die mittlere Inhibitionskonstante des Öffners lag im niedrigaffinen Bereich (2,2 [1,7;2,8] μM). Die K_i -Werte des Wildtyps und der Mutante sind sehr ähnlich und zeigen somit wiederholt, dass die Substitution des Tyrosins in Position 1206 im SUR2A durch Serin keinen essentiellen Einfluss auf die P1075-Affinität hatte.

Tabelle 21 Verdrängung der ^3H -GBC-Bindung durch P1075 an SUR2A-Membranen ohne MgATP.

Gemittelte Parameter aus $n = 4$ Versuchen.

| Rezeptor | ^3H -GBC (nM) | $\text{p}K_i / K_i (\mu\text{M})$ | n_H | B_S (% B_{TOT}) | B_{TOT} (fmol/mg) | Protein (mg/ml) |
|------------------------|------------------------|---|-----------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------|
| SURA-Membranen - MgATP | 3,50 \pm 0,18 | 5,92 \pm 0,11/ 1,20 [0,72;2,00] | 0,99 \pm 0,11 | 22 \pm 2 | 195 \pm 22 | 0,49 \pm 0,03 |

3.3.3.2 Verdrängung der ^3H -GBC-Bindung an Kir6.2/SUR2A(Y1206S) durch P1075 in Membranen und in Anwesenheit von 1 mM MgATP

In Membranen und in Gegenwart von 1 mM MgATP hemmte P1075 die spezifische ^3H -GBC-Bindung an SUR2A(Y1206S) auf biphasischer Weise, wobei der K_i -Wert der Hochaffinitätskomponente mit der wahren Affinität des Öffners (aus homologer ^3H -P1075-

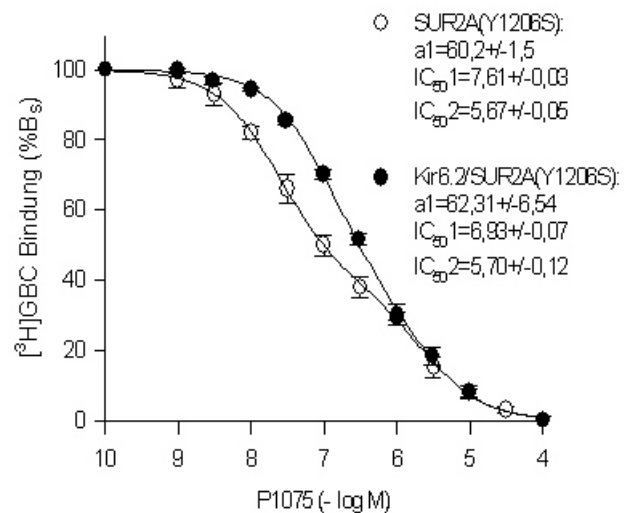
Abbildung 37 Verdrängung der ^3H -GBC-Bindung an Kir6.2/SUR2A(Y1206S) und SUR2A(Y1206S) durch P1075 in Membranen mit 1 mM MgATP.

Gemeinsame Darstellung der gemittelten, normierten (% B_s) Versuchsdaten angepasst an das Bindungsmodell mit zwei Bindungsstellen; Kurvengleichung: $f=100-a_1/(1+10^{(x-pk1)})-(100-a_1)/(1+10^{(x-pk2)})$

Versuchsbedingungen: Inkubationstemperatur: 37°C; Inkubationszeit: 15 min; Inkubationspuffer: 2,2 mM Mg^{2+} , 1 mM ATP, bei pH 7,4.

Die SUR2A(Y1206S)-Daten stammen von Frau E. Stauß und sind hier als Vergleich aufgeführt. Die IC_{50} -Werte sind mit Faktor 1,4 zu korrigieren.

Sichtbar ist die Abnahme der Biphasizität infolge der Koexpression. Bei gleichbleibenden Amplitudenverhältnis verringert sich das Ratio der K_i -Werte von 87 auf 17.



Verdrängung) sehr gut übereinstimmte und der Inhibitionskonstante der Niedrigaffinitätskomponente aus Experimenten in Abwesenheit von MgATP ähnelte (Ergebnisse aus der Dissertation von Frau Eva Stauß).

Nach der Koexpression von SUR2A(Y1206S) mit Kir6.2 (molares Plasmidverhältnis bei der Kotransfektion: 1:1; beide DNA-Sequenzen in pcDNA3.1-Vektoren) blieb im Bereich der spezifischen Bindung (bestimmt mit 100 μM P1075) die heterogene Natur der ^3H -GBC/P1075-Kompetition erhalten, jedoch rückten die Komponenten in ihren K_i -Werten näher zusammen (vgl. Abb. 37). Die Auswertung der Daten nach einer Bindungskomponente (nicht gezeigt) erbrachte einen Hill-Koeffizienten von $0,73 \pm 0,02$ (SUR2A(Y1206S) alleine: $n_H = 0,56 \pm 0,03$). Die Anpassung des Bindungsmodells mit zwei Klassen von Bindungsstellen an die gemittelten Daten vom Kir6.2/SUR2A(Y1206S) (Abb. 37) zeigt, dass die geringere Biphasizität der Verdrängungskurve in erster Linie durch den erhöhten K_i -Wert der sich über $62 \pm 7\%$ B_s erstreckenden Hochaffinitätskomponente zustande kam.

Nach der Cheng-Prusoff-Korrektur des resultierenden IC_{50} -Wertes mit dem Faktor 2,1 (Radioligand-Konzentration: 1,35 nM, siehe Tab. 22; Radioligand-Affinität: 1,2 nM aus Sättigungsexperimenten von Frau Eva Stauß) ergab sich für P1075 eine Inhibitionskonstante von 55 nM [39,78]. Sie unterscheidet sich statistisch nicht von der Dissoziationskonstante des Öffners aus Versuchen mit 3H -P1075 ($K_D = 35$ nM [29;42] siehe. Kap. 3.3.2) und bestätigt im Vergleich mit den Ergebnissen von Frau Stauß am SUR2A(Y1206S) alleine (Dissertation von E. Stauss) die im Kapitel 3.3.2 beschriebene, leichte Abnahme der Affinität für die Öffner durch die Koexpression.

Tabelle 22 Verdrängung der 3H -GBC-Bindung an Kir6.2/SUR2A(Y1206S)-Membranen durch P1075 in Anwesenheit von 1 mM MgATP

Gemittelte Parameter aus $n = 5$ Einzelversuchen.

| Rezeptor | 3H -GBC (nM) | $pK_D1/$ K_D1 (nM) | $pK_D2/$ K_D2 (μ M) | $a1$ (% B_S) | $a2$ (% B_S) | B_{TOT} (fmol/mg) | NSB (% B_{TOT}) | Protein (mg/ml) |
|--|--------------------|--------------------------------------|--|--------------------|--------------------|------------------------|-----------------------|--------------------|
| Kir6.2/ SUR2A(YS) Membr. -MgATP | 1,35 $\pm 0,05$ | 7,40 $\pm 0,09/$ 40 [26;60] | 6,16 $\pm 0,14/$ 0,70 [0,40;1,40] | 57 ± 9 | 43 ± 9 | 365 ± 92 | 19 ± 2 | 0,19 $\pm 0,03$ |

Der niedrigaffine Bereich der Hemmkurve beanspruchte 38 ± 7 % der spezifischen Bindung und wies einen K_i -Wert von 950 [550;1600] nM auf.

3.3.3.3 Verdrängung der 3H -P1075-Bindung an Kir6.2/SUR2A(Y1206S) durch Glibenclamid in Membranen in Anwesenheit von 1 mM MgATP

Die negativ-allosterischen Wechselwirkungen zwischen GBC und P1075 wurden ebenfalls mit 3H -P1075 als Radioligand untersucht. Die Studien von Frau Eva Stauß zeigten, dass Inhibitionskonstanten, die mittels 3H -P1075/GBC-Kompetition an Membranen, welche die regulatorische Untereinheit SUR2A bzw. SUR2A(Y1206S) alleine enthielten, die wahre in Experimenten mit 3H -GBC ermittelte Affinität des Blockers unterschätzen (Dissertation von E. Stauß).

An Membranen aus HEK293-Zellen, die mit SUR2A(Y1206S)- und Kir6.2-DNA im molaren Plasmidverhältnis von 1:1 (beide Sequenzen in pcDNA3.1-Vektoren) kotransfiziert wurden, kam es zur Linksverschiebung der 3H -P1075/GBC-Kompetitionskurve von $K_i = 130$ nM (Daten von Frau E. Stauß, dargestellt als rechte Kurve in Abb. 38) auf $K_i = 2,4$ [2,2;2,6] nM ($pK_i = 8,62 \pm 0,02$). Darüber hinaus zeigte sich die Hemmung der spezifischen Bindung leicht biphasisch ($n_H = 0,81 \pm 0,02$; graphische Darstellung nicht gezeigt). Da der Hill-Koeffizient nur geringfügig von eins

abweicht, ist eine Auswertung der Daten nach zwei Komponenten mit Vorsicht zu betrachten. Wird sie durchgeführt (linke Kurve in der Abb. 38), so ergibt sich eine dominante ($76 \pm 3 \% B_S$) Hochaffinitätskomponente mit einem K_i -Wert von $1,3 [0,93;1,8]$ nM und eine kleine ($24 \pm 3 \% B_S$) Komponente mit niedriger Affinität ($21 [14;32]$ nM). Die Inhibitionskonstanten an Kir6.2/SUR2A(Y1206S) errechneten sich aus den jeweiligen IC_{50} -Werten nach der Cheng-Prusoff-Korrektur mit Faktor 1,1 ($L_0^* = 3,66$ nM; $K_{DP1075} = 35$ nM aus Kapitel 3.3.2). Die Bestimmung der unspezifischen Bindung erfolgte mit $100 \mu\text{M}$ P1075 und lag im Mittel bei $9 \pm 1 \%$. Weitere Parameter der vorliegenden Versuchsreihe können der Tabelle 23 entnommen werden.

Die Linksverschiebung und Heterogenität der ^3H -P1075/GBC-Kompetitionskurve als Effekte der Koexpression mit Kir6.2 wurden von Frau E. Stauß ebenfalls am SUR2A-Wildtyp in Membranen beobachtet, wobei die Affinitätserhöhung schwächer ausfiel als bei der Y1206S-Mutante (Dissertation von E. Stauß).

Abbildung 38 Verdrängung von ^3H -P1075-Bindung an Kir6.2/SUR2A(Y1206S)-, und SUR2A(Y1206S)-Membranen durch GBC in Gegenwart von MgATP. Gemeinsame Darstellung der gemittelten, auf $\% B_S$ normierten Versuchsdaten, an die das Bindungsmodell mit einer (SUR alleine; $f = 100 \cdot 10^{(pk^*-n)} / (10^{(pk^*-n)} + 10^{(x^*-n)})$) bzw. zwei (nach Koexpression; $f = 100 \cdot a1 / (1 + 10^{(x-pk1)}) - (100 \cdot a1) / (1 + 10^{(x-pk2)})$) Komponenten. angepasst wurde. Versuchsbedingungen: Inkubationstemperatur: 37°C ; Inkubationszeit: 13 min; Inkubationspuffer: $2,2 \text{ mM Mg}^{2+}$, 1 mM ATP , bei pH 7,4. Die SUR2A(Y1206S)-Daten stammen von Frau E. Stauß und sind hier zu Vergleichszwecken aufgeführt. Der IC_{50} -Wert ist mit Faktor 1,1 zu korrigieren. Betrachtet man die Hochaffinitätskomponente der Kompetition am Kir6.2/SUR2A(Y1206S), so stellt man eine Verschiebung der SUR2A(Y1206S)-Kurve durch die Koexpression um Faktor 98 fest.

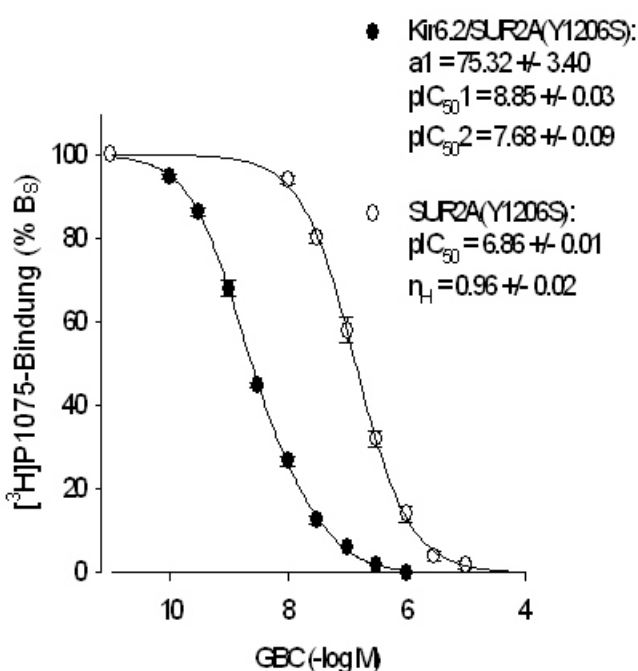


Tabelle 23 Verdrängung der ^3H -P1075-Bindung an Kir6.2/SUR2A(Y1206S)-Membranen durch GBC in Anwesenheit von 1 mM MgATP .; Gemittelte Parameter aus $n = 3$ Einzelversuchen.

| Rezeptor | ^3H -P1075 (nM) | pK_D1/K_D1 (nM) | pK_D2/K_D2 (nM) | a1 (% B_S) | a2 (% B_S) | B_{TOT} (fmol/mg) | NSB (% B_{TOT}) | Protein (mg/ml) |
|--|--------------------------|--------------------------------|----------------------------|---------------|---------------|---------------------|--------------------|-----------------|
| Kir6.2/ SUR2A(YS) Membr. -MgATP | $3,66 \pm 0,07$ | $8,89 \pm 0,07/1,3 [0,93;1,8]$ | $7,67 \pm 0,09/21 [14;32]$ | 76 ± 3 | 24 ± 3 | 42 ± 3 | 9 ± 1 | $0,50 \pm 0,04$ |

3.3.4 Einfluss der Y1206S-Mutation von SUR2A auf die Affinität von Glimepirid und Meglitinid zum Kir6.2/SUR2A(Y1206S)-Kanal in intakten Zellen

Im Rahmen der Charakterisierung der SUR2A(Y1206S)-Mutante wurde die Affinität ausgewählter K_{ATP} -Kanal-Inhibitoren zum Kir6.2/SUR2A(Y1206S) in heterologen ^3H -GBC-Verdrängungsexperimenten bestimmt. Über den Vergleich der erhaltenen Inhibitionskonstanten mit Daten aus Kir6.2/SUR2A-Untersuchungen (Kap. 3.1.1) konnte der Einfluss der Y1206S-Mutation auf die Bindung verschiedener Blockerklassen an den vollständigen, rekombinanten Kanal des Myokards bestimmt werden. Hier wird nun die Hemmung der Radioligandbindung durch Glimepirid und Meglitinid vorgestellt. Die Versuche mit weiteren Kompetitoren führten Frau Petra Kühner und Frau Susanne Bieger durch. Die Publikation der gesamten Daten befindet sich in Vorbereitung.

Die Bindungsstudien erfolgten bei möglichst physiologischen Bedingungen (37°C ; sauerstoffgesättigter Inkubationspuffer, pH 7,4) und einer Inkubationszeit von 30 min an intakten HEK293-Zellen. Die Zellen wurden ca. 48 h vor den Bindungsversuchen transient mit Hilfe von Lipofectamin2000-Reagenz mit Kir6.2- und SUR2A(Y1206S)-DNA bei einem molaren Verhältnis der Plasmide von 1,2:1 kotransfiziert. Beide DNA-Sequenzen, die für die Kanaluntereinheiten kodierten, befanden sich in Vektoren gleicher Promotorstärke (pcDNA3.1).

3.3.4.1 Verdrängung der ^3H -GBC-Bindung an Kir6.2/SUR2A(Y1206S) durch Glimepirid

Der A + B-Ligand Glimepirid verdrängte ^3H -GBC vom wildtypischen Kir6.2/SUR2A-Kanal mit einer Affinität von 11,2 nM (Kap. 3.1.1.2). Die ^3H -GBC/Glimepirid-Kompetitionsexperimente an der Kir6.2/SUR2A(Y1206S)-Mutante erbrachten nach der Cheng-Prusoff-Korrektur der IC_{50} -Werte eine mittlere Inhibitionskonstante von 0,69 [0,55;0,87] nM (siehe Tab. 24 und Abb. 39). Im Bereich der spezifischen Bindung, die mit 100 μM P1075 bestimmt wurde und 25 ± 3 % des B_{TOT} ausmachte, verliefen die Hemmkurven homogen. Darauf deutet der durchschnittliche Hill-Koeffizient von $n_H = 1,08 \pm 0,01$ hin.

Demnach bewirkte die Y1206S-Mutation am SUR2A eine 16,2-fache ($= 10^{\Delta\text{pKi}} = 10^{1,21}$) Erhöhung der Glimepirid-Affinität zum rekombinanten K_{ATP} -Kanal des Herzmuskels.

Abbildung 39 Konkurrenz der ^3H -GBC Bindung an Kir6.2/SUR2A (Y1206S) durch Glimepirid. Anpassung des Bindungsmodells mit einer Bindungsstelle an die gemittelten Messwerte.

Kurvengleichung: $f=100-B_S/(1+10^{n^*(x-pIC_{50})})$, wobei $B_S = 75\%$ festgesetzt wurde; die Cheng-Prusoff-korrigierte Inhibitionskurve (Korrekturfaktor = 2,9 aus $\langle L_0^* = 1,02 \pm 0,09\text{ nM}; K_{D\text{ GBC}} = 0,53\text{ nM}$ (4.3.1.3)) ist gepunktet dargestellt. Der Mittelpunkt dieser Kurve extrapoliert auf die Abszisse ergibt den pK_i -Wert.

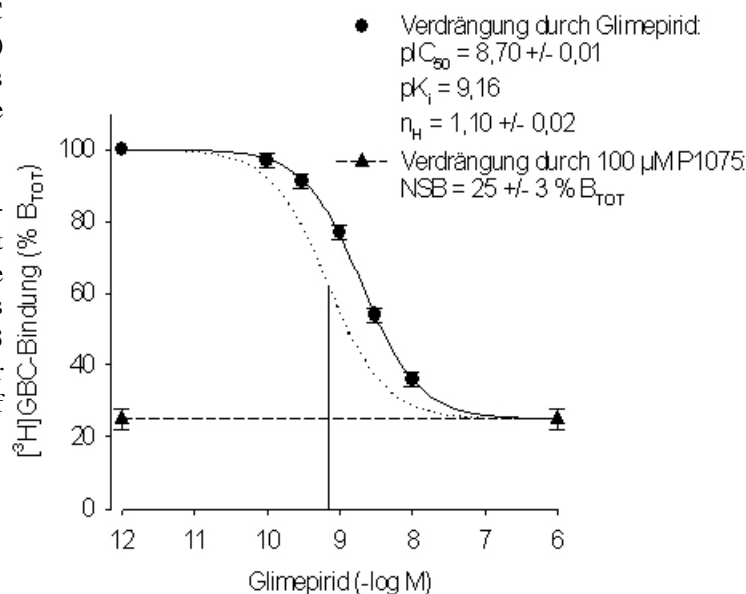


Tabelle 24 Verdrängung der ^3H -GBC Bindung an Kir6.2/SUR2A(Y1206S) durch Glimepirid

Mittelwerte \pm SEM aus 3 Einzelexperimenten.

| Rezeptor | ^3H -GBC (nM) | pK_i / K_i (nM) | n_H | B_S (% B_{TOT}) | B_{TOT} (fmol/mg) | Protein (mg/ml) | ΔpK_i^* |
|-----------------------|------------------------|---|-----------------|----------------------|---------------------|-----------------|-----------------|
| Kir6.2/SUR2A (Y1206S) | 1,02 \pm 0,09 | 9,16 \pm 0,05/ 0,69 [0,55;0,87] | 1,08 \pm 0,01 | 75 \pm 3 | 413 \pm 53 | 0,07 \pm 0,02 | 1,21 \pm 0,05 |

* $pK_i = pK_i(\text{Kir6.2/SUR2A(Y1206S)}) - pK_i(\text{Kir6.2/SUR2A})$

3.3.4.2 Verdrängung der ^3H -GBC-Bindung an Kir6.2/SUR2A(Y1206S) durch Meglitinid

Die an Kir6.2/SUR2A-Zellen ermittelte Inhibitionskonstante für Meglitinid betrug $0,83\ \mu\text{M}$ (Kapitel 3.1.1.7). Die Abbildung 40 und die Tabelle 25 zeigen Daten aus drei Versuchen an transient mit Kir6.2- und SUR2A(Y1206S)-DNA transfizierten Zellen. In diesen Experimenten hemmte der B-Ligand die spezifische ^3H -GBC-Bindung mit einer Affinität von $3,0$ [2,3;3,7] μM . Die unspezifische Radioligandbindung wurde mit Hilfe von $100\ \mu\text{M}$ P1075 bestimmt und betrug im Schnitt $77 \pm 1\%$ B_{TOT} . Im Gegensatz zu Glimepirid wird demnach die Meglitinid-Affinität zum Kir6.2/SUR2A-Kanal durch die Substitution des Tyrosins durch Serin in Position 1206 am SUR2A um den Faktor 3,5 ($1/10^{\Delta pK_i}$) erniedrigt.

Der Hill-Koeffizient von $n_H = 1,15 \pm 0,04$ ($n_H = 1,27 \pm 0,07$ beim gemeinsamen Fit) weist möglicherweise auf nennenswerte Verdrängung der unspezifischen Radioligandbindung durch hohe Meglitinid-Konzentrationen hin (vgl. Kapitel 3.1.1.3). Diese Entwicklung wurde an Zellen die den Kir6.2/SUR2A exprimierten nicht beobachtet, die Kompetitorkonzentration von $30 \mu\text{M}$ wurde dort jedoch nicht eingesetzt (Kapitel 3.1.1.7).

Abbildung 40 Konkurrenz der ^3H -GBC Bindung an Kir6.2/SUR2A (Y1206S) durch Meglitinid. Anpassung des Bindungsmodells mit einer Bindungsstelle an die gemittelten Versuchsdaten.

Kurvengleichung: $f = 100 \cdot B_S / (1 + 10^{n \cdot (x - pIC_{50})})$, wobei $B_S = 77\%$ festgesetzt wurde; die Cheng-Prusoff-korrigierte Inhibitionskurve (Korrekturfaktor = 2,5 aus $\langle L_0^* = 0,81 \pm 0,01 \text{ nM}; K_{D \text{ GBC}} = 0,53 \text{ nM} (4.3,1.3) \rangle$) ist gepunktet dargestellt. Der Mittelpunkt dieser Kurve extrapoliert auf die Abszisse ergibt den pK_i -Wert

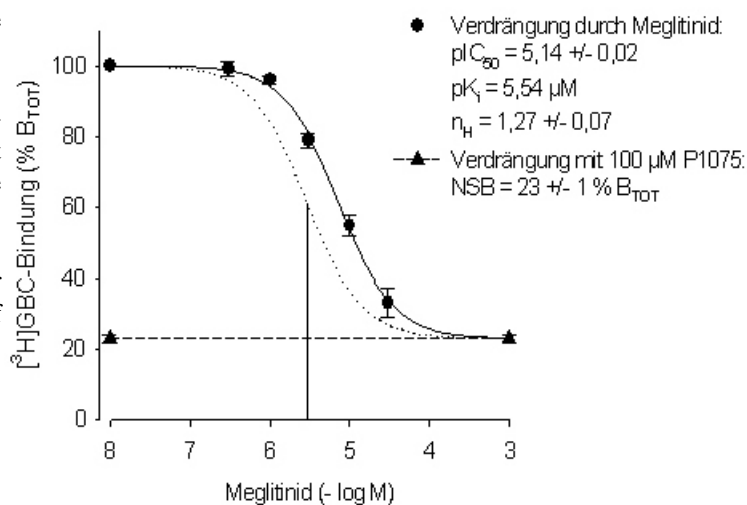


Tabelle 25 Verdrängung der ^3H -GBC Bindung an Kir6.2/SUR2A(Y1206S) durch Meglitinid

Mittelwerte \pm SEM aus 3 Einzelexperimenten.

| Rezeptor | ^3H -GBC (nM) | pK_i / K_i (μM) | n_H | B_S (% B_{TOT}) | B_{TOT} (fmol/mg) | Protein (mg/ml) | ΔpK_i^* |
|-----------------------|------------------------|---------------------------------|-----------------|----------------------|---------------------|-----------------|------------------|
| Kir6.2/SUR2A (Y1206S) | $0,81 \pm 0,01$ | $5,53 \pm 0,05 / 3,0 [2,3;3,7]$ | $1,15 \pm 0,04$ | 77 ± 1 | 635 ± 76 | $0,05 \pm 0,01$ | $-0,55 \pm 0,07$ |

* $pK_i = pK_i$ (Kir6.2/SUR2A(Y1206S)) - pK_i (Kir6.2/SUR2A)

3.4 Der Zugangsweg der K_{ATP} -Kanal-Öffner vom Benzopyran-Typ an ihre Bindungsstelle: Charakterisierung der Bindungs- und Wirkungseigenschaften von Bimakalimsulfonsäure (BMSA) und Bimakalim

Ziel der Experimente, die im folgenden Kapitel vorgestellt werden war es das Bindungsverhalten des sauren Bimakalim-Analogons BMSA am Kir6.2/SUR2B in Radioligandbindungsstudien in Membranen sowie an intakten Zellen zu untersuchen. Die Membrangängigkeit von BMSA wurde an ganzen Zellen, die lediglich die β -Untereinheit SUR2B exprimierten erforscht. Ferner galt es herauszufinden, ob und in welcher Konfiguration der Saugelektrodentchnik BMSA als Öffner des Kir6.2/SUR2B-Kanals agieren kann. In den Versuchen wurde parallel die ungeladene Kontrollsubstanz Bimakalim getestet. Aus dem Vergleich der beiden Benzopyrane könnten sich Aufschlüsse über den Zugang der K_{ATP} -Kanal-Öffner zu ihrer Bindungsstelle ergeben.

3.4.1 Bindungseigenschaften von BMSA und Bimakalim an Kir6.2/SUR2B in Membranen

In Verdrängungsexperimenten in Membranen aus transient mit Kir6.2 und SUR2B transfizierten HEK293-Zellen, mit ^3H -P1075 als Radioligand, wurden die Inhibitionskonstanten (K_i) von BMSA und Bimakalim bestimmt.

Um hochaffine ^3H -P1075-Bindung zu ermöglichen, wurden sämtliche Messungen in Membranen in Anwesenheit von 1 mM MgATP durchgeführt (Quast et al., 1993; Hambrock et al., 1998). Abbildung 41 zeigt, dass sowohl BMSA, als auch Bimakalim in der Lage waren den Radioliganden vollständig aus der spezifischen Bindung zu verdrängen. In beiden Fällen war der Verlauf der Konkurrenzkurven homogen ($n_H=1$). Für BMSA ergab sich eine Inhibitionskonstante von 4,3 μM . Bimakalim verdrängte ^3H -P1075 mit 69 ($pK_i = 1,85$) mal höherer Affinität von 0,061 μM (Tabelle 26). Die Werte stammen aus je 3 Einzelversuchen. Für die Cheng-Prusoff-Korrektur der IC_{50} -Werte wurde die P1075-Dissoziationskonstante in Kir6.2/SUR2B-Membranen von 4,4 nM (Hambrock et al., 2001) herangezogen. Die Bestimmung der unspezifischen Bindung erfolgte mit 100 μM P1075 und lag in allen Experimenten unter 30 % der totalen Bindung.

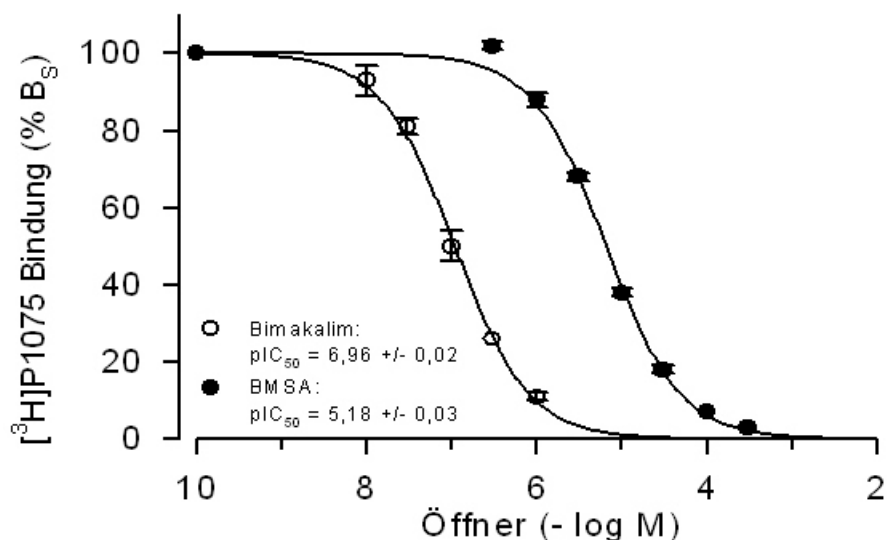


Abbildung 41 Verdrängung der spezifischen ^3H -P1075 Bindung durch BMSA und Bimakalim in Kir6.2/SUR2B-Membranen in Anwesenheit von 1 mM MgATP

BMSA: $n = 3$; $L_0 = 1,86 \pm 0,02$ nM; Proteinkonzentration: $0,48 \pm 0,04$ mg/ml;
 $B_{\text{TOT}} = 44 \pm 16$ fmol/mg; NSB bestimmt mit $100 \mu\text{M}$ P1075 = 21 ± 6 % B_{TOT} .
BM: $n = 3$; $L_0 = 1,90 \pm 0,04$ nM; Proteinkonzentration: $0,56 \pm 0,03$ mg/ml;
 $B_{\text{TOT}} = 38 \pm 10$ fmol/mg; NSB bestimmt mit $100 \mu\text{M}$ P1075 = 21 ± 6 % B_{TOT} .
 Versuchsbedingungen: Inkubation bei 37°C ; pH = 7,4; über 30 min
 Kurvengleichung: $f = 100 \cdot 10^{(\text{pk}^* - 1)} / (10^{(\text{pk}^* - 1)} + 10^{(x^* - 1)})$

Tabelle 26 Heterologe Verdrängung der ^3H -P1075 Bindung durch BMSA und Bimakalim an Kir6.2/SUR2B-Membranen in Anwesenheit von 1 mM MgATP.

Mittelwerte \pm SEM aus jeweils $n = 3$ Einzelerperimenten

| Rezeptor-Präparation | Inkubationszeit (min) / pH-Wert | BMSA: pK_i / K_i (μM) | BM: pK_i / K_i (μM) | K_i (BMSA) / K_i (BM) | ΔpK_i^* |
|------------------------|---------------------------------|---------------------------------------|---|---------------------------|-----------------|
| Kir6.2/SUR2B-Membranen | 30/ 7,4 | $5,37 \pm 0,01$ / 4,3 [4,1;4,5] | $7,21 \pm 0,04$ / 0,061 [0,051;0,074] | 69 [58;83] | $1,84 \pm 0,04$ |

* $pK_i = pK_i(\text{BM}) - pK_i(\text{BMSA})$

3.4.2 Verdrängung der ^3H -P1075 Bindung an Kir6.2/SUR2B in intakten HEK-Zellen durch BMSA und Bimakalim; Abhängigkeit von der Inkubationszeit

In Membranen zeigte BMSA die Fähigkeit, ^3H -P1075 Bindung an Kir6.2/SUR2B mit einer Affinität von $4,3 \mu\text{M}$ zu verdrängen. Als nächstes wurde das ^3H -P1075-Kompetitionsverhalten von BMSA und Bimakalim an ganzen mit Kir6.2 und SUR2B kotransfizierten HEK-Zellen untersucht. Ausführliche Darstellung der Versuchsparameter kann der Tabelle 27 und der Legende zur

Abbildung 42 entnommen werden.

Bei möglichst physiologischen Bedingungen (37°C; pH 7,4) wurden als Erstes die Inhibitionskonstanten der beiden Substanzen nach einer Inkubationszeit von 30 min bestimmt. Dabei ergab sich für BMSA ein K_i -Wert von 186 μ M, für Bimakalim von 0,036 μ M. Es resultierte also ein offenbar viel größerer Unterschied in der Affinität der beiden Verbindungen als in Membranen ($pK_{i\text{Zellen}}: 3,72 > pK_{i\text{Membranen}}: 1,84$)

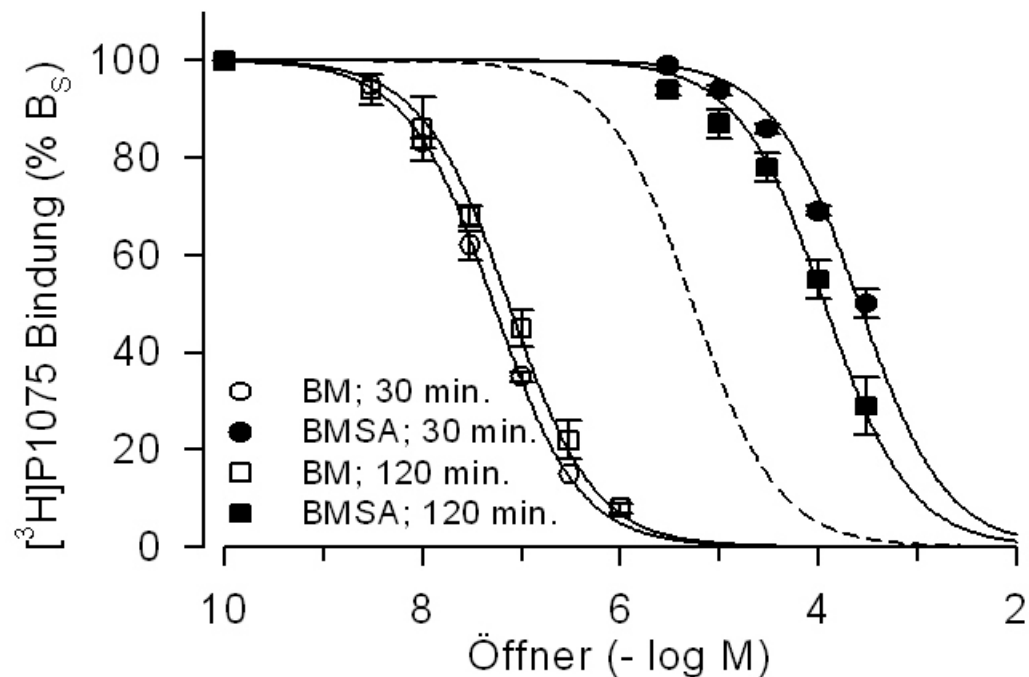


Abbildung 42 Verdrängung der spezifischen ^3H -P1075 Bindung an Kir6.2/SUR2B durch BMSA und Bimakalim in intakten Zellen nach 30 bzw. 120 min Inkubationszeit.

BMSA (30 min): $pIC_{50} = 3,59 \pm 0,04$; $n = 3$; $L_0 = 1,89 \pm 0,02$ nM; Proteinkonzentration: $0,21 \pm 0,07$ mg/ml; $B_{TOT} = 158 \pm 29$ fmol/mg; NSB bestimmt mit 100 μ M P1075 = 11 ± 4 % B_{TOT}

BMSA (120 min): $pIC_{50} = 3,94 \pm 0,03$; $n = 3$; $L_0 = 1,90 \pm 0,05$ nM; Proteinkonzentration: $0,22 \pm 0,06$ mg/ml; $B_{TOT} = 121 \pm 40$ fmol/mg; NSB bestimmt mit 100 μ M P1075 = 14 ± 4 % B_{TOT}

BM (30 min): $pIC_{50} = 7,28 \pm 0,02$; $n = 3$; $L_0 = 1,88 \pm 0,03$ nM; Proteinkonzentration: $0,23 \pm 0,06$ mg/ml; $B_{TOT} = 149 \pm 40$ fmol/mg; NSB bestimmt mit 100 μ M P1075 = 10 ± 4 % B_{TOT} .

BM (120 min): $pIC_{50} = 7,13 \pm 0,03$; $n = 3$; $L_0 = 1,99 \pm 0,2$ nM; Proteinkonzentration: $0,28 \pm 0,08$ mg/ml; $B_{TOT} = 89 \pm 11$ fmol/mg; NSB bestimmt mit 100 μ M P1075 = 13 ± 5 % B_{TOT} .

Versuchsbedingungen: Inkubation bei 37°C; pH=7,4 (Inkubationspuffer O_2 -begast)

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

K_D von P1075 an Kir6.2/SUR2B-Zellen = 3,9 nM (aus Hambrock et al., 2001)

Die gestrichelte Linie stellt den theoretischen Verlauf der BMSA-Verdrängungskurve nach 120 min Inkubationszeit bei ungehinderter Membrangängigkeit dar. Der pIC_{50} -Wert dieser Kurve beträgt 5,27 und errechnet sich wie folgt:

$$pIC_{50\text{theor.}} = -\log((10^{-(7,28-1,84)}) \cdot (1 + 1,90\text{nM}/3,9\text{nM}))$$

Die Verlängerung der Inkubationszeit auf 120 min führte zu einer signifikanten ($P < 0,05$) Veränderung des pK_i für Bimakalim auf $7,28 \pm 0,03$, gleichbedeutend mit der Senkung der Substanzaffinität auf $0,53 \mu\text{M}$.

Ein T-test auf der Ebene der pK_i -Werte zeigte auch einen statistisch signifikanten ($P < 0,05$) Unterschied zwischen den BMSA-Werten nach 30 und 120 min ($pK_{i\ 30\ \text{min}}: 3,73 \pm 0,03 < pK_{i\ 120\ \text{min}}: 4,07 \pm 0,08$). Trotz der scheinbaren Affinitätserhöhung, bedingt durch die länger werdende Inkubationszeit, wurde der theoretische pK_i -Wert für BMSA von $5,44 (= 7,28 - 1,84)$, der bei membranähnlichen Verhältnissen (d.h. die Öffnerbindungsstelle ist unabhängig von der Lokalisation erreichbar) nach 120 min Inkubationszeit zu erwarten wäre, bei weitem nicht erreicht (siehe gestrichelte Linie in der Abbildung 42). Die Diskrepanz zwischen dem theoretischen und dem experimentell ermittelten pK_i -Wert nach 2h betrug 1,37 Logstufen.

Zwecks weiterer Annäherung an die tatsächliche BMSA-Affinität zum Kir6.2/SUR2B in ganzen Zellen, wurde die Inkubationszeit auf 240 min verlängert. Dieses Vorgehen führte jedoch zur starken Abnahme der spezifischen $^3\text{H-P1075}$ -Bindung. Eine zuverlässige Bestimmung der Inhibitionskonstanten von BMSA und Bimakalim war daher bei diesen Bedingungen nicht möglich.

Tabelle 27 Verdrängung der $^3\text{H-P1075}$ Bindung durch BMSA und Bimakalim an intakten Kir6.2/SUR2B-Zellen

Mittelwerte \pm SEM aus je 3 Versuchen

| Rezeptor-Präparation | Inkubationszeit (min) /pH-Wert | BMSA: $pK_i / K_i (\mu\text{M})$ | BM: $pK_i / K_i (\mu\text{M})$ | $K_i(\text{BMSA}) / K_i(\text{BM})$ | ΔpK_i^* |
|----------------------|--------------------------------|------------------------------------|--|-------------------------------------|-----------------|
| Kir6.2/SUR2B-Zellen | 30 / 7,4 | $3,73 \pm 0,03 / 186$ [162;214] | $7,45 \pm 0,01 / 0,036$ [0,034;0,037] | 5200 [4600;6000] | $3,72 \pm 0,03$ |
| Kir6.2/SUR2B-Zellen | 120 / 7,4 | $4,07 \pm 0,08 / 85$ [59;123] | $7,28 \pm 0,04 / 0,053$ [0,044;0,063] | 1600 [1100;2500] | $3,21 \pm 0,09$ |

* $pK_i = pK_i(\text{BM}) - pK_i(\text{BMSA})$

3.4.3 Hemmung der ^3H -P1075-Bindung an SUR2B (exprimiert ohne Kir6.2) durch BMSA und Bimakalim in Ganzzellversuchen

SUR2B alleine exprimiert gelangt nicht an die Zelloberfläche (Zerangue et al., 1999) und sollte daher für eine nichtmembrangängige Substanz unerreichbar sein. Radioligandbindungsstudien an ganzen, mit SUR2B transient transfizierten HEK-Zellen eignen sich somit als Test für die Membrangängigkeit von BMSA und Bimakalim.

Ergebnisse dieses Tests sind in der Tabelle 28 und Abbildung 43 zusammengefasst. Vollständige ^3H -P1075-Verdrängung und Homogenität der Bindungsstellen vorausgesetzt, ergaben sich nach Cheng-Prusoff-Korrektur für BMSA und Bimakalim K_i -Werte von 169 bzw. 0.044 μM .

Wie zu erwarten (siehe Hambrock et al., 2001), war also die Bimakalimaffinität zu SUR2B alleine ähnlich der Affinität zum vollständigen Kir6.2/SUR2B-Kanal. Die BMSA-Verdrängungskurve hingegen erfuhr eine im Vergleich zu den im Abschnitt 3.4.1 geschilderten Experimenten deutliche Rechtsverschiebung. Die K_i -Werte von BMSA und Bimakalim unterscheiden sich hier um den Faktor 3900 ($pK_i = 3,59$) und somit sehr viel stärker als in Membranversuchen ($pK_i = 1,84$).

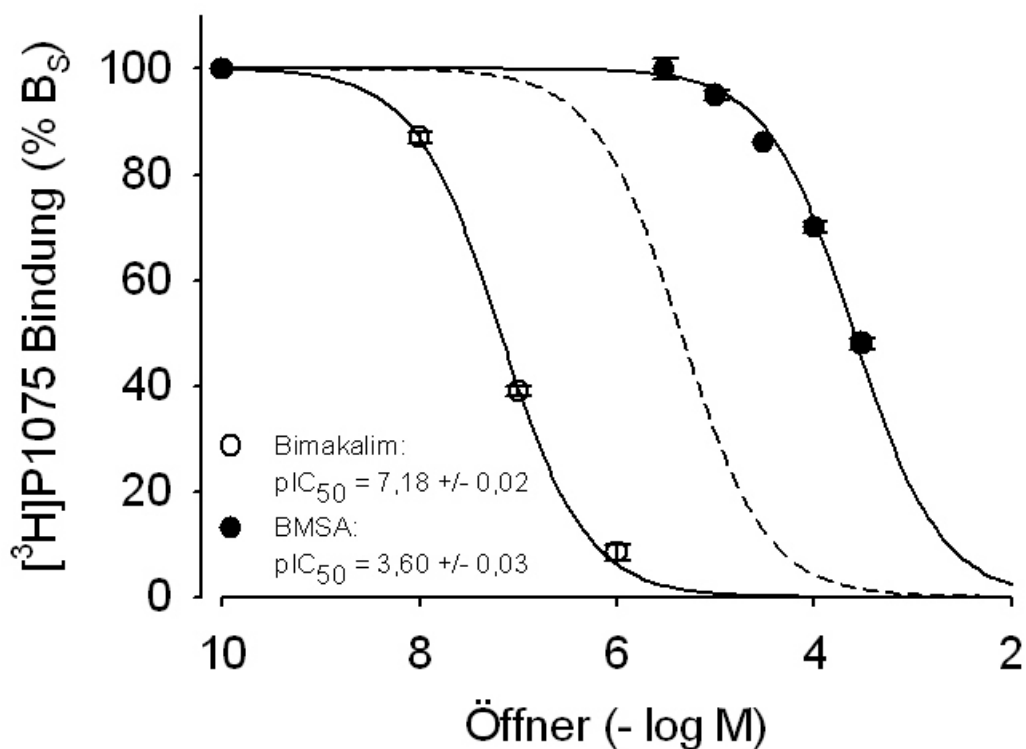


Abbildung 43 Verdrängung der spezifischen ^3H -P1075 Bindung an SUR2B durch BMSA und Bimakalim in intakten Zellen.

BMSA: $n = 3$; $L_0 = 2,15 \pm 0,11 \text{ nM}$; Proteinkonzentration: $0,18 \pm 0,03 \text{ mg/ml}$; $B_{\text{TOT}} = 486 \pm 147 \text{ fmol/mg}$; NSB bestimmt mit $100 \mu\text{M P1075} = 4 \pm 1 \% B_{\text{TOT}}$

BM: $n = 2$; $L_0 = 2,06 \pm 0,07 \text{ nM}$; Proteinkonzentration: $0,15 \pm 0,01 \text{ mg/ml}$; $B_{\text{TOT}} = 579 \pm 138 \text{ fmol/mg}$; NSB bestimmt mit $100 \mu\text{M P1075} = 4 \pm 1 \% B_{\text{TOT}}$

Versuchsbedingungen: Inkubation bei 37°C ; $\text{pH} = 7,4$ (Inkubationspuffer O_2 -begast) über 30 min

Kurvengleichung: $f = 100 \cdot 10^{(\text{pk}^* - 1)} / (10^{(\text{pk}^* - 1)} + 10^{(x^* - 1)})$

Die gestrichelte Linie stellt den theoretischen Verlauf der BMSA-Verdrängungskurve bei ungehinderter Membrangängigkeit. Der pIC_{50} -Wert dieser Kurve beträgt 5,34 und errechnet sich aus dem pK_i von BM (Tab. 28) und dem pK_i aus Tab. 26 unter Berücksichtigung der eingesetzten Radioligandkonzentration und der ^3H -P1075 Affinität zum SUR2B ($4,3 \text{ nM}$ aus Hambrock et al., 2001) wie folgt: $\text{pIC}_{50} \text{ theor.} = -\log((10^{-(7,36-1,84)}) \cdot (1 + 2,15 \text{ nM} / 4,3 \text{ nM}))$

Tabelle 28 Verdrängung der ^3H -P1075 Bindung durch BMSA und Bimakalim in intakten SUR2B-Zellen

Mittelwerte \pm SEM aus 3 (BMSA) bzw. 2 (BM) Versuchen

| Rezeptor-Präparation | Inkubationszeit (min) / pH-Wert | BMSA: $\text{pK}_i / K_i (\mu\text{M})$ | BM: $\text{pK}_i / K_i (\mu\text{M})$ | $K_i(\text{BMSA}) / K_i(\text{BM})$ | ΔpK_i^* |
|----------------------|---------------------------------|---|--|-------------------------------------|-----------------------|
| SUR2B-Zellen | 30 / 7,4 | $3,77 \pm 0,03 / 169$ [147;193] | $7,36 \pm 0,01 / 0,044$ [0,042;0,046] | 3900 [3400;4500] | $3,59 \pm 0,03$ |

* $\text{pK}_i = \text{pK}_i(\text{BM}) - \text{pK}_i(\text{BMSA})$

Anhang:

Am Test der Membrangängigkeit scheiterte ein Versuch der Erforschung des Zugangs zur Öffnerbindungsstelle mittels des N-H-aziden Cromakalim-Tetrazols S853951. Diese Verbindung sollte in ihrer Säurestärke mit einer entsprechenden Carbonsäure vergleichbar sein. Trotzdem verdrängte sie am SUR2B beim pH 7,4 und der Inkubationszeit von 30 min ^3H -P1075 in Ganzzellversuchen mit gleicher Affinität wie an Membranen (K_i von ca. 35 μM). Diese Ergebnisse deuteten auf eine rasche Membranpassage des Tetrazols hin. Eine pH-Werterhöhung (pH 8,5

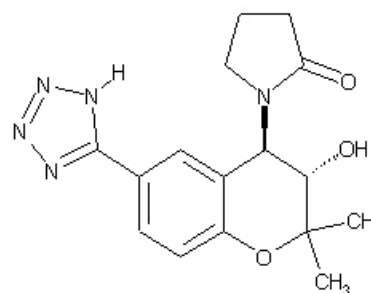


Abbildung 44 Strukturformel des Cromakalim-Tetrazols S853951

und 9) oder eine Inkubationszeitverkürzung (10 und 4 min) verschoben die Bindungskurven des Tetrazols und von Cromakalim jeweils nach rechts, sodass ihr K_i -Quotient gleich blieb. Dies zeigte, dass das Tetrazol innerhalb dieser Zeit vollständig die Zellmembran durchquert hatte und dass die Einstellung des Bindungsgleichgewichts und nicht die Membranpassage zeitlimitierend war. Da auch die Inhibierung eines potentiellen Anionentransporters im HEK293-Zellsystem durch DIDS diesbezüglich keinen Erfolg brachte, wurde das S853951-Projekt aufgegeben. Die Suche nach einem geeigneteren (= saureren) Öffner führte schließlich zur Bimakalim-Sulfonsäure (BMSA).

3.4.4 BMSA und Bimakalim als K_{ATP} -Kanal Öffner

Die verschiedenen Konfigurationen der Saugelektrodenteknik erlauben es, die zu untersuchende Substanz auf die zytoplasmatische (inside-out), oder die extrazelluläre (whole-cell, cell-attached) Seite der Zellmembran zu applizieren (s. Kap. 2.2.3). In den nachfolgend geschilderten Experimenten sollte untersucht werden, ob und in welcher Konfiguration BMSA und Bimakalim den Kir6.2/SUR2B-Kanal aktivieren können.

Die Untersuchungen der Substanzeffekte erfolgten an rekombinanten Kir6.2/SUR2B-Kanälen, die in HEK293-Zellen, als Folge einer transienten Lipofectamin 2000-Transfektion, exprimiert wurden. Das Kir/SUR-Plasmidverhältnis betrug 1,2:1. Um die Kanaldichte zu reduzieren wurde bei den Transfektionen für die Ganzzellexperimente eine geringere DNA-Menge (1 μg) pro Schale verwendet (siehe Kap. 2.2.1.4.3).

3.4.4.1 Wirkung von BMSA und Bimakalim auf den Kir6.2/SUR2B-Kanal in der inside-out-Konfiguration

Nach dem Zustandekommen eines Abdichtwiderstandes im GΩ-Bereich, zwischen der Patchpipette (Pipettenwiderstand um 1MΩ) und der ausgewählten grün fluoreszierenden Zelle wurde durch Zurückziehen der Pipette ein Membranstück von der Zelle abgelöst. Die nun zugängige innere Seite der Zellmembran konnte der Einwirkung der Perfusionslösung ausgesetzt werden. In nukleotidfreier Standard-Kalium Lösung (Kap. 2.1.4.3.3) entwickelte sich ein Strom zwischen 250 und 2500 pA, der durch 1 mM ATP blockiert werden konnte (I_{KATP}).

Die Wirkung der Benzopyrane auf die K_{ATP} -Kanäle wurde in Anwesenheit von 1 mM MgATP untersucht. Zum einen dient der MgATP-Block in Abwesenheit potentieller Öffner zur Ermittlung der Basislinie (= kein I_{KATP}), zum anderen benötigen Öffner hydrolysierbare Mg-Nukleotide um binden und wirken zu können (Schwanstecher et al., 1992b; Schwanstecher et al., 1998; Quast et al., 1993; Hambrock et al., 1998). Als Bezugsgröße für die Quantifizierung der Kanalaktivierung diente I_{KATP} in nukleotidfreier Lösung. Die dargestellten Experimente dienten nicht zur Bestimmung einer vollständigen Konzentrations-Wirkungs-Kurve, vielmehr sollte der Nachweis einer Kanalaktivierung bei vergleichbaren Substanzkonzentrationen erbracht werden.

BMSA wurde in einer Konzentration von 100 μM eingesetzt und sollte in ihrer Wirkung mit der von 1 und 50 μM Bimakalim verglichen werden. Die Wahl von Konzentrationen, die vielfach über den Inhibitionskonstanten aus den Radioligandbindungsstudien an Membranen liegen (BMSA: 4,3 μM; BM: 0,061 μM), folgte den Erkenntnissen von Quast et al., 1993 und Schwanstecher et al., 1998, dass die Konzentrations-Wirkungskurve für Öffner um den Faktor 5 bzw. 10 rechts der Bindungskurve liegt.

Aus der Abbildung 45a geht hervor, dass die Applikation von 100 μM BMSA zum starken Anstieg des I_{KATP} führte. Diese Beobachtung bestätigte sich in 3 weiteren Experimenten. Im Durchschnitt wurde eine Aktivierung von 72 ± 11 % des I_{KATP} in nukleotidfreier Lösung gemessen. Die mittlere Effekt-HWZ betrug 0,4 min. Der BMSA-induzierte Strom war vollständig reversibel und GBC-empfindlich.

Bimakalim hatte erwartungsgemäß ebenfalls Öffnerpotential. Die Originalspur in der Abbildung 45b zeigt ein charakteristisches Beispiel, ausgewählt aus $n = 5$ Versuchen. Die Stromentwicklung nach Zugabe von $1 \mu\text{M}$ Substanz verlief langsam und hatte eine komplexe Kinetik. Nach kumulativer Gabe von $50 \mu\text{M}$ Bimakalim kam es zu einer weiteren schnellen Kanalöffnung die vollständig reversibel war. Im Schnitt betrug die Aktivierung durch $1 \mu\text{M}$ Bimakalim $57 \pm 7 \%$ des I_{KATP} , bei einer Effekt-HWZ von 1,8 min. Die sättigende Bimakalimkonzentration bewirkte einen Stromanstieg auf $81 \pm 4 \%$ (\ll HWZ: 0,1 min).

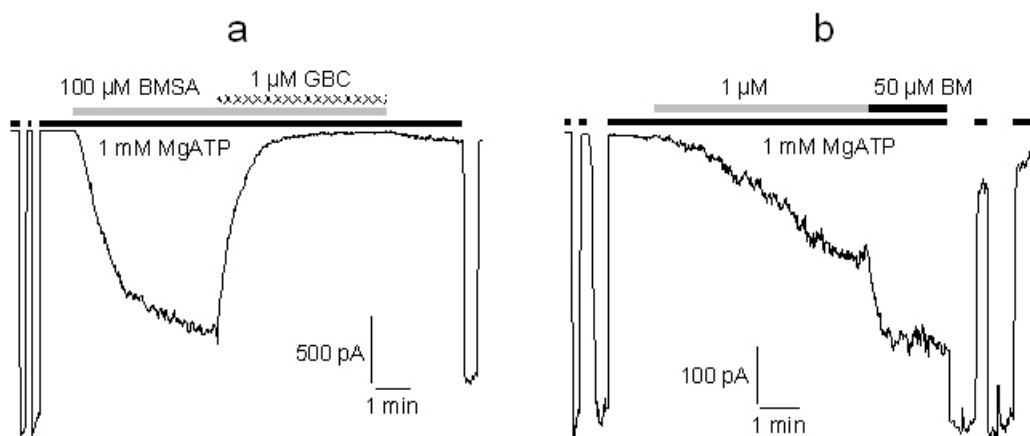


Abbildung 45 Aktivierung der Kir6.2/SUR2B-Kanäle durch BMSA (a) und Bimakalim (b) in Anwesenheit von 1 mM MgATP in der Inside-Out-Konfiguration.

Die Originalspuren wurden bei Raumtemperatur (ca. 22°C) und einem Haltepotential von -50 mV aufgezeichnet. Im Bad und in der Pipette befand sich K^+ -HEPES-Lösung (s. Kap. 2.1.4.3.1.2). Aus der Perfusionsapparatur strömte mit konstanter Flussrate nukleotidfreie bzw. 1 mM MgATP -haltige Kalium-Standard-Lösung (+/- Pharmakon; siehe Kap. 2.1.4.3.3)

a: $100 \mu\text{M}$ BMSA-Zugabe (grauer Balken) aktiviert ca. 70% des I_{KATP} in nukleotidfreier Lösung (Unterbrechungen des schwarzen 1 mM ATP -Balken). Zusätzliche Applikation von $1 \mu\text{M}$ GBC inhibiert diesen Strom vollständig. Der GBC-Block ist nach einer kurzen Auswaschphase reversibel.

b: $1 \mu\text{M}$ Bimakalim (grauer Balken) und darauffolgende Gabe von $50 \mu\text{M}$ BM (schwarzer Balken) aktiviert hier den I_{KATP} auf 40 bzw. 70% . Die Strominduktion ist reversibel. Es tritt kein Rundown auf.

3.4.4.2 Wirkung von BMSA und Bimakalim auf den Kir6.2/SUR2B-Kanal in der Ganzzell-Konfiguration

In den Whole-cell-Messungen wurden die zu testenden Substanzen im Badpuffer (Na⁺-HEPES; siehe Kap. 2.1.4.3.1.1) gelöst, auf 37°C temperiert und konnten so, die Messkammer durchströmend, auf die Außenseite der Zellmembran einwirken. Dabei wurde der Einfluss von 100 µM BMSA und 1 µM Bimakalim auf den basalen K_{ATP}-Strom untersucht, der sich nach der Herstellung der Ganzzellableitung und dem Lösungsaustausch zwischen der Pipette (Pipettenwiderstand: 3-5 MΩ) und dem Zellinneren entwickelte. Um das basale Stromniveau niedrig zu halten, enthielt die K⁺-Glutamat Pipetten-Lösung 3 mM MgATP. Zu starke Kanalaktivität vor der Zugabe eines Öffners begrenzt dessen potentielle Effektamplitude, da ab einer Stromstärke von > 1 nA zunehmend mit Schwierigkeiten bei der Potentialklemme zu rechnen ist.

In jedem der vier durchgeführten Experimente resultierte aus der Applikation der gewählten Bimakalim-Konzentration ein rascher (HWZ < 0,5 min) und starker Anstieg des I_{KATP}. Eine genaue Quantifizierung dieses Effektes ist anhand der vorliegenden Daten nicht möglich, da der induzierte Strom trotz MgATP häufig zu groß wurde und dadurch zum Verlust der stabilen Whole-cell-Konfiguration führte, bevor ein Gleichgewichts-Zustand erreicht war.

Keine Aktivierung der K_{ATP}-Kanäle konnte hingegen in gleichen Versuchen unter der Einwirkung von 100 µM BMSA beobachtet werden. Der Verlauf eines charakteristischen Einzelexperiments ist in der Abbildung 46 dargestellt.

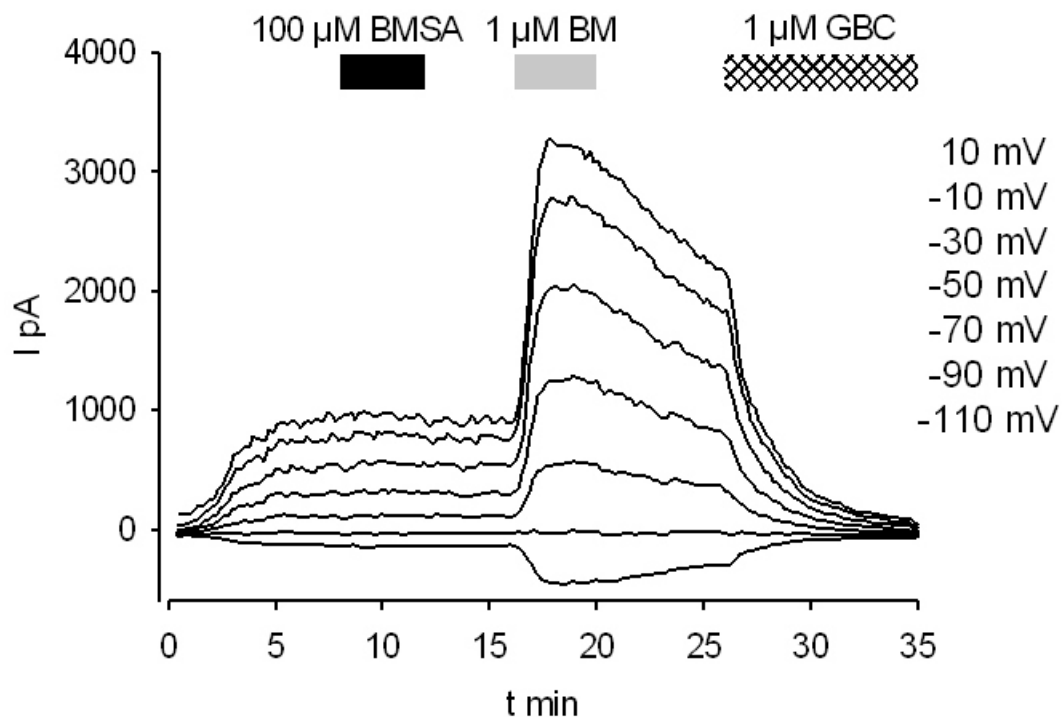


Abbildung 46 Wirkung von BMSA und Bimakalim (BM) auf die Kir6.2/SUR2B-Kanäle in der Ganzzellkonfiguration. Beispiel aus $n = 4$ Versuchen.

Das Testpotential wurde periodisch von -110 bis $+10$ mV in 20 mV-Schritten variiert. Ausgewertet wurde der Stromverlauf bei -60 mV.

Während der Dialyse der untersuchten Zelle mit der 3 mM ATP-haltigen Pipettenlösung entwickelt sich ein basaler K_{ATP} -Strom und erreicht nach ca. 5 min eine stabile Plateauphase. Die Applikation von 100 μ M BMSA über 4 min hat keinen Einfluss auf die Stromentwicklung. Die deutliche, schnelle (HWZ = $0,4$ min) Kanalaktivierung nach der Auswaschphase ist auf die Öffnerwirkung von Bimakalim zurückzuführen. Die induzierten Ströme verkleinern sich beim Auswaschen der Substanz und werden schließlich vollständig durch GBC inhibiert.

3.4.4.3 Wirkung von Bimakalim auf den Kir6.2/SUR2B-Kanal in der Cell-attached-Konfiguration

Überraschend ist die sehr schnelle Aktivierungskinetik von Bimakalim in der Ganzzellkonfiguration verglichen mit dem verhältnismäßig langsamen Bimakalimeffekt in den Inside-out-Experimenten. Diese Tatsache könnte als ein Hinweis auf eine von außen zugängliche Bimakalim-Bindungsstelle gedeutet werden. Unklar ist aber der Anteil der Zellmembranpassage an der Effektkinetik. Gut vorstellbar ist ebenfalls, dass die Bimakalim-vermittelte Aktivierungsgeschwindigkeit an den konfigurationsabhängigen Zustand der Kanäle entscheidend gekoppelt ist.

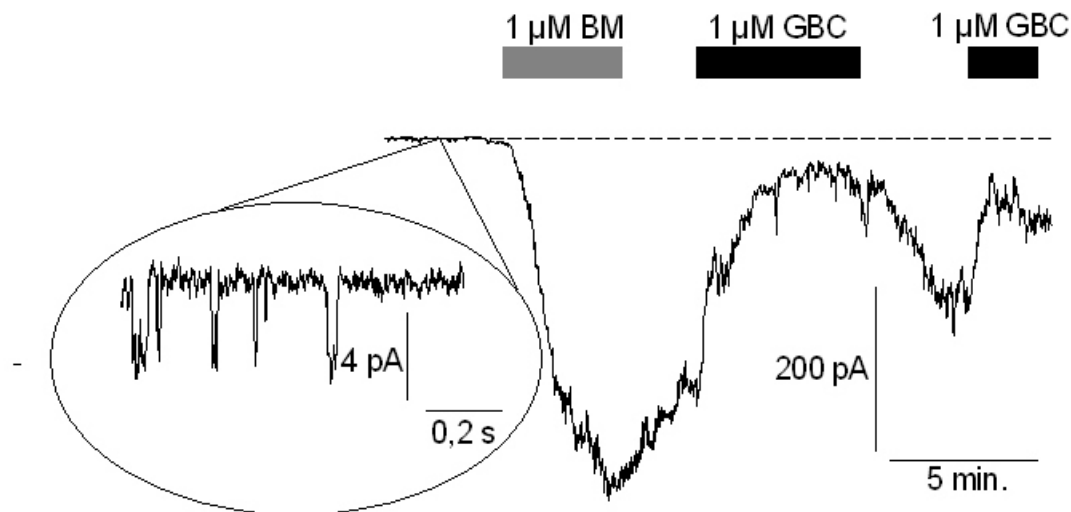


Abbildung 47 Wirkung Bimakalim (BM) auf die Kir6.2/SUR2B-Kanäle in der cell-attached-Konfiguration. Beispiel aus $n = 3$ Versuchen

Die Originalspur wurde bei 37°C und einem Haltepotential von -50 mV aufgezeichnet. Im Bad und in der Pipette befand sich K^+ -HEPES-Lösung (Kap. 2.1.4.3.1.2).

Nach der Bildung eines Abdichtwiderstandes im $\text{G}\Omega$ -Bereich befindet sich die untersuchte Zelle in der cell-attached-Konfiguration. Die Kanalaktivität liegt auf dem Einzelkanalniveau (Spur in der ovalen Einfügung). Die Applikation von $1\ \mu\text{M}$ Bimakalim (grauer Balken) führt rasch (Effekt HWZ = $0,9\text{ min}$) zu einem Stromanstieg. Während der Auswaschphase und der anschließenden Einwirkung von $1\ \mu\text{M}$ GBC (schwarzer Balken) verringert sich die Kanalaktivität, erreicht jedoch nicht den Ausgangslevel (gestrichelte Gerade). Nach dem Absetzen von GBC steigt der Einwärtsstrom wieder an. Dies deutet darauf hin, dass ein Anteil an BM immer noch am Rezeptor gebunden ist. Auch dieser Anstieg ist GBC-empfindlich.

In 3 cell-attached-Versuchen erfolgte die Bimakalimapplikation über das Bad auf die extrazelluläre Seite der Membran außerhalb der Pipettenmündung und führte jedes mal zu einer schnellen ($\langle \rangle\text{HWZ} = 1,1\text{ min}$) Aktivierung der K_{ATP} -Kanäle. Da nur Ströme aus dem Membranbereich unter der Pipette ($0,8 - 1\ \text{M}\Omega$) erfasst wurden, mußte Bimakalim einmal (bei einer vom Zytosol erreichbaren Bindungsstelle), oder zweimal (bei einer von außen zugängigen Bindungsstelle) die Zellmembran passieren um wirken zu können. Diese Wirkung und insbesondere ihre Halbwertszeit kann somit im Vergleich mit den Ergebnissen der i/o- und wc-Experimenten wichtige Einblicke in die Abhängigkeit der Effektkinetik von der Membranpassage gewähren.

4 Diskussion

4.1 Selektivität der insulinotropen Substanzen für die K_{ATP} -Kanalsubtypen

Außer in der β -Zelle findet man K_{ATP} -Kanäle in einer Vielfalt an Zelltypen. Im Herz-Kreislaufsystem zum Beispiel spielen diese Kanäle eine wichtige physiologische Rolle (Quast et al., 2004; s. auch Kap. 1.2.6). Blockade der kardiovaskulären K_{ATP} -Kanäle während einer Diabetes-Typ2 Therapie mit nicht hinreichend selektiven Sulfonylharnstoffen oder Gliniden könnte mit ernstesten Nebenwirkungen assoziiert sein. Wegen widersprüchlichen Ergebnissen aus klinischen Studien (Meinert et al., 1970; Simpson et al., 2006 vs. Autoren der UKPDS-Studie, 1998; Stevens et al., 2004) kann die Sicherheit des SU/Glinid-Einsatzes nicht abschließend beurteilt werden. Eine ausgeprägte Pankreas-Selektivität gilt somit weiterhin als ein wichtiges Sicherheitskriterium. Die Datenlage zur Selektivität der SU und Glinide ist jedoch unvollständig und nicht widerspruchsfrei (Proks et al., 2002; s. auch Kap. 1.2.8.1).

In unserer Arbeitsgruppe wurde deshalb die Affinität der insulinotropen Verbindungen (A+B-Liganden: GBC, Glimepirid, Gliquidon; A-Liganden: Gliclazid, Glibornurid, Nateglinid; B-Liganden: Meglitinid, UL-DF9, Repaglinid, AZ-DF265; Strukturformeln s. Abb. 6) zu rekombinanten Kir6.2/SUR1-, Kir6.2/SUR2A- und Kir6.1/SUR2B-Kanälen mittels Verdrängung des Radioliganden ^3H -GBC bestimmt. In Experimenten an SUR2-Isoformen ist die Wahl des Radioliganden bei der Charakterisierung der Blockerbindung entscheidend. In der Verdrängung des radioaktiv markierten Öffners ^3H -P1075 durch GBC, bei der die negativ allosterische Kopplung der jeweiligen Bindungsregionen ausgenutzt wird, führt zu Unterschätzung der wahren GBC-Affinität (Russ et al., 1999; Hambrock et al., 2001). Es ist wahrscheinlich, dass dies ebenfalls für weitere Blocker gilt.

Die Bindungsstudien am Kir6.2/SUR1 und Kir6.2/SUR2A wurden größtenteils im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt. Die Ergebnisse wurden im Kapitel 3.1.1 vorgestellt; deren zusammenfassende Darstellung ergänzt mit Daten von Frau Petra Kühner befindet sich in der Tabelle 29 und in der Abbildung 48. In elektrophysiologischen Experimenten wurde zudem die Wirkung von Repaglinid und GBC auf Kir6.2/SUR1, Kir6.2/SUR2A und Kir6.1/SUR2B untersucht. Die Ergebnisübersicht befindet sich in der Tabelle 30.

Tabelle 29 Vergleich der Affinität von Kir6.2/SUR1 und Kir6.2/SUR2A für Sulfonylharnstoffe und Glinide

| Substanzen (Ligandentyp) | Kir6.2/SUR1 | | Kir6.2/SUR2A | | pK _i * | f** |
|-----------------------------|-----------------|------------------------|-----------------|-----------------------|-------------------|---------------------|
| | pK _i | K _i (nM) | pK _i | K _i (nM) | | |
| Glibenclamid (A + B) | 9,35 ± 0,08 | 0,45 [0,31;0,65] | 8,21 ± 0,02 | 6,2 [5,6;6,8] | 1,14 ± 0,08 | 14 [10;20] |
| Glimepirid (A + B) | 9,24 ± 0,02 | 0,58 [0,52;0,63] | 7,95 ± 0,02 | 11,2 [10,2;12,3] | 1,29 ± 0,02 | 19 [18;21] |
| Gliquidon (A + B) | 8,51 ± 0,05 | 3,1 [2,5;3,9] | 6,93 ± 0,02 | 117 [107;129] | 1,58 ± 0,05 | 38 [30;48] |
| Gliclazid (A) | 6,16 ± 0,06 | 692 [525;912] | 5,13 ± 0,01 | 7413 [7079;7762] | 1,03 ± 0,06 | 11 [8;14] |
| Glibornurid (A) | 6,44 ± 0,02 | 363 [331;398] | 5,17 ± 0,02 | 6761 [6166;7244] | 1,27 ± 0,03 | 19 [16;22] |
| Nateglinid (A) | 6,46 ± 0,01 | 347 [331;363] | 4,99 ± 0,04 | 10233 [8511;12303] | 1,47 ± 0,04 | 30 [25;35] |
| Repaglinid (B) | 9,14 ± 0,04 | 0,72 [0,60;0,87] | 8,81 ± 0,02 | 1,55 [1,41;1,70] | 0,33 ± 0,04 | 2,1 [1,8;2,6] |
| (-)-AZ-DF 265 (B) | 8,43 ± 0,06 | 3,7 [2,8;4,9] | 7,60 ± 0,02 | 25,1 [22,9;27,5] | 0,83 ± 0,06 | 6,8 [5,1;8,9] |
| Meglitinid (B) | 5,50 ± 0,03 | 3162 [2754;3631] | 6,08 ± 0,05 | 832 [661;1047] | -0,58 ± 0,06 | 0,26 [0,20;0,35] |
| UL-DF 9 (B) | 4,38 ± 0,01 | 41687 [39811;43652] | 5,52 ± 0,03 | 3020 [1820;5012] | -1,14 ± 0,11 | 0,07 [0,04;0,12] |

* pK_i = pK_i (Kir6.2/SUR1) - pK_i (Kir6.2/SUR2A)

** f = 10^{ΔpK_i}

Grau unterlegt sind Felder mit Ergebnissen von Frau Petra Kühner.

Tabelle 30 Vergleich der Wirkung von Repaglinid und Glibenclamid am Kir6.2/SUR1, Kir6.2/SUR2A und Kir6.1/SUR2B

| Kanal | REP | | | GBC | | |
|--------------------|------------------------------|--------------------------|-----|-----------------------------|--------------------------|-------|
| | IC ₅₀ (nM) | a (% I _{KATP}) | f* | IC ₅₀ (nM) | a (% I _{KATP}) | f* |
| Kir6.2/SUR1: | | | | | | |
| wc | ≤0,5 (10 nM: 100 % Block) | 100 | - | ≤0,05 (1 nM: 100% Block) | 100 | - |
| i/o | 0,79 nM | 86 ± 1 | | 0,48 nM | 86 ± 0,2 | |
| Kir6.2/SUR2A: | | | | | | |
| alle | 15 nM | 86 ± 2 | >30 | 51 nM | 56 ± 3 | >1020 |
| schwache Responder | 26 nM | 81 ± 3 | >52 | 151 nM | 53 ± 4 | >3020 |
| starke Responder | 1,6 nM | 100 | >3 | 40 nM | 89 ± 1 | >800 |
| Kir6.1/SUR2B | 29 nM | 94 ± 2 | >58 | 56 nM | 100 | >1120 |

Bedingungen:

wc: Pipette: MgATP 1 (mM); MgGDP 0.27; Mg_{frei} 0.7, KGlu 132, EGTA (5); Bad: Na-HEPES + Gluc (11); 37 °C

i/o: Pipette = Bad: K-HEPES + Gluc (11); Perfusionslösung: K-Hepes + **MgUDP 0.3; MgATP 0.03**, Gluc 11, EGTA 5, 22 °C

* f = IC₅₀(Kir6.x/SUR2x; wc) / IC₅₀ (Kir6.2/SUR1; i/o)

4.1.1 Vergleich der Affinität der Sulfonylharnstoffe und Glinide zu Kir6.2/SUR1 (Pankreas) und Kir6.2/SUR2A (Myokard)

In der Abbildung 48 ist bei A+B-Liganden, verglichen mit reinen A-Liganden, ein Gewinn an Affinität zu Kir6.2/SUR1 und Kir6.2/SUR2A erkennbar. Diese Beobachtung ist für die Sulfonylharnstoffe der 2. Generation charakteristisch. Bereits seit langem existiert die Hypothese, dass die Erweiterung der Sulfonylharnstoffstruktur um ein zusätzliches, über ein Amid verknüpftes, lipophiles Zentrum eine affinitätserhöhende Wechselwirkung mit SUR-Strukturen möglich macht, die von kurzkettigen Sulfonylharnstoffen und Gliniden nicht erreicht werden (Brown und Foubister, 1984). Darauf basiert auch die Einteilung der Blocker in 3 Ligandklassen (A-, A+B-, und B-Liganden; siehe Einleitung). Es gibt Hinweise, dass bei der Ausbildung dieser Bindungstasche (= Bindungsregion B) die zytosolische Schleife Nr. 3 des SUR beteiligt ist (Aguilar-Bryan et al., 1995; Mikhailov et al., 2001; Zusammenfassung bei Bryan et al., 2005), eine Region die bei SUR1 und SUR2 weitgehende Sequenzhomologien aufweist (Bryan et al., 2005). Interaktionen der Blocker mit dieser SUR-Region sollten sich durch einen Verlust an Pankreasselektivität bemerkbar machen.

Trotzdem konnten wir in unseren Bindungsversuchen keine Unterschiede in der Pankreasselektivität zwischen A- und A+B-Liganden feststellen. Aus der Korrelationsanalyse in der Abbildung 48 geht hervor, dass A-Liganden und A+B-Liganden im Mittel eine Pankreasselektivität von 19 [13;28] ($10^{1,29 \pm 0,08}$) aufweisen. Die von Chachin et al., 2003 für Nateglinid beschriebene, sehr stark ausgeprägte Kir6.2/SUR1-Selektivität in der Potenz (Faktor ca. 1000) kann somit nicht alleine durch Unterschiede in der Affinität erklärt werden. Die Diskrepanz in der Nateglinid-Selektivität zwischen den elektrophysiologischen Daten und der Radioligandbindung deutet auf Unterschiede in der Signaltransduktion bei den Kanalsubtypen hin.

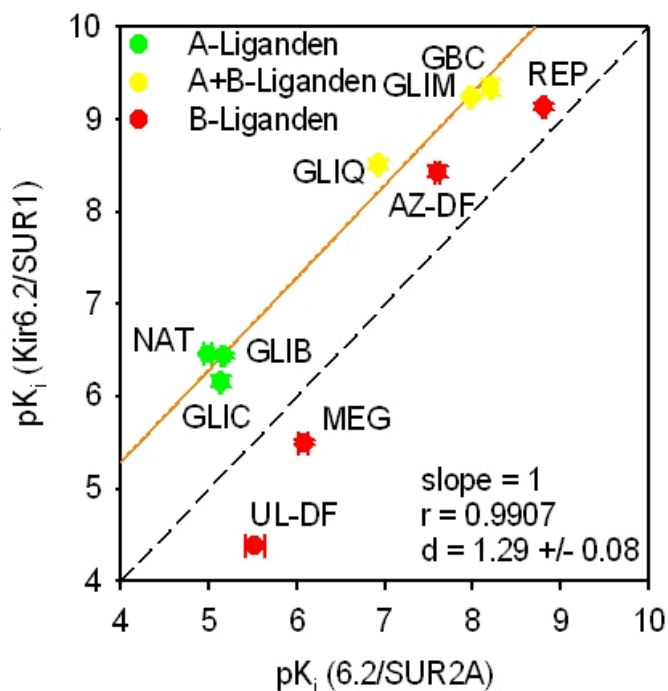
Bei der Erstellung der Korrelationsgeraden (Abb. 48) wurden die reinen B-Liganden nicht berücksichtigt. Aus der Lage der Substanzpunkte geht hervor, dass innerhalb der B-Ligand-Gruppe eine Differenzierung vorgenommen werden muss. Repaglinid und AZ-DF 265 wiesen eine zwar reduzierte, jedoch statistisch signifikante Kir6.2/SUR1-Selektivität auf, wohingegen Meglitinid und UL-DF9 stärker an Kir6.2/SUR2A banden. Ferner war die Affinität von Repaglinid und AZ-DF 265 zu beiden Rezeptorsubtypen insgesamt höher als die von Meglitinid und UL-DF9. Alle vier Verbindungen sind Benzoesäurederivate und verfügen als B-Liganden über die charakteristische Carboxamid-Struktur. Molekulare Modellierung zeigt jedoch darüber hinaus, dass bei Repaglinid und AZ-DF 265 ein Piperidino-Substituent aus der gemeinsamen Pharmakophore hinausragt (Hansen et al., 2002). Diese lipophile Teilstruktur (Grell et al., 1998) könnte mit weiteren, für Meglitinid und UL-DF9 unerreichbaren Rezeptorregionen interagieren und dadurch zu einer, in der Summe, stärkeren Piperidinoblocker-Bindung beitragen. Im nächsten Kapitel wird die Rolle des Kir6.2-N-Terminus bei der Ausbildung der Hochaffinitätsbindungsstelle für Repaglinid und AZ-DF 265 ausführlich diskutiert. Vorweg sei erwähnt, dass die Affinität von Repaglinid und AZ-DF 265 zum SUR1 durch die Koexpression mit Kir6.x stärker erhöht wurde, als die der restlichen K_{ATP} -Kanal-Inhibitoren.

Eine Quantifizierung des Effektes der Koexpression am wildtypischen SUR2A in Bindungsversuchen mit ^3H -GBC als Radioligand war nicht möglich (siehe Kap. .3.3.1.3). Frau Susanne Bieger konnte die erhöhte ^3H -GBC-Affinität zu der SUR2A(Y1206S)-Mutanten (Stephan et al., 2005) nützen und bestimmte in ihrer Promotionsarbeit den Einfluss der Koexpression mit

Abbildung 48 Selektivität der insulinotropen Verbindungen als Vergleich der Affinitäten (aufgetragen als pK_i -Werte aus der Tabelle 29) an Kir6.2/SUR1 und Kir6.2/SUR2A.

Die gestrichelte Winkelhalbierende stellt die Selektivitätsgrenze dar. Substanzen oberhalb der Linie sind Kir6.2/SUR1-selektiv, Substanzen unterhalb der Linie binden stärker an Kir6.2/SUR2A.

Die orange Korrelationsgerade wurde aus Punkten gebildet, die A- und A+B-Liganden repräsentieren. Reine B-Liganden wurden dabei nicht berücksichtigt. Die Steigung der Geraden wurde auf 1 festgesetzt. Es resultierte ein Korrelationskoeffizient von 0,9907 und ein Ordinatenabschnitt von $1,29 \pm 0,08$.



Kir6.2 auf die Bindungsstärke von Repaglinid und AZ-DF 265 zum SUR2A(Y1206S) (siehe Abb. 53). Für Repaglinid und AZ-DF265 zeigte sich in diesen Studien ein geringerer Effekt als am SUR1. Eine Übertragung dieser Erkenntnisse auf den Wildtyp ist nicht abwegig, da davon auszugehen ist, dass die Y1206S-Mutation keinen wesentlichen Einfluss auf die Bindung der Piperidino-Blocker an SUR2A ausübt (Hansen et al., 2002). Noch geringer fiel der Effekt der Koexpression mit Kir6.1 auf die Bindung der Piperidino-Glinide an SUR2B(Y1206S) (bestimmt von Herrn Felix Wolf; Dissertation in Vorbereitung). Aus dem kleineren Einfluss des Kir6.1 auf die Repaglinid-Bindung an SUR2B resultiert vermutlich auch die relativ niedrige Affinität dieser Substanz an den wildtypischen rekombinanten vaskulären K_{ATP} -Kanal ($K_i = 15$ nM; bestimmt von Herrn Marcus Winkler; Publikation in Vorbereitung). Umgekehrt liegt der Grund für die (begrenzte) Pankreasselektivität von Repaglinid in der ausgesprochen ausgeprägten Affinitätserhöhung durch Kir6.2 am SUR1. Die Pankreasselektivität für GBC und andere A bzw. A + B-Liganden hat dagegen ihren Ursprung in der stärkeren Bindung an SUR1 alleine, da die Koexpression mit Kir6.x deren Affinität zum SUR nur geringfügig verbessert.

4.1.2 Vergleich der Wirkung von Repaglinid und Glibenclamid an Kir6.2/SUR1 (Pankreas), Kir6.2/SUR2A (Myokard) und Kir6.1/SUR2B (Gefäßmuskel)

Repaglinid, der einzige B-Ligand der als orales Antidiabetikum zugelassen ist, band an Kir6.2/SUR1 nur geringfügig stärker (Faktor 2,1) als an Kir6.2/SUR2A. GBC, einer der am häufigsten verschriebenen insulinotropen Arzneistoffe zeigte hingegen in der Radioligandbindung eine dem Durchschnitt entsprechende Kir6.2/SUR1-Selektivität. Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse aus elektrophysiologischen Untersuchungen der Wirkung von Repaglinid und GBC auf die Kir6.2/SUR1-, Kir6.2/SUR2A- und Kir6.1/SUR2B-Kanäle (Kap. 3.1.2) diskutiert.

4.1.2.1 Wirkung von Repaglinid und Glibenclamid am pankreatischen K_{ATP} -Kanal (Kir6.2/SUR1)

Die Tabelle 30 zeigt, dass in der Ganzzellkonfiguration der Saugelektrodeentechnik bei möglichst physiologischen Bedingungen die Potenz von Repaglinid und GBC am Kir6.2/SUR1 am stärksten war. Verglichen mit Kir6.2/SUR2A wurden auch Unterschiede in der intrinsischen Effizienz sichtbar. Die präzise Quantifizierung der Selektivitätsfaktoren erwies sich jedoch als schwierig. Wegen der hohen Potenz von GBC und Repaglinid am rekombinanten pankreatischen K_{ATP} -Kanal, der Irreversibilität des Blocks und der langsamen Blockkinetik bei niedrigen Inhibitorkonzentrationen in Ganzzell-Studien konnten keine aussagekräftigen Konzentrations-Wirkungs-Kurven erstellt werden (Kap. 3.1.2.1.1). Dank der schnelleren Effektkinetik (s. Abb. 23, Kap. 3.1.2.1.2) gelang jedoch die Bestimmung der IC_{50} -Werte für die untersuchten Blocker am Kir6.2/SUR1 in der Inside-out-Konfiguration (Kap. 3.1.2.1.2). Repaglinid und GBC inhibierten hier den Kanal mit einer Potenz von 0,79 bzw. 0,48 nM. Die Übertragung dieser Daten auf die Ganzzell-Konfiguration ist jedoch nur eingeschränkt möglich. An ganzen Zellen konnten sättigende Repaglinid- und GBC-Konzentrationen die Kir6.2/SUR1-Ströme vollständig inhibieren, wohingegen am Patch nur ein mittlerer Block von ca. 86 % (Tab. 30) beobachtet wurde. Ferner wirkten die Blocker in Inside-out-Experimenten weniger potent als an ganzen Zellen (s. Tab 30). Diese Abweichungen resultierten wahrscheinlich aus Unterschieden in den Experimentbedingungen, die einen direkten Einfluss auf den metabolischen Zustand der K_{ATP} -Kanäle hatten. Vor allem die Beeinflussung der Blockerwirkung durch Mg-Nukleotide könnte in diesem Zusammenhang von entscheidender Bedeutung gewesen sein. Die Anwesenheit von MgADP soll den Sulfonylharnstoff-Block verstärken. Vermutet wird die Schwächung der aktivierenden Komponente der MgADP-Wirkung durch die Blockerpräsenz, bei unveränderter Kanalinhibierung durch MgADP (Gribble et

al., 1997c). Versuchstechnische Zwänge erforderten in unseren Studien unterschiedliche Simulationen der intrazellulären Mg-Nukleotidverhältnisse (wc: 1 mM MgATP + 0,27 mM MgGDP; i/o: 0,3 mM MgUDP + 0,03 mM MgATP). Ebenso sind Unterschiede in der Mg-Nukleotidempfindlichkeit vorstellbar, die sich beispielsweise aus Abweichungen in der Versuchstemperatur (wc: 37°C, i/o: 22°C), oder Zerstörung der zellulären Strukturen beim Herausreißen des Membranstücks in der Inside-out-Konfiguration ergaben. Somit können die IC₅₀-Werte für Repaglinid und GBC, die an Kir6.2/SUR1 in der Inside-out-Konfiguration bestimmt wurden nur als Orientierungsgröße bei der Schätzung der Pankreasselektivität dienen.

Angesichts der messtechnischen Schwierigkeiten verwundert es nicht, dass die Literatur sehr überschaubare Daten zu Whole-cell-Untersuchungen am Kir6.2/SUR1 bietet. Die sehr hohe Potenz von Repaglinid und GBC (89 bzw. 47 pM), die von Gromada et al., 1995 an nativen β -Zellen neugeborener Ratten beschrieben wurde, ist mit unseren Erkenntnissen gut vereinbar. Langsame Effektkinetik führte dagegen möglicherweise zur Unterbestimmung des Kir6.2/SUR1-Blocks bei niedrigen Repaglinid-Konzentrationen und dadurch zu einem vergleichsweise hohen IC₅₀-Wert (7,4 nM bei einem Hill-Koeffizienten von 2) an NaN₃-vergifteten *Xenopus* Oocyten (Dabrowski et al., 2001).

Die rekombinanten, kardiovaskulären K_{ATP}-Kanäle wurden von Repaglinid und GBC in der Ganzzellkonfiguration mit niedrigerer Potenz und reversibel inhibiert, so dass zuverlässige Effektcharakterisierung anhand Konzentrations-Wirkungs-Kurven erfolgen konnte (s. Kap. 3.1.2.2 und 3.1.2.3).

4.1.2.2 Wirkung von Repaglinid und Glibenclamid am K_{ATP}-Kanal des Herzmuskels (Kir6.2/SUR2A)

Bei der Analyse der Einzelversuche am Kir6.2/SUR2A empfiehlt sich eine Gruppierung in Zellen mit hoher und niedriger Repaglinid- bzw. GBC-Empfindlichkeit. Bei der Mehrzahl an Experimenten handelte es sich um Untersuchungen an schwachen "Respondern". Die Ströme in diesen Zellen konnten weder durch Repaglinid, noch durch GBC vollständig inhibiert werden. Auch die Potenz der beiden Blocker fiel hier geringer aus, als an Zellen mit hoher Empfindlichkeit (Tab. 30). Dieses Verhalten erinnert an Beobachtungen an nativen K_{ATP}-Kanälen des Herzmyokards nach metabolischer Vergiftung bzw. Hypoxie (Findlay, 1993; Krause et al., 1995; Venkatesh et al., 1991). Man kann also spekulieren, dass sich die Mehrzahl unserer untersuchten Zellen in einem "angegriffenen" metabolischen Zustand befand, in dem es intrazellulär zu einer Akkumulierung von MgADP und konsekutiv, in Übereinstimmung mit Erkenntnissen von Reimann et al., 2003, zur

Verschlechterung der Blockerempfindlichkeit kam. Beim Einsatz der Blocker als Diabetes-Typ2-Therapeutika könnte dies sogar als positiver Aspekt gewertet werden, wäre doch der hypoxische Herzmuskel, zum Beispiel infolge eines Infarktes, gegen unerwünschte K_{ATP} -Kanalinhibition geschützt. Problematisch wäre jedoch in dem Fall ein gezielter Einsatz Kir6.2/SUR2-selektiver Blocker (z.B. HMR 1883; Gögelein et al., 2000) als Antiarrhythmikum, über dessen potentiellen therapeutischen Nutzen bis heute kontrovers diskutiert wird (Überblick bei Quast et al., 2004). An intakten *Xenopus* Oocyten, die den rekombinanten Kir6.2/SUR2A exprimierten, beschrieben Dabrowski et al., 2001 eine vollständige Kanalinhhibition durch Repaglinid mit einer Potenz von 8,7 nM. In unseren Versuchen konnte nur bei etwa einem Viertel der Zellen die Kir6.2/SUR2A-Aktivität durch Repaglinid hochpotent und gänzlich aufgehoben werden. Interessanterweise haben wir auch bei den guten "Respondern" keinen vollen Block durch GBC erreichen können. Unter gleichen experimentellen Bedingungen konnten Hambrock et al., 2001 Kir6.2/SUR2B-Kanäle mit GBC komplett hemmen. Da SUR2A und SUR2B nur innerhalb der letzten 42 Aminosäuren voneinander abweichen, können die Unterschiede in der intrinsischen GBC-Effizienz auf die Abweichungen im Carboxy-Terminus zurückgeführt werden. Somit bestätigt sich Sakura et al., 1999 hinsichtlich der Betonung der Bedeutung des SUR-C-Terminus bei der Signaltransduktion in K_{ATP} -Kanälen.

4.1.2.3 Wirkung von Repaglinid und Glibenclamid am K_{ATP} -Kanal der Gefäßmuskulatur (Kir6.1/SUR2B)

Der rekombinante Kir6.1/SUR2B lässt sich sehr schwer in der Inside-out-Konfiguration untersuchen (Satoh et al., 1998). Entsprechend wenig ist über die Wirkung von Repaglinid und GBC an diesem K_{ATP} -Kanal bekannt. Russ et al., 1999 ermittelten für GBC in Ganzzellmessungen bei 37°C einen IC_{50} -Wert von 43 nM. Die Kanalaktivität wurde beim Einsatz hoher Blockerkonzentrationen vollständig aufgehoben. Diese Daten konnten durch unsere Kontrollmessungen voll bestätigt werden. Die Repaglinid-Potenz von 29 nM bei einer 94 %-iger Effizienz stellen die ersten verfügbaren Daten am vaskulären K_{ATP} -Kanal dar und deuten im Vergleich zum Kir6.2/SUR1 auf eine recht ausgeprägte Pankreas-Selektivität des Piperidino-Blockers hin (s. Tab. 30).

4.1.3 Vergleich der Bindung mit der Wirkung von Repaglinid und Glibenclamid an Kir6.2/SUR1 (Pankreas), Kir6.2/SUR2A (Myokard) und Kir6.1/SUR2B (Gefäßmuskel)

Vergleicht man die in Radioligandbindungsstudien ermittelte Affinität von Repaglinid und GBC an Kir6.2/SUR1, Kir6.2/SUR2A und Kir6.1/SUR2B (s. Tab. 29) mit der Potenz der beiden Verbindungen aus unseren elektrophysiologischen Studien (s. Tab. 30), so stellt man fest, dass die Übertragung der Blockerbindung in die Kanalschließung am besten am rekombinanten pankreatischen K_{ATP} -Kanal erfolgt. Hier stimmen die K_D - bzw. K_i -Werte aus der Bindung sehr gut mit den IC_{50} -Werte aus Untersuchungen in der Inside-out-Konfiguration bei 22°C überein (Repaglinid: $K_i = 0,72$ nM vs. $IC_{50} = 0,79$ nM; GBC: $K_D = 0,45$ nM vs. $IC_{50} = 0,48$ nM). Nach unseren Erkenntnissen muss jedoch die Potenz von Repaglinid und GBC in der Ganzzell-Konfiguration bei 37°C, also bei Bedingungen die den Gegebenheiten in Bindungsstudien (Ganzzellversuche bei 37°C) mehr entsprechen, noch höher liegen (s. Kap. 3.1.2.1). Möglicherweise genügt die Bindung von weniger als 4 Blockermolekülen pro SUR1-Tetramer um eine Kanalinhibierung zu induzieren. Am Kir6.2/SUR2A ist dagegen die Transduktion am schlechtesten, wobei jedoch die Unterschiede in der Blockerempfindlichkeit beachtet werden müssen (s. Kap. 3.1.2.2). Kir6.1/SUR2B nimmt eine Zwischenstellung ein. Die Konzentrations-Wirkungs-Kurven (Repaglinid: $IC_{50} = 29$ nM; GBC: $IC_{50} = 56$ nM) liegen bei diesem Kanalsubtyp etwa Faktor 2 rechts der Konzentrations-Bindungs-Kurven (Repaglinid: $K_i = 15$ nM GBC: $K_D = 32$ nM; Daten von Marcus Winkler).

Die Rangfolge der K_{ATP} -Kanäle in der Signalübertragung entspricht der Rangfolge in der Blockereffizienz. Es ist davon auszugehen, dass die Unterschiede in der Transduktion, ähnlich wie die Abweichungen in der Blockereffizienz, zu einem Großteil auf Differenzen im Nukleotideinfluss auf die Wechselwirkungen der Blocker mit den drei Kanalsubtypen zurückzuführen sind. Speziell MgATP verstärkt die Kanalhemmung durch Sulfonylharnstoffe und Glinide am Kir6.2/SUR1 (Gribble et al., 1998b), hat jedoch keinen Einfluss auf den Repaglinid-Block (Dabrowski et al., 2001), bzw. schwächt gar den GBC-Block am Kir6.2/SUR2A (Gribble et al., 1998b). Laut Reimann et al., 2003 sind die Transmembranhelices 8-11 und die anschließenden 65 Aminosäuren bei diesen Effekten ausschlaggebend.

4.1.4 Bedeutung der Selektivitätsdaten für den klinischen Einsatz von Repaglinid und Glibenclamid

Aus unseren Ergebnissen (Tab. 29 und 30) geht hervor, dass sowohl Repaglinid wie auch GBC an den rekombinanten Kir6.2/SUR1 am affinesten binden und ihn am potentesten inhibieren. Zusätzlich zeigt sich am Kir6.2/SUR2A und im Fall von Repaglinid geringfügig auch am Kir6.1/SUR2B eine verminderte Blockeffizienz. In Anbetracht der pharmakokinetischen Daten aus der Tabelle 31 erscheint die Kir6.2/SUR1-Selektivität für Repaglinid hoch genug um therapeutische Sicherheit zu gewährleisten, zumal die Plasmahalbwertszeit dieses Glinids und somit auch die Exposition des Körpers gegenüber relevanten Repaglinid-Dosen relativ kurz ist (Goodmann & Gilman's, 2001). Geeignete klinische Langzeitstudien müssen jedoch diese Folgerung erst bestätigen. Die Pankreasselektivität ist für GBC stärker ausgeprägt, so dass aus molekularpharmakologischer Sicht beim Einsatz dieses Sulfonylharnstoffs in der klinischen Praxis keine sicherheitsrelevanten Effekte am kardiovaskulären System zu erwarten sind. In der UKPDS-Studie wurde ebenfalls keine erhöhte, kardiovaskulär bedingte Mortalität während der GBC-Therapie beobachtet (Autoren der UKPDS-Studie, 1998). Dies galt auch für die Patientengruppe mit akutem Myokardinfarkt (Stevens et al., 2004).

Tabelle 31 Ausgewählte pharmakokinetische Daten von Repaglinid und Glibenclamid aus Goodmann & Gilman's, 2001

| Substanz | Dosis; oral als Tbl. (mg) | C _{MAX} (nM) | Eiweißbindung (%) | t _{1/2} (h) |
|--------------|---------------------------|-----------------------|-------------------|----------------------|
| Repaglinid | 4 mg | 104 | 97,4! | 0,8 ± 0,2 |
| Glibenclamid | 3 mg (mikronisiert) | 215 | 99,8! | 4 ± 1 |

4.2 Einfluss der Koexpression mit Kir6.x und dessen N-Terminus-Mutanten auf die K_{ATP} -Kanal-Inhibitor-Bindung an SUR1

Zu den Besonderheiten der K_{ATP} -Kanäle gehört die Kanalkomplexbildung zwischen strukturell nicht verwandten Kir und SUR zu einem Heterooktamer. In diesem Komplex werden die TMD0 samt CL3 des SUR und der Amino-Terminus des Kir in enger Nachbarschaft vermutet (Mikhailov et al., 2005; Babenko, 2005). Diese Region kristallisiert sich zudem, bezogen auf die vielfältigen Wechselwirkungen zwischen den Untereinheiten, zu einem "Hot Spot" heraus. So kann die TMD0

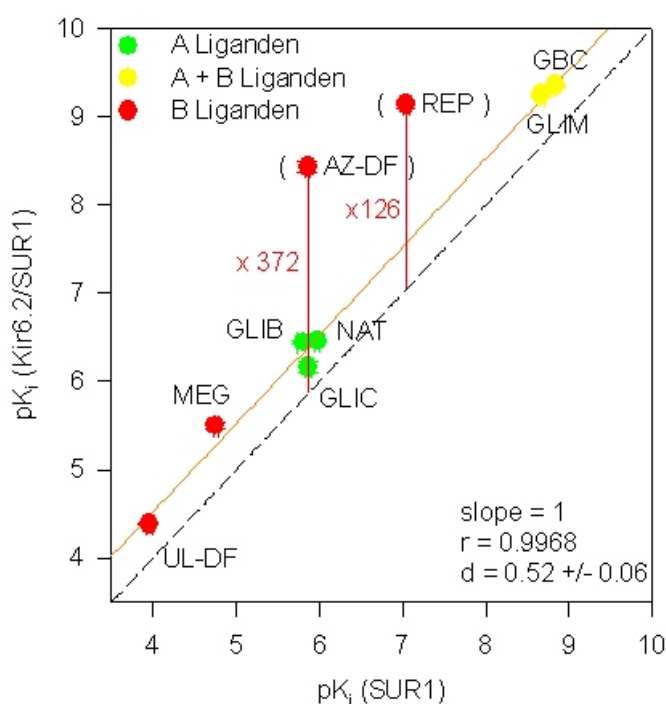
Abbildung 49 Einfluss der Koexpression mit Kir6.2 auf die Bindung der SU und Glinide an SUR1 in intakten Zellen.

Die pK_i -Werte am SUR1 (alle Daten von Frau Susanne Bieger) wurden auf der Abszisse aufgetragen; die Werte am Kir6.2/SUR1 (aus 3.1.1) auf der Ordinate.

Die gestrichelte Winkelhalbierende stellt die "Null-Effekt-Linie" dar.

Die orange Linie repräsentiert die lineare Korrelation (Korrelationskoeffizient = 0,9968) der Werte aller Substanzen mit Ausnahme der Piperidino-Verbindungen Repaglinid und AZ-DF. Sie hat die festgesetzte Steigung 1 und den y-Achsenabschnitt von $0,52 \pm 0,06$.

Die pK_i -Werte von Glimperid und Gliclazid am Kir6.2/SUR1 wurden von Frau Petra Kühner bestimmt und sind hier der systematischen Vollständigkeit wegen gezeigt.



+ CL3 stabil mit dem Kir assoziieren und dabei die Aktivität der Pore modulieren (Babenko und Bryan, 2003). Interessanterweise ist diese SUR-Region auch an der Bindung der Kanal-Inhibitoren (A + B -und B-Liganden; Übersicht in Bryan et al., 2005; Quast et al., 2004) beteiligt. Ohne die ersten 14 Aminosäuren des Kir6.2-N-Terminus hingegen funktioniert die Transduktion der Sulfonylharnstoff-Bindung in die Kanal-inhibition nicht (Reimann et al., 1999; Babenko et al., 1999). Es überrascht daher nicht, dass die Koexpression mit Kir 6.2 auch die Bindung der K_{ATP} -Kanal-Blocker an den SUR1 beeinflusst.

4.2.1 Koexpression mit Kir6.2 und Kir6.1

Wie der Abbildung 49 entnommen werden kann, wurde die Affinität aller von uns untersuchten Blocker zum SUR1 durch die Anwesenheit von Kir6.2 im Mittel um den Faktor $10^{0,52 \pm 0,06} = 3,3 [2,5;4,4]$ erhöht. Ein vergleichbarer Effekt wurde von Russ et al., 1999 für GBC am SUR2B nach Koexpression mit Kir6.1 beschrieben. Gesondert ist der Einfluss der Koexpression im Fall von Repaglinid und (-)-AZ-DF 265 zu betrachten, deren Affinität viel stärker stieg (x 126 bzw. x 372).

Weder die Art der Rezeptorpräparation noch MgATP hatten einen wesentlich Einfluss auf die Affinitätserhöhung infolge der Koexpression. An Membranen in Abwesenheit von MgATP beobachteten wir für GBC und Repaglinid ähnliche Ausmaße des Effektes wie an metabolisch intakten Zellen (vergleiche Abb. 50a und b) mit einer geschätzten, zytosolischen ATP-Konzentration zwischen 3 und 5 mM (Ashcroft, 1988). Es ist bemerkenswert, dass die Kir6.x/SUR1-Affinität von GBC und Repaglinid an Zellen generell niedriger war als in Membranversuchen ohne MgATP. In Übereinstimmung mit den Erkenntnissen von Schwanstecher et al., 1991 und Hambrock et al., 2002a wird dieses Phänomen als Konsequenz der MgATP / MgADP-Bindung an die NBFs des SUR1 in intakten Zellen gedeutet. Diese führt zur Verschlechterung der Blocker-Bindung im Zuge einer negativ allosterischen Wechselwirkung zwischen den Nukleotid- und Blocker-Bindungsregionen (Ueda et al., 1999, Hambrock et al., 2002a).

Auch die Komplexbildung zwischen Kir6.1 und SUR1 wirkte sich bei GBC und Repaglinid affinitätserhöhend aus (siehe Abb. 50a), jedoch signifikant geringer als nach Koexpression des SUR1 mit Kir6.2. Die Abhängigkeit des Koexpressionseffektes vom Kir6.x-Subtyp wurde für GBC von Hambrock et al., 2001 ebenfalls am SUR2B in ganzen Zellen beschrieben.

Aus diesen Ergebnissen kann somit abgeleitet werden, dass die Präsenz von Kir6.x für die Ausbildung der Hochaffinitätsbindungsstellen für Blocker am SUR1 essentiell ist. Es gilt vor allem für die atypischen B-Liganden Repaglinid und (-)-AZ-DF 265 und unterstreicht so die Sonderstellung dieser Verbindungen. Hansen et al., 2002; postulierten für Repaglinid und die Sulfonylharnstoffe unterschiedliche Bindungsregionen, da die A-Ligand- bzw. A + B-Ligand-, nicht aber die Repaglinid-Affinität wesentlich durch die S1237Y-Mutation am SUR1 erniedrigt werden konnte. Auf der anderen Seite zeigten die Autoren in der gleichen Publikation, dass ^3H -Repaglinid vollständig durch Tolbutamid und Nateglinid aus der Bindung verdrängt werden konnte, ein Hinweis auf die Überlappung der Bindungsregionen (siehe Modell der Blocker-Bindungstaschen in Kap. 1.2.8.1), oder deren allosterische Kopplung. In der Strukturüberlappung von Repaglinid und GBC (Fig. 6B in Hansen et al., 2002) ragt der Piperidino-Substituent aus dem, den beiden

Verbindungen gemeinsamen lipophilen Zentrum B (siehe Einleitung) heraus. Auch (-)-AZ-DF 265, ein K_{ATP} -Kanal-Blocker, bei dem wir ebenfalls einen großen Effekt der Koexpression beobachtet haben, verfügt über eine gleichpositionierte Piperidinogruppe. Repaglinid-Analoga ohne diesen Rest fehlt die hypoglykämische Aktivität (Grell et al., 1998). Es ist daher naheliegend die Ursache für die Sonderstellung von Repaglinid und (-)-AZ-DF 265 bei der Affinitätserhöhung durch die Koexpression in der Präsenz des Piperidino-Substituenten zu vermuten.

4.2.2 Bedeutung des N-Terminus von Kir6.2 für die Bindung der SU und Glinide an den Kir6.2/SUR1-Kanal

Mindestens zwei alternative Wege der Einflussnahme des Kir6.x auf die Blocker-Bindung sind denkbar. Zum einen könnten Kir6.x-Sequenzen selbst einen wesentlichen Teil der Bindungsregion ausmachen. Zum anderen könnte die porenbildende Untereinheit im Zuge der Kanalkomplexbildung die Konformation des SUR verändern und dadurch die Bildung einer hochaffinen Bindungsstelle am SUR selbst induzieren. Möglicherweise kann die Beschaffenheit der entscheidenden Kir6.x-Region Aufschlüsse liefern, welche dieser Alternativen plausibler erscheint. Der große Effekt der Koexpression auf die Affinität der Piperidino-Blocker erwies sich bei der Identifikation dieser Kir-Region als hilfreiches Werkzeug. Den entscheidenden Hinweis lieferten uns die Arbeiten von Reimann et al., 1999 und Babenko et al., 1999 mit der Beobachtung, dass der Kir6.2-Amino-Terminus, der im K_{ATP} -Kanalkomplex in der Nähe der für die Blockerbindung wichtigen zytosolischen Schleife Nr. 3 (CL3) vermutet wird, essentiell für die Transduktion der Blocker-Bindung in die Kanalschließung ist. So konnte zum Beispiel Tolbutamid den Kir6.2 N14/SUR1-Kanal nicht blocken (Reimann et al., 1999).

Unsere Ergebnisse zeigen nun, dass Modifikationen des Kir6.2-N-Terminus nicht nur die Transduktion, sondern auch direkt die Bindung von GBC, Repaglinid und (-)-AZ-DF 265 an ganzen Zellen beeinflussen (Abb. 50a). Der am N-Terminus um 10 bzw. 20 Aminosäuren verkürzte Kir6.2, koexprimiert mit SUR1, war nicht mehr in der Lage, die Affinität der untersuchten Blocker zu erhöhen. Weitere Mutationen in dieser Region (N5; RK,4,5,A,A) reduzierten teilweise die

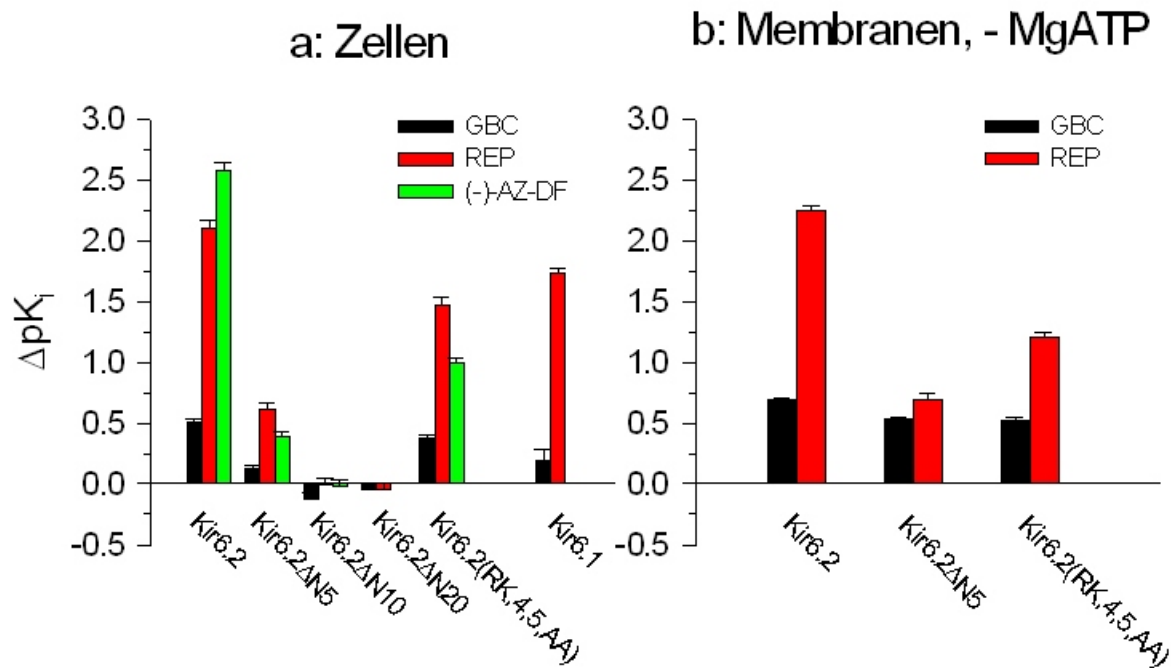


Abbildung 50 Einfluss der Koexpression mit Kir6.x auf die Affinität des SUR1 zu Glibenclamid, Repaglinid und (-)-AZ-DF 265 an intakten Zellen (a) bzw. zu GBC und Repaglinid an Membranen ohne MgATP (b).

Der Effekt wird als $\Delta pK_i = pK_i(\text{Kir6.x-Variante/SUR1}) - pK_i(\text{SUR1})$ dargestellt. Dabei ist die Änderung der Bindungsaffinität (ΔpK_i) der Änderung der Gibbs'schen freien Enthalpie (ΔG) direkt proportional, denn $\Delta G = 1,43 \Delta pK_i$ (kcal/mol) (aus $\Delta G = R \cdot T \cdot \ln K_i = -2,3 \cdot R \cdot T \cdot pK_i$)

Auswirkungen der Koexpression. Qualitativ ähnliches wurde auch an Membranen in Abwesenheit von MgATP beobachtet (Abb. 50b). Im Falle von GBC limitiert das geringe Effektausmaß die quantitative Aussagekraft. Nichtsdestotrotz zeigte sich bei diesem Sulfonylharnstoff der gleiche Trend wie bei Repaglinid und (-)-AZ-DF 265. Unter den Piperidino-Blockern wurde die (-)-AZ-DF 265-Affinität durch die Koexpression des SUR1 mit dem wildtypischen Kir6.2 am stärksten erhöht. Dieser Effekt jedoch war am empfindlichsten gegenüber Veränderungen am Amino-Terminus der porenbildenden Untereinheit.

Die N-Termini der beiden Kir-Subtypen 6.2 und 6.1 sind weitgehend homolog (Abb. 51). Wir vermuten daher stark, dass hinsichtlich der wahrgenommenen Auswirkungen der Koexpression des SUR1 mit Kir6.1 auf die Bindung der eingesetzten Blocker, ebenso der Kir6.1-N-Terminus von entscheidender Bedeutung ist. Die leichten subtypabhängigen Unterschiede im Koexpressionseffekt sind möglicherweise eine Folge der Abweichungen in den ersten 20 Aminosäuren, jedoch kann ein Einfluss weiter entfernter Kir-Regionen nicht ausgeschlossen werden.

Abbildung 51 Vergleich der ersten 20 Aminosäuren des humanen Kir6.2 und Kir6.1.

| | | | |
|----------|---------|----------|--------|
| | 5 | 10 | 20 |
| | | | |
| hKir6.2: | MLSRKGI | IPEEYVLT | R-LAE |
| hKir6.1: | MLARKSI | IPEEYVLT | ARIAAE |
| | | | |
| | 5 | 10 | 20 |

Gleiche Aminosäuren

Verschiedene Aminosäuren

Die N-Terminus-Mutanten sind weiterhin im Stande, mit dem SUR1 Heterooktamere zu bilden, da sie als Öffner- und ADP-aktivierbare Kanäle an der Zelloberfläche exprimiert werden (Reimann et al., 1999). Somit ist nicht nur die Kanalkomplexbildung an sich, sondern zusätzlich die Anwesenheit eines intakten Kir6.x-Aminoterminus für die Ausbildung der Hochaffinitätsbindungsstelle für die K_{ATP} -Kanal-Inhibitoren und hier vor allem der Piperidino-Substanzen erforderlich. Weitgehend unbekannt bleibt dabei die genaue Lokalisation der Kanal-Region, die mit dem Piperidinring von Repaglinid bzw. (-)-AZ-DF 265 unmittelbar wechselwirkt. Ferner ist unklar, ob der Kir6.x-N-Terminus direkt oder indirekt (über die Modulation der SUR1- oder einer weiter entfernten Kir-Konformation) an dieser Region beteiligt ist.

Der Piperidinrest liegt bei physiologischen pH-Verhältnissen größtenteils nicht protoniert vor, ist also Bestandteil einer komplexen, lipophilen Teilstruktur der atypischen B-Liganden (Grell et al., 1998). Somit ist anzunehmen, dass die Bindungstasche im K_{ATP} -Kanal für die Piperidino-Gruppe ebenfalls einen lipophilen Charakter haben muss, um den Substituenten über hydrophobe Wechselwirkungen binden zu können. Die ersten fünf N-terminalen Aminosäuren des Kir6.2 (M L S R K) sind bis auf Leucin polar oder geladen. Trotzdem gehen nach der Entfernung dieser Reste im Schnitt über 70 % des Koexpressionseffektes verloren. Die Neutralisierung von Arginin und Lysin in Position 4 und 5 des Kir6.2 durch Alanin (Kir6.2 RK,4,5,AA) erhöht zwar die Lipophilie des N-Terminus, schwächt aber die Blockerbindung. Diese Beobachtungen sprechen eher gegen einen direkten Kontakt des Kir6.2-N-Terminus mit der Piperidinogruppe. Wahrscheinlicher erscheint eine

Protein-Protein-Wechselwirkung (Kir-Kir oder Kir-SUR), welche die Formation einer hochaffinen Bindungstasche induziert. Eine endgültige Festlegung erlauben die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse jedoch nicht.

Im Januar 2005 wurden von Hansen et al., 2005 Daten publiziert, die mit einigen Erkenntnissen unserer Arbeitsgruppe übereinstimmten. Auch diese Autoren beobachteten an Membranen in Abwesenheit von MgATP eine starke Erhöhung der Repaglinid-Affinität nach Koexpression von SUR1 mit Kir6.2. Dieser Effekt verschwand infolge der Kürzung des Kir6.-N-Terminus um 14 Aminosäuren.

4.3 Einfluss der Mutation Y1206S auf die Ligandbindungseigenschaften des Sulfonylharnstoffrezeptors SUR2A und des K_{ATP} -Kanals Kir6.2/SUR2A

Die im Kapitel 3.3 vorgestellten Radioligandbindungsstudien am Sulfonylharnstoffrezeptor SUR2A verfolgten drei Hauptziele: die Untersuchung der Bindungseigenschaften von K_{ATP} -Kanal-Modulatoren an SUR2A und an der SUR2A(Y1206S)-Mutante, die Spezifizierung der Koexpressionseffekte mit Kir6.x auf die Modulator-Bindung und die Analyse der Wechselwirkungen zwischen Blockern und Öffnern am Beispiel von GBC und P1075. Lediglich die letzten 42 Aminosäuren des SUR2A weichen von der Struktur der SUR-Spleißvariante 2B ab. Ein Vergleich der Untersuchungsergebnisse aus dem Kapitel 3.3 mit Erkenntnissen über den SUR2B (Hambrock et al., 2001; Russ et al., 1999) trägt somit zum Verständnis der Funktion der carboxy-terminalen Aminosäuren des SUR2 bei.

4.3.1 Bindungseigenschaften von SUR2A und Kir6.2/SUR2A; Auswirkungen der Y1206S-Mutation am SUR2A

Die Bestimmung der GBC Affinität zum SUR2A alleine war ausschließlich in homologer ^3H -GBC-Verdrängung an HEK293-Zellmembranen in Abwesenheit von MgATP möglich. Bei diesen Bedingungen band GBC an SUR2A mit einer K_D von 20 nM. Durch die Anwesenheit von MgATP in Versuchen an SUR2A-Membranen wie auch an intakten, SUR2A exprimierenden HEK293-Zellen verschlechterte sich die spezifische ^3H -GBC-Bindung. Daraus resultierte ein ungünstiges Verhältnis zwischen der spezifischen SUR2A-Bindung und den niedrigaffinen aber zahlreichen unspezifischen Bindungsstellen, wodurch präzise Affinitätsbestimmungen verhindert wurden. Die Bemühungen, über bessere SUR2A-Expression in HEK 293-Zellen (z.B durch zusätzliche transiente Transfektion einer permanenten SUR2A-Zelllinie), diese Entwicklung zu kompensieren, waren nicht erfolgreich.

Messungen am SUR2B (Löffler-Walz et al., 2002) konnten zeigen, dass die Verschlechterung der spezifischen ^3H -GBC-Bindung nicht durch eine Verminderung der Affinität erklärt werden kann. Aus Membranversuchen, die sowohl mit, als auch ohne MgATP durchgeführt wurden, ergab sich für GBC ein K_i -Wert von 22 nM. Vermutlich wurde dagegen die Zahl der sichtbaren Bindungsstellen durch MgATP reduziert. Eine Bestätigung dieser Hypothese könnte mittels B_{MAX} -Bestimmung in Sättigungsversuchen erfolgen. Die relativ niedrige Affinität des Radioliganden zu den beiden wildtypischen SUR2-Isoformen, verbunden mit der hohen unspezifischen Bindung, reduzieren jedoch die Aussagekraft dieses Experiment-Typus entscheidend.

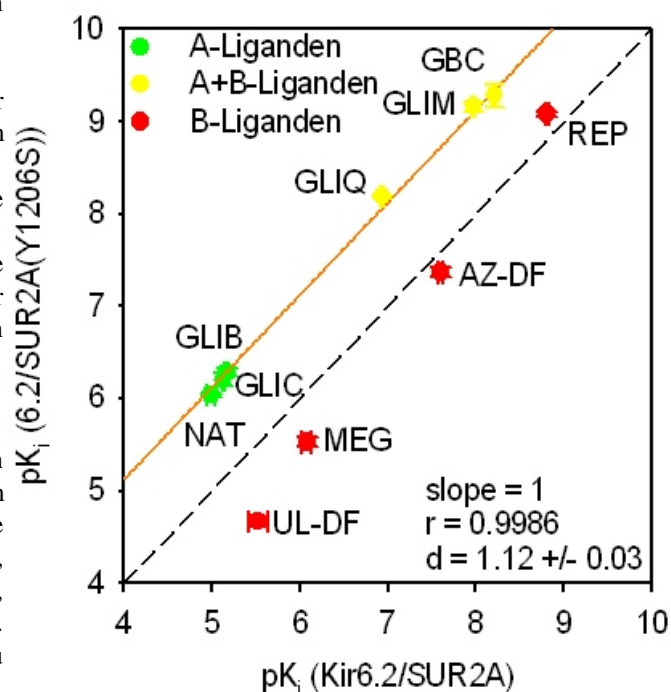
Die ^3H -GBC-Affinität zum SUR2A im Membranversuchen wurde durch Serin in Position 1206 ca. 5 fach erhöht (Ergebniss der Arbeit von Frau Stauß, publiziert in Stephan et al., 2005). Daher wurden Sättigungsexperimente möglich, in denen sich die ^3H -GBC-Affinität als unabhängig von der MgATP-Präsenz erwies. 1 mM MgATP reduzierte in der Tat die maximale Bindungskapazität (B_{MAX}) um etwa 50 % (Daten von Herrn Holger Felsch). Qualitativ Ähnliches wurde auch am SUR2B(Y1206S) beobachtet (Hambrock et al., 2002a; Löffler-Walz et al., 2002). Interessanterweise konnte diese Empfindlichkeit der Blockerbindung gegen den drosselnden MgATP-Einfluss in beiden Fällen durch die Koexpression mit Kir6.2 vermindert werden.

Abbildung 52 Einfluss der Y1206S-Mutation im SUR2A auf die Bindung der SU und Glinide an Kir6.2/SUR2A in Ganzzellversuchen.

Die pK_i -Werte am Kir6.2/SUR2A wurden auf der Abszisse aufgetragen; die Werte am Kir6.2/SUR2A(Y1206S) auf der Ordinate. Die gestrichelte Winkelhalbierende stellt die "Null-Effekt-Linie" dar.

Die orange Linie repräsentiert die lineare Korrelation (Korrelationskoeffizient = 0,9986) der Werte aller Substanzen mit Ausnahme der reinen B-Liganden. Sie hat die festgesetzte Steigung 1 und den y-Achsenabschnitt von $1,12 \pm 0,03$.

Bis auf Gliquidon, Gliclazid und UL-DF9 (Daten von P. Kühner) wurden die Versuche am Kir6.2/SUR2A im Kapitel 3.1.1 vorgestellt. Die pK_i -Werte am Kir6.2/SUR2A(Y1206S) stammen, mit Ausnahme von GBC (s. Kap. 3.3.1.3), Glimperid (s. Kap. 3.3.4.1) und Meglitinid (s. Kap. 3.3.4.2) aus der Dissertation von Frau Susanne Bieger.



Die Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe erlauben eine Analyse der Auswirkungen der Y1206S-Mutation im SUR2A auf die Bindung der K_{ATP} -Kanal-Inhibitoren verschiedener Klassen an Kir6.2/SUR2A in Versuchen an intakten HEK293-Zellen. Die Auftragung der pK_i -Werte am

Kir6.2/SUR2A gegen die Daten aus Experimenten am Kir6.2/SUR2A(Y1206S) befindet sich in der Abbildung 52. Bei der Beurteilung der Mutationseffekte wird die Notwendigkeit der Datengruppierung offenkundig. Die A- und A + B-Liganden korrelieren sehr gut miteinander (orange Korrelationsgerade). Im Mittel ergibt sich eine Affinitätssteigerung durch die Mutation von Faktor $10^{1,12 \pm 0,03} = 13$ [11;15]. In dieser Konfiguration fiel der Mutationseffekt signifikant stärker aus als am SUR2A alleine, in Membranversuchen bei fehlendem MgATP. Dort wurde die GBC-Affinität zum SUR2A durch die Mutation etwa 5-fach erhöht (Stephan et al., 2005). Die Bindung der Piperidino-Glinide Repaglinid und (-)-AZ-DF265 war dagegen von der Mutation unbeeinflusst. Darauf deutet die Nähe der Substanzpunkte zur gestrichelten "Null-Effekt-Linie" in der Abbildung 52. Die typischen B-Liganden Meglitinid und UL-DF9 verloren sogar an Bindungsstärke. Interessanterweise näherten sich die K_i -Werte von Meglitinid und UL-DF9 aus den Versuchen an Kir6.2/SUR2A(Y1206S) (3,0 bzw. 21,4 μM) den Affinitäten dieser Verbindungen zum Kir6.2/SUR1 von 3,2 μM bzw. 41,7 μM (siehe Kap. 3.1.1). An dieser Stelle sei nochmals betont, dass sich bei SUR2 ein Tyrosin in Position 1206, bei SUR1 jedoch in korrespondierender Position 1237 Serin befindet und essentiell bei der Bindung der A- und A + B-Liganden ist (Ashfield et al., 1999; Hansen et al., 2002). Gut vorstellbar ist, dass das im Vergleich zu Tyrosin verhältnismäßig kleine Serin eine günstige Ausrichtung der A- und A + B-Liganden in ihrer Bindungstasche fördert. Ob die Aminosäure direkt an der Ligandbindung beteiligt ist, bleibt ungewiss. Eine direkte Beteiligung dieser Aminosäure an der Bildung der Bindungsstelle von den Piperidino-Glinden Repaglinid und (-)-AZ-DF265 gilt als unwahrscheinlich (Hansen et al., 2002). Die Reduktion der Kir6.2/SUR2A-Selektivität von Meglitinid und UL-DF9 durch die Y1206S-Mutation zeigt jedoch, dass diese Region in der zytosolischen Schleife Nr.8 des Sulfonylharnstoffrezeptor einen nicht zu ignorierenden Einfluss auf die Bindungseigenschaften der charakteristischen B-Liganden ausübt. Wir haben es bei Y 1206 (S 1237 in SUR1) offensichtlich mit einer SUR-Aminosäure zu tun, deren Einfluss sich auf das gesamte Protein erstreckt und möglicherweise außer Blockerbindung auch Wechselwirkungen des SUR mit dem Zytoskelett und den Nukleotiden beeinträchtigt (Hambrock et al., 2001).

Im Gegensatz zu GBC wird die Hochaffinitätsbindung der Öffner durch die Präsenz von hydrolysierbaren Nukleotiden erst möglich (Schwanstecher et al., 1992b; Schwanstecher et al., 1998; Quast et al., 1993; Hambrock et al., 1998). Die P1075-Affinität zum SUR2A in Membranen lag im Bereich um 20 nM und stimmte somit mit bereits früher publizierten Daten überein (Hambrock et al., 1999). Für SUR2B wurde eine 2-5 mal höhere Affinität zu dem Cyanoguanidin-Öffner beschrieben (Hambrock et al., 1999; Felsch et al., 2004). Diese leichte SUR2B-Selektivität, beobachtet auch bei anderen Öffnern (Hambrock et al., 1999), muss als eine Folge der

Abweichungen in der C-terminalen Region der beiden SUR2-Isoformen angesehen werden (s. Kap. 1.2.3).

Nach der Y1206S-Mutation des SUR2A blieb die P1075-Bindung im Wesentlichen unverändert, unabhängig davon ob die Messungen ausschließlich an der regulatorischen Untereinheit, oder am vollständigen Kir6.2/SUR2A(Y1206S)-Kanal getätigt wurden (siehe Tab. 20). Auch in diesem Punkt gibt es zwischen den SUR2-Isoformen weitgehend übereinstimmende Ergebnisse (Hambrock et al., 2001), so dass unter Einbeziehung der ähnlichen Mutationseffekte auf die Blockerbindung an SUR2A und SUR2B, der Rückschluss erlaubt ist, dass der Carboxyterminus des SUR2 die Folgen der beschriebenen Tyrosinsubstitution durch Serin auf die Bindung der K_{ATP} -Kanal-Modulatoren an SUR2 nicht wesentlich beeinflusst.

4.3.2 Effekt der Koexpression mit Kir6.x auf die Bindungseigenschaften des SUR2A und SUR2A(Y1206S)

Die Affinitätserhöhung des SUR1 zu den K_{ATP} -Kanal-Inhibitoren, insbesondere der Piperidino-Glinide, durch die Koexpression mit Kir6.x und die entscheidende Rolle des Kir6.2-N-Terminus im Bezug auf dieses Phänomen wurde in dieser Arbeit bereits diskutiert (Kap. 4.2). Die GBC-Affinität zum SUR2B und SUR2B(Y1206S) wurde infolge der Koexpression mit Kir6.x ebenfalls erhöht, jedoch nur in Ganzzellversuchen (Russ et al., 1999; Hambrock et al., 2001). Betrachtet man den Wildtyp, so gilt Ähnliches auch am SUR2A. Obwohl eine genaue Bestimmung der GBC-Affinität an Kir6.2/SUR2A in Membranversuchen auch ohne MgATP nicht möglich war, muss man, aufgrund der vorliegenden Daten (Kapitel 3.3.1.2), doch davon ausgehen, dass die Dissoziationskonstante am SUR2A (20 nM) durch die Koexpression mit Kir6.2 nicht wesentlich erniedrigt wurde. An intakten Zellen konnte die GBC-Affinität zum vollständigen rekombinanten K_{ATP} -Kanal des Herzmuskels ermittelt werden (6,2 nM), nicht jedoch die zur regulatorischen Untereinheit SUR2A alleine (s.o.). Somit ist eine präzise Quantifizierung des Effektes der Koexpression nicht möglich. Die Tatsache jedoch, dass die Amplitude der spezifischen ^3H -GBC-Bindung in Experimenten am transient exprimierten Kir6.2/SUR2A größer war als am permanent exprimierten SUR2A, ist als Hinweis auf eine erhöhte Radioligand-Affinität zu werten. Zusätzliche Faktoren, die in der Membranpräparation fehlen, sind offensichtlich beim Zustandekommen des Koexpressionseffektes notwendig. Das intakte Zytoskelett gehört vermutlich nicht dazu, da seine Beeinträchtigung durch Cytochalasin D weder die Bindung noch die Wirkung am Kir6.2/SUR2B und Kir6.2/SUR2B(Y1206S) beeinflusst (Hambrock et al., 2001).

Anders als am SUR2B(Y1206S) und insofern überraschend wurde von Frau Eva Stauß

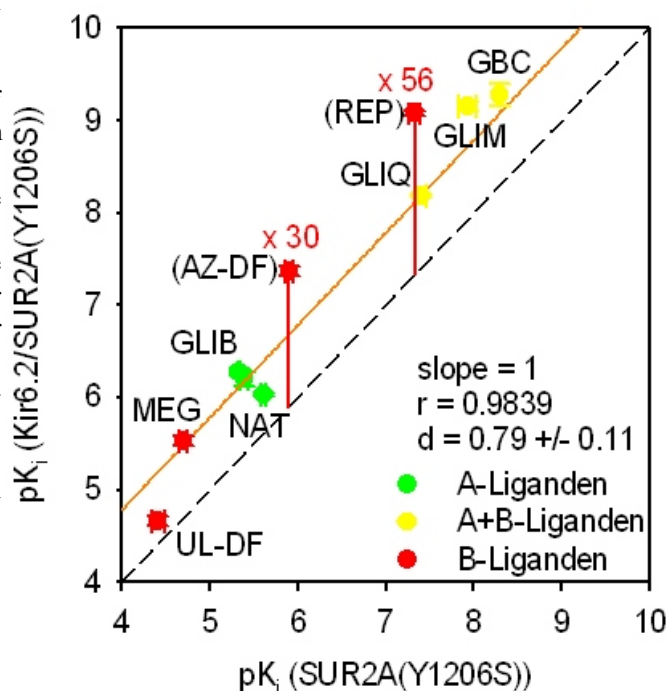
Abbildung 53 Einfluss der Koexpression mit Kir6.2 auf die Bindung der SU und Glinide an SUR2A(Y1206S) in intakten Zellen.

Die pK_i -Werte am SUR2A(Y1206S) wurden auf der Abszisse aufgetragen; die Werte am Kir6.2/SUR2A(Y1206S) auf der Ordinate.

Die gestrichelte Winkelhalbierende stellt die "Null-Effekt-Linie" dar.

Die orange Linie repräsentiert die lineare Korrelation (Korrelationskoeffizient = 0,9839) der Werte aller Substanzen mit Ausnahme der Piperidino-Verbindungen Repaglinid und AZ-DF. Sie hat die festgesetzte Steigung 1 und den y-Achsenabschnitt von $0,79 \pm 0,11$.

Mit Ausnahme von GBC, Glimepirid und Meglitinid am Kir6.2/SUR2A(Y1206S) (s. 3.3.1.3 und 3.3.4) stammen die Daten von Susanne Bieger, Petra Kühner und Eva Stauß.



beobachtet, dass die Koexpression mit Kir6.2 die GBC-Affinität zum SUR2A(Y1206S) auch in Experimenten an Membranen erhöht, insbesondere in Gegenwart von MgATP (Stephan et al., 2005). Dieser Unterschied zwischen den SUR2-Isoformen hebt die Rolle des Carboxy-Terminus bei der Kir-SUR-Kupplung und der dadurch bedingten Verbesserung der GBC-Bindung hervor.

Die Abbildung 53 zeigt den Einfluss der Koexpression mit Kir6.2 auf die Bindung ausgewählter Sulfonylharnstoffe und Glinide an SUR2A(Y1206S) in Ganzzellversuchen. In dieser Graphik wurden die pK_i -Werte der Blocker zum SUR2A(Y1206S) und Kir6.2/SUR2A(Y1206S) gegeneinander aufgetragen. Aus den resultierenden Punkten wurde eine Korrelationsgerade mit der Steigung 1 gebildet (orange Linie). Der extrapolierte Ordinatenabschnitt $d = 0,79 \pm 0,11$ ist ein Maß für den Koexpressionseffekt. Demnach stieg die Affinität der untersuchten Blocker im Mittel um den Faktor $10^{0,79 \pm 0,11} = 6,2 [3,7;10,2]$. Statistisch gesehen gibt es daher zwischen SUR2A(Y1206S) und SUR1 (siehe Abb. 49) keinen Unterschied bezüglich der Affinitätserhöhung durch Kir6.2. Bei der Erstellung der Korrelationsgeraden wurden Repaglinid und (-)-AZ-DF 265 nicht berücksichtigt. Die Bindung dieser Substanzen profitierte am stärksten von der Kanalkomplexbildung. Der Sonderstatus der Piperidino-Glinide war jedoch geringer ausgefallen als am SUR1 (vgl. Abb. 49).

Im Fall von GBC zeigte sich in Ganzzellversuchen an SUR2A(Y1206S), analog zu SUR2B(Y1206) (Hambrock et al., 2001) und SUR1 (Abb 50a), eine leichte Kir6.x-Subtypabhängigkeit des Koexpressionseffektes. Kir6.2 erhöhte die GBC-Affinität ca. 2 mal stärker als Kir6.1.

Kaum Einfluss hatte dagegen die Kanalkomplexbildung auf die Bindung des Öffners P1075 (s. Kap. 3.3.2). Während am SUR2B und SUR2B(Y1206S) gar keine Änderungen der P1075-Affinität infolge der Koexpression mit Kir6.x auftraten (Hambrock et al., 2001), machte sich am SUR2A und an der entsprechenden Mutante eine leichte Verschlechterung der Bindungsstärke durch die Kir6.2-Anwesenheit bemerkbar. Obgleich der Effekt statistisch signifikant ausfiel, wodurch ein weiterer Unterschied zwischen den SUR-Isoformen sichtbar wurde, so ist er doch aufgrund seiner kleinen Dimension (Faktor 1,6 bzw. 1,7) von untergeordneter Bedeutung.

4.3.3 Allosterische Wechselwirkungen zwischen Glibenclamid und P1075

Die gegenseitige Beeinflussung der GBC- und P1075-Bindungsregionen am SUR2A, welche negativ allosterisch miteinander gekoppelt sind (Bray und Quast, 1992; Schwanstecher et al., 1992b), wurde sowohl mit ^3H -GBC wie auch mit ^3H -P1075 als Radioligand in Bindungsstudien untersucht (Kap. 3.3.3). Dabei steigerte der Einsatz der SUR2A(Y1206S)-Mutante mit der, im Vergleich zum Wildtyp, erhöhten GBC- und unveränderten P1075-Affinität, die Qualität der Messungen mit ^3H -GBC erheblich.

Die Verdrängung von ^3H -GBC aus der SUR2A-Bindung durch P1075 in Versuchen an HEK293-Zellmembranen in der Abwesenheit von MgATP (Kap. 3.3.3.1) bestätigte die Beobachtung von Russ et al., 2003 und Felsch et al., 2004, dass Öffner auch in Abwesenheit von MgATP an SUR2 binden können, wenn auch mit einer Affinität, die um zwei Größenordnungen geringer ist, als die in Anwesenheit von MgATP. Die Tatsache, dass die Amplitude der Verdrängung durch den Cyanoguanidin-Öffner gleich (s. Kap. 3.3.1.1) bzw. ähnlich (s. Kap. 3.3.3.1) der Hochaffinitätskomponente aus der homologen ^3H -GBC-Kompetition war, spricht für die Fähigkeit von P1075, die GBC-Bindung an SUR2A vollständig hemmen zu können; was im Übrigen ebenfalls für SUR2A(Y1206S) (Dissertation von Frau Eva Stauß) und SUR2B bzw. SUR2B(Y1206S) (Hambrock et al., 2001) gilt.

In Anwesenheit von MgATP war der Verlauf der ^3H -GBC/P1075-Inhibitionskurven sowohl an SUR2A(Y1206S) (Daten von E. Stauß) wie auch an Kir6.2/SUR2A(Y1206S) im Bereich der spezifischen Bindung biphasisch (Abb. 37), wobei die Inhibitionskonstanten der Hochaffinitätskomponenten gut mit den P1075-Affinitäten aus homologen ^3H -P1075-Kompetitionen übereinstimmten (s. Abb. 35 in Kap. 3.3.2). Es wurde somit auch in heterologer Verdrängung von ^3H -GBC die leichte Verschlechterung der P1075-Bindung infolge der Koexpression sichtbar, was wiederum an Kir6.2/SUR2A(Y1206S)-Membranen die Heterogenität der Radioligandhemmung verminderte. Der Kurvenverlauf an SUR2A(Y1206S) kann mit Hilfe des

von Löffler-Walz et al., 2002 für SUR2B vorgeschlagenen Modells gedeutet werden. Demnach sollen SUR2B-Untereinheiten, alleine exprimiert im Stande sein Homotetramere zu formen. Vorausgesetzt, dies gelte auch für SUR2A(Y1206S), könnte die Hochaffinitätskomponente die Bindung des Öffners an SUR-Untereinheiten widerspiegeln, die nicht von ^3H -GBC besetzt sind. Diese Bindung führte über negativ-allosterische Wechselwirkungen zwischen den Untereinheiten zur Verdrängung des Radioliganden. Die niedrigaffine Komponente repräsentierte die ^3H -GBC/P1075-Kompetition durch allosterische Interaktionen innerhalb der Untereinheiten. Im K_{ATP} -Kanal-Komplex liegen die SUR-Untereinheiten als Tetramer vor (Clement IV et al., 1997; Shyng und Nichols, 1997) und befinden sich zudem in enger räumlicher Nachbarschaft (Mikhailov et al., 2005). Die biphasische Natur der Kompetitionskurven am Kir6.2/SUR2A(Y1206S) stützt somit das Tetramer-Modell von Löffler-Walz et al., 2002 und legt den Rückschluss nahe, dass es auf beide SUR2-Isoformen ausgeweitet werden kann.

Auch die Ergebnisse der ^3H -P1075-GBC Verdrängung können im Rahmen des

Tabelle 32 Hemmung der ^3H -P1075-Bindung durch GBC in Membranexperimenten in Anwesenheit von 1 mM MgATP.

Grau unterlegt sind Felder in den sich Ergebnisse der Arbeit von Frau Eva Stauß befinden.

| Rezeptor | $K_{\text{i,GBC}}$ (nM) |
|----------------------|------------------------------|
| SUR2A | 500 [400;630] |
| SUR2A(Y1206S) | 130 [110;150] |
| Kir6.2/SUR2A | 15 [10;23] 310 [230;410] |
| Kir6.2/SUR2A(Y1206S) | 1,3 [0,93;1,8] 21 [14;32] |

Tetramerenmodells interpretiert werden. In der Tabelle 32 sind nochmals die Inhibitionskonstanten aus diesen Experimenten aufgelistet. Die K_{i} -Werte aus Versuchen an den allein exprimierten, regulatorischen Untereinheiten waren ca. 20-fach höher als die K_{D} -Werte aus homologen ^3H -GBC-Kompetitionen; die tatsächliche GBC-Affinität wurde somit unterbewertet. Die Koexpression mit Kir6.2 machte die ursprünglich monophasischen Hemmkurven (normiert auf die spezifische Bindung) biphasisch und verschob sie in Richtung höherer Affinität. Im Einklang mit dem Tetramer-Modell würde die ^3H -P1075-Bindung an einzelne Untereinheiten des Homotetramers, bestehend ausschließlich aus SUR2A bzw. SUR2A(Y1206S), alle Untereinheiten in den Zustand niedriger GBC-Affinität versetzen. Die Koexpression mit Kir6.2 würde dagegen die Wechselwirkungen zwischen den Untereinheiten vermindern und eine Asymmetrie im Tetramer

induzieren, so dass GBC mit hoher Affinität an die nicht von ^3H -P1075 besetzten SUR2-Untereinheiten binden und die Radioligandbindung schwächen könnte. Die niedrigaffine Komponente würde dann für die ^3H -P1075-Verdrängung durch Bindung von GBC an die restlichen Untereinheiten stehen.

Zwei weitere Folgerungen ergeben sich aus der Analyse der Ergebnisse in der Tabelle 32. Berücksichtigt man nur die K_i -Werte der Hochaffinitätskomponenten, so beobachtet man sowohl eine Steigerung des affinitätserhöhenden Mutationseffektes durch die Koexpression mit Kir6.2 (Faktor 4 < Faktor 12) wie auch einen höheren Effekt der Koexpression auf die Bindungseigenschaften der mutierten SUR2A-Untereinheit (Faktor 33 < Faktor 100). Die porenbildende Untereinheit Kir6.2, vermutlich über den N-Terminus (siehe Kap. 4.2.2) und die Mutation in der cytosolischen Schleife Nr. 8 scheinen somit ihren Einfluss auf die Ausbildung einer Hochaffinitätsbindungstasche für GBC gegenseitig zu verstärken.

4.3.4 Glibenclamid-Bindung und K_{ATP} -Kanal-Inhibition

Die Potenz des Kir6.2/SUR2A(Y1206S)-Blocks durch GBC ($\text{IC}_{50} = 0,84 \text{ mM}$; bestimmt von Dr. Ulf Lange) in Inside-out-Experimenten entspricht ziemlich exakt der in Sättigungsexperimenten bei 23°C ermittelten Affinität des Blockers zu diesem Kanal ($0,88 \text{ nM}$; siehe Kap. 3.3.1.4). Vergleichbares gilt für den Wildtyp wie auch für Kir6.2/SUR2B(Y1206S). Diese Übereinstimmungen sind nicht mit dem einfachen Modell vereinbar, in dem die Bindung des Blockers an eine bzw. an alle vier SUR-Untereinheiten zur Kanalinhibition führt (Dörschner et al., 1999; Russ et al., 1999). Dieses Modell sagt nämlich vorher, dass die Hemmkurve um einen Faktor 5,3 rechts bzw. links von der Bindungskurve liegt. Vergleicht man ferner die GBC-Bindung an Kir6.2/SUR2B und Kir6.2/SUR2B(Y1206S) in intakten Zellen mit den Effekten des Inhibitors in der Ganzzellkonfiguration in Anwesenheit von Nukleotiden so beobachtet man eine offensichtlich verminderte Transduktion der Bindung in die Kanalschließung (Hambrock et al., 2001). Bereits diskutiert wurden ebenfalls die Unterschiede in der Transduktion zwischen diversen K_{ATP} -Kanalsubtypen und die nur unvollständige Hemmung der Kanäle durch sättigende Blockerkonzentrationen am Kir6.2/SUR1 in isolierten Membranstücken (siehe auch Proks et al., 2002). Komplexere Modelle sind deshalb bei der Beschreibung der Übertragung von Blockerbindung in die Kanalschließung zu erarbeiten.

4.4 Zugang zur Bindungsregion der K_{ATP} -Kanal-Öffner vom Benzopyrantyp

Die aus chemischer Sicht heterogene Gruppe der K_{ATP} -Kanal-Öffner (KCO) hat das Potential, über die Aktivierung der K_{ATP} -Kanäle und die daraus resultierende Hyperpolarisation der Zellmembran, modulierend auf die Physiologie wichtiger Gewebe einzuwirken. Die Empfindlichkeit gegenüber den KCO wird dem K_{ATP} -Kanal durch dessen regulatorische Untereinheit, den SUR, verliehen (Tucker et al., 1997; Hambrock et al., 1998; Schwanstecher et al., 1998). Mehrere Studien, vorwiegend an SUR-Chimeren, brachten Erkenntnisse über die Lokalisation und Beschaffenheit der für Öffnerbindung und Wirkung wichtigen SUR-Regionen (Uhde et al., 1999; Moreau et al., 2000; Moreau et al., 2005a; Moreau et al., 2005b; Hambrock et al., 2004; siehe auch Abb. 3). Dennoch blieb bis jetzt unklar, ob die KCO ihre Bindungsstelle von der extrazellulären oder intrazellulären Seite der Membran aus erreichen. Bei der Aufklärung des Zugangs eines Liganden zu seiner Bindungsstelle in membranständigen Proteinen hat sich der Einsatz nichtmembrangängiger Derivate etabliert (Hille, 1977; Hescheler et al., 1982; Schwanstecher et al., 1994a). Wir charakterisierten die unter physiologischen Bedingungen deprotonierte Bimakalimsulfonsäure (BMSA) in der Hoffnung, auf diesem Wege Informationen über den Zugang der Benzopyranöffner zu ihrer SUR-Bindungsstelle zu erhalten.

BMSA hemmte die ^3H -GBC-Bindung an Kir6.2/SUR2B-Membranen mit einer Affinität von $4,3 \mu\text{M}$, die ungeladene Muttersubstanz Bimakalim dagegen mit $0,061 \mu\text{M}$ (Abb. 41). Folglich führt die Substitution der Cyanogruppe in der Position 6 des Bimakalim-Benzopyran-Rings durch den bei einem physiologischen pH-Wert von 7.4 größtenteils deprotonierten Sulfonsäure-Rest zur Senkung der Bindungsaffinität um den Faktor 69.

An ganzen HEK293-Zellen, die den rekombinanten K_{ATP} -Kanal der glatten nicht-vaskulären Muskulatur an der Zelloberfläche exprimieren, zeigte sich nach 30 min Inkubationszeit ein im Vergleich zu Membranversuchen stark erhöhter Unterschied in der Affinität von Bimakalim und BMSA (Faktor ~ 5200 , Abb. 42).

Der K_i -Wert für Bimakalim ($0,036 \mu\text{M}$) war leicht, jedoch statistisch signifikant niedriger als in Membranen. Möglicherweise ist dies ein Hinweis auf einen unterschiedlichen, präparationsabhängigen, metabolischen Zustand des Kanals, beispielsweise als Konsequenz einer ADP-Akkumulation während der Inkubation der Membranen (Hambrock et al., 1999). Insgesamt lag die hier ermittelte Bimakalim-Affinität zum Kir6.2/SUR2B in vergleichbarer Größenordnung wie die zum Kir6.2/SUR2A (56 nM) und Kir6.1/SUR2B (11 nM) (Salamon et al., 2002).

Der Unterschied in der Bimakalim-Affinität zwischen den verschiedenen Rezeptorpräparationen ist gering, verglichen mit dem drastischen Verlust der BMSA-Affinität in

Kir6.2/SUR2B-Zellen (186 μM ; Tab. 27). Wie kann dieses Ergebnis interpretiert werden? Hätten wir für BMSA und Bimakalim ähnliche Abweichungen der K_i -Werte ($pK_i \sim 1,84 \rightarrow \text{Faktor } 10^{1,74} = 69$; Kap. 3.4.1) in Membranen und intakten Zellen, die den vollständigen K_{ATP} -Kanal exprimieren erhalten, so müsste man unter der Bedingung, dass BMSA die Zellmembran nicht passiert, von einer vom extrazellulären Raum zugängigen BMSA-Bindungsstelle ausgehen. Dies ist nicht der Fall (pK_i nach 30 min Inkubation = 3,72 \rightarrow Faktor 5248; Kap. 3.4.2). Es stellt sich die Frage, wie eine potentiell nichtmembrangängige Substanz überhaupt den Radioliganden verdrängen konnte. Denkbar wäre eine Konkurrenz durch eine hochaffine, leicht membrangängige Verunreinigung aus der BMSA-Synthese oder ein BMSA-Zersetzungsprodukt. Dies gilt jedoch laut Auskunft von Prof.

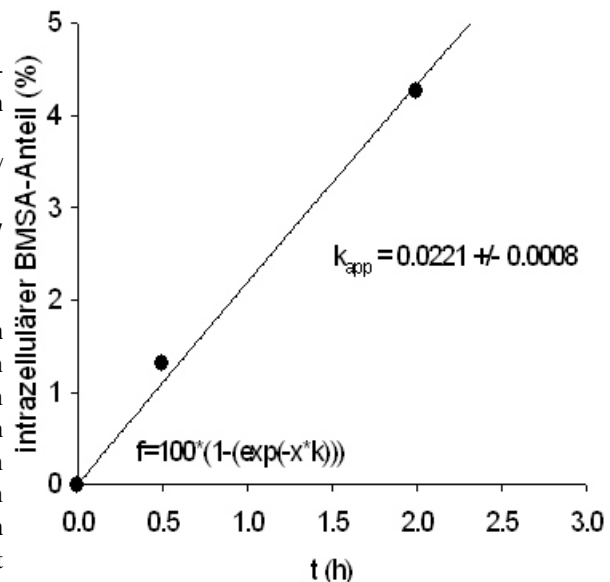
Abbildung 54 Ermittlung der BMSA-Diffusionshalbwertszeit.

Der intrazelluläre Anteil der eingesetzten BMSA-Konzentration steigt mit der Zeit und errechnet sich folgendermaßen:

nach 0,5 h: $K_{i \text{ BMSA ist}} / K_{i \text{ BMSA soll}} \text{ (s. Text)} = 186 \mu\text{M} / 2,45 \mu\text{M} = 76 \rightarrow 100 \% / 76 = 1,3 \%$;

nach 2h: $K_{i \text{ BMSA ist}} / K_{i \text{ BMSA soll}} \text{ (s. Text)} = 85 \mu\text{M} / 3,7 \mu\text{M} = 23 \rightarrow 100 \% / 23 = 4,3 \%$

Vorausgesetzt BMSA durchquert die Zellmembran durch die Diffusion oder einen langsamen Transport, dann nähert sich die Konzentration der Substanz im Zellinneren der im Inkubationsansatz eingesetzten Konzentration in der Weise, wie von der nebenstehenden Funktion beschrieben. Aus der resultierenden scheinbaren Diffusionsgeschwindigkeitskonstante von $k_{\text{app}} = 0,0221 \text{ h}^{-1}$ ergibt sich für BMSA eine Diffusionshalbwertszeit von 35 h ($\ln 2 / k_{\text{app}}$)



Horst Weber, in dessen Arbeitsgruppe BMSA synthetisiert wurde, als unwahrscheinlich. Möglich ist auch, dass das stark geladene Bimakalimderivat die Zellmembran doch durchquert, aber nur sehr langsam, sei es durch Transport oder Diffusion. In diesem Fall wäre die Affinitätsverschlechterung in Kir6.2/SUR2B-Zellen nur scheinbar. Unter dieser Annahme lässt sich aus der scheinbaren Affinität von BMSA nach 30 min Inkubation berechnen, welcher Anteil der Substanz zu diesem Zeitpunkt bereits in die Zelle gelangt war. In Experimenten an intakten Zellen ergab sich eine BMSA-Affinität, die 76-fach niedriger war (186 μM) als die Affinität die man bei ungehinderter Membranpassage von BMSA erwarten würde (2,45 $\mu\text{M} = K_{i \text{ Bimakalim}}$ in Zellversuchen nach 30 min Inkubation * 69 = 0,036 μM aus Tab. 27 * 69). Somit ist anzunehmen, dass sich lediglich 1,3 % (1/76) der eingesetzten BMSA-Konzentration nach 30 Minuten Inkubation im Zytoplasma befand,

von wo aus die Radioligandkompetition möglich wurde. Mit anderen Worten kann der scheinbare Affinitätsverlust der BMSA zu vollständigen, in intakten Zellen exprimierten K_{ATP} -Kanälen als ein Hinweis darauf gedeutet werden, dass die Benzopyranöffner ihre Bindungsregion vom Zytosol aus erreichen. Ferner sollte sich eine Verlängerung der Inkubationszeit, bezogen auf BMSA, affinitätserhöhend auswirken. In der Tat näherten sich nach zweistündiger Inkubation die Verdrängungskurven der untersuchten Benzopyrane ($pK_i = 3,21$ – Faktor 1622; Kap. 3.4.2) ohne jedoch membranähnliche Verhältnisse zu erreichen ($3,7 \mu\text{M} = 0,053 \mu\text{M} * 69$ wären zu erwarten; s. gestrichelte Kurve in der Abb. 42). Das geladene Bimakalim-Analogon wies eine verbesserte scheinbare Affinität auf ($K_i = 85 \mu\text{M}$), was auf eine höhere Präsenz der Substanz im Inneren der Zelle hindeutet (4,3 % der vorgegebenen Konzentration; da die scheinbare Affinität von BMSA ca. 23-fach niedriger war als es bei membranähnlichen Verhältnissen zu erwarten gewesen wäre). Die Bindung der ungeladenen "Muttersubstanz" verschlechterte sich hingegen leicht ($0,053 \mu\text{M}$; Tab. 27), möglicherweise verursacht durch einen Abfall des ATP/ADP-Quotienten.

Die quantitative Betrachtung der Inkubationszeitabhängigkeit der Zellmembranpassage von BMSA ist in Abb. 54 gezeigt. Die Daten lassen auf eine Eintrittshalbwertszeit von BMSA ins Zellinnere von ca. 35 h schließen ($k_{app} = 0,022 \text{ h}^{-1}$; siehe Abb. 54). Bei einem angenommenen pK_S -Wert der BMSA von 1 (Auskunft von Herrn Prof. Weber) liegt beim pH 7,4 eines von $10^{7,4-1} = 2,5 * 10^6$ BMSA-Molekülen in der nicht deprotonierten Form vor. Eine HWZ von $35\text{h}/2,5 * 10^6 = 40$ ms resultiert somit für die Diffusion der undissoziierten BMSA-Form durch die Zellmembran und das Erreichen der Bindungsstelle am Rezeptor. Unter der Annahme dass dabei eine Strecke von 100 Å zurückgelegt wird, erhält man einen Wert für den Diffusionskoeffizienten von $1,7 * 10^7 \text{ cm}^2/\text{s}$, der mit dem von Glycin in Wasser bei 20°C gut übereinstimmt ($D = 9,4 * 10^6 \text{ cm}^2/\text{s}$; van Holde KE, 1971).

Interessant ist der Vergleich des ^3H -P1075-Verdrängungsverhaltens der beiden Benzopyrane an intakten Zellen, die die regulatorische Untereinheit SUR2B alleine exprimieren. Auch hier war der Affinitätsunterschied deutlich größer (Faktor ~4000) als in Membranen. Die Inhibitionskonstante für Bimakalim blieb dabei im Wesentlichen unverändert bei $0,044 \mu\text{M}$. Dies bestätigt die Beobachtungen von Hambrock et al., 2001, dass weder die Koexpression mit Kir6.2 noch die Art der Rezeptorpräparation (Membranen vs. Zellen) einen nennenswerten Einfluss auf die Öffnerbindung an SUR2B hat. Stark erniedrigt erschien dagegen die BMSA-Affinität ($K_i = 169 \mu\text{M}$). Für eine geladene Substanz mit erschwerter Membrangängigkeit ist dieses Ergebnis nicht unerwartet, kann doch der SUR2B ohne die porenbildende Untereinheit nicht an die Zelloberfläche gelangen (Zerangue et al., 1999) und ist daher im Zellinneren nur von der Fraktion der eingesetzten BMSA-Konzentration erreichbar, die während der Inkubationszeit das Hindernis in Gestalt der

Zellmembran überwunden hat. Wir gehen daher von einer scheinbaren Affinitätsniedrigung für BMSA aus, die im Ausmaß den Verhältnissen am Kir6.2/SUR2B in Ganzzellversuchen nach 30 min Inkubationszeit entspricht, folglich unabhängig davon ist, ob sich der SUR in der Plasmamembran befindet. Daraus ergibt sich, dass Benzopyranöffner erst ins Zytoplasma gelangen müssen, bevor sie von dort aus ihre Bindungsstellen besetzen können.

Dieser Rückschluss aus den Radioligandbindungsstudien bestätigte sich auch in elektrophysiologischen Experimenten. BMSA zeigte sich hier als potenter K_{ATP} -Kanal-Öffner, jedoch nur, wenn sie auf die innere Seite der Zellmembran appliziert wurde (Inside-out-Konfiguration; Abb. 45a). Die Kontrollsubstanz Bimakalim wirkte dagegen unabhängig vom Applikationsort, das heißt in allen Patch-clamp-Konfigurationen (i/o, wc, cell-attached; Abb. 45b, 46 und 47).

Die Kinetik der Bimakalimwirkung gab zunächst Rätsel auf. Während die Kanalaktivierung in den Whole-cell-Experimenten bei physiologischer Temperatur von 37°C sehr schnell war (HWZ < 0,5 min), verlief sie in der Inside-out-Konfiguration bei ca. 22°C merklich langsamer (HWZ bei 1,8 min). Vorausgesetzt, die Zellmembranpassage beeinflusst die Geschwindigkeit der Bimakalimwirkung, würde dieses Aktivierungsverhalten darauf hindeuten, dass der ungeladene Öffner von außen bindet. Dies steht aber im Widerspruch zur Schlussfolgerung aus den Experimenten mit BMSA. Hilfreich bei der Klärung dieses Widerspruchs war der Einsatz von Bimakalim in der Cell-attached-Konfiguration bei 37°C. Zum Erreichen einer nur von außen zugänglichen Bindungsstelle hätte Bimakalim hier zweimal die Zellmembran durchqueren müssen, einmal mehr also als in der i/o-Konfiguration. Trotzdem war die Halbwertszeit der Aktivierung in den Cell-attached-Experimenten mit 1,1 min kürzer als in den i/o-Versuchen. Somit liefert der Vergleich der Effekthalbwertszeiten einer leicht membrangängigen Verbindung in den diversen Konfigurationen der Patch-Clamp-Technik keine eindeutigen Hinweise über den Zugang zur Benzopyranbindungsstelle. Vielmehr spiegeln sich in den abweichenden Aktivierungsgeschwindigkeiten unterschiedliche, durch die Versuchsbedingungen (z.B. Temperaturunterschiede) determinierte, metabolische Zustände der K_{ATP} -Kanäle wieder. Wie entscheidend dabei die Versuchstemperatur die Effektkinetik beeinflusst zeigten Ganzzellmessungen bei Raumtemperatur (durchgeführt von PD Dr. U. Russ). Die Halbwertszeit der Bimakalim-Aktivierung lag hier mit 2 min im Bereich dessen, was in der Inside-out-Konfiguration bei 22°C beobachtet wurde.

Es verbleibt die Frage, welchen Beitrag unsere Folgerungen zum Wissen über die Öffnerbindung und Wirkung liefert? Da bis heute nur eine Kristallstruktur der K_{ATP} -Kanäle mit sehr niedriger Auflösung verfügbar ist (Mikhailov et al., 2005), ähnelt die Forschung auf diesem Gebiet dem Zusammensetzen eines komplexen Puzzles. Mit der Erkenntnis, dass die Benzopyranöffner ihre

Bindungsregion vom Zytosol aus erreichen, liefert diese Arbeit einen wichtigen neuen Puzzlestein und darüber hinaus Möglichkeiten zu einer sinnvollen Verknüpfung bisher verfügbarer Daten.

Zieht man in Betracht, dass sich die Bindungsregionen der Öffner und Blocker der K_{ATP} -Kanäle vermutlich in enger Nachbarschaft befinden (Uhde et al., 1999; Moreau et al., 2000; Ashfield et al., 1999) überrascht es nicht, dass Öffner und Blocker (Schwanstecher et al., 1994a) auf dem gleichen Weg, nämlich über das Zytosol dorthin gelangen.

Die Arbeitsgruppe um Vivaudou postuliert die zentrale Rolle der Transmembranhelix 17 bei der Öffnerwirkung (Moreau et al., 2000; Moreau et al., 2005a; Moreau et al., 2005b). Eine Aminosäure (M 1290 im SUR1 bzw. T 1253 in SUR2) im Zentrum dieser Helix soll über ihre Größe den Zugang zur Öffnerbindungsregion regeln, an deren Ausbildung die benachbarten aromatischen Aminosäuren direkt beteiligt sein sollen. Die Vorstellung, dass diese zentrale Aminosäure im Sinne eines Tors den Zugang der Benzopyranöffner von außen versperrt bzw. gestattet (siehe Fig. 7 in Moreau et al., 2005b) ist mit unseren Daten nicht vereinbar. Wir favorisieren eine zum extrazellulären Raum hin abgeschlossene Substratbindungstasche, ähnlich dem "Closed-apo"-Zustand des bakteriellen ABC-Transporters MsbA (Reyes und Chang, 2005; Dong et al., 2005). Eine Konformationsänderung des SUR im Zuge des hydrolytischen Zyklus in den NBF, zum "Posthydrolytischen" Zustand hin kann nicht ausgeschlossen werden (Zingman et al., 2001), dennoch ist auch in dieser nach außen hin potentiell geöffneten Struktur eines ABC-Proteins (Reyes und Chang, 2005; Dong et al., 2005) kein Zugang der BMSA zur Bindungsregion möglich.

Im Gegensatz zu verwandten ABC-Proteinen der Klasse ABCC (z.B. MRP1; Leslie et al., 2001) hat der SUR keine bisher bekannte Transportfunktion. Auch wir konnten keinen BMSA-Transport durch den SUR ins Innere der Zelle beobachten. In Kir6.2/SUR2B-Zellen, die SUR2B als potentiellen Transporter in der Plasmamembran besitzen, wurde eine ähnliche intrazelluläre BMSA-Konzentration und somit scheinbare BMSA-Affinität bestimmt, wie in intakten Zellen, in denen der SUR2B alleine nicht in die Zellmembran eingebaut wird (Zerangue et al., 1999) und somit als Transporter ins Zellinnere nicht zu Verfügung steht. Wir gehen daher davon aus, dass BMSA überwiegend über Diffusion ins Zytoplasma gelangt.

5 Zusammenfassung

ATP-sensitive K^+ -Kanäle sind Heterooktamere aus vier porenbildenden Untereinheiten Kir (2 Subtypen: Kir6.1 und Kir6.2) und vier regulatorischen Untereinheiten SUR (2 Subtypen: SUR1 und SUR2 mit 2 Hauptpleißvarianten 2A und 2B). Sie kommen in unterschiedlicher Zusammensetzung in diversen Geweben (z. B. Kir6.2/SUR1 in β -Zellen des Pankreas, Kir6.2/SUR2A im Myokard, Kir6.2/SUR2B im glatten, nicht-vaskulären Muskel, Kir6.1/SUR2B in der glatten Gefäßmuskulatur) vor und sind dort an der Regulierung physiologischer Funktionen beteiligt. Sie sind daher Zielstrukturen für pharmakologische Modulatoren wie die Kanal-Blocker und Öffner.

In dieser Arbeit wurden folgende Schwerpunkte bearbeitet:

- Selektivität von Sulfonylharnstoffen und Gliniden in Bindung und Wirkung für die drei wichtigsten K_{ATP} -Kanalsubtypen Kir6.2/SUR1 (Pankreas), Kir6.2/SUR2A (Herzmuskel) und Kir6.1/SUR2B (Gefäßmuskel) (Stephan et al., 2006b)
- Einfluss der Koexpression mit Kir6.x auf die Bindung von Sulfonylharnstoffen und Gliniden an SUR1.
- Einfluss der Mutation Y1206S und der Koexpression mit Kir6.x auf den Sulfonylharnstoffrezeptor SUR2A (Stephan et al., 2005)
- Zugang der K_{ATP} -Kanal-Öffner vom Benzopyrantyp an ihre Bindungsstelle (Stephan et al., 2006a)

Sulfonylharnstoffe (SU) und Glinide binden an die SUR-Untereinheit, hemmen die K_{ATP} -Kanäle und stoßen dadurch die Insulinsekretion in den pankreatischen β -Zellen an. Im Interesse der therapeutischen Sicherheit (Vermeidung von potentiellen kardiovaskulären Nebenwirkungen; Quast et al., 2004) sollten die, als orale Antidiabetika eingesetzten insulinotropen Substanzen möglichst selektiv am Kir6.2/SUR1 wirken. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb die Selektivität ausgewählter SU und Glinide in Bindung und Funktion zwischen rekombinanten Kir6.2/SUR1- und Kir6.2/SUR2A-Kanälen in HEK293-Zellen untersucht.

Die Affinität der SU und Glinide zum Kir6.2/SUR1 und Kir6.2/SUR2A wurde mittels Verdrängung des Tritium-markierten Glibenclamids (3H -GBC) bestimmt. Grundsätzlich zeigten sich die langkettigen Sulfonylharnstoffe (GBC, Glimepirid) zu beiden Kanalsubtypen affiner als der kurzkettige Sulfonylharnstoff Glibornurid und das D-Phenylalanin-Derivat Nateglinid. In Übereinstimmung mit dem Modell der zweiteiligen SU-Bindungstasche (A und B-Region), führt im Fall der langkettigen SU die Wechselwirkung mit beiden Bindungsregionen A und B (deshalb A+B-Liganden) zu höherer Affinität als die ausschließliche Interaktion mit der Bindungsregion A

(Glibornurid und Nateglinid als A-Liganden). Die Untersuchungen ergaben keine nennenswerten Unterschiede in der Selektivität zum Kir6.2/SUR1 zwischen den A- und A+B-Liganden. Beide Ligandklassen banden an den pankreatischen K_{ATP} -Kanal etwa 19-fach stärker als an Kir6.2/SUR2A des Myokards. Trotz weitgehender Sequenz-Homologie der potentiellen Bindungsregion B (Bereich der dritten cytosolischen Schleife des SUR) in SUR1- und SUR2-Subtypen, führt also eine Wechselwirkung mit diesem Bereich der Bindungsstelle nicht zwangsläufig zum Verlust der Kir6.2/SUR1-Bindungsselektivität. Repaglinid, AZ-DF265, Meglitinid und UL-DF9 sind reine B-Liganden und zeigten eine stark reduzierte Kir6.2/SUR1- (Repaglinid, AZ-DF265), oder gar eine leichte Kir6.2/SUR2A-Selektivität (Meglitinid, UL-DF9). Die im Vergleich zu Meglitinid und UL-DF9 allgemein höhere Affinität von Repaglinid und AZ-DF265 macht eine Differenzierung unter den B-Liganden notwendig. Für die höhere Affinität ausschlaggebend sind vermutlich Wechselwirkungen der Piperidinogruppe, einer Teilstruktur von Repaglinid und AZ-DF265 (Piperidino-Glinide), mit bisher nicht näher untersuchten Rezeptorbereichen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass zur vollständigen Ausbildung dieser Bindungsregion die Anwesenheit der porenbildenden Untereinheit im Kanalkomplex notwendig ist. Die Koexpression mit Kir6.x erhöht die Affinität der Piperidino-Glinide zum SUR1 sehr stark (> 100 -fach), die der restlichen Verbindungen dagegen nur gering (< 5 -fach). Ein intakter N-Terminus des Kir6.2 ist für diesen Koexpressionseffekt essentiell.

Die Selektivität von Repaglinid und GBC bezüglich der Wirkung auf Kir6.2/SUR1-, Kir6.2/SUR2A- und Kir6.1/SUR2B-Kanäle wurde in der Ganzzellkonfiguration der Saugelektrode-technik untersucht. Der pankreatische K_{ATP} -Kanal wurde von Repaglinid ≥ 30 -fach und von GBC ≥ 1000 -fach potenter inhibiert als die kardiovaskulären Kanäle. Darüber hinaus konnte Kir6.2/SUR2A, im Gegensatz zu Kir6.2/SUR1 und Kir6.1/SUR2B, von beiden Substanzen nur unvollständig geschlossen werden. Die Differenzen in der Wirkung von Repaglinid und GBC zwischen den unterschiedlichen K_{ATP} -Kanal-Subtypen fielen somit stärker aus, als die Unterschiede in der Bindungsaffinität. Es wurde ersichtlich, dass sich die Umsetzung der Substrat-Bindung in die Kanalschließung am Kir6.2/SUR1 am leichtesten vollzieht, woraus ein Selektivitätsvorteil für den pankreatischen Kanal entsteht. Die hier vorgestellte Pankreasselektivität der therapeutisch genutzten Sulfonylharnstoffe und Glinide untermauert deren therapeutische Sicherheit, die jedoch nur in geeigneten klinischen Studien hinreichend belegt werden kann.

Die Bindungseigenschaften des SUR2A wurden in dieser Arbeit als weiterer Schwerpunkt untersucht. Besonderes Interesse galt dabei dem Einfluss der SUR2A-Mutation Y1206S und der Koexpression auf die Bindungseigenschaften. In Membranversuchen und in Abwesenheit von

MgATP band GBC an SUR2A mit der Affinität von 20 nM. In analogen Experimenten am SUR2A(Y1206S) alleine resultierte für GBC eine ca. 5-fache, mutationsbedingte Affinitätserhöhung. Am vollständigen Kir6.2/SUR2A-Kanal in intakten Zellen verbesserte die Y1206S-Mutation die Bindung der A- und A+B-Liganden sogar um den Faktor ~13. Interessanterweise verloren die B-Liganden Meglitinid und UL-DF9 infolge der Mutation geringfügig an Bindungsstärke. Ähnlich wie am SUR1 erhöhte die Koexpression mit Kir6.2 die Affinität aller untersuchten SU und Glinide, am stärksten die von AZ-DF265 und Repaglinid. Die Sonderstellung der beiden Piperidino-Glinide fiel hier jedoch geringer aus.

Die Affinität des K_{ATP} -Kanal-Öffners P1075 zum SUR2A wurde durch die Y1206S-Mutation nicht beeinflusst. Die Koexpression mit Kir6.2 reduzierte marginal die Öffner-Affinität sowohl am Wildtyp, als auch an der Y1206S-Mutante. Die negativ allosterische Kopplung der GBC- und P1075-Bindungsstellen am SUR2 wurde sowohl durch die Y1206S-Mutation, als auch durch die Koexpression mit Kir6.2 wesentlich verändert.

Die Erhöhung der Affinität für GBC durch die Mutation, sowie die modulierenden Effekte der Koexpression wurden von Hambrock et al., 2001 in ähnlicher Form am SUR2B beschrieben. Daraus kann geschlossen werden, dass die letzten 42 C-terminalen SUR2-Aminosäuren nur einen geringen Einfluss auf die beschriebenen Effekte haben.

Der letzte Schwerpunkt dieser Dissertation lag in einer vergleichenden Studie der Bindung und Wirkung eines negativ geladenen, schlecht membrangängigen Benzopyrans BMSA und der ungeladenen Muttersubstanz Bimakalim am rekombinanten Kir6.2/SUR2B. Während Bimakalim den Radioliganden ^3H -P1075 in Membran- und Ganzzellversuchen mit ähnlicher Affinität verdrängte ($K_i = 61$ bzw. 35 nM), band BMSA nur in Membranen, nicht jedoch in intakten Zellen mit hoher Affinität an Kir6.2/SUR2B ($4,3$ vs. 186 μM). Ferner aktivierte Bimakalim Kir6.2/SUR2B-Kanäle in allen verwendeten Patch-clamp-Konfigurationen (whole-cell inside-out, cell-attached), BMSA hingegen zeigte sich als K_{ATP} -Kanal-Öffner nur, wenn es auf die zytoplasmatische Seite der Zellmembran in Inside-out-Versuchen appliziert wurde. Aus diesem Bindungs- und Wirkungsverhalten schließen wir, dass K_{ATP} -Kanal-Öffner vom Benzopyrantyp ihre Bindungsregion am SUR vom Zytosol aus erreichen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertationsarbeit tragen zur Aufklärung der Struktur-Bindungs- und Struktur-Wirkungs-Beziehungen von K_{ATP} -Kanal-Modulatoren signifikant bei. Vor allem die Erkenntnisse über die Selektivität der untersuchten Sulfonylharnstoffe und Glinide haben auch klinische Relevanz.

6 Literaturverzeichnis

Abbott GW, Sesti F, Splawski I, Buck ME, Lehmann MH, Timothy KW, Keating MT und Goldstein SA (1999) MiRP1 forms IKr potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia. *Cell* **97**:175-187.

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

Aguilar-Bryan L, Nichols CG, Wechsler SW, Clement IV JP, Boyd III AE, Gonzáles G, Herrera-Soza H, Nguy K, Bryan J und Nelson DA (1995) Cloning of the β cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. *Science* **268**:423-426.

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.

Antcliff JF, Haider S, Proks P, Sansom MS und Ashcroft FM (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.

Aronow WS und Ahn C (2001) Incidence of new coronary events in older persons with diabetes mellitus and prior myocardial infarction treated with sulfonylureas, insulin, metformin, and diet alone. *Am J Cardiol* **88**:556-557.

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

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

Ashcroft FM, Harrison DE und Ashcroft SJ (1984) Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic β -cells. *Nature* **312**:446-448.

Ashcroft FM und Gribble FM (2000) New windows on the mechanism of action of K_{ATP} channel openers. *Trends Pharmacol Sci* **21**:439-445.

Ashcroft FM und Kakei M (1989) ATP-sensitive K^+ channels in rat pancreatic β -cells: modulation by ATP and Mg^{2+} ions. *J Physiol (Lond)* **416**:349-67:-67.

Ashfield R, Gribble FM, Ashcroft SJH und Ashcroft FM (1999) Identification of the high-affinity tolbutamide site on the SUR1 subunit of the K_{ATP} channel. *Diabetes* **48**:1341-1347.

Ashford ML, Sturgess NC, Trout NJ, Gardner NJ und Hales CN (1988) Adenosine-5'-triphosphate-sensitive ion channels in neonatal rat cultured central neurones. *Pflügers Arch - Eur J Physiol* **412**:297-304.

Atwal KS, Grover GJ, Ahmed SZ, Ferrara FN, Harper TW, Kim KS, Sleph PG, Dzwonczyk S, Russell AD, Moreland S und . (1993) Cardioselective anti-ischemic ATP-sensitive potassium channel openers. *J Med Chem* **36**:3971-3974.

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

Autoren der UKPDS-Studie (1998) Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet* **352** :837-853.

Babenko AP (2005) K_{ATP} channels "vingt ans apres": ATG to PDB to Mechanism. *J Mol Cell Cardiol* **39**:79-98.

Babenko AP und Bryan J (2002) SUR-dependent modulation of K_{ATP} channels by an N-terminal KIR6.2 peptide. Defining intersubunit gating interactions. *J Biol Chem* **277**:43997-44004.

Babenko AP und Bryan J (2003) Sur domains that associate with and gate K_{ATP} pores define a novel gatekeeper. *J Biol Chem* **278**:41577-41580.

Babenko AP, Gonzalez G und Bryan J (1999) The tolbutamide site of SUR1 and a mechanism for its functional coupling to K_{ATP} channel closure. *FEBS Lett* **459**:367-376.

Babenko AP, Gonzalez G und Bryan J (2000a) Pharmaco-topology of sulfonylurea receptors - Separate domains of the regulatory subunits of K_{ATP} channel isoforms are required for selective interaction with K⁺ channel openers. *J Biol Chem* **275**:717-720.

Babenko AP, Gonzalez GC und Bryan J (2000b) Hetero-concatemeric K_{IR}6.X₄/SUR1₄ channels display distinct conductivities but uniform ATP inhibition. *J Biol Chem* **275**:31563-31566.

Barroso I, Luan J, Middelberg RP, Harding AH, Franks PW, Jakes RW, Clayton D, Schafer AJ, O'Rahilly S und Wareham NJ (2003) Candidate gene association study in type 2 diabetes indicates a role for genes involved in beta-cell function as well as insulin action. *PLoS Biol* **1**:E20.

Baukrowitz T und Fakler B (2000) K-ATP channels gated by intracellular nucleotides and phospholipids. *Eur J Biochem* **267**:5842-5848.

Baukrowitz T, Schulte U, Oliver D, Herlitz S, Krauter T, Tucker SJ, Ruppertsberg JP und Fakler B (1998) PIP₂ and PIP as determinants for ATP inhibition of K_{ATP} channels. *Science* **282**:1141-1144.

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.

Bernardi H, De W, Jr., Epelbaum J, Mourre C, Amoroso S, Slama A, Fosset M und Lazdunski M (1993) ATP-modulated K⁺ channels sensitive to antidiabetic sulfonylureas are present in adenohipophysis and are involved in growth hormone release. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:1340-1344.

Bevington PR (1969) *Data reduction and error analysis for the physical sciences*, pp 55-65 and 92-118, 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_{ATP} channel complex. *FASEB J* **14**:1943-1952.

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

Blank T, Nijholt I, Kye MJ und Spiess J (2004) Small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels as targets of CNS drug development. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* **3**:161-167.

Bray KM und Quast U (1992) A specific binding site for K⁺ channel openers in rat aorta. *J Biol Chem* **267**:11689-11692.

Brenner R, Perez GJ, Bonev AD, Eckman DM, Kosek JC, Wiler SW, Patterson AJ, Nelson MT und Aldrich RW (2000) Vasoregulation by the beta1 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, 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.

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, Vila-Carriles WH, Zhao G, Babenko AP und Aguilar-Bryan L (2004) Toward Linking Structure With Function in ATP-Sensitive K⁺ Channels. *Diabetes* **53 Suppl 3**:S104-S112.

Buchheit KH und Fozard JR (1999) K_{ATP} channel openers for the treatment of airways hyperreactivity. *Pulm Pharmacol Ther* **12**:103-105.

Buckingham SD, Kidd JF, Law RJ, Franks CJ und Sattelle DB (2005) Structure and function of two-pore-domain K⁺ channels: contributions from genetic model organisms. *Trends Pharmacol Sci* **26**:361-367.

Burton FL und Smith GL (1997) The effect of cromakalim on intracellular [Ca²⁺] in isolated rat skeletal muscle during fatigue and metabolic blockade. *Exp Physiol* **82**:469-483.

Capener CE, Proks P, Ashcroft FM und Sansom MS (2003) Filter flexibility in a mammalian K channel: models and simulations of Kir6.2 mutants. *Biophys J* **84**:2345-2356.

Cartier EA, Conti LR, Vandenberg CA und Shyng S-L (2001) Defective trafficking and function of K_{ATP} channels caused by a sulfonylurea receptor 1 mutation associated with persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:2882-2887.

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 b-cell-type K_{ATP} channels. *J Pharmacol Exp Ther* **304**:1025-1032.

Chalfie M (1995) Green fluorescent protein. *Photochem Photobiol* **62**:651-656.

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

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

Chang G (2003) Structure of MsbA from *Vibrio cholera*: a multidrug resistance ABC transporter homolog in a closed conformation. *J Mol Biol* **330**:419-430.

Chen J, Lu G, Lin J, Davidson AL und Quirocho FA (2003) A tweezers-like motion of the ATP-binding cassette dimer in an ABC transport cycle. *Mol Cell* **12**:651-661.

Cheng Y und Prusoff WH (1973) Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 % inhibition (IC₅₀) 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, 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.

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

Clement IV JP, Kunjilwar K, Gonzalez G, Schwanstecher M, Panten U, Aguilar-Bryan L und Bryan J (1997) Association and stoichiometry of K_{ATP} channel subunits. *Neuron* **18**:827-838.

Cleveland JC, Jr., Meldrum DR, Cain BS, Banerjee A und Harken AH (1997) Oral sulfonylurea hypoglycemic agents prevent ischemic preconditioning in human myocardium. Two paradoxes revisited. *Circulation* **96**:29-32.

Cohen MV, Baines CP und Downey JM (2000) Ischemic preconditioning: From adenosine receptor to K_{ATP} channel. *Annu Rev Physiol* **62**:79-109.

Conti LR, Radeke CM und Vandenberg CA (2002) Membrane targeting of ATP-sensitive potassium channel. Effects of glycosylation on surface expression. *J Biol Chem* **277**:25416-25422.

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.

Crane A und Aguilar-Bryan L (2004) Assembly, maturation, and turnover of K_{ATP} channel subunits. *J Biol Chem* **279**:9080-9090.

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.

Cui N, Kang Y, He Y, Leung YM, Xie H, Pasyk EA, Gao X, Sheu L, Hansen JB, Wahl P, Tsushima RG und Gaisano HY (2004) H3 domain of syntaxin 1A inhibits K_{ATP} channels by its actions on the sulfonylurea receptor 1 nucleotide-binding folds-1 and -2. *J Biol Chem* **279**:53259-53265.

Curran ME (1998) Potassium ion channels and human disease: phenotypes to drug targets? *Curr Opin Biotechnol* **9**:565-572.

- D'hahan N, Moreau C, Prost AL, Jacquet H, Alekseev AE, Terzic A und Vivaudou M (1999) Pharmacological plasticity of cardiac ATP-sensitive potassium channels toward diazoxide revealed by ADP. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:12162-12167.
- Dabrowski M, Wahl P, Holmes WE und Ashcroft FM (2001) Effect of repaglinide on cloned beta cell, cardiac and smooth muscle types of ATP-sensitive potassium channels. *Diabetologia* **44**:747-756.
- 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.
- Davidson AL und Chen J (2005) Structural biology. Flipping lipids: is the third time the charm? *Science* **308**:963-965.
- Dong J, Yang G und McHaourab HS (2005) Structural basis of energy transduction in the transport cycle of MsbA. *Science* **308**:1023-1028.
- Dörschner H, Brekardin E, Uhde I, Schwanstecher C und Schwanstecher M (1999) Stoichiometry of sulfonylurea-induced ATP-sensitive potassium channel closure. *Mol Pharmacol* **55**:1060-1066.
- Doupnik CA, Davidson N und Lester HA (1995) The inward rectifier potassium channel family. *Curr Op Neurobiol* **5**:268-277.
- Drain P, Li L und Wang J (1998) K_{ATP} channel inhibition by ATP requires distinct functional domains of the cytoplasmic C terminus of the pore-forming subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:13953-13958.
- Dunne MJ, Cosgrove KE, Shepherd RM, Aynsley-Green A und Lindley KJ (2004) Hyperinsulinism in infancy: from basic science to clinical disease. *Physiol Rev* **84**:239-275.
- Edwards G und Weston AH (1993) The pharmacology of ATP-sensitive potassium channels. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **33**:597-637.
- Enkvetchakul D und Nichols CG (2003) Gating mechanism of K_{ATP} channels: function fits form. *J Gen Physiol* **122**:471-480.
- Fan Z und Makielski JC (1997) Anionic phospholipids activate ATP-sensitive potassium channels. *J Biol Chem* **272**:5388-5395.
- Farouque HM, Worthley SG, Meredith IT, Skyrme-Jones RA und Zhang MJ (2002) Effect of ATP-sensitive potassium channel inhibition on resting coronary vascular responses in humans. *Circ Res* **90**:231-236.

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

Findlay I (1993) Sulphonylurea drugs no longer inhibit ATP-sensitive K⁺ channels during metabolic stress in cardiac muscle. *J Pharmacol Exp Ther* **266**:456-467.

Gadsby DC, Nagel G und Hwang TC (1995) The CFTR chloride channel of mammalian heart. *Annu Rev Physiol* **57**:387-416.

Garcia-Calvo M, Knaus HG, McManus OB, Giangiacomo KM, Kaczorowski GJ und Garcia ML (1994) Purification and reconstitution of the high-conductance, calcium-activated potassium channel from tracheal smooth muscle. *J Biol Chem* **269**:676-682.

Garratt KN, Brady PA, Hassinger NL, Grill DE, Terzic A und Holmes DRJ (1999) Sulphonylurea drugs increase early mortality in patients with diabetes mellitus after direct angioplasty for acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* **33**:119-124.

Giblin JP, Leaney JL und Tinker A (1999) The molecular assembly of ATP-sensitive potassium channels - Determinants on the pore forming subunit. *J Biol Chem* **274**:22652-22659.

Gloyn AL (2003) Glucokinase (GCK) mutations in hyper- and hypoglycemia: maturity-onset diabetes of the young, permanent neonatal diabetes, and hyperinsulinemia of infancy. *Hum Mutat* **22**:353-362.

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 KATP 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. *New England Journal of Medicine* **350**:1838-1849.

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). *Diabetic Medicine* **18**:206-212.

Gögelein H (2001) Inhibition of cardiac ATP-dependent potassium channels by sulphonylurea drugs. *Curr Op Investigational Drugs* **2**:72-80.

Gögelein H, Englert HC, Kotzan A, Hack R, Lehr K-H, Seiz W, Becker RHA, Sultan E, Schölkens BA und Busch AE (2000) HMR 1098: An inhibitor of cardiac ATP-sensitive potassium channels. *Cardiovasc Drug Rev* **18**:157-174.

Goodmann & Gilman's (2001) *The pharmacological basis of therapeutics*.

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.

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

Grell W, Hurnaus R, Griss G, Sauter R, Rupprecht E, Mark M, Luger P, Nar H, Wittneben H und Müller P (1998) Repaglinide and related hypoglycemic benzoic acid derivatives. *J Med Chem* **41**:5219-5246.

Gribble FM, Ashfield R, Ämmälä C und Ashcroft FM (1997a) Properties of cloned ATP-sensitive K⁺ currents expressed in *Xenopus* oocytes. *J Physiol (Lond)* **498**:87-98.

Gribble FM, Proks P, Corkey BE und Ashcroft FM (1998a) Mechanism of cloned ATP-sensitive potassium channel activation by oleoyl-CoA. *J Biol Chem* **273**:26383-26387.

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

Gribble FM, Tucker SJ und Ashcroft FM (1997c) The interaction of nucleotides with the tolbutamide block of cloned ATP-sensitive K⁺ channel currents expressed in *Xenopus* oocytes: a reinterpretation. *J Physiol (Lond)* **504**:35-45.

Gribble FM, Tucker SJ, Seino S und Ashcroft FM (1998b) Tissue specificity of sulfonylureas: Studies on cloned cardiac and b-cell K_{ATP} channels. *Diabetes* **47**:1412-1418.

Gromada J, Dissing S, Kofod H und Frøkjær-Jensen J (1995) Effects of the hypoglycaemic drugs repaglinide and glibenclamide on ATP-sensitive potassium-channels and cytosolic calcium levels in beta TC3 cells and rat pancreatic beta cells. *Diabetologia* **38**:1025-1032.

Gross GJ und Peart JN (2003) K_{ATP} channels and myocardial preconditioning: an update. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **285**:H921-H930.

Gross GJ und Fryer RM (1999) Sarcolemmal versus mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels and myocardial preconditioning. *Circ Res* **84**:973-979.

Grover GJ (1994) Protective effects of ATP-sensitive potassium-channel openers in experimental myocardial ischemia. *J Cardiovasc Pharmacol* **24**:S18-S27.

Grover GJ, McCullough JR, D'Alonzo AJ, Sargent CA und Atwal KS (1995) Cardioprotective profile of the cardiac-selective ATP-sensitive potassium channel opener BMS-180448. *J Cardiovasc Pharmacol* **25**(1):40-50.

Gustin MC, Martinac B, Saimi Y, Culbertson MR und Kung C (1986) Ion channels in yeast. *Science* **233**:1195-1197.

Gutman GA, Chandy KG, Adelman JP, Aiyar J, Bayliss DA, Clapham DE, Covarrubias M, Desir GV, Furuichi K, Ganetzky B, Garcia ML, Grissmer S, Jan LY, Karschin A, Kim D, Kuperschmidt S, Kurachi Y, Lazdunski M, Lesage F, Lester HA, Mckinnon D, Nichols CG, O'Kelly I, Robbins J, Robertson GA, Rudy B, Sanguinetti M, Seino S, Stuehmer W, Tamkun MM, Vandenberg CA, Wei A, Wulff H und Wymore RS (2003) International Union of Pharmacology. XLI. Compendium of voltage-gated ion channels: Potassium channels. *Pharmacol Rev* **55**:583-586.

Gutsche K, Schroder E, Rufer C und Loge O (1974) [New hypoglycemic benzenesulfonamido-pyrimidines N-substituted 4- N-(2-pyrimidinyl) sulfonyl--phenylacetamides]. *Arzneimittelforschung* **24**:1028-1039.

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

Hambrock A, Kayar T, Stumpp D und Osswald H (2004) Effect of two amino acids in TM17 of Sulfonylurea receptor SUR1 on the binding of ATP-sensitive K⁺ channel modulators. *Diabetes* **53 Suppl 3**:S128-S134.

Hambrock A, Löffler-Walz C, Kloor D, Delabar U, Horio Y, Kurachi Y und Quast U (1999) ATP-Sensitive K⁺ channel modulator binding to sulfonylurea receptors SUR2A and SUR2B: opposite effects of MgADP. *Mol Pharmacol* **55**:832-840.

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

Hambrock A, Löffler-Walz C und Quast U (2002a) Glibenclamide binding to sulphonylurea receptor subtypes: dependence on adenine nucleotides. *Br J Pharmacol* **136**:995-1004.

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

Hambrock A, Preisig-Müller R, Russ U, Piehl A, Hanley PJ, Ray J, Daut J, Quast U und Derst C (2002b) Four novel splice variants of sulfonylurea receptor 1. *Am J Physiol (Cell Physiol)* **283**:C587-C598.

Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B und Sigworth FJ (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch - Eur J Physiol* **391**:85-100.

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

Hanley PJ und Daut J (2005) K_{ATP} channels and preconditioning: a re-examination of the role of mitochondrial K_{ATP} channels and an overview of alternative mechanisms. *J Mol Cell Cardiol* **39**:17-50.

Hansen AM, Christensen IT, Hansen JB, Carr RD, Ashcroft FM und Wahl P (2002) Differential interactions of nateglinide and repaglinide on the human beta-cell sulphonylurea receptor 1. *Diabetes* **51**:2789-2795.

Hansen AM, Hansen JB, Carr RD, Ashcroft FM und Wahl P (2005) Kir6.2-dependent high-affinity repaglinide binding to beta-cell K_{ATP} channels. *Br J Pharmacol* **144**:551-557.

Hata N, Takano M, Kunimi T, Kishida H und Takano T (2001) Lack of antagonism between nicorandil and sulfonylurea in stable angina pectoris. *Int J Clin Pharmacol Res* **21**:59-63.

Heginbotham L, Abramson T und MacKinnon R (1992) A functional connection between the pores of distantly related ion channels as revealed by mutant K⁺ channels. *Science* **258**:1152-1155.

Henwood MJ, Kelly A, Macmullen C, Bhatia P, Ganguly A, Thornton PS und Stanley CA (2005) Genotype-phenotype correlations in children with congenital hyperinsulinism due to recessive mutations of the adenosine triphosphate-sensitive potassium channel genes. *J Clin Endocrinol Metab* **90**:789-794.

Heron L, Virsolvy A, Peyrollier K, Gribble FM, LeCam A, Ashcroft FM und Bataille D (1998) Human alpha-endosulfine, a possible regulator of sulfonylurea-sensitive K_{ATP} channel: Molecular cloning, expression and biological properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:8387-8391.

Hescheler J, Pelzer D, Trube G und Trautwein W (1982) Does the organic calcium channel blocker D600 act from inside or outside on the cardiac cell membrane? *Pflügers Arch - Eur J Physiol* **393**:287-291.

Hewitt EW und Lehner PJ (2003) The ABC-transporter signature motif is required for peptide translocation but not peptide binding by TAP. *Eur J Immunol* **33**:422-427.

- Higgins CF und Linton KJ (2004) The ATP switch model for ABC transporters. *Nat Struct Mol Biol* **11**:918-926.
- Hilgemann DW und Ball R (1996) Regulation of cardiac Na⁺, Ca²⁺ exchange and K_{ATP} potassium channels by PIP₂. *Science* **273**:956-959.
- Hille B (1977) Local anesthetics: hydrophilic and hydrophobic pathways for the drug-receptor reaction. *J Gen Physiol* **69**:497-515.
- Hille B (2001) *Ionic Channels of Excitatable Membranes*, Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts.
- Huizar JF, Gonzalez LA, Alderman J und Smith HS (2003) Sulfonylureas attenuate electrocardiographic ST-segment elevation during an acute myocardial infarction in diabetics. *J Am Coll Cardiol* **42**:1017-1021.
- Hunter M und Giebisch G (1988) Calcium-activated K-channels of Amphiuma early distal tubule: inhibition by ATP. *Pflügers Arch - Eur J Physiol* **412**:331-333.
- 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 sulfonylurea 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_{KATP}: an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science* **270**:1166-1170.
- 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⁺ channels. *Neuron* **16**:1011-1017.
- 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.
- Inoue H, Ferrer J, Warren-Perry M, Zhang Y, Millns H, Turner RC, Elbein SC, Hampe CL, Suarez BK, Inagaki N, Seino S und Permutt MA (1997) Sequence variants in the pancreatic islet beta-cell inwardly rectifying K⁺ channel Kir6.2 (Bir) gene: identification and lack of role in Caucasian patients with NIDDM. *Diabetes* **46**:502-507.
- Inoue I, Nagase H, Kishi K und Higuti T (1991) ATP-sensitive K⁺ channel in the mitochondrial inner membrane. *Nature* **352**:244-247.

Isomoto S, Kondo C, Yamada M, Matsumoto S, Higashiguchi O, Horio Y, Matsuzawa Y und Kurachi Y (1996) A novel sulfonylurea receptor forms with BIR (KIR6.2) a smooth muscle type ATP-sensitive K⁺ channel. *J Biol Chem* **271**:24321-24324.

Jan LY und Jan YN (1994) Potassium channels and their evolving gates. *Nature* **371**:119-122.

Jung DW, Baysal K und Brierley GP (1995) The sodium-calcium antiport of heart mitochondria is not electroneutral. *J Biol Chem* **270**:672-678.

Kamp F, Kizilbash N, Corkey BE, Berggren PO und Hamilton JA (2003) Sulfonylureas rapidly cross phospholipid bilayer membranes by a free-diffusion mechanism. *Diabetes* **52**:2526-2531.

Karow T und Lang R (2002) *Vasodilatoren*, pp 68-70

Katz LB, Giardino EC, Salata JJ, Moore JB, Jr. und Falotico R (1993) RWJ 26629, a new potassium channel opener and vascular smooth muscle relaxant: a potential antihypertensive and antianginal agent. *J Pharmacol Exp Ther* **267**:648-656.

Ketchum KA, Joiner WJ, Sellers AJ, Kaczmarek LK und Goldstein SA (1995) A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem. *Nature* **376**:690-695.

Klein A, Lichtenberg J, Stephan D und Quast U (2005) Lipids modulate ligand binding to sulphonylurea receptors. *Br J Pharmacol* **145**:907-915.

Koster JC, Sha Q und Nichols CG (1999) Sulfonylurea and K⁺-channel opener sensitivity of K_{ATP} channels - *Functional coupling of Kir6.2 and SUR1 subunits. J Gen Physiol* **114**:203-213.

Krause E, Englert H und Gögelein H (1995) Adenosine triphosphate-dependent K currents activated by metabolic inhibition in rat ventricular myocytes differ from those elicited by the channel opener rilmakalim. *Pflügers Arch -Eur J Physiol* **429**:625-635.

Krauter T, Ruppertsberg JP und Baukrowitz T (2001) Phospholipids as modulators of K_{ATP} channels: Distinct mechanisms for control of sensitivity to sulphonylureas, K⁺ channel openers, and ATP. *Mol Pharmacol* **59**:1086-1093.

Kruh GD, Zeng H, Rea PA, Liu G, Chen ZS, Lee K und Belinsky MG (2001) MRP subfamily transporters and resistance to anticancer agents. *J Bioenerg Biomembr* **33**:493-501.

Kuo A, Gulbis JM, Antcliff JF, Rahman T, Lowe ED, Zimmer J, Cuthbertson J, Ashcroft FM, Ezaki T und Doyle DA (2003) Crystal structure of the potassium channel KirBac1.1 in the closed state. *Science* **300**:1922-1926.

Larsson O, Deeney JT, Bränström R, Berggren PO und Corkey BE (1996) Activation of the ATP-sensitive K^+ channel by long chain acyl-CoA. A role in modulation of pancreatic beta-cell glucose sensitivity. *J Biol Chem* **271**:10623-10626.

Latorre R, Oberhauser A, Labarca P und Alvarez O (1989) Varieties of calcium-activated potassium channels. *Annu Rev Physiol* **51**:385-399.

Laukkanen O, Pihlajamäki J, Lindström J, Eriksson J, Valle TT, Hamalainen H, Ilanne-Parikka P, Keinänen-Kiukaanniemi S, Tuomilehto J, Uusitupa M und Laakso M (2004) Polymorphisms of the SUR1 (ABCC8) and Kir6.2 (KCNJ11) genes predict the conversion from impaired glucose tolerance to type 2 diabetes. The Finnish Diabetes Prevention Study. *J Clin Endocrinol Metab* **89**:6286-6290.

Leslie EM, Deeley RG und Cole SP (2001) Toxicological relevance of the multidrug resistance protein 1, MRP1 (ABCC1) and related transporters. *Toxicology* **167**:3-23.

Levin BE, Dunn-Meynell AA und Routh VH (1999) Brain glucose sensing and body energy homeostasis: role in obesity and diabetes. *Am J Physiol* **276**:R1223-R1231.

Lewis HA, Buchanan SG, Burley SK, Conners K, Dickey M, Dorwart M, Fowler R, Gao X, Guggino WB, Hendrickson WA, Hunt JF, Kearins MC, Lorimer D, Maloney PC, Post KW, Rajashankar KR, Rutter ME, Sauder JM, Shriver S, Thibodeau PH, Thomas PJ, Zhang M, Zhao X und Emtage S (2004) Structure of nucleotide-binding domain 1 of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *EMBO J* **23**:282-293.

Li JH, Yasay GD, Zografos P, Kau ST, Ohnmacht CJ, Russell K, Empfield JR, Brown FJ, Trainor DA, Bonev AD und . (1995) Zeneca ZD6169 and its analogs from a novel series of anilide tertiary carbinols: in vitro K_{ATP} channel opening activity in bladder detrusor. *Pharmacology* **51**:33-42.

Light PE, Comtois AS und Renaud JM (1994) The effect of glibenclamide on frog skeletal muscle: evidence for K^{+ATP} channel activation during fatigue. *J Physiol (Lond)* **475**:495-507.

Liu GX, Hanley PJ, Ray J und Daut J (2001) Long-chain acyl-coenzyme A esters and fatty acids directly link metabolism to K_{ATP} channels in the heart. *Circ Res* **88**:918-924.

Locher KP, Lee AT und Rees DC (2002) The *E-coli* BtuCD structure: A framework for ABC transporter architecture and mechanism. *Science* **296**:1091-1098.

Löffler C und Quast U (1997) Pharmacological characterization of the sulphonylurea receptor in rat isolated aorta. *Br J Pharmacol* **120**:476-480.

- Löffler-Walz C, Hambrock A und Quast U (2002) Interaction of K_{ATP} channel modulators with sulfonylurea receptor SUR2B: implication for tetramer formation and allosteric coupling of subunits. *Mol Pharmacol* **61**:407-414.
- Loussouarn G, Phillips LR, Masia R, Rose T und Nichols CG (2001) Flexibility of the Kir6.2 inward rectifier K^+ channel pore. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:4227-4232.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL und Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**:265-275.
- Lynch JJ, Jr., Sanguinetti MC, Kimura S und Bassett AL (1992) Therapeutic potential of modulating potassium currents in the diseased myocardium. *FASEB J* **6**:2952-2960.
- Magge SN, Shyng SL, Macmullen C, Steinkrauss L, Ganguly A, Katz LE 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^{4+} mediates closure of pancreatic β -cell ATP -sensitive potassium channels by interaction with 1 of 4 identical sites. *Diabetes* **49**:1413-1418.
- Masia R, Enkvetchakul D und Nichols CG (2005) Differential nucleotide regulation of K_{ATP} channels by SUR1 and SUR2A. *J Mol Cell Cardiol* **39**:491-501.
- Matsuo M, Kimura Y und Ueda K (2005) K_{ATP} channel interaction with adenine nucleotides. *J Mol Cell Cardiol* **38**:907-916.
- 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.
- Matsuoka T, Matsushita K, Katayama Y, Fujita A, Inageda K, Tanemoto M, Inanobe A, Yamashita S, Matsuzawa Y und Kurachi Y (2000) C-terminal tails of sulfonylurea receptors control ADP -induced activation and diazoxide modulation of ATP -sensitive K^+ channels. *Circ Res* **87**:873-880.
- Matsushita K, Kinoshita K, Matsuoka T, Fujita A, Fujikado T, Tano Y, Nakamura H und Kurachi Y (2002) Intramolecular interaction of SUR2 subtypes for intracellular ADP -induced differential control of K_{ATP} channels. *Circ Res* **90**:554-561.
- Meinert CL, Knatterud GL, Prout TE und Klimt CR (1970) A study of the effects of hypoglycemic agents on vascular complications in patients with adult-onset diabetes. II. Mortality results. *Diabetes* **19**:Suppl-830.

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 WH, Shimomura K, Zadek B, Collins RF, Sansom MS, Ford RC und Ashcroft FM (2005) 3-D structural and functional characterization of the purified KATP channel complex Kir6.2-SUR1. *EMBO J* **24**:4166-4175.

Mikhailov MV, Mikhailova EA und Ashcroft SJH (2001) Molecular structure of the glibenclamide binding site of the b-cell K-ATP channel. *FEBS Lett* **499**:154-160.

Mikhailov MV, Mikhailova EA und Ashcroft SJH (2000) Investigation of the molecular assembly of b-cell K_{ATP} channels. *FEBS Lett* **482**:59-64.

Miki T und Seino S (2005) Roles of K_{ATP} channels as metabolic sensors in acute metabolic changes. *J Mol Cell Cardiol* **38**:917-925.

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. *Nature 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⁺ channel-mediated glucose uptake is independent of IRS-1/phosphatidylinositol 3-kinase signaling. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **285**:E1289-E1296.

Miura H, Wachtel RE, Loberiza FR, Jr., Saito T, Miura M, Nicolosi AC und Gutterman DD (2003) Diabetes mellitus impairs vasodilation to hypoxia in human coronary arterioles: reduced activity of ATP-sensitive potassium channels. *Circ Res* **92**:151-158.

Moreau C, Gally F, Jacquet-Bouix H und Vivaudou M (2005a) The size of a single residue of the sulphonylurea receptor dictates the effectiveness of K_{ATP} channel openers. *Mol Pharmacol* **67**:1026-1033.

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

Moreau C, Prost A-L, Dérand R und Vivaudou M (2005b) SUR, ABC proteins targeted by K_{ATP} channel openers. *J Mol Cell Cardiol* **38**:951-963.

Munch-Ellingsen J, Lokebo JE, Bugge E, Jonassen AK, Ravingerova T und Ytrehus K (2000) 5-HD abolishes ischemic preconditioning independently of monophasic action potential duration in the heart. *Basic Res Cardiol* **95**:228-234.

Murry CE, Jennings RB und Reimer KA (1986) Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* **74**:1124-1136.

Nelson MT und Quayle JM (1995) Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol (Cell Physiol)* **268**:C799-C822.

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

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

Nielsen EM, Hansen L, Carstensen B, Echwald SM, Drivsholm T, Glumer 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.

Nielsen FE, Bodvarsdottir TB, Worsaae A, MacKay P, Stidsen CE, Boonen HC, Pridal L, Arkhammar PO, 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.

Nishida M und MacKinnon R (2002) Structural basis of inward rectification: cytoplasmic pore of the G protein-gated inward rectifier GIRK1 at 1.8 Å resolution. *Cell* **111**:957-965.

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

Numberger M. und Draguhn A. (1996) *Patch-Clamp-Technik*

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

Patel AJ, Honore E, Lesage F, Fink M, Romey G und Lazdunski M (1999) Inhalational anesthetics activate two-pore-domain background K⁺ channels. *Nat Neurosci* **2**:422-426.

Pegan S, Arrabit C, Zhou W, Kwiatkowski W, Collins A, Slesinger PA und Choe S (2005) Cytoplasmic domain structures of Kir2.1 and Kir3.1 show sites for modulating gating and rectification. *Nat Neurosci* **8**:279-287.

Pfaffinger PJ, Martin JM, Hunter DD, Nathanson NM und Hille B (1985) GTP-binding proteins couple cardiac muscarinic receptors to a K channel. *Nature* **317**:536-538.

Proks P, Antcliff JF, Lippiat J, Gloyn AL, Hattersley AT und Ashcroft FM (2004) Molecular basis of Kir6.2 mutations associated with neonatal diabetes or neonatal diabetes plus neurological features. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:17539-17544.

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

Quast U (1996) ATP-sensitive K⁺ channels in the kidney. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **354**:213-225.

Quast U, Bray KM, Andres H, Manley PW, Baumlin Y und Dosogne J (1993) Binding of the K⁺ channel opener [³H]P1075 in rat isolated aorta: relationship to functional effects of openers and blockers. *Mol Pharmacol* **43**:474-481.

Quast U und Cook NS (1989) Moving together: K⁺ channel openers and ATP-sensitive K⁺ channels. *Trends Pharmacol Sci* **10**:431-435.

Quast U, Guillon JM und Cavero I (1995) Modulation of K⁺ channels: pharmacological and therapeutic aspects, in *Pharmacological Control of Calcium and Potassium Homeostasis* (Godfraind T und et al. eds) pp 23-42, Kluwer Academic Publishers and Fondazione Giovanni Lorenzini,

Quast U, Stephan D, Bieger S und Russ U (2004) The impact of ATP-sensitive K⁺ channel subtype selectivity of insulin secretagogues for the coronary vasculature and the myocardium. *Diabetes* **53**:S156-S164.

Quayle JM, Nelson MT und Standen NB (1997) ATP-sensitive and inwardly rectifying potassium channels in smooth muscle. *Physiol Rev* **77**:1165-1232.

- Quinn KV, Giblin JP und Tinker A (2004) Multisite phosphorylation mechanism for protein kinase A activation of the smooth muscle ATP-sensitive K⁺ channel. *Circ Res* **94**:1359-1366.
- Rainbow RD, James M, Hudman D, Al Johi M, Singh H, Watson PJ, Ashmole I, Davies NW, Lodwick D und Norman RI (2004) Proximal C-terminal domain of sulphonylurea receptor 2A interacts with pore-forming Kir6 subunits in K_{ATP} channels. *Biochem J* **379**:173-181.
- Reimann F, Ashcroft FM und Gribble FM (2001a) Structural basis for the interference between nicorandil and sulfonylurea action. *Diabetes* **50**:2253-2259.
- Reimann F, Dabrowski M, Jones P, Gribble FM und Ashcroft FM (2003) Analysis of the differential modulation of sulphonylurea block of beta-cell and cardiac ATP-sensitive K⁺ (K_{ATP}) channels by Mg-nucleotides. *J Physiol (Lond)* **547**:159-168.
- Reimann F, Gribble FM und Ashcroft FM (2000) Differential response of K_{ATP} channels containing SUR2A or SUR2B subunits to nucleotides and pinacidil. *Mol Pharmacol* **58**:1318-1325.
- Reimann F, Proks P und Ashcroft FM (2001b) Effects of mitiglinide (S 21403) on Kir6.2/SUR1, Kir6.2/SUR2A and Kir6.2/SUR2B types of ATP-sensitive potassium channel. *Br J Pharmacol* **132**:1542-1548.
- Reimann F, Tucker SJ, Proks P und Ashcroft FM (1999) Involvement of the N-terminus of Kir6.2 in coupling to the sulphonylurea receptor. *J Physiol (Lond)* **518**:325-336.
- Reyes CL und Chang G (2005) Structure of the ABC transporter MsbA in complex with ADP.vanadate and lipopolysaccharide. *Science* **308**:1028-1031.
- Ribalet B, John SA und Weiss JN (2003) Molecular basis for Kir6.2 channel inhibition by adenine nucleotides. *Biophys J* **84**:266-276.
- Ribalet B, John SA und Weiss JN (2000) Regulation of cloned ATP-sensitive K channels by phosphorylation, MgADP, and phosphatidylinositol bisphosphate (PIP₂) - A study of channel rundown and reactivation. *J Gen Physiol* **116**:391-409.
- Riedel MJ, Boora P, Steckley D, De Vries G und Light PE (2003) Kir6.2 polymorphisms sensitize beta-cell ATP-sensitive potassium channels to activation by acyl CoAs: a possible cellular mechanism for increased susceptibility to type 2 diabetes? *Diabetes* **52**:2630-2635.
- Riordan JR (1993) The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Annu Rev Physiol* **55**:609-630.

Rosenberg MF, Kamis AB, Aleksandrov LA, Ford RC und Riordan JR (2004) Purification and crystallization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *J Biol Chem* **279**:39051-39057.

Rosenberg MF, Kamis AB, Callaghan R, Higgins CF und Ford RC (2003) Three-dimensional structures of the mammalian multidrug resistance P-glycoprotein demonstrate major conformational changes in the transmembrane domains upon nucleotide binding. *J Biol Chem* **278**:8294-8299.

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

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

Russ U, Hambrock A, Artunc F, Löffler-Walz C, Horio Y, Kurachi Y und Quast U (1999) Coexpression with the inward rectifier K⁺ channel Kir6.1 increases the affinity of the vascular 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_{ATP} channel openers in the absence of Mg²⁺. *Br J Pharmacol* **139**:368-380.

Sagen JV, Raeder H, Hathout E, Shehadeh N, Gudmundsson K, Baevre H, Abuelo D, Phornphutkul C, Molnes J, Bell GI, Gloyn AL, Hattersley AT, Molven A, Sovik O und Njolstad 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, 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, 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 b-cells, brain, heart and skeletal muscle. *FEBS Lett* **377**:338-344.

Sakura H, Trapp S, Liss B und Ashcroft FM (1999) Altered functional properties of K_{ATP} channel conferred by a novel splice variant of SUR1. *J Physiol (Lond)* **521**:337-350.

Salamon E, Mannhold R, Weber H, Lemoine H und Frank W (2002) 6-Sulfonylchromenes as highly potent K_{ATP}-channel openers. *J Med Chem* **45**:1086-1097.

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

Sánchez JA, Gonoï T, Inagaki N, Katada T und Seino S (1998) Modulation of reconstituted ATP-sensitive K⁺ channels by GTP-binding proteins in a mammalian cell line. *J Physiol (Lond)* **507**:315-324.

Sanguinetti MC und Spector PS (1997) Potassium channelopathies. *Neuropharmacology* **36**:755-762.

Sanguinetti MC und Jurkiewicz NK (1990) Two components of cardiac delayed rectifier K⁺ current. Differential sensitivity to block by class III antiarrhythmic agents. *J Gen Physiol* **96**:195-215.

Sartor G, Melander A, Schersten B und Wahlin-Boll E (1980) Serum glibenclamide in diabetic patients, and influence of food on the kinetics and effects of glibenclamide. *Diabetologia* **18**:17-22.

Satoh E, Yamada M, Kondo C, Repunte VP, Horio Y, Iijima T und Kurachi Y (1998) Intracellular nucleotide-mediated gating of SUR/Kir6.0 complex potassium channels expressed in a mammalian cell line and its modification by pinacidil. *J Physiol (Lond)* **511**:663-674.

Sausbier M, Arntz C, Bucurenciu I, Zhao H, Zhou XB, Sausbier U, Feil S, Kamm S, Essin K, Sailer CA, Abdullah U, Krippeit-Drews P, Feil R, Hofmann F, Knaus HG, 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 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 Ca²⁺-activated K⁺ channel deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:9474-9478.

Sausbier U, Sausbier M, Sailer CA, Arntz C, Knaus HG, Neuhuber W und Ruth P (2006) Ca²⁺-activated K⁺ channels of the BK-type in the mouse brain. *Histochem Cell Biol* **125**:725-741.

Schreiber M, Yuan A und Salkoff L (1999) Transplantable sites confer calcium sensitivity to BK channels. *Nat Neurosci* **2**:416-421.

Schulze D, Rapedius M, Krauter T und Baukrowitz T (2003) Long-chain acyl-CoA esters and phosphatidylinositol phosphates modulate ATP inhibition of K_{ATP} channels by the same mechanism. *J Physiol (Lond)* **552**:357-367.

Schwanstecher C, Dickel C und Panten U (1992a) Cytosolic nucleotides enhance the tolbutamide sensitivity of the ATP-dependent K⁺ channel in mouse pancreatic B cells by their combined actions at inhibitory and stimulatory receptors. *Mol Pharmacol* **41**:480-486.

Schwanstecher C, Meyer U und Schwanstecher M (2002a) K_{IR}6.2 polymorphism predisposes to type 2 diabetes by inducing overactivity of pancreatic β -cell ATP-sensitive K⁺ channels. *Diabetes* **51**:875-879.

Schwanstecher C, Neugebauer B, Schulz M und Schwanstecher M (2002b) The common single nucleotide polymorphism E23K in $K_{IR}6.2$ sensitizes pancreatic β -cell ATP-sensitive potassium channels toward activation through nucleoside diphosphates. *Diabetes* **51**:S363-S367.

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

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

Schwanstecher M, Schwanstecher C, Dickel C, Chudziak F, Moshiri A und Panten U (1994a) Location of the sulphonylurea receptor at the cytoplasmic face of the beta-cell membrane. *Br J Pharmacol* **113**:903-911.

Schwanstecher M, Löser S, Chudziak F und Panten U (1994b) Identification of a 38-kDa high affinity sulphonylurea-binding peptide in insulin-secreting cells and cerebral cortex. *J Biol Chem* **269**:17768-17771.

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 sulphonylurea receptors. *EMBO J* **17**:5529-5535.

Schwappach B, Zerangue N, Jan YN und Jan LY (2000) Molecular basis for K_{ATP} assembly: Transmembrane interactions mediate association of a K^+ channel with an ABC transporter. *Neuron* **26**:155-167.

Seino S (1999) ATP-sensitive potassium channels: A model of heteromultimeric potassium channel/receptor assemblies. *Annu Rev Physiol* **61**:337-362.

Seino S und Miki T (2003) Physiological and pathophysiological roles of ATP-sensitive K^+ channels. *Prog Biophys Mol Biol* **81**:133-176.

Sharma N, Crane A, Clement IV JP, Gonzalez G, Babenko AP, Bryan J und Aguilar-Bryan L (1999) The C terminus of SUR1 is required for trafficking of K_{ATP} Channels. *J Biol Chem* **274**:20628-20632.

Shindo T, Yamada M, Isomoto S, Horio Y und Kurachi Y (1998) SUR2 subtype (A and B)-dependent differential activation of the cloned ATP-sensitive K^+ channels by pinacidil and nicorandil. *Br J Pharmacol* **124**:985-991.

Shyng S-L, Ferrigni T und Nichols CG (1997) Regulation of K_{ATP} channel activity by diazoxide and MgADP. Distinct functions of the two nucleotide binding folds of the sulphonylurea receptor. *J Gen Physiol* **110**:643-654.

- Shyng S-L und Nichols CG (1997) Octameric stoichiometry of the K_{ATP} channel complex. *J Gen Physiol* **110**:655-664.
- Shyng S-L und Nichols CG (1998) Membrane phospholipid control of nucleotide sensitivity of K_{ATP} channels. *Science* **282**:1138-1141.
- Simpson SH, Majumdar SR, Tsuyuki RT, Eurich DT und Johnson JA (2006) Dose-response relation between sulfonylurea drugs and mortality in type 2 diabetes mellitus: a population-based cohort study. *CMAJ* **174**:169-174.
- 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.
- Standen NB, Quayle JM, Davies NW, Brayden JE, Huang Y und Nelson MT (1989) Hyperpolarizing vasodilators activate ATP-sensitive K^+ channels in arterial smooth muscle. *Science* **245**:177-180.
- Stanley CA, Lieu YK, Hsu BY, 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, Salamon E, Weber H, Ruß U, Lemoine H und Quast U (2006a) K_{ATP} channel openers of the benzopyran type reach their binding site via the cytosol. *Br J Pharmacol* **149**:199-205.
- Stephan D, Stauss E, Lange U, Felsch H, Löffler-Walz C, Hambrock A, Ruß U und Quast U (2005) The mutation Y1206S increases the affinity of the sulphonylurea receptor SUR2A for glibenclamide and enhances the effects of coexpression with Kir6.2. *Br J Pharmacol* **144**:1078-1088.
- Stephan D, Winkler M, Kuhner P, Ruß U und Quast U (2006b) Selectivity of repaglinide and glibenclamide for the pancreatic over the cardiovascular K_{ATP} channels. *Diabetologia* **49**:2039-2048.
- Stevens RJ, Coleman RL, Adler AI, Stratton IM, Matthews DR und Holman RR (2004) Risk factors for myocardial infarction case fatality and stroke case fatality in type 2 diabetes: UKPDS 66. *Diabetes Care* **27**:201-207.
- Storm JF (1990) Potassium currents in hippocampal pyramidal cells. *Prog Brain Res* **83**:161-187.
- Suzuki M, Fujikura K, Inagaki N, Seino S und Takata K (1997a) Localization of the ATP-sensitive K^+ channel subunit Kir6.2 in mouse pancreas. *Diabetes* **46**:1440-1444.

Suzuki M, Kotake K, Fujikura K, Inagaki N, Suzuki T, Gono T, Seino S und Takata K (1997b) Kir6.1: A possible subunit of ATP-sensitive K⁺ channels in mitochondria. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **241**:693-697.

Tanabe K, Tucker SJ, Ashcroft FM, Proks P, Kioka N, Amachi T und Ueda K (2000) Direct photoaffinity labeling of Kir6.2 by [γ -³²P]ATP- γ 4-azidoanilide. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **272**:316-319.

Tanabe K, Tucker SJ, Matsuo M, Proks P, Ashcroft FM, Seino S, Amachi T und Ueda K (1999) Direct photoaffinity labeling of the Kir6.2 subunit of the ATP-sensitive K⁺ channel by 8-azido-ATP. *J Biol Chem* **274**:3931-3933.

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

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.

Thorneloe KS, Maruyama Y, Malcolm AT, Light PE, Walsh MP und Cole WC (2002) Protein kinase C modulation of recombinant ATP-sensitive K⁺ channels composed of Kir6.1 and/or Kir6.2 expressed with SUR2B. *J Physiol (Lond)* **541**:65-80.

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

Trivedi S, Potter-Lee L, McConville MW, Li JH, Ohnmacht CJ, Trainor DA und Kau ST (1995) K-channel opening activity of dihydropyridine ZM244085: effect on 86Rb efflux and 3H-P1075 binding in urinary bladder smooth muscle. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* **88**:137-151.

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 - Eur J Physiol* **401**:178-184.

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

Tusnády GE, Bakos E, Varadi A und Sarkadi B (1997) Membrane topology distinguishes a subfamily of the ATP-binding cassette (ABC) transporters. *FEBS Lett* **402**:1-3.

Ueda K, Inagaki N und Seino S (1997) MgADP antagonism to Mg²⁺-independent ATP binding of the sulfonylurea 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 sulfonylurea 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 sulfonylurea receptors. *J Biol Chem* **274**:28079-28082.

van Holde KE (1971) *Physical Biochemistry*

Vaxillaire M, Populaire C, Busiah K, Cave 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.

Venkatesh N, Lamp ST und Weiss JN (1991) Sulfonylureas, ATP-sensitive K⁺ channels, and cellular K⁺ loss during hypoxia, ischemia, and metabolic inhibition in mammalian ventricle. *Circ Res* **69**:623-637.

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.

Wang C, Wang K, Wang W, Cui Y und Fan Z (2002) Compromised ATP binding as a mechanism of phosphoinositide modulation of ATP-sensitive K⁺ channels. *FEBS Lett* **532**:177-182.

Yamada M, Isomoto S, Matsumoto S, Kondo C, Shindo T, Horio Y und Kurachi Y (1997) Sulphonylurea receptor 2B and Kir6.1 form a sulphonylurea-sensitive but ATP-insensitive K⁺ channel. *J Physiol (Lond)* **499**:715-720.

Yatani A, Okabe K, Polakis P, Halenbeck R, McCormick F und Brown AM (1990) ras p21 and GAP inhibit coupling of muscarinic receptors to atrial K⁺ channels. *Cell* **61**:769-776.

Yellon DM und Downey JM (2003) Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. *Physiol Rev* **83**:1113-1151.

Yu Y und de Groat WC (1998) Effects of ZD6169, a K_{ATP} channel opener, on bladder hyperactivity and spinal c-fos expression evoked by bladder irritation in rats. *Brain Res* **807**:11-18.

Zerangue N, Schwappach B, Jan YN und Jan LY (1999) A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane K_{ATP} 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^+ conductance. *Neuron* **31**:233-245.

Zingman LV, Hodgson D, Bienengraeber M, Karger AB, Kathmann EC, Alekseev AE und Terzic A (2002a) Tandem function of nucleotide binding domains confers competence to sulfonylurea receptor in gating ATP-sensitive K^+ channels. *J Biol Chem* **277**:14206-14210.

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

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

Züinkler BJ, Lins S, Ohno-Shosaku T, Trube G und Panten U (1988) Cytosolic ADP enhances the sensitivity to tolbutamide of ATP-dependent K^+ channels from pancreatic B-cells. *FEBS Lett* **239**:241-244

Akademische Lehrer

Prof. Dr. H.P.T. Ammon

Prof. Dr. G. Drews

Prof. Dr. L. Heide

Prof. Dr. K.-A. Kovar

Prof. Dr. S. Laufer

Prof. Dr. U. Quast

PD Dr. U. Russ

Prof. Dr. P. Ruth

Prof. Dr. P.C. Schmidt

Prof. Dr. J. Schultz

Prof. Dr. M.A. Wahl

Prof. Dr. A. Wankmüller

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Damian Makary Stephan
Geburtsdatum: 02.01.1974
Geburtsort: Beuthen (Polen)

Schulbildung

1981 - 1989 Grundschule in Zawadzkie (Polen)
1989 - 1991 Private Grund- und Hauptschule Jugenddorf Schloss Kaltenstein in
Vaihingen/Enz
1991 - 1996 Ferdinand-Porsche-Gymnasium in Stuttgart-Zuffenhausen
1996 Abitur

Zivildienst

07/1996 - 08/1997 Olgahospital Stuttgart

Akademische Ausbildung

04/1998 - 04/2002 Pharmaziestudium an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
05/2002 - 10/2002 Pharmaziepraktikum in der Apotheke am Lustnauer Tor in Tübingen
11/2002 - 04/2003 Pharmaziepraktikum am Institut für Pharmakologie und Toxikologie des
Universitätsklinikums Tübingen
05/2003 Approbation als Apotheker

05/2003 -03/2007 Anfertigung der Doktorarbeit mit dem Titel "Bindung und Wirkung von
Modulatoren der ATP-empfindlichen Kaliumkanäle" unter der Anleitung
von Herrn Prof. Dr. Ulrich Quast und Herrn Prof. Dr. Peter Ruth am
Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Eberhard-Karls-
Universität Tübingen