

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der
Universität Tübingen

Direktor: Professor Dr. H. Oßwald

Abteilung: Molekularpharmakologie
Abteilungsleiter: Professor Dr. U. Quast

**Modulation der Bindung von K_{ATP} -Kanalliganden an
rekombinante Sulfonylharnstoffrezeptoren durch
Oleoyl-Coenzym A**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Jochen Lichtenberg
aus
Tübingen

2006

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth
1. Berichterstatter: Professor Dr. U. Quast
2. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. S. Ullrich

Ein großer Teil der hier dargestellten Ergebnisse wurde unter dem Titel
“Lipids modulate ligand binding to sulphonylurea receptors” veröffentlicht
(KLEIN, A., LICHTENBERG, J., STEPHAN, D., und QUAAT, U. [2005];
British Journal of Pharmacology 145, 907-915).

1	Einleitung	1
1.1	Die Plasmamembran	1
1.2	Ionenkanäle	1
1.3	Kaliumkanäle	3
1.4	ATP-abhängige Kaliumkanäle (K_{ATP} -Kanäle)	6
1.4.1	Aufbau und molekulare Struktur von K_{ATP} -Kanälen	7
1.4.2	Die α -Untereinheit $K_{IR}6.x$	9
1.4.3	Die β -Untereinheit SUR	10
1.4.4	Regulation des K_{ATP} -Kanals	12
1.4.5	Gewebsspezifische Zusammensetzung und Verteilung der Untereinheiten der K_{ATP} -Kanäle	14
1.5	Physiologische und pathophysiologische Rolle der K_{ATP} -Kanäle	14
1.6	Pathophysiologie: K_{ATP} -Kanalopathien	17
1.6.1	Kongenitaler Hyperinsulinismus im Kindesalter (HI)	17
1.6.2	Neonataler Diabetes	20
1.6.3	MODY (maturity-onset diabetes of the young)	22
1.6.4	Diabetes mellitus Typ 2 (NIDDM)	23
1.7	Pharmakologie der K_{ATP} -Kanäle	24
1.7.1	K_{ATP} -Kanal-Blocker	24
1.7.2	K_{ATP} -Kanal-Öffner (KCO)	28
1.8	Modulation von K_{ATP} -Kanälen durch negativ geladene Lipide	31
1.8.1	Modulation durch PIP_2 und DOGS-NTA	31
1.8.2	Modulation durch den LC-Acyl-CoA-Ester Oleoyl-CoA	35
1.9	Fragestellung der Arbeit	40
2	Material und Methoden	42
2.1	Übersicht	42
2.2	Chemikalien	43
2.3	Puffer und Medien	45
2.4	HEK293-Zellen	51
2.4.1	Kultivierung von HEK293-Zellen	51

2.4.2	Auftauen von HEK293-Zellen	52
2.4.3	Einfrieren von HEK293-Zellen (Kryokonservierung)	52
2.4.4	Transiente Transfektion von HEK293-Zellen	53
2.4.5	Permanente Transfektion von HEK293-Zellen	54
2.4.6	Herstellung einer mikrosomalen Membranfraktion aus HEK293-Zellen	54
2.5	Proteinbestimmung der Membranfraktion nach Lowry	55
2.6	Technik und Durchführung der Radioligand-Rezeptor- Bindung („Bindungsversuch“)	57
2.6.1	Auswahl des Radioliganden	59
2.6.2	Gewinnung von Rezeptormaterial	62
2.6.3	Zubereitung des Lipides Oleoyl-CoA und Behandlung der Membranfraktion mit Oleoyl-CoA	62
2.6.4	Inkubation	63
2.6.5	Filtration zur Trennung von gebundenem und freiem Radioliganden	64
2.6.6	Messung der Radioaktivität	64
2.7	Modell der Rezeptorbindungsstudien	65
2.7.1	Sättigungsexperiment	67
2.7.2	Kompetitionsexperiment	68
2.7.3	Verallgemeinerung der Bindungsisotherme nach Hill	70
2.8	Datenauswertung und Statistik	71
2.8.1	Analyse der Bindungskurven	71
2.8.2	Statistik	71
3	Ergebnisse	73
3.1	Effekt von Oleoyl-CoA auf die ³ H-GBC-Bindung an SUR1 in Membranen in Abwesenheit von MgATP	73
3.1.1	Homologe Verdrängung der Bindung von ³ H-GBC an SUR1	73
3.1.2	Hemmung der ³ H-GBC-Bindung an SUR1 durch Oleoyl-CoA	74
3.1.3	Effekt von 15 µM Oleoyl-CoA auf die homologe Verdrängung der ³ H-GBC-Bindung an SUR1	76

3.1.4	Sättigung der ^3H -GBC-Bindung an SUR1 $\pm 10 \mu\text{M}$ Oleoyl-CoA	79
3.2	Effekt von Oleoyl-CoA auf die ^3H -GBC-Bindung an SUR1 in Membranen in Anwesenheit von 1 mM Mg^{2+} und 0.3 mM ATP	83
3.2.1	Homologe Verdrängung der Bindung von ^3H -GBC an SUR1	83
3.2.2	Hemmung der ^3H -GBC-Bindung an SUR1 durch Oleoyl-CoA	85
3.2.3	Effekt von 25 μM Oleoyl-CoA auf die homologe Verdrängung der GBC-Bindung an SUR1	87
3.3	Effekt von Poly-D-Lysin auf die Hemmung der ^3H -GBC-Bindung durch Oleoyl-CoA an SUR1 in Membranen in Abwesenheit von MgATP	90
3.3.1	Aktivierung der Bindung von ^3H -GBC an SUR1 durch Poly-D-Lysin	90
3.3.2	Hemmung der ^3H -GBC-Bindung an SUR1 durch Oleoyl-CoA in Anwesenheit von 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Poly-D-Lysin	92
3.3.3	Hemmung der ^3H -GBC-Bindung an SUR1 durch Oleoyl-CoA in Anwesenheit von 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Poly-D-Lysin	93
3.4	Effekt von Oleoyl-CoA auf die ^3H -P1075-Bindung an SUR2A in Membranen	95
3.4.1	Homologe Verdrängung der Bindung von ^3H -P1075 an SUR2A	95
3.4.2	Hemmung der ^3H -P1075-Bindung an SUR2A durch Oleoyl-CoA	97
3.4.3	Effekt von 30 μM Oleoyl-CoA auf die homologe Verdrängung der ^3H -P1075-Bindung an SUR2A	99
3.4.4	Auswirkung der Koexpression mit $K_{\text{IR}}6.2$ auf die Hemmung der ^3H -P1075-Bindung an SUR2A durch Oleoyl-CoA	101
3.5	Modulation der ^3H -GBC-Bindung an SUR2A(Y1206S) in Membranen	103
3.5.1	Aktivierung der ^3H -GBC-Bindung an SUR2A(Y1206S) durch Oleoyl-CoA	103
3.6	Anhang: Einfluß von 15 μM Oleoyl-CoA auf den Zeitverlauf der ^3H -GBC-Bindung an SUR1 in Membranen	106

4	Diskussion	111
4.1	Fragestellung	111
4.2	Tabellarische Übersicht der Ergebnisse	113
4.3	Die Wechselwirkung von Oleoyl-CoA mit SUR	115
4.4	Wechselwirkung zwischen Lipid und Ligand	117
4.5	Effekt von Poly-D-Lysin auf die durch Oleoyl-CoA vermittelte Hemmung der Ligandbindung	118
4.6	Physiologische Relevanz der Effekte von Oleoyl-CoA am SUR .	118
4.7	Stimulation der Bindung durch Oleoyl-CoA	119
5	Zusammenfassung	120
6	Literaturverzeichnis	122

Verzeichnis der Abkürzungen

ABC	ATP-binding-cassette
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
B _{MAX}	Maximale Bindungskapazität
B _S	Spezifische Bindung
BSA	Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumine)
B _{TOT}	Totale Bindung
cDNA	copy DNA, DNA-Kopie eines RNA-Stückes mithilfe der Reversen Transkriptase
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator
Ci	Curie; Einheit der spezifischen Aktivität eines radioaktiven Stoffes
CoA	Coenzym A
cpm	Zerfälle pro Minute (counts per minute)
DAG	Diacylglycerol
DEND-Syndrom	D evelopmental delay, muscle weakness, e pilepsy, dysmorphic features and n eonatal d iabetes
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOGS-NTA	D ioleoyl g lycerol- s uccinyl- n itrilo t riacetic a cid
dpm	Zerfälle pro Minute (decays per minute)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykol-bis (2-aminoethylether)-N,N,N',N',-tetraacetat
FBS	Fetales Rinderserum (Fetal Bovine Serum)
fmol	Femtomol (10 ⁻¹⁵ mol)
g	Gravitationsbeschleunigung (9.81 m/s ²)
GBC	Glibenclamid
GLUT2	Glucosetransporter 2
HEK-293-Zellen	Menschliche embryonale Nierenzelllinie (H uman E mbryonal K idney cells)
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N-(2-ethansulfonsäure)
HI	Kongenitaler Hyperinsulinismus im Kindesalter (congenital hyperinsulinism of infancy)
HNF	Hepatocyte nuclear factor
³ H-GBC	Tritium markiertes Glibenclamid
³ H-P1075	Tritium markiertes P1075

Verwendete Abkürzungen

IC ₅₀	Konzentration des kalten Liganden, welche die halb-maximale Bindung bewirkt [M]
IPC	Ischämische Präkonditionierung
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
K _{ATP} -Kanal	ATP-abhängiger Kaliumkanal
KCO	K ⁺ -channel opener (Kaliumkanalöffner)
K _D	Gleichgewichtsdissoziationskonstante [M]
kDa	Kilo-Dalton (relative Molekülmasse)
K _i	Dissoziationskonstante des heterologen Inhibitors
K _{IR}	Einwärtsgleichrichtender Kaliumkanal (inwardly rectifying)
K _{NDP}	Nukleosiddiphosphat-abhängiger Kaliumkanal
K _O	Gleichgewichtsdissoziationskonstante für Oleoyl-CoA
L ₀	Totale Konzentration des Radioliganden im Inkubationsansatz
LC-Acyl-CoA	Langkettige (long chain) Acyl-Coenzym A Ester
M	Molarität [mol/l]
MDR	Multidrug resistance
MEM	Minimum Essential Medium
MgADP	Magnesium-gebundenes Adenosindiphosphat
MgATP	Magnesium-gebundenes Adenosintriphosphat
MgNDP	Magnesium-gebundene Nukleosiddiphosphate
mM	Millimolar (10 ⁻³ M)
MODY	Maturity-onset diabetes of the young
MRP	Multidrug resistance-associated protein
mV	Millivolt (10 ⁻³ V)
NBF	Nukleotidbindungsfalte
n _H	Hill-Koeffizient
NIDDM	Non insulin dependent diabetes mellitus
nM	Nanomolar (10 ⁻⁹ M)
NSB	Nichtspezifische Bindung
OD ₇₇₀	Optische Dichte (Extinktion) bei einer Wellenlänge des Lichtes von 770nm
Oleoyl-CoA	Oleoyl-Coenzym A
pcDNA	Plasmidvektor, der die cDNA eines zu exprimierenden Proteins enthält
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration

Verwendete Abkürzungen

pIC ₅₀	Negativer dekadischer Logarithmus der halbmaximalen Bindung eines Liganden, [-logM]
PIP ₂	Phosphatidyl-Inositol-Bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
pK _D	Negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichts-dissoziationskonstanten
PNDM	Permanent neonatal diabetes mellitus
pS	Pico-Siemens (10 ⁻¹² S)
S	Siemens; Maß der elektrischen Leitfähigkeit
SA	Spezifische Aktivität eines radioaktiven Stoffes
SEM	Standard error of the mean
SU	Sulfonylharnstoff (sulfonylurea)
SUR	Sulfonylharnstoffrezeptor (sulfonylurea receptor)
TM	Transmembransegment
TMD	Transmembrandomäne
TNDM	Transient neonatal diabetes mellitus
TRIS	Tris (hydroxymethyl)aminomethan
µM	Mikromolar (10 ⁻⁶ M)
ZSM	Zellkultur Standard Medium

1 Einleitung

1.1 Die Plasmamembran

Biologische Membranen wie die Plasmamembran eukaryotischer Zellen bestehen aus einer kontinuierlichen, etwa 5 nm dicken Phospholipid-Doppelschicht.

Phospholipide sind amphiphile Moleküle mit einer negativ geladenen hydrophilen Kopfgruppe und einer oder mehreren sich anschließenden langen hydrophoben Kohlenwasserstoffketten. Bei der Zusammenlagerung einzelner Phospholipidmoleküle entsteht eine Lipiddoppelschicht, wobei die hydrophilen Molekülgruppen nach außen ragen (und so die Verbindung zur wässrigen Umwelt herstellen), und die Kohlenwasserstoffketten im Inneren der Doppelschicht eine über hydrophobe Wechselwirkungen und Van-der-Waals-Kräfte stabilisierte nicht-wässrige Phase bilden.

Für Ionen (z.B. Na^+ , K^+ , Ca^{2+} oder Cl^- -Ionen) ist die Plasmamembran impermeabel und daher eine gute Diffusionsbarriere, wodurch Ionengradienten zwischen Zytoplasma und Extrazellulärraum aufrechterhalten werden können. Um dennoch ein Austausch von geladenen Teilchen zwischen dem extra- und intrazellulären Raum zu ermöglichen, befinden sich in der Plasmamembran verschiedenartige Ionenkanäle und Transportermoleküle, welche die Lipiddoppelschicht überbrücken.

1.2 Ionenkanäle

Ionenkanäle sind im allgemeinen aus mehreren Untereinheiten bestehende integrale Membranproteine, die hydrophile Poren in der Membran bilden und somit den Austausch anorganischer Ionen (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^-) zwischen Extrazellulärraum und Zytoplasma gewährleisten.

Dabei lassen sich zwei Kanalzustände, der Offen- und der Geschlossenzustand, zwischen denen die Kanäle hochfrequent hin und her schalten, unterscheiden.

Im Offenzustand erfolgt die Ionenbewegung durch passive Diffusion entlang des elektrochemischen Gradienten, und es lassen sich Leitungsgeschwindigkeiten von bis zu 10^9 Ionen/s für einen Einzelkanal nachweisen (falls der elektroche-

mische Gradienten aufrecht erhalten wird).

Viele Kanäle lassen nur bestimmte Ionen passieren, d.h. sie besitzen eine Ionen-selektivität: So gelangen z.B. durch Kalium-Kanäle überwiegend K^+ -Ionen.

Wichtige Parameter der Selektivität sind die Größe des Ions ohne seine Hydrathülle, sowie die jeweilige Ladung. Um einen Kanal passieren zu können, muß das Ion den größten Teil seiner Hydrathülle ablegen und sich an die geladenen funktionellen Gruppen von Aminosäuren entlang des Kanals schwach binden. Dabei sollte diese schwache Bindung an die Kanalwand den Energieverlust, hervorgerufen durch das Ablegen der Hydrathülle, kompensieren, sonst wird das Ion aufgrund der energetisch ungünstigen Lage den Kanal nicht durchqueren (Doyle et al., 1998; Hille, 1992b).

Der Ionenstrom durch einen einzelnen Kanal hängt von der Leitfähigkeit des Kanals und dem elektrochemischen Gradienten ab.

Die Leitfähigkeit wird in Siemens [S] angegeben und beschreibt die Anzahl der passierenden Ionen pro Zeiteinheit und pro Volt Potentialdifferenz. Physiologische Leitfähigkeiten sind gering und bewegen sich im Bereich von pico-Siemens ($1 \text{ pS} = 10^{-12} \text{ S}$).

Ionenkanäle werden über verschiedene Reize in ihrer Aktivität reguliert:

Es lassen sich über das Zellmembranpotential gesteuerte spannungsabhängige Ionenkanäle, mechanisch kontrollierte Ionenkanäle, sowie ligandengesteuerte Ionenkanäle unterscheiden. Die Signalmoleküle eines ligandengesteuerten Kanals bestehen entweder aus extrazellulären Botenstoffen wie Hormonen und Neurotransmittern oder aus Komponenten der intrazellulär aktiven Informationstransduktionssysteme wie die second messenger IP_3 (Inositol-1,4,5-Trisphosphat) und Ca^{2+} oder G-Proteinen, Nukleotiden und PIP_2 (Phosphatidyl-Inositol-Bisphosphat). Zusätzlich besteht eine weitere Regulationsmöglichkeit der Ionenkanäle in der Proteinphosphorylierung durch Proteinkinasen bzw. Proteindephosphorylierung durch Proteinphosphatasen (Hille, 1992a; Süßbrich und Busch, 1998).

1.3 Kaliumkanäle

Im Ruhezustand der meisten Zellen ist die Membranleitfähigkeit für Kalium dominierend, daher bestimmt sie im allgemeinen das Ruhemembranpotential.

Dieses entspricht im Idealfall dem Nernst'schen Gleichgewichtspotential für K^+ , E_{K^+} , das bei etwa -90 mV gelegen ist. In Wirklichkeit schwankt es jedoch je nach Gewebe zwischen -80 und -30 mV, was durch einen kontinuierlich vorhandenen geringen Na^+ - und Ca^{2+} -Einstrom, sowie Cl^- -Ausstrom bedingt ist (Hille, 1992b). Kommt es zur Schließung von K^+ -Kanälen mit einer konsekutiven Anreicherung positiver Ladungsträger im Zellinneren, so depolarisiert die Zelle, und das Membranpotential fällt auf -60 bis -40 mV ab. Diese Depolarisation löst in erregbaren Geweben (Neuronen und Muskelzellen) ein Aktionspotential aus, basierend auf der spannungsabhängigen Aktivierung von Na^+ oder Ca^{2+} -Kanälen.

Eine Öffnung von K^+ -Kanälen verschiebt das Membranpotential in Richtung des Kalium-Gleichgewichtspotentials, E_{K^+} , und bewirkt durch vermehrten Kaliumausstrom eine Hyperpolarisation. Dadurch kommt es nach einer Depolarisation zu einer Erregungsrückbildung (Repolarisation), die Auslösung weiterer Aktionspotentiale wird verhindert.

K^+ -Kanäle bestehen aus homologen α -Untereinheiten, welche die Kanalpore bilden und in Form eines Di- oder Tetramers angeordnet sind (Hille, 1992b; Doyle et al., 1998). Dazu können noch β -Untereinheiten treten, die für die Regulation der Kanalaktivität eine wichtige Rolle spielen (Leicher et al., 1996).

Anhand der molekularen Struktur können Kaliumkanäle in vier verschiedene Klassen eingeteilt werden (s. Abb. 1):

a. Spannungsabhängige Kaliumkanäle (K_v)

Sie bilden die größte Gruppe der K^+ -Kanäle, dienen der Repolarisation von Zellen erregbarer Gewebe (Neurone, Myozyten) nach Abschluß eines Aktionspotentials und weisen eine ausgeprägte Auswärtsgleichrichtung der K^+ -Leitfähigkeit auf.

Die α -Untereinheit des K_v besteht aus sechs α -helikalen Transmembransegmenten, wobei zwischen Transmembransegment S5 und S6 die hoch konservierte H5-Domäne zu liegen kommt, welche einen Teil der Kanalpore bildet (Jan und

1. Einleitung

Jan, 1997). Sie bestimmt die Ionenselektivität des Kanals und ist bei allen Arten von K^+ -Kanälen vorhanden (Heginbotham et al., 1994).

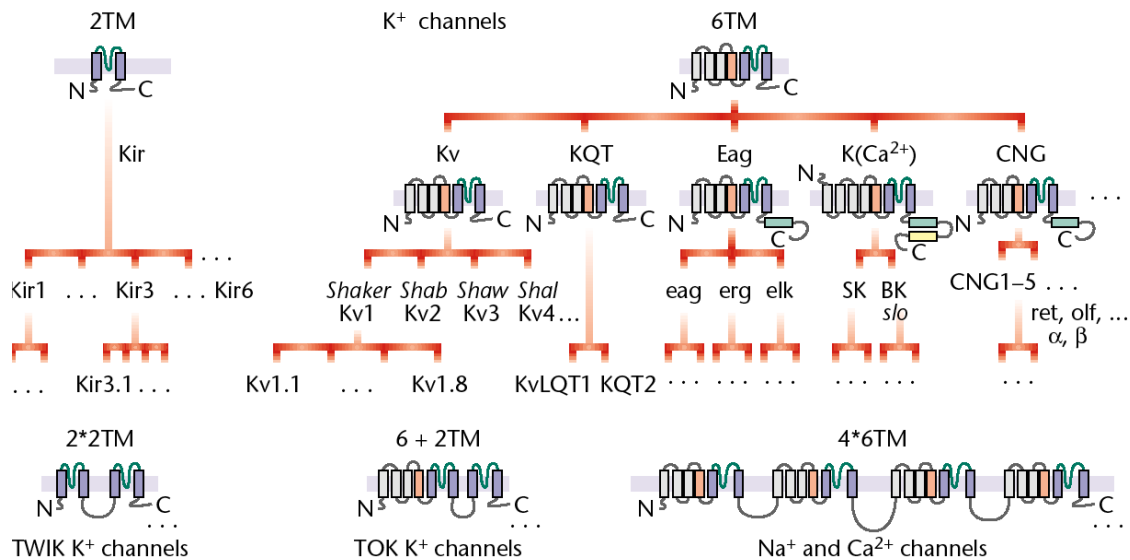


Abbildung 1: Übersicht über die Genfamilie der kaliumkanalformenden Protein-untereinheiten und damit verwandte Proteine

Dargestellt sind nur die wichtigsten Vertreter. Das Schema basiert auf Kaliumkanälen mit 2 und 6 Transmembransegmenten (2TM und 6TM), die weiteren kanalformenden Proteine haben sich wahrscheinlich durch Genduplikation oder Splicing entwickelt: 2*2TM (TWIK Kanäle), 6+2TM (TOK Kanäle) und 4*6TM (Natrium- und Calciumkanäle). Mehrere Vertreter der 2TM- und 6TM-Familie sind dargestellt; die Punkte zeigen die vielen, durch den raschen Fortschritt im Klonieren von Kanalgenen zu erwartenden Vertreter (nach Heinemann, 2001, modifiziert nach Wei et al., 1996).

Mutationen einzelner spannungsabhängiger Kaliumkanäle führen klinisch zum sogenannten Long QT-Syndrom. Kennzeichen dieser seltenen genetischen Erkrankungen sind eine verlangsamte Repolarisation der Kardiomyozyten durch verzögerten Kalium-Ausstrom mit im EKG nachweisbarer Verlängerung des QT-Intervalles, sowie dadurch bedingte Arrhythmien und plötzlicher Herztod.

Unter anderem kann die Ursache in der Mutation des HERG-Kanals (KCNH1) liegen, welcher einen schnellen K^+ -Auswärtsstrom am Herzen erzeugt (Sanguineti et al., 1995), aber auch in der Veränderung des KVLQT1-Kanals (KCNQ1), der für den langsamen K^+ -Auswärtsstrom zuständig ist (Wang et al., 1996).

1. Einleitung

b. Calcium-abhängige Kaliumkanäle (K_{Ca})

Sie sind strukturell den K_V -Kanälen sehr ähnlich und finden sich in fast allen Zelltypen. Durch Depolarisation und/oder eine erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration werden sie aktiviert.

Es lassen sich zwei grundsätzliche Arten von K_{Ca} -Kanälen hinsichtlich ihrer Leitfähigkeit und Dauer der Aktivierung bzw. Inaktivierung unterscheiden:

K_{Ca} -Kanäle mit hoher Leitfähigkeit, schneller Aktivierung und Inaktivierung (Rudy, 1988; Butler et al., 1993) dienen der schnellen Re- bzw. Hyperpolarisation von depolarisierten und mit Ca^{2+} angereicherten Zellen.

K_{Ca} -Kanäle mit geringer Leitfähigkeit, langsamer Aktivierung und Inaktivierung (Rudy, 1988; Köhler et al., 1996) schützen die Zelle durch Hyperpolarisation der Membran und folglich vermindertem Ca^{2+} -Influx über spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle vor Übererregung und erhöhten Ca^{2+} -Konzentrationen.

c. Einwärtsgleichrichtende Kaliumkanäle (K_{IR})

Die Einwärtsgleichrichtenden Kaliumkanäle (K_{IR} = „inwardly rectifying“) vermitteln einen nach intrazellulär gerichteten K^+ -Strom (Einwärtsstrom), der umso größer ist, je näher das Ruhemembranpotential am Nernst'schen Gleichgewichtspotential für K^+ liegt. Somit spielt der K_{IR} eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung des Ruhemembranpotentials und der Regulierung der Erregbarkeit von Zellen. Fällt das Membranpotential auf etwa -70 mV ab, so wird der K_{IR} durch positiv geladene Substanzen (Mg^{2+} , Polyamine), die sich von innen in die Kanalpore legen, verschlossen und damit inaktiviert, womit der auswärtsgerichtete Kaliumstrom versiegt (Doupnik et al., 1995).

Die Struktur des K_{IR} besteht aus nur zwei Transmembransegmenten, M1 und M2 (Kubo et al., 1993), welche die H5-Domäne bilden und den Segmenten S5 und S6 des K_V -Kanals entsprechen.

Eine Sonderform des K_{IR} ist der ATP-abhängige K^+ -Kanal, der im folgenden Kapitel charakterisiert wird (s. 1.4).

d. Tandem-Kaliumkanäle (K_{2P})

Bei den Tandem-Kaliumkanälen liegen zwei porenbildende Untereinheiten auf einer Polypeptidkette, so daß zur Bildung eines vollständigen Kanals nur zwei Untereinheiten nötig sind (Ketchum et al., 1995).

Als Beispiele seien die TOK1- (Two P-region-containing outwardly rectifying K⁺-channel) und die TWIK1-Kanäle (Tandem of P domains in a weak inwardly rectifying K⁺-channel) erwähnt.

Diese Kanäle sind ubiquitär vorhanden und erzeugen einen kontinuierlichen, spannungsunabhängigen schwach gleichrichtenden Kaliumstrom. Sie scheinen somit für die Erhaltung der Hintergrundleitfähigkeit der Zellen verantwortlich zu sein.

1.4 ATP-abhängige Kaliumkanäle (K_{ATP} -Kanäle)

K_{ATP} -Kanäle sind schwache Einwärtsgleichrichter für die K^+ -Leitfähigkeit (Ashcroft und Ashcroft, 1990b), die spannungsunabhängig arbeiten. Ihr Hauptcharakteristikum besteht in der Nukleotidempfindlichkeit: Intrazelluläres ATP schließt die Kanäle, das ATP-Abbauprodukt ADP bzw. allgemein Magnesiumnukleosiddiphosphate (MgNDP) bewirken eine Kanalöffnung (Ashcroft und Ashcroft, 1990a). Insgesamt betrachtet werden also die Kanäle durch das intrazelluläre Verhältnis der Konzentrationen von ATP zu NDP in ihrer Aktivität reguliert. Ein hoher ATP/NDP-Quotient (guter energetischer Zustand der Zelle) führt zu einer Blockierung der Kanäle mit daraus resultierender Depolarisation, wobei ein niedriger Quotient für die Hyperpolarisation der Membran und eine erhöhte Erregungsschwelle verantwortlich ist. Die physiologische Bedeutung der K_{ATP} -Kanäle liegt also in einer Kopplung des metabolischen Zustandes der Zelle mit der elektrischen Aktivität und damit Erregbarkeit der Zellmembran.

Unter pathologischen Bedingungen wie z.B. bei einer Myokardischämie (s. 1.5) mit niedrigem ATP/NDP-Quotienten schützt sich die Zelle durch Herabsetzung ihrer Erregbarkeit (Nichols und Lederer, 1991).

Entdeckt wurden die K_{ATP} -Kanäle erstmals im Herzmuskel 1983 durch Noma (Noma, 1983; Trube und Hescheler, 1984). Später fand man die Kanäle auch in

vielen anderen Geweben wie Pankreas, Skelett- und glatter Muskulatur, Neuronen und Nierenepithel (s. a. 1.4.5).

K_{ATP} -Kanäle stellen therapeutisch wichtige Angriffspunkte für Pharmaka dar: Die Inhibition der Kanäle durch die Gruppe der Sulfonylharnstoffe führt zu einer vermehrten Insulinfreisetzung aus den β -Zellen des Pankreas und ist Hauptbestandteil der Therapie des nicht insulinabhängigen Diabetes mellitus Typ 2 (NIDDM, s. 1.6.4). Umgekehrt werden Öffner der K_{ATP} -Kanäle wie z.B. das Benzothiadiazin Diazoxid vornehmlich als Antihypertensiva eingesetzt, weil sie durch Öffnung der Kanäle in glatten Muskelzellen der Gefäße eine Vasodilatation bewirken (zur Pharmakologie der K_{ATP} -Kanäle s. 1.7 ff).

Desweiteren werden K_{ATP} -Kanäle auf zellulärer Ebene in ihrer Aktivität moduliert durch die Lipide PIP_2 (Hilgemann und Ball, 1996; Baukrowitz et al., 1998) und Oleoyl-CoA (Liu et al., 2001a), sowie durch G-Proteine (Sánchez et al., 1998) und Phosphorylierung über die Proteinkinasen A und C (vgl. 1.4.4).

1.4.1 Aufbau und molekulare Struktur von K_{ATP} -Kanälen

K_{ATP} -Kanäle bilden Heteromultimere und setzen sich aus zwei verschiedenen Untereinheiten (α - und β -Untereinheit) zusammen (s. Abb. 2). Die α -Untereinheit bildet mit vier homologen Monomeren den Einwärtsgleichrichtenden Kaliumkanal $K_{IR}6.x$ ($x=1$ oder 2), und als β -Untereinheiten ebenfalls mit vier gleichartigen Monomeren wird der regulatorisch-bedeutsame Sulfonylharnstoffrezeptor SUR (SUR1 oder 2) eingebaut (Aguilar-Bryan et al., 1995; Inagaki et al., 1995; Sakura et al., 1995). Es bildet sich also ein oktamerer Molekülkomplex aus, welcher eine relative Molekülmasse von ungefähr 950 kDa besitzt (Clement IV et al., 1997). Ein Retentionsmotiv, bestehend aus den Aminosäuren RKR (Arginin-Lysin-Arginin) sorgt dafür, daß immer nur komplette, aus jeweils vier α - und β -Untereinheiten zusammengesetzte K_{ATP} -Kanäle in die Plasmamembran eingebaut werden (Zerangue et al., 1999). Entfernt man die 36 C-terminalen Aminosäuren an $K_{IR}6.2$ -Kanälen ($K_{IR}6.2\Delta C36$) und damit das Retentionsmotiv, so ist auch die alleinige Bildung funktionsfähiger und nur aus $K_{IR}6.2$ bestehender Kanalproteine möglich.

1.4.2 Die α -Untereinheit $K_{IR}6.x$

Das humane Gen für $K_{IR}6.1$ (KCNJ8) konnte auf Chromosom 12, Position 12p11.23 lokalisiert werden (nahe dem Gen für SUR2), ist ca. 9.7 kb lang und besitzt 3 Exons. Das daraus entstehende Protein (ca. 38 kDa) zeigt eine 98%ige Homologie zu murinem $K_{IR}6.1$ und umfasst 424 Aminosäuren. $K_{IR}6.1$ kann mit den β -Untereinheiten SUR1 (Ämmälä et al., 1996a) und SUR2B funktionelle Kanäle ausbilden (Aguilar-Bryan et al., 1998). Die Kombination mit SUR2A ergibt ebenfalls funktionelle Kanäle (Liu et al., 2001b; U. Lange, Doktorarbeit, 2005). $K_{IR}6.1$ enthaltende Kanäle sind nur sehr schwach ATP-empfindlich und haben eine unitäre Leitfähigkeit von etwa 30 pS bei hohen symmetrischen Kaliumionenkonzentrationen ($K^+_i = K^+_o = 140$ mM).

$K_{IR}6.2$ (syn. BIR), dessen intronloses Gen auf dem kurzen Arm von Chromosom 11 liegt (in der Nähe von SUR1), ist 390 Aminosäuren lang. $K_{IR}6.2$ kann mit allen drei Isoformen des SUR funktionelle K_{ATP} -Kanäle ausbilden (Inagaki et al., 1996; Isomoto et al., 1996). $K_{IR}6.2$ enthaltende Kanäle sind sehr ATP-empfindlich ($K_i \sim 15-30$ μ M) und haben eine unitäre Leitfähigkeit von ~ 80 pS (140 mM symmetrische K^+ -Konzentration).

$K_{IR}6.x$ bildet in einem tetrameren Komplex den eigentlichen Kanal für die Membranpassage von K^+ -Ionen. Wie die anderen Mitglieder der Familie der Einwärtsgerichteten K^+ -Kanäle (K_{IR} , s. 1.3 c.) besitzt er zwei Transmembranhelices TM1 und TM2, welche durch die intramembranär gelegene hochkonservierte H5-Domäne (P-loop) verbunden sind. Letztere bildet zusammen mit TM2 die Kanalpore und trägt damit zur K^+ -Selektivität bei.

Die Subtypen $K_{IR}6.1$ oder $K_{IR}6.2$ stimmen in der Aminosäuresequenz zu 70% überein (Inagaki et al., 1997). Sie zeigen einen Selektivitätsfilter mit der Sequenz Gly-Phe-Gly anstelle des häufiger in anderen K_{IR} -Kanälen vorkommenden Gly-Tyr-Gly (Inagaki et al., 1995).

1.4.3 Die β -Untereinheit SUR

Der Sulfonylharnstoffrezeptor (SUR) stellt die β -Untereinheit des K_{ATP} -Kanals dar und dient als regulatorische Komponente der Kanalfunktion. Es sind zwei Subtypen der β -Untereinheit SUR bekannt (Inagaki et al., 1996; Isomoto et al., 1996): SUR1 und SUR2, deren Gene auf Chromosom 11 (p15.1), bzw. 12 (11.23) liegen (Chutkow et al., 1996).

SUR1 besteht aus 1581 Aminosäuren, besitzt eine relative Molekülmasse von ~176 kDa und wird durch 39 Exons kodiert, wohingegen SUR2 (1549 Aminosäuren) nur 38 Exons zugrundeliegen (Bryan und Aguilar-Bryan, 1999). Der Subtyp SUR2 läßt sich weiterhin in die Varianten SUR2A und SUR2B unterteilen, wobei letztere durch alternatives Spleißen des Exon 38 entsteht. SUR2A unterscheidet sich von SUR2B nur in seinen 42 C-terminalen Aminosäuren (Inagaki et al., 1996; Isomoto et al., 1996).

Anhand seiner Struktur wird der SUR den ABC-Proteinen (ATP-binding-cassette-proteins) zugeordnet (Altschul und Lipman, 1990), zu denen auch die strukturell homologen MDR-Proteine (multidrug resistance proteins) und der CFTR (cystic fibrosis transmembrane regulator) gehören. Die Gene der ABC-Proteine werden in die 7 Unterfamilien *ABCCA* bis *ABCCG* eingeteilt. Dabei bilden die Gene des SUR die *ABCC*-Unterfamilie, mit *ABCC8* für SUR1 und *ABCC9* für SUR2. Weiterhin wird der homologe CFTR als *ABCC7* klassifiziert, und die MDR-Proteine werden der *ABCB*-Unterfamilie zugeordnet. Eine wichtige Eigenschaft aller ABC-Proteine besteht in ihrer Transportfunktion: So stellt das MRP1 (multidrug resistance-associated protein 1) eine ATP-getriebene Auswärtspumpe dar, welche die Zelle von zytotoxischen Substanzen befreit. Allerdings ist eine derartige Transportfunktion weder beim SUR noch beim CFTR nachweisbar. Diese beiden ABC-Proteine regulieren hingegen die Aktivität von Ionenkanälen (Bienengraeber et al., 2000; Zingman et al., 2001) über die Bindung und Hydrolyse von Nukleotiden und besitzen eine ATPase-Aktivität, die bei den SUR überwiegend in der Nukleotidbindungsfalte 2 (NBF2) lokalisiert ist (Bienengraeber et al., 2000; Matsuo et al., 2000). Der strukturelle Baustein der ABC-Proteine besteht aus 6 Transmembranhelices (TM) und 1 Nukleotidbindungsfalte (NBF). Bei Eukaryonten ist

1. Einleitung

häufig durch Genduplizierung diese Grundstruktur zweimal hintereinander vorhanden. Insbesondere bei SUR gibt es zusätzlich, wie auch bei MDR1, eine TMD0. Die Nukleotidbindungsfalten enthalten hochkonservierte Walker A- und Walker B-Motive, die ATP und MgNDP binden können, sowie eine "Linkersequenz", welche die ATP-Bindung und -Hydrolyse in Konformationsänderungen des SUR umsetzt und den Besetzungszustand der NBF registriert.

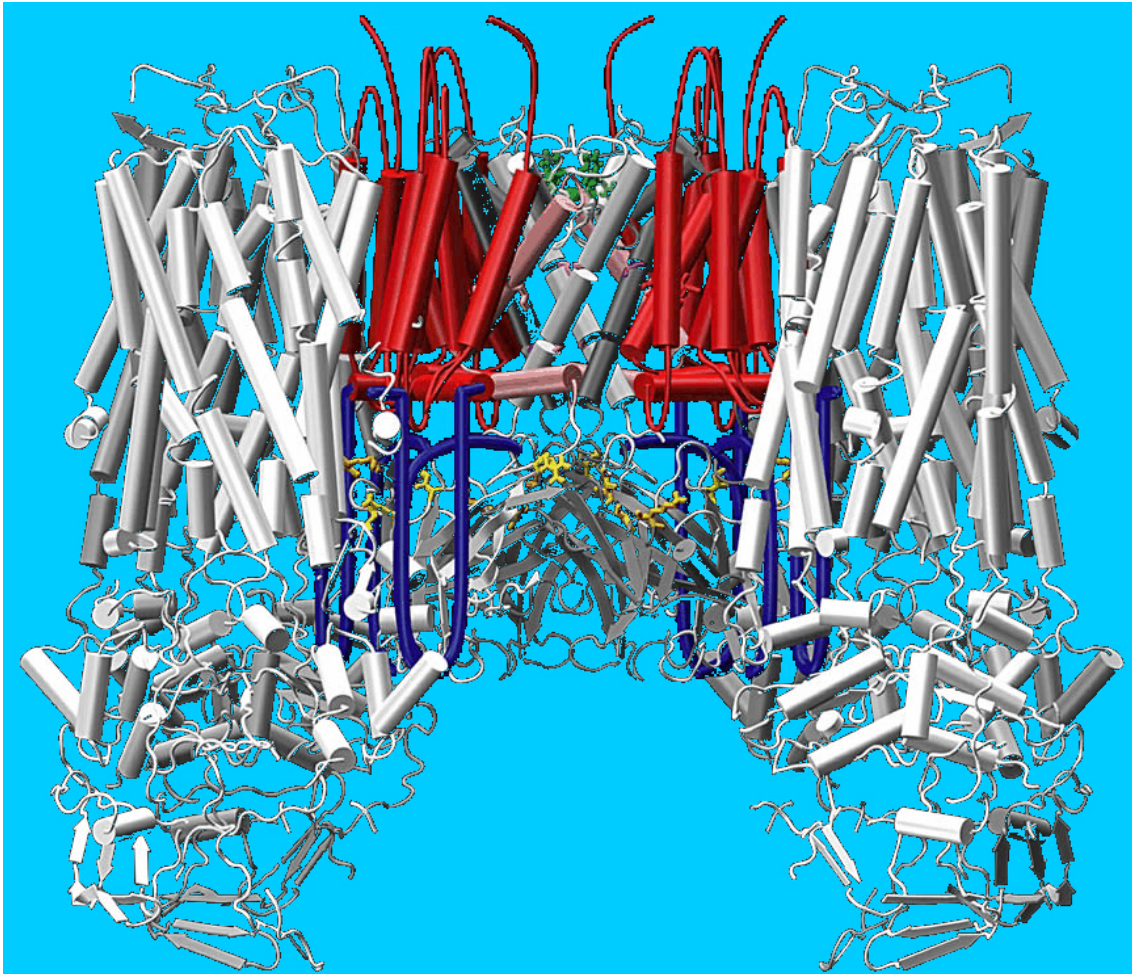


Abbildung 3: Strukturelles Modell des K_{ATP}-Kanals: Quartärstruktur (nach Babenko, 2005)

Das Walker A-Motiv besteht aus der Sequenz Gly-X-X-Gly-X-Gly-Lys-Ser/Thr (X=beliebige Aminosäure) und koordiniert durch das positiv geladene Lysin die Bindung der negativen Ladung am γ -Phosphat des ATP. Beim Walker B-Motiv (-Y-Y-Y-Y-Asp-; Y=hydrophobe Aminosäure) bindet Aspartat das positiv geladene Magnesium-Ion im Mg²⁺-Nukleotid-Komplex (Walker et al., 1982; Hilgenfeld,

1995). In der NBF1 besteht die Linkersequenz aus den Aminosäuren -LSGGQ- und in der NBF2 aus -FSQGQ- (Ashcroft, 2000).

Die molekulare Struktur der Sulfonylharnstoffrezeptoren wurde anhand von Hydrophathie-Analysen aufgeklärt und von Bienengraeber et al., 2000 und Tusnády et al., 1997) bestätigt.

Man unterscheidet 3 Transmembrandomänen (TMD0 bis TMD2), die der Reihenfolge nach aus 5, 6 und 6 Transmembranhelices (TM) bestehen, sowie 2 intrazellulär lokalisierte Nukleotidbindungsfalten (NBF1 und NBF2).

Die TMD0 folgt auf den extrazellulär gelegenen N-Terminus und setzt sich aus 5 Transmembranhelices (TM1-5) zusammen. Über eine intrazellulär gelegene Schleife (CL3) ist TMD0 mit der aus 6 TM (TM6-11) bestehenden TMD1 verbunden. Zwischen TMD1 und der darauf folgenden TMD2 (6TM, 12-17) befindet sich eine ungefähr 40 kDa große, intrazellulär gelegene Domäne, welche die Nukleotidbindungsfalte 1 (NBF1) enthält. NBF2 (~38 kDa) liegt zwischen TMD2 und dem intrazellulären C-Terminus.

Abbildung 2 gibt den schematischen Aufbau des pankreatischen K_{ATP} -Kanals SUR1/ $K_{IR}6.2$ wieder, Abbildung 3 zeigt den Kanal in seiner Quartärstruktur.

1.4.4 Regulation des K_{ATP} -Kanals

Die Regulation ATP-abhängiger K^+ -Kanäle erfolgt im wesentlichen durch das Energiesubstrat ATP bzw. MgATP, sowie Magnesiumdinukleosidphosphate (MgNDP), wie auch durch das Phospholipid PIP_2 und den Acyl-CoA-Ester Oleoyl-CoA, welche beide die Empfindlichkeit des Kanals und somit dessen Arbeitspunkt einzustellen in der Lage sind.

Tucker et al., 1997 fanden, daß bei alleiniger Expression von $K_{IR}6.2$ ohne SUR ($K_{IR}6.2\Delta C$) der Kanal durch ATP gehemmt werden konnte, allerdings mit einer geringeren Affinität für ATP ($K_i \sim 100 \mu M$) als bei der Koexpression mit SUR1 ($K_i \sim 10 \mu M$). Tanabe et al., 1999 konnten daraufhin mittels $[\gamma\text{-}^{32}P]\text{-8-azido-ATP}$ direkt das Vorhandensein einer ATP-Bindungsstelle an $K_{IR}6.2$ beweisen. Erfolgt eine Bindung von ATP an diese Stelle, so wird der Geschlossenenzustand des Kanals stabilisiert.

SUR enthält je eine Nukleotid-Bindungsstelle in NBF1 und NBF2 (Ueda et al., 1997; Matsuo et al., 2000). Nach einem von Ueda et al., 1999b vorgeschlagenen Modell für den β -Zell- K_{ATP} -Kanal bindet NBF1 ATP und NBF2 MgADP, wenn der Quotient [ATP/ADP] klein ist (niedrige Energieladung der Zelle). Hierbei fördert sowohl die MgADP- als auch die MgATP-Bindung an NBF2 die ATP-Bindung an NBF1 in positiv kooperativer Weise. In dieser Konstellation stabilisiert SUR den Offenzustand des Kanals, und die Hemmung durch ATP wird überwunden. Wenn der Quotient [ATP/ADP] in der Zelle ansteigt, führt die verminderte Konzentration von MgADP zu einer Dissoziation von MgADP von NBF2 und nachfolgend zu einer verminderten Bindung von ATP an NBF1. Daraus resultiert eine Konformationsänderung von SUR1, die zu einer Affinitätserhöhung von $K_{IR}6.2$ für ATP führt, und der Kanal schließt sich.

Die SUR-Subtypen unterscheiden sich in ihren Nukleotidbindungseigenschaften: SUR1 zeigt im Gegensatz zu SUR2 eine ausgeprägte Mg^{2+} -Abhängigkeit seiner MgADP Bindung an NBF2. Die Affinität der NBF1 von SUR1 für ATP ist deutlich höher als diejenige von SUR2. Die NBF2 von SUR2B weist eine signifikant höhere Affinität für ADP auf als die NBF2 von SUR2A (Matsuo et al., 2000).

Weitere wichtige Regulatoren der K_{ATP} -Kanäle stellen auch negativ geladene Lipide, wie langkettige Acyl-Coenzym A-Ester oder PIP_2 dar. Sie verknüpfen hauptsächlich im Herzmuskel die Kanalaktivität mit dem Fettsäuremetabolismus. Eine ausführliche Darstellung der Lipidmodulation von K_{ATP} -Kanälen ist in Kapitel 1.8 zu finden.

Es bestehen Hinweise, daß auch G-Proteine (Sánchez et al., 1998), Endosulfine (Heron et al., 1998) und die Phosphorylierung des Kanals durch Proteinkinase A (Quinn et al., 2004) die Aktivität von K_{ATP} -Kanälen beeinflussen können. Die physiologische Rolle dieser Regulationsmechanismen ist aber zum jetzigen Zeitpunkt noch weitgehend ungeklärt.

1.4.5 Gewebsspezifische Zusammensetzung und Verteilung der Untereinheiten der K_{ATP} -Kanäle

Elektrophysiologische Untersuchungen haben gezeigt, daß die SUR-Subtypen 1 oder 2, sowie die Kanalporen $K_{IR6.1}$ oder $K_{IR6.2}$ zu unterschiedlichen Kanaleinheiten zusammengefügt werden können (s. Tab. 1). Dies stellt die Grundlage für die Gewebsdiversität der K_{ATP} -Kanäle dar und erklärt deren vielfältige Aufgaben in verschiedenen Geweben.

Für die SUR2-Subtypen wurde auch die Existenz von Mischkanälen der Form $(K_{IR6.1})_x(K_{IR6.2})_{4-x}$ und $(SUR2)_4$ nachgewiesen (Cui et al., 2001; Pountney et al., 2001).

Kanal-kombination	Vorkommen	Glibenclamid K_i (nM)	Öffner	Referenzen
$K_{IR6.1}/SUR2B$	Gefäßmuskulatur, K_{NDP}	42	Pinacidil Nicorandil	Russ et al., 1999 Yamada et al., 1997
$K_{IR6.2}/SUR2B$	glatte Muskulatur	27	Diazoxid Pinacidil	Russ et al., 2001 Isomoto et al., 1996
$K_{IR6.2}/SUR1$	Pankreas Neurone	1	Diazoxid Pinacidil	Inagaki et al., 1995 Gribble et al., 1997a
$K_{IR6.2}/SUR2A$	Herz- und Skelettmuskel	26	Cromakalim Pinacidil Nicorandil	Russ et al., 2001; Inagaki et al., 1996 Okuyama et al., 1998

Tabelle 1:
Gewebsspezifische Zusammensetzung der K_{ATP} -Kanäle aus den α - und β -Untereinheiten und deren pharmakologische Charakterisierung durch Schließer und Öffner
 Die GBC -Konzentrationen wurden in inside-out patches bei 22°C gemessen.

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

K_{ATP} -Kanäle spielen bei vielen zellulären Funktionen eine bedeutende Rolle, indem sie das Membranpotential und damit die Erregbarkeit einer Zelle an deren metabolischen Energiezustand, vereinfacht durch das ATP/ADP-Verhältnis widergegeben, anpassen. Dabei ist die Nukleotidempfindlichkeit der Kanäle ihre entscheidende Eigenschaft.

1. Einleitung

In den β -Zellen des Pankreas sind die ATP-abhängigen K^+ -Kanäle hauptsächlich an der Kopplung der Insulinfreisetzung an den Blutzuckerspiegel beteiligt (s. Abb. 4):

Die Aktivität der aus SUR1 und $K_{IR}6.2$ aufgebauten Kanäle sorgt normalerweise für ein Ruhemembranpotential von etwa -70 mV. Spannungsgesteuerte L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle (L_{VOCC} =voltage operated calcium channel) sind bei diesem Potential noch geschlossen.

Der nach einer kohlenhydrathaltigen Mahlzeit folgende Anstieg der Plasmakonzentration für Glucose führt über den Glucosetransporter GLUT2 zu deren Aufnahme

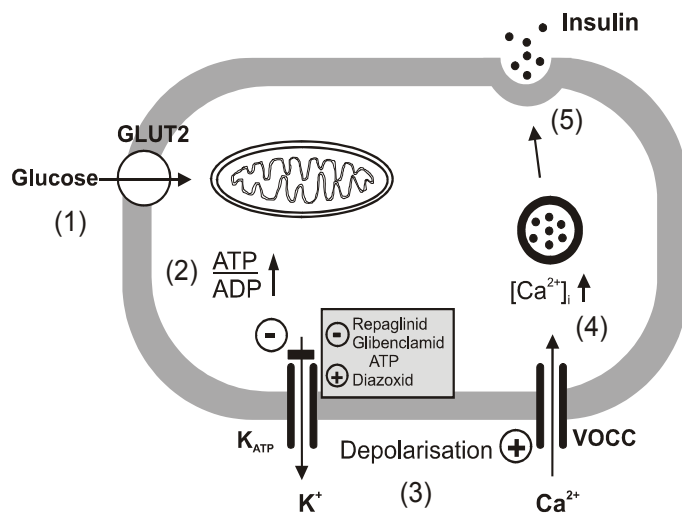


Abbildung 4: Modell der Insulinfreisetzung aus den β -Zellen des Pankreas (Konsensusmodell nach Cook & Hales, 1984) Aus Quast DMW 2002 (freundlicherweise überlassen)

in die β -Zelle (1). Dies aktiviert die im Zytoplasma und in den Mitochondrien stattfindende Glykolyse, welche zu einer erhöhten Synthese von ATP aus ADP führt, und der ATP/ADP-Quotient der Zelle steigt an (2). Hieraus resultiert die nukleotidvermittelte, durch ATP gesteuerte Inhibition der K_{ATP} -Kanäle und schließlich eine Depolarisation des Membranpotentials (3). Die Depolarisation öffnet spannungsgesteuerte L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle und löst somit einen Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle aus (4), wodurch es über eine Reaktionskaskade zur Exozytose von in Vesikeln gespeichertem Insulin kommt (5).

Desweiteren besitzen die in der Herzmuskulatur auftretenden und aus SUR2A/ $K_{IR}6.2$ bestehenden K_{ATP} -Kanäle eine zentrale Bedeutung bei der ischämischen Präkonditionierung des Myokards (IPC). Die IPC ist ein Schutzmechanismus der Herzmuskelzellen gegen Infarzierung während länger dauernder Perioden der Ischämie, der durch vorangegangene kurze Ischämiephasen aktiviert wird (Murry et al., 1986; Cohen et al., 2000; Gross und Fryer, 1999).

1. Einleitung

Normalerweise sind die myokardialen K_{ATP} -Kanäle geschlossen (Nichols und Lederer, 1991), jedoch öffnen sie sich während einer Ischämiephase aufgrund des dadurch bedingten niedrigen ATP/ADP-Quotienten der Zelle und des Anstieges von Oleoyl-CoA. Die Öffnung der Kanäle hat allerdings kaum Einfluß auf das Ruhemembranpotential in Richtung einer Hyperpolarisation, da dieses bei Kardiomyozyten prinzipiell schon nahe dem Nernst'schen Gleichgewichtspotential für K^+ liegt. Es ist aber eine Verkürzung von Aktionspotentialen zu beobachten, die zu einer verminderten Erregbarkeit der Zelle führen. Hierdurch kann die Zelle Energie einsparen und sich in Stressituationen (z.B. Sauerstoffmangel durch Ischämie) schützen (Nichols et al., 1991; Caverio et al., 1995).

Allerdings zog die Beobachtung, daß die K_{ATP} -Kanal Öffner Diazoxid (Birincioglu et al., 1999), Cromakalim (Grover et al., 1995b) oder BMS-180448 (Grover et al., 1995a) zwar in der Lage waren, die Ausdehnung eines Infarktes zu vermindern, aber nur geringen oder keinen Einfluß auf die Länge des Aktionspotentials hatten, diese Hypothese in Zweifel.

Elektrophysiologische Studien wiesen auf die Existenz eines mitochondrialen Kanals ($mitoK_{ATP}$) hin, welcher ähnlich dem sarkolemmalen Kanal durch ATP und GBC inhibierbar war (Inoue et al., 1991). Es gibt Hinweise, daß die $mitoK_{ATP}$ -Kanäle für den protektiven Effekt der ischämischen Präkonditionierung verantwortlich sein könnten, da die IPC mit einem selektiven Blocker des sarkolemmalen K_{ATP} -Kanals (HMR-1883) nicht aufgehoben werden konnte (Jung et al., 2000; Dhein et al., 2000). Ebenso konnte Diazoxid den $mitoK_{ATP}$ -Kanal mit 1000-2000-facher Potenz öffnen als den sarkolemmalen Kanal (Garlid et al., 1997), was die Schutzwirkung von Öffnern über die mitochondrialen K_{ATP} -Kanäle erklären würde. Allerdings ist keine der hier benutzten Verbindungen wirklich selektiv, und der $mitoK_{ATP}$ -Kanal ist bis heute noch nicht kloniert.

Reguliert wird der $mitoK_{ATP}$ vermutlich durch Adenosin, das von den Kardiomyozyten während einer Ischämie freigesetzt wird. Die Signaltransduktion verläuft über den Adenosinrezeptor und die Phospholipase C zur PKC (Proteinkinase C), die schließlich den Kanal aktiviert (Cohen et al., 2000). Auch andere Substanzen wie

Acetylcholin, welche die Phospholipase C aktivieren, können eine Öffnung von $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ vermitteln.

Neuere Untersuchungen lassen annehmen, daß die sarkolemmalen K_{ATP} -Kanäle die für die Vermittlung der IPC wichtigeren Kanäle sind. Knockout-Mäuse, denen sarkolemmale K_{ATP} -Kanäle fehlten, zeigten keine IPC (Suzuki et al., 2002; Quast et al., 2004).

Es gibt aber auch Wechselbeziehungen zwischen den beiden K_{ATP} -Kanalformen: So kann die Beeinflussung des Energiemetabolismus der Zelle durch $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ (z.B. vermittelt durch in den Mitochondrien entstehende ROS (= reactive oxygen species) oder durch die PKC zu Sekundäreffekten am sarkolemmalen K_{ATP} führen. Umgekehrt könnte die Beeinflussung des Membranpotentials (z.B. durch sarkolemmale K_{ATP} -Kanäle) eine Veränderung der Aktivität der $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ verursachen. Die Aktivierung von K_{ATP} -Kanälen in Neuronen und in der Skelettmuskulatur wirkt ebenfalls zytoprotektiv. In glatten Gefäßmuskeln sind die Kanäle wichtige Determinanten des Vasotonus, da ihre Öffnung zu einer Dilatation der Gefäße führt. Die K_{ATP} -Kanäle der juxtaglomerulären Zellen der Niere (umgewandelte glatte Gefäßmuskelzellen) sind an der Regulation der Reninsekretion beteiligt. Im Tubulusepithel der Niere spielen K_{ATP} -Kanäle jedoch eine eher marginale Rolle bei der Ionenrückresorption (Quast, 1996b).

1.6 Pathophysiologie: K_{ATP} -Kanalopathien

1.6.1 Kongenitaler Hyperinsulinismus im Kindesalter (HI)

Der kongenitale Hyperinsulinismus im Kindesalter (HI, früher PHHI; persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy) ist gekennzeichnet durch eine Unterfunktion bis hin zum Funktionsverlust von K_{ATP} -Kanälen. Dies führt zu einer ständigen Depolarisation der β -Zelle, wodurch die spannungsabhängigen L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle aktiviert werden und die intrazellulär erhöhte Ca^{2+} -Konzentration zur Insulinfreisetzung führt (Aguilar-Bryan und Bryan, 1999). Diese andauernde, erhöhte Insulinsekretion bedingt das Auftreten schwerer Hypoglykämien, welche irreversible Hirnschädigungen hervorrufen und bis zum Tode führen können.

Im allgemeinen manifestiert sich die Erkrankung bei der Geburt oder im ersten Lebensjahr. Geschätzt wird die Inzidenz auf 1:50000 Lebendgeburten in der Normalbevölkerung, in geographisch isolierten Populationen ist sie jedoch bedeutend höher (z.B. 1:2500 auf der Arabischen Halbinsel) (Dunne et al., 2004; Glaser et al., 2000).

Die Mehrzahl der Erkrankungen an HI treten sporadisch auf, aber es gibt auch familiäre Formen mit homozygoten, zusammengesetzt heterozygoten oder rein heterozygoten Genmutationen (Thomas et al., 1995; Nestorowicz et al., 1997; Huopio et al., 2000; Magge et al., 2004). Therapeutisch ist bei mildem Krankheitsverlauf die Gabe des K_{ATP} -Kanalöffners Diazoxid oder sogar nur eine spezielle Diät ausreichend, in über 90% der Fälle ist jedoch die subtotale Pankreatektomie indiziert, die aufgrund der resultierenden pankreatischen Insuffizienz in einen iatrogenen Diabetes mellitus mündet.

Als Krankheitsursache liegen in etwa 50% der Fälle Mutationen im SUR1-Gen (*ABCC8*) vor, wobei hier mehr als 100 verschiedene Formen beschrieben wurden (Dunne et al., 2004; Glaser et al., 2000). Hinsichtlich der funktionellen Auswirkungen unterscheidet man Mutationen der Klasse 1 und 2: Bei Klasse 1-Mutationen kommt es zu einem Verlust von K_{ATP} -Kanälen in der Plasmamembran, was durch beeinträchtigte SUR1-Synthese, veränderte SUR1-Reifung, defekten Kanalzusammenbau oder fehlerhaften Membrantransport an die Oberfläche hervorgerufen sein kann (Dunne et al., 2004; Taschenberger et al., 2002; Partridge et al., 2001; Yan et al., 2004). Da SUR1 für die Oberflächenexpression des $K_{IR6.2}$ erforderlich ist, fehlt letzterer ebenso (Zerangue et al., 1999). Klasse 2-Mutationen hingegen beeinträchtigen die Fähigkeit von MgADP (s. 1.4.4), die Kanalaktivität heraufzusetzen, womit die Hemmung durch ATP dominiert und der Kanal sogar bei einer niedrigen Blutglucosekonzentration permanent geschlossen bleibt (Dunne et al., 2004; Huopio et al., 2000; Nichols et al., 1996). Viele der Klasse 2-Mutationen haben ihren Ursprung in der Nukleotid-Bindungsdomäne (s. 1.4.3) des SUR1.

Weiterhin können bestimmte Mutationen im SUR1 (z.B. R1353H) die familiäre Leuzin-sensitive HI hervorrufen, bei welcher die Aufnahme der essentiellen

1. Einleitung

Aminosäure Leuzin zu einer reaktiven Hypoglykämie führt, was aber nur ein leichtes Krankheitsbild bedingt (Magge et al., 2004). Aufgrund dieser Mutationen ist der K_{ATP} -Kanal nur noch eingeschränkt empfindlich gegenüber einer Stimulation durch MgATP. Durch eine (auch bei Gesunden zu beobachtende) Leuzin-induzierte Zunahme der ATP-Produktion in der β -Zelle kommt es dann zu einem Überwiegen der Kanalhemmung mit gesteigerter Insulinsekretion. Auch kann eine vorausgegangene Behandlung mit dem Kanalblocker Tolbutamid (s. 1.7.1) zu einer Zunahme der Leuzin-Sensitivität führen.

Mutationen im $K_{IR}6.2$ als Ursache für HI sind wesentlich seltener als jene im SUR (Nestorowicz et al., 1997; Thomas et al., 1996; Henwood et al., 2005). Hier kommt es ebenfalls zur Abnahme oder zum Verlust der Aktivität des K_{ATP} -Kanals mit Entkoppelung der Insulinsekretion vom aktuell herrschenden Blutzuckerspiegel.

Schließlich können auch Mutationen in den metabolischen Enzymen Glucokinase (GCK) (Gloyn, 2003; Glaser et al., 1998), Glutamat-Dehydrogenase (GLUD1) (Stanley et al., 1998) und SCHAD (short-chain L-3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase) (Molven et al., 2004) milde Formen der HI auslösen, die sich gut mit dem Öffner Diazoxid (s. 1.7.2) behandeln lassen (Dunne et al., 2004), oder im Falle der GCK-Mutation sogar eine diätetische Therapie ermöglichen (Gloyn et al., 2003).

Hingegen erfordern Mutationen im SUR1 oder $K_{IR}6.2$, welche schwere Formen der HI auslösen, im allgemeinen die subtotale Pankreatektomie, da sie sich gegenüber Diazoxid refraktär zeigen (Dunne et al., 2004; Henwood et al., 2005). Neuerdings mehren sich die Hinweise, daß die durch bestimmte Mutationen im SUR1 verursachte HI im weiteren Verlauf in einen Diabetes mellitus Typ 2 (s. 1.6.4) übergehen kann (Huopio et al., 2000; Gribble et al., 1998b). Es wird vermutet, daß die mit der reduzierten Aktivität der K_{ATP} -Kanäle einhergehende Dauerdepolarisation der β -Zellmembran für einen ständigen Einstrom von Ca^{2+} -Ionen sorgt, welcher die Apoptose aktiviert und somit zu einer schwindenden Zahl an β -Zellen führt.

1.6.2 Neonataler Diabetes

Diese seltene Stoffwechselstörung (1:400000 Geburten) ist gekennzeichnet durch eine sich in den ersten 6 Lebensmonaten entwickelnde Hyperglykämie, die eine Therapie mit Insulin erforderlich macht. Es lassen sich zwei Formen unterscheiden: der permanente (PNDM) und der transiente neonatale Diabetes mellitus (TNDM). Letzterer bildet sich üblicherweise in einem Zeitraum von 3 bis 6 Monaten wieder zurück. Ungefähr die Hälfte aller Betroffener mit PNDM weisen heterozygote Mutationen im $K_{IR}6.2$ auf, welche die Kanalaktivität erhöhen (sogenannte „gain-of-function“-Mutationen) (Gloyn et al., 2004; Sagen et al., 2004; Gloyn et al., 2005). Patienten mit TNDM zeigen normalerweise Störungen beim Imprinting des Chromosoms 6q24 (Temple et al., 1995).

Bis zum heutigen Zeitpunkt sind insgesamt 20 Mutationen in 14 verschiedenen Abschnitten des $K_{IR}6.2$ -Kanals bekannt, welche den neonatalen Diabetes verursachen können. Diese treten gehäuft im Bereich der ATP-Bindungsstelle auf, wobei hier häufig die Aminosäurereste V59 und R201 betroffen sind.

Durch die gain-of-function-Mutationen entstehen unterschiedliche Krankheitsausprägungen, die sich bezüglich des Schweregrades unterscheiden. Die häufigste Klasse der Mutationen ist für die Entstehung des PNDM ohne weitere begleitende Symptome verantwortlich. Auf die intravenöse Verabreichung von Glucose reagieren diese Patienten nur mit einer äußerst geringen, inadäquaten Insulinsekretion; erstaunlicherweise ruft die Gabe von Sulfonylharnstoffen eine normale Insulinantwort hervor (Gloyn et al., 2004; Sagen et al., 2004; Zung et al., 2004; Proks et al., 2004). Andere Mutationsklassen verursachen zusätzlich zum neonatalen Diabetes gravierendere Symptome wie verzögertes Sprechen und Gehen und Muskelschwäche (Gloyn et al., 2004; Vaxillaire et al., 2004; Massa et al., 2005). Eine schwere Form des neonatalen Diabetes stellt das DEND-Syndrom dar mit Entwicklungsverzögerung, Muskelschwäche, Epilepsie und kraniofazialen Dismorphien (Gloyn et al., 2004; Proks et al., 2004; Proks et al., 2005). Jedoch gibt es auch Mutationen, die eine noch geringere Symptomatik als beim PNDM hervorrufen, z.B. den oben genannten TNDM. Desweiteren ist eine Mutation bekannt, welche unterschiedliche Schweregrade des Diabetes erzeugt, die vom

TNDM bis zum Diabetes des beginnenden Erwachsenenalters (Beginn 22.-26. Lebensjahr) reicht, wobei letzterer dem MODY (maturity-onset diabetes of the young) ähnelt (Yorifuji et al., 2005).

Der pathophysiologische Mechanismus der gain-of-function-Mutationen besteht in der verminderten Fähigkeit des Nukleotides ATP, den K_{ATP} -Kanal zu blockieren, was zu einer Erhöhung der Stromamplitude des Kanals führt und somit die Zellmembran hyperpolarisiert (Gloyn et al., 2004; Gloyn et al., 2005; Proks et al., 2004; Proks et al., 2005). Hierbei ist eine Korrelation zwischen dem klinischen Schweregrad der Erkrankung und dem Ausmaß der Unempfindlichkeit gegenüber ATP festzustellen: je schwächer die Hemmung des Kanals durch ATP, desto größer die Beeinträchtigung der Insulinsekretion.

Die molekularen Mechanismen der verminderten ATP-Empfindlichkeit sind vielfältig und bedürfen noch weiterer Aufklärung (Proks et al., 2004; Proks et al., 2005). Zum einen kann durch Mutation die ATP-Bindung direkt an der am $K_{IR}6.2$ lokalisierten Bindungsstelle beeinträchtigt sein, so z.B. beim neonatalen Diabetes (Gloyn et al., 2004; Gloyn et al., 2005; Proks et al., 2004; John et al., 2003). Im Gegensatz dazu betreffen Mutationen, welche das DEND-Syndrom auslösen, die Kanalhemmung durch ATP nur indirekt, indem sie den Offenzustand des Kanals stabilisieren und dessen Schlußfähigkeit behindern (Proks et al., 2004; Proks et al., 2005). Die Lokalisation derartiger Mutationen liegt in den für die Kanalsteuerung zuständigen Regionen, z.B. im $K_{IR}6.2$ (V59G). Schließlich scheinen manche Mutationen sowohl die intrinsische Steuerung als auch die ATP-Bindung zu beeinflussen (Proks et al., 2004; Proks et al., 2005). Handelt es sich bei den Mutationen um heterozygote Zustände, so entsteht für den aus 4 Monomeren bestehenden $K_{IR}6.2$ in den Zellen ein Mosaik zwischen 0 und 4 mutierten Untereinheiten. Jedoch erst wenn alle 4 Untereinheiten mutiert sind, wirkt sich der Defekt auf die ATP-Bindung aus. Insgesamt betrachtet ist daher die Änderung der ATP-Empfindlichkeit in der durchschnittlichen Kanalpopulation nur gering ausgeprägt (Gloyn et al., 2004; Gloyn et al., 2005; Proks et al., 2004). Anders verhält es sich bei Mutationen, welche die Kanalsteuerung betreffen. Hier wird der Offenzustand des Kanals durch die zunehmende Anzahl an Mutanten-Untereinheiten

energetisch stabilisiert (Proks et al., 2004) und die ATP-Empfindlichkeit von über 90% der in einer heterozygoten Population vorhandenen Kanäle ist betroffen. Dies unterstreicht die Bedeutung der Heterozygotie im Zusammenhang mit dem Schweregrad einer Mutation bei gain-of-function- K_{ATP} -Kanalopathien.

In der Behandlung des neonatalen Diabetes müssen zwei Ansätze berücksichtigt werden. Neuere Studien zeigen, daß der PNDM (ohne Begleitsymptomatik) gut auf Sulfonylharnstoffe anspricht (Gloyn et al., 2004; Sagen et al., 2004; Zung et al., 2004). Kanäle mit der Mutation für eine erhöhte Offenwahrscheinlichkeit sind jedoch weniger empfindlich gegenüber diesen Kanalblockern (Proks et al., 2004), weshalb hier zusätzlich Insulin (in Kombination mit einem Sulfonylharnstoff) gegeben wird.

1.6.3 MODY (maturity-onset diabetes of the young)

Diese Diabetesform mit Dysfunktion der β -Zellen folgt einem autosomal-dominanten Erbgang und tritt im frühen Erwachsenenalter auf (Gloyn, 2003; Fajans et al., 2001). Sie wird durch Mutationen in einem von wenigstens sieben unterschiedlichen Genen verursacht. So rufen heterozygote Mutationen mit einem Funktionsverlust der Glucokinase den MODY2 hervor, welcher oft asymptomatisch verläuft und nur mäßig erhöhte Blutzuckerwerte mit sich bringt. Im Gegensatz hierzu verursachen homozygote Mutationen dieses Enzymes eine ausgeprägtere Störung des β -Zellmetabolismus mit konsekutiver Entstehung eines permanenten neonatalen Diabetes (PNDM, s. 1.6.2). Fünf weitere MODY-Gene kodieren für verschiedene Transkriptionsfaktoren, die sowohl für die Entwicklung der β -Zellen als auch für die Expression von den Glucosestoffwechsel regulierenden Genen verantwortlich sind. Dabei kommt es über den gestörten Glucosestoffwechsel zu einem Mangel an inhibitorisch wirksamen ATP, und die Kanäle bleiben offen. Schließlich können auch Mutationen im $K_{IR}6.2$ selbst einen MODY auslösen (Yorifuji et al., 2005).

1.6.4 Diabetes mellitus Typ 2 (NIDDM)

Der nicht insulinabhängige Diabetes mellitus (NIDDM), kurz Typ 2-Diabetes, ist eine polygene Erkrankung, die durch angeborene Faktoren und Umwelteinflüsse (Hyperalimentation und Adipositas) verursacht wird. Gewöhnlich manifestiert er sich erst im späteren Erwachsenenalter. Pathogenetisch spielen vor allem eine herabgesetzte Insulinempfindlichkeit (Insulinresistenz) und eine gestörte Insulinsekretion der β -Zellen eine Rolle. Da der K_{ATP} -Kanal der β -Zelle die Insulinsekretion an den Blutzuckerspiegel koppelt, ist anzunehmen, daß Mutationen dieses Kanals existieren, die den Typ 2-Diabetes mitverursachen können.

Im $K_{IR}6.2$ Gen wurde der Polymorphismus $E^{23}K$ gefunden, bei dem in Position 23 die Aminosäure Glutamat (E) durch Lysin (K) ersetzt ist (Hansen et al., 1997). Bei europäischen Kaukasiern tritt der Basenaustausch heterozygot mit einer Häufigkeit von ~45% auf (Gloyn et al., 2001; Sakura et al., 1996; Inoue et al., 1997), die Häufigkeit der KK Homozygoten (bei denen in beiden Allelen E durch K ersetzt ist) beträgt ~13%. Es konnte gezeigt werden, daß zwischen dem Auftreten von Typ-2 Diabetes und der homozygoten Form des $E^{23}K$ -Polymorphismus eine deutliche Assoziation besteht (Gloyn et al., 2001; Hani et al., 1998). Der $E^{23}K$ -Polymorphismus bewirkt dabei eine erhöhte spontane Offenwahrscheinlichkeit und eine verminderte Sensitivität des $K_{IR}6.2$ für ATP. Zusammen führt dies zu einer Erhöhung der für die Insulinsekretion nötigen ATP-Konzentration (~1.5-fach/~3.1-fach für den E/K / K/K Polymorphismus) (Schwanstecher et al., 2002). Darüberhinaus verstärkt die $E^{23}K$ -Mutation die Empfindlichkeit des $K_{IR}6.2$ gegenüber dem Lipid Oleoyl-CoA, womit die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals in der β -Zelle erhöht und konsekutiv die Insulinsekretion vermindert wird (Riedel et al., 2003).

Zusätzlich können ein stiller Polymorphismus (AGG1273AGA) und Mutationen im Promotorbereich des SUR1-Genes in Kombination mit der $E^{23}K$ -Mutation ein bis zu 6-fach erhöhtes Risiko für einen NIDDM mit sich bringen (Laukkanen et al., 2004; Riedel et al., 2005).

Auch Polymorphismen in den Transkriptionsfaktoren HNF1 α und HNF4 α , sowie in dem Enzym Glucokinase (Triggs-Raine et al., 2002; Stone et al., 1996; Weedon et al., 2004) und in Genen des mitochondrialen Stoffwechsels (Sesti et al., 2003;

Poulton et al., 2002) bewirken ein erhöhtes Risiko für die Entstehung eines Diabetes mellitus Typ 2. Vermutlich ist hierfür eine gestörte Stoffwechselkontrolle der K_{ATP} -Kanalaktivität verantwortlich.

1.7 Pharmakologie der K_{ATP} -Kanäle

1.7.1 K_{ATP} -Kanal-Blocker

Sulfonylharnstoffe (SU) wie Tolbutamid und Glibenclamid (GBC) zählen zu den klassischen Blockern des K_{ATP} -Kanals. Als weitere chemische Gruppe kommen die Glinide (z.B. Repaglinid, Nateglinid), bei denen die saure Sulfonylgruppe durch eine Carboxylgruppe ersetzt ist. Die Sulfonylharnstoffe werden in die kurzkettigen Erst- (z.B. Tolbutamid) und langkettigen Zweitgenerationsabkömmlinge (z.B. GBC) eingeteilt; letztere besitzen zusätzlich eine Benzamidogruppe und vereinen so beide chemischen Klassen. Die Glinide werden als neuere Substanzen der dritten Generation der SU zugeordnet (s. Abb. 5).

Sulfonylharnstoffe und Benzamidoverbindungen binden an die β -Untereinheit SUR des K_{ATP} , fördern durch Kanalblock die Insulinfreisetzung und werden daher mit Erfolg bei der Behandlung des Typ 2-Diabetes eingesetzt. Aufgrund der höheren Affinität zu SUR1 sind die Wirkungen von Tolbutamid und GBC vornehmlich auf die β -Zellen des Pankreas beschränkt (Gribble et al., 1998c). Da GBC auch andere K_{ATP} -Kanäle inhibieren kann, sind Arzneimittelnebenwirkungen durchaus denkbar. Allerdings liegt der therapeutische Blutspiegel von Glibenclamid zwischen 1-10 nM (Matsuda et al., 1983; Coppack et al., 1990; Leibowitz und Cerasi, 1996) und somit unterhalb den publizierten IC_{50} -Werten von 27 nM für SUR2A/ $K_{IR}6.2$ -Kanäle (Gribble et al., 1998c; Russ et al., 2001) und 40-100 nM für NDP-abhängige K_{ATP} -Kanäle in Gefäßen (Beech et al., 1993; Russ et al., 1997). Fraglich ist allerdings, ob eine Langzeitbehandlung mit dem häufig eingesetzten GBC zur Schädigung des Herzens führt (Smits und Thien, 1995; Leibowitz und Cerasi, 1996), wobei die großangelegte britische Diabetesstudie UKPDS keine Hinweise für derartige unerwünschte Arzneimittelwirkungen fand. Insbesondere

1. Einleitung

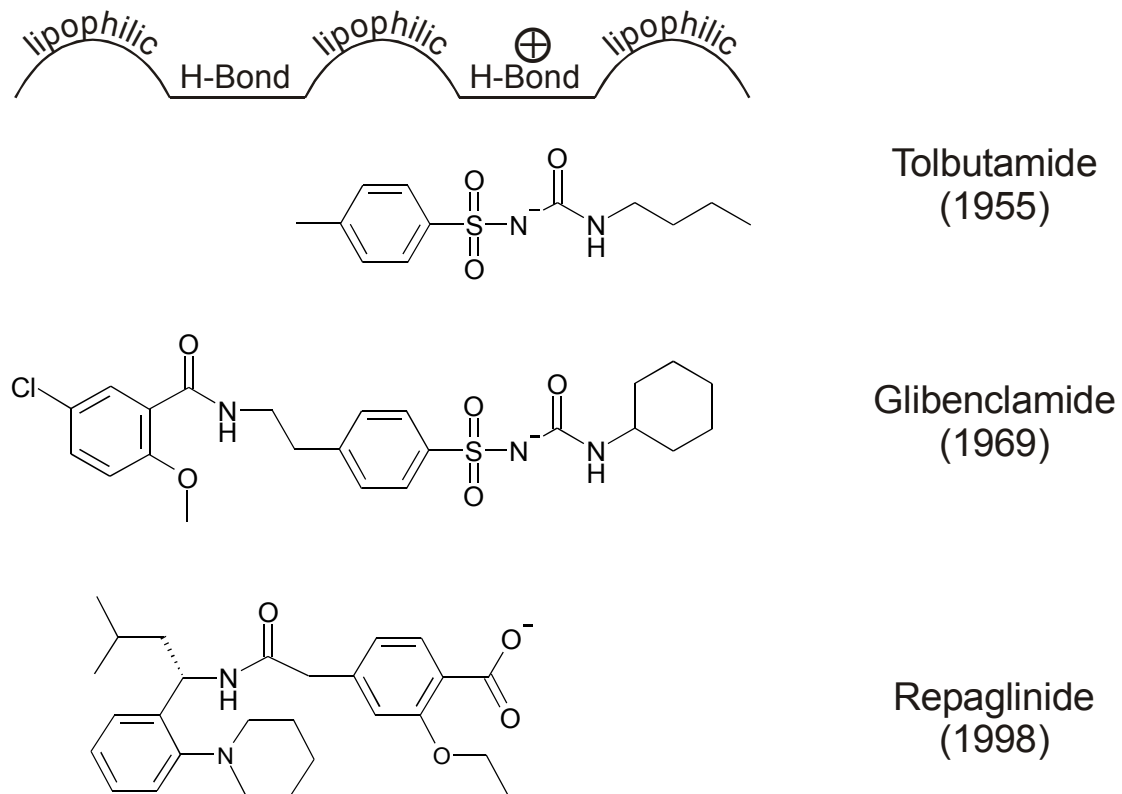


Abbildung 5:

Struktur von K_{ATP}-Kanal-Blockern der ersten, zweiten und dritten Generation

Die unterschiedlichen Substanzen verfügen über eine zentrale lipophile Bindungsstelle (Benzolring), von dem rechts eine funktionelle Gruppe mit negativer Ladung (NH-azide Verbindung: z.B. Sulfonylharnstoffgruppe) mit ankonjugiertem lipophilen Rest (lipophile Tasche) abgeht. Auf der linken Seite ist über eine Ethyl-Gruppe, die an eine Amidgruppe gebunden ist, eine substituierte lipophile Gruppe gebunden.

bei Repaglinid liegen hinsichtlich einer etwaigen herzscheidenden Wirkung noch zu wenig Daten vor, um dies abschließend zu beurteilen (Quast et al., 2004).

Zu den unerwünschten Wirkungen auf das Herz könnte die Hemmung der kardioprotektiv-wirksamen Öffnung von K_{ATP}-Kanälen in der frühen Ischämie, aber auch die Erhöhung des Koronarwiderstandes durch Hemmung von glattmuskulären K_{ATP}-Kanälen beitragen (Quast et al., 2004).

Für beide Strukturklassen sind am SUR Hochaffinitätsbindungsstellen vorhanden. Desweiteren ist eine Hemmung durch niederaffine Bindung der Substanzen an die α -Untereinheit K_{IR}6.2 beschrieben, die sich jedoch erst in sehr hohen Konzentrationen zeigt (Gribble et al., 1998c; Gros et al., 1999).

1. Einleitung

Die Einteilung der SUR-Isoformen kann anhand ihrer Sulfonylharnstoff-Empfindlichkeit erfolgen: Man unterscheidet so Hochaffinitäts- von Niederaffinitätsrezeptoren. Der im Pankreas vorkommende SUR1 ist hochaffin für GBC, dessen Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D in Radioligandbindungsstudien mit ^3H -GBC betrug an nativen β -Zellen 0.3 - 7 nM (Schwanstecher et al., 1992; Ashcroft und Ashcroft, 1992) und in SUR1-transfizierten HEK 293-Zellen \sim 5-7 nM (Ämmälä et al., 1996b; Hambrock et al., 2002a; Hambrock et al., 2002b). Bei Koexpression mit $K_{\text{IR}}6.2$ ergab sich eine Zunahme der Affinität mit einem K_D -Wert von 0.45 nM (Quast et al., 2004). Die halbmaximale Inhibitionskonzentration IC_{50} des Kanalblocks lag im nativen wie auch im rekombinanten System $<$ 10 nM (Babenko et al., 1998). Die Bindung von Tolbutamid an den pankreatischen K_{ATP} -Kanal erfolgt hingegen mit einer IC_{50} von wenigen μM deutlich weniger affin als GBC (Ämmälä et al., 1996a; Gribble et al., 1998c).

Die SUR2-Isoformen wurden lange als niederaffine Rezeptoren für Sulfonylharnstoffe betrachtet. Jedoch haben neuere Untersuchungen eine Bindungskonstante K_D für GBC von \sim 20-30 nM an SUR2A (Stephan et al., 2005) und SUR2B (Löffler-Walz et al., 2002) gezeigt. Auch hier erhöht die Koexpression die GBC-Empfindlichkeit, wobei dieser Effekt bei $K_{\text{IR}}6.2$ ausgeprägter ist als bei $K_{\text{IR}}6.1$ (Quast et al., 2004; Winkler/Stephan, in Vorbereitung).

Tolbutamid führt zwar zur Schließung des K_{ATP} -Kanals der β -Zelle, läßt aber kardiale K_{ATP} -Kanäle (SUR2A/ $K_{\text{IR}}6.2$) unbeeinflußt. Man geht daher davon aus, daß SUR2A keine Hochaffinitätsbindungsstelle für Tolbutamid (bzw. kurzkettige Sulfonylharnstoffe) besitzt (Venkatesh et al., 1991; Gribble et al., 1998c). Repaglinid hingegen bindet sowohl an kardiale als auch an β -Zell K_{ATP} -Kanäle mit gleicher Affinität (K_i im mikromolaren Bereich) (Gribble et al., 1997b; Stephan et al., 2005; in Vorbereitung). Es scheinen somit beide β -Untereinheiten, SUR1 und SUR2A, über eine Bindungsstelle für Benzamido-Verbindungen zu verfügen. Chimären- und Mutationsuntersuchungen deuten darauf hin, daß die Hybridsubstanz GBC (Sulfonylharnstoff- und Benzamido-Gruppe!) an SUR1 sowohl an die Bindungsstelle für kurzkettige Sulfonylharnstoffe als auch an diejenige für Benzamido-

1. Einleitung

Verbindungen bindet (Aguilar-Bryan et al., 1995; Ashfield et al., 1999; Mikhailov und Ashcroft, 2000; Quast et al., 2004; Bryan et al., 2005; s. Abb. 6).

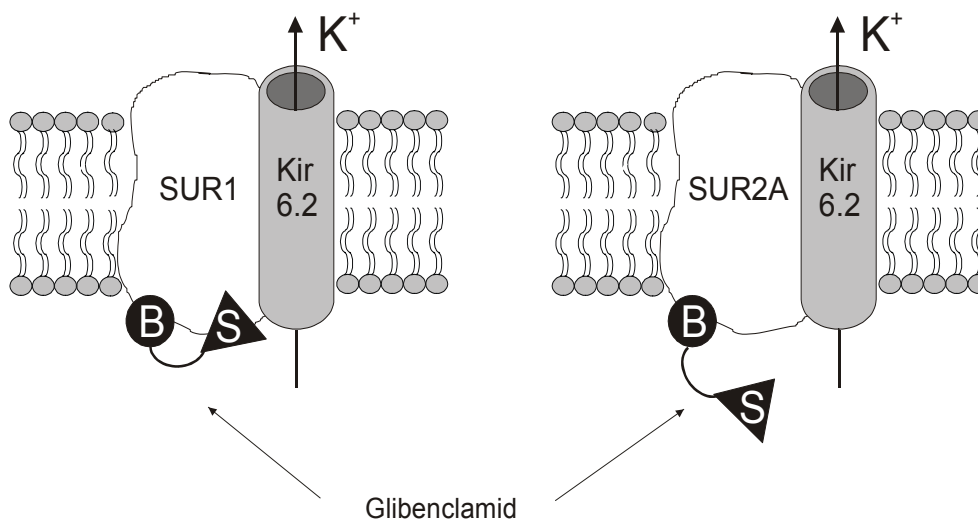


Abbildung 6: Modell der Bindungsstellen für K_{ATP}-Kanal-Blocker an SUR1 und SUR2A (nach Ashcroft und Gribble, 1999)

Die Bindung der Hybridsubstanz GBC kann über die Benzamidogruppe (B) und die Sulfonylharnstoffgruppe (S) erfolgen.

Zur Vereinfachung ist der K_{ATP}-Kanal unvollständig mit jeweils nur einer α - und β -Untereinheit dargestellt.

Substanzen, die ausschließlich mit der S-Bindungsstelle interagieren, werden als SUR-selektiv bezeichnet (kurzkettige Sulfonylharnstoffe und Nateglinid), wohingegen Benzamidoverbindungen (z.B. Repaglinid und Meglitinid) als unselektive Liganden gelten.

Am β -Zell K_{ATP} führt die Bindung von MgATP und MgADP zur Dissoziation der ³H-GBC-Bindung (mit dem Radioisotop Tritium markiertes GBC) (Niki et al., 1990). Schwanstecher et al., 1992 konnten zeigen, daß die scheinbare K_D des GBC keine lineare Funktion der MgATP-Konzentration darstellte und somit eine kompetitive Inhibition zwischen GBC und MgATP nicht anzunehmen war (s. Hambrock et al., 2002a). Man nimmt deshalb an, daß die Bindung von MgATP/MgADP an die Nukleotidbindungsfalten (NBF) die GBC-Bindungsstelle modifiziert. Einen klaren Beweis für die Kommunikation zwischen NBF und GBC-Bindungsstelle lieferten Ueda et al., 1999a. Sie demonstrierten die konzentrationsabhängige

1. Einleitung

Dissoziation von vorher gebundenem 8-azido- $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ von SUR1 durch die Applikation von GBC in Anwesenheit von MgATP oder MgADP.

Über die Anzahl der Sulfonylharnstoffmoleküle, die nötig sind, um den K_{ATP} zu schließen, herrscht Uneinigkeit. Dörschner et al., 1999 postulierten, daß die Bindung eines Moleküles für den Kanalschluß ausreicht, während eine Studie von Russ et al., 1999 an $K_{\text{IR}}6.1/\text{SUR2B}$ ergab, daß alle vier Bindungsstellen besetzt sein müssen.

1.7.2 K_{ATP} -Kanal-Öffner (KCO)

Die K_{ATP} -Kanal-Öffner (KCO, K_{ATP} channel opener) werden anhand ihres unterschiedlichen chemischen Aufbaus in verschiedene Strukturklassen eingeteilt (s. Tab. 2 und Abb. 7).

Strukturklasse	Wirkstoff
Benzopyrane	Levcromakalim
Benzothiadiazine	Diazoxid
Cyanoguanidine	Pinacidil, P1075
Pyrimidine	Minoxidilsulfat

Tabelle 2:

Wichtige chemische Strukturklassen von KCO und zugehörige Wirkstoffe

Wichtige Vertreter der KCO der ersten Generation sind Diazoxid und Minoxidilsulfat. Sie wirken unter physiologischen ATP-Konzentrationen selektiv am vaskulären K_{ATP} -Kanal ($\text{SUR2B}/K_{\text{IR}}6.1$) und werden bei therapierefraktärer Hypertonie und zur Behandlung hypertensiver Krisen eingesetzt, haben jedoch aufgrund schwerer Nebenwirkungen in der modernen Pharmakotherapie kaum eine Bedeutung. Außerdem besitzt Diazoxid die Fähigkeit, den K_{ATP} -Kanal der β -Zellen ($\text{SUR1}/K_{\text{IR}}6.2$) zu öffnen und wird daher bei der Therapie von Hyperinsulinämien beim Insulinom, sowie beim HI - falls der mutierte Kanal Diazoxid-empfindlich ist - eingesetzt (vgl. 1.6.1). Ein weiterer Öffner, Nicorandil, eignet sich zur Behandlung der Angina pectoris, da er neben der K_{ATP} -Kanalöffnung auch die Guanylatcyclase

1. Einleitung

in glatten Gefäßmuskelzellen aktivieren kann (Karow, 2002; Quast, 1996a). Cromakalim und P1075 sind vor allem experimentell bedeutsame Substanzen.

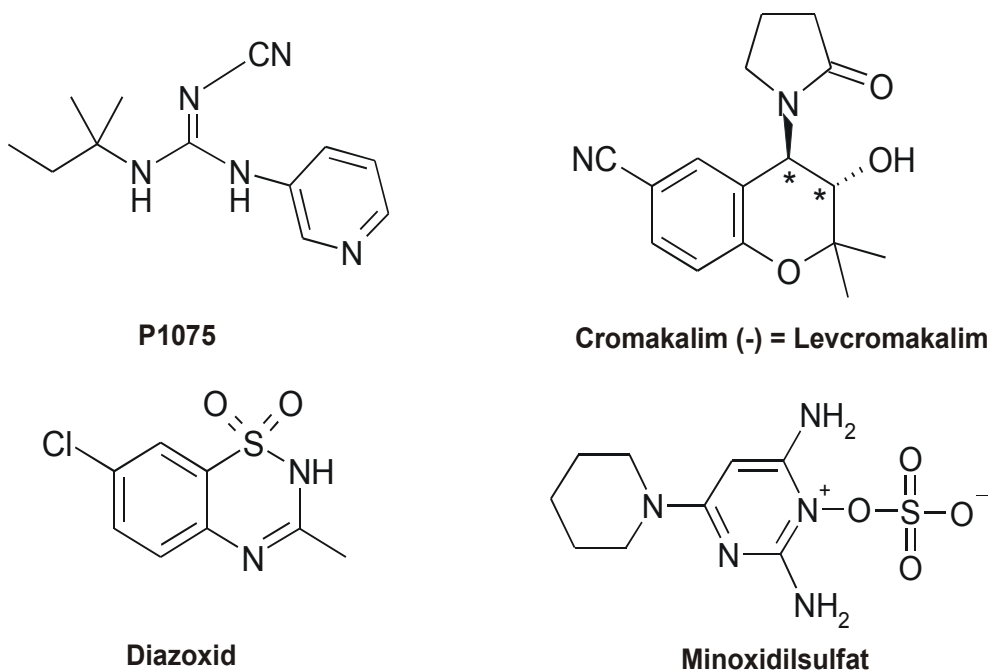


Abbildung 7: Strukturformeln von K_{ATP} -Kanal-Öffnern

Verschiedene neuentwickelte KCO lassen auf den Einsatz als Kardioprotektiva (Atwal et al., 1993; Grover et al., 1995c), bei der bronchialen Atemwegshyperreagibilität (Buchheit und Fozard, 1999) und der Dranginkontinenz (Yu und de Groat, 1998; Li, 1997) hoffen.

Die Bindungsstelle der K_{ATP} -Kanal-Öffner befindet sich auf der β -Untereinheit SUR (Hambrock et al., 1998; Schwanstecher et al., 1998). KCO benötigen zur hochaffinen Kanalöffnung und zur Bindung am Rezeptor hydrolysierbares MgATP oder MgADP (positiv allosterische Koppelung) (Schwanstecher et al., 1992; Quast et al., 1993; Dickinson et al., 1997; Löffler und Quast, 1997; Schwanstecher et al., 1998; Hambrock et al., 1999). Die Datenlage zur Regulation der KCO-Bindung am SUR durch Nukleotide ist keineswegs eindeutig (Russ et al., 2003; Ashcroft, 2000). Zur Zeit geht man davon aus, daß die Bindung von MgADP an die NBF2 zusammen mit der Öffnerbindung eine Konformation des Kanals stabilisiert, die ihn für die inhibitorische Wirkung von ATP am $K_{IR}6.2$ unempfindlich macht. Zu-

sätzlich spielen möglicherweise ATPase-Aktivitäten der NBF eine Rolle (Schwanstecher et al., 1998; Bienengraeber et al., 2000; Zingman et al., 2001). Wie Hambrock et al., 1999 zeigen konnten, bewirken Varianten in den 42 C-terminalen Aminosäuren eine 4-5-fach niedrigere Affinität für die Öffnerbindung an SUR2A im Vergleich zur Bindung an SUR2B. Dies zeigt, daß neben dem C-Terminus auch der restliche Anteil von SUR die Affinität beeinflusst. Uhde et al., 1999 konnten zwei Regionen der TMD2 von SUR2B identifizieren, die für die hochaffine Bindung von P1075 verantwortlich sind. Beide Regionen befinden sich an SUR2B in intrazellulären Schleifen und bilden dabei die Bindungstasche für P1075 aus. Ersetzt man bei dem normalerweise für Öffner unempfindlichen SUR1 die entsprechenden Regionen durch jene von SUR2, kann man die Affinität des so mutierten SUR für P1075 in den submikromolaren Bereich steigern (Hambrock et al., 2004).

In ähnlicher Weise konnte die Bindungsstelle des Benzopyrans Levcromakalim ebenfalls auf der TMD2 von SUR2A lokalisiert werden (D'hahan et al., 1999). Ein Austausch dieser Domäne durch den entsprechenden Bereich von SUR1 hob die Wirkung von Levcromakalim auf.

Für die Diazoxidinteraktion konnte keine strenge Verbindung zu einer bestimmten Domäne hergestellt werden. Unterschiede in der Wirksamkeit von Diazoxid bei K_{ATP} -Kanälen mit SUR1 oder SUR2A als β -Untereinheit könnten demnach auf unterschiedlicher Signaltransduktion von der Bindung hin zur Kanalöffnung beruhen. Dies wird durch Bindungsstudien an rekombinanten SUR1 und SUR2B unterstützt, die für Diazoxid ähnliche K_d -Werte ergaben (Schwanstecher et al., 1998; Hambrock et al., 1999; Russ et al., 2003).

1.8 Modulation von K_{ATP} -Kanälen durch negativ geladene Lipide

1.8.1 Modulation durch PIP_2 und DOGS-NTA

Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2 , s. Abb. 8) ist ein in der Zellmembran vorkommendes Phospholipid, das aus einer negativ geladenen Kopfgruppe (phosphorylierte Hydroxylgruppen des mehrwertigen Zuckers Inositol) besteht und

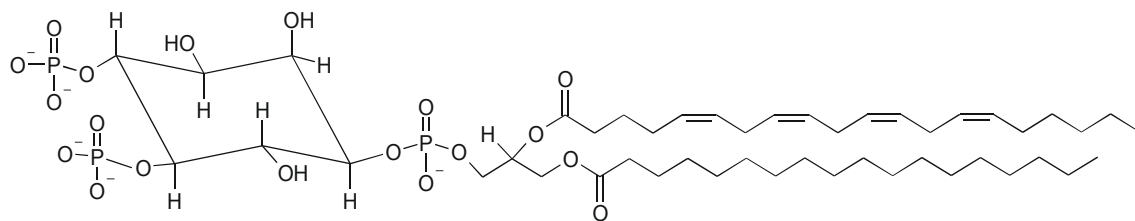


Abbildung 8: Strukturformel von PIP_2 (L- α -phosphatidyl-D-myo-inositol-4,5-bisphosphat)

daran anschließend, über Veresterung mit Glycerol, einen langen hydrophoben Fettsäurerest besitzt. Es ist das Vorläufermolekül von IP_3 (Inositol-1,4,5-trisphosphat) und DAG (Diacylglycerol), sowie auch von PIP_3 (Phosphatidylinositol-1,4,5-trisphosphat) und damit ein funktionell wichtiger Ligand an zahlreichen Ionenkanälen und Transportern (Hilgemann et al., 2001). Einerseits kann die Bindung von PIP_2 eine rein konstitutive Rolle bei der Stabilisierung des aktiven Zustandes eines Ionenkanals spielen. Auf der anderen Seite können Änderungen in der PIP_2 -Konzentration der Membran als Signale benutzt werden, um die Offenwahrscheinlichkeit von Ionenkanälen zu regulieren. Durch die G-Protein-aktivierte Phospholipase C wird PIP_2 in DAG (Diacylglycerol) und IP_3 gespalten, welche wichtige Überträgersubstanzen bei der intrazellulären Signaltransduktion darstellen und z.B. durch Aktivierung von Proteinkinasen oder Freisetzung von Ca^{2+} aus dem endoplasmatischen Retikulum verschiedenste Stoffwechseleffekte hervorrufen. Schließlich ist PIP_2 durch Interaktion mit diversen Hüllproteinen und Dynamin auch bedeutsam für den Membranfluß, besonders bei der Knospung und der Rückgewinnung von Membranmaterial (Lee et al., 1999; Czech, 2003). PIP_2 ist ein potenter Aktivator von K_{ATP} -Kanälen, sowie auch von Na^+ und Ca^{2+} -Carriern. Es erhöht die Offenwahrscheinlichkeit der K_{ATP} -Kanäle (Hilgemann und

Ball, 1996; Fan und Makielski, 1999), indem es ihre ATP-Sensitivität herabsetzt (Baukrowitz et al., 1998; Shyng und Nichols, 1998; Baukrowitz und Fakler, 2000). Untersuchungen an kardialen K_{ATP} -Kanälen (SUR2A/ K_{IR} 6.2) haben ergeben, daß diese eine beträchtliche Variabilität in der Empfindlichkeit gegenüber ATP und GBC besitzen (Krauter et al., 2001). Dies wurde auf den in der Zellmembran schwankenden Gehalt an Phospholipiden wie PIP_2 zurückgeführt. Entsprechend dem metabolischen Zustand der Zelle wird vermehrt PIP_2 gebildet oder abgebaut und so der Arbeitspunkt der Kanäle hinsichtlich ihrer ATP-Sensitivität moduliert. So führt die Aktivierung der Phospholipase C zu einer Abnahme der PIP_2 -Konzentration (Stauffer et al., 1998) und einer Zunahme der Hemmbarkeit durch ATP (Baukrowitz et al., 1998; Xie et al., 1999), wohingegen die Überexpression von Phosphatidylinositol-4-Phosphat-5-Kinase die Empfindlichkeit gegenüber ATP reduziert (Shyng et al., 2000a).

Desweiteren konnte PIP_2 auch die GBC- und Öffnereffekte (P1075 und Cromakalim) am K_{ATP} vollständig hemmen. Für die Modulation der Sensitivität gegenüber GBC und ATP wurden zwei unterschiedliche molekulare Mechanismen angenommen (Krauter et al., 2001):

Die ATP-Hemmkurve wurde durch PIP_2 kompetitiv nach rechts, zu höheren ATP-Konzentrationen verschoben (Baukrowitz et al., 1998).

Im Gegensatz dazu veränderte sich die GBC-Hemmkurve in nicht-kompetitiver Weise, indem PIP_2 die Anzahl GBC-unempfindlicher Kanäle heraufsetzte und somit das Maximum der durch GBC erreichbaren Hemmung reduzierte. Die IC_{50} der restlichen GBC-empfindlichen Kanäle blieb unverändert. Dies ist vereinbar mit einem allosterischen Hemmechanismus, wobei zwei Kanalzustände in Bezug auf die GBC-Sensitivität angenommen werden müssen: GBC-empfindlich und nach Applikation von PIP_2 GBC-unempfindlich.

Hinsichtlich der Beeinflussung der Öffnerbindung durch Lipide konnte beobachtet werden, daß PIP_2 die aktivierende Wirkung der KCO Cromakalim und P1075 deutlich verringerte (Krauter et al., 2001).

Darüberhinaus beobachteten Fan und Makielski, 1997 und Krauter et al., 2001, daß die Abschwächung der ATP-Bindung durch PIP_2 mittels Polykationen wie

Polylysin und Neomycin aufgehoben werden konnte, wobei hier eine direkte elektrostatische Interaktion zwischen den Polykationen und dem anionischen Lipid in Betracht gezogen werden muß. Es zeigte sich aber auch, daß die PIP_2 -induzierte Abnahme der Sensitivität gegenüber GBC und KCO durch die Polykationen nicht beeinflussbar war. Somit ist anzunehmen, daß PIP_2 die ATP-Hemmung über einen Mechanismus moduliert, der sich zumindest teilweise von dem der Modulation der GBC-Hemmung und KCO-Aktivierung unterscheidet (Krauter et al., 2001).

Weiterhin untersuchten Krauter et al. die für eine Modulation von K_{ATP} -Kanälen strukturellen Erfordernisse von Lipiden. Dabei wurde die Fähigkeit unterschiedlicher Lipide betrachtet, Einfluß auf die ATP- und GBC-Inhibition und Aktivierung durch KCO zu nehmen.

Das Zwitterion PC (Phosphatidylcholin), das neutrale DOG (Dioleoylglycerol) und das schwach negativ geladene PI (Phosphatidylinositol) hatten keinen Effekt auf die Sensitivität von K_{ATP} -Kanälen gegenüber ATP, GBC und P1075. Im Gegensatz dazu waren die stark negativ geladenen Phosphatidylinositolphosphate ($\text{PI}(4)\text{P}$, $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$, $\text{PI}(3,4)\text{P}_2$ und $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$) potente Modulatoren aller drei betrachteten Bindungseigenschaften. Daher ist für die Lipidwirkung an K_{ATP} -Kanälen eine negativ geladene Kopfgruppe und ein hydrophober Fettsäurerest von entscheidender Bedeutung. Dabei ist es unbedeutend, durch welche Molekülgruppen die negativen Ladungen gestellt werden, da auch das künstliche Lipid DOGS-NTA (**d**ioleoyl**g**lycerol-**s**uccinyl-**n**itrilo**t**riacetic **a**cid, s. Abb. 9) mit seiner negativ geladenen NTA-Kopfgruppe (Nitrilotriessigsäure) als voller Ersatz für die PIPs mit ihrem phosphorylierten Inositolring betrachtet werden kann.

Die Frage nach dem Mechanismus der Interaktion von PIP_2 mit ATP wurde mittels eines fluoreszierenden ATP-Analogons, dem 2,4,6-Trinitrophenyl (TNP-ATP) untersucht (MacGregor et al., 2002). Es zeigte sich eine Konkurrenz zwischen Lipiden und ATP um die Bindungsstelle am Carboxy-Terminus des $\text{K}_{\text{IR}}6.1$ und 6.2.

1. Einleitung

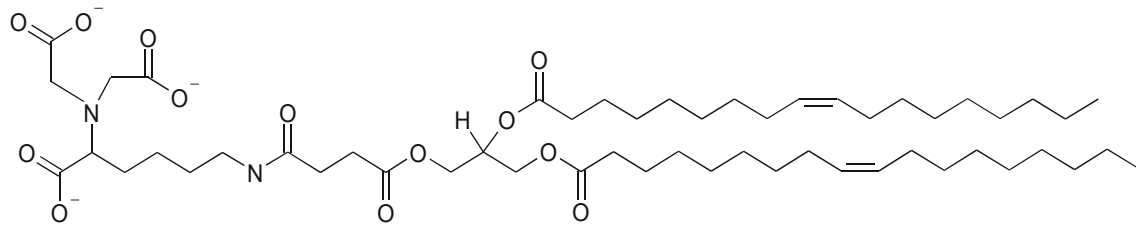


Abbildung 9:

**Strukturformel des künstlichen Lipids DOGS-NTA (1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-
[N(5-Amino-1-Carboxypentyl)iminodiacetic Acid]succinyl)**

Neuerdings konnte am Amino-Terminus des $K_{IR}6.2$ ein Argininrest in Position 54 als eine wesentliche Determinante der PIP_2 -Wechselwirkung identifiziert werden (Schulze et al., 2003b). Mutationen des Arginins zum neutralen Glutamin (R54Q) und besonders zum negativ geladenen Glutamat (R54E) setzten die PIP_2 -Modulation der ATP-Hemmung völlig außer Kraft, wohingegen der Austausch von Arginin mit Lysin (R54K) keine Auswirkungen erkennen ließ. Damit scheinen elektrostatische Interaktionen zwischen Arginin-54 und PIP_2 grundlegend für die Modulation der ATP-Inhibition zu sein.

Ebenso wurden im Bereich des C-Terminus des $K_{IR}6.2$ an den Positionen 176, 177 und 206 Argininreste (Baukrowitz et al., 1998; Shyng und Nichols, 1998; Shyng et al., 2000b; Cukras et al., 2002) als bedeutsam für eine Interaktion mit PIP_2 erkannt. Diese führt dazu, daß die zytoplasmatische Domäne des Kanals in Richtung der Membran gezogen und somit der Offenzustand stabilisiert wird. Im Gegensatz hierzu wird bei der ATP-Bindung durch Wechselwirkung mit Aminosäureresten an den Positionen 50, 54, 182, 185, 201, 20b und 334 (Tucker et al., 1997; Drain et al., 1998; Li et al., 2000; Shyng et al., 2000b) die zytoplasmatische Domäne weg von der Membran gezogen und ein Geschlossenzustand des Kanals stabilisiert (Enkvetchakul und Nichols, 2003).

1.8.2 Modulation durch den LC-Acyl-CoA-Ester Oleoyl-CoA

Langkettige (long chain) Acyl-Coenzym A-Ester (LC-Acyl-CoA-Ester) sind wie die Phosphatidylinositolphosphate amphiphil aufgebaute Substanzen mit einer hydrophilen anionischen Kopfgruppe in Form des Coenzym A und einem langkettigen (im allgemeinen ≥ 12 Kohlenstoffatome) gesättigten oder ungesättigten hydrophoben Fettsäurerest (s. Abb. 10).

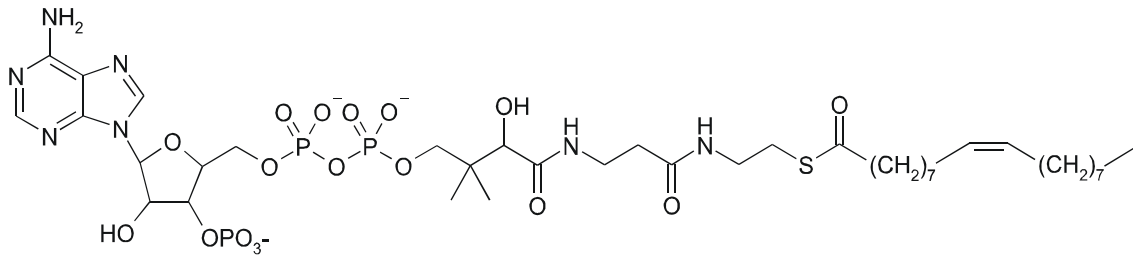


Abbildung 10: Strukturformel des LC-Acyl-CoA-Esters Oleoyl-CoA

Sie dienen dem Herzen als Hauptstoffwechselsubstrate und stellen die aktivierten Formen der Fettsäuren dar, die während der β -Oxidation im Mitochondrium zur Energiegewinnung in Form von ATP genutzt werden können. Darüberhinaus spielen sie eine wichtige Rolle bei der Regulation von K_{ATP} -Kanälen und verbinden so den Fettsäuremetabolismus mit der elektrischen Aktivität der Zelle (s. Abb. 11). Die ersten Untersuchungen zur Wirkung der LC-Acyl-CoA-Ester wurden an inside-out-patches von pankreatischen β -Zellen der Maus (SUR1/ $K_{IR}6.2$) durchgeführt (Bränström et al., 1997). Es zeigte sich, daß LC-Acyl-CoA-Ester die Aktivität der K_{ATP} -Kanäle stark heraufsetzten und die mittleren Kanalöffnungszeiten verlängerten. Diese potente Aktivierung konnte auch in der Gegenwart verschiedener ATP/ADP-Konzentrationsverhältnisse beobachtet werden, und die gleichzeitige Zugabe von MgADP und CoA-Ester rief einen supra-additiven Effekt auf die Öffnungszeiten hervor. Pathophysiologisch findet diese Beobachtung ihr Korrelat beim Diabetes mellitus Typ 2, der zu erhöhten Konzentrationen an Oleoyl-CoA in der β -Zelle führt.

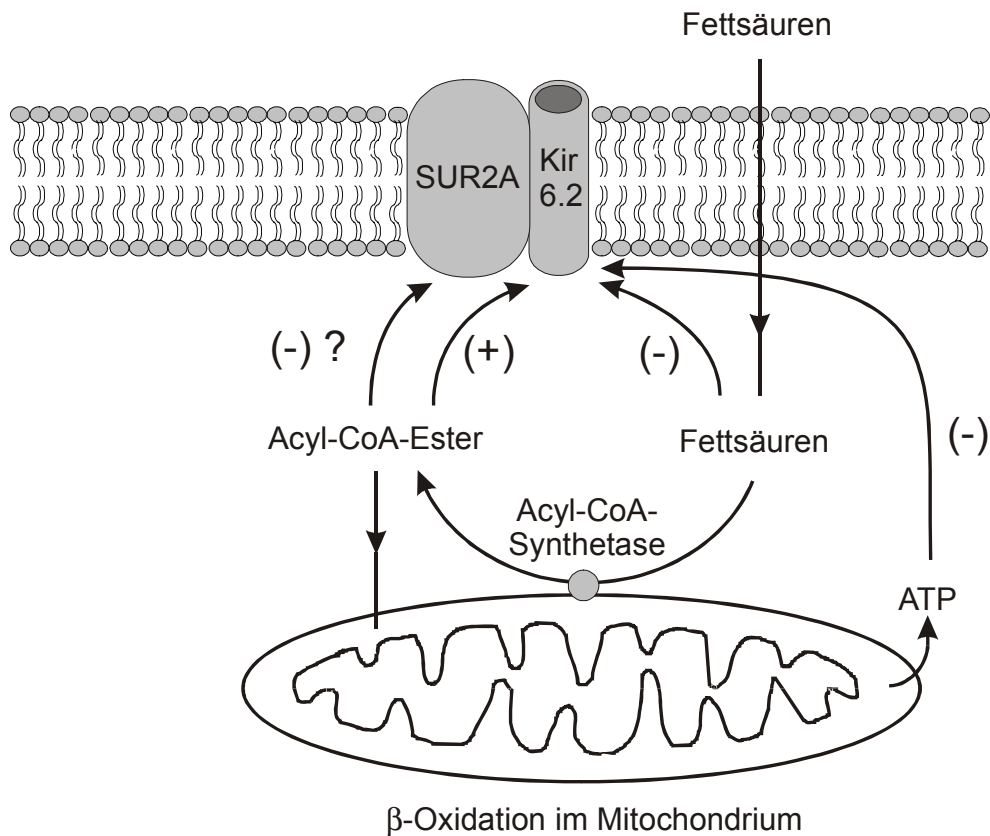


Abbildung 11: Regulation der Aktivität des kardialen K_{ATP} -Kanals durch den Fettsäuremetabolismus; Beziehung zwischen Nukleotid- und Fettsäuremetabolismus (modifiziert nach Liu et al., 2001a)

An der äußeren Mitochondrienmembran werden langkettige Fettsäuren mit Coenzym A konjugiert, und es entstehen die metabolisierbaren langkettigen Acyl-CoA-Ester. Diese werden mittels eines Transporters zusammen mit Carnitin in die mitochondriale Matrix transportiert, wo sie als Substrate der β -Oxidation dienen. Im Zytosol erleichtern die langkettigen Acyl-CoA-Ester die Öffnung von K_{ATP} -Kanälen, indem sie die ATP-Sensitivität reduzieren. Freie Fettsäuren und das aus der β -Oxidation entstandene ATP wirken inhibitorisch auf den Kanal.

Liu et al., 2001a fanden an kardialen Myozyten des Meerschweinchens (SUR2A/ $K_{IR6.2}$) ebenfalls eine Aktivierung der K_{ATP} -Kanäle mit gesteigerter spannungsabhängiger (zunehmend mit Depolarisation) Offenwahrscheinlichkeit durch Applikation des LC-CoA-Esters Oleoyl-CoA. Desweiteren reduzierte Oleoyl-CoA die ATP-Sensitivität der Kanäle, so daß die halbmaximale Inhibitionskonzentration IC_{50} für ATP um über das 200-fache anstieg. Durch diese Resistenz gegenüber ATP könnte während Phasen des metabolischen Stresses, z.B. einer kardialen Ischämie oder Hypoxie, die Öffnung der K_{ATP} -Kanäle erleichtert und mit der resultierenden Abnahme der Erregbarkeit der Zelle Energie eingespart werden.

1. Einleitung

Die in Anwesenheit von Oleoyl-CoA beschriebene Insensitivität gegenüber ATP zeigte sich auch gegenüber GBC. Dies spricht für eine Konformationsänderung des K_{ATP} -Kanals hin zu einem ligandenunempfindlichen Zustand (Alekseev et al., 1998). Unterstützt wird diese Annahme noch durch die Beobachtung, daß LC-Acyl-CoA-Ester einen Schutz der Kanäle vor Rundown bieten und nach einem erfolgten partiellen Rundown diese reaktivieren konnten.

Freie Fettsäuren, die Vorläufersubstanzen der LC-Acyl-CoA-Ester inhibierten die K_{ATP} -Kanäle (Liu et al., 2001a).

LC-Acyl-CoA-Ester aktivieren sowohl K_{ATP} -Kanäle aus pankreatischen β -Zellen (Bränström et al., 1997) als auch Kanäle aus kardialen Myozyten (Liu et al., 2001a). Pankreatische und kardiale K_{ATP} -Kanäle besitzen beide die gleichen α -Untereinheiten ($K_{IR}6.2$), jedoch unterschiedliche β -Untereinheiten: SUR1 in β -Zellen und SUR2A in Kardiomyozyten. Der Effekt der Ester auf die ATP-Bindung ist an den Myozyten jedoch viel ausgeprägter als an den β -Zellen (Liu et al., 2001a). Die Mutante $K_{IR}6.2\Delta36$ (pankreatischer K_{ATP} -Kanal ohne die SUR1-Untereinheit) ließ sich ebenfalls wie der β -Zell-Wildtyp SUR1/ $K_{IR}6.2$ durch Oleoyl-CoA aktivieren. Insgesamt lassen diese Beobachtungen den Schluß zu, daß die Untereinheit $K_{IR}6.2$ die Bindungsstelle für Oleoyl-CoA im Pankreas darstellt (Bränström et al., 1998; Gribble et al., 1998a). Die sehr viel stärkere Wirkung des Oleoyl-CoA in nativen Kardiomyozyten läßt auch die β -Untereinheit SUR2A (jedoch nicht SUR1) als Interaktionsbereich für die Esterbindung in Betracht kommen, wobei hier zwei Mechanismen denkbar sind: Zum einen könnte die Interaktion zwischen Lipid und $K_{IR}6.2$ durch den SUR subtypenspezifisch beeinflußt werden, zum anderen könnte die Kanalaktivierung aber auch durch eine direkte Bindung des Lipides am SUR erfolgen (s. Fragestellung, 1.9).

Liu et al., 2001 verglichen die Effekte der LC-Acyl-CoA-Ester mit denen von PIP_2 . Die beiden Lipide zeigen einige Gemeinsamkeiten:

(1) Sie haben keinen Einfluß auf die Offenwahrscheinlichkeit der K_{ATP} -Kanäle vor Einsetzen des Rundowns. (2) Sie verändern die ATP-Sensitivität durch Verschiebung der Affinität gegenüber ATP. (3) Sie verhindern die Hemmbarkeit durch Sulfonylharnstoffe.

1. Einleitung

Auf der anderen Seite gibt es auch hinsichtlich mehrerer Aspekte Unterschiede: (1) Durch steigende intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen kann die Wirkung von PIP_2 aufgehoben werden. Oleoyl-CoA lässt sich durch die Ca^{2+} -Konzentration nicht beeinflussen. (2) Oleoyl-CoA bewirkt eine rasche Abnahme der ATP-Empfindlichkeit, wohingegen PIP_2 langsamer agiert. (3) Oleoyl-CoA ist ein spezifischer Modulator der K_{ATP} -Kanäle (Rohács et al., 2003), PIP_2 aktiviert verschiedene Mitglieder der einwärtsgerichteten Kaliumkanäle (Fan und Makielski, 1997; Huang et al., 1998; Rohács et al., 1999).

Neuere Untersuchungen zur Lipidmodulation der K_{ATP} -Kanäle zeigen einen für LC-Acyl-CoA-Ester (z.B. Oleoyl-CoA) und Phosphatidylinositolphosphate (z.B. PIP_2) identischen Wirkmechanismus (Schulze et al., 2003a). Mutationen im C- und N-Terminus des $\text{K}_{\text{IR}}6.2$ reduzierten sowohl die PIP_2 - als auch die Oleoyl-CoA-Modulation der ATP-Empfindlichkeit und machen damit eine gemeinsame Bindungsstelle für beide Lipide am $\text{K}_{\text{IR}}6.2$ plausibel. Weiterhin spielen für die Lipidbindung elektrostatische Interaktionen eine Rolle, denn Polykationen konnten die Effekte von Oleoyl-CoA und PIP_2 auf die ATP-Empfindlichkeit vermindern. Dabei interagieren wahrscheinlich die Polykationen nicht direkt mit der ATP-Bindungsstelle, sondern blockieren die für die Bindung der Lipide nötigen elektrostatischen Wechselwirkungen.

Über den genauen Mechanismus der wechselseitigen Beeinflussung von ATP und Lipiden herrscht noch Uneinigkeit:

Ein Modell geht von einem allosterischen Inhibitionsmechanismus der Lipide gegenüber ATP aus. Demnach reduzieren Oleoyl-CoA und PIP_2 die ATP-Empfindlichkeit, indem sie den Offenzustand des K_{ATP} -Kanals stabilisieren (Enkvetchakul et al., 2000). Die Beobachtungen lassen sich jedoch auch mit einem Mechanismus vereinbaren, nach dem Oleoyl-CoA bzw. PIP_2 und ATP an sich gegenseitig überlappende Bereiche des $\text{K}_{\text{IR}}6.2$ binden (Fan und Makielski, 1999; MacGregor et al., 2002; Enkvetchakul und Nichols, 2003).

Erstaunlicherweise konnte die Kopfgruppe des Oleoyl-CoA, das freie Coenzym A, mit einem IC_{50} -Wert von $265 \pm 33 \mu\text{M}$ die K_{ATP} -Kanäle hemmen. Somit interagiert Coenzym A alleine mit der inhibitorischen ATP-Bindungsstelle, wohingegen

1. Einleitung

Coenzym A als Teil von Oleoyl-CoA mit der aktivierenden Lipidbindungsstelle wechselwirkt (Schulze et al., 2003a).

Die Verknüpfung der Aktivität des K_{ATP} -Kanals mit dem Fettsäurestoffwechsel der kardialen Myozyten (s.o.) erlangt unter pathophysiologischen Bedingungen besondere Bedeutung: Innerhalb der ersten 5 Minuten einer low-flow-Ischämie steigt die intrazelluläre Konzentration an langkettigen Acyl-CoA-Estern im Myozyten an (van der Vusse et al., 1987; van der Vusse et al., 1992). Neely und Feuvray, 1981 stellten eine Zunahme der Konzentration an Acyl-CoA-Ester im Kaninchenmyokard von 0.18 auf 0.33 mmol/g Trockengewebe fest. Darüberhinaus beobachtet man eine Abnahme der Aktionspotentialdauer und eine Zunahme des K^+ -Ausstroms, sowie eine Störung der kontraktile Funktionen, jeweils bei unveränderten intrazellulären ATP-Konzentrationen (Bethell et al., 1998). Es ist vorstellbar, daß die Zunahme der Acyl-CoA-Ester zu einer Aktivierung der K_{ATP} -Kanäle mit den beschriebenen Effekten auf die Aktionspotentialdauer und die Ionenströme führen könnte. Der resultierende verminderte Ca^{2+} -Einstrom würde eine Abnahme der Kontraktilität und damit eine Schonung der Energiereserven bedingen. Die Modulation von K_{ATP} -Kanälen durch LC-Acyl-CoA-Ester im Herzen während der Initialphase einer low-flow-Ischämie könnte also einen effektiven Energiesparmechanismus darstellen (Liu et al., 2001a).

Neben den regulatorischen Effekten auf K_{ATP} -Kanäle von Nukleosidtriphosphaten und Nukleosiddiphosphaten, der Phosphorylierung durch Proteinkinase A oder Proteinkinase C (PKA/PKC) und des Phospholipides PIP_2 , wurde jetzt mit Oleoyl-CoA als dem Vertreter der LC-Acyl-CoA-Ester eine neue Gruppe von Regulatoren entdeckt, welche die Kanalfunktion an den Stoffwechsel der Fettsäuren koppeln. Dabei gibt es durchaus Überschneidungen in den Wirkungen der einzelnen Modulatoren: So führen steigende ATP-Konzentrationen direkt zu einem Kanalblock oder indirekt über eine vermehrte Proteinphosphorylierung zu ganz anderen Effekten. Die zunehmende Bereitstellung von LC-Acyl-CoA-Estern kann einerseits direkt die Kanäle aktivieren, andererseits entsteht durch die nun gesteigerte β -Oxidation mehr inhibitorisches ATP (Nichols und Cukras, 2001). Schließlich vermag Oleoyl-CoA auch bestimmte Isoformen der Proteinkinase C (α PKC) zu

aktivieren, wodurch es in der pankreatischen β -Zelle zu einer Stimulation und/oder Potenzierung der glucoseinduzierten Insulinsekretion kommt (Yaney et al., 2000).

1.9 Fragestellung der Arbeit

Die Fragestellung der vorliegenden Arbeit ergibt sich aus den Beobachtungen von Krauter et al., 2001, Liu et al., 2001 und Bränström et Corkey, 1997 (s. 1.8).

Diese Arbeitsgruppen entdeckten, daß K_{ATP} -Kanäle durch die negativ geladenen Lipide PIP_2 , DOGS-NTA und Oleoyl-CoA aktiviert werden können und ihre Empfindlichkeit gegenüber inhibitorischem ATP abnimmt. Ferner konnten lipidmodifizierte Kanäle durch GBC nicht mehr geschlossen und durch P1075 nicht mehr geöffnet werden.

Die lipidinduzierte Abschwächung der ATP-Sensitivität der Kanäle konnte kürzlich durch die Wechselwirkung von Lipid und ATP an einer identischen Stelle der K_{IR} -Untereinheit nachgewiesen werden (Schulze et al., 2003a). Der Mechanismus der Lipidhemmung auf die Wirkung der Kanalmodulatoren GBC und P1075 ist hingegen noch unklar: Zum einen wäre eine funktionelle Entkopplung der beiden Kanaluntereinheiten durch die Lipide denkbar. Folglich könnte die lipidmodifizierte K_{IR} -Untereinheit unempfindlich gegenüber Konformationsänderungen des SUR, hervorgerufen durch die Bindung der Kanalmodulatoren, werden.

Auf der anderen Seite könnten die Lipide zusätzlich am SUR die Bindung der Modulatoren GBC und P1075 hemmen bzw. erschweren.

Erste vergleichende Bindungsstudien mit den Lipiden PIP_2 , DOGS-NTA und Oleoyl-CoA an den verschiedenen SUR-Subtypen zeigten eine direkte Hemmung der Ligandbindung durch die Lipide (Klein et al., 2005). PIP_2 erbrachte einen relativ schwachen inhibitorischen Effekt, DOGS-NTA wirkte deutlich stärker, konnte jedoch von Oleoyl-CoA in seiner Hemmwirkung noch übertroffen werden. Die hier durchgeführten Untersuchungen konzentrierten sich daher auf die Bindungseigenschaften des LC-Acyl-CoA-Ester Oleoyl-CoA, und es wurde versucht, die folgenden Aspekte der Lipidbindung an die unterschiedlichen SUR-Subtypen zu beleuchten:

(1) Einfluß von Oleoyl-CoA auf die Bindung des Blockers GBC an SUR1

1. Einleitung

- a. Welcher Mechanismus liegt der Inhibition durch Oleoyl-CoA zugrunde?
 - b. Wie wirkt sich die An- oder Abwesenheit von MgATP auf die GBC- und Oleoyl-CoA-Bindung aus?
 - c. Welchen Einfluß haben Polykationen auf die Bindung von GBC an SUR1 in der Anwesenheit von Oleoyl-CoA?
- (2) Einfluß von Oleoyl-CoA auf die Bindung des Öffners P1075 an SUR2A
- a. Welcher Mechanismus liegt der Inhibition durch Oleoyl-CoA zugrunde?
 - b. Wie wirkt sich die An- oder Abwesenheit von MgATP auf die P1075- und Oleoyl-CoA-Bindung aus?
 - c. Kann die Koexpression von SUR2A mit $K_{IR}6.2$ die Affinität für Oleoyl-CoA erhöhen?
- (3) Einfluß von Oleoyl-CoA auf die Bindung des Blockers GBC an SUR2A(Y1206S)
- a. Gibt es eine Stimulation der GBC-Bindung, die nur bei niedrigen Lipidkonzentrationen zu beobachten ist?

Zur Klärung dieser Fragen wurden Radioligandbindungsstudien mit ^3H -P1075 und ^3H -GBC bei 37°C in Membranen aus mit SUR-Subtypen permanent transfizierten HEK293-Zellen durchgeführt (s. Kapitel 2).

2 Material und Methoden

2.1 Übersicht

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse wurden anhand von Radioligandbindungsstudien gewonnen. Dabei bindet eine radioaktiv markierte Substanz als Ligand (sogenannter Radioligand, z.B. ^3H -GBC oder ^3H -P1075) an bestimmte Rezeptoren der Plasmamembran. Aufgrund der extrem geringen Anzahl von Membranrezeptoren im Vergleich zur Gesamtproteinfraktion muß die Bindung hochaffin und rezeptorspezifisch erfolgen. Zunächst werden unter standardisierten Bedingungen hinsichtlich Temperatur und pH-Wert und für eine gewisse Dauer Rezeptor und Radioligand miteinander inkubiert. Danach erfolgt durch Filtration die Trennung von membrangebundenem Radioliganden und freiem, noch im Inkubationsmedium vorhandenem Radioliganden. Zuletzt läßt sich die Radioaktivität des membrangebundenen Radioliganden in einem Szintillationszähler quantifizieren.

Die vorliegenden Daten wurden mithilfe von Gleichgewichtsexperimenten, einer Unterform der Bindungsstudien bestimmt. Bei diesem Experimenten-Typ handelt es sich um Bindungsuntersuchungen, welche gemäß dem Massenwirkungsgesetz das Erreichen der Gleichgewichtslage voraussetzen. Die Inkubationszeit wurde so festgelegt, daß nach deren Ablauf keine beobachtbare zeitliche Änderung der Bindung festgestellt werden konnte.

Gleichgewichtsbindungsstudien können im wesentlichen die Form eines Sättigungs- oder eines Konkurrenzexperimentes annehmen.

Eine Beschreibung zur Durchführung der zwei Typen von Bindungsexperimenten findet sich in Kapitel 2.6.

Die Analyse der Experimente erfolgte nach einem auf dem Massenwirkungsgesetz basierenden theoretischen Modell der Rezeptor-Ligand-Interaktion (vgl. 2.7).

Zur vollständigen und vergleichenden Auswertung war auch eine Bestimmung der in den Versuchsansätzen vorhandenen Rezeptorkonzentration erforderlich, wozu

die quantitative Proteinbestimmung nach Lowry (Lowry et al., 1951; Kapitel 2.5) diente.

Abschließend wurden die Daten auf ihre statistische Relevanz geprüft (s. 2.8).

Die Gewinnung von Rezeptormaterial erfolgte durch Kultivierung (s. 2.4.1) und anschließende Membranaufbereitung (s. 2.4.6) von mit SUR-Subtypen (hier: SUR1, SUR2A, SUR2A(Y1206)S und SUR2A/K_{IR}6.2) transfizierten humanen embryonalen Nierenzellen (**H**uman **E**mbrional **K**idney Cells, HEK293-Zellen). Dargestellt werden die für den Umgang mit Zellkulturen notwendigen Nährmedien und Pufferlösungen (s. 2.3).

Das folgende Kapitel 2.2 gibt einen Überblick über sämtliche in dieser Arbeit eingesetzten Chemikalien.

2.2 Chemikalien

Von den Substanzen wurden zu Beginn Stammlösungen hergestellt, die als Basis für die Herstellung der in den Experimenten benötigten Konzentrationsreihen dienten. Als Lösungsmittel kamen je nach Substanz ein Ethanol/DMSO-Gemisch im Verhältnis 1:1, reines DMSO oder Ethanol, sowie Inkubationspuffer zum Einsatz. Alle Stammlösungen wurden bei -20°C für höchstens 3 Monate aufbewahrt.

Substanzen	Einheiten	Hersteller
ATP-Na ₂	605.20 g/mol	Boehringer Mannheim
BSA (Bovines Serumalbumin)	~67000 g/mol	Fluka, Buchs, Schweiz
CuSO ₄	159.60 g/mol	Merck & Co. Inc., USA
DMSO	1 l	Merck & Co. Inc., USA
EDTA-Na ₂ (Ethylendiamintetraacetat)	372.24 g/mol	Fluka, Buchs, Schweiz
EGTA (Ethylenglycol-bis (2-Aminoethylether)-N,N,N',N',-tetraacetat)	380.40 g/mol	Sigma, München

2. Material und Methoden

Ethanol 99% p.a.	500 ml	Merck & Co. Inc., USA
FBS (fetales Kälberserum)	500 ml	GibcoBRL-Life Technologies, Gaithersburg, USA
Folin-Ciocalteau-Reagenz (2M)	100 ml	Fluka, Buchs, Schweiz
Geneticinsulfat	692.70 g/mol	GibcoBRL-Life Technologies, Gaithersburg, USA
Gentamycin	50 mg/ml	GibcoBRL-Life Technologies, Gaithersburg, USA
Glibenclamid	494.00 g/mol	Sigma, München
HCl	25%	Fluka, Buchs, Schweiz
HEPES-Puffer (N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N-(2-ethansulfonsäure)	238.30 g/mol	Sigma, München
³ H-Glibenclamid	47-52 Ci/mmol	Dupont/NEN, Boston, USA
³ H-P1075	117-121 Ci/mmol	Amersham Buchler, Braunschweig
K ⁺ /Na ⁺ -Tartrat	282.23 g/mol	Merck & Co. Inc., USA
KCl	74.56 g/mol	Merck & Co. Inc., USA
MEM (Minimum Essential Medium) + L-Glutamin + Earle`s Salze	500 ml	GibcoBRL-Life Technologies, Gaithersburg, USA
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	203.30 g/mol	Merck & Co. Inc., USA
Na ₂ CO ₃	105.99 g/mol	Merck & Co. Inc., USA
NaCl	58.44 g/mol	Merck & Co. Inc., USA
NaOH	40.00 g/mol	Merck & Co. Inc., USA

2. Material und Methoden

Oleoyl-Coenzym A	1162.20 g/mol	ICN
P1075	231.30 g/mol	Leo Pharmaceuticals, Ballerup, Dänemark
Poly-D-Lysin	30000-70000 g/mol	Sigma, München
TRIS (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	121.14 g/mol	Fluka, Buchs, Schweiz
Ultima Gold LLT	2.50 l	Packard Instruments, USA

2.3 Puffer und Medien

Die Aufbewahrung sämtlicher Puffer erfolgte bei 6°C im Kühlraum.

Hypotoner Puffer:

10 mM HEPES
1 mM EGTA

Dieser wurde zur Lyse von HEK293-Zellen und Herstellung einer Zellmembransuspension verwendet. Nach Lösen der Substanzen in aqua bidest und Abkühlung des Puffers auf 6°C wurde der pH-Wert auf 7.4 eingestellt.

Isotoner Inkubationspuffer:

5 mM HEPES
139 mM NaCl
5 mM KCl

Nach Solution der Substanzen in bidestilliertem Wasser (aqua bidest), wurden zwei verschiedene Pufferlösungen zubereitet. Die eine wurde auf Eis bei 0°C auf einen pH-Wert von 7.4 eingestellt und diente zur Suspendierung und dem anschließenden Einfrieren der zu Membranen verarbeiteten Zellen. Der andere, bei 37°C auf einen pH-Wert von 7.4 eingestellte Puffer, fand bei der Inkubation von

2. Material und Methoden

Rezeptor und Ligand, sowie bei der Herstellung von Stammlösungen und Verdünnungsreihen seine Verwendung.

Puffer zur Herstellung von Geneticin-Aliquots:

100 mM HEPES

Die Substanz wurde in aqua bidest gelöst und der pH-Wert der Lösung bei 37°C auf 7.3 eingestellt. Zum Erreichen der für die Arbeit mit Zellkulturen erforderlichen Sterilität wurden die Aliquots abschließend autoklaviert (60 min bei 121°C und 4 bar). Die Aufbewahrung erfolgte bei -20°C.

Waschpuffer: (zur Trennung von gebundener und nichtgebundener Radioaktivität während eines Bindungsversuches)

50 mM Tris-Puffer

154 mM NaCl

Eine zehnfach konzentrierte Stammlösung der Substanzen mit entmineralisiertem Wasser (aqua monodest) diente nach vorheriger 1:10-Verdünnung zur Herstellung des Waschpuffers. Der pH-Wert wurde nach Abkühlung der Lösung auf 6°C mit HCl auf 7.4 eingestellt.

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

Zusammensetzung:

Anorganische Salze (mg/ml):

CaCl₂, 264; KCl, 400; MgSO₄ x 7 H₂O, 200; NaCl, 6800; NaHCO₃, 2200; NaHPO₄ x 2 H₂O, 158

Aminosäuren (L-Formen; mg/ml):

Arginin, 126; Cystin, 24; Glutamin, 292; Histidin, 42; Isoleucin, 52; Lysin, 73; Methionin, 15; Phenylalanin, 32; Threonin, 48; Tryptophan, 10; Tyrosin, 36; Valin, 46

2. Material und Methoden

Vitamine (mg/ml):

D-Ca-Pantothenat, 1; Cholinchorid, 1; Folsäure, 1; i-Inositol, 2; Nikotinamid, 1; Pyridoxal-HCl, 1; Riboflavin, 0.1; Thiamin-HCl, 1

Andere Komponenten (mg/ml):

D-Glucose, 1000; Phenolrot, 10

Hitzeinaktiviertes fetales Rinderserum (FBS):

Serumzusatz zum Zellkulturmedium

Für die Kultivierung der HEK293-Zellen wird dem Kulturmedium hitzeinaktiviertes FBS zugesetzt, welches zum Wachstum der Zellen erforderliche mitogene Faktoren enthält. Die Hitzeinaktivierung dient der vollständigen Unterbindung noch vorhandener Restaktivitäten von Serumproteasen. Dazu wird die bis dahin bei -20°C aufbewahrte 500 ml-Flasche aufgetaut und im Wasserbad (55°C) für 90 Minuten erhitzt. Danach erfolgt die Aufbewahrung der Flasche im Kühlschrank bis zu ihrer jeweiligen Verwendung.

Gentamycin:

Ein ideales Antibiotikum für den Einsatz in der Zellkultur sollte ein breites Wirkungsspektrum gegen bakterielle und Mykoplasma-Aktivität und gleichzeitig keine Zelltoxizität aufweisen. Gentamycin erfüllt annähernd diese Bedingungen und ist aufgrund seiner biologischen und biochemischen Eigenschaften Penicillin und Streptomycin (PS) gegenüber in der Zellkultur zu bevorzugen.

Gentamycin wird der Gruppe der Aminoglykosid-Antibiotika zugerechnet und entfaltet seine bakterizide Wirkung durch Angriff an den Ribosomen mit konsekutiv fehlerhafter Proteinbiosynthese.

Abgesehen von seinem breiten Wirkungsspektrum im grampositiven und gramnegativen Bereich ist Gentamycin auch wirksam gegenüber Pseudomonaden und PS-resistenten Stämmen von Proteus und Staphylokokken.

Obgleich Gentamycin keine Wirkung auf Hefen, Schimmelpilze oder Protozoen besitzt, ist es einsetzbar gegen mehrere Mykoplasmen-Stämme. Das Aminoglykosid ist in einem pH-Bereich von 2-10 in Kulturmedien bei 37°C bis zu 15 Tagen

stabil. Desweiteren ist es äußerst thermostabil und kann deshalb sogar autoklaviert werden.

Die Konzentration der gelieferten Stammlösung betrug 50 mg/ml. Das Gentamycin wurde in 6 ml-Aliquots angesetzt ($c = 2 \text{ mg/ml}$, Verdünnung der Stammlösung auf die gewünschte Konzentration mit sterilem aqua bidest), bei -20°C aufbewahrt und vor der Herstellung des Zellkulturmediums im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Die Endkonzentration an Gentamycin im Kulturmedium betrug dann $20 \mu\text{g/ml}$.

Geneticin (G418 Sulfat):

Geneticin gehört wie Gentamycin zu den Aminoglykosid-Antibiotika und wirkt toxisch auf Bakterien, Hefen, Pflanzen, Protozoen, Helminthen (Würmer) und auch auf Säugerzellen. Bakterien besitzen zwei dominante Resistenzgene, welche für Aminoglykosid-Phosphotransferase 3'(I) und Aminoglykosid-Phosphotransferase 3'(II) kodieren und auch in eukaryontischen Zellen exprimiert werden können. Schon die Aufnahme und Expression eines der beiden Gene führt zu Ausbildung der Geneticin-Resistenz in den Zellen.

Zur Gewinnung der in den Versuchen eingesetzten Membranproteine unterschiedlichen SUR-Subtyps wurden die HEK-Zellen mittels eines Plasmides, welches sowohl die cDNA für die β -Untereinheit (SUR) des K_{ATP} -Kanals als auch ein Resistenzgen für Geneticin enthielt, transfiziert. Somit wurde bei allen Zellen, die erfolgreich einen bestimmten SUR-Subtyp exprimierten, gleichzeitig eine Geneticin-Resistenz induziert. Dies ermöglichte die Selektion von SUR-exprimierenden gegenüber nicht SUR-exprimierenden und damit Geneticin-empfindlichen Zellen.

Die notwendige Menge an Geneticin zur Selektion von resistenten Zellen variiert je nach Zellart und Phase des Zellzyklus. Im allgemeinen wird eine sich teilende, nicht resistente Zelle eher von Geneticin beeinträchtigt als eine nicht resistente ruhende Zelle. Bis der Zelltod eintritt, kann es jedoch 3-7 Tage dauern.

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

2. Material und Methoden

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

Medium zur Kultivierung von HEK293-Zellen:

Zellkultur Standard Medium (ZSM):

MEM 500 ml
FBS 56 ml
Gentamycin (2 mg/ml) 5.6 ml

Die einzelnen Komponenten wurden unter sterilen Bedingungen (Laminar Flow, Sterilarbeitsbank) zusammenpipettiert und anschließend bei 6°C im Kühlschrank aufbewahrt. Vor Zugabe des Mediums zu den Zellen wurde dieses im Wasserbad auf 37°C erhitzt.

Medium zum Einfrieren von Zellen:

Gefriermedium A

MEM 60% (v/v)
FBS 40% (v/v)

Gefriermedium B

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

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

Medium zum Auftauen von Zellen:

Hierzu wurde auf 37°C temperiertes ZSM verwendet.

Stammlösungen für die Proteinbestimmung nach Lowry:

Lowry A:

2% (w/v) Na₂CO₃ in 0.1 M NaOH

Lowry B:

1% (w/v) CuSO₄ 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 bereits fertig erworben (Fluka).

Lowry E:

Lowry A 98 Teile

Lowry C 1 Teil

Lowry B 1 Teil

Um ein Ausfallen der Substanzen zu verhindern, muß die Reihenfolge A-C-B des Zupipettierens beachtet werden.

Lowry F:

Diese Lösung besteht aus Lowry D (Folin-Ciocalteu-Reagenz) und aqua bidest im Verhältnis 1:1.

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

2.4 HEK293-Zellen

Die HEK293-Zelllinie (s. Abb. 12) stammt aus menschlichen embryonalen Nierenzellen, die durch das DNA-haltige Adenovirus Typ 5 tumorös transformiert und dadurch immortalisiert wurden. Sie wurde von der Firma DSMZ, Braunschweig, Deutschland (Kat.-Nr. DSMACC305) bezogen.

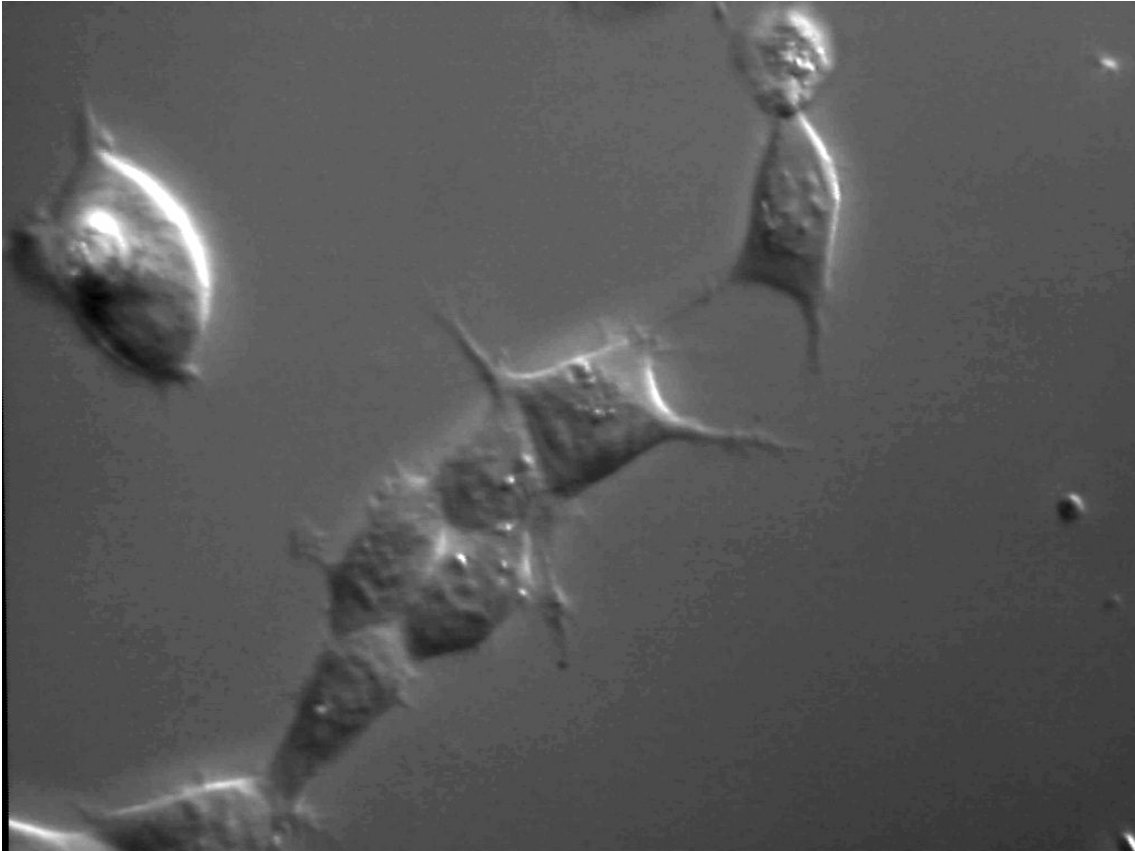


Abbildung 12:

HEK293-Zellen niedriger Konfluenz in der lichtmikroskopischen Ansicht: Man beachte die typischen Zellausläufer, welche als positives Vitalitätszeichen zu werten sind. Die Abbildung entstand in 40-facher Vergrößerung im Differenz-Interferenz-Kontrastmodus.

2.4.1 Kultivierung von HEK293-Zellen

Sämtliche Arbeiten mit lebenden Zellen wurden unter keimarmen Bedingungen an einer Sterilarbeitsbank mit laminarer Luftströmung (laminar flow, Hera Safe, Heraeus Instruments, Deutschland) durchgeführt. Die Kultivierung der HEK-Zellen erfolgte in sterilen Petrischalen (Greiner 94/16 (94 mm Durchmesser), Frickenhausen) mit 10 ml Zellkultur Standard Medium (MEM, FBS und Gentamycin) bei 37°C in der mikroaerophilen Atmosphäre (5% CO₂, 95% relative Luftfeuchtigkeit) des Zellkulturschranks (Heraeus Instruments, Deutschland).

Bei Erreichen einer Konfluenz der Zellen pro Schale von 60 - 80% nach 3 - 5 Tagen wurden diese im Verhältnis 1:3 bis 1:5 passagiert und damit weitervermehrt. Dabei wurde das hinsichtlich der Nährstoffe „verbrauchte“ Medium einer Schale abgesaugt, frisches, auf 37°C erwärmtes Medium (ZSM) zugegeben (in ml

entsprechend der geplanten Anzahl neuer Schalen) und die Zellen mit einer 1 ml-Pipette vom Boden der Kulturschale abgelöst. Nach Überführen von jeweils 1 ml abgelöster Zellen in die neuen Schalen wurde das Volumen pro Schale mit frischem und warmem Medium zu 10 ml aufgefüllt und bei permanent transfizierten Zellen jeweils 100 µl Geneticin zur Selektion SUR-exprimierender Zellen hinzugefügt.

2.4.2 Auftauen von HEK293-Zellen

Die in Kryoröhrchen konservierten und in flüssigem Stickstoff bei -196°C tiefgefrorenen Zellen wurden im Wasserbad (37°C) angetaut, bis nur noch ein dünner Eiskern im Röhrchen zu erkennen war. Das nun sichtbare Pellet wurde sofort unter der Sterilarbeitsbank in 20 ml Kulturmedium (37°C) überführt, um den Kontakt der Zellen mit dem 10% DMSO enthaltenden Gefriermedium so kurz wie möglich zu halten. Die Zellen wurden nun bei 500 x g für 2 -3 Minuten zentrifugiert (Biofuge primo, Heraeus Instruments über Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau). Nach vorsichtigem Absaugen des Überstandes erfolgte die Resuspendierung des Pellets in 4 ml Kulturmedium (37°C). Schließlich wurde in eine Petrischale 6 ml Kulturmedium vorgelegt und die Zellsuspension (4 ml) zugegeben. Nach 24 Stunden fand ein Wechsel des Kulturmediums statt, und nach einer Brutdauer von 3 -4 Tagen konnten die Zellen unter Zugabe von jeweils 100 µl Geneticin pro Schale erstmals passagiert werden.

2.4.3 Einfrieren von HEK293-Zellen (Kryokonservierung)

Zum Einfrieren wurden ausschließlich Kulturschalen mit einer Zelldichte von > 70% (7-10 Millionen Zellen pro Schale) verwendet, wobei pro Kryoröhrchen (Cryos, Greiner Labortechnik) das Zellmaterial einer Kulturschale eingefroren wurde.

Nach Entfernen des Mediums aus einer Kulturschale wurden die Zellen mit 4 ml Gefriermedium A von deren Boden abgelöst, in ein Falcon-Tube überführt und für die Dauer von 2 -3 Minuten bei 500 x g zentrifugiert. Unterdessen wurden 500 µl Gefriermedium B in ein Kryoröhrchen vorgelegt. Aus dem zentrifugierten Röhr-

chen wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet mit 500 µl Gefriermedium A resuspendiert, in das Kryoröhrchen überführt und vorsichtig mit dem vorgelegten Medium B vermischt. Um den Kontakt der Zellen mit dem bei Raumtemperatur zytotoxisch wirkenden Detergens DMSO so gering wie möglich zu halten, mußten die Zellen nach Zugabe der Zellsuspension zum Gefriermedium B sofort auf Eis herabgekühlt werden. Danach wurde das Kryoröhrchen zunächst bei -80°C vorgefroren. Die endgültige Aufbewahrung der Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff bei -196°C.

2.4.4 Transiente Transfektion von HEK293-Zellen

Zur transienten Transfektion wurden Schalen mit 70 - 80%iger Zellkonfluenz verwendet, und der pcDNA 3.1-Vektor (Invitrogen) hinzugefügt, welcher die kodierende Sequenz für murinen SUR2A (Genbank-Nummer D86037) enthielt. Zellen, die den vollständigen $K_{IR}6.2$ /SUR2A-Kanal exprimieren sollten, wurden zusätzlich mit $K_{IR}6.2$ (Genbanknummer BC057006) in pcDNA 3.1 kotransfiziert. Es wurde ein Transfektionsmedium, bestehend aus den DNA-Komponenten (K_{IR} und SUR-Verhältnis 1:1) und Lipofectamin (25 µl/DNA-Komponente) in 1.6 ml Optimem hergestellt, 20 Minuten vorinkubiert und mit weiteren 6.3 ml Optimem verdünnt.

Die zu transfizierenden Zellen einer Schale wurden mit 10 ml Optimem gewaschen und anschließend für die Dauer von 5 Stunden mit dem Transfektionsgemisch inkubiert. In dieser Zeitspanne erfolgte die Aufnahme der DNA-Liposomen-Komplexe in die Zellen.

Nach der Inkubation wurde das Transfektionsgemisch mit 10 ml Medium, bestehend aus 80% MEM und 20% FBS, versetzt. Ein Wechsel des Mediums gegen ZSM erfolgte nach 24 Stunden.

Die Präparation der Zellmembranen aus den transient transfizierten Zellen fand am 2. Tag nach Transfektionsbeginn statt.

2.4.5 Permanente Transfektion von HEK293-Zellen

Die permanent transfizierten Zelllinien (SUR2A (Genbank-Nummer D86037), SUR 2A(Y1206S) (D88159) oder SUR1 (X97279)) wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe um Frau Dr. Hambrock (Pharmakologisches Institut Tübingen) zur Verfügung gestellt. Diese wurden wie in Hambrock et al., 1998 beschrieben hergestellt.

2.4.6 Herstellung einer mikrosomalen Membranfraktion aus HEK293-Zellen

Zur Herstellung einer mikrosomalen Membranfraktion als Träger der zu untersuchenden SUR-Proteine wurden Kulturschalen mit einer Zellkonfluenz von mindestens 60% verwendet. Nach Absaugen eines Teils des Mediums diente dessen Rest zum Ablösen der Zellen. So wurden bis zu 12 Schalen in ein Falcon-Tube überführt, und dieses bei Raumtemperatur zentrifugiert (500 x g; 5 min.). Danach wurde der Überstand abgesaugt, das durch Zentrifugation entstandene Zellpellet (Bodensatz) mit hypotonem Puffer lysiert (4 ml hypotoner Puffer/Schale) und die Suspension bei 0°C und 100 000 x g 30 Minuten lang ultrazentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in isotonem Inkubationspuffer (pH 7.4 bei 0°C) resuspendiert (0.3 -1.0 ml/Schale), in 2 ml-Eppendorf-Cups aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

Zu Beginn eines Bindungsexperimentes wurde die Membranfraktion mit einem Polytron-Homogenisator (PT 3000, Kinematika AG, Schweiz) unter Eiskühlung mehrmals für 3 -4 Sekunden bei 12000 U/min homogenisiert, bis keine größeren Membranklumpen mehr vorhanden waren, und schließlich mit isotonem Inkubationspuffer (pH 7.4 bei 37°C) auf das für den jeweiligen Versuch benötigte Volumen gebracht.

2.5 Proteinbestimmung der Membranfraktion nach Lowry

Die Proteinbestimmung nach Lowry (Lowry et al., 1951) diente zur Quantifizierung des in den Reaktionsansätzen jedes Bindungsversuches enthaltenen Rezeptorproteins. Die Zugabe von geeigneten Reagentien (s. 2.2) zu einer verdünnten Membranfraktion führt zur Bildung eines Farbstoffes, der annähernd proportional zum Proteingehalt der Probe ist und photometrisch gemessen werden kann.

Zunächst mußte eine Standardmeßkurve mit Rinderserumalbumin (BSA) erstellt werden, wobei aus einer BSA-Stammlösung (1 mg/ml) unterschiedliche Verdünnungen in 0.1 M NaOH entstanden, und ihre jeweiligen Extinktionen gemessen wurden. Die Auftragung der BSA-Konzentrationsreihe gegen die Extinktion lieferte die Eichgerade (s. Abb. 13). Analog hierzu wurde noch für HEPES eine Eichkurve erstellt, da die freien Stickstoffgruppen dieser Puffersubstanz erheblich mit der Proteinbestimmung interferieren. HEPES ist im Inkubationspuffer der Bindungsversuche und somit in jeder Membransuspension mitenthalten.

Um den Proteingehalt der Membranfraktion eines Bindungsversuches zu bestimmen, mußte die Suspension verdünnt werden, um Störungen der Extinktionsmessung durch nicht gelöste Partikel zu vermindern und mit der Proteinkonzentration in den linearen Bereich der BSA-Eichkurve zu gelangen. Dazu wurden 35 bzw. 70 µl an Membransuspension und ebensoviel Inkubationspuffer in je ein Reaktionsgefäß überführt und mit 0.1 M NaOH entsprechend der verwendeten Proteinmenge verdünnt (1:10 bei einer Schale/Versuch, 1:20 bei zwei oder mehr Schalen/Versuch).

Der nächste Schritt der Proteinbestimmung bestand in der Zubereitung des Reaktionsansatzes. In Halbmikroküvetten wurden zu 200 µl der verdünnten Membransuspension bzw. zu 200 µl des verdünnten Inkubationspuffers jeweils 1 ml Lowry E-Lösung zugegeben. Der Leerwert mit 200 µl 0.1 M NaOH wurde ebenso behandelt. Nach 5 Minuten Inkubationsdauer erfolgte schließlich der Zusatz von 100 µl Lowry F (Folin-Ciocalteu-Reagenz und aqua bidest im Verhältnis 1:1), und nach sorgfältigem Mischen wurden die Ansätze bis zur Messung 20 Minuten lang unter Lichtabschluß inkubiert.

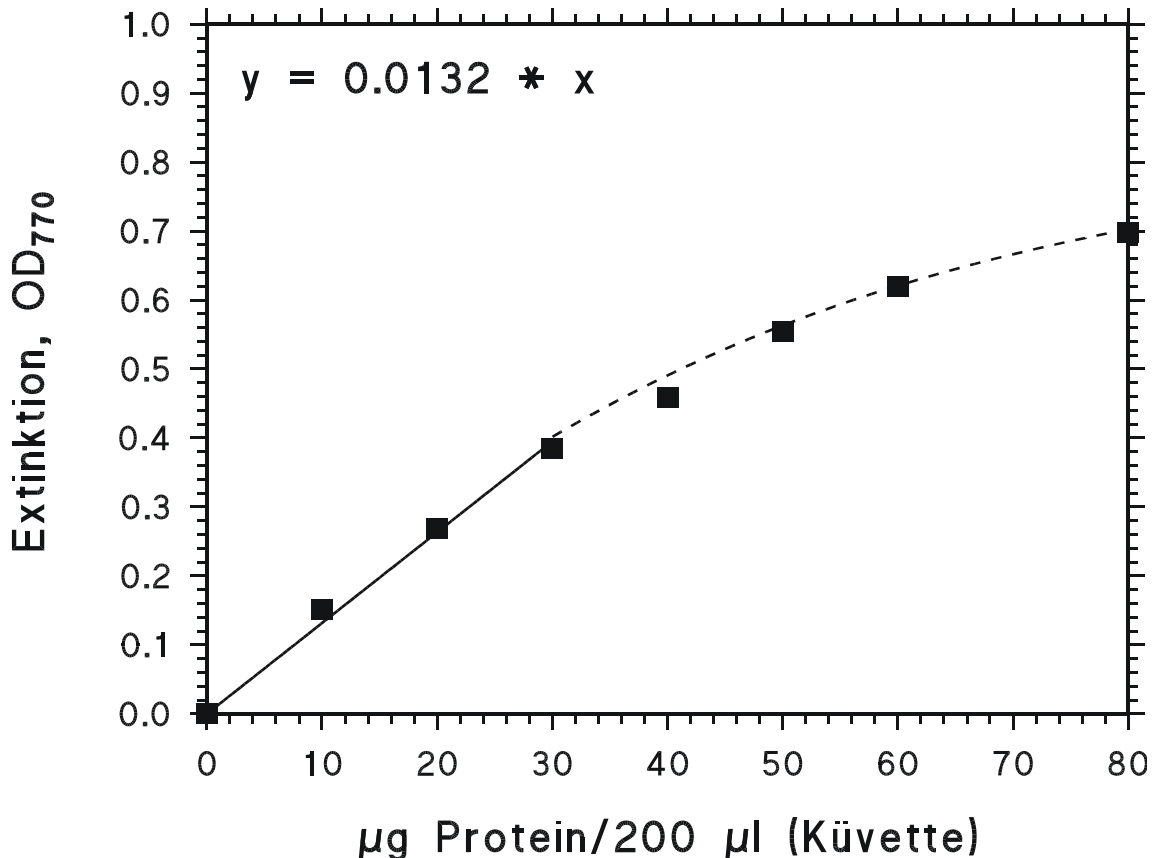


Abbildung 13:

Eichkurve 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 durch das Protein entstehende Farbstoff wird über zwei verschiedene Schritte gebildet. Zunächst erfolgt in 5 -10 Minuten nach Zugabe von Lowry E die Reaktion des Proteins mit Kupfer. Durch Zugabe von Lowry F wird das mit Kupfer vorbehandelte Protein durch das Folin-Ciocalteu-Reagenz reduziert.

Nach der Inkubation ließ sich die Extinktion des entstandenen Farbstoffes in einem Spektralphotometer (Hitachi U-3.000) bestimmen, wobei die Wellenlänge der Wolfram-Lampe 770 nm und die Spaltbreite 5 nm betrug. Es erfolgte die Messung der optischen Dichte (OD₇₇₀) der jeweiligen Membransuspension und des Inkubationspuffers gegen die des Leerwertes (NaOH + Lowry E + Lowry F). Bis zu einer Proteinkonzentration von etwa 30 µg/200 µl (in der Halbmikroküvette) lag die OD₇₇₀ unter 0.3 und zeigte - wie auch der anfängliche Kurvenverlauf bei

der Puffersubstanz HEPES - eine lineare Abhängigkeit (s. Abb. 13). Ebenfalls linear stellte sich somit die zur Berechnung der Proteinkonzentration gebildete Differenz zwischen der Extinktion des Proteins und der des Puffers dar.

Die Funktion der Eichgeraden bei Extinktionen unter 0.3 ergab sich wie folgt:

$$OD_{770} = 0.0132 \cdot m_{Prot} \quad \rightarrow \quad m_{Prot} = \frac{OD_{770}}{0.0132}$$

Gleichung (1a/1b)

m_{Prot} : Proteinmenge in $\mu\text{g}/\text{Küvette}$

OD_{770} : Differenz der Extinktionen zwischen Protein und Puffer

Bei einer zu hohen Proteinkonzentration, mit konsekutiver Verlagerung des Extinktionswertes über den linearen Bereich des Graphen hinaus, kam eine höhere Verdünnung zum Einsatz, was später bei der Berechnung der Proteinkonzentration berücksichtigt wurde.

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

Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien sind eine gängige Methode zur direkten Bestimmung der Rezeptorenzahl und der Affinität zwischen Rezeptor und Radioligand als auch der Affinität zu unmarkierten, kreuzreagierenden Liganden. Somit wird eine Isolierung und molekulare Charakterisierung von Rezeptoren und deren Wechselwirkung mit Liganden, Plasmamembran und Effektoren möglich. Der Nachteil der sehr geringen Anzahl von Rezeptormolekülen im Vergleich zur Gesamtproteinfraktion kann nur durch das Prinzip einer hochaffinen, biospezifischen Bindung des Radioliganden kompensiert werden.

Man unterscheidet grundsätzlich zwei Typen von Bindungsexperimenten:

1. Gleichgewichtsexperimente:

Gemäß dem Massenwirkungsgesetz (MWG) wird das Erreichen einer Gleichgewichtslage angenommen. Deshalb wird die Inkubationszeit so festgelegt, daß

nach deren Ablauf keine meßbare Änderung in der Rezeptor-Ligand-Assoziation bzw. -Dissoziation mehr erfolgt; es herrscht also ein Gleichgewicht. Die Geschwindigkeit der Einstellung einer Gleichgewichtslage ist nicht nur von der kinetischen Konstanten des Liganden, sondern auch maßgeblich von den kleinsten im Reaktionsansatz vorhandenen Konzentrationen an Rezeptor und Ligand abhängig. Gleichgewichtsbindungsstudien lassen sich weiterhin unterteilen in Sättigungs- und Konkurrenzexperimente.

a. Sättigungsexperiment:

Gewöhnlich handelt es sich um eine bimolekulare Reaktion mit Bindung eines Radioliganden an *eine* Klasse von Rezeptoren. Hierbei wird die Konzentration des Rezeptors konstant gehalten, während diejenige des Radioliganden in einem bestimmten Konzentrationsbereich variiert wird. Im günstigsten Fall soll etwa 70-80% des Bindungsbereiches abgedeckt werden. Parallel zum eigentlichen Bindungsexperiment (totale Bindung) wird eine zusätzliche Bindungskurve in Gegenwart eines genügend großen Überschusses an nicht markiertem Liganden erstellt. Dadurch kann die spezifische (B_s) von der nichtspezifischen Bindung (NSB) des Radiolabels unterschieden werden. Aus einem Sättigungsexperiment läßt sich neben der Affinität des Liganden zum Rezeptor in Form der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten (K_D) auch direkt die Gesamtkonzentration der Rezeptoren im Ansatz (Bindungskapazität B_{max}) erkennen.

b. Konkurrenzexperiment:

Diese Art von Experiment beruht auf einem „Wettstreit“ eines radioaktiv markierten und eines unmarkierten Liganden um ein und dieselbe Bindungsstelle am Rezeptor. Im allgemeinen wird hierzu die Konzentration an Radiolabel konstant gehalten und die Konzentration des unmarkierten Liganden schrittweise erhöht. Eine echte Konkurrenz ist allerdings nur dann gegeben, falls die beiden Liganden dem Inkubationsmedium gleichzeitig zugegeben werden. In erster Linie dient dieser Typ von Bindungsexperiment der Bestimmung der halbmaximalen Inhibitionskonzentration IC_{50} des Radioliganden. Sind die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D und die Konzentration des Radiolabels bekannt, so läßt sich aus der

IC_{50} nach mathematischer Umformulierung (Cheng, Prusoff, s. 2.7.2) die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D des unmarkierten Liganden berechnen.

2. Ligand-Rezeptor-Kinetik (kinetisches Bindungsexperiment):

Im Gegensatz zu Gleichgewichtsexperimenten werden mithilfe der Ligand-Rezeptor-Kinetik die zeitlichen Bindungsabläufe untersucht.

Für ein bimolekulares Bindungsmodell können aus einem kinetischen Bindungsexperiment die Geschwindigkeitskonstanten der Hin- und Rückreaktion der Ligand-Rezeptor-Interaktion ermittelt werden. Dabei ergibt sich aus dem Verhältnis der beiden Geschwindigkeitskonstanten die Assoziations- bzw. Dissoziationskonstante, welche mit denjenigen aus einem Gleichgewichts-Sättigungsexperiment übereinstimmen sollten.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse wurden ausschließlich anhand von Sättigungs- oder Kompetitionsexperimenten gewonnen.

Abschließend sollen noch zwei grundlegende Mechanismen der Rezeptor-Ligand-Interaktion dargestellt werden:

Bei einer echten Kompetition (s.o.) kommt es durch Erhöhung der Konzentration des kompetitiven, unmarkierten Liganden (kalter Ligand) zu einer vollständigen Verdrängung des Radioliganden (warmer Ligand, Label).

Hingegen ist die Wechselwirkung von K_{ATP} -Kanal-Öffnern oder Sulfonylharnstoffen auf die SUR-Typen negativ allosterischer Natur.

MgATP als Aktivator bindet an die NBF und erhöht die Bindung eines Öffners (z.B. 3H -P1075) (Hambrock et al., 1998), wohingegen es auf die 3H -GBC-Bindung einen hemmenden Einfluß ausübt (Hambrock et al., 2002a).

Ebenso stellte sich das für diese Arbeit untersuchte Lipid Oleoyl-CoA als ein potenter allosterischer Modulator der 3H -GBC und 3H -P1075-Bindung am SUR dar.

2.6.1 Auswahl des Radioliganden

Eine wichtige Voraussetzung für die erfolgreiche Durchführung eines Bindungsexperimentes ist die Auswahl eines für die Bindung an den zu untersuchenden Rezeptorsubtyp geeigneten Radioliganden.

Es muß festgehalten werden, daß durch die radioaktive Markierung eines Liganden dessen physikalisch-chemische Eigenschaften und biologische Wirkungen verändert werden können. Dies ist bei der Einführung des relativ großen Jod 125-Atoms, aber auch ganzer chemischer Gruppen der Fall. Im Gegensatz hierzu bewirkt eine Markierung mit Tritium (^3H -) kaum Veränderungen der Bindungseigenschaften des Liganden, allerdings besitzt es mit ~ 30 Ci/mmol eine geringere spezifische Aktivität als Jod 125 (~ 2200 Ci/mmol). Dies wird jedoch durch die längere Halbwertszeit von 12.26 Jahren (Jod 125: HWZ 59.39 Tage), und die somit geringere Abnahme der Aktivität im Versuchsintervall kompensiert.

Der radioaktive Ligand sollte sowohl chemisch als auch radiochemisch rein und stabil sein, sowie eine möglichst geringe unspezifische Bindung aufweisen. Die unspezifische Bindung eines Liganden an Nicht-Rezeptor-Material hängt hauptsächlich von seiner Lipophilie ab. Ein Maß für die unspezifische Bindung ist ihr Anteil im Vergleich zur totalen gebundenen Radioligandenkonzentration. Infolge eines ungünstigen „Signal/Rausch“-Verhältnisses kann eine im Vergleich zur spezifischen relativ hohe unspezifische Bindung wesentliche Informationen vernichten. Je höher die Affinität des Radioliganden zum Rezeptor, desto günstiger fällt das „Signal/Rausch“-Verhältnis bei gegebener Lipophilie aus.

Die wichtigste Anforderung an den Radioliganden stellt eine ausreichende Affinität zum Rezeptor dar, wobei die Gleichgewichtsdissoziationskonstante (K_D) für den radioaktiv-markierten Liganden im nano- oder subnanomolaren Bereich liegen sollte. So kann ein unmarkierter Ligand mit niedriger Affinität problemlos eingesetzt und seine K_i mittels eines Konkurrenzexperimentes bestimmt werden.

Weiterhin ist auf eine Reversibilität der Radioligandbindung zu achten. Extrem hochaffine Radioliganden tendieren dazu, sehr langsam vom Rezeptor zu dissoziieren und erscheinen damit möglicherweise während einer zu kurzen Inkubationsperiode als irreversible Liganden. Falls ein Gleichgewicht zugrunde gelegt werden soll, sind entsprechend lange Inkubationszeiten notwendig.

Für die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Bindungsstudien kamen zwei verschiedene, jeweils mit dem Radioisotop Tritium (^3H -) markierte Liganden (Radioliganden) zum Einsatz:

³H-GBC:

Glibenclamid ist ein K_{ATP} -Kanalhemmstoff aus der Gruppe der Sulfonylharnstoffe (s. 1.7.1). Es bindet mit einer deutlich höheren Affinität an SUR1 ($K_D \sim 1$ nM) als an SUR2 ($K_D \sim 30$ nM) (Hambrock et al., 1998; Hambrock et al., 2002b; Schwanstecher et al., 1998). Die spezifische Aktivität der verschiedenen ³H-GBC-Chargen betrug 47-52 Ci/mmol, die Konzentration etwa 20 μ M.

Da Glibenclamid ausgeprägte hydrophobe Wechselwirkungen mit der Wand des aus Polypropylen bestehenden Reaktionsgefäßes eingeht und somit daran haften bleibt, muß die Radioligandstammlösung immer 10% Ethanol enthalten. Hiervon werden in jeden Reaktionsansatz (1000 μ l) 25 μ l pipettiert, woraus eine Ethanolkonzentration von 0.25% pro Ansatz resultiert. Nur so sind gleichbleibende Konzentrationen des Radioliganden gewährleistet. Bei höheren Ethanolkonzentrationen kann eine Denaturierung der empfindlichen Rezeptorproteine nicht mehr ausgeschlossen werden.

Eine weitere Schwierigkeit bei der Durchführung der Radioligandbindungsstudien mit ³H-GBC besteht in der Anwesenheit vieler niedrigaffiner endogener Non-SUR-Bindungsstellen im Proteinmaterial. Deren Quantifizierung (zusammen mit dem an die Filter gebundenen Radioliganden = NSB) erfolgte am SUR1 mittels Konkurrenz durch 100 nM GBC.

Bedingt durch die niedrige ³H-GBC-Affinität, ist das Signal-Rausch-Verhältnis an den SUR2-Subtypen ungünstiger als an SUR1. Hier wurde die nichtspezifische Bindung (NSB; Hambrock et al., 2001) mit 100 μ M P1075 bestimmt, da der Öffner P1075 die spezifische Bindung von GBC an SUR2 (vollständig) verdrängen kann (Hambrock et al., 2001, Stephan et al., 2005).

³H-P1075:

Dieser Öffner der K_{ATP} -Kanäle bindet mit guter Affinität an SUR2-Subtypen ($K_D \sim 3$ -15 nM) (Stephan et al., 2005), jedoch kaum an SUR1 ($K_D > 100$ μ M).

Das verwendete ³H-P1075 zeigte eine spezifische Aktivität von 117-121 Ci/mmol und eine Konzentration von etwa 0.5 μ M.

Die nichtspezifische Bindung NSB, bei dieser Substanz außergewöhnlich gering, wurde in Anwesenheit von 10 μ M unmarkiertem P1075 bestimmt.

2.6.2 Gewinnung von Rezeptormaterial

Die Herstellung der Membranfraktion mit dem Rezeptormaterial erfolgte wie in Kapitel 2.4.5 erläutert. Die Membranen wurden im Gefrierschrank bei -80°C in magnesiumfreiem Inkubationspuffer (pH 7.4 bei 4°C) eingefroren und damit haltbar gemacht. Während der Homogenisierung und bis zum Start der Inkubation sollte das Membranprotein zum Schutz vor Denaturierung auf Eis (0°C) gehalten werden.

2.6.3 Zubereitung des Lipides Oleoyl-CoA und Behandlung der Membranfraktion mit Oleoyl-CoA

Zur Herstellung von Stammlösungen mit der Konzentration von 1 mM an Oleoyl-CoA wurde das Lipid in eiskaltem isotonen, 0.1 mM EDTA enthaltenden Inkubationspuffer (pH 7.4 bei 37°C) gelöst, sofort in eiskaltem Wasser für die Dauer von 30 Minuten soniziert (ultraschallbehandelt; Sonorex RK52, Bandelin, Berlin) und anschließend bis zum Gebrauch in 300 μl -Aliquots bei -20°C aufbewahrt.

Für die Bindungsexperimente wurde direkt aus den 1 mM-Lipidstammlösungen bzw. den Verdünnungen in die Reaktionsansätze pipettiert und jeweils 200 μl Membranprotein in die vorgelegte Lipid-Puffer-Lösung (750 μl) gegeben.

Anschließend wurden alle (mit und ohne Oleoyl-CoA) Versuchsansätze 2 Minuten lang bei 0°C soniziert, um die Inkorporation des Lipides in die Membranen zu erleichtern. Bei Versuchen in der Anwesenheit von MgATP wurde dieses immer erst *nach* Sonizierung der Membranen dem Ansatz beigefügt, da Mg^{2+} -Ionen die Zellmembran stabilisieren und somit die Integration des Lipides stören können.

Kontrollmessungen zeigten, daß die 2-minütige Ultraschallbehandlung keinen Einfluß auf die ^3H -P1075 oder ^3H -GBC-Bindung an die SUR hatte.

2.6.4 Inkubation

Gestartet wurde die Rezeptor-Ligand-Bindungsreaktion durch Zugabe von 25 μ l des Radioliganden (^3H -P1075 oder ^3H -GBC) zu dem vorbereiteten und auf Eis stehenden Reaktionsgemisch. Dieses setzte sich folgendermaßen zusammen:

750 μ l	(Oleoyl-CoA+isotoner Inkubationspuffer mit EDTA; Endkonzentration von EDTA im 1 ml-Ansatz: 30 μ M)
200 μ l	Rezeptorprotein
25 μ l	MgATP (Endkonzentrationen: Mg^{2+} : 1 mM; ATP: 0.3 mM); bei Versuchen in der Abwesenheit von MgATP 25 μ l isotoner Inkubationspuffer als Volumenersatz
25 μ l	Radioligand (Endkonzentrationen: ^3H -P1075 \sim 3 nM; ^3H -GBC \sim 2 nM)

Die Inkubation erfolgte unter standardisierten Bedingungen hinsichtlich Temperatur, Zeit und Zusammensetzung des Inkubationsmediums.

Inkubationstemperatur:

Die Temperatur des Wasserbades wurde mit 37°C an die physiologische Körpertemperatur des menschlichen Organismus angepaßt.

Inkubationszeit:

Bei Gleichgewichtsexperimenten wird entsprechend dem Massenwirkungsgesetz (MWG) eine Gleichgewichtslage erreicht, deren Einstellung sowohl von der kinetischen Konstanten als auch von der Konzentration der Reaktionsteilnehmer abhängig ist. Für die Festlegung der Inkubationszeit sind somit die kleinsten im Versuch vorkommenden Konzentrationen von Rezeptor und Ligand maßgeblich. Inkubationszeiten werden anhand von Assoziationsexperimenten (s. kinetisches Bindungsexperiment, 2.6) bestimmt, wobei die Zeit so gewählt wird, daß der Radioligand-Rezeptorkomplex die Gleichgewichtslage erreichen kann.

Die Inkubationszeiten der in dieser Arbeit durchgeführten Gleichgewichtsexperimente betragen an SUR2-Subtypen 13 min und an SUR1 25 min.

Inkubationsmedium:

Als Inkubationsmedium diente der in seiner Zusammensetzung in Kapitel 2.3 dargestellte isotone Inkubationspuffer (Bindungspuffer), der auf den physiologischen pH-Wert von 7.4 bei einer Temperatur von 37°C eingestellt war.

2.6.5 Filtration zur Trennung von gebundenem und freiem Radioliganden

Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte die Abtrennung des Radioligand-Rezeptor-Komplexes von dem noch im Inkubationsmedium enthaltenen ungebundenen (freien) Radioliganden. Dies geschah durch Filtration.

Aus den einzelnen Reaktionsansätzen ($V=1000\ \mu\text{l}$) wurde nach gründlicher Durchmischung auf dem Vortex dreimal ein Aliquot zu $300\ \mu\text{l}$ entnommen und in ein vorbereitetes, mit eiskaltem Waschpuffer gefülltes Reagenzglas überführt. Hierdurch wurde die sich während der Inkubation ausgebildete Gleichgewichtslage fixiert. Sofort danach erfolgte die Filtration in einer geeigneten Apparatur über Glasfaserfilter (Whatman GF/B) mithilfe des von einer Membranpumpe (KNF Neuberger Typ N 026.3 AN.18) erzeugten Vakuums. Die Poren des Glasfaserfilters sind in ihrer Größe so gewählt, daß der für die spätere Messung wichtige Radioligand-Rezeptor-Komplex im Filter zurückbleibt. Um die unspezifisch im Präparat gebundene Radioaktivität möglichst vollständig zu entfernen, wurden die Filter zweimal mit 8 ml Waschpuffer schnell durchgespült.

2.6.6 Messung der Radioaktivität

Da mit dem Radioisotop Tritium (^3H -) markierte Liganden Betastrahlen emittieren, erfolgte die Messung der Radioaktivität in einem Szintillationszähler (TRICARB® Liquid Scintillation Analyser 2000CA, Packard).

Hierzu wurden die einzelnen Filter in spezielle Meßröhrchen (Super Polyethylene Vial 20 ml; Perkin Elmer) überführt, mit jeweils $200\ \mu\text{l}$ aqua dest. benetzt und anschließend mit Szintillationsflüssigkeit (Ultima Gold, 4.5 ml/Vial) übergossen. Während der ersten Stunden löst sich die Radioaktivität aus dem Filter heraus. Für zuverlässige Auswertungen sollten deshalb nur Messungen verwendet wer-

2. Material und Methoden

den, die mindestens 12 Stunden nach Beendigung eines Versuches stattgefunden haben. Jeder Meßpunkt eines Versuches wurde dreifach bestimmt und daraus das arithmetische Mittel gebildet.

Die Zählbeute des Szintillationszählers lag bei 0.54, es wurden also nur 54% der Zerfälle pro Minute detektiert.

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

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

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

c= Konzentration in mol/l

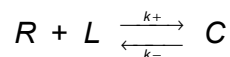
SA= spezifische Aktivität des Radioliganden in Ci/mmol

V= Filtrationsvolumen pro Ansatz in ml

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

2.7 Modell der Rezeptorbindungsstudien

Es wird die Bindung eines Radiolabels L an eine Klasse von nicht miteinander wechselwirkenden Bindungsstellen angenommen.



Gleichung (2)

wobei R die freie Rezeptorkonzentration, L die freie Ligandkonzentration, C der Rezeptor-Ligand-Komplex, k_+ die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante ($M^{-1}s^{-1}$) und k_- die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante (s^{-1}) darstellen.

Im Gleichgewicht gilt das Massenwirkungsgesetz:

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

Gleichung (3)

Dabei ist K_D die Gleichgewichtsdissoziationskonstante (mol/l).

Weiterhin gelten die Massenbilanzen

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

Gleichung (4a/4b)

Der Index $_0$ bezeichnet die totale Konzentration, die sich als Summe aus der freien und gebundenen Konzentration ergibt (total=frei+gebunden).

Die Experimente werden nach Möglichkeit so angelegt, daß gilt:

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

Gleichung (4c)

Somit ist die totale Ligandkonzentration sehr viel höher als die totale Rezeptorkonzentration, wobei der gebundene Anteil des Radioliganden stets unter 5% liegen sollte.

Die spezifische Bindung des Radioliganden an die Rezeptoren (B_S) wird im Experiment regelmäßig von einer nichtspezifischen Bindung (NSB), welche durch das unspezifische Kleben des Liganden am Membranprotein und am Filter verursacht wird, überlagert. Daher ist es notwendig, NSB gesondert zu bestimmen, indem die spezifische Bindung durch einen Überschuß an unmarkiertem (kaltem) Liganden blockiert wird.

Experimentell bestimmt werden die totale, B_{TOT} , und die nichtspezifische Bindung; NSB (B_{NS}). Aus diesen Werten läßt sich dann die spezifische Bindung, B_S , berechnen:

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

Gleichung (5)

2.7.1 Sättigungsexperiment

2. Material und Methoden

Gemessen werden B_{TOT} und NSB als Funktion der freien Ligandkonzentration L . Da NSB eine schwache Bindung des Liganden an sehr viele Bindungsplätze darstellt, bei der keine Sättigung erreicht wird, gilt folgender linearer Ansatz:

$$NSB = a \cdot L$$

Gleichung (6)

Die spezifische Bindung, B_S , wird aus Gleichung (2) und Gleichung (4a) bzw. (4b) errechnet ($B_S \equiv C$):

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

Gleichung (7)

Unter der Bedingung von (4c) läßt sich diese Gleichung umformen in:

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

Gleichung (8)

Hieraus ist ersichtlich, daß die spezifische Bindung, $B_S \equiv C$, mit der freien Ligandenkonzentration in Form einer rechtwinkligen Hyperbel steigt, ihre Sättigung für $C \rightarrow R_0$ erreicht und Halbsättigung bei $L=K$ vorliegt.

Im Experiment direkt meßbar sind B_{TOT} , NSB und L_0 , wobei gilt:

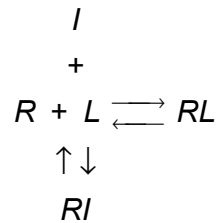
$L = L_0 - B_{TOT} - NSB$. Die Bindungsisotherme ist dann die Summe der spezifischen und unspezifischen Interaktion des Liganden.

$$B_{TOT} = R_0 \cdot \frac{L}{L + K} + a \cdot L$$

Gleichung (9)

2.7.2 Wettbewerbsexperiment

Von folgender Reaktion wird ausgegangen:



Gleichung (10)

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

In der Präparation wird nur eine Klasse von Bindungsstellen (Rezeptoren) angenommen, wobei L und I in Konkurrenz um die Bindung an R stehen. Bei steigenden Konzentrationen von I wird die Abnahme von RL gemessen. Bei Reaktionsstart eines jeden Ansatzes ($t=0$) muß L und I gleichzeitig der Rezeptorpräparation zugegeben werden, und man wartet die Gleichgewichtseinstellung während der Inkubation bei 37°C (s. 2.6) ab.

Die zu beobachtende Größe ist RL , die als Funktion des hinzugegebenen Inhibitors mittels einer Hemmkurve dargestellt werden kann. Aus den Massenwirkungsgesetzen für die beiden oben gezeigten konkurrierenden Reaktionen

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

Gleichung (11a/11b)

erhält man durch Umformung unter der Bedingung $R_0 \ll L_0, I_0$:

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

Gleichung (12)

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

Die Beziehung zwischen IC_{50} und K_I beschreibt die Cheng-Prusoff-Gleichung (Cheng und Prusoff, 1973) und erlaubt die Berechnung von K_I bei gegebenem K_L :

2. Material und Methoden

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

Gleichung (13)

Eine andere Möglichkeit zur Bestimmung der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_I und K_L , ebenfalls unter Zuhilfenahme der Cheng-Prusoff-Gleichung, besteht in der Auftragung der verschiedenen IC_{50} -Werte der einzelnen Experimente gegen die zugegebene Ligandenkonzentration L_0 .

Durch einfache Umformung der Cheng-Prusoff-Gleichung erhält man eine Geradengleichung mit Ordinatenabschnitt K_I und Steigung K_I / K_L :

$$IC_{50} = \frac{K_I}{K_L} \cdot L_0 + K_I$$

Gleichung (14)

Im Falle der homologen Konkurrenz (Verdrängung eines Radioliganden durch sein unmarkiertes nichtradioaktives Analogon) gilt:

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

Gleichung (15)

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

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

Gleichung (16a/16b)

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

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

Gleichung (17)

Hieraus läßt sich die maximale Bindungskapazität, d.h. die Gesamtrezeptorenzahl, $B_{MAX} \equiv R_0$, berechnen als

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

Gleichung (18)

2.7.3 Verallgemeinerung der Bindungsisotherme nach Hill

Gelegentlich stellt sich die Bindungsisotherme entgegen der Gleichung 9, bzw. 16a/b steiler oder flacher dar. Dies trifft vor allem dann zu, wenn der unmarkierte Ligand und der Radioligand ein nicht-kompetitives oder komplizierteres Bindungsverhalten aufweisen. In diesem Fall werden die beiden Gleichungen durch Einführung eines Exponenten n ($=n_H$, Hill-Koeffizient) verallgemeinert. Für die Inhibitionskurve gilt dann:

$$B_S = \frac{B_S(0)}{1 + 10^{n(p/C_{50} - pI)}}$$

Gleichung (19)

Die Sättigungsisotherme ergibt sich zu:

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

Gleichung (20a/20b)

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

Anhand des Zahlenwertes für den Hill-Koeffizienten n_H lassen sich über die Bindungsstellen und ihre Interaktion mit Liganden folgende Aussagen treffen:

- $n_H = 1$: übliche Bindungsisotherme;
Vorhandensein nur einer Klasse von nicht miteinander wechselwirkenden Bindungsstellen
- $n_H > 1$: positive Kooperativität;
mehrere Ligandmoleküle binden mit steigender Affinität an den Rezeptor und können durch allosterische Modulation der Bindungsstelle zur erhöhten oder verminderten Ligandbindung führen
- $n_H < 1$: negative Kooperativität;
die Bindung des ersten Liganden erschwert die Bindung weiterer Ligandmoleküle. Dies kommt in der Natur sehr selten vor. Meist sind in der Membranpräparation mehrere Klassen von Bindungsstellen enthalten, die sich in ihrer Affinität für einen Liganden kaum unterscheiden (weniger als 10-30-fach). Somit sind die einzelnen Kompo-

nennten nicht mehr deutlich voneinander getrennt, und es ergibt sich eine homogen flach abfallende Bindungskurve.

2.8 Datenauswertung und Statistik

2.8.1 Analyse der Bindungskurven

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

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

Gleichung (21)

Dabei gilt:

- y = %B_s (% der spezifischen Bindung)
- A = Amplitude (maximaler Effekt der Sättigung);
A=100 → vollständige Hemmung
- pl = -log I, wobei I die Konzentration des homologen bzw. heterologen Inhibitors bezeichnet
- pIC_{50} = -logIC₅₀; IC₅₀ ist die halbmaximale Inhibitionskonzentration und markiert den Mittel- bzw. Wendepunkt der Hemmkurve
- n = n_H = Hill-Koeffizient

Für den Fall, daß A ~100% und n_H ~1 betrug, wurden diese beiden Werte als Konstanten in die Anpassung eingegeben, um die Fehler der verbleibenden Parameter zu reduzieren.

Die Anpassung erfolgte nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate mit Hilfe des Programmes Sigma Plot 6.1/ Sigma Plot 2000 (SPSS Science, Chicago, USA).

2.8.2 Statistik

Die Amplituden der Bindungskurven und deren pIC₅₀-Werte folgen einer Normalverteilung (Christopoulos, 1998). Zur Auswertung einer Versuchsreihe wurden deshalb die arithmetischen Mittel dieser Parameter ± SEM (Standardabweichung

2. Material und Methoden

des Mittelwertes, standard error of the mean) gebildet. Die Konfidenzintervalle der IC_{50} -Werte ließen sich bestimmen als

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

Gleichung (22)

Die so gewonnenen Werte sind in den Ergebnistabellen dargestellt.

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

Die Abbildungen zeigen jeweils die Mittelwertskurven (gemittelte Daten der Einzelexperimente \pm SEM). An diese Mittelwertskurven wurden die entsprechenden Modellgleichungen angepasst. Im allgemeinen stimmen die so erhaltenen Parameter gut mit den aus der Analyse der Einzelkurven gemittelten Parametern überein, fanden aber keine weitere Verwendung.

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

Summen- und Differenzbildung:

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

Gleichung (23)

Produkt und Quotient:

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

Gleichung (24)

3 Ergebnisse

3.1 Effekt von Oleoyl-CoA auf die ^3H -GBC-Bindung an SUR1 in Membranen in Abwesenheit von MgATP

3.1.1 Homologe Verdrängung der Bindung von ^3H -GBC an SUR1

In den folgenden drei Versuchsreihen wurde die Hemmung der ^3H -GBC-Bindung an SUR1 durch den langkettigen Acyl-Coenzym A-Ester, Oleoyl-CoA, untersucht. Besonderes Interesse galt dem Effekt des Lipides auf die homologe Verdrängung der Liganden GBC und ^3H -GBC an SUR1 in Membranen.

Als Vorbereitung für die Experimente mit Oleoyl-CoA wurde zunächst durch homologe Konkurrenz die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D des Radioliganden ^3H -GBC bestimmt. Sämtliche Messungen wurden in Abwesenheit von MgATP durchgeführt, welches die Bindung von GBC durch Interaktion mit den NBF allosterisch hemmt (Löffler-Walz et al., 2002).

Aus $n=3$ Einzelversuchen ergab die homologe Konkurrenz der ^3H -GBC -Bindung mit nicht-markiertem GBC eine Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D von 0.4 [0.3; 0.5] nM, entsprechend einem $\text{p}K_D$ -Wert von 9.41 ± 0.05 . Der Hill-Koeffizient mit einem Wert von $n_H=1.2 \pm 0.1$ läßt einen monophasischen Kurvenverlauf erkennen. Die nichtspezifische Bindung wurde mit 100 nM GBC bestimmt, wodurch eine vollständige Absättigung der Bindungsstellen möglich und die spezifische Bindung gänzlich verdrängbar war (s. Abb. 14 und Tab. 3).

Radioligand	Rezeptor	K_D $\text{p}K_D$ (-log M)	A (% B_s)	n_H	B_{\max} (fmol/mg)
^3H -GBC	SUR1	0.37[0.30;0.47]nM 9.41±0.05	100	1.2±0.1	1225±255

Tabelle 3:

Homologe Verdrängung der Bindung von ^3H -GBC an SUR1, ohne MgATP

(Gemittelte Parameter aus $n=3$ Einzelversuchen; B_{\max} wurde aus B_s nach der Formel $B_{\max} = B_s (1+K_D/L)$ berechnet.)

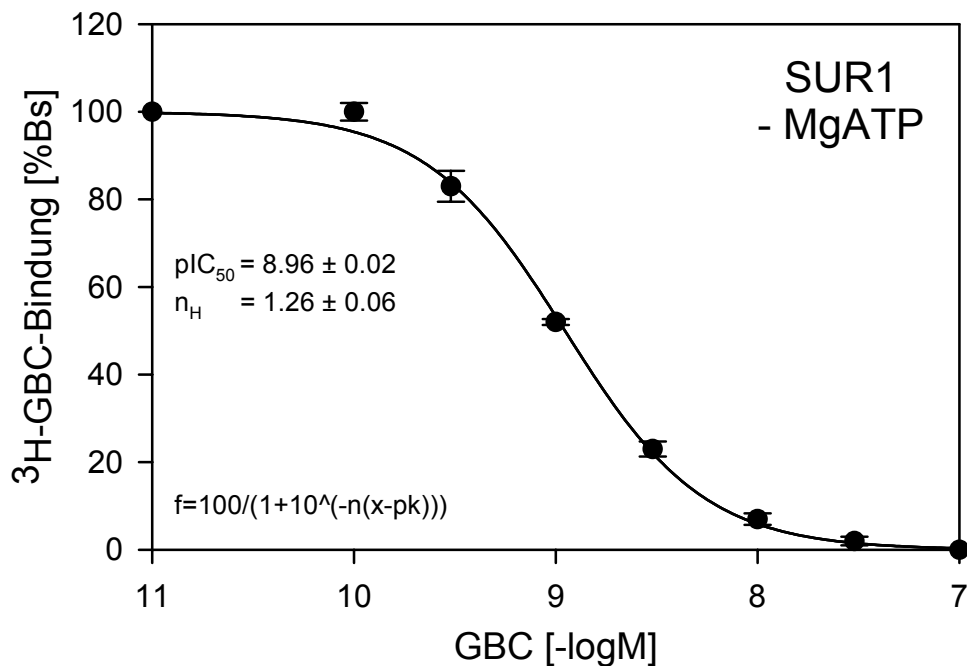


Abbildung 14:

Homologe Verdrängung der Bindung von ³H-GBC an SUR1, ohne MgATP

Mittelwerte ± SEM aus n=3 Einzelexperimenten.

[³H-GBC]=0.60±0.03 nM, B_S=748±126 fmol/mg (=100%), B_{TOT}=810±131 fmol/mg,

NSB=8±1% B_{TOT}, pIC₅₀=8.96±0.02, n=1.26±0.06

Proteinkonzentration (PK)=0.041±0.006 mg/ml; Inkubationszeit 25 min

3.1.2 Hemmung der ³H-GBC-Bindung an SUR1 durch Oleoyl-CoA

In Abwesenheit von MgATP wurde nun die Wirkung von Oleoyl-CoA auf die Bindungseigenschaften des SUR1 für GBC untersucht. Dabei erstreckte sich der Konzentrationsbereich der Lipides in 10er- und 3er-Schritten von 1 µM bis 100 µM, wobei die spezifische ³H-GBC-Bindung vollständig durch Oleoyl-CoA verdrängt werden konnte.

Oleoyl-CoA zeigte keinen Einfluß auf die nichtspezifische Bindung, diese betrug 13±4% der Gesamtbindung B_{tot}.

Die Verdrängungskurve für GBC durch Oleoyl-CoA erbrachte bei einer Radioligandkonzentration von L₀=1.10±0.02 nM einen pIC₅₀-Wert von 5.22±0.11 und

3. Ergebnisse

somit einen Wert für die IC_{50} von $6.1 [3.6;10.0] \mu M$, sowie einen Hill-Koeffizienten von 1.1 ± 0.2 (s. Abb. 15 und Tab. 4).

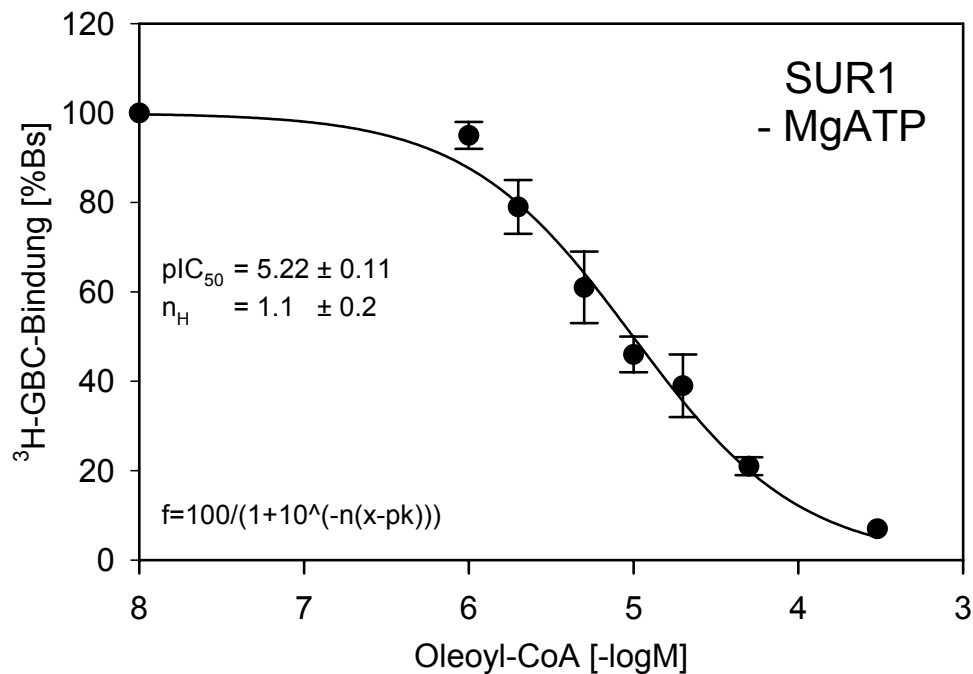


Abbildung 15:

Effekt von Oleoyl-CoA auf die 3H -GBC-Bindung an SUR1, ohne MgATP

Mittelwerte \pm SEM aus $n=4$ Einzelexperimenten.

$[^3H\text{-GBC}] = 1.10 \pm 0.02$ nM, $B_s = 1520 \pm 226$ fmol/mg (=100%),

$B_{TOT} = 1746 \pm 260$ fmol/mg, NSB = $13 \pm 4\%$ B_{TOT} , $pIC_{50} = 5.22 \pm 0.11$, $n = 1.1 \pm 0.2$

Proteinkonzentration (PK) = 0.020 ± 0.005 mg/ml; Inkubationszeit 25 min

Radioligand	Rezeptor	IC_{50}	A (% B_s)	n_H	B_{max} (fmol/mg)
		pIC_{50} (-log M)			
3H -GBC	SUR1	$6.1 [3.6;10.0] \mu M$	100	1.1 ± 0.2	2073 ± 301
		5.22 ± 0.11			

Tabelle 4:

Verdrängung der 3H -GBC-Bindung durch Oleoyl-CoA an SUR1, ohne MgATP

(Gemittelte Parameter aus $n=4$ Einzelversuchen)

3.1.3 Effekt von 15 μM Oleoyl-CoA auf die homologe Verdrängung der ^3H -GBC-Bindung an SUR1

Nachdem die halbmaximale Inhibitionskonzentration von $\sim 6 \mu\text{M}$ Oleoyl-CoA für die GBC-Bindung an SUR1 bestimmt wurde, folgte in der abschließenden Versuchsreihe die Charakterisierung des modulierenden Effektes von Oleoyl-CoA auf die homologe Konkurrenz zwischen markiertem und unmarkiertem GBC.

Wir benutzten eine doppelt so hohe Konzentration an Oleoyl-CoA als dies die halbmaximale Inhibitionskonzentration IC_{50} der Hemmkurve (3.1.2) vorgab, um eine ausreichende Hemmung zu erzielen und dadurch die Modulation besser untersuchen zu können.

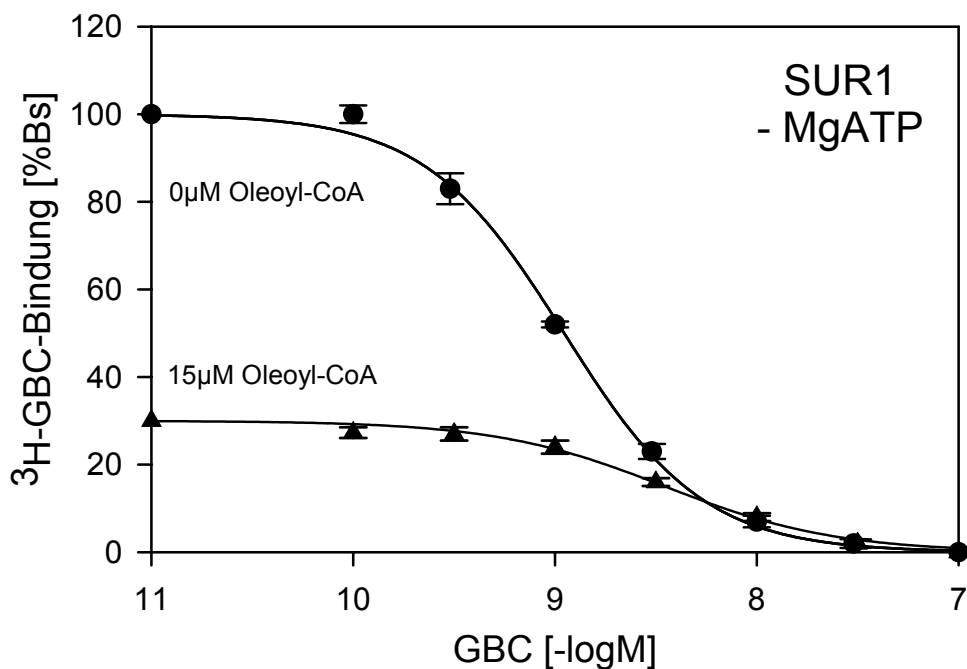


Abbildung 16:
Vergleich der homologen Konkurrenz von ^3H -GBC mit GBC, ohne bzw. mit 15 μM Oleoyl-CoA, in Abwesenheit von MgATP

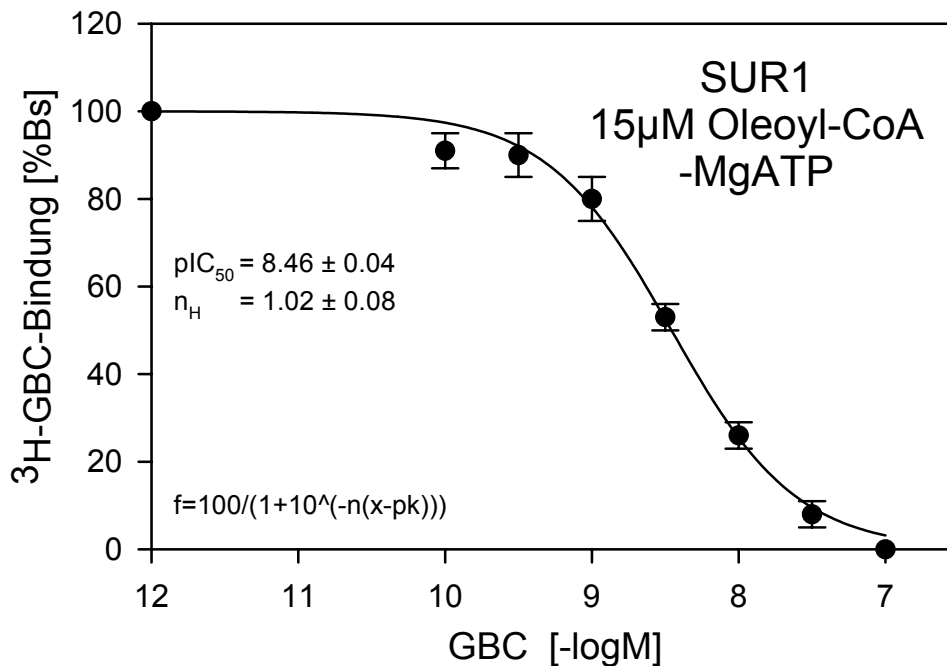


Abbildung 17:
Homologe Verdrängung der Bindung von ³H-GBC an SUR1 bei 15 μM Oleoyl-CoA in Abwesenheit von MgATP :
Mittelwerte ± SEM aus n=4 Einzelerperimenten.
[³H-GBC]=1.10±0.03 nM, B_S=350±72 fmol/mg (=100%), B_{TOT}=438±71 fmol/mg,
NSB=19±4% B_{TOT}, pIC₅₀=8.46±0.04, n=1.02±0.08
Proteinkonzentration (PK)=0.046±0.004 mg/ml; Inkubationszeit 25 min

Bei 15 μM Oleoyl-CoA konnte die Kurvenamplitude um 70% reduziert werden. Die Abbildung 16 zeigt die Bindungsverhältnisse in der Zusammenschau für die homologe Konkurrenz ³H-GBC gegen GBC mit 15 μM Oleoyl-CoA und ohne das Lipid.

Für die durch 15 μM Oleoyl-CoA modulierte homologe Konkurrenzkurve fanden wir in n=4 Experimenten in der Abwesenheit von MgATP einen K_D-Wert von 2.6 [2.0;3.5] nM (pK_D=8.58±0.06), der Hill-Koeffizient wurde mit n_H=1 festgesetzt (s. Tab. 5). Die Abbildung 17 zeigt die Lipidwirkung auf die Bindung, wobei hier die Kurve auf eine 100%-Amplitude renormiert und somit der Lipidhemmung am Ausgangspunkt der Messung im Gegensatz zu Abbildung 3 keine Rechnung getragen wurde.

Oleoyl-CoA verschiebt somit die Bindungskurve für GBC an SUR1 in Abwesenheit von MgATP um einen Faktor von 6.5 nach rechts, was einer 6.5-fachen Affinitäts-

3. Ergebnisse

abnahme des Rezeptors für den Liganden GBC in der Anwesenheit des Lipides entspricht.

Oleoyl-CoA	Radioligand	Rezeptor	K_D [nM]	A (% B_s)	n_H	B_{max} (fmol/mg)
-	$^3\text{H-GBC}$	SUR1	0.37 [0.30 ; 0.47]	100	1.2 ± 0.1	1225 ± 255
15 μM			2.6 [2.0 ; 3.5]	100	1.0 ± 0	1181 ± 277

Tabelle 5:

Vergleich der homologen Konkurrenz von $^3\text{H-GBC}$ mit GBC ohne, bzw. mit 15 μM Oleoyl-CoA an SUR1 in Abwesenheit von MgATP (gemittelte Werte aus n=3 bzw. 4 Versuchen)

Zur Klärung der Frage, ob die K_D -Verschiebung die Hemmung der Bindung auf 30% erklären kann (s. Abb. 16) oder ob es sich hierbei um einen durch Oleoyl-CoA vermittelten Effekt auf die Gesamtbindung B_{max} mit Reduktion der Bindungsstellen handelt, wandten wir das Massenwirkungsgesetz an.

Demnach beschreiben wir die spezifische Bindung in Abwesenheit von Oleoyl-CoA wie folgt,

$$B_s = B_{max} \frac{L}{L + K_D}$$

Gleichung (25)

wobei B_{max} die Anzahl der Bindungsstellen und L die Gesamtkonzentration an Radioligand widerspiegelt. Für die Bindungsverhältnisse unter 15 μM Oleoyl-CoA wird die Gleichung 25 modifiziert und mit K_D' eine andere Gleichgewichtsdissoziationskonstante für die $^3\text{H-GBC}$ -Bindung eingeführt, um die Rechtsverschiebung durch Oleoyl-CoA zu berücksichtigen:

$$B_s' = B_{max}' \frac{L}{L + K_D'}$$

Gleichung (26)

Durch Division der beiden Gleichungen und unter der Voraussetzung eines identischen Wertes für B_{max} der beiden Versuchsreihen (s. Tab. 5) ergibt sich:

3. Ergebnisse

$$\frac{B_s'}{B_s} = \frac{L + K_D}{L + K_D'}$$

Gleichung (27)

Um die Frage einer Competition zwischen Oleoyl-CoA und GBC am Rezeptor beantworten zu können, vergleichen wir die experimentell bestimmte Reduktion der Kurvenamplitude (um 70%) mit dem aus Gleichung 27 errechneten Wert, der den beobachteten Effekt des Lipides auf die Bindung anhand der K_D -Verschiebung zu erklären versucht.

Durch Einsetzen der entsprechenden Parameter (L in beiden Versuchsreihen gerundet ~1 nM, $K_D=0.4$ nM, $K_D'=2.6$ nM) in Gleichung 27 resultiert ein Quotient von 0.4, entsprechend einer Hemmung um 60% (vergleiche experimentelle Hemmung um 70%). Dies zeigt, daß der Oleoyl-CoA-Wirkung auf die GBC-Bindung an SUR1 allem Anschein nach ein überwiegend kompetitiver Hemmechansmus zugrunde liegt.

Unter dieser Annahme kann aus dem IC_{50} -Wert für Oleoyl-CoA (s. 3.1.2., Tab. 4) mithilfe der folgenden Gleichung ein K_D -Wert für Oleoyl-CoA berechnet werden:

$$K_D (\text{Oleoyl} - \text{CoA}) = IC_{50} (\text{Oleoyl} - \text{CoA}) / \left(1 + \frac{L}{K_D (\text{GBC})} \right)$$

Gleichung (28)

$$IC_{50} (\text{Oleoyl-CoA}) = 6.0 \mu\text{M}$$

$$L = 1.10 \text{ nM} \quad K_D (\text{GBC}) = 0.37 \text{ nM}$$

Somit erhalten wir einen K_D -Wert für Oleoyl-CoA von 1.5 μM bei der homologen Competition von GBC an SUR1 unter 15 μM Oleoyl-CoA und in Abwesenheit von MgATP.

3.1.4 Sättigung der ^3H -GBC-Bindung an SUR1 \pm 10 μM Oleoyl-CoA

Falls der Inhibitionsmechanismus des Oleoyl-CoA auf die GBC-Bindung an SUR1 tatsächlich kompetitiv mit dem K_{ATP} -Hemmstoff GBC ist (s. 3.1.3), muß sich der Hemmeffekt durch steigende Konzentrationen von GBC wieder aufheben lassen. Dann wäre auch gezeigt, daß es sich um eine reversible Hemmung handelt, und

3. Ergebnisse

diese nicht etwa auf einer irreversiblen Modifikation des SUR durch das Lipid beruht.

Daher wurden Sättigungsversuche mit ^3H -GBC an SUR1 \pm 10 μM Oleoyl-CoA in der Abwesenheit von MgATP durchgeführt.

In n=2 Experimenten zeigte sich eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse mit jenen aus den Konkurrenzexperimenten (s. Tab. 6).

Die Kontrollwerte für B_{max} in den beiden Versuchen waren etwas unterschiedlich.

SUR1/GBC	Oleoyl-CoA [μM]	K_D [nM]	B_{max} [fmol/mg]
homologe Konkurrenz	0	0.37	1225 \pm 255
	15	26	1181 \pm 277
Sättigung	0	4	3320 \pm 282
	10	17	2712 \pm 214

Tabelle 6:

Vergleich der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_D von GBC an SUR 1 unter dem Einfluß von Oleoyl-CoA (in Abwesenheit von MgATP):

Homologe Konkurrenz ^3H -GBC vs. GBC mit 15 μM Oleoyl-CoA und ohne Oleoyl-CoA

Sättigung der ^3H -GBC-Bindung mit 10 μM Oleoyl-CoA und ohne Oleoyl-CoA

Für die gemeinsame Auswertung wurde die spezifische Bindung jeweils als % der maximalen Bindung B_{max} der Kontrolle renormiert und zusammengefasst. Die Abbildung 18 zeigt den gemeinsamen Fit der normierten Daten an das Massenwirkungsgesetz, Abbildung 19 die Auftragung der Sättigungsexperimente nach Scatchard (Scatchard, 1949), wobei die Kurven nun als Geraden mit negativer Steigung imponieren und somit geeignet modifiziert sind, um die Werte für die Gleichgewichtsdissoziationskonstanten abzulesen. Hierbei ergeben sich die K_D -Werte aus dem negativen Kehrwert der jeweiligen Geradensteigung.

Die Gerade ohne Oleoyl-CoA läßt für die ^3H -GBC-Sättigung an SUR1 einen K_D -Wert von 0.37 nM erkennen, welcher damit genau dem in der homologen Konkurrenz von GBC und ^3H -GBC bestimmten Wert entspricht (s. Tab. 6). Die ^3H -GBC-

3. Ergebnisse

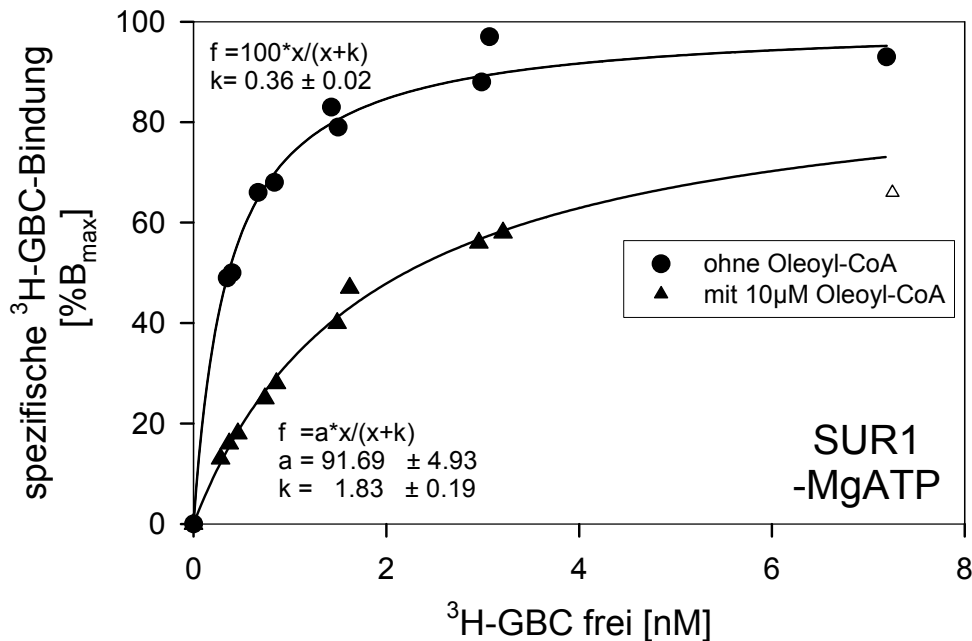


Abbildung 18:

Sättigung der ^3H -GBC-Bindung an SUR1 mit und ohne Oleoyl-CoA (10 μM) in Abwesenheit von MgATP;

gemeinsame Auswertung zweier Einzelerperimente

$B_{\text{max}}(-\text{OcoA}) = 100 \pm 0 \%$ (3600 ± 82 fmol/mg); $PK = 6.30$ $\mu\text{g}/300$ μl

$B_{\text{max}}(+\text{OcoA}) = 83 \pm 3 \%$

NSB stieg linear mit der Radioligandkonzentration an und betrug bei 7.5 nM ^3H -GBC

20% B_{tot}

Sättigung in der Anwesenheit von 10 μM Oleoyl-CoA ergibt eine Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D von $-(1/-0.6) = 1.7$ nM und entspricht damit im wesentlichen dem K_D -Wert der Konkurrenz von 2.6 nM bei 15 μM Oleoyl-CoA.

Diese Experimente zeigen, daß die Inhibition der ^3H -GBC-Bindung an SUR1 durch Oleoyl-CoA im wesentlichen reversibel und von kompetitiver Natur ist, somit kann mit steigenden Radioligandkonzentrationen das Lipid vom Rezeptor verdrängt werden. Dies zeigt sich in Abbildung 18 an der Amplitude der in Gegenwart von 10 μM Oleoyl-CoA gemessenen Kurve, die bei $83 \pm 3 \%$ liegt. Obgleich dies, trotz Beachtung der statistischen Abweichung, nicht der für eine reine Konkurrenz typischen 100% -Amplitude entspricht, kann doch überwiegend von einer Konkurrenz ausgegangen werden. Der gleiche Sachverhalt zeigt sich in Abbildung 19 der beiden Scatchard-Geraden, wobei hier die Lipidgerade bei $88 \pm 8 \%$ ihren Abszissenschnittpunkt besitzt.

3. Ergebnisse

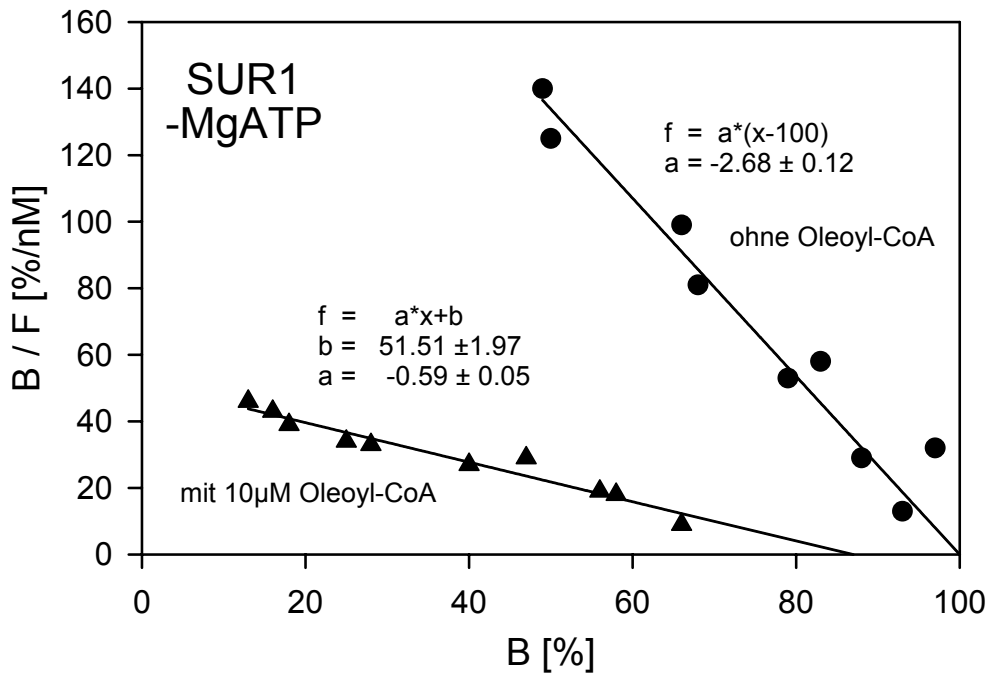


Abbildung 19:

Darstellung der beiden Sättigungsexperimente ^3H -GBC an SUR1 mit 10 µM, bzw. ohne Oleoyl-CoA (in Abwesenheit von MgATP) nach Scatchard

K_D ohne Oleoyl-CoA: $1/2.7=0.4$ nM

K_D mit 10 µM Oleoyl-CoA: $1/0.6=1.7$ nM

Die K_D -Werte ergeben sich aus dem negativen Kehrwert der Geradensteigungen.

Die Kontrollkurve ohne Oleoyl-CoA wurde auf den Abszissenschnittpunkt 100 gefittet; die Kurve in Anwesenheit des Lipides ergab einen Achsenschnittpunkt bei 88 ± 8 %, welcher geringfügig, aber statistisch signifikant unterschiedlich ist von 100 %.

3.2 Effekt von Oleoyl-CoA auf die ^3H -GBC-Bindung an SUR1 in Membranen in Anwesenheit von 1 mM Mg^{2+} und 0.3 mM ATP

3.2.1 Homologe Verdrängung der Bindung von ^3H -GBC an SUR1

Die Bindung von MgATP und die anschließende Hydrolyse zu MgADP verursacht eine Dissoziation von rezeptorgebundenem ^3H -GBC, wobei eine kompetitive Hemmung zwischen MgATP und GBC ausgeschlossen werden kann (Schwansstecher et al., 1992; Hambrock et al., 2002a).

Ueda et al., 1999a zeigten, daß die GBC- Bindungsstelle durch Bindung von MgATP/MgADP an die NBF, welche in direkter räumlicher Nähe anzutreffen sind, modifiziert wird und somit die Affinität für GBC abnimmt (negativer allosterischer Effekt).

Im Folgenden haben wir in Analogie zu den vorherigen Kapiteln 3.1.1 bis 3.1.3. die Bindungsverhältnisse an SUR1 für GBC und die Modulation durch Oleoyl-CoA unter dem Einfluß von MgATP studiert.

In n=4 Experimenten wurde eine Kompetition von ^3H -GBC mit GBC an SUR1 in Anwesenheit von Mg^{2+} 1 mM und ATP 0.3 mM durchgeführt.

Wie zu erwarten, stieg die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D im Vergleich zum Analogversuch ohne MgATP um den Faktor 5.5 von 0.4 nM auf 2.2 [1.7;2.9] nM an (allosterische Hemmung der GBC-Bindung durch MgATP). Logarithmiert ergab sich ein $\text{p}K_D$ -Wert von 8.66 ± 0.06 bei einem auf $n_H=1$ festgesetzten Hill-Koeffizienten. Die nichtspezifische Bindung lag bei 11 ± 1 % der totalen Bindung und wurde mit 100 nM GBC bestimmt, wobei die spezifische ^3H -GBC-Bindung vollständig verdrängt werden konnte (s. Abb. 20).

Die Tabelle 7 zeigt die Bindungsverhältnisse an SUR1 für die homologe Kompetition von GBC mit und ohne MgATP im Vergleich.

3. Ergebnisse

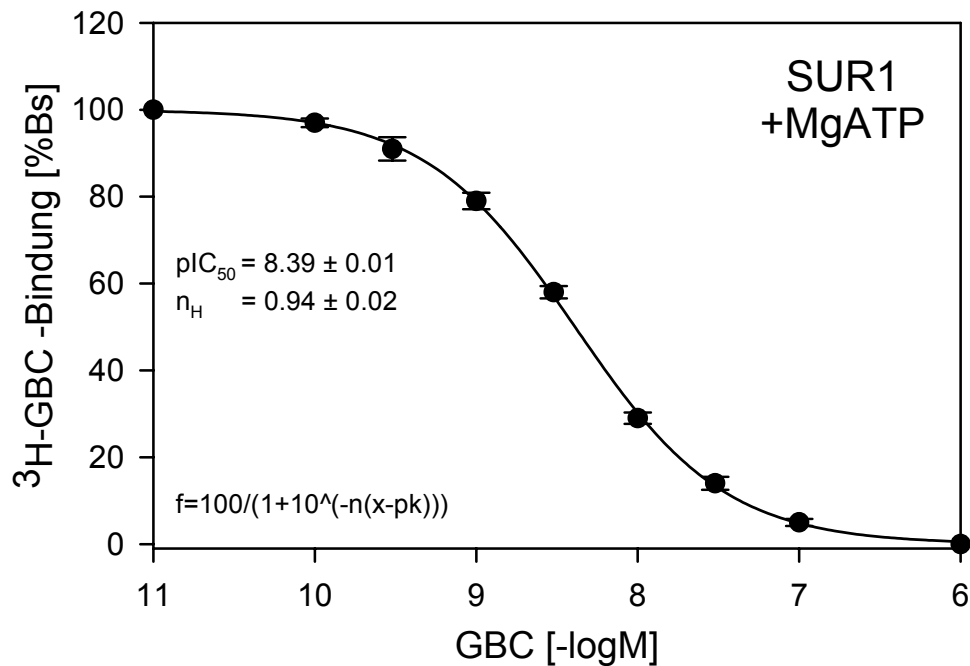


Abbildung 20:

Homologe Verdrängung der Bindung von $^3\text{H-GBC}$ an SUR1, 1 mM Mg^{2+} , 0.3 mM ATP:

Mittelwerte \pm SEM aus $n=4$ Einzelerperimenten.

$[^3\text{H-GBC}] = 1.9 \pm 0.1$ nM, $B_S = 502 \pm 43$ fmol/mg (=100%), $B_{TOT} = 566 \pm 45$ fmol/mg,

NSB = $11 \pm 1\%$ B_{TOT} , $pIC_{50} = 8.39 \pm 0.03$, $n = \text{fix} = 1$

Proteinkonzentration (PK) = 0.10 ± 0.01 mg/ml; Inkubationszeit 25 min

MgATP	Radio-ligand	Rezeptor	K_D pK_D (-log M)	A (% B_S)	n_H	B_{max} (fmol/mg)
+	$^3\text{H-GBC}$	SUR1	2.2nM [1.7;2.9] 8.66 ± 0.06	100	1 ± 0	1102 ± 107
-	$^3\text{H-GBC}$	SUR1	0.37nM [0.30;0.47] 9.41 ± 0.05	100	1.2 ± 0.1	1225 ± 255

Tabelle 7:

Homologe Verdrängung der Bindung von $^3\text{H-GBC}$ an SUR1 mit und ohne MgATP im Vergleich

(Gemittelte Parameter aus $n=3$ Einzelversuchen)

3.2.2 Hemmung der ^3H -GBC-Bindung an SUR1 durch Oleoyl-CoA

Nachdem aus 3.1.2 für die Hemmung der GBC-Bindung durch Oleoyl-CoA an SUR1 in Abwesenheit von MgATP eine halbmaximale Inhibitionskonzentration von 6 μM gezeigt wurde, soll hier die Auswirkung von 1 mM Mg^{2+} und 0.3 mM ATP auf die Oleoyl-CoA-Hemmkurve betrachtet werden.

Bei einer Labelkonzentration von $L_0=0.9\pm 0.1$ (in 3.1.2 $L_0=1.10\pm 0.02$) ergab sich aus $n=3$ Experimenten ein pIC_{50} -Wert von 4.84 ± 0.04 , was einem IC_{50} -Wert von 15 [12;17] μM entspricht. Damit ist die halbmaximale Inhibitionskonzentration im Vergleich zu den Bindungsverhältnissen ohne MgATP um den Faktor 2.4 nach rechts verschoben. Der Hill-Koeffizient stieg auf 2.1 ± 0.3 an (ohne MgATP $n_H=1.5\pm 0.1$), was statistisch nicht signifikant ist ($p=0.063$; s. Tab. 8 und Abb. 21).

ATP [mM]	Radio-ligand	Rezeptor	IC_{50} pIC_{50} (-log M)	A (% B_s)	n_H	B_{max} (fmol/mg)
0.3	^3H -GBC (0.9nM)	SUR1	15 μM [12;17] 4.84 ± 0.04	100	2.1 ± 0.3	2371 \pm 392
0	^3H -GBC (1.1nM)	SUR1	6.0 μM [3.6;10] 5.22 ± 0.11	100	1.5 ± 0.1	2073 \pm 301

Tabelle 8:
Hemmung der ^3H -GBC-Bindung durch Oleoyl-CoA an SUR1 mit und ohne MgATP im Vergleich (Gemittelte Parameter aus $n=4$ bzw. 3 Einzelversuchen)

Die spezifische ^3H -GBC-Bindung konnte mit 300 μM Oleoyl-CoA komplett verdrängt werden, die nichtspezifische Bindung stieg unter dem Lipid nicht an und betrug $9\pm 2\%$ der Gesamtbindung.

Desweiteren untersuchten wir bei einer Radioligandkonzentration L_0 von 2 nM die Verdrängung der ^3H -GBC-Bindung durch Oleoyl-CoA, um nachfolgend für die Modulation der homologen Competition mit GBC durch Oleoyl-CoA (siehe dort) anhand des IC_{50} -Wertes einen Richtwert für die zu verwendende Lipidkonzentration zu erhalten. Dies wurde notwendig aufgrund der bei der homologen Kom

3. Ergebnisse

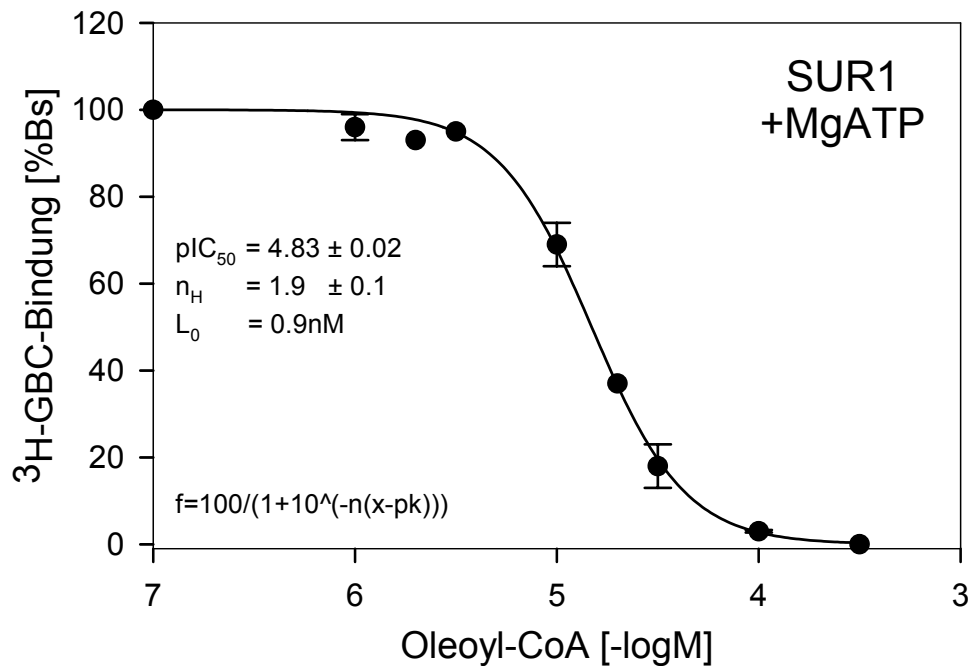


Abbildung 21:
Effekt von Oleoyl-CoA auf die 3H -GBC-Bindung an SUR1, 1 mM Mg^{2+} , 0.3 mM ATP
Mittelwerte \pm SEM aus n=3 Einzelexperimenten.
 $[^3H-GBC] = 0.9 \pm 0.1$ nM, $B_s = 546 \pm 47$ fmol/mg (=100%), $B_{TOT} = 608 \pm 68$ fmol/mg,
NSB=9 \pm 2% B_{TOT} , $pIC_{50} = 4.83 \pm 0.02$, $n = 1.9 \pm 0.1$
Proteinkonzentration (PK)=0.053 \pm 0.003 mg/ml; Inkubationszeit 25 min

petition von GBC (3.2.1.) eingesetzten Radioligandkonzentration von 1.9 nM.

Die Oleoyl-CoA-Verdrängung der 3H -GBC-Bindung an SUR1 mit 1 mM Mg^{2+} und 0.3 mM ATP, sowie $L_0 = 2.0 \pm 0.1$ nM, erbrachte in n=2 Experimenten eine IC_{50} von 19 [15;23] μM ($pIC_{50} = 4.73 \pm 0.05$) bei einem Hill-Koeffizienten von 2.6 ± 0.7 (s. Tab. 9 und Abb. 22).

Der Vergleich der beiden Oleoyl-CoA-Verdrängungskurven mit den unterschiedlichen Radioligandkonzentrationen lässt die Tendenz einer kompetitiv nach rechts verschobenen und steileren Bindungskurve in Anwesenheit höherer Radioligandkonzentrationen erkennen (IC_{50} von 15 μM bei $[^3H-GBC]$ von 0.9 nM versus IC_{50}

Radioligand	Rezeptor	IC_{50} pIC_{50} (-log M)	A (% B_s)	n_H	B_{max} (fmol/mg)
3H -GBC (2nM)	SUR1	19 μM [15;23] 4.73 \pm 0.05	100	2.6 \pm 0.7	2275 \pm 148

Tabelle 9:
Verdrängung der 3H -GBC-Bindung durch Oleoyl-CoA an SUR1, 1 mM Mg^{2+} , 0.3 mM ATP
(Gemittelte Parameter aus n=2 Einzelversuchen)

3. Ergebnisse

von 19 μM bei [$^3\text{H-GBC}$] von 2 nM). Allerdings ist dieser Effekt nicht statistisch signifikant.

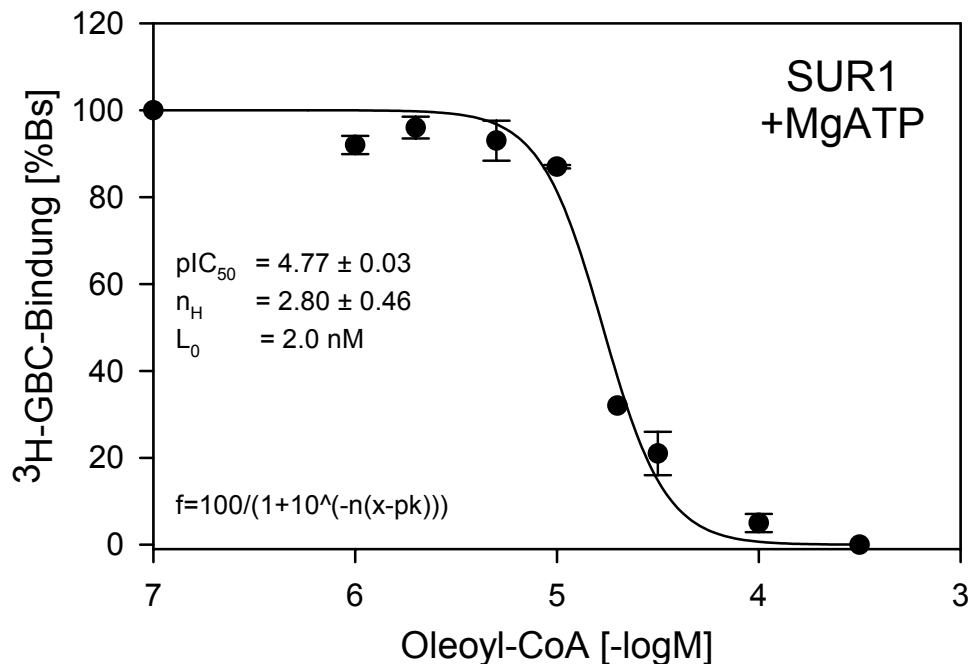


Abbildung 22:

Effekt von Oleoyl-CoA auf die $^3\text{H-GBC}$ -Bindung an SUR1,
1 mM Mg^{2+} , 0.3 mM ATP

Mittelwerte \pm SEM aus $n=2$ Einzelerperimenten.

[$^3\text{H-GBC}$]= 2.0 ± 0.1 nM, $B_S = 1068 \pm 55$ fmol/mg (=100%), $B_{TOT} = 1208 \pm 53$ fmol/mg,

NSB= $12 \pm 1\%$ B_{TOT} , $pIC_{50} = 4.77 \pm 0.03$, $n = 2.8 \pm 0.5$

Proteinkonzentration (PK)= 0.068 ± 0.010 mg/ml; Inkubationszeit 25 min

Unter der Voraussetzung einer Kompetitivität zwischen Oleoyl-CoA und GBC kann mittels der Gleichung 28 (s. 3.1.3) ein K_D -Wert für Oleoyl-CoA von 9 μM bestimmt werden. Allerdings zeigt das folgende Kapitel, daß die Annahme der Kompetitivität nicht ganz erfüllt ist (s. 3.2.3).

3.2.3 Effekt von 25 μM Oleoyl-CoA auf die homologe Verdrängung der GBC-Bindung an SUR1

Abschließend für dieses Kapitel untersuchten wir den Effekt einer konstanten Konzentration an Oleoyl-CoA auf die homologe Konkurrenz GBC gegen $^3\text{H-GBC}$ an SUR1 in Anwesenheit von Mg^{2+} 1 mM und ATP 0.3 mM. Die zu verwendende Oleoyl-CoA-Konzentration ergab sich aus dem IC_{50} -Wert von 19 μM der Oleoyl-

3. Ergebnisse

CoA-Verdrängungskurve bei der Radioligandkonzentration $L_0=2$ nM und wurde auf 25 μ M erhöht, um eine sichere Hemmung durch das Lipid zu gewährleisten. Aus der vergleichenden Abbildung 23 der homologen GBC-Verdrängung mit und ohne 25 μ M Oleoyl-CoA ist ersichtlich, daß die spezifische Bindung durch das Lipid um 70% gehemmt werden konnte.

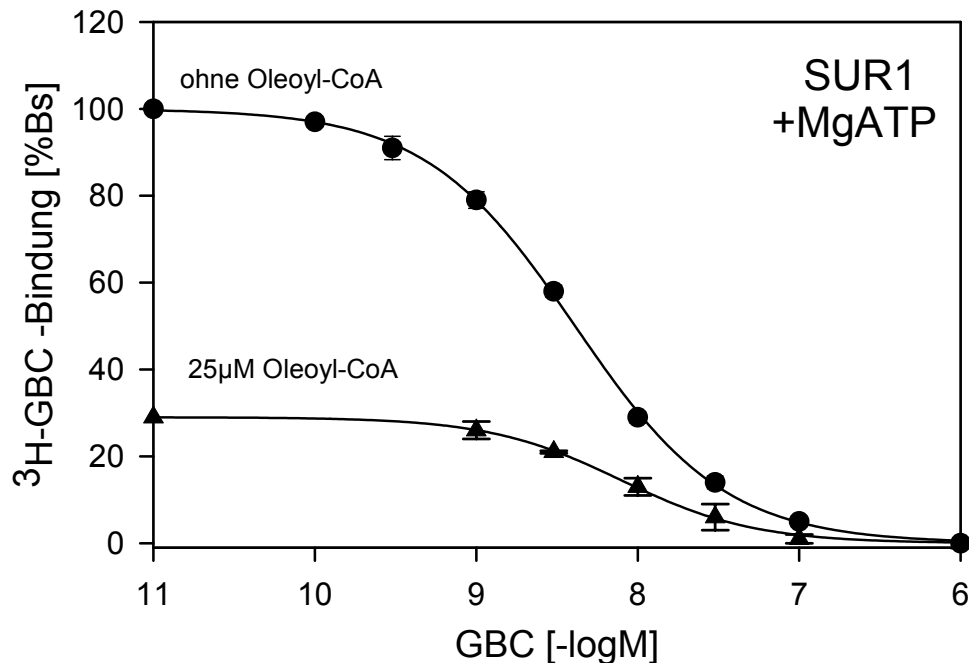


Abbildung 23:
Vergleich der homologen Konkurrenz von ^3H -GBC mit GBC, ohne bzw. mit 25 μM Oleoyl-CoA ;
1 mM Mg^{2+} , 0.3 mM ATP

Die durch Oleoyl-CoA modifizierte Bindungskurve zeigt eine Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D von 5.6 [5.4;5.9] nM, entsprechend einem Wert für $\text{p}K_D$ von 8.25 ± 0.01 . Der Hill-Koeffizient mit $n_H=1.1 \pm 0.1$ belegt einen monophasischen Kurvenverlauf. Die spezifische Bindung konnte durch 100 nM GBC komplett inhibiert werden, wobei die nichtspezifische Bindung bei $29 \pm 4\%$ der Gesamtbindung lag (Tab. 10). Die Abbildung 24 zeigt die auf 100% spezifische Bindung renormierte homologe Verdrängungskurve.

Wiederum erhielten wir für die Modulierung durch Oleoyl-CoA eine nach rechts verschobene homologe Bindungskurve, hier um den Faktor 2.5, von dem K_D -Wert von 2.2 nM ohne Oleoyl-CoA zu einem Wert von 5.6 nM in Anwesenheit des Lipides.

3. Ergebnisse

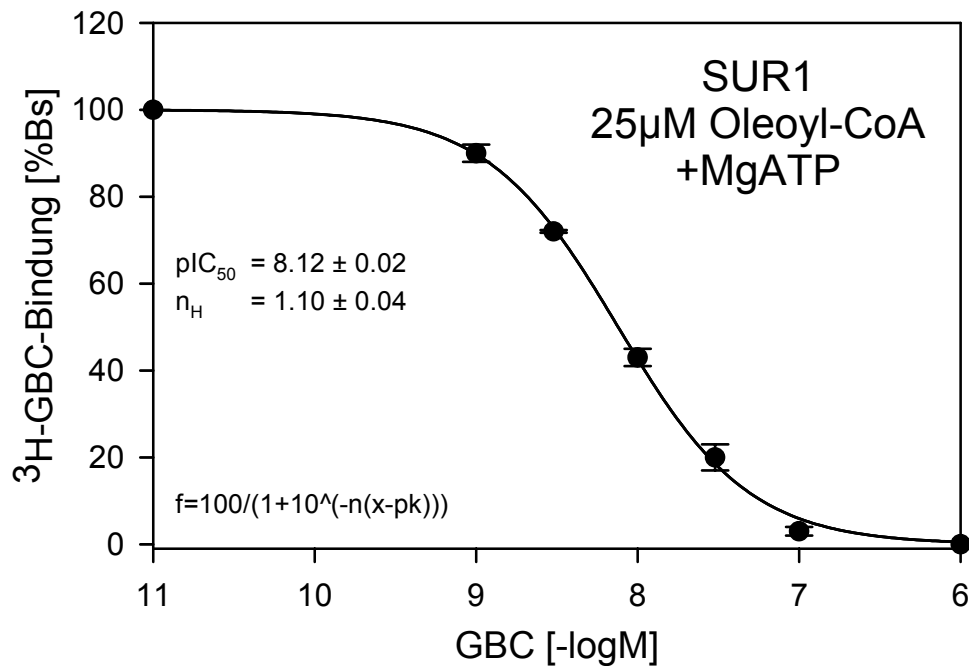


Abbildung 24:
Homologe Verdrängung der Bindung von ^3H -GBC an SUR1 bei 25 μM Oleoyl-CoA ;
1 mM Mg^{2+} , 0.3 mM ATP
 Mittelwerte \pm SEM aus $n=4$ Einzelerperimenten.
 $[^3\text{H}\text{-GBC}] = 2.0 \pm 0.1$ nM, $B_s = 268 \pm 30$ fmol/mg (=100%), $B_{\text{TOT}} = 353 \pm 38$ fmol/mg,
 $\text{NSB} = 29 \pm 4\%$ B_{TOT} , $\text{pIC}_{50} = 8.12 \pm 0.02$, $n = 1.10 \pm 0.04$
 Proteinkonzentration (PK) = 0.084 ± 0.003 mg/ml; Inkubationszeit 25 min

Die Frage nach einer zugrundeliegenden Kompetitivität der Hemmung der GBC-Bindung durch Oleoyl-CoA lässt sich durch Einsetzen der entsprechenden Parameter in die Gleichungen (s. 3.1.3; $L = 2$ nM, $K_D = 2.2$ nM, $K_D' = 5.6$ nM) beantworten: Wir erhalten einen Quotienten von 0.6 (40% Hemmung), im Gegensatz zu der experimentell bestimmten Hemmung um 70%.

Oleoyl-CoA	Radioligand	Rezeptor	K_D [nM]	A (% B_s)	n_H	B_{max} (fmol/mg)
-	^3H -GBC	SUR1	2.2 [1.7 ; 2.9]	100	1.0 ± 0.0	1102 ± 107
25 μM			5.6 [5.4 ; 5.9]	100	1.1 ± 0.1	1033 ± 91

Tabelle 10:
Vergleich der homologen Competition von ^3H -GBC mit GBC, ohne bzw. mit Oleoyl-CoA 25 μM an SUR1; 1 mM Mg^{2+} , 0.3 mM ATP
 (gemittelte Werte aus $n=3$ bzw. 4 Versuchen)

In diesem Fall kann das Massenwirkungsgesetz einen kompetitiven Inhibitionsmechanismus anhand der Verschiebung der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_D nur teilweise erklären. Es müssen noch andere, nicht-kompetitive Hemmechanismen eine Rolle spielen.

3.3 Effekt von Poly-D-Lysin auf die Hemmung der ^3H -GBC-Bindung durch Oleoyl-CoA an SUR1 in Membranen in Abwesenheit von MgATP

3.3.1 Aktivierung der Bindung von ^3H -GBC an SUR1 durch Poly-D-Lysin

Viele Autoren, z.B. MacGregor et al., 2002; Krauter et al., 2001 haben gefunden, daß polykationische Stoffe wie Neomycin, Spermin oder Poly-Lysin die Lipidwirkung auf die Untereinheit K_{IR} des K_{ATP} abschwächen können, indem sie die durch Lipide aktivierten und dadurch in ihrer ATP-Sensitivität geminderten Kanäle wieder für ATP empfindlich machen. Es zeigte sich jedoch auch, daß die Polykationen nicht in der Lage sind, die lipidinduzierte Schwächung der GBC- und P1075-Bindung zu beeinflussen (Krauter et al., 2001).

In den folgenden Versuchsreihen haben wir die Polykationenwirkung auf die ^3H -GBC-Bindung an SUR1 näher charakterisiert, vor allem im Hinblick auf eine mögliche Antagonisierung des hemmenden Effektes von Oleoyl-CoA auf die GBC-Bindung.

In den vorbereitenden Messungen fanden wir überraschenderweise eine Stimulierung der ^3H -GBC-Bindung durch Poly-D-Lysin mit einem Maximaleffekt von 26%, die schon bei niedrigen Konzentrationen des Polykations (3 $\mu\text{g}/\text{ml}$) nachweisbar war. Desweiteren untersuchten wir Konzentrationen für Poly-D-Lysin in 3er- und 10er-Schritten bis zu 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und konnten schließlich aus $n=5$ Versuchen eine konzentrationsabhängige Aktivierungskurve der ^3H -GBC-Bindung an SUR1 erstellen.

Aus der gefitteten Gesamtauswertung (Abb. 25 und Tab. 11) zeigte sich bei einer Radioligandkonzentration von $L_0=1.00\pm 0.02$ nM und in Abwesenheit von MgATP

3. Ergebnisse

eine halbmaximale Wirkungskonzentration EC_{50} von 7.4 $\mu\text{g/ml}$ bei einem Hill-Koeffizienten von 3.5 ± 1.2 . Die spezifische Bindung erreichte bereits bei einer

Radioligand	Rezeptor	EC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	A (% B_s)	n_H	B_{max} (fmol/mg)
$^3\text{H-GBC}$	SUR1	7.40 ± 0.05	126	3.5 ± 1.2	2617 ± 111

Tabelle 11:

Konzentrationsabhängiger Effekt von Poly-D-Lysin auf die $^3\text{H-GBC}$ -Bindung an SUR1 in Abwesenheit von MgATP

(gemittelte Werte aus $n=5$ Einzelversuchen)

Polykationen-Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ eine Plateauphase, höhere Konzentrationen konnten keine weitere Bindungszunahme erzeugen. Die nichtspezifische Bindung änderte sich mit steigender Konzentration an Poly-D-Lysin im Vergleich zu den Kontrollwerten ohne das Polykation um maximal 60%.

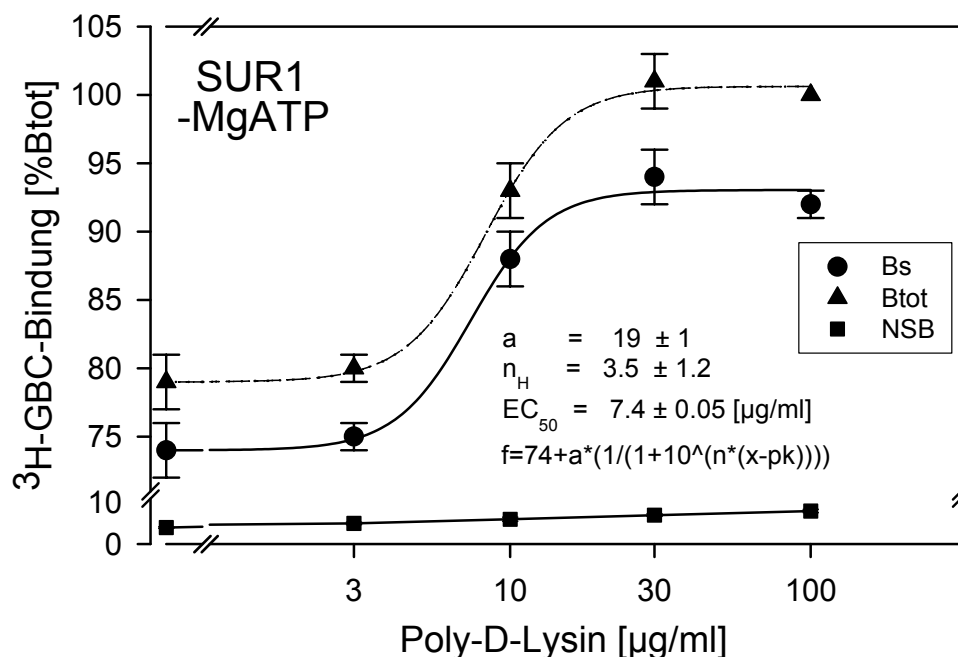


Abbildung 25:

Konzentrationsabhängiger Effekt von Poly-D-Lysin auf die $^3\text{H-GBC}$ -Bindung an SUR1 in Abwesenheit von MgATP ;

Mittelwerte \pm SEM aus $n=5$ Einzelexperimenten.

$[^3\text{H-GBC}] = 1.00 \pm 0.02$ nM, $B_s = 1882 \pm 84$ fmol/mg (=100%), $B_{TOT} = 2002 \pm 94$ fmol/mg,

$NSB = 6.0 \pm 0.4\%$ B_{TOT} , $EC_{50} = 7.40 \pm 0.05$ [$\mu\text{g/ml}$], $n = 3.5 \pm 1.2$

Proteinkonzentration (PK) = 0.042 ± 0.003 mg/ml; Inkubationszeit 25 min

Die Kurvenamplitude ergibt sich durch Renormierung der experimentell bestimmten Amplitude auf 100% B_s ($19 / 0.74 + 100 = 126$).

3.3.2 Hemmung der ^3H -GBC-Bindung an SUR1 durch Oleoyl-CoA in Anwesenheit von 3 $\mu\text{g/ml}$ Poly-D-Lysin

Nach Beobachtung der Stimulierung der ^3H -GBC-Bindung an SUR1 durch Poly-D-Lysin stellte sich nun die Frage, ob die Lipidhemmung der GBC-Bindung durch Zugabe des Polykations aufgehoben werden kann.

Bei den Experimenten wurde der Reihenfolge des Zupipettierens der einzelnen Agentien besondere Beachtung geschenkt: Die Zugabe von Poly-D-Lysin erfolgte nach der Inkorporation des Oleoyl-CoA mittels Sonizierung in die Membranen, so daß jegliche physikalische Interaktion des negativ geladenen Lipides mit dem positiv geladenen Polylysin vor Inkorporation des Lipides in die Membran und dadurch eine etwaige Neutralisierung der gegensätzlich geladenen Reaktionspartner unmöglich gemacht wurde.

Zunächst wählten wir mit 3 $\mu\text{g/ml}$ Poly-D-Lysin eine Konzentration, welche noch keine wesentliche Stimulierung der Bindung hervorrief, um einen vermuteten Antagonismus zwischen Oleoyl-CoA und Poly-D-Lysin auf Rezeptorebene klar von dem durch Poly-D-Lysin induzierten Stimulierungseffekt unterscheiden zu können.

Für die Verdrängung der ^3H -GBC-Bindung an SUR1 durch Oleoyl-CoA in Abwesenheit von MgATP und bei einer Konzentration von 3 $\mu\text{g/ml}$ Poly-D-Lysin zeigte sich in $n=2$ Experimenten eine halbmaximale Inhibitionskonzentration IC_{50} von 8.9 [8.1;9.8] μM , entsprechend dem pIC_{50} -Wert von 5.05 ± 0.02 , bei einem Hill-Koeffizienten von 3.0 ± 0.9 . (s. Tab. 12 und Abb. 26).

Die Kontrollkurve ohne 3 $\mu\text{g/ml}$ Poly-D-Lysin ergab mit 8.1 [6.8;9.8] μM bei einem Hill-Koeffizienten von 2.1 ± 0.2 keine signifikant unterschiedliche Inhibitionskonzentration für Oleoyl-CoA ($p=0.349$).

Radioligand	Rezeptor	IC_{50} pIC_{50} (-log M)	A (% B_s)	n_H	B_{max} (fmol/mg)
^3H -GBC	SUR1	8.9[8.1;9.8] μM 5.05 \pm 0.02	100	3.0 \pm 0.9	3148 \pm 64

Tabelle 12:
Effekt von Oleoyl-CoA auf die ^3H -GBC-Bindung an SUR1 bei 3 $\mu\text{g/ml}$ Poly-D-Lysin in Abwesenheit von MgATP ;
(gemittelte Werte aus $n=2$ Einzelversuchen)

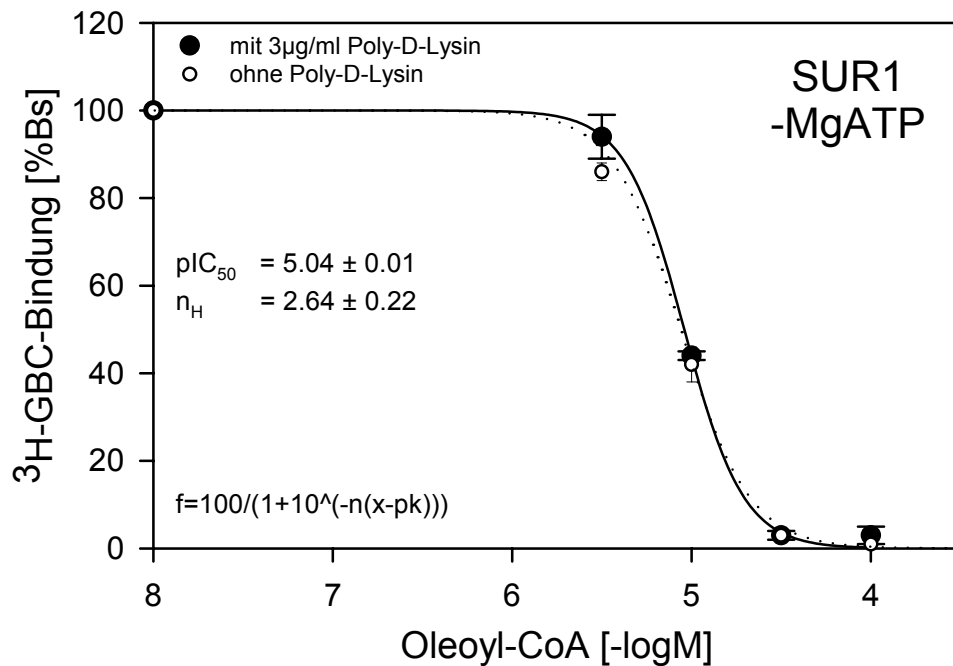


Abbildung 26:

Effekt von Oleoyl-CoA auf die ^3H -GBC-Bindung an SUR1 bei 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Poly-D-Lysin in Abwesenheit von MgATP ;

Mittelwerte \pm SEM aus $n=2$ Einzelexperimenten, orientierende Versuche
 $[^3\text{H}\text{-GBC}] = 1.3 \pm 0.1$ nM, $[^3\text{H}\text{-GBC}]$ Kontrollkurve = 1.1 ± 0.1 nM $B_s = 2384 \pm 26$ fmol/mg
 (=100%), $B_{\text{TOT}} = 2535 \pm 24$ fmol/mg, NSB = $6 \pm 0\%$ B_{TOT} , $p\text{IC}_{50} = 5.04 \pm 0.01$, $n = 2.6 \pm 0.2$
 Proteinkonzentration (PK) = 0.0240 ± 0.0003 mg/ml; Inkubationszeit 25 min

Somit kann bei 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Poly-D-Lysin kein antagonistischer Effekt im Sinne einer Disinhibition auf die Hemmung der ^3H -GBC-Bindung an SUR1 durch Oleoyl-CoA festgestellt werden. Deshalb haben wir in der nächsten Versuchsreihe die Konzentration an Poly-D-Lysin erhöht (s. 3.3.3).

3.3.3 Hemmung der ^3H -GBC-Bindung an SUR1 durch Oleoyl-CoA in Anwesenheit von 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Poly-D-Lysin

Bei einer Konzentration von 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Poly-D-Lysin untersuchten wir die Oleoyl-CoA-Verdrängungskurve der GBC-Bindung an SUR1 in Abwesenheit von MgATP. Dies wurde notwendig, da die Polykation in einer Konzentration von 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ keinen erkennbaren Effekt auf die Bindung ausübte und sich daher die gleichen Verhältnisse wie bei der einfachen Verdrängung der ^3H -GBC-Bindung durch Oleoyl-CoA einstellen (s. 3.1.2).

3. Ergebnisse

In n=5 Versuchen beobachteten wir eine Stimulierung der ^3H -GBC-Bindung unter Poly-D-Lysin um etwa 34%, die in der Kontrolle ohne das Polykation nicht nachweisbar war (vgl. Abb. 27).

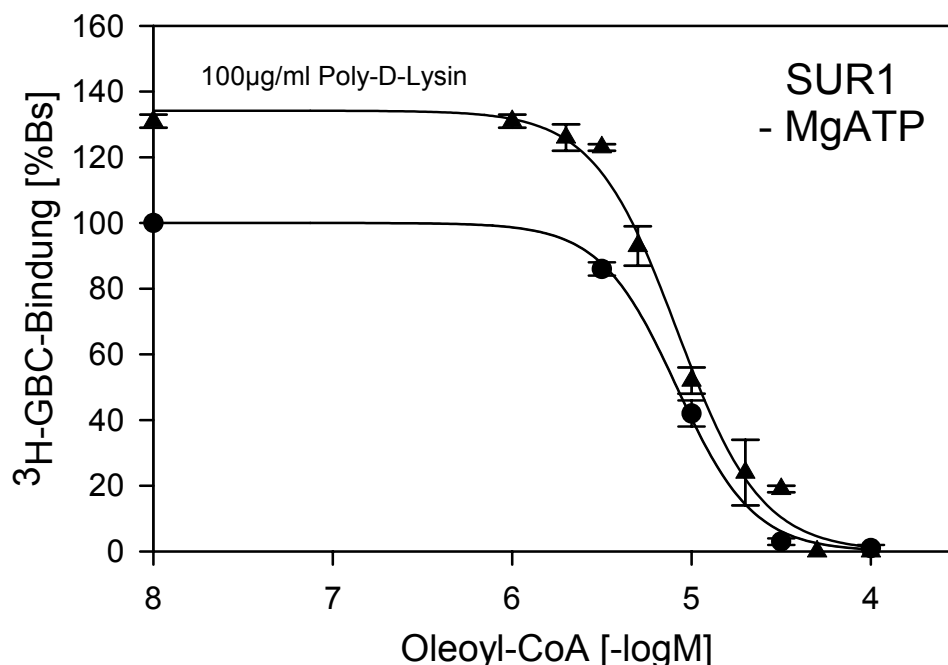


Abbildung 27:

Vergleich der Hemmung der ^3H -GBC-Bindung an SUR1 durch Oleoyl-CoA mit und ohne 100 µg/ml Poly-D-Lysin, jeweils in Abwesenheit von MgATP
(gemittelte Parameter aus n=5 bzw.4 Versuchen)
[^3H -GBC] = 1.0 ± 0.1 nM, [^3H -GBC] Kontrolle = 1.1 ± 0.1 nM

Desweiteren fanden wir für die durch Poly-D-Lysin modulierte Bindungskurve eine halbmaximale Inhibitionskonzentration IC_{50} von 7.8 [6.5;9.3] µM ($\text{pIC}_{50} = 5.11 \pm 0.04$) und einen Hill-Koeffizienten von 2.1 ± 0.2 (s. Tab. 13 und Abb. 28).

Damit ist dieser Wert für die halbmaximale Inhibitionskonzentration der Oleoyl-

Poly-D-Lysin	Radioligand	Rezeptor	IC_{50} [µM]	A (%B _s)	n_H	B _{max} (fmol/mg)
-	^3H -GBC	SUR1	8.1 [6.8;9.8]	100	2.1 ± 0.2	3148 ± 64
100 µg/ml			7.8 [6.5 ; 9.3]	100	2.1 ± 0.2	4228 ± 840

Tabelle 13:

Vergleich der Verdrängung der ^3H -GBC-Bindung an SUR1 durch Oleoyl-CoA mit und ohne 100 µg/ml Poly-D-Lysin, jeweils in Abwesenheit von MgATP
(gemittelte Parameter aus n=5 bzw.4 Versuchen)

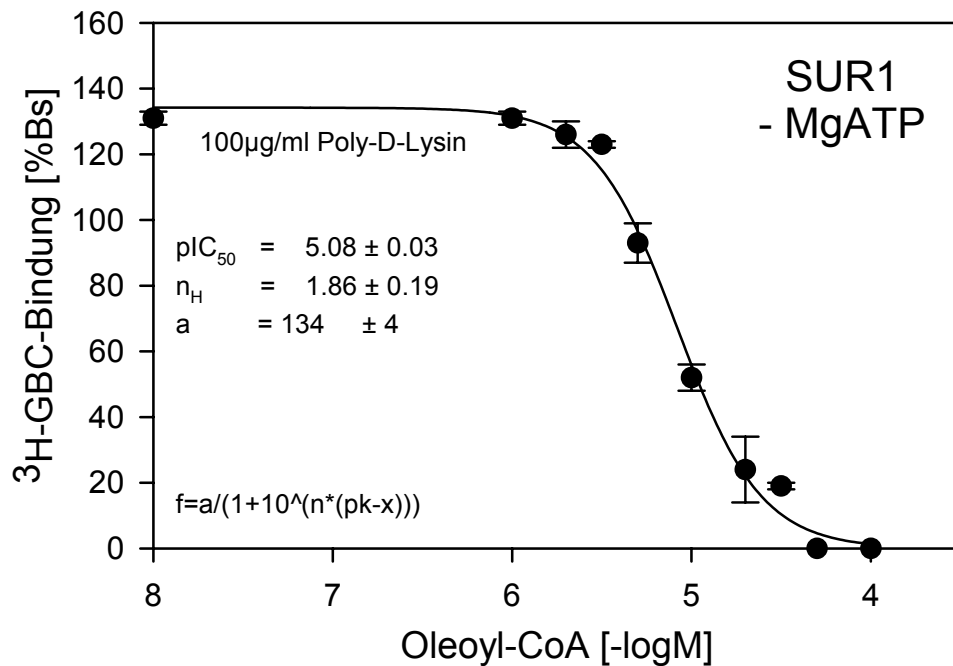


Abbildung 28:

Effekt von Oleoyl-CoA auf die ³H-GBC-Bindung an SUR1 bei 100 µg/ml Poly-D-Lysin in Abwesenheit von MgATP ;

Mittelwerte ± SEM aus n=5 Einzelexperimenten.

[³H-GBC]=1.0±0 nM, B_S=2273±606 fmol/mg (=100%), B_{TOT}=2465±650 fmol/mg,

NSB=8±1% B_{TOT}, pIC₅₀=5.08±0.03, n=1.9±0.2

Proteinkonzentration (PK)=0.0353±0.0053 mg/ml; Inkubationszeit 25 min

CoA-Verdrängung unter 100 µg/ml Poly-D-Lysin statistisch nicht signifikant verschieden von der Inhibitionskonzentration für die Bindungsverhältnisse ohne Polykation (IC₅₀=8.1 µM). Poly-D-Lysin ist folglich nicht in der Lage, die lipidinduzierte Hemmung der GBC-Bindung an SUR1 abzuschwächen, obgleich es jedoch die spezifische Bindung für GBC ansteigen läßt.

3.4 Effekt von Oleoyl-CoA auf die ³H-P1075-Bindung an SUR2A in Membranen

3.4.1 Homologe Verdrängung der Bindung von ³H-P1075 an SUR2A

In den folgenden drei Versuchsreihen wurde die Hemmung der ³H-P1075-Bindung an SUR2A durch Oleoyl-CoA untersucht.

3. Ergebnisse

Als Vorbereitung für die Experimente mit Oleoyl-CoA wurde zunächst durch homologe Konkurrenz die K_D des Radioliganden $^3\text{H-P1075}$ bestimmt.

Aus $n=5$ Experimenten bei 1 mM ATP und 2.2 mM Mg^{2+} ergab die homologe Konkurrenz der $^3\text{H-P1075}$ -Bindung mit nicht-markiertem P1075 einen pK_D -Wert von 7.82 ± 0.03 , welcher dem K_D -Wert von 15.1 [13.2, 17.4] nM entspricht. Der Hill-Koeffizient von 1.03 ± 0.05 weist auf eine monophasische Verdrängungskurve mit einer Klasse von Bindungsstellen ohne Kooperativität hin.

Die nichtspezifische Bindung (NSB) lag bei 12% der totalen Bindung (B_{tot}) und wurde mit einer sättigenden Konzentration an P1075 (100 μM) bestimmt.

Es zeigte sich, daß dadurch die spezifische $^3\text{H-P1075}$ -Bindung vollständig verdrängt werden konnte (Tab. 14 und Abb. 29).

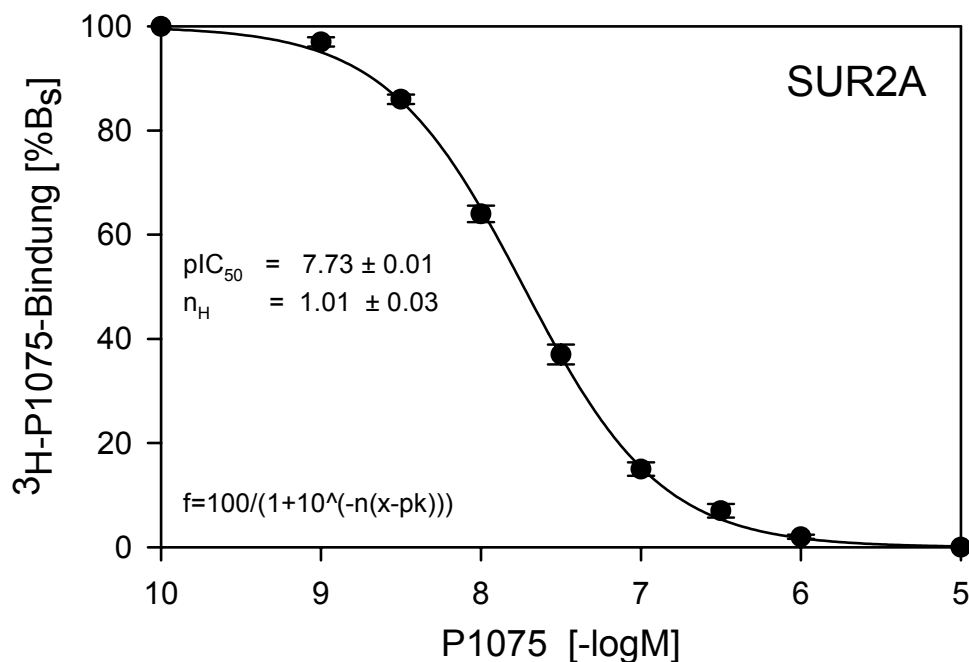


Abbildung 29:

Homologe Verdrängung der Bindung von $^3\text{H-P1075}$ an SUR2A

Mittelwerte \pm SEM aus $n=5$ Einzelexperimenten.

$[^3\text{H-P1075}] = 2.20 \pm 0.01$ nM, $B_S = 85 \pm 22$ fmol/mg (=100%), $B_{\text{TOT}} = 93 \pm 22$ fmol/mg,

NSB = $12 \pm 2\%$ B_{TOT} , $\text{pIC}_{50} = 7.73 \pm 0.01$, $n = 1.03 \pm 0.05$

Proteinkonzentration (PK) = 0.25 ± 0.01 mg/ml; Inkubationszeit 13 min

3. Ergebnisse

Radioligand	Rezeptor	K_D p K_D (-log M)	A (%B _s)	n _H	B _{max} (fmol/mg)
³ H-P1075	SUR2A	15[13;17]nM 7.82±0.03	100	1.03± 0.05	691± 201

Tabelle 14:
homologe Verdrängung der Bindung von ³H-P1075 an SUR2A
(Gemittelte Parameter aus n=5 Einzelversuchen)

3.4.2 Hemmung der ³H-P1075-Bindung an SUR2A durch Oleoyl-CoA

K_{ATP}-Kanäle koppeln die elektrische Membranaktivität an den Energiestoffwechsel der Zelle (Noma, 1983; Nichols und Lederer, 1991; Terzic et al., 1995; Benndorf et al., 1992). Liu et al., 2001a beschrieben einen direkten Effekt von langkettigen Acyl-CoA-Estern (LC-Acyl-CoA) auf die K_{ATP}-Aktivität in Herzmuskelzellen. Sie fanden eine Aktivierung der K_{ATP}-Kanäle durch LC-Acyl-CoA, die um ein Vielfaches höher war als in den pankreatischen β-Zellen (Bränström et al., 1997). Da die LC-Acyl-CoA aber an der K_{IR}-Untereinheit ansetzen (Bränström et al., 1998; Gribble et al., 1998a) und diese in beiden Fällen dieselbe (K_{IR}6.2) ist, muß man schließen, daß der SUR-Subtyp den Effekt der LC-Acyl-CoA auf den K_{IR}6.2 moduliert. Wir untersuchten hier die Rolle der β-Untereinheit, SUR2A.

Hierzu wurde die ³H-P1075-Bindung an SUR2A durch ansteigende Konzentrationen an Oleoyl-CoA über einen Bereich von 0.01 bis 100 µM betrachtet, wobei die spezifische Bindung des Radioliganden vollständig verdrängt werden konnte. Es zeigte sich auch eine konstant bleibende nichtspezifische Bindung über den Oleoyl-CoA-Konzentrationsbereich hinweg.

Die drei durchgeführten Experimente ergaben für die Hemmung der ³H-P1075-Bindung durch Oleoyl-CoA bei einer Radioligandkonzentration von L₀ = 2.20±0.09 nM und in Anwesenheit von MgATP (Mg²⁺ 1 mM, ATP 0.3 mM) einen pIC₅₀-Wert von 4.76±0.04, entsprechend einer halbmaximalen Inhibitionskonzentration IC₅₀ von 17 [15;21] µM (s. Tab. 15). Die Abbildung 30 zeigt die Hemmkurve aus den gemittelten Daten.

3. Ergebnisse

Radioligand	Rezeptor	IC ₅₀ pIC ₅₀ (-log M)	A (%B _s)	n _H	B _{max} (fmol/mg)
³ H-P1075	SUR2A	17[15;21]μM 4.76±0.04	100	1.51±0.13	815± 113

Tabelle 15:
Hemmung der ³H-P1075-Bindung durch Oleoyl-CoA an SUR2A
 (Gemittelte Parameter aus n=3 Einzelversuchen)

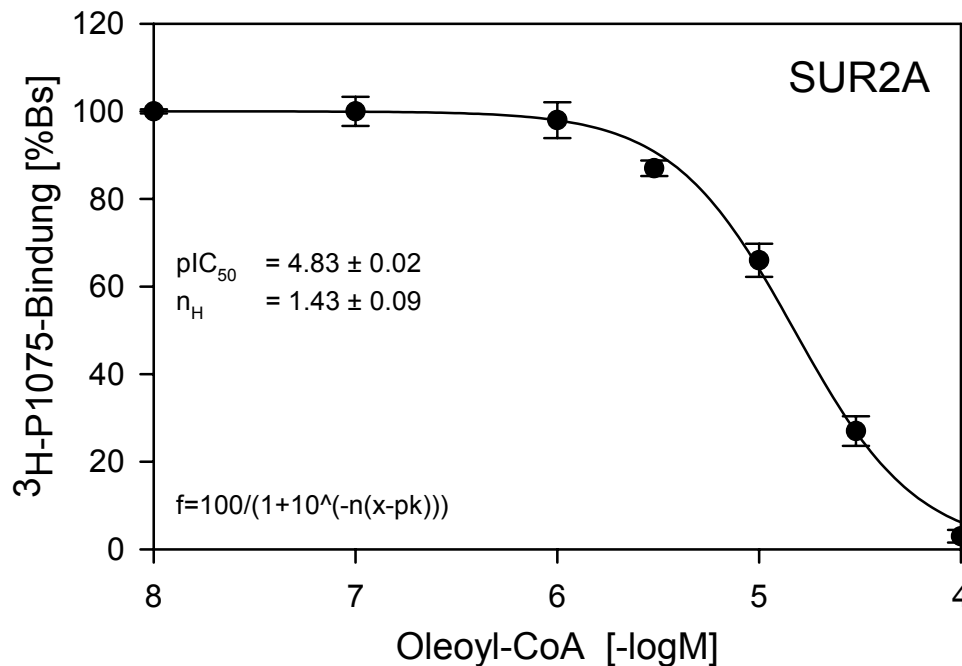


Abbildung 30:

Effekt von Oleoyl-CoA auf die ³H-P1075-Bindung an SUR2A

Mittelwerte ± SEM aus n=3 Einzelerperimenten.

[³H-P1075]=2.20±0.09 nM, B_s=102±15 fmol/mg (=100%), B_{TOT}=114±18 fmol/mg,

NSB=10±1% B_{TOT}, pIC₅₀=4.83±0.02, n=1.43±0.09

Proteinkonzentration (PK)=0.26±0 mg/ml; Inkubationszeit 13 min

Der Hill-Koeffizient lag mit 1.51±0.13 signifikant verschieden von 1, was auf eine positive Kooperativität hinweisen könnte.

Die Berechnung der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_D für Oleoyl-CoA (vorausgesetzte Kompetitivität) aus IC₅₀=17 μM, L_o=[³H-P1075]=2.2 nM und K_D (GBC)=15 nM ergibt einen Wert von 15 μM.

Eine früher in unserer Arbeitsgruppe beobachtete Stimulation der Radioligandbindung ³H-GBC an SUR2A(Y1206S) bei submikromolaren Oleoyl-CoA-Konzentrationen wurde ebenfalls für die Oleoyl-CoA-Modulation der ³H-P1075-Bindung

an SUR2A in Betracht gezogen, konnte aber weder hier gezeigt, noch an SUR2A(Y1206S) mit statistisch signifikanten Daten reproduziert werden (s. 3.5).

3.4.3 Effekt von 30 μM Oleoyl-CoA auf die homologe Verdrängung der ^3H -P1075-Bindung an SUR2A

Nachdem in den beiden Vorversuchen die Gleichgewichtsdissoziationskonstante für P1075 und die halbmaximale Inhibitionskonzentration der P1075-Bindung für Oleoyl-CoA an SUR2A bestimmt worden waren, untersuchten wir nun den Effekt einer konstanten Konzentration an Oleoyl-CoA auf die P1075-Bindung an SUR2A in Anwesenheit von 1 mM Mg^{2+} und 0.3 mM ATP.

Aus der Oleoyl-CoA-Hemmkurve (s. 3.4.2) ist ersichtlich, daß die spezifische Bindung des Radioliganden ^3H -P1075 bei einer Lipidkonzentration von $\sim 15 \mu\text{M}$ auf etwa 40% der Ausgangsamplitude reduziert ist.

Um eine ausreichende Hemmung der ^3H -P1075-Bindung unter Oleoyl-CoA zu gewährleisten, nahmen wir jetzt 30 μM Oleoyl-CoA und beobachteten eine Hemmung der Bindung um 70%, d.h. die ^3H -P1075-P1075-Kompetitionskurve beginnt bei 30% der ohne das Lipid gemessenen Kontrollkurve. Die Abbildung 31 zeigt die Hemmkurven ohne und mit 30 μM Oleoyl-CoA in der vergleichenden Zusammenschau.

Für die durch 30 μM Oleoyl-CoA modulierte Bindungskurve ergibt sich ein K_D -Wert von 50 [48;53] nM (ohne Oleoyl-CoA $K_D=15$ nM) und ein Hill-Koeffizient von 0.90 ± 0.03 (s. Abb. 32 für die auf 100% renormierte Bindungskurve und Tab. 16). Es wird somit deutlich, daß Oleoyl-CoA die Bindungskurve für P1075 an SUR2A um einen Faktor von 3.3 nach rechts verschiebt, was einer Affinitätsabnahme des

Oleoyl-CoA	Radioligand	Rezeptor	K_D [nM]	A (% B_s)	n_H	B_{max} (fmol/mg)
-	^3H -P1075	SUR2A	15 [13;17]	100	1.03 ± 0.05	691 ± 201
30 μM			50 [48;53]	30	0.90 ± 0.03	584 ± 63

Tabelle 16:
Vergleich der homologen Konkurrenz von ^3H -P1075 mit P1075, ohne und mit 30 μM Oleoyl-CoA
 (gemittelte Werte aus $n=5$, bzw. 4 Versuchen)

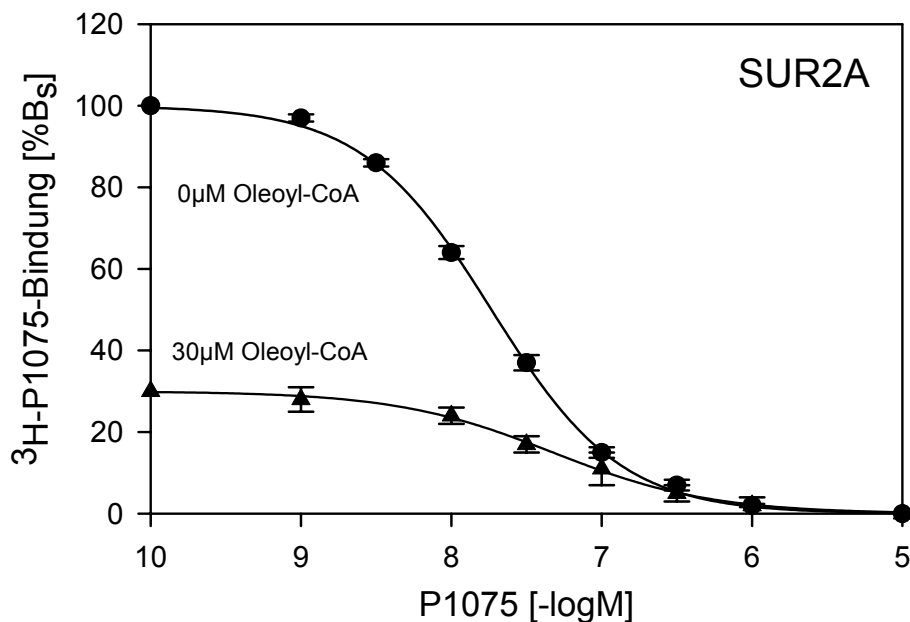


Abbildung 31:

Vergleich der homologen Konkurrenz von ^3H -P1075 mit P1075 ohne und mit 30 μM Oleoyl-CoA

Rezeptors für den Liganden P1075 in Anwesenheit von Oleoyl-CoA entspricht. Zur Prüfung der Frage, ob die Verschiebung des K_D -Wertes die Hemmung der Bindung auf 30% erklären kann oder ob es sich hierbei um einen durch das Lipid vermittelten Effekt auf die Gesamtbindung B_{max} mit Reduktion der Bindungsstellen handelt, wandten wir die aus dem Massenwirkungsgesetz abgeleiteten Gleichungen (s. 3.1.3) an.

Durch Einsetzen von $L=2$ nM, $K_D=15$ nM und $K_D'=50$ nM erhalten wir einen Quotienten von 0.3, welcher damit genau der experimentell bestimmten Hemmung der P1075-Bindung durch 30 μM Oleoyl-CoA um 70% entspricht. Die K_D -Verschiebung für P1075 ist demnach vollständig durch die Oleoyl-CoA-Hemmung der Bindung zu erklären. Allem Anschein nach zeigen die Liganden P1075 und Oleoyl-CoA an SUR2A einen kompetitiven Hemmechanismus. Aus der Verschiebung der beiden K_D -Werte lässt sich wiederum der K_D -Wert für Oleoyl-CoA von 15 μM bestimmen (s. 3.4.2).

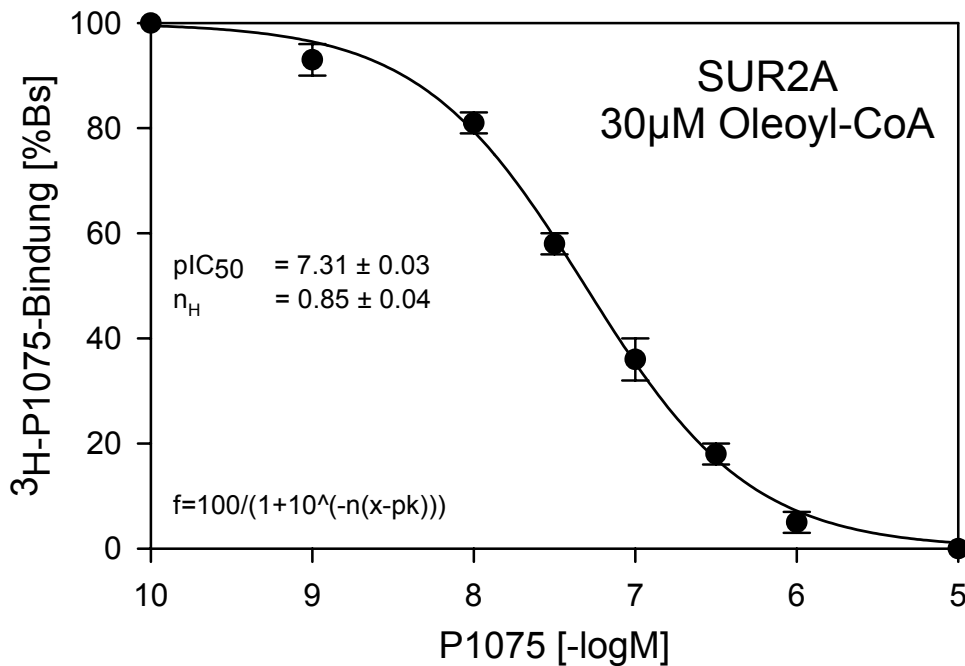


Abbildung 32:

Homologe Verdrängung der Bindung von ³H-P1075 an SUR2A bei 30 μM Oleoyl-CoA

Mittelwerte ± SEM aus n=4 Einzelerperimenten.

[³H-P1075]=2.20±0.03 nM, B_S=38±14 fmol/mg (=100%), B_{TOT}=48±14 fmol/mg,

NSB=26±5% B_{TOT}, pIC₅₀=7.31±0.03, n=0.90±0.04

Proteinkonzentration (PK)=0.28±0.02 mg/ml; Inkubationszeit 13 min

Zur endgültigen Klärung der Kompetitivität wären allerdings noch Sättigungsstudien mit ³H-P1075 in Anwesenheit von Oleoyl-CoA angezeigt, jedoch konnten diese aufgrund der hohen Lösungsmittelkonzentrationen des Labels mit daraus resultierender Membranrezeptorprotein-Denaturierung nicht durchgeführt werden.

3.4.4 Auswirkung der Koexpression mit K_{IR}6.2 auf die Hemmung der ³H-P1075-Bindung an SUR2A durch Oleoyl-CoA

Elektrophysiologische Untersuchungen an SUR2A/K_{IR}6.2 haben für Oleoyl-CoA Effekte in einem Konzentrationsbereich von 0.2 bis 2 μM gezeigt (Liu et al., 2001a). Hingegen liegen die Wirkkonzentrationen des Lipides für die Hemmung der Radioligandbindung an SUR2A ohne Koexpression mit K_{IR}6.2 um den Faktor 10 bis 100 höher (vgl. 3.4.2). Dabei ist zu berücksichtigen, daß elektrophysiologische Effekte der Lipide durch deren Bindung an die K_{IR}-Untereinheit des Kanals

3. Ergebnisse

zustande kommen, während die Untereinheit SUR auf die Lipidbindung nur modulatorischen Einfluß auszuüben scheint.

Aufgrund dieser Diskrepanz in den Oleoyl-CoA-Konzentrationen wurde im folgenden die Auswirkung der Koexpression von SUR2A mit $K_{IR}6.2$ auf die Lipidhemmung der $^3\text{H-P1075}$ -Bindung untersucht. Insbesondere sollte der Frage nachgegangen werden, ob die Koexpression mit $K_{IR}6.2$ den Rezeptor SUR2A für die Hemmung durch Oleoyl-CoA empfindlicher macht und somit die Bindungskurve nach links zu physiologischeren Lipidkonzentrationen im submikromolaren Bereich hin verschoben wird.

Für die Messungen wurden Membranen aus transient mit SUR2A/ $K_{IR}6.2$ transfizierten Zellen verwendet. Die Hemmung der $^3\text{H-P1075}$ -Bindung an SUR2A/ $K_{IR}6.2$ durch Oleoyl-CoA zeigte in $n=3$ Versuchen bei einer Radioligandkonzentration von $L_0=2.4\pm 0.1$ nM, sowie mit 1 mM Mg^{2+} und 0.3 mM ATP eine halbmaximale Inhibitionskonzentration IC_{50} von 30 [26.9; 32.4] μM ($\text{pIC}_{50}=4.53\pm 0.02$). Selbst bei 100 μM Oleoyl-CoA konnte die spezifische Bindung B_s nicht vollständig verdrängt werden, höhere Lipidkonzentrationen führten zu einem Niederschlag und konnten daher nicht untersucht werden. Die nichtspezifische Bindung (NSB) stieg unter Oleoyl-CoA nicht an und lag bei $30\pm 1\%$ B_{tot} . Aus den bestimmten Werten ließ sich eine monophasische Bindungskurve mit einem Hill-Koeffizienten von $n_H=1.38\pm 0.11$ erstellen (s. Abb. 33).

Vergleicht man nun die Oleoyl-CoA-Hemmkurven für die $^3\text{H-P1075}$ -Bindung an SUR2A alleine mit der an SUR2A in Koexpression mit $K_{IR}6.2$ (s. Tab. 17), so zeigt sich wider Erwarten eine Erhöhung des IC_{50} -Wertes um den Faktor 1.8 (von 17 μM auf 30 μM), welche statistisch signifikant ist ($p=0.007$). Durch Koexpression

Radioligand	L_0 [nM]	Rezeptor	IC_{50} pIC_{50} (-log M)	A (% B_s)	n_H
$^3\text{H-P1075}$	2.2 \pm 0.1	SUR2A	17[15;21] μM 4.76 \pm 0.04	100	1.51 \pm 0.13
	2.4 \pm 0.1	SUR2A/ $K_{IR}6.2$	30[27;32] μM 4.53 \pm 0.02	100	1.38 \pm 0.11

Tabelle 17:
Vergleich der Hemmung der $^3\text{H-P1075}$ -Bindung durch Oleoyl-CoA an SUR2A, bzw. SUR2A/ $K_{IR}6.2$
 (Gemittelte Parameter aus jeweils $n=3$ Einzelversuchen)

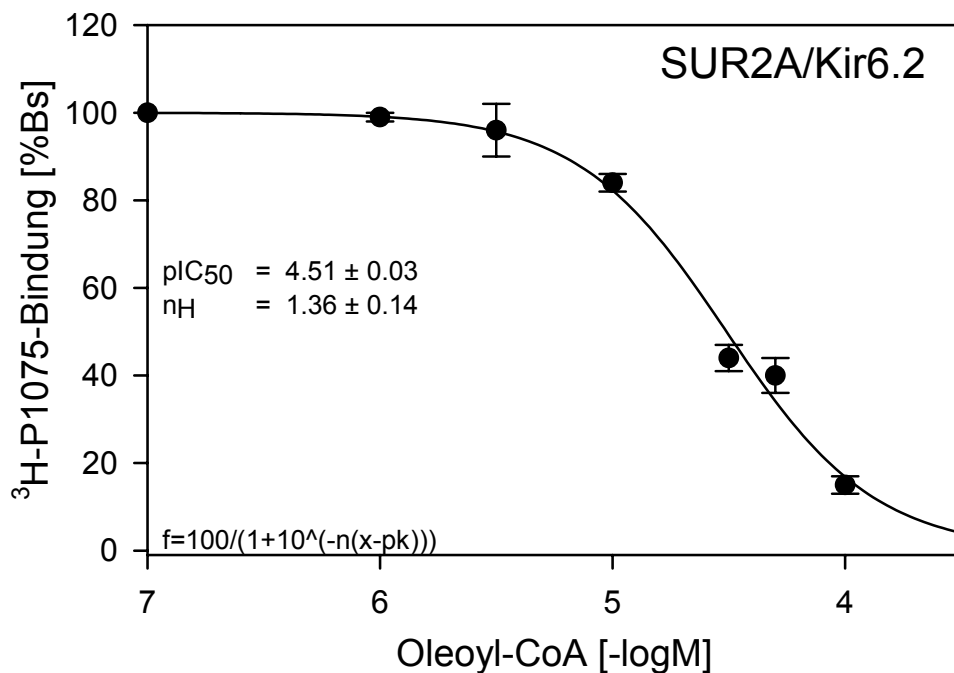


Abbildung 33: Effekt von Oleoyl-CoA auf die ³H-P1075-Bindung an SUR2A/K_{IR}6.2
Mittelwerte ± SEM aus n=3 Einzelerperimenten (gepoolte Hemmkurve).
[³H-P1075]=2.40±0.05 nM, B_S=32±1 fmol/mg (=100%), B_{TOT}=46±2 fmol/mg,
NSB=30±1% B_{TOT}, pIC₅₀=4.51±0.03, n=1.36±0.14
Proteinkonzentration (PK)=0.23±0.01 mg/ml; Inkubationszeit 13 min

des SUR2A mit K_{IR}6.2 verschiebt sich also die Bindungskurve nach rechts, hin zu höheren Lipidkonzentrationen und einer niedrigeren Affinität des SUR2A für Oleoyl-CoA.

3.5 Modulation der ³H-GBC-Bindung an SUR2A(Y1206S) in Membranen

3.5.1 Aktivierung der ³H-GBC-Bindung an SUR2A(Y1206S) durch Oleoyl-CoA

Aus Untersuchungen zum Effekt von Oleoyl-CoA auf die ³H-GBC-Bindung an SUR2A(Y1206S) in Membranen wurde für die Bindungskurve in Anwesenheit von MgATP eine stimulatorische Komponente mit einem EC₅₀-Wert von 0.003 µM bei einer Amplitude von 52% (bei 0.3 µM Oleoyl-CoA) gefunden, gefolgt von einer inhibitorischen Komponente mit einem IC₅₀-Wert von 42 µM, jeweils bei einem fixen Hill-Koeffizienten von n_H=1 (Klein, Dissertation, 2004).

3. Ergebnisse

Da für die Lipidwirkung an der Untereinheit $K_{IR}6.2$ des K_{ATP} eine Aktivierung mit Zunahme der Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle gesichert ist (z.B. Liu et al., 2001a), wollten wir die Aktivierung der Bindung von GBC an SUR2A(Y1206S) durch Oleoyl-CoA genauer untersuchen, vor allem im Hinblick auf den Einfluß von MgATP.

Leider konnten wir bereits in den vorbereitenden Messungen (Tab. 18, Abb. 34) eine vergleichbare Aktivierung der ^3H -GBC-Bindung um die beschriebenen 52% nicht reproduzieren, da die gemessenen Wertetriplets untereinander eine große Streuung aufwiesen. Unter Berücksichtigung offensichtlicher Meßfehler als „Ausreißer“ sahen wir in $n=2$ Experimenten eine Stimulierung der Bindung um 17% bei einer Oleoyl-CoA-Konzentration von $0.1 \mu\text{M}$, was jedoch aufgrund der niedrigen Versuchsanzahl als nicht signifikant eingestuft werden muß. Desweiteren ergab sich aus $n=7$ Messungen eine Aktivierung der Ligandbindung um 3% bei $1 \mu\text{M}$ Oleoyl-CoA, im gepaarten t-Test fand sich jedoch keine statistische Signifikanz ($p=0.488$). Betrachtet man allerdings die beiden in der Tabelle mit (*) markierten

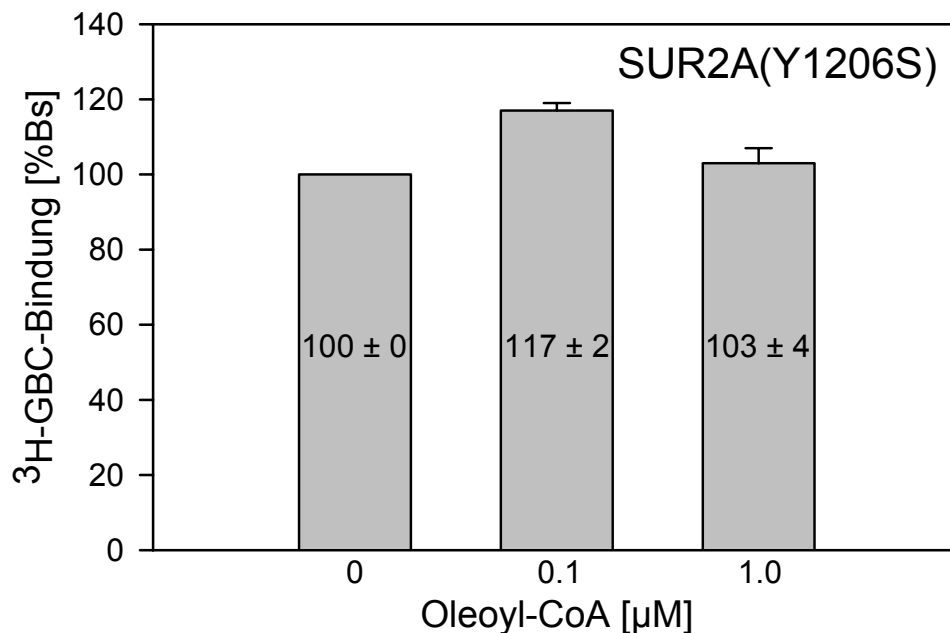


Abbildung 34:
Stimulierung der ^3H -GBC-Bindung an SUR2A(Y1206S) durch Oleoyl-CoA;
 1 mM Mg^{2+} , 0.3 mM ATP
Mittelwerte \pm SEM aus $n=2$ ($0.1 \mu\text{M}$ Oleoyl-CoA), bzw. 7 ($1 \mu\text{M}$ Oleoyl-CoA)
Experimenten
 $[^3\text{H-GBC}] = 1.9 \pm 0.1 \text{ nM}$, $B_s=954\pm55 \text{ dpm}$, $B_{\text{tot}}=1697\pm56 \text{ dpm}$, $\text{NSB}=44\pm3\% B_{\text{tot}}$

3. Ergebnisse

Werte als "Ausreißer", so ergibt sich eine signifikante Aktivierung um 9% ($109\pm 2\%$; gepaarter t-Test: $p=0.008$).

#	0 μM Oleoyl-CoA			0.1 μM Oleoyl-CoA			1 μM Oleoyl-CoA		
	Bs (spezifische Bindung)			Bs (spezifische Bindung)			Bs (spezifische Bindung)		
	dpm	SEM	%	dpm	SEM	%	dpm	SEM	%
1	900	144	100	1032	137	115	1007	129	112
2	839	55	100	997	120	119	864	221	103
3	958	38	100				1051	32	110
4	819	31	100				871	47	106
5	1040	28	100				1108	49	107
6	747	192	100				648	62	87*
7	638	93	100				594	74	93*
Σ	100 \pm 0			117 \pm 2			103 \pm 4		

Tabelle 18:

Stimulierung der ^3H -GBC-Bindung an SUR2A(Y1206S) durch 0.1 und 1.0 μM Oleoyl-CoA; 1 mM Mg^{2+} , 0.3 mM ATP, $[^3\text{H}\text{-GBC}] = 1.9\pm 0.1$ nM

Darstellung der spezifischen Bindung Bs mit mittlerem Standardfehler SEM, Angabe der Stimulierung der Bindung durch Oleoyl-CoA in % Bs, siehe auch Abbildung 34

Eine mögliche Erklärung für die von Klein beschriebenen Effekte könnte in einer Fehlinterpretation der Meßwerte liegen:

In einem von uns durchgeführten Probeversuch (s. Tab. 19) ergab sich aus den Kontrollwerten für die Gesamtbindung ohne Oleoyl-CoA ein deutlicher zeitabhängiger Bindungsverlust von 38% während 30 min, der jedoch nicht bei der Gesamtbindung in Anwesenheit von 0.3 μM Oleoyl-CoA feststellbar war. Dieser Lipid-schutzeffekt vor Bindungsverlust konnte bereits an SUR1 klar gezeigt werden (vgl. Anhang 3.6). Bleibt nun der Rundown der Bindung bei der Datenauswertung unberücksichtigt, so ergibt sich zwangsweise eine erhöhte Bindung durch Verhinderung desselben in Anwesenheit von Oleoyl-CoA.

3. Ergebnisse

Zeit t [min]	Oleoyl-CoA [μ M]	Bs [dpm]	Bs [%]
0	0	1840	100
3	0.3	1602	87
9	0	1625	100
12	0.3	1530	94
18	0	1347	100
21	0.3	1427	106
27	0	1149	100
30	0.3	1662	145

Tabelle 19:
Zeitverlauf der ^3H -GBC-Bindung an SUR2A(Y1206S) mit 0.3 μM und ohne Oleoyl-CoA (Probeversuch)
[^3H -GBC] = 1.5 nM

Zur abschließenden Klärung dieser Beobachtung müßten weitere Bindungsstudien zum Rundown an SUR2A(Y1206S) in Membranen durchgeführt werden, die jedoch erhebliche Schwierigkeiten durch dessen inkonstantes Auftreten bereiten würden.

3.6 Anhang: Einfluß von 15 μM Oleoyl-CoA auf den Zeitverlauf der ^3H -GBC-Bindung an SUR1 in Membranen

Nach Auswertung der Versuche zur homologen Konkurrenz von GBC bei 15 μM Oleoyl-CoA und in Abwesenheit von MgATP fiel bei den mehrfach im Verlauf der Versuche bestimmten Kontrollwerten ohne Oleoyl-CoA für die Gesamtbindung B_{tot} eine annähernd lineare Abnahme der Werte mit der Zeit auf. Erstaunlich war, daß diese Abnahme nur für die Bindung in Abwesenheit des Lipides auftrat und daß die Gesamtbindung in Anwesenheit von Oleoyl-CoA einen deutlich geringeren, bzw. kaum sichtbaren Bindungsverlust erkennen ließ.

3. Ergebnisse

Diese Beobachtung führte uns zur Hypothese, daß Oleoyl-CoA einen Schutzeffekt auf die Ligandbindung von ^3H -GBC ausüben und ähnlich der von unterschiedlichen Arbeitsgruppen (z.B. Liu et al., 2001a) an $\text{K}_{\text{IR}}6.2$ beobachteten Hemmung des Kanalrundowns durch negativ geladene Lipide (s. u.) ein solcher Effekt auch durch deren Interaktion am SUR zustande kommen könnte.

Aus der Literatur ist bekannt, daß negativ geladene Lipide wie PIP_2 oder Oleoyl-CoA die K_{ATP} -Kanäle aktivieren können. Krauter et al., 2001 zeigten, daß die Hemmung der Untereinheit $\text{K}_{\text{IR}}6.2$ durch ATP unter Applikation von PIP_2 abgeschwächt wird. Liu et al., 2001a demonstrierten am $\text{K}_{\text{IR}}6.2$ des Meerschweinchen-Herzens eine durch submikromolare Konzentrationen an Oleoyl-CoA induzierte Hemmung des Kanal-Rundowns, was in einer erhöhten Offenwahrscheinlichkeit des Kanals resultierte.

Die von uns postulierte Stabilisierung der GBC-Bindung an SUR1 durch Oleoyl-CoA untersuchten wir nun eingehender:

Über einen Zeitraum von bis zu 100 min nach Inkubation des ersten Bindungsansatzes (jeweils 25 Minuten Inkubation pro Ansatz), wurden die Werte für die Gesamtbindung B_{tot} und die nichtspezifische Bindung NSB in regelmäßigen Zeitabständen bestimmt, wobei parallel die Bindungsverhältnisse mit 15 μM Oleoyl-CoA, bzw. ohne das Lipid gemessen wurden, jeweils in Anwesenheit von 1 mM Mg^{2+} , um den von diesem Ion abhängigen Rundown (Barrett-Jolley et al., 1996) zu verstärken.

Leider konnte nur in zwei Versuchen ein signifikanter Abfall der Bindung um mehr als 20% nach der Dauer von einer Stunde beobachtet werden, wobei sich die spezifische Bindung in Abwesenheit des Lipides von $100\pm 0\%$ auf $69\pm 8\%$ nach 63 min erniedrigte (Abb. 35). Unter 15 μM Oleoyl-CoA fiel der Verlust der spezifischen Bindung signifikant geringer aus, nach 66 min waren noch $95\pm 11\%$ des Anfangswertes für die spezifische Bindung meßbar (Abb. 35). Die nichtspezifische Bindung (NSB) blieb jeweils über die Zeit konstant bei etwa 10% des B_{tot} -Wertes. In weiteren vier Experimenten gelang trotz identischer Versuchsbedingungen die Reproduktion eines ausgeprägten Rundowns nicht mehr, es zeigte sich ein

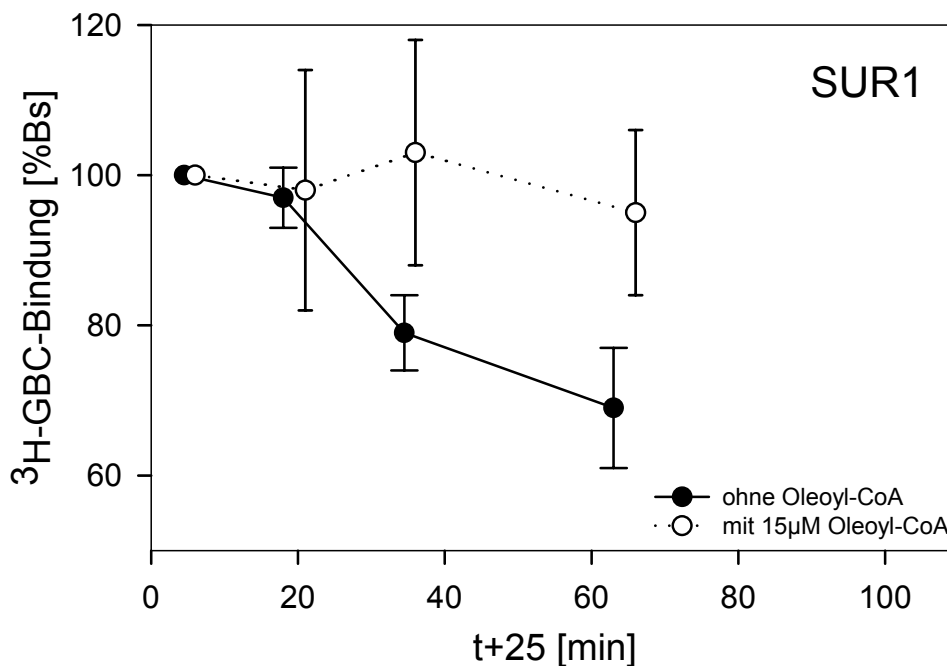


Abbildung 35:

Zeitabhängigkeit des Bindungsverlustes für $^3\text{H-GBC}$ an SUR1 in An- und Abwesenheit von $15 \mu\text{M}$ Oleoyl-CoA; 1 mM Mg^{2+}

Rundown $\geq 20\%$ nach 60 min

Mittelwerte \pm SEM aus $n=2$ (Oleoyl-CoA) und $n=3$ (Kontrolle) Einzelerperimenten.
 $[^3\text{H-GBC}] = 1.00 \pm 0.03 \text{ nM}$, $B_s = 927 \pm 63 \text{ fmol/mg}$ (=100%), $B_{\text{TOT}} = 1002 \pm 69 \text{ fmol/mg}$,
 $\text{NSB} = 7.0 \pm 0.3\% B_{\text{TOT}}$, Proteinkonzentration (PK) = $0.063 \pm 0.008 \text{ mg/ml}$; Inkubationszeit 25 min

Bindungsverlust von maximal 20% nach einer Dauer von 96 min für die Ansätze ohne Oleoyl-CoA (s. Abb. 36).

Eine mögliche Erklärung für die nicht reproduzierbare Bindungsabschwächung könnte in einem je nach Membranpräparation unterschiedlichen Gehalt an zelleigenen Phosphatasen begründet liegen, welche bei Vorhandensein das Rezeptorprotein dephosphorylieren und somit die Radioligandbindung inaktivieren.

Die Anwesenheit von $15 \mu\text{M}$ Oleoyl-CoA konnte hier einen anfänglichen Bindungsverlust auf $81 \pm 5\%$ der spezifischen Bindung nicht verhindern, allenfalls nach 40 min war eine Stabilisierung der Bindung im Sinne der Verhinderung eines

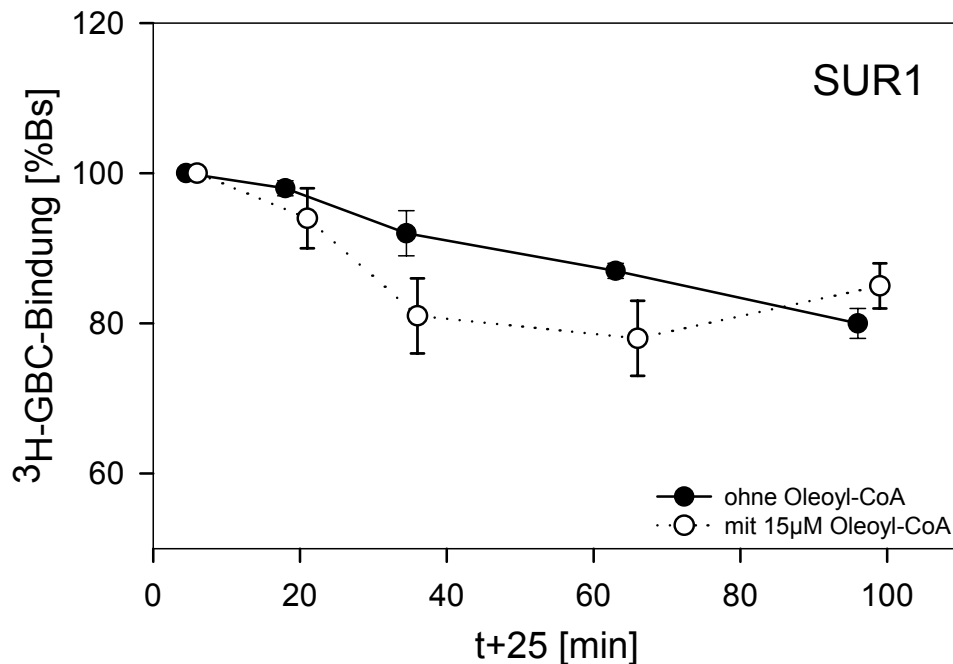


Abbildung 36:

**Zeitabhängigkeit des Bindungsverlustes für $^3\text{H-GBC}$ an SUR1 in An- und Abwesenheit von $15 \mu\text{M}$ Oleoyl-CoA;
 1 mM Mg^{2+}**

Rundown < 20% nach 60 min

Mittelwerte \pm SEM aus n=4 Einzelexperimenten.

$[^3\text{H-GBC}] = 0.80 \pm 0.04 \text{ nM}$, $B_S = 767 \pm 26 \text{ fmol/mg}$ (=100%), $B_{\text{TOT}} = 816 \pm 22 \text{ fmol/mg}$,

$\text{NSB} = 6 \pm 1 \% B_{\text{TOT}}$, Proteinkonzentration (PK) = $0.076 \pm 0.017 \text{ mg/ml}$;

Inkubationszeit 25 min

weiteren Rundowns auszumachen, so daß sich die Kurve bei etwa 80% der anfänglichen Bindung einem Plateau annäherte (s. Abb. 36).

Diese Beobachtungen legen nahe, daß bei Vorhandensein eines relevanten Rundowns Oleoyl-CoA in mikromolaren Konzentrationen einen Schutz vor Bindungsverlust für $^3\text{H-GBC}$ an SUR1 bietet. Daher ist es naheliegend, daß beim Fehlen eines relevanten Rundowns auch der Lipidschutzeffekt abgeschwächt ist. Desweiteren ist die Konzentrationsabhängigkeit des Lipideffektes von Interesse: Da die Hemmung des Rundowns an $K_{\text{IR}6.2}$ bei physiologischen Konzentrationen an Oleoyl-CoA beobachtet wurde, untersuchten wir probeweise in n=1 Experiment die Bindung bei einer Lipidkonzentration von $1 \mu\text{M}$. Hierbei zeigte sich selbst bei ausgeprägtem Bindungsverlust ohne Lipidschutz jedoch keine Hemmung des

3. Ergebnisse

Rundowns durch 1 μM Oleoyl-CoA, weshalb weitere Versuche in diesem Konzentrationsbereich nicht durchgeführt wurden.

Weitergehende Untersuchungen müssen folgen, um den bei starkem Rundown beobachteten stabilisierenden Effekt von Oleoyl-CoA genauer zu beschreiben, vor allem im Hinblick auf physiologischere Konzentrationen des Lipides. Da ein Rundown nicht regelmäßig auftrat und daher selten reproduzierbar war, konnte diese Frage nicht abschließend geklärt werden.

4 Diskussion

4.1 Fragestellung

In jüngster Vergangenheit hat man zunehmend erkannt, daß Membranphospholipide wie PIP_2 oder langkettige Acyl-CoA-Ester wie Oleoyl-CoA als endogene Modulatoren von K_{ATP} -Kanälen wirken. PIP_2 und Oleoyl-CoA vermindern in physiologischen Konzentrationen die Empfindlichkeit der Kanäle gegenüber inhibitorischen Nukleotiden wie ATP und ermöglichen somit deren Aktivierung (Liu et al., 2001a). Ebenfalls konnten die Lipide die Effekte von Glibenclamid oder den Öffnern am Kanal abschwächen (Krauter et al., 2001).

Die Modulation der ATP-Hemmung durch Oleoyl-CoA wurde an $\text{K}_{\text{IR}}6.2$ -enthaltenen Kanälen bereits eingehend untersucht. Hierbei zeigte sich eine Aktivierung der durch ATP geschlossenen Kanäle in Inselzellen des Pankreas ($\text{SUR1}/\text{K}_{\text{IR}}6.2$) und im Herzmuskel ($\text{SUR2A}/\text{K}_{\text{IR}}6.2$) (Larsson et al., 1996; Liu et al., 2001a). Aufgrund von physiologischen Schwankungen der intrazellulären Lipidkonzentration wird die ATP-Sensitivität der Kanäle dem jeweiligen metabolischen Zustand der Zelle angepaßt. Die inhibitorische Wirkung des ATP auf K_{ATP} -Kanäle wird durch die Bindung des Nukleotids an die $\text{K}_{\text{IR}}6.2$ -Untereinheit vermittelt (Tucker et al., 1997). Die $\text{K}_{\text{IR}}6.2$ -Untereinheit wurde ebenfalls als Lipidbindungsstelle identifiziert (MacGregor et al., 2002), und weitere Untersuchungen zeigten, daß die Bindungsstellen für ATP und die Lipide direkt nebeneinander liegen (Enkvetchakul und Nichols, 2003). Auf der Ebene der Wirkung wird ein antagonistischer Mechanismus erkennbar: Eine Zunahme der Lipidkonzentration verschiebt die ATP-Hemmkurve nach rechts, ohne ihr Maximum zu verändern (Baukrowitz et al., 1998). Desweiteren konnte gezeigt werden, daß neben der $\text{K}_{\text{IR}}6.2$ -Bindungsstelle auch die SUR-Untereinheit für die Effizienz der Lipidbindung von Bedeutung ist (Liu et al., 2001a).

Die Wirkung der K_{ATP} -Kanalmodulatoren (Glibenclamid und Öffner wie P1075, etc.) wird durch Lipide abgeschwächt oder aufgehoben (Koster et al., 1999; Liu et al., 2001a; Krauter et al., 2001). Dabei gehorcht die Interaktion von Modulatoren mit dem Phospholipid PIP_2 einem allosterischen Mechanismus, nach dem PIP_2 -

modifizierte Kanäle refraktär gegenüber der durch Glibenclamid erzeugten Konformationsänderung sind (Krauter et al., 2001). Ein ähnlicher Mechanismus wurde für die Aufhebung der Öffnerwirkung angenommen (Koster et al., 1999).

Die zitierten Untersuchungen zeigen, daß die Lipide am $K_{IR}6.2$ ansetzen. Es wurde jedoch noch nicht untersucht, ob sie auch über eine direkte Wechselwirkung am SUR die Bindung der klassischen Kanalmodulatoren GBC und P1075 beeinflussen können.

Erste orientierende Untersuchungen erbrachten den Nachweis einer direkten Bindung der Lipide an den SUR, wobei die ^3H -P1075- und ^3H -GBC-Bindung inhibiert wurde (Klein, Dissertation, 2004). Als das am stärksten wirksame Lipid erwies sich der Acyl-CoA-Ester Oleoyl-CoA vor DOGS-NTA und PIP_2 . Die Empfindlichkeit der SUR-Subtypen folgte in der Reihenfolge $\text{SUR2B} > \text{SUR2A} > \text{SUR1}$. Desweiteren konnte in zwei Fällen, nämlich für die Oleoyl-CoA-Modulation der ^3H -GBC-Bindung an SUR2A(Y1206S), sowie für die DOGS-NTA-Modulation der ^3H -P1075-Bindung an SUR2A eine signifikante Aktivierung der Ligandbindung bei physiologischen Lipidkonzentrationen beobachtet werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Effekte des wirksamsten Lipides, Oleoyl-CoA, weitergehend zu charakterisieren, vor allem hinsichtlich des Wirkmechanismus am Rezeptor, des Einflusses des Nukleotides MgATP auf die Bindung und einer Stimulation der Radioligandbindung bei geringen (physiologischen) Lipidkonzentrationen (s. Fragestellung 1.9).

4.2 Tabellarische Übersicht der Ergebnisse

Rezeptor	Radio- ligand	MgATP [mM]	PDK [µg/ml]	Inhibition IC ₅₀ [µM]	n _H	Bemerkungen
SUR1	³ H-GBC	-	-	6.0 [3.6;10.0]	1.1±0.2	
		0.3	-	15 [12;17]	2.1±0.3	
		-	0-100	*	3.5±1.2	Stimulationsamplitude 26%
		-	3	8.9 [8.1;9.8]	3.0±0.9	Erspricht Hemmkurve ohne PDK
		-	100	7.8 [6.5;9.3]	2.1±0.2	Kontrollversuch ohne PDK IC ₅₀ = 8.1 µM !!
SUR2A	³ H-P1075	0.3	-	17 [15;21]	1.51±0.13	
SUR2A/ K _{IR} 6.2	³ H-P1075	0.3	-	30 [27;32]	1.38±0.11	
SUR2A (Y1206S)	³ H-GBC	0.3	-	geringer und variabler, statistisch unsicherer Effekt der Stimulation der Ligandbindung (s.3.5)		

Übersichtstabelle 1:

Inhibition der Ligandbindung am SUR durch Oleoyl-CoA

PDK = Poly-D-Lysin

Inhibitionsamplitude immer 100%

* Stimulation der ³H-GBC-Bindung an SUR1 um 26% mit EC₅₀ = 7.40±0.05 µg/ml

4. Diskussion

Rezeptor	Radio- ligand	Oleoyl-CoA [μ M]	MgATP [mM]	Inhibition K_D [nM]	Reduktion Kurven- amplitude	n_H	Bemerkungen
SUR1	3 H-GBC	-	-	0.37 [0.30;0.47]	-	1.2 \pm 0.1	im Sättigungsexperiment $K_D = 0.4$ nM (s. 3.1.4)
		15	-	2.6 [2.0;3.5]	70	1.0 \pm 0	im Sättigungsexperiment $K_D = 1.7$ nM (bei 10 μ M Oleoyl-CoA)
		-	0.3	2.2 [1.7;2.9]	-	1.0 \pm 0	
		25	0.3	5.6 [5.4;5.9]	70	1.1 \pm 0.1	
		-	1	15 [13;17]	-	1.03 \pm 0.05	
SUR2A	3 H-P1075	30	0.3 *	50 [48;53]	70	0.90 \pm 0.03	* Reduktion der ATP-Konzentration aufgrund des Auftretens eines Niederschlags bei 1 mM

Übersichtstabelle 2:
Auswirkung von Oleoyl-CoA auf die homologe Verdrängung der Ligandbindung am SUR

4.3 Die Wechselwirkung von Oleoyl-CoA mit SUR

In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß neben anderen amphiphilen Lipidverbindungen wie PIP₂ und DOGS-NTA auch der Acyl-CoA-Ester Oleoyl-CoA in der Lage ist, die Bindung des Standard-Kanalblockers GBC und des Standard-Kanalöffners P1075 an den SUR-Subtypen SUR2A, SUR2A(Y1206S) und SUR1 zu modulieren. Dabei beruhte der Haupteffekt der Oleoyl-CoA-Modulation auf einer Inhibition der Ligandbindung an den meisten Rezeptorsubtypen. Eine geringgradige Stimulation der GBC-Bindung konnte an SUR2A(Y1206S) bei submikromolaren Konzentrationen an Oleoyl-CoA nachgewiesen werden.

Die folgenden drei Beobachtungen legen nahe, daß dies nicht auf eine Artefaktbildung im Sinne einer Proteindenaturierung durch hohe Konzentrationen an amphiphilen Verbindungen zurückzuführen ist, sondern eine spezifische Interaktion des Lipides mit dem SUR widerspiegelt.

a) Reversibilität der Bindung und Kompetitivität mit ³H-GBC an SUR1

Beim Vergleich der homologen Kompetition von ³H-GBC mit GBC an SUR1 ohne und mit Oleoyl-CoA sowie in Abwesenheit von MgATP (vgl. 3.1.3, Tab. 3) zeigte sich, daß Oleoyl-CoA eine etwa 6.5-fache Affinitätsabnahme für die Bindung von GBC hervorrief, die Bindungskurve wurde nach rechts verschoben (vgl. Abb. 3). Anhand des Massenwirkungsgesetzes wurde gezeigt, daß die Interaktion zwischen Lipid und ³H-GBC einem überwiegend kompetitiven Mechanismus folgt. Somit konnte auch errechnet werden, daß Oleoyl-CoA mit einer Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_O von ~3 µM an SUR1 bindet (vgl. 3.1.3).

Diese Ergebnisse wurden durch weitere Versuche bestätigt. So zeigte sich in Sättigungsexperimenten, daß mit steigender Konzentration des Radioliganden die Hemmung der ³H-GBC-Bindung durch Oleoyl-CoA beinahe vollständig aufgehoben werden konnte. Der Lipideffekt auf die GBC-Bindung ist also voll reversibel und im wesentlichen von kompetitivem Charakter.

Für den Lipideffekt auf die Bindung von GBC an SUR1 in Anwesenheit von MgATP ergaben sich analoge Beobachtungen. Hier kam es jedoch zu einer geringeren Rechtsverschiebung der Bindungskurve (Faktor 2.5) durch Oleoyl-

CoA, und ein kompetitiver Inhibitionsmechanismus konnte nur teilweise gezeigt werden (vgl. Abb. 10, 3.2.3). Es ist anzunehmen, daß zur Inhibition weitere, nicht-kompetitive Mechanismen beitragen.

b) Kompetitivität mit der ^3H -P1075-Bindung an SUR2A

Analog zu den Bindungsverhältnissen an SUR1 stellte sich der Einfluß des Lipids Oleoyl-CoA auf die ^3H -P1075-Bindung an SUR2A in Anwesenheit von MgATP dar. Dabei konnte Oleoyl-CoA die Bindungskurve um den Faktor 3.3 nach rechts verschieben, entsprechend einem Affinitätsverlust des Liganden P1075 (s. 3.4.3, Abb. 18). Also ist die Hemmung vereinbar mit einer Competition zwischen Oleoyl-CoA und ^3H -P1075, und für die Bindung von Oleoyl-CoA an SUR2A kann ein K_{O} -Wert von $\sim 14 \mu\text{M}$ berechnet werden.

c) Einfluß des Nukleotides MgATP und der Koexpression

Für die Bindung von ^3H -GBC an SUR1 in Anwesenheit von MgATP ergab sich in sämtlichen Untersuchungen eine Abnahme der Affinität von Oleoyl-CoA gegenüber dem Rezeptor, wobei die Werte für K_{D} , bzw. IC_{50} auf etwa das Doppelte (im Vergleich zur Abwesenheit von MgATP) anstiegen (vgl. 3.2.3). Dies steht im Einklang mit der Beobachtung, daß durch Bindung von MgATP oder MgADP an die NBF die GBC-Bindungsstelle modifiziert wird, was sich in einer allosterischen Hemmung der Ligandbindung äußert (negativer allosterischer Effekt) (Ueda et al., 1999a; Hambrock et al., 2002a).

Die Untersuchungen zum Effekt der Koexpression von SUR2A mit $K_{\text{IR}}6.2$ sollten klären, ob hierdurch ein Affinitätszugewinn für Oleoyl-CoA resultiert und auch Lipidkonzentrationen im submikromolaren Bereich, deren Wirkung typischerweise über die $K_{\text{IR}}6.2$ -Untereinheit vermittelt wird (Liu et al., 2001a), in Interaktion mit dem Rezeptor treten können. Allerdings zeigte sich nach der Koexpression mit $K_{\text{IR}}6.2$ eine Erhöhung des Wertes für die IC_{50} um den Faktor 1.8 und damit eine Abnahme der Affinität von Oleoyl-CoA an SUR2A (vgl. 3.4.4, Tab. 15).

Die Anwesenheit von MgATP und die Koexpression mit $K_{\text{IR}}6.2$ vermindern also die Affinität von Oleoyl-CoA am SUR, was zusammen mit der Reversibilität der Effekte deutlich als eine spezifische Interaktion betrachtet werden kann.

4.4 Wechselwirkung zwischen Lipid und Ligand

Zwei grundlegende Wirkmechanismen der Interaktion zwischen Lipid und Ligand sind denkbar:

Entweder liegt eine Konkurrenz zwischen Oleoyl-CoA und den Radioliganden um ein und dieselbe Bindungsstelle der SUR vor, oder es erfolgt eine Bindung an unterschiedliche Bindungsstellen, die durch starke negative allosterische Wechselwirkungen miteinander verbunden sind. Hierbei scheint für die Bindung ein besonderes molekularstrukturelles Muster von entscheidender Bedeutung zu sein: So bestehen alle in Frage kommenden Lipide, einschließlich Oleoyl-CoA, aus einer stark negativ geladenen Kopfgruppe und einem langen hydrophoben Fettsäurerest. In jedem Fall konnte als ein wesentliches Ergebnis der Bindungsstudien eine auch bei fortwährender Anwesenheit von Oleoyl-CoA vollständig reversible Inhibition herausgestellt werden, was auf eine spezifische Interaktion des Oleoyl-CoA mit den SUR schließen läßt. Dafür spricht auch der Umstand, daß MgATP und die Koexpression mit $K_{IR}6.2$ die Hemmkurve in Richtung höherer Konzentrationen an Lipid verschoben.

Die Bindungsstellen der Lipide am SUR werden allerdings noch Gegenstand weiterführender Studien sein.

Der SUR wird aufgrund seiner Struktur zu der Klasse der ABC-Proteine gerechnet. ABC Proteine spielen eine wichtige Rolle beim Transport von Lipiden, einschließlich Phospholipiden und langkettigen Fettsäuren, jedoch bleiben bis heute die Lipid-Bindungsstellen schwer faßbar (Borst und Elferink, 2002; Higgins & Linton, 2004). Bei der Betrachtung des multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2, ABCC2), welches den SUR strukturell ähnlich und dessen Hauptaufgabe im Transport von Östradiolglucuronid besteht, wurde beobachtet, daß viele negativ geladene Verbindungen (einschließlich GBC) bei mikromolaren Konzentrationen Transportvorgänge beeinflussen (Zelcer et al., 2003).

4.5 Effekt von Poly-D-Lysin auf die durch Oleoyl-CoA vermittelte Hemmung der Ligandbindung

Polykationische Stoffe wie Neomycin, Spermin oder Poly-Lysin können die Wirkung von Phospholipiden wie PIP_2 auf die ATP-Inhibition am $\text{K}_{\text{IR}}6.2$ aufheben, und die Kanäle werden wieder für ATP empfindlich (vgl. 1.8.1). Auf molekularer Ebene wird eine direkte elektrostatische Interaktion zwischen anionischem Lipid und Polykation angenommen (MacGregor et al., 2002; Krauter et al., 2001; Fan und Makielski, 1997). Im Gegensatz hierzu konnte die verminderte Empfindlichkeit lipidmodifizierter Kanäle gegenüber Sulfonylharnstoffen und Kanalöffnern durch die Anwendung von Poly-Lysin nicht wiederhergestellt werden (Koster et al., 1999; Krauter et al., 2001).

Es sollte nun hier mittels Bindungsexperimenten geklärt werden, ob die oben genannten, am $\text{K}_{\text{IR}}6.2$ durchgeführten Untersuchungen auf die Rezeptorebene übertragbar sind, vor allem bezüglich einer Antagonisierung der Lipidhemmung der GBC-Bindung an SUR1.

Für Poly-D-Lysin konnte eine Stimulation der ^3H -GBC-Bindung an SUR1 nachgewiesen werden, die jedoch mit 30% zu gering ausfiel, um weitere Untersuchungen folgen zu lassen. Darüberhinaus war Poly-D-Lysin nicht in der Lage, die durch Oleoyl-CoA verursachte Hemmung der Radioligandbindung an SUR1 aufzuheben oder umzukehren, was im Einklang mit den Beobachtungen am $\text{K}_{\text{IR}}6.2$ (s.o.) steht.

4.6 Physiologische Relevanz der Effekte von Oleoyl-CoA am SUR

Ein wesentliches Ergebnis der Untersuchungen liegt in der Herausarbeitung des für die Wirkung von Oleoyl-CoA (entsprechend auch von PIP_2 und DOGS-NTA) auf die Ligandbindung am SUR erforderlichen Konzentrationsbereiches des Lipides: Es wurden für Effekte an den SUR-Subtypen im Vergleich zu denen am $\text{K}_{\text{IR}}6.2$ um etwa den Faktor 100 höhere Konzentrationen benötigt. Betrachtet man die Interaktion von Oleoyl-CoA mit $\text{K}_{\text{IR}}6.2$, so sind Konzentrationen von 100 bis 200 nM völlig ausreichend, um einen Rundown der K_{ATP} -Kanalaktivität in inside-

out-patches bei β -Zellen der Maus (Larsson et al., 1996) und Meerschweinchen-Kardiomyozyten (Liu et al., 2001a) zu verhindern. Konzentrationen von 1 bis 10 μM können den durch ATP geschlossenen Kanal wieder vollständig öffnen und den durch GBC verursachten Kanalblock aufheben (Bränström et al., 1998; Liu et al., 2001a; Rohács et al., 2003; Schulze et al., 2003a). Im Gegensatz hierzu reichten die IC_{50} -Werte für Oleoyl-CoA bei der Hemmung der Ligandbindung an den SUR-Subtypen von 6 bis 44 μM . Im Herzen finden sich Konzentrationen an Acyl-CoA-Estern im oberen mikromolaren Bereich, jedoch sind die Ester beinahe ausschließlich in den Mitochondrien lokalisiert (van der Vusse et al., 1992), wobei das Zytosol die für die genannten Wirkungen am $\text{K}_{\text{IR}}6.2$ geringeren Konzentrationen an Lipiden aufweist.

Daher sind die an den SUR-Subtypen beschriebenen Wirkungen des Acyl-CoA-Esters Oleoyl-CoA wohl kaum von physiologischer Bedeutung. Die Interaktion von Oleoyl-CoA mit den SUR-Subtypen sollte jedoch bei hohen Lipidkonzentrationen ($\geq 10 \mu\text{M}$) in Betracht gezogen werden. In diesem Fall wird das Ausbleiben der Kanalantwort gegenüber Sulfonylharnstoffen und Öffnern durch die Wechselwirkungen des Lipides sowohl mit dem SUR als auch $\text{K}_{\text{IR}}6.2$ verursacht.

4.7 Stimulation der Bindung durch Oleoyl-CoA

Bei Konzentrationen von Oleoyl-CoA, die etwa 10 mal niedriger lagen als jene für die Inhibition der Ligandbindung benötigten, zeigte sich eine geringe Stimulation der ^3H -GBC-Bindung an der Mutante SUR2A(Y1206S) um maximal 9%. Durch Untersuchungen von Klein (Dissertation, 2004) wurden desweiteren stimulatorische Effekte auf die ^3H -P1075-Bindung an SUR2A für die Lipide PIP_2 und DOGS-NTA nachgewiesen. Dabei zeigte sich die Stimulation ausschließlich an SUR2A-, nicht jedoch an SUR2B-Subtypen, was den carboxyterminalen 42 Aminosäuren wesentliche Bedeutung zukommen läßt. Die carboxyterminale Aminosäuresequenz des SUR2A unterscheidet sich grundlegend von jener des SUR2B, letztere ähnelt aber SUR1 (Isomoto et al., 1996). Bedauerlicherweise stellte sich der stimulatorische Effekt als zu gering und variabel heraus, so daß eine weitergehende Charakterisierung unmöglich war.

5 Zusammenfassung

ATP-abhängige Kaliumkanäle (K_{ATP} -Kanäle) sind schwache Einwärtsgleichrichter. Sie zählen zu den ligandgesteuerten Kanälen und werden durch intrazelluläres ATP geschlossen, wohingegen MgADP eine Kanalöffnung bewirkt. Somit dienen die Kanäle den Zellen als metabolische Sensoren, welche die Membranerregbarkeit an den Zellstoffwechsel koppeln. In den β -Zellen des Pankreas wird so die Insulinsekretion durch den Blutzuckerspiegel reguliert.

Pharmakologisch läßt sich die Kanalaktivität durch Kanalmodulatoren (z.B. Sulfonylharnstoffe) hemmen, bzw. steigern (z.B. P1075, Diazoxid und Minoxidil). K_{ATP} -Kanäle sind hetero-oktamere Proteinkomplexe, die sich aus der Assoziation von jeweils vier K^+ -Kanal-Untereinheiten ($K_{IR6.1}$ oder $K_{IR6.2}$) und vier Sulfonylharnstoffrezeptor-Untereinheiten (SUR1 oder SUR2) ergeben. ATP hemmt dabei die Kanalaktivität durch Bindung an die K_{IR6} -Untereinheit, während die anderen Kanalmodulatoren typischerweise an die SUR-Untereinheit binden.

Als wichtige physiologische Modulatoren der Kanäle wurden in den letzten Jahren das Phospholipid PIP_2 und langkettige Acyl-Coenzym A-Ester entdeckt. Sie erhöhen die Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle und vermindern deren Empfindlichkeit gegenüber ATP. Unter ihrem Einfluß wird auch eine verminderte Wirkung der Kanalmodulatoren Glibenclamid (GBC) und P1075 beobachtet. Die Bindungsstelle der Lipide ist bei physiologischen Konzentrationen die $K_{IR6.2}$ -Untereinheit, bei höheren Konzentrationen kommt auch eine Interaktion mit dem SUR zustande.

An den SUR-Subtypen hemmen Lipide im Konzentrationsbereich von 100-300 μM die Bindung von 3H -GBC und 3H -P1075, wobei Oleoyl-CoA am stärksten wirksam ist und die Radioligandbindung vollständig inhibiert.

Aufgrund dieser Beobachtungen sollte in der vorliegenden Arbeit die Wechselwirkung von Oleoyl-CoA am SUR näher charakterisiert werden, vor allem hinsichtlich des jeweiligen Hemmechanismus.

Hierzu wurden Radioligandbindungsstudien an rekombinanten SUR-Subtypen in HEK-Zellmembranen bei 37°C durchgeführt. Es wurde die 3H -P1075-Bindung an SUR2A und SUR2A/ $K_{IR6.2}$ (K_{ATP} -Kanal im Herz- und Skelettmuskel) und die 3H -

GBC-Bindung an SUR1 (K_{ATP} -Kanal in Pankreas und Neuronen) und die Mutante SUR2A(Y1206S) untersucht. Als Lipid wurde der langkettige Acyl-CoA-Ester Oleoyl-CoA eingesetzt.

Für die Interaktion von Oleoyl-CoA mit ^3H -GBC an SUR1 konnte ein überwiegend kompetitiver Inhibitionsmechanismus gezeigt werden mit einer Gleichgewichtsdissoziationskonstanten für Oleoyl-CoA (K_O) von $\sim 3 \mu\text{M}$. Prinzipiell Gleiches gilt für die Bindung von ^3H -P1075 an SUR2A, der K_O -Wert betrug hier $\sim 14 \mu\text{M}$. Die Anwesenheit von MgATP bei SUR1 und die Koexpression von SUR2A mit $K_{IR}6.2$ verschob die Hemmkurven in Richtung höherer Lipidkonzentrationen und schwächte somit den Hemmeffekt des Oleoyl-CoA. Die IC_{50} -Werte sämtlicher Oleoyl-CoA-Hemmkurven lagen in einem Bereich von 6 bis $44 \mu\text{M}$. Die Hemmung ließ sich durch steigende Konzentrationen des Radioliganden umkehren, was im Einklang mit einem kompetitiven Mechanismus steht.

Eine in früheren Untersuchungen beobachtete deutliche Stimulierung der Bindung von ^3H -GBC an die Mutante SUR2A(Y1206S) um etwa 50% bei geringen Konzentrationen (0.01 - $1 \mu\text{M}$) an Oleoyl-CoA konnte nicht bestätigt werden. Es zeigte sich nur ein stimulatorischer Effekt von maximal 9%, der jedoch zu variabel war, um weiter untersucht werden zu können.

Die Daten zeigen, daß Oleoyl-CoA nur bei relativ hohen Konzentrationen mit dem SUR interagiert und die Bindung von Glibenclamid und P1075 hemmt. Eine Aktivierung der Bindung von ^3H -GBC an SUR2A(Y1206S) bei geringen (physiologischen) Lipidkonzentrationen geht der Hemmung voraus, spielt jedoch hinsichtlich der Aktivierung des K_{ATP} -Kanals über $K_{IR}6.2$ eine untergeordnete Rolle.

Somit liegen die Lipidkonzentrationen für eine Interaktion von Oleoyl-CoA mit dem SUR um den Faktor 10-100 höher als die für Effekte am $K_{IR}6.2$ benötigten Konzentrationen. Die Bindung von Oleoyl-CoA an die verschiedenen SUR-Subtypen ist daher von geringer physiologischer Relevanz. Jedoch sollte bei Untersuchungen zur Wirkung von Sulfonylharnstoffen und Öffnern am K_{ATP} -Kanal in Anwesenheit von Lipiden wie Oleoyl-CoA deren Konzentration berücksichtigt werden, da hohe Lipidkonzentrationen (≥ 1 - $10 \mu\text{M}$) die Bindung von Kanalmodulatoren beeinflussen.

6 Literaturverzeichnis

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

Aguilar-Bryan L, Clement IV JP, Gonzalez G, Kunjilwar K, Babenko A und Bryan J (1998) Toward understanding the assembly and structure of K_{ATP} channels. *Physiol Rev* **78**:227-245.

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.

Alekseev AE, Brady PA und Terzic A (1998) Ligand-insensitive state of cardiac ATP-sensitive K^+ channels - *Basis for channel opening*. *J Gen Physiol* **111**:381-394.

Altschul SF und Lipman DJ (1990) Equal animals. *Nature* **348**:493-494.

Ämmälä C, Moorhouse A, Gribble F, Ashfield R, Proks P, Smith PA, Sakura H, Coles B, Ashcroft SJH und Ashcroft FM (1996a) Promiscuous coupling between the sulphonylurea receptor and inwardly rectifying potassium channels. *Nature* **379**:545-548.

Ämmälä C, Moorhouse A und Ashcroft F (1996b) The sulphonylurea receptor confers diazoxide sensitivity on the inwardly rectifying K^+ channel Kir6.1 expressed in human embryonic kidney cells. *J Physiol (Lond)* **494.3**:709-714.

Ashcroft SJ und Ashcroft FM (1992) The sulfonylurea receptor. *Biochim Biophys Acta* **1175**:45-59.

Ashcroft SJ und Ashcroft FM (1990a) Properties and functions of ATP-sensitive K-channels. *Cell Signal* **2**:197-214.

Ashcroft SJH (2000) The β -cell K_{ATP} channel. *J Membrane Biol* **176**:187-206.

Ashcroft SJH und Ashcroft FM (1990b) Properties and functions of ATP-sensitive K-channels. *Cell Signal* **2**:197-214.

Ashfield R, Gribble FM, Ashcroft SJH und Ashcroft FM (1999) Identification of the high-affinity tolbutamide site on the SUR1 subunit of the K_{ATP} channel. *Diabetes* **48**:1341-1347.

6. Literaturverzeichnis

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.

Babenko AP (2005) K_{ATP} channels "vingt ans apres": ATG to PDB to Mechanism. *J Mol Cell Cardiol* **39**:79-98.

Babenko AP, Aguilar-Bryan L und Bryan J (1998) A view of SUR/ $K_{IR6.X}$, K_{ATP} channels. *Annu Rev Physiol* **60**:667-687.

Barrett-Jolley R, Comtois A, Davies NW, Stanfield PR und Standen NB (1996) Effect of adenosine and intracellular GTP on K_{ATP} channels of mammalian skeletal muscle. *J Membrane Biol* **152**:111-116.

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, Herlitze S, Krauter T, Tucker SJ, Ruppersberg JP und Fakler B (1998) PIP_2 and PIP as determinants for ATP inhibition of K_{ATP} channels. *Science* **282**:1141-1144.

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.

Benndorf K, Bollmann G, Friedrich M und Hirche H (1992) Anoxia induces time-independent K^+ current through K_{ATP} channels in isolated heart cells of the guinea-pig. *J Physiol (Lond)* **454**:339-357.

Bethell HW, Vandenberg JI, Smith GA und Grace AA (1998) Changes in ventricular repolarization during acidosis and low-flow ischemia. *Am J Physiol* **275**:H551-H561.

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.

6. Literaturverzeichnis

Birincioglu M, Yang XM, Critz SD, Cohen MV und Downey JM (1999) S-T segment voltage during sequential coronary occlusions is an unreliable marker of preconditioning. *Am J Physiol* **277**:H2435-H2441.

Borst P und Elferink RO (2002) Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu Rev Biochem* **71**:537-592.

Bränström R, Corkey BE, Berggren P-O und Larsson O (1997) Evidence for a unique long chain acyl-CoA ester binding site on the ATP-regulated potassium channel in mouse pancreatic beta cells. *J Biol Chem* **272**:17390-17394.

Bränström R, Leibiger IB, Leibiger B, Corkey BE, Berggren P-O und Larsson O (1998) Long chain coenzyme A esters activate the pore-forming subunit (Kir6.2) of the ATP-regulated potassium channel. *J Biol Chem* **273**:31395-31400.

Bryan J, Crane A, Vila-Carriles WH, Babenko AP und Aguilar-Bryan L (2005) Insulin secretagogues, sulfonylurea receptors and K(ATP) channels. *Curr Pharm Des* **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.

Buchheit KH und Fozard JR (1999) K_{ATP} channel openers for the treatment of airways hyperre-activity. *Pulm Pharmacol Ther* **12**:103-105.

Butler A, Tsunoda S, McCobb DP, Wei A und Salkoff L (1993) mSlo, a complex mouse gene encoding "maxi" calcium-activated potassium channels. *Science* **261**:221-224.

Cavero I, Djellas Y und Guillon JM (1995) Ischemic myocardial cell protection conferred by the opening of ATP-sensitive potassium channels. *Cardiovasc Drugs Ther* **9**:245-255.

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, 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.

6. Literaturverzeichnis

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.

Cohen MV, Baines CP und Downey JM (2000) Ischemic preconditioning: From adenosine receptor to K_{ATP} channel. *Annu Rev Physiol* **62**:79-109.

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

Coppack SW, Lant AF, McIntosh CS und Rodgers AV (1990) Pharmacokinetic and pharmacodynamic studies of glibenclamide in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Br J Clin Pharmacol* **29**:673-684.

Cui Y, Giblin JP, Clapp LH und Tinker A (2001) A mechanism for ATP-sensitive potassium channel diversity: Functional coassembly of two pore-forming subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:729-734.

Cukras CA, Jeliaskova I und Nichols CG (2002) The role of NH_2 -terminal positive charges in the activity of inward rectifier K_{ATP} channels. *J Gen Physiol* **120**:437-446.

Czech MP (2003) Dynamics of phosphoinositides in membrane retrieval and insertion. *Annu Rev Physiol* **65**:791-815.

D'hahan N, Jacquet H, Moreau C, Catty P und Vivaudou M (1999) A transmembrane domain of the sulfonylurea receptor mediates activation of ATP-sensitive K^+ channels by K^+ channel openers. *Mol Pharmacol* **56**:308-315.

Dhein S, Pejman P und Krusemann K (2000) Effects of the I(K_{ATP}) blockers glibenclamide and HMR1883 on cardiac electrophysiology during ischemia and reperfusion. *Eur J Pharmacol* **398**:273-284.

Dickinson KEJ, Bryson CC, Cohen RB, Rogers L, Green DW und Atwal KS (1997) Nucleotide regulation and characteristics of potassium channel opener binding to skeletal muscle membranes. *Mol Pharmacol* **52**:473-481.

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.

6. Literaturverzeichnis

- Doupnik CA, Davidson N und Lester HA (1995) The inward rectifier potassium channel family. *Curr Op Neurobiol* **5**:268-277.
- Doyle DA, Cabral JM, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT und MacKinnon R (1998) The structure of the potassium channel: Molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* **280**:69-77.
- 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.
- Enkvetchakul D, Loussouarn G, Makhina E, Shyng SL und Nichols CG (2000) The kinetic and physical basis of K_{ATP} channel gating: Toward a unified molecular understanding. *Biophys J* **78**:2334-2348.
- Enkvetchakul D und Nichols CG (2003) Gating mechanism of K_{ATP} channels: function fits form. *J Gen Physiol* **122**:471-480.
- Fajans SS, Bell GI und Polonsky KS (2001) Molecular mechanisms and clinical pathophysiology of maturity-onset diabetes of the young. *N Engl J Med* **345**:971-980.
- Fan Z und Makielski JC (1997) Anionic phospholipids activate ATP-sensitive potassium channels. *J Biol Chem* **272**:5388-5395.
- Fan Z und Makielski JC (1999) Phosphoinositides decrease ATP sensitivity of the cardiac ATP-sensitive K⁺ channel - A molecular probe or the mechanism of ATP-sensitive inhibition. *J Gen Physiol* **114**:251-269.
- Garlid KD, Paucek P, Yarov-Yarovoy V, Murray HN, Darbenzio RB, D'Alonzo AJ, Lodge NJ, Smith MA und Grover GJ (1997) Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels. Possible mechanism of cardioprotection. *Circ Res* **81**:1072-1082.
- Glaser B, Kesavan P, Heyman M, Davis E, Cuesta A, Buchs A, Stanley CA, Thornton PS, Permutt MA, Matschinsky FM und Herold KC (1998) Familial hyperinsulinism caused by an activating glucokinase mutation. *N Engl J Med* **338**:226-230.

6. Literaturverzeichnis

Glaser B, Thornton P, Otonkoski T und Junien C (2000) Genetics of neonatal hyperinsulinism. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* **82**:F79-F86.

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, Noordam K, Willemsen MA, Ellard S, Lam WW, Campbell IW, Midgley P, Shiota C, Buettger C, Magnuson MA, Matschinsky FM und Hattersley AT (2003) Insights into the biochemical and genetic basis of glucokinase activation from naturally occurring hypoglycemia mutations. *Diabetes* **52**:2433-2440.

Gloyn AL, Reimann F, Girard C, Edghill EL, Proks P, Pearson ER, Temple IK, Mackay DJ, Shield JP, Freedenberg D, Noyes K, Ellard S, Ashcroft FM, Gribble FM und Hattersley AT (2005) Relapsing diabetes can result from moderately activating mutations in KCNJ11. *Hum Mol Genet* **14**:925-934.

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.

Graham FL, Smiley J, Russell WC und Nairn R (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* **36**:59-74.

Gribble FM, 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 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.

6. Literaturverzeichnis

Gribble FM, Tucker SJ, Haug T und Ashcroft FM (1998b) MgATP activates the β cell K_{ATP} channel by interaction with its SUR1 subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:7185-7190.

Gribble FM, Tucker SJ, Seino S und Ashcroft FM (1998c) Tissue specificity of sulfonylureas: Studies on cloned cardiac and β -cell K_{ATP} channels. *Diabetes* **47**:1412-1418.

Gros L, Virsolvy A, Salazar G, Bataille D und Blache P (1999) Characterization of low-affinity binding sites for glibenclamide on the Kir6.2 subunit of the beta-cell KATP channel. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **257**:766-770.

Gross GJ und Fryer RM (1999) Sarcolemmal versus mitochondrial ATP-sensitive K^+ channels and myocardial preconditioning. *Circ Res* **84**:973-979.

Grover GJ, D'Alonzo AJ, Hess T, Sleph PG und Darbenzio RB (1995a) Glyburide-reversible cardioprotective effect of BMS-180448 is independent of action potential shortening. *Cardiovasc Res* **30**:731-738.

Grover GJ, D'Alonzo AJ, Parham CS und Darbenzio RB (1995b) Cardioprotection with the KATP opener cromakalim is not correlated with ischemic myocardial action potential duration. *J Cardiovasc Pharmacol* **26**(1):145-152.

Grover GJ, McCullough JR, D'Alonzo AJ, Sargent CA und Atwal KS (1995c) Cardioprotective profile of the cardiac-selective ATP-sensitive potassium channel opener BMS-180448. *J Cardiovasc Pharmacol* **25**(1):40-50.

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) Mg^{2+} 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.

6. Literaturverzeichnis

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

Hambrock A, 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.

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.

Hansen L, Echwald SM, Hansen T, Urhammer SA, Clausen JO und Pedersen O (1997) Amino acid polymorphisms in the ATP-regulatable inward rectifier Kir6.2 and their relationships to glucose- and tolbutamide-induced insulin secretion, the insulin sensitivity index, and NIDDM. *Diabetes* **46**:508-512.

Heginbotham L, Lu Z, Abramson T und MacKinnon R (1994) Mutations in the K⁺ channel signature sequence. *Biophys J* **66**:1061-1067.

Heinemann, SH (2001) Sodium, Calcium and Potassium Channels. Encyclopedia Life Sci.

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.

Hilgemann DW, Feng S und Nasuhoglu C (2001) The complex and intriguing lives of PIP₂ with ion channels and transporters. *Sci STKE* **2001**:RE19.

Hilgemann DW und Ball R (1996) Regulation of cardiac Na⁺, Ca²⁺ exchange and K_{ATP} potassium channels by PIP₂. *Science* **273**:956-959.

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

6. Literaturverzeichnis

- Hille B (1992b) *Ionic channels of excitable membranes*, Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts.
- Hille B (1992a) G-protein-coupled mechanisms and nervous signaling. *Neuron* **9**:187-195.
- Huang CL, Feng S und Hilgemann DW (1998) Direct activation of inward rectifier potassium channels by PIP2 and its stabilization by G $\beta\gamma$. *Nature* **391**:803-806.
- 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 (1995) 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 sulfonylurea receptors determines the pharmacological properties of ATP-sensitive K⁺ channels. *Neuron* **16**:1011-1017.
- Inagaki N, Gono T und Seino S (1997) Subunit stoichiometry of the pancreatic beta-cell ATP-sensitive K⁺ channel. *FEBS Lett* **409**:232-236.
- 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 (1997) Voltage-gated and inwardly rectifying potassium channels. *J Physiol (Lond)* **505**:267-282.
- John SA, Weiss JN, Xie L-H und Ribalet B (2003) Molecular mechanism for ATP-dependent closure of the K⁺ channel Kir6.2. *J Physiol (Lond)* **552**:23-34.

6. Literaturverzeichnis

Jung O, Englert HC, Jung W, Gögelein H, Schölkens BA, Busch AE und Linz W (2000) The K_{ATP} channel blocker HMR 1883 does not abolish the benefit of ischemic preconditioning on myocardial infarct mass in anesthetized rabbits. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **361**:445-451.

Karow, T. Lang R. Vasodilatoren. 68-70. 2002.

Ref Type: Generic

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*

Köhler M, Hirschberg B, Bond CT, Kinzie JM, Marrion NV, Maylie J und Adelman JP (1996) Small-conductance, calcium-activated potassium channels from mammalian brain. *Science* **273**:1709-1714.

Koster JC, Sha Q und Nichols CG (1999) Sulphonylurea and K^+ -channel opener sensitivity of K_{ATP} channels - *Functional coupling of Kir6.2 and SUR1 subunits*. *J Gen Physiol* **114**:203-213.

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.

Kubo Y, Baldwin TJ, Jan YN und Jan LY (1993) Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel. *Nature* **362**:127-133.

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.

Laukkanen O, Pihlajamäki J, Lindström J, Eriksson J, Valle TT, Hamalainen H, Ilanne-Parikka P, Keinänen-Kiukkaanniemi 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.

6. Literaturverzeichnis

Lee A, Frank DW, Marks MS und Lemmon MA (1999) Dominant-negative inhibition of receptor-mediated endocytosis by a dynamin-1 mutant with a defective pleckstrin homology domain. *Curr Biol* **9**:261-264.

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

Leicher T, Roeper J, Weber K, Wang X und Pongs O (1996) Structural and functional characterization of human potassium channel subunit beta 1 (KCNA1B). *Neuropharmacology* **35**:787-795.

Li, J. H. Pharmacology of ZM244085: A Novel Bladder-Selective Dihydropyridine K_{ATP} Channel Activator. *Cardiovascular Drug Reviews* 15, 220-231. 1997.

Ref Type: Generic

Li L, Wang J und Drain P (2000) The I182 region of K_{ir}6.2 is closely associated with ligand binding in K_{ATP} channel inhibition by ATP. *Biophys J* **79**:841-852.

Liu GX, Hanley PJ, Ray J und Daut J (2001a) Long-chain acyl-coenzyme A esters and fatty acids directly link metabolism to K_{ATP} channels in the heart. *Circ Res* **88**:918-924.

Liu Y, Ren G, O'Rourke B, Marbán E und Seharaseyon J (2001b) Pharmacological comparison of native mitochondrial K_{ATP} channels with molecularly defined surface K_{ATP} channels. *Mol Pharmacol* **59**:225-230.

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.

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

MacGregor GG, Dong K, Vanoye CG, Tang LQ, Giebisch G und Hebert SC (2002) Nucleotides and phospholipids compete for binding to the C terminus of K_{ATP} channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:2726-2731.

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.

6. Literaturverzeichnis

Massa O, Iafusco D, D'Amato E, Gloyn AL, Hattersley AT, Pasquino B, Tonini G, Dammacco F, Zanette G, Meschi F, Porzio O, Bottazzo G, Crino A, Lorini R, Cerutti F, Vanelli M und Barbetti F (2005) KCNJ11 activating mutations in Italian patients with permanent neonatal diabetes. *Hum Mutat* **25**:22-27.

Matsuda A, Kuzuya T, Sugita Y und Kawashima K (1983) Plasma levels of glibenclamide in diabetic patients during its routine clinical administration determined by a specific radioimmunoassay. *Horm Metab Res* **15**:425-428.

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.

Mikhailov MV und Ashcroft SJH (2000) Interactions of the sulfonylurea receptor 1 subunit in the molecular assembly of β -cell K_{ATP} channels. *J Biol Chem* **275**:3360-3364.

Molven A, Matre GE, Duran M, Wanders RJ, Rishaug U, Njolstad PR, Jellum E und Sovik O (2004) Familial hyperinsulinemic hypoglycemia caused by a defect in the SCHAD enzyme of mitochondrial fatty acid oxidation. *Diabetes* **53**:221-227.

Murry CE, Jennings RB und Reimer KA (1986) Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* **74**:1124-1136.

Neely JR und Feuvray D (1981) Metabolic products and myocardial ischemia. *Am J Pathol* **102**:282-291.

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, Ripoll C und Lederer WJ (1991) ATP-sensitive potassium channel modulation of the guinea pig ventricular action potential and contraction. *Circ Res* **68**:280-287.

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.

6. Literaturverzeichnis

Nichols CG und Cukras CA (2001) K_{ATP} channel regulators balanced diets include carbohydrates, proteins, and fats. *Circ Res* **88**:849-851.

Niki I, Nicks JL und Ashcroft SJ (1990) The beta-cell glibenclamide receptor is an ADP-binding protein. *Biochem J* **268**:713-718.

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

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.

Partridge CJ, Beech DJ und Sivaprasadarao A (2001) Identification and pharmacological correction of a membrane trafficking defect associated with a mutation in the sulfonylurea receptor causing familial hyperinsulinism. *J Biol Chem* **276**:35947-35952.

Poulton J, Luan J, Macaulay V, Hennings S, Mitchell J und Wareham NJ (2002) Type 2 diabetes is associated with a common mitochondrial variant: evidence from a population-based case-control study. *Hum Mol Genet* **11**:1581-1583.

Pountney DJ, Sun Z-Q, Porter LM, Nitabach MN, Nakamura TY, Holmes D, Rosner E, Kaneko M, Manaris T, Holmes TC und Coetzee WA (2001) Is the molecular composition of K_{ATP} channels more complex than originally thought? *J Mol Cell Cardiol* **33**:1541-1546.

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, Girard C, Haider S, Gloyn AL, Hattersley AT, Sansom MS und Ashcroft FM (2005) A gating mutation at the internal mouth of the Kir6.2 pore is associated with DEND syndrome. *EMBO Rep* **6**:470-475.

Quast U (1996a) Effects of potassium channel activators in isolated blood vessels, in *Potassium Channels and their Modulators: From Synthesis to Clinical Experience* (Evans JM, Hamilton TC, Longman SD und Stemp G eds) pp 173-195, Taylor & Francis, London.

Quast U (1996b) ATP-sensitive K^+ channels in the kidney. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **354**:213-225.

6. Literaturverzeichnis

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, 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.

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.

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.

Riedel MJ, Steckley DC und Light PE (2005) Current status of the E23K Kir6.2 polymorphism: implications for type-2 diabetes. *Hum Genet* **116**:133-145.

Rohács T, Chen J, Prestwich GD und Logothetis DE (1999) Distinct specificities of inwardly rectifying K⁺ channels for phosphoinositides. *J Biol Chem* **274**:36065-36072.

Rohács T, Lopes CMB, Jin T, Ramdya PP, Molnár Z und Logothetis DE (2003) Specificity of activation by phosphoinositides determines lipid regulation of Kir channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:745-750.

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

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 (2001) Interaction of the sulfonylthiourea HMR 1883 with sulfonylurea receptors and recombinant ATP-sensitive K⁺ channels: Comparison with glibenclamide. *J Pharmacol Exp Ther* **299**:1049-1055.

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

6. Literaturverzeichnis

- Russ U, Metzger F, Kickenweiz E, Hambrock A, Krippeit-Drews P und Quast U (1997) Binding and effects of K_{ATP} channel openers in the vascular smooth muscle cell line, A10. *Br J Pharmacol* **122**:1119-1126.
- Sagen JV, Ræder H, Hathout E, Shehadeh N, Gudmundsson K, Bævre H, Abuelo D, Phornphutkul C, Molnes J, Bell GI, Gloyn AL, Hattersley AT, Molven A, Søvik O und Njølstad PR (2004) Permanent neonatal diabetes due to mutations in KCNJ11 encoding Kir6.2: patient characteristics and initial response to sulfonylurea therapy. *Diabetes* **53**:2713-2718.
- Sakura H, 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 β -cells, brain, heart and skeletal muscle. *FEBS Lett* **377**:338-344.
- 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, Jiang C, Curran ME und Keating MT (1995) A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the IKr potassium channel. *Cell* **81**:299-307.
- Scatchard G (1949) The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann N Y Acad Sci* **51**:660-672.
- Schulze D, Rapedius M, Krauter T und Baukrowitz T (2003a) Long-chain acyl-CoA esters and phosphatidylinositol phosphates modulate ATP inhibition of K_{ATP} channels by the same mechanism. *J Physiol (Lond)* **552**:357-367.
- Schulze D, Krauter T, Fritzenschaft H, Soom M und Baukrowitz T (2003b) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP_2) modulation of ATP and pH sensitivity in Kir channels. A tale of an active and a silent PIP_2 site in the N terminus. *J Biol Chem* **278**:10500-10505.
- Schwanstecher C, Meyer U und Schwanstecher M (2002) $K_{IR}6.2$ polymorphism predisposes to type 2 diabetes by inducing overactivity of pancreatic β -cell ATP-sensitive K^+ channels. *Diabetes* **51**:875-879.

6. Literaturverzeichnis

Schwanstecher M, Brandt C, Behrends S, Schaupp U und Panten U (1992) 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, Chudziak F und Panten U (1994) Identification of a 38-kDa high affinity sulfonylurea-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 sulfonylurea receptors. *EMBO J* **17**:5529-5535.

Sesti G, Cardellini M, Marini MA, Frontoni S, D'Adamo M, Del GS, Lauro D, De NP, Sbraccia P, Del PS, Gambardella S, Federici M, Marchetti P und Lauro R (2003) A common polymorphism in the promoter of UCP2 contributes to the variation in insulin secretion in glucose-tolerant subjects. *Diabetes* **52**:1280-1283.

Shyng S-L, Barbieri A, Gumusboga A, Cukras C, Pike L, Davis JN, Stahl PD und Nichols CG (2000a) Modulation of nucleotide sensitivity of ATP-sensitive potassium channels by phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:937-941.

Shyng S-L und Nichols CG (1998) Membrane phospholipid control of nucleotide sensitivity of K_{ATP} channels. *Science* **282**:1138-1141.

Shyng S-L, Cukras CA, Harwood J und Nichols CG (2000b) Structural determinants of PIP_2 regulation of inward rectifier K_{ATP} channels. *J Gen Physiol* **116**:599-607.

Smits P und Thien T (1995) Cardiovascular effects of sulphonylurea derivatives - Implication for the treatment of NIDDM. *Diabetologia* **38**:116-121.

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.

Stauffer TP, Ahn S und Meyer T (1998) Receptor-induced transient reduction in plasma membrane $PtdIns(4,5)P_2$ concentration monitored in living cells. *Curr Biol* **8**:343-346.

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

6. Literaturverzeichnis

glibenclamide and enhances the effects of coexpression with Kir6.2. *Br J Pharmacol* **144**:1078-1088.

Stone LM, Kahn SE, Fujimoto WY, Deeb SS und Porte D, Jr. (1996) A variation at position -30 of the beta-cell glucokinase gene promoter is associated with reduced beta-cell function in middle-aged Japanese-American men. *Diabetes* **45**:422-428.

Süßbrich H und Busch AE (1998) Kaliumkanäle. *Deutsche Apotheker Zeitung* **138**:1139-1148.

Suzuki M, Sasaki N, Miki T, Sakamoto N, Ohmoto-Sekine Y, Tamagawa M, Seino S, Marban E und Nakaya H (2002) Role of sarcolemmal K_{ATP} channels in cardioprotection against ischemia/reperfusion injury in mice. *J Clin Invest* **109**:509-516.

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.

Temple IK, James RS, Crolla JA, Sitch FL, Jacobs PA, Howell WM, Betts P, Baum JD und Shield JP (1995) An imprinted gene(s) for diabetes? *Nat Genet* **9**:110-112.

Terzic A, Jahangir A und Kurachi Y (1995) Cardiac ATP-sensitive K⁺ channels: Regulation by intracellular nucleotides and K⁺ channel-opening drugs. *Am J Physiol (Cell Physiol)* **269(3)**:C525-C545.

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.

Triggs-Raine BL, Kirkpatrick RD, Kelly SL, Norquay LD, Cattini PA, Yamagata K, Hanley AJ, Zinman B, Harris SB, Barrett PH und Hegele RA (2002) HNF-1alpha G319S, a transactivation-deficient mutant, is associated with altered dynamics of diabetes onset in an Oji-Cree community. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:4614-4619.

6. Literaturverzeichnis

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 sub-family 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 (1999a) Cooperative binding of ATP and MgADP in the sulfonylurea receptor is modulated by glibenclamide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:1268-1272.

Ueda K, Matsuo M, Tanabe K, Morita K, Kioka N und Amachi T (1999b) Comparative aspects of the function and mechanism of SUR1 and MDR1 proteins. *Biochim Biophys Acta* **1461**:305-313.

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 der Vusse GJ, Glatz JF, Stam HC und Reneman RS (1992) Fatty acid homeostasis in the normoxic and ischemic heart. *Physiol Rev* **72**:881-940.

van der Vusse GJ, Prinzen FW, van BM, Engels W und Reneman RS (1987) Accumulation of lipids and lipid-intermediates in the heart during ischaemia. *Basic Res Cardiol* **82 Suppl 1**:157-167.

Vaxillaire M, Populaire C, Busiah K, Cavé H, Gloyn AL, Hattersley AT, Czernichow P, Froguel P und Polak M (2004) Kir6.2 mutations are a common cause of permanent neonatal diabetes in a large cohort of French patients. *Diabetes* **53**:2719-2722.

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.

6. Literaturverzeichnis

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 Q, Curran ME, Splawski I, Burn TC, Millholland JM, VanRaay TJ, Shen J, Timothy KW, Vincent GM, de JT, Schwartz PJ, Toubin JA, Moss AJ, Atkinson DL, Landes GM, Connors TD und Keating MT (1996) Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias. *Nat Genet* **12**:17-23.

Weedon MN, Owen KR, Shields B, Hitman G, Walker M, McCarthy MI, Love-Gregory LD, Permutt MA, Hattersley AT und Frayling TM (2004) Common variants of the hepatocyte nuclear factor-4alpha P2 promoter are associated with type 2 diabetes in the U.K. population. *Diabetes* **53**:3002-3006.

Wei A, Jegla T und Salkoff L (1996) Eight potassium channel families revealed by the *C. elegans* genome project. *Neuropharmacology* **35**:805-829.

Xie L-H, Horie M und Takano M (1999) Phospholipase C-linked receptors regulate the ATP-sensitive potassium channel by means of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:15292-15297.

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.

Yan F, Lin C-W, Weisiger E, Cartier EA, Taschenberger G und Shyng S-L (2004) Sulfonylureas correct trafficking defects of ATP-sensitive potassium channels caused by mutations in the sulfonylurea receptor. *J Biol Chem* **279**:11096-11105.

Yaney GC, Korchak HM und Corkey BE (2000) Long-chain acyl CoA regulation of protein kinase C and fatty acid potentiation of glucose-stimulated insulin secretion in clonal beta-cells. *Endocrinology* **141**:1989-1998.

Yorifuji T, Nagashima K, Kurokawa K, Kawai M, Oishi M, Akazawa Y, Hosokawa M, Yamada Y, Inagaki N und Nakhata T (2005) The C42R mutation in the Kir6.2 (KCNJ11) gene as a cause of transient neonatal diabetes, childhood diabetes, or later-onset, apparently type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* **90**:3174-3178.

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.

6. Literaturverzeichnis

Zelcer N, Huisman MT, Reid G, Wielinga P, Breedveld P, Kuil A, Knipscheer P, Schellens JH, Schinkel AH und Borst P (2003) Evidence for two interacting ligand binding sites in human multi-drug resistance protein 2 (ATP binding cassette C2). *J Biol Chem* **278**:23538-23544.

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.

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.

Danksagung

An dieser Stelle sei all jenen mein Dank ausgesprochen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Ulrich Quast danke ich herzlich für die Bereitstellung des Themas und die hervorragende Anleitung, sowie die stete Hilfs- und Gesprächsbereitschaft. Auch die "Exkurse jenseits der Pharmakologie" waren sehr lehrreich.

Herrn PD Dr. Ulrich Ruß gilt mein besonderer Dank für die geduldige und ausdauernde Unterstützung bei der Fertigstellung der Arbeit am Computer und darüberhinaus für die ständige Ansprechbarkeit bei unerwarteten Problemen.

Den Herren Drs. Ulf Lange und Alexander Klein danke ich für die freundliche und hilfsbereite Einarbeitung in die Methodik und die Erteilung zahlreicher wertvoller Ratschläge.

Herrn Apotheker Damian Stephan möchte ich besonders herzlich danken für die weitergehende Einarbeitung in Theorie und Praxis und die moralische Unterstützung.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Quast für ihre freundliche Hilfsbereitschaft und gute Zusammenarbeit, was zu einer äußerst angenehmen Arbeitsatmosphäre beitrug, namentlich Frau Julia Laske-Ernst, Herrn Alexander Stehle, Herrn Marc Chmielnicki, Frau Petra Kühner, Frau Susanne Bieger, Herrn Marcus Winkler, Herrn Felix Wolf und Frau Renate Prager.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern für den uneingeschränkten Rückhalt und die großzügige Unterstützung, die mir das Studium überhaupt erst ermöglicht haben.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Jochen Lichtenberg
Geburtsdatum: 23.05.1978
Geburtsort: Tübingen

Schulbildung

1985 - 1989 Grundsule Sulz a.N.
1989 - 1998 Albeck-Gymnasium Sulz a.N.
1998 Abitur

Ersatzdienst

1998 - 1999 Zivildienst im Berneuchener Haus Kloster Kirchberg

Akademische Ausbildung

Oktober 1999 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen
September 2001 Ärztliche Vorprüfung (Physikum)
September 2002 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (1. Staatsexamen)
Oktober 2002 Beginn der Dissertation am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Tübingen
März 2005 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (2. Staatsexamen)
April 2005 Beginn des Praktischen Jahres am Uniklinikum Tübingen, Wahlfach Anästhesie
30. Mai 2006 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (3. Staatsexamen)