

Struktur-Funktions-Untersuchungen
an ATP-empfindlichen K⁺-Kanälen, deren
Untereinheiten und schließenden Liganden

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2009

vorgelegt von

Marcus Stephan Winkler

Tag der mündl. Prüfung: 09.09.2009

Dekan: Prof. Dr. L. Wesemann

1. Berichtstatter: Prof. Dr. U. Quast

2. Berichtstatter: Prof. Dr. M. Schwarz

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	ix
1 Einleitung	1
1.1 K ⁺ -selektive Ionenkanäle.....	1
1.1.1 K _v -Kanäle	1
1.1.2 K _{Ca} -Kanäle.....	2
1.1.3 K _{IR} -Kanäle.....	2
1.1.4 K _{2P} -Kanäle.....	5
1.2 K _{ATP} -Kanäle.....	6
1.2.1 Aufbau des K _{ATP} -Kanals	6
1.2.1.1 Die regulatorische K _{ATP} -Kanal-Untereinheit SUR.....	8
1.2.1.1.1 ABC-Proteine	8
1.2.1.1.2 SUR-Spleißvarianten.....	10
1.2.1.2 Gewebsspezifische Kombination von Kir6.1, Kir6.2, SUR1, SUR2A und SUR2B.....	11
1.2.2 (Patho-)Physiologische Bedeutung von K _{ATP} -Kanälen.....	15
1.2.2.1 K _{ATP} -Kanäle im Pankreas.....	15
1.2.2.2 K _{ATP} -Kanäle im Gehirn	19
1.2.2.3 K _{ATP} -Kanäle im Skelettmuskel.....	20
1.2.2.4 K _{ATP} -Kanäle im Herz.....	20
1.2.2.5 K _{ATP} -Kanäle in der glatten Gefäßmuskulatur.....	21
1.2.3 Regulation.....	22
1.2.3.1 Nukleotide	22
1.2.3.1.1 Kir-vermittelte Hemmung	22
1.2.3.1.2 SUR-vermittelte Aktivierung	25
1.2.3.1.3 Assoziation des K _{ATP} -Kanals mit Adenylatkinase (AK) und Creatinkinase (CK).....	30
1.2.3.2 Phospholipide	32
1.2.3.3 pH	36
1.2.3.4 Zn ²⁺	37
1.2.3.5 Phosphorylierung.....	38
1.2.3.5.1 Proteinkinase A (PKA).....	38
1.2.3.5.2 Proteinkinase C (PKC)	39

1.2.3.5.3	Tyrosinkinasen	42
1.2.3.6	Assoziation und Interaktion von K_{ATP} -Kanälen mit Proteinen	42
1.2.3.6.1	Adenylatkinase (AK) und Creatinkinase (CK)	42
1.2.3.6.2	Lactatdehydrogenase (LDH)	43
1.2.3.6.3	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), Triosephosphat- isomerase (TPI) und Pyruvatkinase (PK)	43
1.2.3.6.4	Epac2	44
1.2.3.6.5	Syntaxin-1A	45
1.2.3.7	Potentielle Regulatoren/Modulatoren mit unklarem Wirkmechanismus	45
1.2.3.7.1	H_2S , NO	45
1.2.3.7.2	Leptin, Insulin	46
1.2.3.7.3	α -Endosulfin	47
1.2.4	Synthetische K_{ATP} -Kanalmodulatoren	47
1.2.4.1	Insulinotrope und das Konzept der zweiteiligen Bindungstasche	47
1.2.4.2	K_{ATP} -Kanal-Öffner	52
1.3	Fragestellung	55
2	Materialien und Methoden	57
2.1	Software	57
2.2	Geräte	57
2.3	Verbrauchsmaterial	61
2.4	Substanzen	61
2.4.1	Antikörper	61
2.4.2	Enzyme	62
2.4.3	Plasmide	62
2.4.4	DNA-Oligomere	62
2.4.5	Synthetische K_{ATP} -Kanal-Modulatoren	63
2.4.6	Sonstige Substanzen	64
2.4.7	„Kits“	65
2.5	<i>E. coli</i> -Kultur zur Gewinnung von Plasmid-DNA	65
2.5.1	LB-Medium	65
2.5.2	Herstellung von <i>E. coli</i> -Stammkulturen	66
2.6	Allgemeine Techniken zur Isolierung, Modifizierung, Analyse, Amplifikation und sonstigen Manipulation von DNA	66

2.6.1	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen	66
2.6.2	Elution von Plasmid-DNA aus Filterpapier	66
2.6.3	Transformation von <i>E. coli</i>	67
2.6.4	DNA-Präparation in unterschiedlichem Größenmaßstab	67
2.6.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	67
2.6.6	Hybridisierung (Annealing) von DNA-Oligomeren	67
2.6.7	Restriktionsverdau	68
2.6.8	Horizontale Agarose-Gelelektrophorese und DNA-Extraktion	68
2.6.9	Ligation von DNA	69
2.6.10	Ortsgerichtete Mutagenese	69
2.6.11	DNA-Sequenzierung	69
2.7	HEK293-Zellkultur	69
2.7.1	Standard-Kulturbedingungen	70
2.7.2	Einfrieren von HEK293	71
2.7.3	Auftauen von HEK293	71
2.7.4	(Transiente) Transfektion	71
2.7.5	Herstellung und Kultivierung „permanent transfizierter“ HEK293-Zelllinien	72
2.7.6	Gewinnung nicht-fraktionierter Membranen aus HEK293-Zellen.....	72
2.8	Immunopräzipitation (IP), SDS-PAGE und Western Blot.....	73
2.8.1	FLAG- und MYC-Tagging für IP und Western Blot	73
2.8.2	Solubilisation von Membranproteinen und Co-Immunopräzipitation (Co-IP)	74
2.8.3	SDS-PAGE	75
2.8.4	Western Blot und Immunodetektion.....	77
2.9	Radioligandbindungsstudien	79
2.9.1	Theoretische Grundlagen der Konkurrenzexperimente	80
2.9.2	Theoretische Grundlagen der Sättigungsexperimente.....	83
2.9.3	Inkubations- und Waschpuffer für Radioligandbindungsexperimente.....	84
2.9.3.1	Inkubationspuffer für Bindungsexperimente an intakten Zellen.....	84
2.9.3.2	Inkubationspuffer für Bindungsexperimente an Membranen.....	85
2.9.3.3	Waschpuffer	86
2.9.4	Bindungsexperimente an intakten HEK293-Zellen.....	86
2.9.5	Bindungsexperimente an Membranen	88
2.9.5.1	Standardbedingungen für Konkurrenzexperimente	88

2.9.5.2	Kompetitionsexperimente an Kir6.2/SUR1(Q1178R) in Gegenwart von BeF_x und V_i	89
2.9.5.3	Sättigungsexperimente an Kir6.2/SUR1(Q1178R).....	90
2.9.6	Korrektur bei Abnahme der spezifischen Radioligandbindung während eines Experiments.....	91
2.9.7	Proteinbestimmung nach Lowry.....	92
2.10	Elektrophysiologische Experimente („Patch-Clamp“).....	93
2.10.1	Das Prinzip der Saugelektrode (Patch-Clamp-Technik).....	93
2.10.2	Physikalische Grundlage des „Voltage-Clamp“-Verfahrens („Spannungsklemme“).....	95
2.10.3	Allgemeiner Aufbau der Patch-Clamp-Apparatur.....	96
2.10.4	Pipetten.....	98
2.10.5	Silberelektroden.....	98
2.10.6	KCl-Agar-Brücken.....	99
2.10.7	Präparation der Zellen.....	100
2.10.8	Messungen in der whole-cell-Konfiguration.....	101
2.10.8.1	Lösungen.....	101
2.10.8.2	Experimenteller Ablauf.....	101
2.10.9	Messungen in der inside-out-Konfiguration.....	103
2.10.9.1	Lösungen.....	103
2.10.9.1.1	Badpuffer.....	103
2.10.9.1.2	Perfusionslösung („Pipe-Lösung“).....	104
2.10.9.2	Experimenteller Ablauf.....	107
2.11	Statistik und Fehlerrechnung.....	108
2.12	Das Hefe-Zweihybrid-System für Membranproteine (MY2H).....	108
2.12.1	Funktionsprinzip.....	108
2.12.2	Verlauf der MY2H-Suche.....	110
2.12.3	Hefe-Stamm und Kulturmedien.....	110
2.12.3.1	Hefe-Stamm: Genotyp und Reportergene.....	110
2.12.3.2	Stammlösungen zur Komplementierung der Kulturmedien.....	111
2.12.3.3	Herstellung der Kulturmedien.....	111
2.12.4	Herstellung und Verwendung von <i>S. cerevisiae</i> -Stammkulturen.....	112
2.12.5	Klonierung der Gene für Kir6.1 (bzw. SUR2B) in die entsprechenden Hefe-Expressionsvektoren.....	112

2.12.5.1	Klonierung in pCCW-STE	112
2.12.5.2	Klonierung von SUR2B in p416CYC	113
2.12.6	Einfaches Transformationsprotokoll für <i>S. cerevisiae</i> (niedrige Transformations-effizienz)	113
2.12.6.1	Transformationsreagenzien	113
2.12.6.2	Transformationsprotokoll	114
2.12.7	Herstellung von <i>S. cerevisiae</i> -Zelllysaten für Western Blot	115
2.12.8	Western Blot zur Detektion der Cub-LexA-VP16-Fusionsproteine.....	116
2.12.9	Transformation der cDNA-Bibliothek (hohe Transformationseffizienz).....	116
2.12.10	Test der β -Galactosidaseaktivität	118
2.12.11	Isolierung der „Beutevektoren“ aus „positiven“ Klonen und erneuter Test auf Aktivierung im MY2H-System zum Ausschluss von „Falsch-Positiven“.....	118
2.12.12	FLAG-Tagging der potentiellen Interaktionspartner für die Überprüfung der im MY2H-System gefundenen Interaktionen durch Co-Immunopräzipitation	119
3	Bindung von Sulfonylharnstoffen und Gliniden der Klassen A, B und A+B: Einfluss von Kir- und SUR-Subtypen.....	121
3.1	Fragestellung	121
3.2	Ergebnisse.....	121
3.2.1	Unterscheidung von spezifisch und nicht-spezifisch gebundenem [3 H]GBC....	122
3.2.2	Verdrängung von [3 H]GBC durch GBC und REP an Kir6.1/SUR2B.....	128
3.2.3	Verdrängung von [3 H]GBC durch GBC und REP an Kir6.2/SUR2B.....	128
3.3	Diskussion	130
3.3.1	Einfluss der porenbildenden Untereinheit auf die Bindung verschiedener Liganden (-klassen).....	130
3.3.2	Auswirkung der Y1206S-Mutation in SUR2 auf die Affinität für A-, A+B- und B-Liganden	134
3.3.3	K _{ATP} -Kanal-Subtyp-Selektivität der Insulinotrope in Bindung und Elektrophysiologie	135
3.3.4	Anwendbarkeit des Konzepts von A-, B- und A+B-Liganden auf Kir6/SUR2 .	136
4	Modulierung der Glibenclamid-Bindung in Gegenwart von MgATP durch Orthovanadat (V_i) und Berylliumfluorid (BeF₃)	138
4.1	Fragestellung	138
4.2	Ergebnisse.....	139

4.3	Diskussion.....	143
5	Struktur-Funktionsbeziehungen des Sulfonylharnstoffrezeptors – Charakterisierung von SUR2B(YS)ΔTMD0.....	148
5.1	Fragestellung.....	148
5.2	Ergebnisse.....	149
5.2.1	Radioligandbindungsstudien an SUR2B(YS) und SUR2B(YS) Δ TMD0 in An- und Abwesenheit von Kir6.2.....	150
5.2.2	Verifizierung der Ergebnisse aus den Radioligandbindungsstudien mittels Co- Immunopräzipitation.....	153
5.2.3	Elektrophysiologische Untersuchungen an SUR2B(YS) Δ TMD0 exprimierenden Zellen.....	154
5.3	Diskussion.....	156
6	Charakterisierung der DEND-Mutation Kir6.2(V59G) – Implikationen für die Funktion von Kir-N-Terminus und Gleithelix.....	161
6.1	Fragestellung.....	161
6.2	Ergebnisse.....	161
6.2.1	Sekundärstrukturvorhersagen: (Zer-)Stört Glycin 59 die Gleithelix?.....	161
6.2.2	Identischer Block von Kir6.2/SUR1 (wt) und Kir6.2(V59G)/SUR1 durch Ba ²⁺	162
6.2.3	Inhibition durch ATP, Glibenclamid und Repaglinid.....	163
6.2.4	Aktivierung durch Phospholipide – Inhibition durch Polykationen.....	169
6.2.5	Kir6.1(I60G).....	172
6.3	Diskussion.....	173
6.3.1	Ba ²⁺ -Block.....	174
6.3.2	Reduzierung der ATP-Empfindlichkeit durch die V59G-Mutation.....	174
6.3.3	V59G-Mutation vs. Verkürzung des Kir-N-Terminus: ATP-Empfindlichkeit und Offenwahrscheinlichkeit.....	180
6.3.4	ATP-Empfindlichkeit von Kir6.1(I60G)/SUR1.....	182
6.3.5	Der „GBC-Effekt“: Potentierung der ATP-Hemmung.....	183
6.3.6	Phospholipide und Polykationen.....	184
6.4	Anhang: P _o (0), P _o (∞) und IC ₅₀ als Funktion von [ATP]: Mathematische Herleitung der Gleichungen zum Modell aus Abb. 6-8.....	185

7	Mechanismus der K_{ATP}-Kanal-Hemmung durch Tetrapentylammonium (TPA)..	188
7.1	Fragestellung	188
7.2	Ergebnisse.....	188
7.3	Diskussion	191
8	Vergleich der Hemmstärke in whole-cell- und inside-out-Konfiguration der Patch-Clamp-Technik: Messungen mit Meglitinid.....	194
8.1	Fragestellung	194
8.2	Ergebnisse.....	194
8.3	Diskussion	197
9	Identifizierung bislang unbekannter Interaktionspartner von Kir6.1 mit Hilfe des Hefe-Zweihybrid-Systems für Membranproteine (MY2H)	202
9.1	Fragestellung	202
9.2	Ergebnisse.....	202
9.2.1	Klonierung des „Köders“, Transformation, Nachweis der Expression und Optimierung der Selektionsbedingungen.....	203
9.2.2	Transformation der cDNA-Bibliothek, Identifizierung, Isolierung und erneute Transformation potentieller Interaktionspartner.....	205
9.2.3	Sequenzierergebnis der „positiven“ Klone.....	206
9.2.4	Überprüfung der im MY2H-System gefundenen Interaktionen durch Co-Immunopräzipitation	207
9.3	Diskussion	209
9.3.1	Limitationen des MY2H-Screens	209
9.3.2	Mit Hilfe des MY2H-Systems identifizierte Interaktionspartner von Kir6.1.....	211
9.3.2.1	NCU-G1	211
9.3.2.2	ATP-Synthase Untereinheit a	212
9.3.2.3	LEM2 (LEM domain containing protein 2)	212
9.3.2.4	Laptm4a (Lysosomal-associated protein transmembrane 4A)	213
9.3.3	Intrazelluläre Lokalisierung von K_{ATP} -Kanälen	214
10	Zusammenfassung	217
11	Veröffentlichungen	225

12	Literaturverzeichnis	226
-----------	-----------------------------------	------------

Abkürzungsverzeichnis

Ø	Durchmesser
3-AT	3-Amino-1,2,4-Triazol
Å	Ångström ($1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$)
A ₂₆₀	Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm
Abb.	Abbildung
ABC-Proteine	Proteine mit ABC-Motiv ("ATP binding cassette")
Abt. Molpharm.	Abteilung Molekularpharmakologie
Ade	Adenin
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Adenylatkinase
AKAP	A-Kinase anchoring protein
AMP	Adenosinmonophosphat
Amp	Ampicillin
AMP-PCP	Adenosin-5'-(β,γ -methylen)triphosphat
AMP-PNP	Adenosin-5'-(β,γ -imido)triphosphat
APD	Aktionspotentialdauer
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
BCRP	breast cancer resistance protein
BeF _x	Berylliumfluorid
B _{max}	maximale Bindungskapazität
B _s	spezifische Bindung
BSA	Rinderserumalbumin („bovine serum albumin“)
B _{tot}	gesamte („totale“) Bindung, d.h. die Summe aus B _s und NSB
C	elektrische Kapazität (Einheit: $1 \text{ F} = 1 \text{ A} \cdot \text{s} \cdot \text{V}^{-1}$)
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cAMP-GEFII	cAMP-regulated guanine nucleotide exchange factor II
cDNA	„copy DNA“: mittels reverser Transkription von mRNA hergestellte (intronlose) DNA
CGRP	calcitonin gene related peptide
CHI	angeborener Hyperinsulinismus („Congenital Hyperinsulinism“)
CIP	alkalische Phosphatase aus Kälberdarm („calf intestinal alkaline phosphatase“)
CK	Creatinkinase
CL3 (\triangleq L0)	„Cytoplasmic Loop 3“: dritte cytoplasmatische Schleife im SUR
CMV	Cytomegalie-Virus
CoA	Coenzym A
Cr	Creatin
CrP	Creatinphosphat
CTP	Cytidintriphosphat
Cub	C-terminaler Abschnitt von Ubiquitin
DEND	Krankheitsbild, das Entwicklungsstörungen, Epilepsie und neonatalem Diabetes beinhaltet („Developmental delay, Epilepsy, Neonatal Diabetes“)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOG	1,2-Dioctanoyl-sn-glycerin

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(β -amino-ethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
E_m	Ruhemembranpotential
Epac2	exchange protein activated by cAMP 2
ER	Endoplasmatisches Reticulum
EtOH	Ethanol
FBS	Fötales Kälberserum („fetal bovine serum“)
G	elektrische Leitfähigkeit (Einheit: $1 \text{ S} = 1 \text{ A} \cdot \text{V}^{-1}$)
GABA	γ -Aminobuttersäure („ γ -aminobutyric acid“)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GBC	Glibenclamid
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
GLP-1	glucagon-like peptide 1
GTP	Guanosintriphosphat
HEK293	Zelllinie aus humanen embryonalen Nierenzellen („human embryonic kidney“)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HI	Hyperinsulinismus im Säuglingsalter („Hyperinsulinemia of Infancy“)
His	L-Histidin
I	Stromstärke (Einheit: 1 A)
i.o.	inside-out
IC_{50}	die Konzentration, bei der eine Substanz 50 % ihrer maximal möglichen inhibitorischen Wirkung hervorruft
IP	Immunopräzipitation
IP_3	Inositol-1,4,5-Trisphosphat
IPC	ischämische Präkonditionierung („ischemic preconditioning“)
ITP	Inositoltriphosphat
K_{2p} -Kanäle	Tandem- K^+ -Kanäle
Kan	Kanamycin
Kap.	Kapitel
K_{ATP} -Kanäle	ATP-empfindliche K^+ -Kanäle
K_{Ca} -Kanäle	Ca^{2+} -aktivierte K^+ -Kanäle
KCO	K_{ATP} -Kanal-Öffner („ K_{ATP} channel opener“)
kD	Kilodalton
K_D	Dissoziationskonstante
K_I	Inhibitionskonstante
K_{IR} -Kanäle, K_{ir} -Kanäle	einwärtsgerichtete K^+ -Kanäle („inward rectifier“)
$K_{ir\Delta C26}$	am C-Terminus um 26 AS verkürzter K_{ir}
$K_{ir\Delta N10}$	am N-Terminus um „10“ AS verkürzter K_{ir} (Met an Position 1 bleibt erhalten)
K_v -Kanäle	spannungsgesteuerte K^+ -Kanäle
$L0 (\triangleq CL3)$	„Loop 0“: cytoplasmatische Schleife zwischen TMD0 und TMD1 des SUR
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LC-CoA	langkettige Thioester von Coenzym A
LDH	Lactatdehydrogenase

Leu	L-Leucin
MCS	Multiple Klonierungsstelle („multiple cloning site“)
MDR1	multidrug resistance protein 1
MEG	Meglitinid
MEM	„Minimum Essential Medium“
MeOH	Methanol
mitoK _{ATP}	mitochondrialer K _{ATP} -Kanal
mK _{ATP}	mitochondrialer K _{ATP} -Kanal
MRP1	multidrug resistance-associated protein 1
MY2H	Hefe-Zweihybridsystem für Membranproteine („membrane yeast two-hybrid“)
n	jeweils die Anzahl der ausgewerteten Einzelerperimente
NAD ⁺ /NADH	Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
NADP ⁺ /NADPH	Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NBD	Nukleotidbindungsdomäne
NBF	Nukleotidbindungsfalte
NDP	Nukleosiddiphosphat
n _H	Hill-Koeffizient
nK _{ATP}	nukleärer K _{ATP} -Kanal
NSB	nicht-spezifische Bindung
NubG	N-terminaler Abschnitt von Ubiquitin mit Mutation I13G
OAc	Acetat
OCoA	Oleoyl-CoA
OD ₅₄₆	„Optische Dichte“ bei einer Wellenlänge von 546 nm
P1075	N-cyano-N ⁷ -(1,1-dimethylpropyl)-N ³ ’-3-pyridylguanidin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	„polymerase chain reaction“: Polymerase-Kettenreaktion zur Amplifizierung von DNA
PDBu	Phorbol-12,13-dibutyrat
PEG	Polyethylenglycol
PEP	Phosphoenolpyruvat
PHHI	Persistierende hyperinsulinämische Hypoglykämie im Säuglingsalter („Persistent Hyperinsulinemic Hypoglycemia of Infancy“)
P _i	Orthophosphat
PI(3,4,5)P ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat
PI3K	Phosphoinositol-3-Kinase
pIC ₅₀	= -lg IC ₅₀
PIP ₂ (≙ PI(4,5)P ₂)	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
PK	Pyruvatkinase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PNDM	Permanenter neonataler Diabetes mellitus
P _o	Offenwahrscheinlichkeit („open probability“)
P-Schleife	Poren-Schleife
R	elektrischer Widerstand (Einheit: 1 Ω = 1 V·A ⁻¹)
REP	Repaglinid
RT	Raumtemperatur (~ 22 °C)
RT-PCR	Reverse Transkription (spezielle PCR-Technik)

<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SCHAD	Short-Chain L-3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase
SDS	Natriumdodecylsulfat („sodium dodecyl sulfate“)
SEM	Standardabweichung („standard error of the mean“)
SNARE	soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor
SNr	Substantia nigra
ssDNA	Einzelstrang-DNA („single-stranded DNA“)
SUR	Sulfonylharnstoffrezeptor
SUR2B(YS)	SUR2B(Y1206S)
SV40	Simianes Virus 40
T2D	Diabetes Typ II
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TM	Transmembranhelix
TMD	Transmembrandomäne
TNDM	Transienter neonataler Diabetes mellitus
TPA	Tetrapentylammonium
TPI	Triosephosphatisomerase
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Trp	L-Tryptophan
U	elektrische Spannung (Einheit: 1 V)
UAW	Unerwünschte Arzneimittelwirkung
UDP	Uridindiphosphat
UniProtKB	UniProt Knowledgebase
Ura	Uracil
UTP	Uridintriphosphat
V _i	Orthovanadat
w.c.	whole-cell
wt	Wildtyp
β-ME	β-Mercaptoethanol

1 Einleitung

1.1 K^+ -selektive Ionenkanäle

Ionenkanäle sind integrale Membranproteine, die einen wassergefüllten Diffusionsweg durch die Membran bilden. Die porenbildenden α -Untereinheiten der mehr als 70 bekannten K^+ -selektiven Kanäle werden üblicherweise in vier Familien unterteilt: Die der spannungsgesteuerten (K_v), der Ca^{2+} -aktivierten (K_{Ca}), der einwärtsgerichteten (K_{IR}) und der zwei Porendomänen umfassenden (K_{2P}) K^+ -Kanal-Untereinheiten (Gutman et al., 2005; Wei et al., 2005; Kubo et al., 2005; Goldstein et al., 2005). Allen gemeinsam ist die sog. P-Schleife („P-Loop“), auch als H5-Schleife bezeichnet, die elementarer Bestandteil der Pore ist und dieser Selektivität für K^+ verleiht. Ihre Signatursequenz lautet typischerweise TXXTXGYG (Heginbotham et al., 1994). Es werden jedoch in einigen Fällen Abweichungen beobachtet, so auch bei den K_{ATP} -Kanal-Untereinheiten Kir6.1 und Kir6.2, die die Sequenz TXGFG aufweisen. Für die vollständige Pore sind vier P-Schleifen erforderlich, was durch Tetramerisierung bzw. Dimerisierung (K_{2P} -Kanäle) der Untereinheiten erreicht wird (Doyle et al., 1998). Die Topologie der vier K^+ -Kanal-Familien ist in Abb. 1-1 dargestellt.

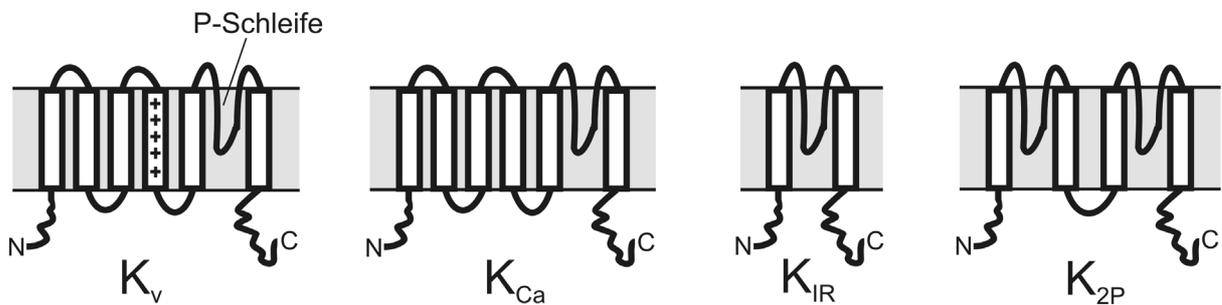


Abb. 1-1: Topologie der porenbildenden α -Untereinheiten der vier K^+ -Kanal-Familien. Die +-Zeichen stehen für positiv geladene Aminosäuren, die eine entscheidende Rolle für die Spannungsempfindlichkeit der K_v -Kanäle spielen (vgl. Text).

1.1.1 K_v -Kanäle

Spannungsgesteuerte Ionenkanäle sind entscheidend für die Erregbarkeit von Neuronen und Herzzellen. Mit etwa 40 Genen stellen die K_v -Kanäle die größte Familie unter den humanen K^+ -Kanälen dar. Durch Heteromultimerisierung, Assoziation mit weiteren Proteinen, alternatives mRNA-Spleißen und posttranslationale Modifizierung wie Phosphorylierung, Ubiquitylierung oder Palmitoylierung wird diese Diversität noch weiter erhöht (Gutman et

al., 2005). Die sechs Transmembransegmente bilden zwei Module, die Porendomäne (Transmembranhelices S5-S6) und die Spannungssensordomäne (S1-S4).

Die Funktion der Letzteren beruht vor allem auf der S4-Helix, die auf einer Seite mehrere positiv geladene Seitenketten (vor allem Arginine) aufweist. Beim Wechsel von einem negativen zu einem positiveren Membranpotential kommt es zu einer Umlagerung der S4-Helices Richtung extrazellulärer Seite des Kanals, verbunden mit der Öffnung der von den vier S6-Helices gebildeten inneren Pforte („internal gate“) (Übersicht bei Börjesson und Elinder, 2008).

1.1.2 K_{Ca} -Kanäle

Die Ca^{2+} -aktivierten (K_{Ca}) K^+ -Kanäle (Übersicht bei Wei et al., 2005) verfügen ebenfalls über sechs (im Fall von $K_{Ca}1.1$ und $K_{Ca}5.1$ über sieben) Transmembranhelices. Sie teilen sich in zwei Gruppen. Die eine Gruppe beinhaltet $K_{Ca}2.1$, $K_{Ca}2.2$, $K_{Ca}2.3$ (jeweils niedrige Leitfähigkeit) und $K_{Ca}3.1$ (mittlere Leitfähigkeit). Sie sind spannungsunempfindlich, werden durch niedrige ($< 1 \mu M$) intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen aktiviert und spielen bei Prozessen wie der Ca^{2+} -abhängigen Signalübertragung sowohl in elektrisch erregbaren als auch in nicht-erregbaren Zellen eine wichtige Rolle. Es kommt zu keiner direkten Ca^{2+} -Bindung an den eigentlichen Kanal, vielmehr wird Ca^{2+} mit Hilfe von Calmodulin detektiert, welches konstitutiv mit dem C-Terminus der Kanaluntereinheiten assoziiert ist. Hingegen besitzt $K_{Ca}1.1$ (wegen seiner hohen Leitfähigkeit („big“) auch BK-Kanal genannt) aus der zweiten Gruppe der K_{Ca} -Kanäle in seinem C-Terminus mindestens drei Bindungsstellen für Ca^{2+} . Die Bindung von Ca^{2+} ermöglicht bereits bei hyperpolarisiertem Membranpotential eine Aktivierung von $K_{Ca}1.1$, bei Depolarisation erfolgt die Aktivierung auch in Abwesenheit von Ca^{2+} . $K_{Ca}1.1$ ist fundamental für die Kontrolle des Tonus der glatten Muskulatur und neuronale Erregbarkeit. Die übrigen Mitglieder dieser Gruppe, $K_{Ca}4.1$, $K_{Ca}4.2$ und $K_{Ca}5.1$, werden dieser aufgrund ihrer Struktur zugeordnet, zeigen jedoch entgegen ihrer Bezeichnung keine Sensitivität gegenüber Ca^{2+} . $K_{Ca}4.2$ und $K_{Ca}4.1$ werden durch Na^+ und Cl^- aktiviert, $K_{Ca}5.1$ durch eine intrazelluläre Alkalisierung (OH^-).

1.1.3 K_{IR} -Kanäle

Die Klasse der einwärtsgerichteten K^+ -Kanäle („ K_{IR} “ oder „ K_{IR} “ abgekürzt) spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation von u.a. Herzfrequenz, Blutdruck und Insulinsekretion

(Übersicht bei Kubo et al., 2005; Bichet et al., 2003). Die humane Kir-Familie umfasst 15 Mitglieder, die sich in sieben Subfamilien (Kir1-7) unterteilen. Kir-Untereinheiten besitzen lediglich zwei Transmembranhelices, die mit M1 und M2 bezeichnet werden und der fünften und sechsten Helix der K_v - und K_{Ca} -Kanäle entsprechen (vgl. Abb. 1-1). Hochauflösende Kristallstrukturen von eukaryotischen Kir-Kanälen sind nicht verfügbar. Die aufgeklärten Strukturen eng verwandter bakterieller Kanalproteine wie KcsA und KirBac1.1 lassen jedoch darauf schließen, dass die M2-Helices im geschlossenen Kanal trichterförmig angeordnet sind und im Bereich der Membraninnenseite die innere Pforte („internal gate“) bilden. Eine zweite Pforte („gate“) stellt der bereits erwähnte Selektivitätsfilter dar (vgl. Abb. 1-2).

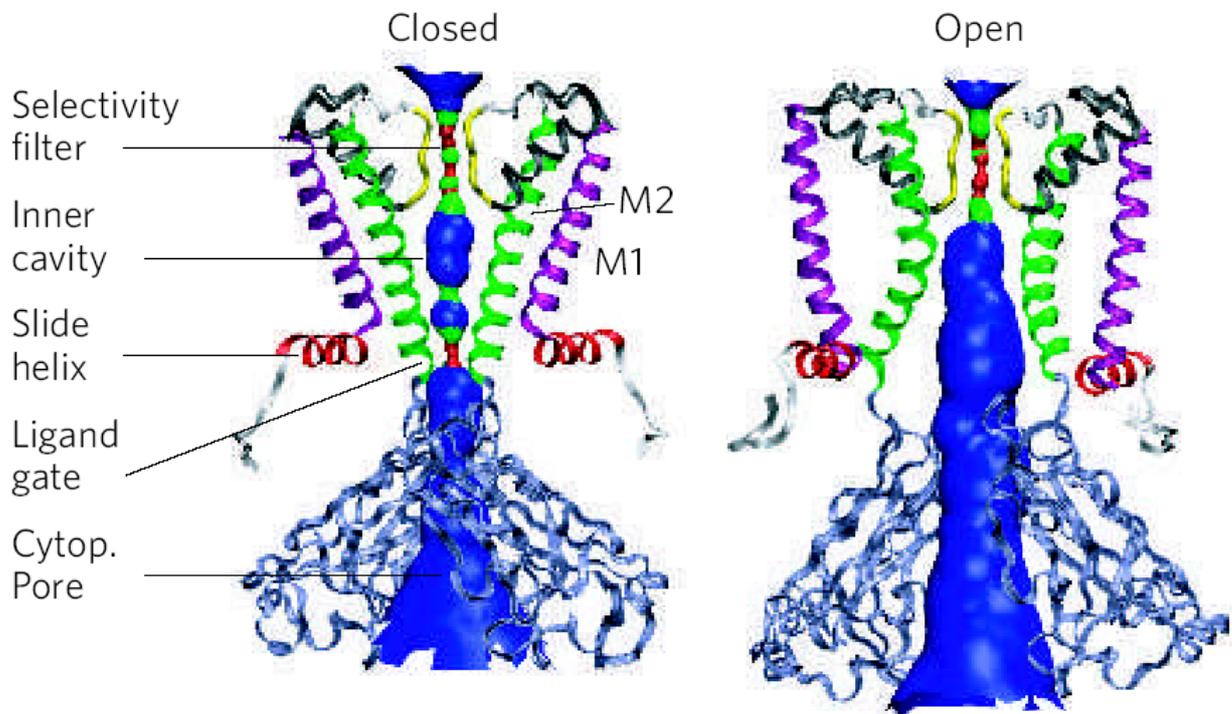


Abb. 1-2: Hypothetische Struktur der α -Untereinheit eines Kir-Kanals (modelliert auf Grundlage der Kristallstruktur des verwandten bakteriellen KirBac3.1) in geschlossenem (links) und offenem Zustand (rechts). Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind nur zwei Untereinheiten des Tetramers gezeigt. Die im geschlossenen Kanal trichterförmig aufeinander zulaufenden M2-Helices (grün) bilden nahe der Membraninnenseite die innere Kanalpforte („ligand gate“, rot), die P-Schleife (gelb) nahe der Membranaußenseite den Selektivitätsfilter. Auf die Rolle der Gleithelix („Slide helix“, rot) für die Steuerung der inneren Kanalpforte wird in Kap. 6 ausführlicher eingegangen. Der blau ausgefüllte Raum ist zugänglich für Wasser. (Abb. entnommen aus Nichols, 2006)

Die Aktivitätsänderungen („gating“) des Kanals spiegeln das Öffnen und Schließen der beiden Pforten wider. Das Öffnen der inneren Pforte wird allgemein als die Ursache für die sog. „Bursts“ („Ausbrüche“) angesehen, während sie in den Phasen zwischen den „Bursts“

geschlossen ist (vgl. Abb. 1-3). Kurzzeitige Schließungen („Flickern“) innerhalb der „Burst-Phasen“ werden hingegen auf Änderungen im Bereich des Selektivitätsfilters zurückgeführt. Entsprechend spricht man zuweilen auch von einer langsamen und einer schnellen Pforte („slow gate“ und „fast gate“). Das „Gating“ der inneren (langsamen) Kanalpforte wird durch eine Reihe von cytoplasmatischen Faktoren bestimmt, weshalb man auch von der ligandgesteuerten Pforte („ligand gate“) spricht. Je nach Kir-Subtyp handelt es sich bei diesen regulierenden Faktoren u.a. um Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP₂), Arachidonsäure, Na⁺, Mg²⁺, den pH-Wert, die βγ-Untereinheiten heterotrimerer G_K-Proteine, ATP, Phosphorylierung, Oxidation/Reduktion, PDZ-Domänen und den Sulfonylharnstoffrezeptor (SUR).

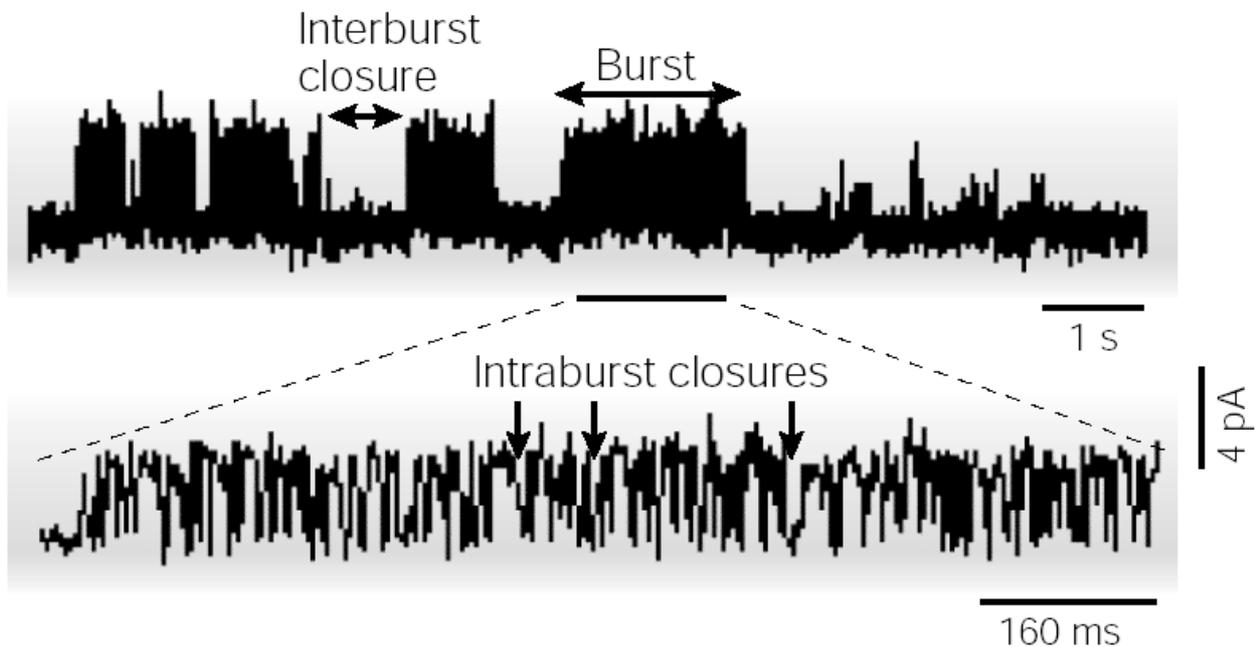


Abb. 1-3: „Gating“ (Aktivitätsprofil) eines Kir-Kanals. Kanalaktivität (Ausgang der Stromlinie nach oben) in Form von „Bursts“ („Ausbrüchen“) spiegelt vermutlich das Öffnen der inneren Pforte („slow gate“) wider, schnelles Öffnen und Schließen innerhalb eines „Bursts“ hingegen Veränderungen im Bereich des Selektivitätsfilters. (Abb. entnommen aus Bichet et al., 2003)

Kir-Kanäle erlauben bevorzugt einen Einstrom von K⁺ in die Zelle hinein, während der K⁺-Ausstrom (bei einem Membranpotential größer als das K⁺-Ruhepotential) durch intrazelluläre Amine (Putrescin, Spermidin, Spermin) und Mg²⁺ gehemmt wird (vgl. Abb. 1-4). Dieses als „Einwärtsgleichrichtung“ bezeichnete Verhalten ist bei den verschiedenen Kirs unterschiedlich stark ausgeprägt. Während Kir2 und Kir3 starke Gleichrichter darstellen, zeigen Kir1 und Kir6 nur geringe Gleichrichtung, was mit der Bindungsaffinität der jeweiligen Kanäle für die blockierenden Kationen korreliert.

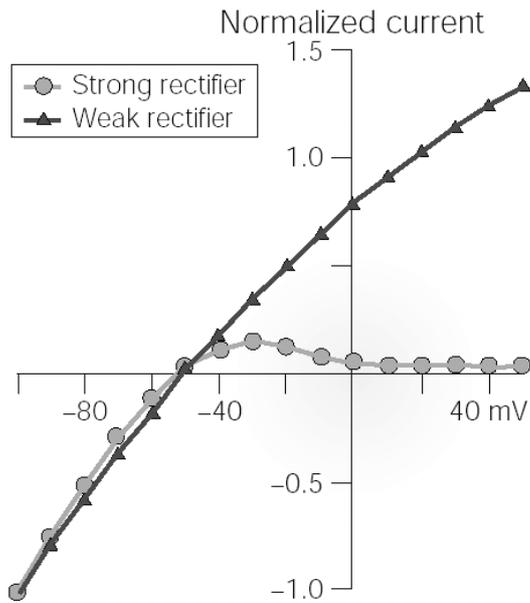


Abb. 1-4: Einwärtsgleichrichtung des K^+ -Stroms durch einen schwach und einen stark gleichrichtenden Kanal. (Abb. entnommen aus Bichet et al., 2003)

1.1.4 K_{2P} -Kanäle

Bei den Tandem- K^+ -Kanälen (K_{2P} -Kanäle) weisen die α -Untereinheiten jeweils zwei Porendomänen auf (vgl. Abb. 1-1). Entsprechend geht man davon aus, dass sich die α -Untereinheiten für die Bildung der vollständigen Pore zu Dimeren vereinigen. Gegenwärtig sind 15 Vertreter dieser Familie in Säugern bekannt, die in verschiedensten Körperregionen angetroffen werden. Ihre oft als „Hintergrund-“ und „Leckströme“ bezeichnete Aktivität stellt einen stark regulierten Mechanismus zur Aufrechterhaltung des Ruhepotentials und zur Steuerung der zellulären Erregbarkeit, der Weiterleitung von Sinnesreizen, des Ionentransports und der Anpassung des Zellvolumens dar. Auch für die Regulation bestimmter metabolischer und apoptotischer Prozesse wird den K_{2P} -Kanälen Bedeutung beigemessen. Für eine Fülle von chemischen und physikalischen Stimuli wurde ein Einfluss auf K_{2P} -Kanäle gezeigt. Neben Sauerstoffgehalt, pH, Lipiden, mechanischem Stress, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und Neurotransmittern, finden hier auch verschiedene gängige Arzneimittel wie Anästhetika, Antidepressiva und neuroprotektive Medikamente einen molekularen Angriffspunkt (Übersicht bei Goldstein et al., 2005; Lotshaw, 2007).

1.2 K_{ATP} -Kanäle

1.2.1 Aufbau des K_{ATP} -Kanals

Bei den porenbildenden Untereinheiten der ATP-empfindlichen K^+ -Kanäle (K_{ATP} -Kanäle) handelt es sich um Kir6.1 (424 Aminosäuren (AS), 48 kD, Gen: KCNJ8) bzw. Kir6.2 (390 AS, 44 kD, KCNJ11) aus der Familie der einwärts gleichrichtenden K^+ -selektiven Ionenkanäle (vgl. Kap. 1.1.3). Die von ihnen gebildeten Kanäle zeigen eine Leitfähigkeit von ~ 35 pS (Kir6.1) bzw. ~ 80 pS (Kir6.2) (Repunte et al., 1999). Bemerkenswert ist ihre Assoziation mit dem Sulfonylharnstoffrezeptor SUR1 (1581 AS, 177 kD, ABCC8) bzw. SUR2 (1549 AS, 174 kD, ABCC9) zu einem heterooktameren (Kir/SUR)₄-Komplex (Inagaki et al., 1997; Clement IV et al., 1997; Shyng und Nichols, 1997). Diese Assoziation ist für eine Integration des Kanals in die Cytoplasmamembran zwingend erforderlich, da sowohl die Kir6- als auch die SUR-Sequenz das ER-Retentionsmotiv RKR (RKQ im Fall von SUR2) beinhalten. Nur bei Maskierung dieser Motive durch Ausbildung des vollständigen Kanalkomplexes erfolgt dessen Transfer vom ER (Endoplasmatisches Reticulum) in die Cytoplasmamembran (Zerangue et al., 1999).

Wie schon ihr Name andeutet, ist die Steuerung durch ATP eine wichtige Eigenschaft der K_{ATP} -Kanäle. Die Bindung von ATP an Kir6 ruft eine Hemmung des Kanals hervor, während besonders MgADP über den SUR die Offenwahrscheinlichkeit erhöht (Tucker et al., 1997). Auf diesem Weg kommt es zu einer Kopplung der Kanalaktivität an den metabolischen Zustand der Zelle. Die komplexe Regulation der Kanäle wird in Kap. 1.2.3 ausführlich erörtert.

Hochauflösende Kristallstrukturen des K_{ATP} -Kanals bzw. seiner Untereinheiten sind gegenwärtig nicht verfügbar. Mikhailov und Kollegen gelangten mittels Einzelpartikel-elektronenmikroskopie an gereinigten Tetrameren eines Kir6.2-SUR1-Fusionsproteins zu einem dreidimensionalen Bild des Kanals in einer Auflösung von 18 Å. Die erfolgreiche Integration von auf Basis der aufgeklärten Strukturen verwandter bakterieller Proteine berechneter Kir6.2- und SUR1-Modelle in diese Struktur führte Mikhailov et al., 2005 zu der in Abb. 1-5 dargestellten Anordnung der Kanalproteine. Abb. 1-6 zeigt eine weitere „Hilfsstruktur“ eines K_{ATP} -Kanals (Kir6.2/SUR2), ebenfalls modelliert anhand bereits bekannter Strukturen aus Prokaryoten.

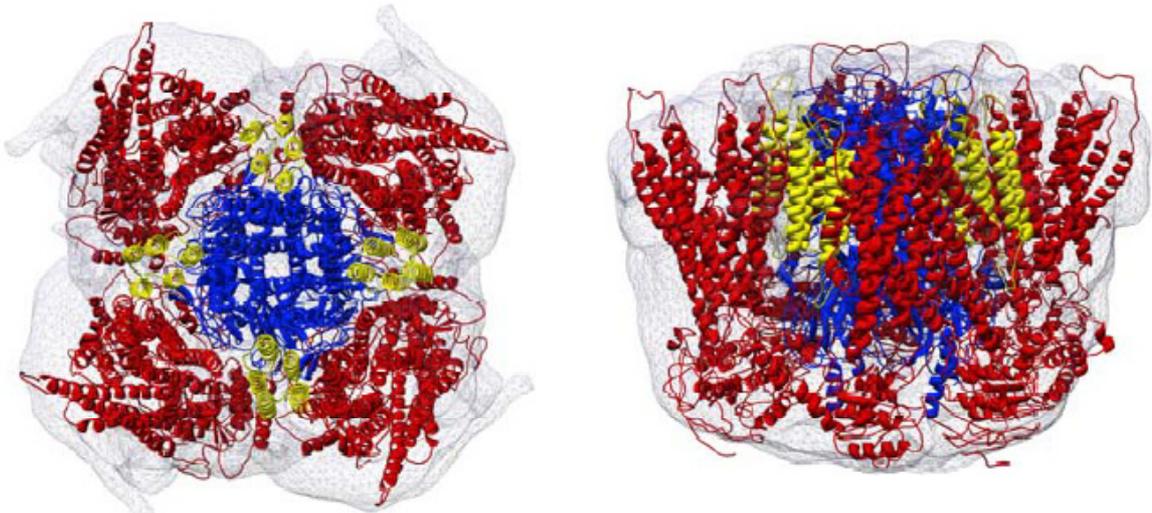


Abb. 1-5: Aktuelles Modell zum räumlichen Aufbau des K_{ATP} -Kanals, erzeugt durch Positionierung von Kir6.2- und SUR1-Modellen in die niedrig aufgelöste elektronenmikroskopische Struktur des vollständigen Kanals. Kir6.2 ist blau, die Transmembrandomäne TMD0 von SUR1 gelb, der Rest des SUR1-Moleküls rot dargestellt. links: Aufsicht; rechts: Seitenansicht. (Abb. entnommen aus Mikhailov et al., 2005)

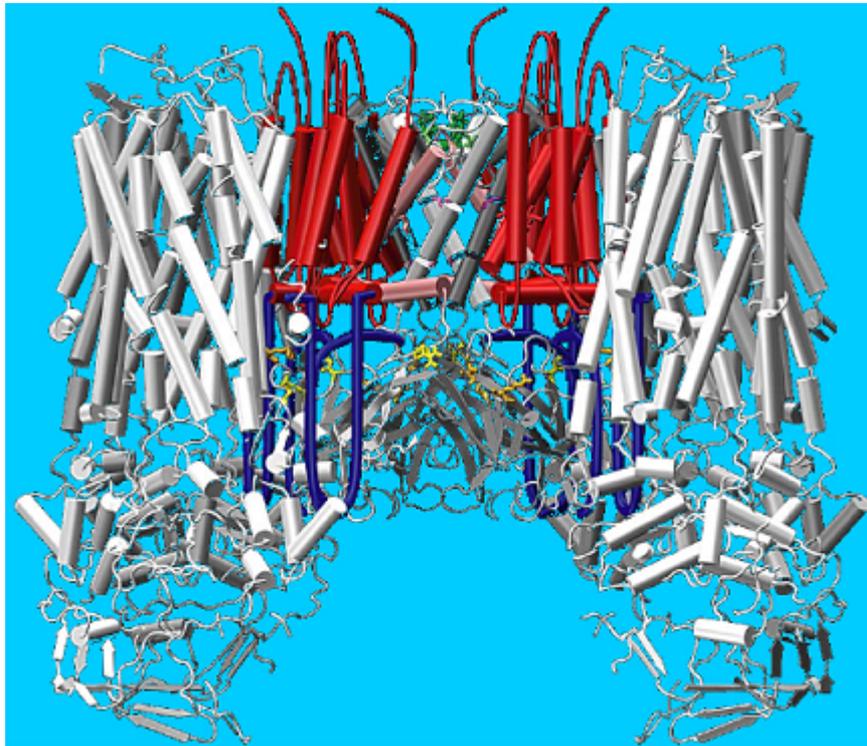


Abb. 1-6: Strukturmodell von Kir6.2/SUR2 (Seitenansicht), basierend auf den Strukturen des bakteriellen K^+ -Kanals KirBac1.1 und des bakteriellen ABC-Transporters Vc-MsbA. Zur anschaulichen Darstellung sind nur je zwei Kir- und SUR-Untereinheiten gezeigt. N-Terminus, M1- und Glythelix der Kirs sind hellrot dargestellt, Phenylalanin im Selektivitätsfilter grün, die inhibitorischen ATP-Bindungsstellen gelb. TMD0 von SUR ist dunkelrot, die cytosolische Schleife L0 (vgl. Kap. 1.2.1.1.1) dunkelblau gefärbt. (Abb. entnommen aus Babenko, 2005)

1.2.1.1 Die regulatorische K_{ATP} -Kanal-Untereinheit SUR

1.2.1.1.1 ABC-Proteine

Die Transmembranproteine SUR1 und SUR2 zählen zur Familie der ABC-Proteine. Im Gegensatz zu den SURs, die im K_{ATP} -Kanal rein regulatorische Aufgaben haben, fungieren die meisten der übrigen Mitglieder dieser Familie als Transporter (Übersicht bei Klein et al., 1999). Ihre Transmembrandomänen (TMD) bestehen in der Regel aus je sechs Transmembranhelices. Das cytosolische ATP-bindende Segment („ATP binding cassette“), dem die ABC-Proteine ihren Namen verdanken, enthält zwei für die ATP-Bindung verantwortliche kurze, konservierte Peptidmotive („Walker A“ und „Walker B“), sowie die „ABC-Signatur“, einen weiteren konservierten Sequenzabschnitt zwischen Walker A und Walker B. Der gesamte ca. 200-250 Aminosäuren lange Proteinabschnitt wird oftmals als NBF oder NBD (Nukleotidbindungsfalte oder -domäne) bezeichnet. Ein ABC-Transporter benötigt nach heutigem Kenntnisstand mindestens zwei der besagten Transmembrandomänen, sowie zwei NBFs. Diese Domänen können Bestandteil eines einzigen Proteins sein oder in einem Multiproteinkomplex assoziiert vorliegen.

In aktiven Transportern ist die kooperativ verlaufende Hydrolyse von ATP an den NBFs an den Transport des jeweiligen Substrats gekoppelt. Zu den Substraten zählen auch Pharmaka wie Krebsmedikamente, HIV-Proteaseinhibitoren, Antibiotika, Antidepressiva, Antiepileptika und Schmerzmittel. Die Namen vieler ABC-Transporter wie MDR1 (multidrug resistance protein 1), MRP1 (multidrug resistance-associated protein 1) oder BCRP (breast cancer resistance protein) zeugen von den teils gravierenden therapeutischen Beeinträchtigungen, die entstehen, wenn durch Transport aus der Zelle heraus bzw. in intrazelluläre Kompartimente hinein, die erwünschten cytosolischen Wirkstoffkonzentrationen nicht erreicht werden. Auch sind ABC-Transporter ein wichtiger Bestandteil der Blut-Hirn-Schranke. Sie minimieren/verhindern in vielen Fällen unerwünschte neurotoxische Arzneimittelnebenwirkungen, stellen andererseits jedoch oft ein Hindernis bei der gezielten Behandlung von Krankheiten des zentralen Nervensystems dar (Löscher und Potschka, 2005). Diese Phänomene haben zu großem Interesse an ABC-Proteinen und ihrer Funktion geführt, sowie zur Entwicklung einer Reihe von Prüfsystemen, um bereits möglichst früh die Wechselwirkungen neuer klinischer Wirkstoffe mit ABC-Transportern zu untersuchen (Szakács et al., 2008).

Für die SUR-Proteine ist keine Transportaktivität bekannt. Erwähnt sei jedoch, dass SUR1 in den β -Zellen des Pankreas nicht nur als regulatorische Untereinheit des K_{ATP} -Kanals fungiert, sondern anscheinend auch eine wichtige Funktion bei der Modulation von apoptotischen Prozessen durch u.a. das Östrogen 17β -Estradiol ausübt (Ackermann et al., 2009).

Die in Abb. 1-7 dargestellte Topologie von SUR1 und SUR2 beruht auf dem bis heute gültigen Modell von Tusnády et al., 1997. Neben den beiden für ABC-Proteine typischen Transmembrandomänen mit je sechs Transmembranhelices, weist der Sulfonylharnstoffrezeptor N-terminal eine weitere Transmembrandomäne mit fünf Helices auf, die über eine als L0 oder CL3 bezeichnete cytoplasmatische Schleife mit dem Rest des Proteins verbunden ist. Die Funktion dieser als TMD0 bezeichnete Domäne (in Abb. 1-5 gelb dargestellt), die SUR1, SUR2 und einigen MRP-Proteinen zu einer Sonderstellung innerhalb der ABC-Proteinfamilie verhilft, ist trotz mehrerer Studien noch nicht vollständig aufgeklärt. Während z.B. MRP1 durch Deletion von TMD0 und L0 seiner Funktionalität beraubt wird, scheint das Anfügen dieser Domänen an MDR1 (welches in seiner natürlichen Form nicht über diese Segmente verfügt) auf diesen keine Auswirkungen zu haben (Bakos et al., 2000). Kap. 5 beschäftigt sich eingehend mit den Folgen, die der Verlust von TMD0 für SUR2 und dessen Interaktion mit Kir6.2 nach sich zieht.

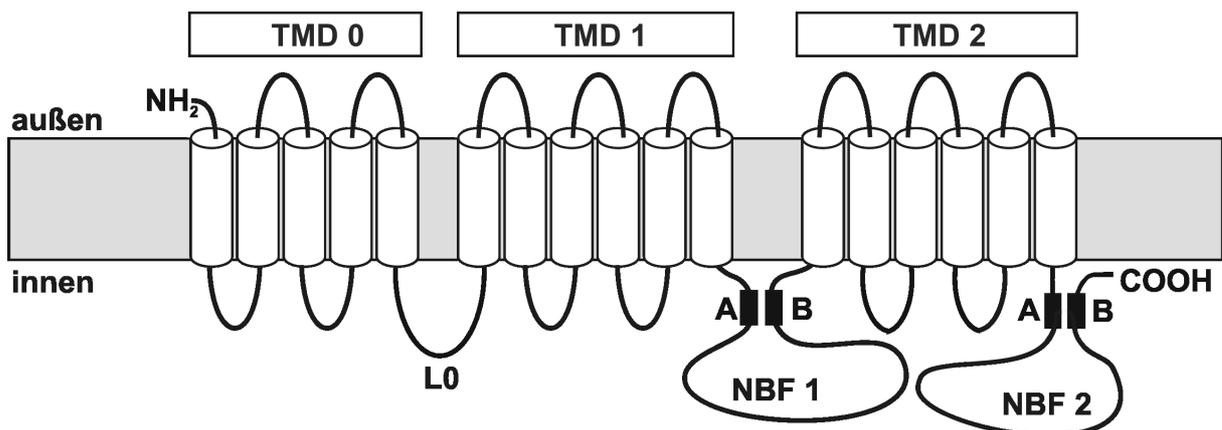


Abb. 1-7: Topologie von SUR1 und SUR2. Neben zwei TMDs mit je sechs Transmembranhelices und zwei NBFs besitzen diese ABC-Proteine am N-Terminus eine weitere TMD mit fünf Helices (TMD0), die über eine als L0 oder CL3 bezeichnete cytoplasmatische Schleife mit dem Rest des Proteins verbunden ist. TMD: Transmembrandomäne, NBF: Nukleotidbindungsfasern, A,B: Walker A, Walker B (vgl. Text).

1.2.1.1.2 SUR-Spleißvarianten

Die humanen KCNJ8- (codiert für Kir6.1) und KCNJ11-Gene (codiert für Kir6.2) liegen auf Chromosom 12 bzw. 11 und setzen sich aus drei bzw. einem Exon zusammen (Inagaki et al., 1995b; Inagaki et al., 1995a). Im Vergleich hierzu drängt sich bei den relativ großen für SUR1 und SUR2 codierenden Genen ABCC8 (auf Chromosom 11) und ABCC9 (auf Chromosom 12) mit je 39 Exons (Aguilar-Bryan et al., 1998) die Frage nach potentiellen durch alternatives Spleißen entstehenden SUR-Isoformen auf.

Die wohl wichtigsten SUR2-Isoformen, SUR2A (Inagaki et al., 1996) und SUR2B (Isomoto et al., 1996), unterscheiden sich in ihren letzten 42 Aminosäuren, bedingt durch alternative Nutzung der letzten beiden Exons (SUR2A: Exons 1-38, SUR2B: Exons 1-37 & 39). Auf mRNA-Ebene wurde auch eine SUR2A-Variante ohne Exon 14 (SUR2A Δ 14), sowie SUR2A- und SUR2B-Varianten ohne Exon 17 (SUR2 Δ 17) (Chutkow et al., 1999) bzw. ohne die Exons 17 und 18 (SUR2 Δ 17,18) (Aguilar-Bryan et al., 1998) nachgewiesen. SUR2A Δ 17 und SUR2B Δ 17 bilden bei Co-Expression mit Kir6.2 in Säugerzellen funktionelle rekombinante Kanäle, nicht jedoch SUR2A Δ 14 (Chutkow et al., 1999; Davis-Taber et al., 2000). Zwei kurze SUR2-Formen ohne NBF1 mit apparenten Molekulargewichten von 68 und 28 kD, die zusammen mit Kir6.2 Glibenclamid-unempfindliche K_{ATP} -Kanäle bilden, wurden von Pu et al., 2008 in ventrikulären Cardiomyocyten gefunden.

Sakura et al., 1999 isolierten aus einer cDNA-Bibliothek (Hypothalamus, Ratte) eine Spleißvariante von SUR1, in der das Fehlen von Exon 33 zu einer Verschiebung des Leserasters und infolgedessen zu einem verkürzten Protein ohne NBF2 führt. Mit Kir6.2 bildet dieser Kanal in *Xenopus* Oocyten einen K_{ATP} -Kanal mit im Vergleich zum Wildtyp erhöhter Offenwahrscheinlichkeit und verringerter ATP-Empfindlichkeit. Gros und Kollegen beschrieben ein ABCC8-Transkript ohne Exon 31 in der insulinsezernierenden Zelllinie RINm5F (Ratte), das für einen SUR1 codiert, dem die Transmembranhelices 16 und 17 fehlen (vgl. Abb. 1-7). Nach Co-Expression mit Kir6.2 in HEK293-Zellen konnte dieser SUR1 jedoch nicht in der Cytoplasmamembran nachgewiesen und somit auch kein K_{ATP} -Strom gemessen werden (Gros et al., 2002). Auch für SUR1 Δ 17, SUR1 Δ 19, SUR1 Δ 17,19 und ein von den Exons 31-39 gebildetes SUR1-Fragment konnte die Existenz entsprechender mRNAs mittels PCR belegt werden. Von diesen SUR1-Spezies erwies sich jedoch nur SUR1 Δ 17 als in der Lage, mit Kir6.2 einen funktionellen K_{ATP} -Kanal zu bilden (Hambrock et al., 2002b).

Die Expressionslevel von z.B. SUR2 Δ 17 sind zumindest auf mRNA-Ebene teilweise sehr hoch (Davis-Taber et al., 2000), die Relevanz dieser SUR-Varianten für das physiologische

Membranpotential entsprechender Zellen jedoch kaum erforscht. Dies ist vermutlich der Grund, warum abgesehen von der überschaubaren Zahl an Arbeiten, die sich gezielt mit der Frage nach alternativen Spleißformen beschäftigten, die meisten Publikationen auf dem Gebiet der K_{ATP} -Kanäle lediglich zwischen SUR1, SUR2A und SUR2B unterscheiden. Experimente im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden ausschließlich am rekombinanten Kanal in HEK293-Zellen durchgeführt. Die für SUR1, SUR2A und SUR2B codierenden cDNAs umfassten (soweit nicht ausdrücklich anders beschrieben) stets sämtliche Exons (auf den Unterschied zwischen SUR2A und SUR2B wurde oben hingewiesen).

1.2.1.2 Gewebsspezifische Kombination von Kir6.1, Kir6.2, SUR1, SUR2A und SUR2B

ATP-empfindliche K^+ -Kanäle wurden zunächst im Herz beschrieben (Noma, 1983), in der Folgezeit jedoch auch im Gehirn, den β -Zellen des Pankreas, der Skelettmuskulatur, sowie der glatten vaskulären und nicht-vaskulären Muskulatur nachgewiesen (Übersicht bei Seino und Miki, 2003). Unterschiede zwischen den K_{ATP} -Kanälen dieser verschiedenen Gewebe, hinsichtlich ihrer elektrischen Eigenschaften und ihrer Sensitivität für Nukleotide, Pharmaka, etc., beruhen vor allem auf der Kombination unterschiedlicher Kir- und SUR-Untereinheiten zu gewebsspezifischen K_{ATP} -Kanal-Subtypen (vgl. Tab. 1-1). Der pankreatische K_{ATP} -Kanal setzt sich aus je vier Kir6.2- und vier SUR1-Untereinheiten zusammen (Inagaki et al., 1995a). Den selben Aufbau zeigen K_{ATP} -Kanäle in den GABAergen Neuronen der Substantia nigra pars reticulata (Liss et al., 1999). Weniger klar ist die Zusammensetzung des K_{ATP} -Kanals in anderen Regionen des Gehirns, für die z.T. auch Kir6.1 und SUR2 nachgewiesen wurden (Übersicht bei Liss und Roeper, 2001). Kürzlich veröffentlichten Arbeiten von Flagg et al., 2008 zufolge tritt der Typ $(Kir6.2)_4/(SUR1)_4$ auch in den Vorhöfen (Atrien) des Herzens auf, wohingegen die elektrophysiologischen Eigenschaften der K_{ATP} -Kanäle in den Myocyten der Herzkammern (Ventrikel) mit denen von rekombinanten Kanälen aus Kir6.2 und SUR2A übereinstimmen (Babenko et al., 1998). Auch im Skelettmuskel sind die K_{ATP} -Kanäle aus den letztgenannten Untereinheiten aufgebaut (Inagaki et al., 1996). Beim in der glatten Muskulatur vorherrschenden Sulfonylharnstoffrezeptor handelt es sich um SUR2B. Im vaskulären K_{ATP} -Kanal liegt er im Komplex mit Kir6.1 (Yamada et al., 1997), im Dickdarm (Colon) im Verbund mit Kir6.2 vor (Koh et al., 1998).

Tab. 1-1: Aufbau der K_{ATP} -Kanäle in verschiedenen Geweben. Die Tabelle gibt eine Übersicht über die nach heutigem Wissensstand in den jeweiligen Geweben vorherrschenden K_{ATP} -Kanal-Subtypen. In der glatten nicht-vaskulären Muskulatur vermutete man lange Zeit einen K_{ATP} -Kanal der Form $(Kir6.2)_4/(SUR2B)_4$ (Isomoto et al., 1996), in der glatten Muskulatur des Harnleiters scheint die Kanalpore jedoch aus je einer Kir6.2- und drei Kir6.1-Untereinheiten zu bestehen (Teramoto et al., 2009). Heterogene K_{ATP} -Kanäle aus verschiedenen Kir6- und/oder SUR-Untereinheiten existieren möglicherweise auch in anderen Geweben, z.B. im Vorhof des Herzens (vgl. Text).

Gewebe/Organ	K_{ATP} -Kanal
Pankreas (β -Zellen)	$(Kir6.2)_4$ / $(SUR1)_4$
Gehirn	$(Kir6.2)_4$ / $(SUR1)_4$
Herz (Ventrikel)	$(Kir6.2)_4$ / $(SUR2A)_4$
Herz (Atrium)	$(Kir6.2)_4$ / $(SUR1)_4$
Skelettmuskel	$(Kir6.2)_4$ / $(SUR2A)_4$
glatte Muskulatur (Blutgefäße)	$(Kir6.1)_4$ / $(SUR2B)_4$
glatte Muskulatur (nicht-vaskulär)	$(Kir6.2)_4$ / $(SUR2B)_4$
	$(Kir6.1)_3Kir6.2$ / $(SUR2B)_4$

Mischkanäle

Die obige vereinfachte Beschreibung erweckt den Anschein, die verschiedenen Gewebe würden jeweils nur einen Kir6- und einen SUR-Subtyp exprimieren. Tatsächlich aber werden die beiden Kir6-Untereinheiten in vielen Fällen im selben Gewebe exprimiert, beispielsweise in Endothelzellen von Kapillaren (Mederos y Schnitzler et al., 2000), Neuronen (Zawar et al., 1999) und Cardiomyocyten (Zhou et al., 2005). Auch Co-Expression verschiedener SURs wird beobachtet, etwa in dopaminergen Neuronen der Substantia nigra, in denen man mRNAs für alternativ SUR1, SUR2B oder beide SUR-Formen findet (Liss et al., 1999). In der Skelettmuskulatur lässt sich in einigen Fällen neben SUR2A auch SUR1 nachweisen, beispielsweise im kurzen Zehenbeuger (Flexor digitorum brevis) von Ratten (Tricarico et al., 2006). Diese und ähnliche Beobachtungen führten zu der Frage, ob verschiedene Kirs und/oder SURs im selben Kanalkomplex vorliegen können.

Babenko et al., 2000b fusionierten Kir6.2 und Kir6.1 zu „Tetrameren“ wie z.B. Kir-6.1-6.2-6.1-6.2 und demonstrierten in COSm6-Zellen, dass diese Konstrukte mit SUR1 funktionelle K_{ATP} -Kanäle ausbilden, deren elektrische Leitfähigkeit das Zahlenverhältnis von Kir6.1- und Kir6.2-Untereinheiten im Kanal widerspiegelt. Cui und Kollegen gelang nach Co-Expression

von Kir6.1 und Kir6.2 in HEK293-Zellen die Co-Immunopräzipitation (Co-IP) des einen Kir-Subtyps durch den jeweils anderen. Bei zusätzlicher Expression von SUR2B konnten sie anhand von Einzelkanalmessungen die Existenz von fünf Kanalpopulationen mit unterschiedlicher Leitfähigkeit belegen (Cui et al., 2001). Co-IP von Kir6.2 durch Kir6.1 und umgekehrt wurde auch von Pountney et al., 2001 beschrieben. Co-Expression eines (infolge einer Mutagenese des GFG-Motivs im Selektionsfilter zu AAA) nicht-funktionellen Kir6.1 mit Kir6.2/SUR2A bzw. nicht-funktionellen Kir6.2 mit Kir6.1/SUR2A führte außerdem zu einem starken Verlust an Kanalaktivität, was Pountney mit Komplexbildung zwischen mutiertem und wildtypischem Kir, also zwischen Kir6.2 und Kir6.1 erklärte. Zu einem ähnlichen Ergebnis führte die Expression derartiger Mutanten in nativen Herzzellen (van Bever et al., 2004).

Starke Evidenz für „Mischkanäle“ aus Kir6.1 und Kir6.2 in der glatten Muskulatur des Harnleiters (Urether) von Schweinen präsentierte eine erst kürzlich im American Journal of Physiology (Renal Physiology) publizierte Studie (Teramoto et al., 2009). Nachdem RT-PCR die Expression von sowohl Kir6.1 als auch Kir6.2 belegte, konstruierten Teramoto und Kollegen Konkatemere aus Kir6.1 und Kir6.2, exprimierten diese zusammen mit SUR2B in HEK293 und charakterisierten die resultierenden Kanäle hinsichtlich ihres Verhaltens als Einwärtsgleichrichter, ihrer Leitfähigkeit, sowie der Regulation ihrer Aktivität durch Proteinkinase C. Der Vergleich dieser Eigenschaften mit denen der nativen K_{ATP} -Kanäle in den Myocyten des Harnleiters, ergab starke Hinweise, dass in Letzteren jeweils eine Kir6.2- und drei Kir6.1-Untereinheiten die Kanalpore bilden. Wie diese einheitliche Stöchiometrie gewährleistet wird, konnte noch nicht geklärt werden. Viele der biophysikalischen Eigenschaften der $(Kir6.1)_3Kir6.2/(SUR2B)_4$ -Kanäle, wie Regulation durch intrazelluläre Nukleotide oder spontane Aktivierung in Membran-Patches, werden in erster Linie durch die Kir6.2-Untereinheit bestimmt. Diesbezüglich bestätigt die Arbeit von Teramoto die Ergebnisse früherer Untersuchungen (Kono et al., 2000; Babenko et al., 2000b).

„Mischkanäle“ aus Kir6.1 und Kir6.2 existieren möglicherweise auch in den Atrien und in Purkinje-Fasern des Herzens. Hier wurden Leitfähigkeiten festgestellt, die mit 58-60 pS (Baron et al., 1999; Light et al., 1999) zwischen denen reiner Kir6.1- (~ 35 pS) und reiner Kir6.2-Kanäle (~ 80 pS) lagen. In Cardiomyocyten aus neonatalen atrialen Appendizes (Ratte) wurde mittels RT-PCR die Expression sämtlicher K_{ATP} -Kanal-Untereinheiten, also nicht nur von Kir6.2 und SUR2A, sondern auch von SUR1, Kir6.1 und SUR2B nachgewiesen (Baron et al., 1999). Hinsichtlich ihres funktionalen und pharmakologischen Profils nehmen die K_{ATP} -Kanäle dieser Zellen eine Zwischenstellung zwischen den pankreatischen K_{ATP} -

Kanälen (Kir6.2/SUR1) und den K_{ATP} -Kanälen in ventrikulären Cardiomyocyten (Kir6.2/SUR2A) ein. Ersteren ähneln sie in ihrer Sensitivität für Glibenclamid und Diazoxid (vgl. Kap. 1.2.4), Letzteren in ihrer hohen Affinität für Cromakalim, ihrem „Burst“-Verhalten und ihrer Empfindlichkeit gegenüber ATP (Baron et al., 1999). Die Bindung von Glibenclamid, Diazoxid und Cromakalim wird hauptsächlich durch den SUR bestimmt, so dass der Befund von Baron auch als Indiz für K_{ATP} -Kanal-Komplexe angesehen werden kann, die sowohl SUR1- als auch SUR2-Untereinheiten enthalten.

Gegen die Existenz derartiger K_{ATP} -Kanäle sprachen Experimente von Giblin et al., 2002, die an Kir6.2, SUR1 und SUR2A exprimierenden HEK293-Zellen keinen Hinweis auf Kanäle fanden, die beide SUR-Subtypen enthielten. Sechs Jahre später jedoch berichteten Wheeler und Kollegen über die erfolgreiche Co-IP von Kir6.2 und SUR2A mit SUR1. Durch Co-Expression von Fusionsproteinen aus jeweils einer SUR1- oder SUR2A- und zwei Kir6.2 Δ C26-Untereinheiten mit „freiem“ SUR1, SUR2A oder SUR2B gelang letztgenannter Arbeitsgruppe der Nachweis, dass funktionelle K_{ATP} -Kanäle für jede paarweise Kombination aus SUR1, SUR2A und SUR2B möglich sind. Die Aktivität und das pharmakologische Profil dieser „Hybridkanäle“ reflektiert die Zusammensetzung aus den unterschiedlichen SURs (Wheeler et al., 2008). Dies ist ein nicht unwesentlicher Unterschied zur Kombination von Kir6.2 und Kir6.1, bei der der Einfluss der Kir6.2-Untereinheit weitestgehend über den der Kir6.1-Untereinheiten dominiert (Kono et al., 2000; Babenko et al., 2000b; Teramoto et al., 2009). Cheng et al., 2008 nutzten für ihre Untersuchungen, dass die Substitution von Asparagin 160 in der Kanalpore durch Aspartat die Affinität von Kir6.2 für Kationen wie Spermin und Mg^{2+} erhöht und hierdurch eine starke Einwärtsgleichrichtung des K_{ATP} -Stroms bewirkt (Shyng et al., 1997). Bei Co-Expression der Dimerkonstrukte SUR1-Kir6.2(N160D) und SUR2A-Kir6.2 (bzw. SUR2A-Kir6.2(N160D) und SUR1-Kir6.2) entstanden funktionelle K_{ATP} -Kanäle, deren elektrisches Verhalten auf eine Komplexbildung der unterschiedlichen Dimere und somit unterschiedlicher SURs schließen ließ (Cheng et al., 2008). Ähnliche Experimente waren bereits von Chan et al., 2008 durchgeführt worden. Diese Arbeitsgruppe verglich außerdem die ATP- und Tolbutamid-Hemmkurven bei Co-Expression von Kir6.2 mit SUR1 bzw. SUR2A bzw. SUR1 und SUR2A und zog auch aus diesen Messungen den Schluss, dass sich K_{ATP} -Kanäle mit heterogener SUR-Zusammensetzung gebildet hatten.

Die Berichte über heteromultimere K_{ATP} -Kanäle und SUR-Spleißvarianten (vgl. Kap. 1.2.1.1.2) machen deutlich, dass die Angaben in Tab. 1-1 keinen endgültigen Befund darstellen. Vielmehr handelt es sich nur um eine Übersicht über die nach heutigem

Wissensstand jeweils wichtigsten K_{ATP} -Kanal-Subtypen der verschiedenen Gewebe. Ziel zukünftiger Forschungsarbeiten muss es sein, etwaige weitere relevante Subtypen zu identifizieren und charakterisieren, nicht zuletzt um die Voraussetzungen für eine gewebsspezifische Manipulation von K_{ATP} -Kanälen zu schaffen, etwa bei cardialen Ischämien oder einigen Formen episodischer Skelettmuskellähmungen.

1.2.2 (Patho-)Physiologische Bedeutung von K_{ATP} -Kanälen

1.2.2.1 K_{ATP} -Kanäle im Pankreas

K_{ATP} -Kanäle werden mit der Sekretion von Glucagon aus den α -Zellen, Somatostatin aus den D-Zellen und GLP-1 aus den L-Zellen der Langerhans'schen Inseln des Pankreas in Verbindung gebracht (für Referenzen vgl. Ashcroft, 2005). Am besten verstanden wird ihre Funktion jedoch in den β -Zellen, wo sie die Insulinsekretion in Abhängigkeit vom Blutglucosespiegel steuern. Bei substimulatorischem Glucosespiegel ist die Aktivität dieser pankreatischen K_{ATP} -Kanäle hoch genug, um das Membranpotential der Zellen bei ca. -70 mV zu stabilisieren (Übersicht bei Ashcroft und Rorsman, 1989). Ein postprandialer Anstieg der Glucosekonzentration im Blut führt nach Transport der Glucose in die β -Zellen (durch den Transporter GLUT-2 bzw. GLUT-1 (De Vos et al., 1995)) und der dortigen Verstoffwechselung zu einem Anstieg des intrazellulären Konzentrationsverhältnisses von ATP zu ADP, was wie bereits eingangs von Kap. 1.2.1 erklärt, eine Inhibition der K_{ATP} -Kanäle nach sich zieht. Die Folge ist eine Depolarisation der Zellmembran, was ab einem Potential von ca. -50 mV zur Aktivierung von L-Typ Ca^{2+} -Kanälen führt. Das einströmende Ca^{2+} bewirkt schließlich die Exocytose des in Granula gespeicherten Insulins nach einem noch nicht vollständig aufgeklärten Mechanismus (vgl. Kwan und Gaisano, 2009).

Angesichts seiner zentralen Rolle für die Glucose-Homöostase verwundert es nicht, dass Mutationen in den Untereinheiten des pankreatischen K_{ATP} -Kanals (Kir6.2 und SUR1) in einer Hypo- bzw. Hyperglykämie resultieren können. Eine aktuelle und umfassende Übersicht über derartige Mutationen findet sich bei Flanagan et al., 2009. Die nachfolgenden Informationen sind dieser Veröffentlichung entnommen (für Referenzen siehe dort).

Ein wesentlicher oder gar vollständiger Verlust an Kanalaktivität führt dazu, dass selbst bei niedrigem Blutglucosespiegel Insulin ausgeschüttet wird. Die hierdurch bedingte starke Hypoglykämie wird in der Regel bereits in den ersten Monaten nach der Geburt diagnostiziert, weshalb das Krankheitsbild als HI für „Hyperinsulinemia of Infancy“ bezeichnet wird. Auch die Bezeichnungen PHHI (persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy) und CHI (congenital hyperinsulinism) sind gebräuchlich. Die häufigste Ursache für HI stellen Mutationen in dem für SUR1 codierenden Gen ABCC8 dar, von denen bislang bereits mehr als 150 beschrieben wurden, die sich über das gesamte Gen verteilen. Ein Teil dieser Mutationen führt dazu, dass nur geringe Mengen oder überhaupt kein SUR1 gebildet wird, z.B. durch vorzeitigen Abbruch der Translation nach Entstehung eines Stopcodons. In anderen Fällen werden die entstandenen K_{ATP} -Kanäle im ER zurückgehalten (gestörtes „trafficking“), so dass auch hier kein K_{ATP} -Kanal in die Cytoplasmamembran gelangt. Bei einer zweiten Klasse von Mutationen ist die Oberflächenexpression der K_{ATP} -Kanäle nicht entscheidend beeinträchtigt, sie zeigen jedoch keine ausreichende Aktivierbarkeit durch MgADP mehr. Derartige Mutationen liegen meist in den NBFs von SUR1. Für das im Vergleich zu ABCC8 wesentlich kleinere Gen für Kir6.2 (KCNJ11) wurden bislang 24 HI-Mutationen bekannt. Eine Therapie von HI ist in einigen Fällen mit dem K_{ATP} -Kanal-Öffner Diazoxid möglich (vgl. Kap. 1.2.4.2), meist ist jedoch eine (partielle oder totale) Pankreatektomie erforderlich, um die Entstehung schwerer cerebraler Schäden zu verhindern. Kir6.2^{-/-} Knockout-Mäuse zeigen nach ihrer Geburt eine transiente Hypoglykämie, interessanterweise normalisiert sich ihr Blutzuckerspiegel jedoch nach etwa einer Woche. Alte, übergewichtige Kir6.2^{-/-} Knockout-Mäuse entwickeln gar Hyperglykämie und Insulinresistenz, so dass sie ein Tiermodell für Diabetes Typ II darstellen (Seino und Miki, 2003).

Anders als bei HI ist bei neonatalem Diabetes (sofern dieser auf Mutationen in KCNJ11 oder ABCC8 beruht) die Aktivität des pankreatischen K_{ATP} -Kanals erhöht. Die verminderte Insulinsekretion und die daraus resultierende Hyperglykämie können entweder transienter oder permanenter Natur sein. Im ersten Fall kommt es nach einer gewissen Zeit, möglicherweise durch einen Rückgang des Insulinbedarfs des gesamten Organismus oder durch Anpassungen des Pankreas bzw. der β -Zellen, zu einer Kompensation des Defekts und einer Remission des Diabetes. Permanenter neonataler Diabetes mellitus (PNDM) beruht in etwa zwischen einem Drittel und der Hälfte aller Fälle auf Mutationen von Kir6.2, weitere 27 % werden auf Veränderungen von SUR1 zurückgeführt. Im Vergleich zu mutierten K_{ATP} -

Kanälen, die einen transienten Diabetes hervorrufen, ist die ATP-Empfindlichkeit der K_{ATP} -Kanäle bei PNDM noch stärker reduziert, die Kanalaktivität somit noch höher. Betroffene Patienten sind teilweise auf Insulin angewiesen, in vielen Fällen ist jedoch auch eine Behandlung durch K_{ATP} -Kanal-Inhibitoren wie den Sulfonylharnstoff Glibenclamid möglich (vgl. Kap. 1.2.4.1).

Einige Mutationen von Kir6.2 bzw. SUR1, die eine besonders starke Aktivierung des K_{ATP} -Kanals hervorrufen, verursachen das sog. DEND-Syndrom, ein schweres Krankheitsbild, in dem PNDM mit Entwicklungsstörungen, Muskelschwäche und im schlimmsten Fall auch Epilepsie einhergeht. Diese Komplikationen werden dadurch möglich, dass Kir6.2 und SUR1 neben dem Pankreas auch in anderen Geweben und Organen exprimiert werden (vgl. Tab. 1-1).

Sowohl für KCNJ11 als auch ABCC8 wurde eine Vielzahl von Polymorphismen beschrieben (vgl. Supplemente zu Flanagan et al., 2009). Bei den meist gemeinsam auftretenden Polymorphismen Kir6.2(E23K) und SUR1(S1370A) scheint eine Prädisposition für die Entwicklung von Diabetes Typ II vorzuliegen. Dieser tritt typischerweise im Alter auf, bedingt durch die in den Gesellschaften industrialisierter Länder verbreiteten Lebensgewohnheiten (fette Ernährung in Kombination mit Bewegungsarmut) jedoch in zunehmendem Maß auch bei jüngeren Patienten oder sogar Kindern.

Tab. 1-2 und Tab. 1-3 geben einen Überblick über K_{ATP} -Kanal-Mutationen, die mit HI und den verschiedenen Formen von Diabetes in Verbindung gebracht werden.

Tab. 1-2: Assoziation von Varianten in KCNJ11 (codiert für Kir6.2) mit Hyperinsulinismus und verschiedenen Formen von Diabetes. Übersicht nach Flanagan et al., 2009 (siehe dort für Referenzen), ergänzt mit der i-DEND-Mutanten V59A (Winkler et al., 2009). Für den E23K-Polymorphismus wird eine starke Assoziation mit SUR1(S1370A) beobachtet, so dass unklar ist, ob beide bzw. welcher der beiden Polymorphismen verantwortlich für das erhöhte T2D-Risiko ist (Florez et al., 2004). (HI: hyperinsulinemia of infancy, T2D: Diabetes Typ II, TNDM: transient neonatal diabetes mellitus, PNDM: permanent neonatal diabetes mellitus, DEND: developmental delay, epilepsy and neonatal diabetes, i-DEND: intermediate DEND (mildere Form von DEND ohne Epilepsie), X: durch Mutation entstandenes Stopcodon)

HI	(normal)	T2D	TNDM	PNDM	i-DEND	DEND
c.-656G>T		E23K	R34C	F35L	V59A	R50G
c.54C>T			C42R	F35V	V59M	R50P
Y12X			N48D	H46Y	R201C	Q52R
R34H			R50Q	G53N		G53D
G40D			G53R	L164P		V59G
F55L			G53S	K170N		C166F
K67N			A174G	K170R		C166Y
T76fs			E179A	K170T		I167L
W91R			I182V	R201H		I296L
A101D			E227K	R201L		G334D
S116P			E229K	E292G		
G134A			V252A	E322K		
c.405_406insG				Y330C		
R136L				Y330S		
L147P				F333I		
A187V						
P254L						
H259R						
P266L						
P272fs						
c.813delinsTCT						
E282K						
R301H						
C344X						

Tab. 1-3: Assoziation von Varianten in ABCC8 (codiert für SUR1) mit Hyperinsulinismus und verschiedenen Formen von Diabetes. Übersicht nach Flanagan et al., 2009 (siehe dort für Referenzen). Die Nummerierung der Aminosäuren weicht teilweise von den Positionsangaben in den jeweiligen Originalveröffentlichungen ab. Grund hierfür ist, dass durch alternatives Spleißen von Exon 17 zwei SUR1-Isoformen mit einer Länge von 1581 bzw. 1582 Aminosäuren entstehen. Laut Untersuchungen von Flanagan et al., 2009 wird die längere Isoform (zusätzliches Serin an Position 740) allgemein stärker exprimiert, weshalb sie in der vorliegenden Tabelle als Referenz gewählt wurde. Bei den aufgeführten Mutanten handelt es sich um exemplarische Vertreter, für eine umfassendere Übersicht siehe Supplemente zu Flanagan et al., 2009. (für Anmerkung zu SUR1(S1370A) und für Abkürzungen vgl. Tab. 1-2)

HI	(normal)	T2D	TNDM	PNDM	i-DEND	DEND
R74Q		S1370A	V86A	N72S	L213R	F132L
G111R			D212N	V86A		
Y179X			D212I	V86G		
V187D			V324M	A90V		
Y195X			C435R	F132V		
Q219X			L451P	L135P		
c.1176+2T>C			L582V	Q211K		
F591L			R826W	L225P		
L1044LfsX63			H1024Y	E382K		
R1215W			R1183Q	L438F		
c.3992-9G>A			R1183W	N1123D		
K1337N			R1314H	M1290V		
S1387F			R1380C	I1425V		
F1388del			R1380H	V1524M		
R1421C						

1.2.2.2 K_{ATP}-Kanäle im Gehirn

K_{ATP}-Kanäle wurden in mehreren Hirnregionen nachgewiesen, u.a. im Neocortex, im Hippocampus, der Substantia nigra (SNr) und im Hypothalamus. Der Hypothalamus, das wohl wichtigste Steuerzentrum des vegetativen Nervensystems, ist durch die Regulation der Sekretion von Glucagon und Catecholaminen auch an der Glucose-Homöostase beteiligt. Mäuse ohne funktionelles KCNJ11-Gen (Kir6.2^{-/-} Knockout-Mäuse) zeigen bei Hypoglykämie eine im Vergleich zu wildtypischen Mäusen verminderte Glucagonsekretion, Indiz für eine Beteiligung der K_{ATP}-Kanäle an diesem Prozess.

Die Substantia nigra ist reich an K_{ATP}-Kanälen, deren Aktivierung unter metabolischem Stress wie Hypoxie und Hypoglykämie eine Hyperpolarisation der Zellmembran bewirkt. Die

hierdurch reduzierte Erregbarkeit senkt den Energieverbrauch der Neuronen und verbessert ihre Chancen, den metabolischen Stress zu überstehen. Kir6.2^{-/-} Knockout-Mäuse erleiden unter Hypoxie (150 s) mittels Elektroenzephalographie und Elektromyographie nachweisbare Krämpfe und sterben schließlich, während Wildtyp-Mäuse diese Prozedur unbeschadet überstehen. In Letzteren nimmt unter diesen Bedingungen die Erregungsfrequenz der Neuronen ab. Ihre Hyperpolarisation, die in den Knockout-Tieren ausbleibt, lässt sich mit dem K_{ATP}-Kanal-Inhibitor Tolbutamid unterdrücken (Seino und Miki, 2003). Moderate Anstiege der extrazellulären K⁺-Konzentration induzieren eine Vasodilatation (Nguyen et al., 2000), so dass eine K_{ATP}-Kanal-Aktivierung möglicherweise auch zu einer Verbesserung der lokalen Perfusion führt. Darüber hinaus werden Kopplungen von Metabolismus und neuronaler Aktivität auch mit Lernvorgängen, Gedächtnisprozessen und gezielten Bewegungsabläufen in Verbindung gebracht (Lamensdorf et al., 1999; Stefani et al., 1999).

1.2.2.3 K_{ATP}-Kanäle im Skelettmuskel

Kontraktionen der Skelettmuskulatur gehen mit einem starken ATP-Verbrauch einher. Bei Ermüdung des Muskels verliert dieser zunehmend die Fähigkeit, zwischen zwei Kontraktionen vollständig zu entspannen. Aktivierung der K_{ATP}-Kanäle scheint dieser Entwicklung entgegen zu wirken. So ist die Ruhespannung („resting tension“) in der Ermüdungsphase bei Kir6.2^{-/-} Knockout-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp signifikant höher, die Erholung (im Sinn von Zeit bis zur Wiederherstellung der Maximalkraft) verlangsamt.

K_{ATP}-Kanal-Öffner wie Pinacidil verbessern die Symptome einiger Formen episodischer Skelettmuskellähmungen, allerdings sind die kardiovaskulären UAW (Tachycardie und Hypotonie) beträchtlich (Lawson, 1996).

Interessanterweise ist sowohl die basale als auch die insulinstimulierte Glucoseaufnahme in den Skelettmuskel bei Kir6.2^{-/-} Knockout-Mäusen erhöht. Ähnliche Beobachtungen wurden an SUR2^{-/-} Knockout-Mäusen gemacht, der zugrundeliegende Mechanismus ist unklar. (Seino und Miki, 2003)

1.2.2.4 K_{ATP}-Kanäle im Herz

Unter Stress, z.B. bei starker körperlicher Anstrengung oder in Angstsituationen, bewirkt die Ausschüttung von Catecholaminen eine Erhöhung der Herzfrequenz, sowie eine Reihe weiterer physiologischer Veränderungen, die insgesamt die körperliche Leistungsfähigkeit

erhöhen. Um unter diesen Bedingungen eine Überladung der Cardiomyocyten mit Ca^{2+} und den mit dessen Rücktransport verbundenen Energieaufwand oder gar eine Zellschädigung durch Aktivierung Ca^{2+} -abhängiger Proteasen und Lipasen zu vermeiden, wird die Aktionspotentialdauer (APD) verkürzt. Dabei spielt die Aktivierung cardialer K_{ATP} -Kanäle eine wichtige Rolle, wie Untersuchungen an $\text{Kir6.2}^{-/-}$ Knockout-Mäusen zeigten, deren APD-Verkürzung unter adrenergem Stress signifikant schwächer ausfiel. Messungen des Drucks in der linken Herzkammer (LVDP: „left ventricular developed pressure“) dieser bzw. wildtypischer Mäuse belegten, dass die durch den Beta-Agonisten Isoprenalin zunächst in allen Tieren in ähnlichem Maß erhöhte Kontraktionsstärke bei den Knockout-Mäusen nach 10 min deutlich abfällt, die erhöhte Herzleistung also in Abwesenheit des K_{ATP} -Kanals nicht aufrechterhalten werden kann. Extremer β -adrenerger Stress durch Einsatz hoher Isoprenalin-Konzentrationen führt in $\text{Kir6.2}^{-/-}$ Knockout-Mäusen zu Störungen der Repolarisation mit tödlich verlaufenden ventrikulären Arrhythmien (Zingman et al., 2002). Der cardiale K_{ATP} -Kanal besitzt somit elementare Funktion in der Adaption an adrenergen Stress.

Auch unter Ischämie stellt die Aktivierung der K_{ATP} -Kanäle im Herzen und die daraus resultierende Verkürzung der Aktionspotentiale und herabgesetzte Erregbarkeit der Cardiomyocyten ein wichtiges Mittel zur Schonung der zellulären Energiereserven dar. Kurze Ischämie-Intervalle mildern die durch einen anschließenden längeren ischämischen Insult hervorgerufenen Schädigungen des Herzmuskels. Dieses als ischämische Präkonditionierung (IPC) bekannte Phänomen beruht ebenfalls auf der Aktivierung der K_{ATP} -Kanäle. Dies unterstreichen Untersuchungen an $\text{Kir6.2}^{-/-}$ Knockout-Mäusen, in denen anders als in wildtypischen Tieren das Ausmaß eines durch Ischämie verursachten Infarkts durch vorausgehende kurze Ischämieabschnitte nicht verringert wird. In Gegenwart des K_{ATP} -Kanalinhibitors HMR1098 wird auch im Wildtyp keine ischämische Präkonditionierung beobachtet. Strittig ist, welche Bedeutung die mitochondrialen K_{ATP} -Kanälen (mito K_{ATP} oder m K_{ATP} , vgl. Kap. 9.3.3) für die ischämische Präkonditionierung haben und aus welchen Untereinheiten sie aufgebaut sind (Ardehali und O'Rourke, 2005). (Seino und Miki, 2003)

Die massive Öffnung der cardialen K_{ATP} -Kanäle ist auch verantwortlich für die diagnostisch wichtige ST-Streckenhebung bei transmuraalem Infarkt (Li et al., 2000).

1.2.2.5 K_{ATP} -Kanäle in der glatten Gefäßmuskulatur

Der K_{ATP} -Kanal-Öffner Pinacidil induziert in Wildtyp-Mäusen eine Dilatation der Gefäße, verbunden mit einem Abfall des Blutdrucks. In $\text{Kir6.1}^{-/-}$ und $\text{SUR2}^{-/-}$ Knockout-Mäusen bleibt dieser Effekt aus. Die Knockout-Tiere neigen zum plötzlichen Tod als Folge einer

myocardialen Ischämie, die durch Muskelkrämpfe der Herzkranzgefäße ausgelöst wird, ähnlich der Prinzmetal-Angina des Menschen. Dies verdeutlicht die Bedeutung des K_{ATP} -Kanals für die Dilatation der Coronararterien zur Mobilisierung der Coronarreserve. (Seino und Miki, 2003)

1.2.3 Regulation

Nachfolgend werden die wichtigsten bekannten Regulatoren des K_{ATP} -Kanals dargestellt. Die ersten Kapitel beschäftigen sich mit der Regulation durch Nukleotide und Phospholipide. Man weiß jedoch seit geraumer Zeit auch um eine kovalente Modifizierung des Kanals in Form einer Phosphorylierung durch die Proteinkinasen A und C. Des Weiteren liegt der K_{ATP} -Kanal (d.h. das Heterooktamer aus Kir- und SUR-Untereinheiten) in der Zellmembran nicht isoliert vor, sondern im Verbund mit einer Reihe von assoziierten Proteinen, denen wichtige Funktionen bei der Steuerung der Kanalaktivität zugeschrieben wird. Unter diesen Interaktionspartnern finden sich neben dem Actin-Cytoskelett (Korchev et al., 2000) mehrere Schlüsselenzyme des Energiestoffwechsels. Ihre Fähigkeit, in unmittelbarer Nachbarschaft zum K_{ATP} -Kanal ATP und ADP zu generieren bzw. zu verbrauchen, ermöglicht eine besonders wirkungsvolle Kopplung der Kanalaktivität (und somit des Membranpotentials) an den metabolischen Zustand der Zelle. Neben ATP und ADP scheinen in einigen Fällen gar weitere Produkte der von diesen Enzymen katalysierten Prozesse (Lactat, 1,3-Bisphosphoglycerat) direkten Einfluss auf die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals auszuüben.

1.2.3.1 Nukleotide

1.2.3.1.1 Kir-vermittelte Hemmung

Aufgrund der NBFs des Sulfonylharnstoffrezeptors (vgl. Kap. 1.2.1.1.1) wurde ursprünglich angenommen, dass die ATP-Hemmung des K_{ATP} -Kanals durch den SUR vermittelt wird. Expression von Kir6.2 Δ C26 bzw. Kir6.2 Δ C36 (C-terminal verkürzte Kirs ohne ER-Retentionsmotiv, vgl. Kap. 1.2.1) in Abwesenheit von SUR erzeugt jedoch K^+ -Kanäle, deren Aktivität durch MgADP nicht gesteigert, aber sehr wohl durch ATP (unabhängig von Mg^{2+}) gehemmt wird (Tucker et al., 1997).

Auf der Suche nach der Kir-Bindungsstelle für ATP modellierten Antcliff et al., 2005 Kir6.2 (Maus) auf Basis der Röntgenstrukturen von KirBac1.1 und der intrazellulären Domäne von Kir3.1. Die vier ATP-Bindungsstellen werden jeweils von zwei benachbarten Kirs gebildet. In

der Struktur von Antcliff et al., 2005 liegen 17 Aminosäuren in einer Entfernung von $\leq 4.5 \text{ \AA}$ zum ATP: K38, K39 und G40 in der N-Domäne, E179, T180, L181, I182, F183, S184, K185, R201, A300, R301, T302, F333 und G334 in der C-Domäne und R50 in der N-Domäne des benachbarten Kir.

Der Adenin-Ring des ATP liegt in diesem Modell in einer überwiegend hydrophoben Tasche, die durch die Seitenketten von E179, T180, L181 und I182, sowie den Atomen von K38, K39, G40 und R301 in der Peptidhauptkette ausgekleidet wird. Für die Seitenkette von E179 und den Carbonylsauerstoff von R301 in der Peptidhauptkette werden H-Brücken zum N6 im Adenin-Ring vorhergesagt. Derartige Wechselwirkungen könnten mit zu der hohen Selektivität des Kir für Adenin-Nukleotide beitragen. Während Kir6.2 Δ C (Δ C26 oder Δ C36) durch ATP mit einer IC_{50} von ca. 100 μ M gehemmt wird, ist die Potenz von GTP, ITP, CTP und UTP um Größenordnungen geringer (Tucker et al., 1998). So wurde z.B. für GTP eine IC_{50} von 6 mM ermittelt (Trapp et al., 1997).

Für die Phosphate des ATP sagt das Modell von Antcliff und Kollegen elektrostatische Wechselwirkungen mit R201 (α -Phosphat), K185 (β -Phosphat) und R50 (γ -Phosphat) vorher. Mutagenese an diesen drei Positionen bestätigte die Bedeutung dieser Aminosäuren für die ATP-Hemmung von Kir6.2 Δ C. So verringert die Mutation R201C die ATP-Empfindlichkeit drastisch von $IC_{50} = 194 \mu$ M auf $IC_{50} = 14 \text{ mM}$ (Antcliff et al., 2005). Substitution von K185 durch das ebenfalls positiv geladene Arginin (die korrespondierende Aminosäure aus Kir6.1) erhöht die IC_{50} von ATP für Kir6.2 Δ C26 moderat von 85 ± 8 auf $183 \pm 9 \mu$ M, bei Austausch gegen das ungeladene Alanin wächst die IC_{50} auf $490 \pm 29 \mu$ M. Treten die negativ geladenen Aminosäuren Glutamat bzw. Aspartat an die Stelle von K185, geht die hemmende Wirkung von ATP mit IC_{50} -Werten von > 20 bzw. $> 30 \text{ mM}$ weitestgehend verloren (Reimann et al., 1999a). Die Bedeutung des β -Phosphats von ATP für die Hemmung von Kir6.2 Δ C wird auch anhand eines Vergleichs der Potenz von ATP, ADP und AMP ersichtlich: Während für AMP eine IC_{50} von $9.2 \pm 0.5 \text{ mM}$ bestimmt wurde, hemmte ADP in der selben Studie mit einer IC_{50} von $260 \pm 22 \mu$ M, ATP mit einer IC_{50} von $115 \pm 6 \mu$ M (Tucker et al., 1998).

Mutagenese von R50 ergab, dass in Abwesenheit des SUR die Größe der Aminosäure an Position 50 eine Rolle spielt, nicht jedoch Ladung und Hydrophobizität. Dies spricht dafür, dass ohne SUR eine direkte elektrostatische Interaktion zwischen R50 und ATP (dessen γ -Phosphat) für die Hemmung nicht essentiell ist. Passend hierzu ist die Hemmwirkung von ATP in Abwesenheit des SUR nur etwa zwei- bis dreimal stärker als die von ADP. SUR1 erhöht die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals in nukleotidfreier Lösung (Babenko et al., 1999a), gleichzeitig aber auch seine ATP-Empfindlichkeit von $IC_{50} = 130 \mu$ M auf

$IC_{50} = 13 \mu\text{M}$, während sich die ADP-Hemmung lediglich von $IC_{50} = 380 \mu\text{M}$ auf $IC_{50} = 120 \mu\text{M}$ verbessert. Jetzt, d.h. in Gegenwart von SUR, führt die Ladungsumkehr R50D zu einer leicht verminderten ATP-, aber leicht erhöhten ADP-Empfindlichkeit. Anscheinend hat die negative Ladung des Aspartats einen ähnlichen Effekt wie das γ -Phosphat im ATP (John et al., 2005). Diese Befunde stärken die Hypothese, dass R50 mit dem γ -Phosphat von ATP interagiert, und weisen darauf hin, dass diese Wechselwirkung durch den SUR begünstigt wird. Mit SUR2 ist der Zuwachs an ATP-Empfindlichkeit wesentlich schwächer als mit SUR1. Für Kir6.2/SUR2B bestimmten Isomoto et al., 1996 eine IC_{50} von ca. $70 \mu\text{M}$ (ohne Mg^{2+}).

Die Mutation G334D in Kir6.2 hat unter nukleotidfreien Bedingungen keine Auswirkungen (unverändertes „gating“), hebt die ATP-Hemmung des Kanals jedoch völlig auf. Untersuchungen von Markworth et al., 2000 an K_{ATP} -Kanälen, die wildtypischen Kir6.2 und diese ATP-unempfindliche Mutante Kir6.2(G334D) in unterschiedlichen Zahlenverhältnissen enthielten, deuten daraufhin, dass bereits die Besetzung einer der vier Bindungsstellen mit ATP für die Induktion der Kanalschließung ausreichend ist.

Wie gerade erwähnt, erhöht der SUR die hemmende Wirkung von ATP am Kir. In Anwesenheit von Mg^{2+} üben Nukleotide über den SUR jedoch auch eine aktivierende Wirkung auf den K_{ATP} -Kanal aus, so dass sich insgesamt die Potenz der ATP-Hemmung verringert, von $IC_{50} = 6 \mu\text{M}$ ($-\text{Mg}^{2+}$) auf $14 \mu\text{M}$ ($+\text{Mg}^{2+}$) für Kir6.2/SUR1 (Hambrock et al., 2002b), von $IC_{50} = 67.9 \mu\text{M}$ ($-\text{Mg}^{2+}$) auf $300 \mu\text{M}$ ($+\text{Mg}^{2+}$) für Kir6.2/SUR2B (Isomoto et al., 1996). Für Kir6.2/SUR2A konnten Okuyama et al., 1998 mit $148 \pm 34 \mu\text{M}$ ($-\text{Mg}^{2+}$) und $172 \pm 47 \mu\text{M}$ ($+\text{Mg}^{2+}$) allerdings keine signifikante Verschiebung der IC_{50} feststellen, obwohl SUR2A und SUR2B abgesehen von den letzten 42 C-terminalen Aminosäuren identisch sind (vgl. Kap. 1.2.1.1.2). Teilweise weichen die Literaturdaten auch in Abhängigkeit von den jeweiligen genauen Messbedingungen voneinander ab, z.B. geben Reimann et al., 2000 die IC_{50} der ATP-Hemmung ($+\text{Mg}^{2+}$) mit $117 \mu\text{M}$ (Kir6.2/SUR2B) und $29 \mu\text{M}$ (Kir6.2/SUR2A) an.

Handelt es sich bei der porenbildenden Untereinheit um Kir6.1, wie im K_{ATP} -Kanal der vaskulären Muskulatur (vgl. Tab. 1-1), so sind diese Kanäle in nukleotidfreier Lösung geschlossen (Yamada et al., 1997). Applikation von MgATP führt zu einer Aktivierung der Kanäle, was zunächst als Indiz für eine geringe Empfindlichkeit gegenüber der hemmenden Wirkung von ATP interpretiert wurde (Yamada et al., 1997). Dieser Befund und die noch stärkere Aktivierung durch Nukleosiddiphosphate wie MgADP, MgGDP oder MgUDP

fürten dazu, dass Kir6.1-Kanäle anstelle von K_{ATP} - teilweise auch als K_{NDP} -Kanäle bezeichnet werden. Andere Untersuchungen deuten eher darauf hin, dass sich die ATP-Hemmung von Kir6.1 nicht grundlegend von Kir6.2 unterscheidet (Babenko und Bryan, 2001). In diesem Zusammenhang von Interesse sind Berichte über eine zweite Nukleotidbindungsstelle im distalen C-Terminus (AS 319-404) von Kir6.1, die Kir6.2 nicht aufweist (Dong et al., 2005). Über eine etwaige Funktion dieser Bindungsstelle ist bislang jedoch nichts bekannt.

Das unterschiedliche Verhalten von Kir6.1- und Kir6.2-Kanälen in nukleotidfreier Lösung konnte mit Hilfe von Chimären aus Kir6.1 und Kir6.2 auf kurze Peptidabschnitte in den cytosolischen N- (AS 37-44) und C-Termini (AS 243-248) zurückgeführt werden (Nummerierung bezieht sich auf Sequenz von Kir6.2), ohne den zugrundeliegenden Mechanismus aufklären zu können (Kondo et al., 1998). In der selben Studie wurde demonstriert, dass die unterschiedliche Leitfähigkeit (vgl. Kap. 1.2.1) hingegen auf Sequenzunterschieden in dem extrazellulären Abschnitt zwischen M1- und M2-Helix beruht, vermutlich im Bereich zwischen M1-Helix und P-Schleife (vgl. Abb. 1-2, S. 3).

1.2.3.1.2 SUR-vermittelte Aktivierung

Wie bereits erwähnt entwickeln die Nukleotide ihre aktivierende Wirkung durch Interaktion mit den NBFs des SURs. Jede NBF enthält die hochkonservierten Walker A- und Walker B-Motive (Walker et al., 1982), die, wie Untersuchungen mehrerer ATPasen und ABC-Transporter zeigten, die Hydrolyse von ATP katalysieren. Ein für die Nukleotidbindung erforderliches Aspartat in Walker B koordiniert das Mg^{2+} -Ion, während ein Lysin im Walker A mit den γ - und β -Phosphatgruppen des ATP interagiert und essentiell für die ATP-Hydrolyse ist. Man geht davon aus, dass Mutagenese dieses Lysins in NBF1 (K719A) bzw. NBF2 (K1385M, Nummerierung nach SUR1 aus Ratte) die Hydrolyse unterbindet, ohne die ATP-Bindung entscheidend zu beeinträchtigen (für Referenzen siehe Gribble et al., 1997b).

Der genaue Mechanismus der K_{ATP} -Kanal-Aktivierung durch Mg^{2+} -Nukleotide ist bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Grund hierfür ist vor allem die komplexe Kooperativität der NBFs und die Interaktionen der je vier in einem K_{ATP} -Kanal-Komplex assoziierten SURs.

So berichteten de Wet et al., 2007, dass Fusionsproteine aus MBP (maltose binding protein) und NBF1 bzw. NBF2 von SUR1 (unabhängig von $MgATP$) ringartige Komplexe aus wahrscheinlich acht Monomeren bilden, die per Gelfiltration isoliert werden können. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit der Kristallisation einer Reihe prokaryotischer NBFs und ABC-Proteine, die sandwichartige Dimere ausbilden, in denen jeweils Walker A und

Walker B der einen NBF mit der Signatursequenz der anderen NBF interagieren, so dass insgesamt zwei ATP-Bindungsstellen entstehen (für Referenzen siehe de Wet et al., 2007). Dabei ist noch nicht endgültig geklärt, ob die in besagten Dimeren assoziierten NBF1 und NBF2 Bestandteil des selben SURs sind oder von benachbarten SUR-Untereinheiten stammen (Mikhailov et al., 2005).

Des Weiteren übt insbesondere MgATP parallel zur SUR-vermittelten Aktivierung einen stark inhibitorischen Einfluss am Kir aus (s.o.), der die Analyse der aktivierenden Komponente erschwert.

Dennoch konnten einige wichtige Erkenntnisse gewonnen werden, u.a. durch Inkubation von SUR mit 8-azido- $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ bzw. 8-azido- $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, anschließende proteolytische Spaltung des SUR und separate Quantifizierung der Photoaffinitätsmarkierung von NBF1 und NBF2. Es stellte sich heraus, dass für eine Photoaffinitätsmarkierung von SUR1 mit 8-azido- $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ kein Mg^{2+} erforderlich ist. Dieses Mg^{2+} -unabhängige „Labeling“ wird durch Substitution des konservierten Lysins in der Walker A-Sequenz von NBF1 (K719R oder K719M) oder des Aspartats in Walker B von NBF1 (D854N) verhindert, nicht jedoch durch die analogen Mutationen in NBF2 (K1385R, K1385M, D1506N), was für eine Lokalisation der entsprechenden Bindungsstelle in NBF1 spricht (Ueda et al., 1997).

Neben der relativ starken Mg^{2+} -unabhängigen Bindung von 8-azido-ATP an NBF1 von SUR1 ($K_D \approx 4 \mu\text{M}$; vgl. Tab. 1-4, S. 29) wird in Gegenwart von Mg^{2+} auch eine schwächere Bindung an NBF2 beobachtet. Während Ersterer auch bei Verwendung von 8-azido- $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ anstelle von 8-azido- $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ auftritt, ist eine Photoaffinitätsmarkierung von NBF2 mit 8-azido- $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (jeweils in Gegenwart von Mg^{2+}) nicht möglich, Indiz für eine Hydrolyse des NBF2-gebundenen MgATP und fehlende oder nur geringe ATPase-Aktivität von NBF1 (Ueda et al., 1999).

Nach Vorinkubation von SUR1 mit 8-azido- $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ wird dessen Bindung durch MgATP und MgADP, nicht jedoch durch das Mg^{2+} -Salz des schwer hydrolysierbaren γ -Thio-ATP stabilisiert. Mutationen in Walker A (K1385M) und Walker B (D1506N) von NBF2 unterdrücken diesen stabilisierenden Effekt von MgADP, ohne die Photoaffinitätsmarkierung in Abwesenheit von MgADP merklich zu beeinflussen (Ueda et al., 1999). Dies legt nahe, dass SUR1 8-azido- $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ stark an NBF1 bindet und dass MgADP, das an NBF2 bindet bzw. dort durch Hydrolyse aus MgATP entsteht, die Bindung von ATP an NBF1 stabilisiert. Da die Bindung von 8-azido-ATP an NBF1 durch MgADP sogar etwas stärker stabilisiert wird als durch MgATP, ist für diese Stabilisierung vermutlich keine Hydrolyse notwendig.

Vielmehr bewirkt wohl auch die unmittelbare Bindung von MgADP an NBF2 eine Konformationsänderung, die die Affinität von NBF1 für das gebundene ATP noch weiter erhöht. Derartige Konformationsänderungen werden möglicherweise durch obige Mutationen in NBF2 behindert.

Untersuchungen am vollständigen Kanal, d.h. bei Co-Expression von Kir6.2 und SUR1, ergaben, dass für die MgADP-Aktivierung des K_{ATP} -Stroms beide NBFs intakt sein müssen, die Mutationen K719A und K1385M heben jeweils die Aktivierung auf (Gribble et al., 1997b). Auch bei einem Kanal aus Kir6.1 und SUR2B(K707R,K1348R) (Ratte) verhindern die Mutationen in den NBFs eine Aktivierung durch Nukleotide (T. Amann, unveröffentlicht). Ebenso zeigt die KR,KR-Mutante von SUR2B keine Hochaffinitätsbindung des Öffners mehr (vgl. Kap. 1.2.4.2; Schwanstecher et al., 1998; S. Schell, unveröffentlicht).

Auf Basis der obigen Erkenntnisse schlugen Ueda und Kollegen folgendes Modell für die SUR1-vermittelte Aktivierung des K_{ATP} -Kanals durch Nukleotide vor: Der Kanal wird aktiviert, wenn ATP an NBF1 und MgADP an NBF2 von SUR1 bindet. MgADP bindet entweder direkt an NBF2 oder entsteht dort durch Hydrolyse von MgATP. Da unter physiologischen Bedingungen die ATP-Konzentration stets deutlich höher als die ADP-Konzentration ist, ist eine direkte Verdrängung von NBF2-gebundenem MgATP durch MgADP eher unwahrscheinlich. Vielmehr dürfte eine Zunahme der ADP-Konzentration dazu führen, dass durch Hydrolyse von MgATP entstehendes MgADP länger an NBF2 gebunden bleibt und somit ein aktiver Kanalzustand stabilisiert wird. Wenn die intrazelluläre MgADP-Konzentration abnimmt, dissoziiert MgADP von NBF2, was die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals verringert. Des weiteren wird hierdurch die Stabilisierung des NBF1-ATP-Komplexes aufgehoben, so dass in Patch-Clamp-Messungen in nukleotidfreier Lösung auch dieser dissoziieren kann, was möglicherweise mit zu dem in vielen Messungen beobachteten Phänomen einer zunehmenden Kanalinaktivierung („run-down“) beiträgt. Unter physiologischen Bedingungen ist die ATP-Konzentration jedoch stets so hoch, dass es zur Bindung von ATP an NBF1 und zur Hydrolyse von MgATP an NBF2 kommt. Die Stabilität des so erzeugten Zustands und damit die Aktivität des Kanals hängt primär von der MgADP-Konzentration ab. Sulfonylharnstoffe wie Glibenclamid (vgl. Kap. 1.2.4.1) können den Kanal direkt in eine inaktive Form überführen, indem sie die Dissoziation des NBF1-ATP-Komplexes induzieren. Dieser Prozess wird durch NBF2-gebundenes MgADP begünstigt (Ueda et al., 1999; Matsuo et al., 2005).

Bemerkenswerterweise ruft das nicht-hydrolysierbare MgADP-Analogon α - β -Methylen-MgADP keine Aktivierung des Kanals (Kir6.2/SUR1) hervor (Larsson et al., 1993; Gribble et al., 1997b). Sollte das eben beschriebene Modell korrekt sein, muss man annehmen, dass die Methylengruppe des α - β -Methylen-MgADP die Bindung verändert, so dass eine Aktivierung unterbleibt. Andererseits kann auch nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, dass die Azidogruppe des für die Photoaffinitätsmarkierungen verwendeten 8-azido-ATP die Interaktionen mit dem SUR beeinflusst und so zu falschen Interpretationen führt. Wichtig ist auch, festzuhalten, dass die Experimente zur Photoaffinitätsmarkierung von SUR1 im Gegensatz zu den elektrophysiologischen Messungen in Abwesenheit des Kir durchgeführt wurden. Kir6.2 beeinflusst jedoch nachweislich die ATPase-Aktivität von SUR1 (de Wet et al., 2007), so dass Vorsicht bei der Übertragung der am SUR allein gemachten Beobachtungen auf den vollständigen K_{ATP} -Kanal-Komplex geboten ist.

Viele der in diesem Kapitel bisher beschriebenen Eigenschaften der NBFs von SUR1 treffen auch auf SUR2 zu (Matsuo et al., 2000). So handelt es sich auch bei NBF1 von SUR2 um eine Mg^{2+} -unabhängige ATP- und ADP-Bindungsstelle, bei NBF2 um eine Mg^{2+} -abhängige ATP- und ADP-Bindungsstelle. Allerdings genügen für die Bindung von ATP an NBF2 von SUR2 bereits geringste Mg^{2+} -Konzentrationen. Die Bindung von 8-azido-ATP an NBF1 wird durch Bindung von MgATP oder MgADP an NBF2 stabilisiert. Auch für SUR2 sprechen die experimentellen Befunde für eine ATPase-Aktivität von NBF2, bei fehlender oder nur geringer ATPase-Aktivität von NBF1.

Andererseits stellten Matsuo und Kollegen auch klare Unterschiede zwischen den SURs fest. So ist die Affinität von NBF1 für ADP und besonders ATP bei SUR1 höher als bei SUR2. Die entsprechenden Bindungsaffinitäten für NBF2 von SUR2 waren bei SUR2B wiederum deutlich höher als bei SUR2A, Beleg für einen Einfluss des C-Terminus, der zwischen SUR1 und SUR2B hohe Homologie zeigt, jedoch deutliche Sequenzunterschiede zu SUR2A aufweist. Matsushita et al., 2002 gingen der Frage nach, welche der 42 C-terminalen Aminosäuren von SUR2 bei der Aktivierung von Kir6.2/SUR2 durch MgADP entscheidend für die unterschiedliche Reaktion von SUR2A- und SUR2B-Kanälen sind. Nach Untersuchung entsprechender Chimären konnten besagte Unterschiede auf ein Segment von sieben Aminosäuren zurückgeführt werden, welches gemäß einem anhand der Struktur des bakteriellen nukleotidbindenden Proteins HisP entwickelten Modells in räumlicher Nähe zum Walker A von NBF2 liegt. Die Ergebnisse von Matsuo et al., 2000 sind in Tab. 1-4

zusammengefasst. Zu beachten ist, dass auch diese Daten in Abwesenheit des Kir erfasst wurden.

Tab. 1-4: Nukleotidbindung an NBF1 und 2 verschiedener SUR-Subtypen. Die Bindung an NBF1 erfolgt Mg^{2+} -unabhängig (symbolisiert durch „-“ in der rechten Spalte), die Bindung an NBF2 stark (SUR1: „++“) bzw. schwach (SUR2: „+“) Mg^{2+} -abhängig. (nach Matsuo et al., 2000)

		K_I (μ M)		Mg^{2+} - Abhängigkeit
		ATP	ADP	
SUR1	NBF1	4.4 ± 3.7	26 ± 8.6	-
	NBF2	60 ± 26	100 ± 26	++
SUR2A	NBF1	110 ± 41	86 ± 23	-
	NBF2	120 ± 39	170 ± 70	+
SUR2B	NBF1	51 ± 13	66 ± 7.5	-
	NBF2	38 ± 26	67 ± 40	+

Die niedrigeren Bindungsaffinitäten von SUR2A tragen vermutlich zu der unter physiologischen Bedingungen im Vergleich zu Kir6.2/SUR1 (z.B. Pankreas) niedrigeren Aktivität von Kir6.2/SUR2A (z.B. Herz) bei. Falls für die Stimulation des K_{ATP} -Kanals die Besetzung von NBF1 mit ATP erforderlich ist, erschwert außerdem eine Kompetition zwischen ATP und ADP um Bindung an NBF1 im Fall von SUR2, bei dem anders als bei SUR1 die Affinität für ATP und ADP ähnlich ist, die Aktivierung der Kanäle. Bei gleichzeitiger Applikation von 1 mM MgATP ist für die Aktivierung von Kir6.2/SUR2A eine wesentlich höhere MgADP-Konzentration erforderlich als für Kir6.2/SUR2B (Matsuoka et al., 2000), appliziert man jedoch MgADP (100 μ M) alleine, findet sich kein signifikanter Unterschied zwischen Kir6.2/SUR2A und Kir6.2/SUR2B (Reimann et al., 2000), bezeichnend für die Komplexität der zugrundeliegenden Mechanismen.

Neben dem bereits erwähnten Lysin (in Walker A) und Aspartat (in Walker B) wurde für einige weitere Aminosäuren in den NBFs eine wichtige Funktion für die Steuerung des K_{ATP} -Kanals durch Nukleotide demonstriert. Von Interesse war nicht zuletzt die ABC-Signatur (aufgrund ihrer Lage in der Proteinsequenz zwischen Walker A und Walker B auch als „Linker“ bezeichnet), die gemäß dem eingangs beschriebenen Modell an der Bildung der Nukleotidbindungsstelle beteiligt ist. Mutagenese eines stark konservierten Serins in den ABC-Signaturen von NBF1 und NBF2 zu Arginin („S1R“ bzw. „S2R“, wobei die Zahl hier die jeweilige NBF bezeichnet) wirkt sich zwar nicht auf Nukleotidbindung und -Hydrolyse

aus, bei Co-Expression der „S1R“-SURs mit Kir6.2 wird aber dennoch eine verminderte Aktivierung durch MgADP festgestellt. Im Fall von „S2R“-SUR1 und „S2R“-SUR2B unterdrückt die Mutation die MgADP-Aktivierung der resultierenden K_{ATP} -Kanäle sogar komplett, während das Verhalten von Kir6.2/„S2R“-SUR2A interessanterweise keinen Unterschied zum Wildtyp zeigt (Matsuo et al., 2002). Anscheinend beeinträchtigen die Mutationen die Transduktion der MgADP-Bindung in eine Aktivierung des Kanals. Es ist unklar, ob diese Transduktion durch Interaktionen der NBFs mit den Transmembrandomänen von SUR vermittelt wird oder auf direkten Wechselwirkungen zwischen den NBFs und den cytoplasmatischen Domänen von Kir6.2 beruht. In der selben Arbeit wurde auch die Bedeutung zweier weiterer konservierter Aminosäuren der NBFs untersucht: Substitution von Q1426 (zwischen Walker A und ABC-Signatur) oder H1537 (C-terminal von Walker B) in NBF2 von SUR1 gegen Alanin schwächt die Aktivierung des Kanals durch MgADP, ein Hinweis auf eine Beteiligung dieser Aminosäuren an der Nukleotidbindung und/oder der Transduktion. Analoge Mutationen in NBF1 verhindern die Expression eines funktionellen Kanals (Matsuo et al., 2002).

Die Mutation F333I in Kir6.2 reduziert dessen Affinität für ATP und verstärkt die SUR1-vermittelte Aktivierung durch MgATP, so dass Letzteres in einer Konzentration von 1 mM eine massive Steigerung der Kanalaktivität hervorruft, während beim wildtypischen Kir6.2/SUR1 die inhibitorische Wirkung überwiegt (Tammaro et al., 2005). Wie bereits erwähnt heben Mutationen in den NBFs von SUR1 (K719A, K1385M) die aktivierende Wirkung von Mg^{2+} -Nukleotiden auf (Gribble et al., 1997b). Gleichzeitige Expression von Kir6.2(F333I), SUR1(KA,KM) und wildtypischem SUR1 führt zur Entstehung von K_{ATP} -Kanälen mit jeweils 0-4 mutanten SUR1-Untereinheiten. Aus dem Verhalten der Gesamtpopulation dieser Kanäle bei Applikation von MgATP folgerten Tammaro et al., 2005, dass für eine Kanalaktivierung jeweils Bindung/Hydrolyse von MgATP an mindestens drei der vier SURs erforderlich ist.

1.2.3.1.3 Assoziation des K_{ATP} -Kanals mit Adenylatkinase (AK) und Creatinkinase (CK)

Die für die Kanalaktivität relevanten Nukleotidkonzentrationen in der Mikroumgebung des K_{ATP} -Kanals werden vermutlich in starkem Maß durch Co-Lokalisation mit Enzymen des Energiestoffwechsels bestimmt.

Adenylatkinase (AK) katalysiert die Reaktion $\text{ATP} + \text{AMP} \rightleftharpoons 2 \text{ADP}$. Nach Solubilisation von Sarkolemma wiesen Carrasco und Kollegen mittels Co-Immunopräzipitation die Interaktion dieses Enzyms mit dem K_{ATP} -Kanal nach. Diese unmittelbare Nachbarschaft ermöglicht in Patch-Clamp-Messungen an Cardiomyocyten eine Aktivierung des durch ATP inhibierten K_{ATP} -Kanals durch zusätzliche Applikation von AMP. An Cardiomyocyten von Mäusen mit inaktiviertem *ak1*-Gen („knock-out“) bleibt eine solche Aktivierung hingegen aus (Carrasco et al., 2001).

Unter Hypoxie produziert die mitochondriale F_1F_0 -ATP-Synthase kein ATP mehr, sondern hydrolysiert es vielmehr zu ADP. Durch sequentiellen Phosphattransfer ermöglicht Adenylatkinase die schnelle und durch die Co-Lokalisation mit dem K_{ATP} -Kanal zielgerichtete Kommunikation dieses Signals an die daraufhin aktivierten K_{ATP} -Kanäle der Cytoplasmamembran (vgl. Abb. 1-8). Einfache Diffusionsvorgänge würden für eine effektive Signalübermittlung nicht ausreichen, wie Experimente an AK-defizienten Zellen zeigten (Carrasco et al., 2001).

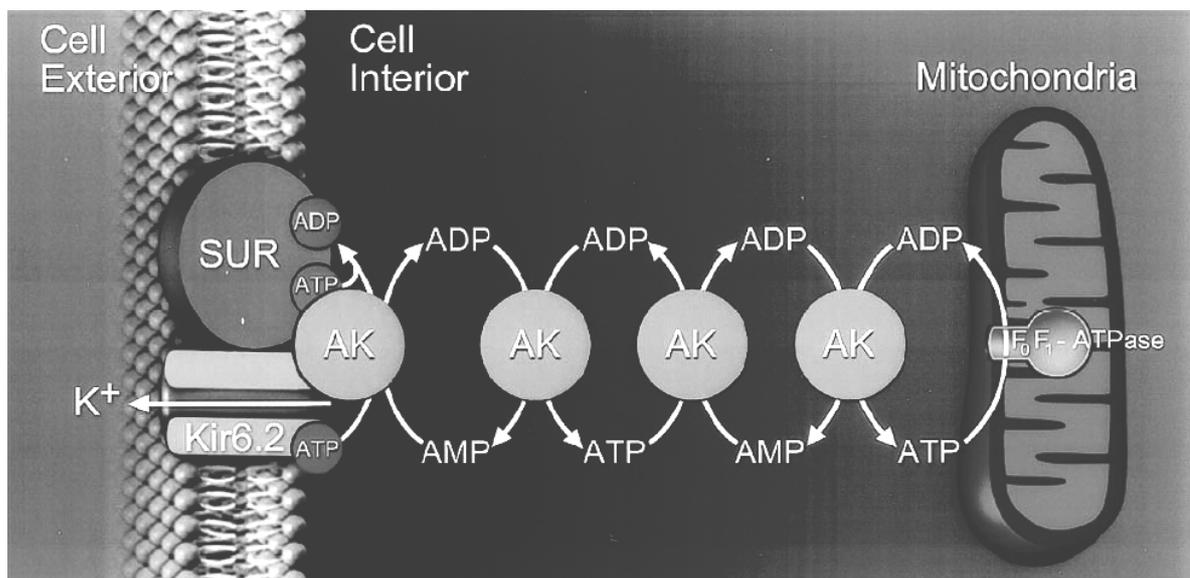


Abb. 1-8: Modell zur zielgerichteten Übermittlung metabolischer Signale von den F_1F_0 -ATP-Synthasen (hier als F_0F_1 -ATPase bezeichnet) der Mitochondrien zu den K_{ATP} -Kanälen der Cytoplasmamembran. In der dargestellten Situation hydrolysiert die F_1F_0 -ATP-Synthase unter hypoxischem Stress ATP zu ADP. Mehrfacher Phosphattransfer, katalysiert durch Adenylatkinase führt schließlich zur Umwandlung von ATP in ADP am Ort des hierdurch aktivierten K_{ATP} -Kanals. (Abb. entnommen aus Carrasco et al., 2001)

Die AK-vermittelte Aktivierung des cardialen K_{ATP} -Kanals durch Bildung von ADP aus AMP und ATP (s.o.) wird zunächst gemacht, wenn der Patch gleichzeitig einer ausreichend hohen

Konzentration Creatinphosphat (CrP) ausgesetzt wird (Carrasco et al., 2001). Creatinphosphat ist Substrat der Creatinkinase (CK), welche die Reaktion $ADP + CrP \rightleftharpoons ATP + Cr$ katalysiert, im beschriebenen Fall also das durch Adenylatkinase gebildete ADP zu ATP umsetzt. Umgekehrt bewirkt die gleichzeitige Applikation von Creatin (Cr) und ATP eine Kanalaktivierung als Folge der Bildung von ADP (Crawford et al., 2002b). Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass neben der Adenylat- auch die Creatinkinase mit dem K_{ATP} -Kanal assoziiert ist, und in der Tat wurde eine solche Assoziation per Co-Immunopräzipitation nachgewiesen. Genauere Untersuchungen belegten, dass der Kontakt zwischen ventrikulär-myocardialem K_{ATP} -Kanal und Creatinkinase über SUR2A, nicht jedoch über Kir6.2 erfolgt (Crawford et al., 2002b).

Die Nukleotiddiffusion ist im Bereich der Membran massiv beeinträchtigt, so dass eine Überbrückung dieser Barriere durch die Phosphattransferaktivitäten von Creatinkinase und Adenylatkinase wohl Voraussetzung für eine schnelle Kopplung zwischen metabolischem Zellstatus und K_{ATP} -Kanalaktivität (und somit Polarisation/Erregbarkeit der Zellmembran) ist (vgl. Illustration für AK in Abb. 1-8). Dies verdeutlichen u.a. Untersuchungen an Cardiomycyten von M-Creatinkinase-defizienten Mäusen (Abraham et al., 2002).

Unter physiologischen Bedingungen katalysiert CK die Produktion von ATP aus Phosphocreatin und ADP und hält somit das ATP/ADP-Verhältnis in der Mikroumgebung des Kanals hoch und den Kanal geschlossen. Ist das Herz starkem metabolischem Stress ausgesetzt, kommt es zu einer Abnahme der Phosphocreatinkonzentration und zur verstärkten ADP-Synthese durch AK und CK, resultierend in einer Aktivierung des cardialen K_{ATP} -Kanals.

1.2.3.2 Phospholipide

Phospholipide sind an der Regulation/Modulation einer Vielzahl von Ionenkanälen und Transportern beteiligt. So weiß man heute, dass sämtliche Kir-Kanäle (vgl. Kap. 1.1.3) u.a. durch inositolhaltige Phospholipide (Phosphoinositide, PI) und langkettige Thioester von Coenzym A (LC-CoA) reguliert werden. Soweit nicht anderweitig gekennzeichnet sind die in diesem Kapitel dargelegten Kenntnisse dem aktuellen Übersichtsartikel von Tucker und Baukrowitz, 2008 entnommen (siehe dort für Referenzen).

Der Anteil von Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat ($PI(4,5)P_2$, PIP_2 , vgl. Abb. 1-9), welches auf alle Kir-Kanäle aktivierend wirkt, an den Phospholipiden der eukaryotischen

Zellmembran beträgt etwa 1 %. Damit ist die Konzentration an PIP₂ mehr als hundertmal höher als die anderer Phosphoinositide wie PI(3,4)P₂ oder PI(3,4,5)P₃. Sie wird durch Phosphoinositid-Kinasen und -Phosphatasen, sowie Phospholipase C (spaltet PIP₂ in IP₃ und Diacylglycerin) bestimmt, deren Aktivitäten wiederum durch G-Proteine und Tyrosinkinasen gesteuert werden. Da PIP₂ neben dem K_{ATP}-Kanal auch viele andere Ionenkanäle und Transporter reguliert und darüber hinaus in weitere zelluläre Prozesse wie Ca²⁺-Signalwege, Endo- und Exocytose, sowie die Organisation des Cytoskeletts involviert ist, ist es unklar, inwieweit eine Steuerung des K_{ATP}-Kanals über eine Änderung der PIP₂-Konzentration möglich ist, ohne mit besagten anderen Prozessen zu interferieren. Denkbar wären lokal begrenzte Anpassungen der PIP₂-Konzentration in der Mikroumgebung des Kanals.

Der in Patch-Clamp-Messungen oftmals mit zunehmender Versuchsdauer beobachtete Verlust an Kanalaktivität („run-down“) wird v.a. auf eine Abnahme der PIP₂-Konzentration zurückgeführt, die durch Applikation von MgATP induzierbare (teilweise) Umkehrung („refreshment“) dieses „run-downs“ entsprechend als Erhöhung der PIP₂-Konzentration durch Phosphoinositid-Kinasen interpretiert.

Während PIP₂ alle Kir-Kanäle aktiviert, stellt die Aktivierung der K_{ATP}-Kanäle durch LC-CoAs wie Oleoyl-CoA (vgl. Abb. 1-9) oder Palmitoyl-CoA eine Besonderheit dar, alle übrigen Kir-Kanäle werden durch LC-CoAs inhibiert. LC-CoAs sind Intermediate des Fettsäuremetabolismus, die nach ihrer Bildung im Cytoplasma in den Mitochondrien zur Energiegewinnung dienen (β -Oxidation). Die Akkumulation von LC-CoAs bei Ischämie trägt möglicherweise zur Aktivierung der kardialen K_{ATP}-Kanäle und der damit verbundenen cardioprotektiven Effekte bei (vgl. Kap. 1.2.2.4). Andererseits wird die Möglichkeit diskutiert, dass eine Aktivierung des pankreatischen K_{ATP}-Kanals durch LC-CoAs in Patienten mit Diabetes Typ II die Insulinsekretion verringert.

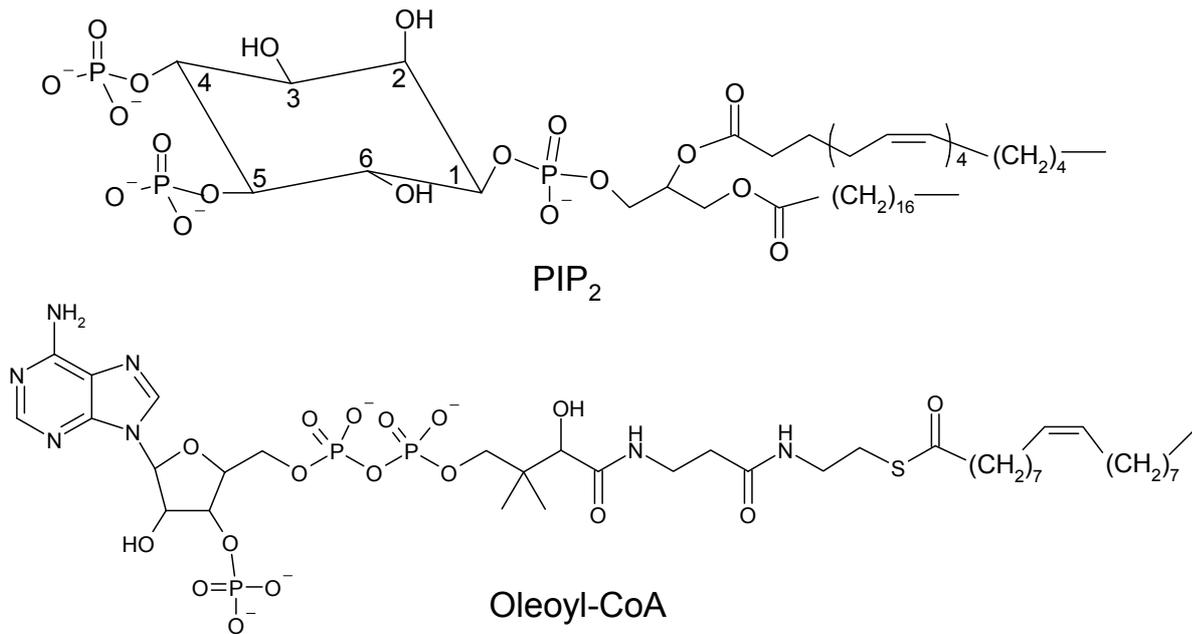


Abb. 1-9: Strukturformeln der Phospholipide Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP₂) und Oleoyl-CoA.

Man geht davon aus, dass die anionische Kopfgruppe der Phospholipide direkt mit einer positiv geladenen Bindungsstelle am Kanal interagiert, während der lipophile „Schwanz“ für eine Verankerung des Moleküls in der Membran sorgt. Divalente Kationen wie Mg²⁺ und Polykationen wie Poly-Lysin und Neomycin interferieren mit der Kanalaktivierung, da sie im Komplex mit Phospholipiden deren negative Ladung abschirmen. Wenngleich diese Beobachtung die Bedeutung der anionischen Kopfgruppe unterstreicht, erwies sich Letztere in inside-out-Patch-Clamp-Experimenten als wirkungslos, wenn sie allein (d.h. als IP₃ oder CoA) appliziert wurde.

Haider et al., 2007 schufen auf Basis der Kristallstrukturen von KirBac1.1 und der N- und C-terminalen Domänen von Kir3.1 und Kir2.1 ein Kir6.2-Strukturmodell. In einem als „ligand docking“ bezeichneten Verfahren berechneten sie, wo eine Bindung von PIP₂ an das Kir6.2-Modell energetisch besonders begünstigt ist. Das Ergebnis der Simulationen war die Identifizierung einer potentiellen PIP₂-Bindungsstelle im jeweiligen Grenzbereich benachbarter Kir-Untereinheiten (d.h. wie bei ATP vier Bindungsstellen pro Tetramer), in der die anionische Kopfgruppe des Phospholipids mit Aminosäuren des N-Terminus (K39, N41, R54), der Transmembrandomänen (K67) und des C-Terminus (R176, R177, E179, R301) interagiert. Die meisten dieser Aminosäuren stammen von der selben Untereinheit, R54 jedoch vom angrenzenden Kir6.2. Das Modell sagt elektrostatische Wechselwirkungen mit den Phosphaten an Position 4 (K39 und R54) und 5 (R176 und R301) des Inositol-Rings

voraus, sowie eine H-Brücke zwischen N41 und dem Phosphat, das den Inositol-Ring mit dem Glycerin verbindet (vgl. Abb. 1-9). Sich an die Modellierungen anschließende funktionelle Studien ergaben, dass die Kir6.2-Mutationen R54E, R54L, R176A und K67L jeweils zu geringeren K_{ATP} -Strömen führen und die Empfindlichkeit von Kir6.2/SUR1 gegenüber Neomycin erhöhen, was auf eine reduzierte Affinität der mutanten Kanäle für PIP_2 zurückgeführt wird. Auch der durch die Kir6.2-Mutationen F55L, K67N und R301H ausgelöste Hyperinsulinismus (vgl. Tab. 1-2) kann als eine Bestätigung der *in silico*-Ergebnisse angesehen werden. Der Verlust der positiven Ladung an Position 67 bzw. 301 schwächt vermutlich die PIP_2 -Bindung. F55 interagiert möglicherweise mit dem „Lipidschwanz“ von PIP_2 , aber auch eine Beeinträchtigung der Wechselwirkungen zwischen R54 und PIP_2 durch die F55L-Mutation ist vorstellbar.

In der Literatur wird auch ein Einfluss von Aminosäuren auf die Wirkung von PIP_2 beschrieben, die nicht in räumlicher Nähe zu der PIP_2 -Bindungsstelle aus dem Modell von Haider liegen. Hier muss man einen allosterischen Einfluss auf die Bindungsstelle und/oder eine Beeinträchtigung der Kopplung zwischen PIP_2 -Bindung und Kanalaktivierung annehmen.

Man geht davon aus, dass bereits bei Besetzung einer Kir-Untereinheit mit PIP_2 eine Aktivierung des Kanals hervorgerufen wird, die mit Bindung weiterer PIP_2 -Moleküle noch gesteigert wird.

Die Aktivierung des K_{ATP} -Kanals durch LC-CoAs erfolgt höchstwahrscheinlich über die selbe Bindungsstelle und den selben Mechanismus wie die Aktivierung durch PIP_2 . Diese geht einher mit einer verringerten Empfindlichkeit gegenüber einer Hemmung durch ATP. Dies ist nicht nur eine indirekte Folge der durch PIP_2 erhöhten Offenwahrscheinlichkeit, vielmehr liegen gemäß dem Modell von Haider die Bindungsstellen für ATP und PIP_2 in direkter Nachbarschaft. Insbesondere für K39, E179 und R301 wird eine Beteiligung an der Bindung beider Liganden angenommen (vgl. Kap. 1.2.3.1.1). Darüber hinaus schwächt laut Haiders Berechnungen die Bindung von PIP_2 die Wechselwirkungen von R201, K185 und speziell R50 mit den Phosphaten von ATP (vgl. Kap. 1.2.3.1.1), so dass die Affinität von Kir6.2 für ATP abnimmt. Hieraus wurde die Hypothese entwickelt, dass unter physiologischen Bedingungen die ATP-Empfindlichkeit und somit auch die Aktivität des Kanals maßgeblich durch Phospholipide bestimmt wird, deren Konzentration ihrerseits durch die Enzyme des Phospholipidmetabolismus (s.o.) reguliert wird (Baukrowitz und Fakler, 2000a; Baukrowitz und Fakler, 2000b).

PIP₂ schwächt nicht nur die ATP-Hemmung von Kir6.2/SUR1, sondern hebt auch die hochaffine Komponente der Hemmung durch den Sulfonylharnstoff Tolbutamid auf. Auch die Wirksamkeit von Diazoxid und MgADP bleibt durch PIP₂ nicht unbeeinflusst: Kurze Applikation von PIP₂ verstärkt die Effekte der Öffner, nach längerer PIP₂-Applikation rufen sie keine zusätzliche Aktivierung mehr hervor. Polykationen unterdrücken die Effekte von PIP₂ auf die Offenwahrscheinlichkeit und die ATP-Empfindlichkeit, die Unempfindlichkeit gegenüber Tolbutamid und der Verlust der Öffnerwirkung erwiesen sich jedoch nur in geringem Umfang als reversibel (Koster et al., 1999a). Analog zu Kir6.2/SUR1 verringert PIP₂ auch am Kir6.2/SUR2A die Wirkung hemmender (ATP, Glibenclamid) und aktivierender (Cromakalim, P1075) Liganden (Krauter et al., 2001). Während die Konzentrations-Wirkungskurve der ATP-Hemmung mit zunehmender Dauer der PIP₂-Applikation immer weiter nach rechts, d.h. hin zu höheren ATP-Konzentrationen verschoben wird, kommt es im Fall der Glibenclamidhemmung zu einer Abnahme der Effizienz, bei im wesentlichen unveränderter IC₅₀, d.h. der Anteil der durch Glibenclamid hemmbaren Kanäle wird durch PIP₂ reduziert. Dies, sowie die Beobachtung, dass Polykationen den Effekt von PIP₂ auf die Wirksamkeit von ATP, nicht aber auf die Wirksamkeit von Glibenclamid und den K_{ATP}-Kanal-Öffnern aufheben, spricht dafür, dass der PIP₂-Effekt auf Letztere einem anderen Mechanismus folgt als der PIP₂-Effekt auf ATP. Krauter und Kollegen vermuten, dass beide Mechanismen dennoch die selbe PIP₂-Bindungsstelle am Kir6.2 involvieren, da Mutation von R176 (s.o.) zu Alanin den PIP₂-Effekt sowohl auf die Inhibition durch ATP als auch durch Glibenclamid schwächt.

Kir6.1-Kanäle, wie sie in der glatten Gefäßmuskulatur vorkommen (vgl. Kap. 1.2.2.5), sind ebenfalls auf Phospholipide angewiesen. Die Affinität scheint hier jedoch wesentlich stärker zu sein als bei Kir6.2, so dass physiologische Schwankungen der PIP₂-Konzentration höchstwahrscheinlich keinerlei Auswirkungen auf die Aktivität von Kir6.1 haben (Quinn et al., 2003).

1.2.3.3 pH

Ausgehend von pH 7.4 führt ein moderater Abfall des pH-Werts sowohl in An- als auch in Abwesenheit von ATP zu einer verstärkten Aktivität des Kir6.2/SUR1-Kanals. In Abwesenheit von ATP beobachteten Wu et al., 2002 einen maximalen K_{ATP}-Strom bei pH 6.5-6.8, bei stärkerer Ansäuerung kommt es zu einer zunehmenden Inhibition. Ein ähnlicher glockenförmiger Verlauf des Stroms in Abhängigkeit vom pH resultiert in Gegenwart von ATP (0.1-1 mM), die maximale Aktivierung ist hier jedoch hin zu noch niedrigeren pH-

Werten (5.9-6.2) verschoben. Die IC_{50} der ATP-Hemmung von Kir6.2/SUR1 liegt bei 7 μM (pH 7.4) bzw. 30 μM (pH 6.8). Analoge Messungen an Kir6.2 ΔC36 (d.h. ohne SUR1) ergaben, dass die gegenseitige allosterische Modulation der pH- und ATP-Empfindlichkeit durch die SUR1-Untereinheit signifikant verstärkt wird.

Die Mutation K185E in Kir6.2 hebt die inhibitorische Wirkung von ATP weitestgehend auf (vgl. Kap. 1.2.3.1.1). Die Arbeit von Wu zeigte, dass infolge dieser Mutation auch die pH-Sensitivität von Kir6.2(K185E)/SUR1 unabhängig von ATP (0-10 mM) ist. Umgekehrt hat nach Substitution von Histidin 175 in Kir6.2 gegen Alanin oder Lysin eine Änderung des pH keine Auswirkungen mehr auf die ATP-Empfindlichkeit. Letztere entspricht der, die der Wildtyp bei pH 7.4 aufweist. Anscheinend wird die ATP-Empfindlichkeit durch Protonierung von H175 moduliert. Wie die Mutation H175K zeigt, beruht dieser Mechanismus nicht nur auf der positiven Ladung des protonierten Histidins, sondern wohl auch auf damit einhergehenden Änderungen der Tertiärstruktur, die durch ein Lysin an dieser Position nicht erreicht werden.

Eine Abnahme des intrazellulären pH verringert somit die ATP-Empfindlichkeit, während eine Abnahme der ATP-Konzentration die pH-Empfindlichkeit erhöht. Dieses Prinzip erleichtert unter metabolischem Stress wie Hypoxie, Hypoglykämie und Ischämie die für bestimmte cytoprotektive Effekte nötige Aktivierung der K_{ATP} -Kanäle (vgl. Kap. 1.2.2).

1.2.3.4 Zn^{2+}

Zn^{2+} wird von den sog. Moosfasern des Hippocampus zusammen mit dem Neurotransmitter Glutamat ausgeschüttet. Unter Hypoxie werden dabei vermutlich mikromolare Zn^{2+} -Konzentrationen erreicht, die über eine Aktivierung von K_{ATP} -Kanälen eine Hyperpolarisation der Moosfasern bewirken, was eine weitere Glutamatfreisetzung unterbindet und einen neuroprotektiven Mechanismus darstellt (Bancila et al., 2004). Auch für den pankreatischen K_{ATP} -Kanal konnte eine Aktivierung durch extrazelluläres Zn^{2+} (10-20 μM) demonstriert werden (Bloc et al., 2000). Die Insulingranula der β -Zellen enthalten Zn^{2+} , das mit dem Insulin freigesetzt wird und vermutlich eine negative Rückkopplung der Insulin-/ Zn^{2+} -Sekretion bewirkt. Gleichzeitig inhibiert Zn^{2+} die Ausschüttung von Glucagon durch die α -Zellen (Ishihara et al., 2003).

Die Aktivierung des K_{ATP} -Kanals vom Typ Kir6.2/SUR1 durch Zn^{2+} , die über einen gleichzeitigen inhibitorischen Effekt dominiert, führten Bancila et al., 2005 auf die Bindung des Ions an zwei Histidine (H326, H332) in einem extrazellulären TMD1-Abschnitt von

SUR1 (Ratte) zurück. Angemerkt sei allerdings, dass der humane SUR1 anstelle von H332 ein Aspartat aufweist. Handelt es sich bei dem Sulfonylharnstoffrezeptor hingegen um SUR2 (weist weder H326 (\rightarrow Arginin) noch H332 (\rightarrow Asparagin) auf), wird nur der hemmende Effekt von Zn^{2+} auf den Kanal beobachtet (Bancila et al., 2005).

1.2.3.5 Phosphorylierung

1.2.3.5.1 Proteinkinase A (PKA)

Quayle et al., 1994 zeigten, dass die Aktivierung des K_{ATP} -Kanals der glatten Muskulatur in Arterien durch CGRP (calcitonin gene related peptide) die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) involviert. Gemäß ihrem Modell aktivieren CGRP und eine Reihe anderer endogener Vasodilatoren wie Adenosin (Mutafova-Yambolieva und Keef, 1997) und Epoxy-eicosatriensäure (Lu et al., 2006) zunächst Adenylylcyclase. Diese katalysiert die Synthese von cAMP, welches seinerseits die Aktivierung von PKA bewirkt. In $^{86}Rb^{+}$ -Fluss-Assays an Aortenringen (Ratte) führt Erhöhung der cAMP-Konzentration nach Aktivierung der Adenylylcyclase durch Forskolin zu einer Steigerung des $^{86}Rb^{+}$ -Flusses, das Ausmaß der K_{ATP} -Kanalaktivierung durch die Öffner P1075 und Cromakalim (vgl. Kap. 1.2.4.2) wird potentiert. Glibenclamid hebt diese Effekte von Forskolin weitestgehend auf (Linde und Quast, 1995; Kessler et al., 1997). Das Ausmaß der PKA-vermittelten Kanalaktivierung nimmt mit sinkender ADP-Konzentration ab (Shi et al., 2008a).

An welchen Positionen Kir6.1 und/oder SUR2B durch Proteinkinase A phosphoryliert werden, ist nicht endgültig geklärt. Während Quinn et al., 2004 eine Phosphorylierung von S385 in Kir6.1, sowie T633 und S1465 in SUR2B beschrieben, konnten Shi et al., 2007b keine Rolle dieser Aminosäuren bei der über β_2 -adrenergen Rezeptor, G_s , Adenylylcyclase, cAMP und PKA verlaufenden Aktivierung von Kir6.1/SUR2B durch Isoprenalin beobachten. Stattdessen identifizierten sie S1387 als essentiell für besagten Mechanismus. Nach Modellierungen anhand des kristallisierten ABC-Proteins SAV1866 gelangten sie zu dem Schluss, dass S1387 in phosphorylierter Form durch elektrostatische Wechselwirkungen mit R1462 (liegt wie S1387 selbst in NBF2) und H-Brücken zu Y506 (in CL5) eine stärkere Kopplung von NBF2 mit TMD1 bewirkt (Shi et al., 2008a).

Die Phosphorylierungen werden durch eine Verankerung der PKA durch AKAPs (A-Kinase anchoring proteins) in Nachbarschaft zu ihrem Substrat ermöglicht (Hayabuchi et al., 2001a). Die Co-IP von Caveolin (aller drei Isoformen) durch Kir6.1 und der Nachweis von Kir6.1, Caveolin und Adenylylcyclase in den selben Membranfraktionen (Sampson et al., 2004)

stellen eine starke Evidenz für eine gemeinsame Lokalisation des vaskulären K_{ATP} -Kanals mit besagten Faktoren in den Caveolen der Cytoplasmamembran dar. Auch nach Zerstörung der Caveolenstruktur durch Methyl- β -Cyclodextrin (entzieht der Membran Cholesterin) war eine Co-IP von Caveolin durch Kir6.1 möglich. In diesen Zellen war die Hemmung des mit Hilfe des Öffners Pinacidil aktivierten K_{ATP} -Stroms durch Rp-cAMPS (einem PKA-Inhibitor) jedoch deutlich schwächer als in Zellen mit intakten Caveolen, was im Umkehrschluss bedeutet, dass die K_{ATP} -Kanal-Aktivierung durch PKA infolge der Zerstörung der Caveolen beeinträchtigt war (Sampson et al., 2004). In der pankreatischen β TC-6-Zelllinie (Maus) wurde auch für Kir6.2 eine Interaktion mit Caveolin-1 nachgewiesen: Die beiden Proteine co-immunopräzipitierten, und eine Reduktion der Caveolin-1-Expression um ca. 90 % mittels siRNA verringerte signifikant das Maß der durch Glucose oder Glimperid induzierbaren Insulinsekretion, während die basale, sowie die durch Depolarisation der Zellmembran mit KCl hervorgerufene Insulinsekretion nicht beeinflusst wurde (Puddu et al., 2008).

Auch die Aktivität des pankreatischen K_{ATP} -Kanals wird durch PKA moduliert. An welcher Stelle die Phosphorylierung erfolgt, ist auch hier strittig. Béguin et al., 1999 vermuteten eine Modifikation an S1571 in SUR1 und S372 in Kir6.2, wohingegen nach einer späteren Studie die PKA-vermittelte Regulation des Kanals über T224 in Kir6.2 erfolgt (Lin et al., 2000). Wiederum zu einem anderen Ergebnis kamen Light et al., 2002. Die durch das Inkretin GLP-1 (glucagon-like peptide 1) induzierte Aktivierung von PKA hatte in ihren Experimenten dann keinen Einfluss auf Kir6.2/SUR1, wenn S1448 in NBF2 von SUR1 gegen Alanin ausgetauscht war. Ein ganz wesentliches Ergebnis ihrer Untersuchungen ist die Abhängigkeit der durch die Phosphorylierung bewirkten Aktivitätsänderung des K_{ATP} -Kanals von der ADP-Konzentration. Während in i.o.-Patches die Applikation von cPKA (die katalytische Untereinheit von Proteinkinase A) zusammen mit 0.2 mM ATP allein (d.h. ohne ADP) keinen signifikanten Effekt erzeugt, ruft cPKA mit 0.2 mM ATP + 0.2 mM ADP gar eine Hemmung und mit 0.2 mM ATP + 0.5 mM ADP eine Aktivierung des K_{ATP} -Stroms hervor (jeweils in Gegenwart von Mg^{2+}) (Light et al., 2002)!

1.2.3.5.2 Proteinkinase C (PKC)

Proteinkinase C (PKC) kommt in Form verschiedener Isoenzyme vor, die in drei Gruppen als konventionell, neuartig oder atypisch eingeteilt werden. Neu synthetisierte PKC erfährt drei (Auto-)Phosphorylierungen und ist zunächst inaktiv, da ein autoinhibitorischer Sequenzabschnitt als Pseudosubstrat die Aktivität hemmt. Die im Fall konventioneller PKCs Ca^{2+} -

abhängige Bindung anionischer Membran-Lipide wie Phosphatidylserin führt zu einer Translokation von PKC zur Zellmembran. Bei Spaltung von Phospholipiden wie PIP₂ und Phosphatidylcholin durch Phospholipase C oder Phospholipase D/Phosphatidat-Phosphohydrolase (Lee und Severson, 1994) erhöht das dabei gebildete Diacylglycerin die relativ niedrige Affinität konventioneller und neuartiger PKCs speziell zu Phosphatidylserin sehr stark. Die durch das Zusammenwirken dieser Liganden freigesetzte Bindungsenergie wird dann groß genug, um die Autoinhibition des Enzyms aufzuheben. Experimentell kann eine Aktivierung von PKC auch mit Hilfe bestimmter Phorbol-Ester wie Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) oder Phorbol-12,13-dibutyrat (PDBu) erreicht werden. Diese binden mit um zwei Größenordnungen höherer Affinität als Diacylglycerin an PKC, so dass keine weiteren Liganden für die Translokation und Aktivierung von PKC erforderlich sind (Newton, 1995; Newton, 2009).

PKC hemmt den vaskulären K_{ATP}-Kanal — Die Hemmung des vaskulären K_{ATP}-Kanals Kir6.1/SUR2B durch PKC (Linde et al., 1997; Cole et al., 2000; Thorneloe et al., 2002) ist wesentlicher Bestandteil der vasokonstriktiven Wirkung verschiedener Hormone, deren Bindung an ihre meist G_{q/11}-gekoppelten Rezeptoren eine Aktivierung von Phospholipase C und schließlich von PKC auslöst. So ruft Angiotensin II (Ang II) eine Inhibition des durch den Öffner Levromakalim aktivierten K_{ATP}-Stroms in der arteriellen glatten Muskulatur von Ratten hervor, ein Effekt, der sowohl durch GDPβS (ein GDP-Analogon, das mit der Aktivierung von G-Proteinen interferiert), als auch durch Vorbehandlung der Muskelzellen mit den PKC-Hemmern Staurosporin oder Calphostin C verhindert wird (Kubo et al., 1997). Die Aktivierung von PKC durch Angiotensin II wird von einer gleichzeitigen Hemmung von PKA begleitet, was bei ausreichend hoher ATP-Konzentration (1 mM) die Inhibition des vaskulären K_{ATP}-Kanals verstärkt (Hayabuchi et al., 2001b).

Das volle Ausmaß der durch Vasopressin induzierten Hemmung des Pinacidil-aktivierten K_{ATP}-Stroms in Kir6.1/SUR2B und den V1a-Rezeptor co-exprimierenden HEK293-Zellen wird auch durch den PKC-Aktivator PMA (s.o.) hervorgerufen. Umgekehrt hebt der K_{ATP}-Kanal-Öffner Pinacidil die Vasokonstriktion von Rattenarterien durch Vasopressin auf, Indiz dafür, dass Letztere wesentlich auf der Hemmung der K_{ATP}-Kanäle beruht (Shi et al., 2007a). Weitere Vasokonstriktoren, für die eine PKC-vermittelte Inhibierung des vaskulären K_{ATP}-Kanals nachgewiesen wurde, sind u.a. Endothelin-1 und Noradrenalin (Park et al., 2005), Neuropeptid Y, Phenylephrin, Serotonin und Histamin (Bonev und Nelson, 1996), sowie

Carbachol, ein Agonist des muskarinischen M₃-Rezeptors (Quinn et al., 2003). Diese Substanzen binden an G_q-gekoppelte Rezeptoren.

Beim verantwortlichen PKC-Isoenzym handelt es sich um PKC-ε aus der Gruppe der neuartigen PKCs (Hayabuchi et al., 2001b). Direkte oder indirekte Aktivierung durch PMA oder Angiotensin II bewirkt eine Co-Lokalisation von PKC-ε mit dem K_{ATP}-Kanal in den Caveolen glatter Muskelzellen der Rattenaorta (Sampson et al., 2007). Dort phosphoryliert PKC-ε die porenbildenden Untereinheit des vaskulären K_{ATP}-Kanals und bewirkt so dessen Inhibition. Dies zeigte die schrittweise Mutagenese von S354, S379, S385, S391 und S397 im distalen C-Terminus von Kir6.1 zu Alanin, die graduell die Effekte von PKC schwächt, bis hin zum fast vollständigen Verlust von Phosphorylierung und Kanal-Inhibition bei gleichzeitiger Substitution an allen fünf Positionen (Shi et al., 2008b).

Die Phosphorylierung des Kanals führt zu einer Verlängerung der „Interbursts“ (vgl. Abb. 1-3) und somit zu einer verringerten Offenwahrscheinlichkeit (Cole et al., 2000; Thorneloe et al., 2002). Darüber hinaus kommt es zu einer Dynamin-abhängigen Endocytose, die die Zahl der K_{ATP}-Kanäle in der Cytoplasmamembran reduziert. Unterdrückung der Caveolin-1-Expression (mittels siRNA) oder der Dynamin-Funktion (durch Co-Expression einer dominant-negativen Dynamin-Mutanten) verhindert in HEK293-Zellen eine solche Internalisierung, so dass nach Aktivierung von PKC eine wesentlich schwächere Abnahme des K_{ATP}- Stroms beobachtet wird (Jiao et al., 2008).

PKC aktiviert den cardialen K_{ATP}-Kanal — Die C-Termini von Kir6.1 und Kir6.2 zeigen starke Sequenzunterschiede. Sämtliche der für die Phosphorylierung von Kir6.1 relevanten Serine (s.o.) fehlen in Kir6.2, was zusammen mit Unterschieden im proximalen N-Terminus dazu führt, dass PKC Kir6.2-Kanäle nicht inhibiert (Shi et al., 2008b). Phosphorylierung von T180 in Kir6.2 bewirkt sowohl in Anwesenheit von SUR1 bzw. SUR2A, als auch in deren Abwesenheit, eine veränderte ATP-Empfindlichkeit des Kanals. Dies äußert sich in einer Abnahme des Hill-Koeffizienten der entsprechenden ATP-Hemmkurve, mit der Folge einer höheren Kanalaktivität bei physiologischen ATP-Konzentrationen (Light et al., 2000). Andererseits wurde auch für Kir6.2-Kanäle eine Dynamin-abhängige Endocytose nach Aktivierung von PKC beschrieben (Hu et al., 2003), so dass PKC hier einen dualen Effekt auf den K_{ATP}-Kanal hat. Die aktivierende Wirkung scheint jedoch zu überwiegen und gilt als Grundlage der ischämischen Präkonditionierung (IPC) im Herzen (vgl. Kap. 1.2.2.4). So demonstrierten Speechly-Dick et al., 1995, dass eine signifikant verbesserte Erholung der kontraktile Funktion des humanen Herzmuskels (rechter atrialer Trabekel) nach Ischämie

nicht nur durch vorherige IPC, sondern auch durch Präkonditionierung mit dem PKC-Aktivator 1,2-Dioctanoyl-sn-glycerin (DOG) bzw. dem K_{ATP} -Kanal-Öffner Cromakalim erreicht wird. Der PKC-Antagonist Chelerythrin und der K_{ATP} -Kanal-Inhibitor Glibenclamid verhindern eine derartige Präkonditionierung. Bei den für die protektive Wirkung von IPC verantwortlichen PKC-Formen handelt es sich vermutlich um PKC- δ und PKC- ϵ (Kawamura et al., 1998). Viele Fragen zum Phänomen der ischämischen Präkonditionierung sind allerdings noch ungeklärt, darunter auch die potentielle Beteiligung mitochondrialer K_{ATP} -Kanäle (Ardehali und O'Rourke, 2005).

1.2.3.5.3 Tyrosinkinasen

Auch Tyrosinkinasen spielen bei der Regulation des K_{ATP} -Kanals eine Rolle, ihre Inhibition führt zur Hyperpolarisation von Zellen der insulinsezernierenden Zelllinie CRI-G1. Die Wirkung dieser Kinasen auf den Kanal erfolgt jedoch vermutlich indirekt, d.h. Kir und SUR selbst sind wohl kein Substrat dieser Enzyme (Harvey und Ashford, 1998b).

1.2.3.6 Assoziation und Interaktion von K_{ATP} -Kanälen mit Proteinen

Neben Adenylat- und Creatinkinase (vgl. Kap. 1.2.3.1.3) kennt man inzwischen noch weitere Proteine, die zumindest in bestimmten Geweben und unter bestimmten Bedingungen mit dem K_{ATP} -Kanal assoziieren und interagieren. Hinter der Co-Lokalisation von Lactatdehydrogenase (vgl. Kap. 1.2.3.6.2) bzw. verschiedener Glycolyse-Enzyme (vgl. Kap. 1.2.3.6.3) mit dem K_{ATP} -Kanal steht vermutlich ein ähnliches Prinzip wie bei der Assoziation mit Adenylat- und Creatinkinase: Die räumliche Nähe ermöglicht eine direktere und schnellere Kopplung der Kanalaktivität an metabolische Signale. Komplexer und noch nicht vollständig verstanden sind die Interaktionen des K_{ATP} -Kanals mit Epac2 (vgl. Kap. 1.2.3.6.4) und Syntaxin-1A (vgl. Kap. 1.2.3.6.5).

1.2.3.6.1 Adenylatkinase (AK) und Creatinkinase (CK)

Auf die Assoziation mit Adenylat- und Creatinkinase wurde bereits bei der Regulation des K_{ATP} -Kanals durch Nukleotide eingegangen (vgl. Kap. 1.2.3.1.3).

1.2.3.6.2 Lactatdehydrogenase (LDH)

Die Muskelform der Lactatdehydrogenase (M-LDH) ist integraler Bestandteil des cardialen K_{ATP} -Kanals. Direkte Wechselwirkung erfolgt sowohl mit Kir6.2 (über ihren N-Terminus) als auch mit SUR2A (über ihren C-Terminus). Sie katalysiert die Reaktion Pyruvat + NADH/H⁺ \rightleftharpoons Lactat + NAD⁺, und gleichzeitige Applikation von Pyruvat und NADH auf i.o.-Patches von Cardiomyocyten induziert trotz Gegenwart von ATP (1 mM) eine Aktivierung der K_{ATP} -Kanäle (Crawford et al., 2002a). Dies beruht auf der Bildung von Lactat, dessen aktivierende Wirkung auf den cardialen K_{ATP} -Kanal bereits Anfang der 90er Jahre publiziert wurde (Han et al., 1993). Umgekehrt wird die Lactat-Aktivierung, deren zugrundeliegender Mechanismus nicht bekannt ist, durch NAD⁺ aufgehoben.

Expression von Kir6.2 und SUR2A mit M-LDH in A549-Zellen (eine humane Lungenkarzinom-Zelllinie) verleiht den Zellen einen gewissen Schutz gegen Ischämie (bemessen am intrazellulären [Ca²⁺]-Anstieg unter Ischämie), nicht jedoch die Expression von Kir6.2 und SUR2A mit einer infolge einer Mutation inaktiven Form von M-LDH (Crawford et al., 2002a).

1.2.3.6.3 Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), Triosephosphat-isomerase (TPI) und Pyruvatkinase (PK)

Bei der Erprobung verschiedener (Zwischen-)Produkte der Glycolyse hinsichtlich eines potentiellen Effekts auf den K_{ATP} -Strom in Cardiomyocyten, entdeckten Jovanovic & Jovanovic (2005), dass 1,3-Bisphosphoglycerat (20 mM) trotz einer ATP-Konzentration von 5 mM eine Aktivierung des cardialen K_{ATP} -Kanals bewirkte. Eine ähnliche Aktivierung resultierte auch bei gemeinsamer Anwendung von Glycerinaldehyd-3-Phosphat und NAD⁺, die der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als Substrat für die Herstellung von 1,3-Bisphosphoglycerat dienen (Jovanovic und Jovanovic, 2005).

Da 1,3-Bisphosphoglycerat *in vivo* kurzlebig ist und durch Phosphoglyceratkinase schnell zu 3-Phosphoglycerat umgesetzt wird, muss man eine enge räumliche Nähe zwischen GAPDH und dem K_{ATP} -Kanal annehmen, sollten die experimentell beobachteten Effekte von 1,3-Bisphosphoglycerat von physiologischer Bedeutung sein. Tatsächlich wurde in Immunopräzipitationsexperimenten und Untersuchungen mit dem Hefe-Zweihybrid-System eine direkte Bindung von GAPDH an Kir6.2 (nicht jedoch an SUR2A) gezeigt (Jovanovic et al., 2005).

Die Interaktion zwischen Kir6.2 und GAPDH wurde etwa zeitgleich von einer weiteren Arbeitsgruppe beobachtet (Dhar-Chowdhury et al., 2005). In einem bakteriellen Zweihybrid-System identifizierte diese Gruppe GAPDH, sowie Triosephosphatisomerase (TPI) als Interaktionspartner des cytosolischen C-Terminus von Kir6.2. Anschließend bestätigten sie diese Wechselwirkungen mittels Co-Immunopräzipitation und zeigten darüber hinaus auch eine Assoziation von Pyruvatkinase (PK) mit Kir6.2. Für GAPDH und PK (TPI nicht untersucht) wurde eine derartige Interaktion auch zu Kir6.1 demonstriert. In ihren elektrophysiologischen Untersuchungen stellten Dhar-Chowdhury und Kollegen eine reversible Hemmung fest, wenn sie cardiale K_{ATP} -Kanäle (in Gegenwart von ATP und ADP) alternativ Glycerinaldehyd-3-Phosphat und $NADP^+$ oder Phosphoenolpyruvat (PEP) aussetzten. Im Fall von PEP, das von Pyruvatkinase zu Pyruvat und ATP umgesetzt wird, ist die besagte Inhibition plausibel, eine Hemmung durch Glycerinaldehyd-3-Phosphat steht allerdings im Widerspruch zu den Messungen von Jovanovic & Jovanovic (s.o.).

1.2.3.6.4 Epac2

Bei der Suche nach Interaktionspartnern von SUR1 mit Hilfe eines Hefe-Zweihybrid-Systems identifizierten Ozaki et al., 2000 das Protein Epac2 (exchange protein activated by cAMP 2), auch bekannt unter der Bezeichnung cAMP-GEFII (cAMP-regulated guanine nucleotide exchange factor II). Epac2 fungiert als cAMP-Sensor und vermittelt eine cAMP- und Ca^{2+} -abhängige, jedoch PKA-unabhängige Insulinsekretion. Shibasaki und Mitarbeiter stellten auf Grundlage ihrer Untersuchungen ein Modell auf, demnach Epac2 in cAMP-ungebundener Form im Komplex mit SUR1 und somit mit dem pankreatischen K_{ATP} -Kanal vorliegt. Bindung von cAMP führt gemäß ihrer Hypothese zur Dissoziation dieses Komplexes, woraufhin Epac2 im Zusammenspiel mit Rim2 und Piccolo, die ihrerseits eine Kopplung an L-Typ spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle und die Insulinvesikel (über Wechselwirkungen zwischen Rim2 und Rab3) herstellen, die Insulinsekretion vermittelt (Shibasaki et al., 2004a; Shibasaki et al., 2004b). Kang und Kollegen gelang die Co-Immunopräzipitation von Epac2 (und Epac1) mit SUR1. Indiz für eine physiologisch relevante Kopplung zwischen Epac2 und dem pankreatischen K_{ATP} -Kanal stellt die Aktivierung von Epac2 durch cAMP-Analoga in menschlichen β -Zellen und Zellen der insulinsezernierenden Zelllinie INS-1 (Ratte) dar, die zur Inhibition der K_{ATP} -Kanäle dieser Zellen führt (Kang et al., 2006a). Da Epac2 nach Bindung von cAMP vom K_{ATP} -Kanal dissoziiert (s.o.), erfolgt dessen Hemmung vermutlich nicht direkt durch Epac2 selbst, sondern als Folge nachgeschalteter Prozesse.

1.2.3.6.5 Syntaxin-1A

SNARE-Proteine (soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor) sind an der Fusion biologischer Membranen beteiligt, wie sie z.B. bei Exocytose auftreten (Übersicht bei Malsam et al., 2008). Für das SNARE-Protein Syntaxin-1A (Syn-1A) wurde neben seiner Funktion bei der Exocytose jedoch auch die Bindung und Regulation spannungsgesteuerter K^+ - und Ca^{2+} -Kanäle nachgewiesen (Wiser et al., 1996; Leung et al., 2003). Darüber hinaus sind inzwischen auch direkte Wechselwirkungen mit K_{ATP} -Kanälen bekannt. So bindet es mittels seiner C-terminalen H3-Domäne an die NBFs von SUR1 und SUR2 und bewirkt eine Hemmung von pankreatischem und cardialem K_{ATP} -Kanal (Cui et al., 2004; Pasyk et al., 2004; Kang et al., 2004). Dabei wirkt Syntaxin-1A auch der mit sinkendem intrazellulären pH (z.B. bei Ischämie) einsetzenden Aktivierung des cardialen K_{ATP} -Kanals entgegen (Kang et al., 2006b) und verringert (wie auch das homologe Syntaxin-1B) die Wirksamkeit der K_{ATP} -Kanal-Öffner P-1075, Cromakalim und Diazoxid (Ng et al., 2008).

1.2.3.7 Potentielle Regulatoren/Modulatoren mit unklarem Wirkmechanismus

1.2.3.7.1 H_2S , NO

Schwefelwasserstoff (H_2S) ist in den letzten Jahren zunehmend als ein wichtiges Signalmolekül im Herz-Kreislauf- und Nervensystem erkannt worden (Übersicht bei Szabó, 2007). Je nach H_2S -Konzentration und Vorbehandlung des untersuchten Gewebes, wurden sowohl vasokonstriktive als auch vasorelaxierende Effekte von H_2S beschrieben. Während K_{ATP} -Kanäle für die vasokonstriktive Wirkung von H_2S wohl keine Rolle spielen (Lim et al., 2008), beschrieben Zhao und Kollegen eine H_2S -induzierte Aktivierung von K_{ATP} -Kanälen in isolierten Zellen der vaskulären glatten Muskulatur. Glibenclamid wirkte dieser Aktivierung, sowie einer Blutdrucksenkung nach intravenöser H_2S -Injektion entgegen (Zhao et al., 2001). Andererseits konnte in einer Studie von Kiss et al., 2008 kein Einfluss von Glibenclamid auf eine durch H_2S ausgelöste Vasodilatation festgestellt werden. Stattdessen vermuteten diese Autoren, dass H_2S neben einer Hemmung des Metabolismus und einer Abnahme des zellulären pH-Werts eine Aktivierung von Cl^-/HCO_3^- -Kanälen hervorruft, und auf diesem Weg schließlich eine Relaxation der Gefäße bewirkt. Inwieweit eine physiologisch relevante Steuerung der K_{ATP} -Kanäle durch H_2S erfolgt, bleibt somit Gegenstand der Forschung. Ähnliches gilt für die durch Ras und Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase (MAPKK) vermittelte Aktivierung von K_{ATP} -Kanälen durch NO (Lin et al., 2004).

1.2.3.7.2 Leptin, Insulin

Insulin und das vom Fettgewebe sezernierte Leptin tragen wesentlich zur Kontrolle von Nahrungsaufnahme und Körpergewicht bei. Insulin- und Leptinrezeptoren finden sich u.a. in für die Energiehomöostase zuständigen Regionen des Hypothalamus. Die beiden Proteohormone modulieren hier die Funktion bestimmter Neurone, indem sie die Expression appetitstimulierender bzw. -zügelder Neuropeptide regulieren und die elektrische Aktivität der Neurone steuern. Bei der Untersuchung der Leptin-Wirkung auf Neurone im Nucleus ventromedialis (VMN) und Nucleus arcuatus (ARC) des Hypothalamus stellten Irani et al., 2008 sehr unterschiedliche Reaktionen fest: Neurone, die durch Leptin erregt wurden, Neurone, die inhibiert wurden, Neurone, die bei niedrigen Leptinkonzentrationen erregt, bei höheren jedoch inhibiert wurden und schließlich Neurone, die keine Reaktion auf Leptin zeigten. Diese unterschiedlichen Reaktionen traten sowohl bei glucosesensitiven als auch bei glucoseinsensitiven Spezies auf. Während der der Erregung zugrundeliegende Mechanismus von den Autoren nicht näher untersucht wurde, konnte (für die VMN-Neurone) in Übereinstimmung zu früheren Arbeiten (Harvey und Ashford, 1998a; Spanswick et al., 1997) gezeigt werden, dass die zur Hyperpolarisation (und somit Inhibition) der Neurone führenden Prozesse eine Aktivierung von Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K) und K_{ATP} -Kanälen beinhalten. Auch Insulin ruft nach Bindung an seinen Rezeptor eine PI3K-abhängige Aktivierung der K_{ATP} -Kanäle in bestimmten Neuronen des Hypothalamus hervor (Spanswick et al., 2000). Bedingung für eine durch Leptin bzw. Insulin induzierte K_{ATP} -Kanal-Aktivierung sind neben der Erhöhung der PI3K-Aktivität auch PI3K-abhängige Veränderungen des Actin-Cytoskeletts (Harvey et al., 2000; Mirshamsi et al., 2004). Man geht daher davon aus, dass die K_{ATP} -Kanal-Aktivierung nicht direkt durch Bindung des von PI3K gebildetem $PI(3,4,5)P_3$ an den K_{ATP} -Kanal ausgelöst wird, sondern die zugrundeliegenden Mechanismen wesentlich komplexer sind.

Eine K_{ATP} -Kanal-Aktivierung durch Leptin wurde auch in den β -Zellen des Pankreas (Kieffer et al., 1997) und der insulinsezernierenden Zelllinie CRI-G1 (Harvey et al., 1997) beschrieben. Die leptininduzierte Hyperpolarisation dieser Zellen erfordert die Gegenwart von ATP, wird durch Tolbutamid und Glibenclamid verhindert und beinhaltet anscheinend eine Inhibierung von Tyrosinkinase (Harvey et al., 1997; Harvey und Ashford, 1998b). Durch Aktivierung des pankreatischen K_{ATP} -Kanals wirkt Leptin der Insulinsekretion entgegen (vgl. Kap. 1.2.2.1). Umgekehrt stimuliert Insulin die Leptinausschüttung der Adipocyten, so dass eine Rückkopplung der beiden Hormone vorliegt.

Auffällig ist, dass die appetithemmende Wirkung von Leptin in Kir6.2^{-/-} Knockout-Mäusen nicht beeinträchtigt zu sein scheint (Miki et al., 2001). So das Fehlen von Kir6.2 in diesen Tieren nicht auf unbekannt Art und Weise kompensiert wird, könnte dieser Befund als Bestätigung von Lee et al., 1999 angesehen werden, die anders als z.B. Ibrahim et al., 2003 von einer Zusammensetzung des K_{ATP}-Kanals im Hypothalamus aus Kir6.1 und SUR1 ausgehen. Die Leitfähigkeit von Kir6.1-Kanälen ist jedoch mit ca. 35 pS deutlich geringer als die der Kir6.2-Kanäle (ca. 80 pS, Repunte et al., 1999), und bereits für Letztere ist die Diskrepanz zu den „K_{ATP}-Kanälen“ im Hypothalamus schwer erklärbar, deren Leitfähigkeit mit 137 ± 23 pS (Spanswick et al., 2000) oder gar 156 ± 15 pS (Mirshamsi et al., 2004) angegeben wurde. Um diese Widersprüche aufzulösen bedarf es weiterer Forschungsanstrengungen.

1.2.3.7.3 α -Endosulfin

Bei der Suche nach endogenen Liganden, die analog zu den synthetischen Sulfonylharnstoffen (vgl. Kap. 1.2.4.1) eine Hemmung des K_{ATP}-Kanals und Stimulation der Insulinsekretion bewirken, wurde das 121 Aminosäuren lange α -Endosulfin identifiziert.

Dieses Peptid verdrängt [³H]GBC, inhibiert in Patch-Clamp-Messungen K_{ATP}-Ströme und regt die Insulinsekretion von MIN6-Zellen an (Heron et al., 1998), was es zu einem potentiellen K_{ATP}-Kanal-Regulator macht. Die Affinität von α -Endosulfin für SUR1 ist jedoch mit $K_I \approx 1 \mu\text{M}$ mehrere Größenordnungen niedriger als die von Glibenclamid. In der jüngeren Literatur finden sich keine klaren Hinweise auf eine mögliche Verbindung zwischen α -Endosulfin und dem K_{ATP}-Kanal.

1.2.4 Synthetische K_{ATP}-Kanalmodulatoren

1.2.4.1 Insulintrope und das Konzept der zweiteiligen Bindungstasche

Die Bedeutung des pankreatischen K_{ATP}-Kanals für die Insulinsekretion (vgl. Kap. 1.2.2.1) macht ihn zu einem pharmakologischen Angriffspunkt. So finden u.a. die in Abb. 1-10 aufgeführten Sulfonylharnstoffe und Glinide mit Ausnahme von Meglitinid, UL-DF 9 und (-)-AZ-DF 265 durchgehend Verwendung in der Therapie von Diabetes Typ II. Eine Sulfonylharnstoff- bzw. Carboxylgruppe macht sie zu schwachen organischen Säuren mit pK_a-Werten von etwa 5.3 (GBC) bzw. 4.4 (MEG) (Züinkler et al., 1989; Kamp et al., 2003), so

dass sie bei physiologischem pH in Nachbarschaft zu dem allen diesen Verbindungen gemeinen Phenylring eine negative Ladung aufweisen (vgl. Abb. 1-10).

Die Insulinotrope binden an die regulatorische Untereinheit SUR, induzieren die Schließung des Kanals und erhöhen in der Konsequenz den Insulinspiegel der betroffenen Patienten (vgl. Kap. 1.2.2.1). Die Frage, welche Segmente bzw. einzelnen Aminosäuren des K_{ATP} -Kanals bei dieser Bindung und der anschließenden Transduktion in eine Kanalthemmung entscheidend involviert sind, war und ist Gegenstand zahlreicher Untersuchungen (Übersicht bei Bryan et al., 2005). Bereits früh (Rufer und Losert, 1979; Brown und Foubister, 1984) wurde eine Art Zweiteilung der Bindungstasche in eine sog. A- („A-site“) und eine B-Bindungsstelle („B-site“) postuliert. Die verschiedenen Inhibitoren werden je nachdem, ob sie einer oder beiden Bindungsstellen zugeordnet werden, entsprechend als A-, B- oder A+B-Liganden klassifiziert (vgl. Abb. 1-10).

Die kurzen Sulfonylharnstoffe und Nateglinid binden an die A-Bindungsstelle und zeigen eine bis zu 1000-fache Selektivität für den pankreatischen gegenüber den kardiovaskulären K_{ATP} -Kanälen (Ashfield et al., 1999). Glibenclamid und die anderen langkettigen Sulfonylharnstoffe binden zusätzlich zur A- auch an die B-Bindungsstelle. Dies verleiht ihnen eine höhere Affinität bei geringerer Selektivität (Übersicht bei Proks et al., 2002). Die Entwicklung der ersten B-Liganden orientierte sich am B-Teil der A+B-Liganden (vgl. Abb. 1-10). Die B-Liganden werden im allgemeinen als recht unselektiv beschrieben (z.B. Dörschner et al., 1999). Für Repaglinid finden sich diesbezüglich in der Literatur teilweise widersprüchliche Angaben (z.B. Dabrowski et al., 2001 vs. Stephan et al., 2006b), angesichts seiner erfolgreichen Verwendung als Medikament muss jedoch von einer gewissen Selektivität für den pankreatischen K_{ATP} -Kanal ausgegangen werden.

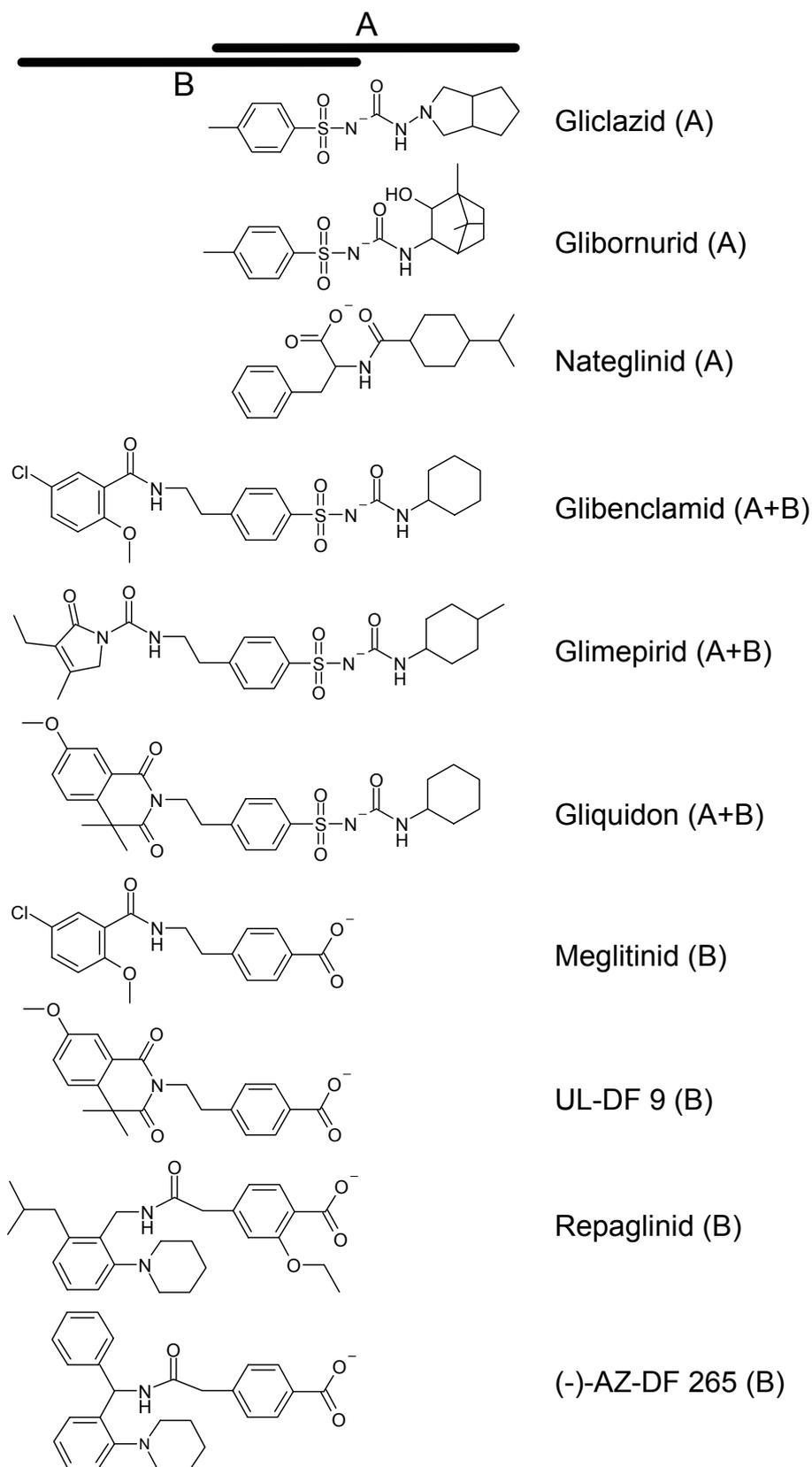


Abb. 1-10: Struktur und Klassifizierung verschiedener Sulfonylharnstoffe und Glinide. Die schwarzen Balken symbolisieren die A- und die B-Bindungsstelle des K_{ATP} -Kanals (vgl. Text). In ihrem Überlappungsbereich erfolgt nach Modellvorstellung die Bindung des allen dieser Insulinotropen gemeinsamen Phenylrings mit benachbarter negativer Ladung. Die Verbindungen werden entsprechend dem Ort ihrer Bindung in A-, B- und A+B-Liganden unterteilt.

Aus Experimenten mit einem wenig membrangängigen Sulfonsäurederivat von Meglitinid, das sich bei Applikation auf die Innen- bzw. Außenseite der Membran pankreatischer Inselzellen im ersten Fall als um Größenordnungen potenter erwies, zogen Schwanstecher et al., 1994 die Schlussfolgerung, dass der Zugang zu Bindungstasche der Insulinotrope vom Cytosol aus erfolgt. Da keine hochauflösenden Kristallstrukturen des K_{ATP} -Kanals existieren, sind die genaue Struktur der Bindungstasche und die einzelnen an ihrem Aufbau beteiligten Aminosäuren nach wie vor unbekannt. Dennoch konnte für ein Segment der Transmembrandomäne 2 (TMD2) von SUR gezeigt werden, dass es von elementarer Bedeutung für die Bindung der A-Liganden ist. So geht die hochaffine Komponente der Inhibition des K_{ATP} -Stroms durch den A-Liganden Tolbutamid, die für Kir6.2/SUR1, nicht jedoch Kir6.2/SUR2A beobachtet wird, komplett verloren, wenn die Transmembranhelices TM 13-17 in SUR1 gegen den entsprechenden Bereich aus SUR2A ausgetauscht werden. Tatsächlich reicht für diesen Effekt bereits der Austausch einer einzigen Aminosäure, Serin 1237, gegen Tyrosin (die korrespondierende Aminosäure aus SUR2) aus. SUR1(S1237Y) zeigt keine hochaffine Bindung von [3 H]GBC. Umgekehrt verleihen die Transmembranhelices TM 14-16 aus SUR1, einem Kanal aus Kir6.2 und dem chimären SUR2A eine Tolbutamidempfindlichkeit, die der von Kir6.2/SUR1 entspricht. Die Wirkung des B-Liganden Meglitinid dagegen wird durch die SUR1(S1237Y)-Mutation nicht wesentlich verändert (jeweils Ashfield et al., 1999). Daher wird angenommen, dass die Selektivität von Tolbutamid und anderen A-Liganden für den pankreatischen Kanal primär nicht auf die Bindung der Sulfonylharnstoffgruppe (allgemeiner: der negativen Ladung) zurückzuführen ist, sondern auf die Wechselwirkungen zwischen SUR und der lipophilen Seitenkette der A-Liganden (in der Darstellung in Abb. 1-10 der rechte Molekülabschnitt). Hierfür wird eine hydrophobe „Tasche“ in der A-Bindungsstelle von SUR1 vermutet, die im SUR2 fehlt bzw. weniger geeignet (= affin) für die Aufnahme dieser Strukturen ist (Vila-Carriles et al., 2007). Das Ersetzen von Serin 1237 durch das sperrigere Tyrosin könnte eine direkte sterische oder aber eine allosterische Hinderung darstellen. Entsprechend erhöht eine Mutation dieses Tyrosins in SUR2 zu Serin die Affinität für GBC (Hambrock et al., 2001; Stephan et al., 2005; vgl. Tab. 3-3, S. 131).

In Experimenten zur Affinitätsmarkierung von SUR1 bzw. Kir6.2/SUR1 mit [125 I]-azido-GBC wurden der N-Terminus von Kir6.2 und die cytoplasmatische Schleife CL3 des SUR als Bestandteile der B-Bindungsstelle identifiziert (vgl. Abb. 1-11). CL3 wird in der Literatur auch mit L0 bezeichnet und erstreckt sich im SUR1 von I190 bis R306 (Gonoi und Seino, 2000). So wird bei Verkürzung des N-Terminus von SUR1 um 196 Aminosäuren eine

gegenüber dem vollständigen SUR unveränderte Affinitätsmarkierung beobachtet, die bei weiterer Verkürzung progressiv schwächer wird und bei einer Deletion von 220 und mehr Aminosäuren nicht mehr nachweisbar ist. Werden diese Experimente am vollständigen Kanal, also in Gegenwart von Kir6.2 durchgeführt, so wird auch die porenbildende Untereinheit affinitätsmarkiert. Tatsächlich findet man für die Mutanten SUR1(Y230A) und SUR1(W232A), die ohne den Kir interessanterweise nicht mehr markiert werden, bei Co-Expression mit Kir6.2 wieder eine Affinitätsmarkierung von sowohl Kir, als auch SUR durch [125 I]-azido-GBC. Keine Markierung erfährt jedoch ein um die ersten 20 N-terminalen Aminosäuren verkürzter Kir6.2 (jeweils Vila-Carriles et al., 2007). Die Bedeutung der porenbildenden Untereinheit für die Bindung der Substanzen wird auch daran deutlich, dass Kir6.2 diese in Radioligandbindungsstudien verbessert (z.B. Hambroek et al., 2001), in speziellen Fällen gar um Größenordnungen (Faktor ~ 150 für den B-Liganden Repaglinid, Hansen et al., 2005; Stephan et al., 2006b).

Durch Proteasespaltung des affinitätsmarkierten SUR1 und Analyse der resultierenden Fragmente wurde gezeigt, dass die Bindung des Liganden tatsächlich an oder zumindest in unmittelbarer Nähe von CL3 stattfindet (Vila-Carriles et al., 2007). Dagegen könnte der Beitrag des Kir6.2-N-Terminus zur B- und von TMD2 zur A-Bindungsstelle auch rein allosterischer Natur sein, hier wurde streng genommen nur ein funktioneller Zusammenhang demonstriert.

In Abb. 1-11 ist zusammenfassend dargestellt, welche Abschnitte von SUR und Kir nach bisherigen Erkenntnissen an der Bindung der Sulfonylharnstoffe und Glinide beteiligt sind.

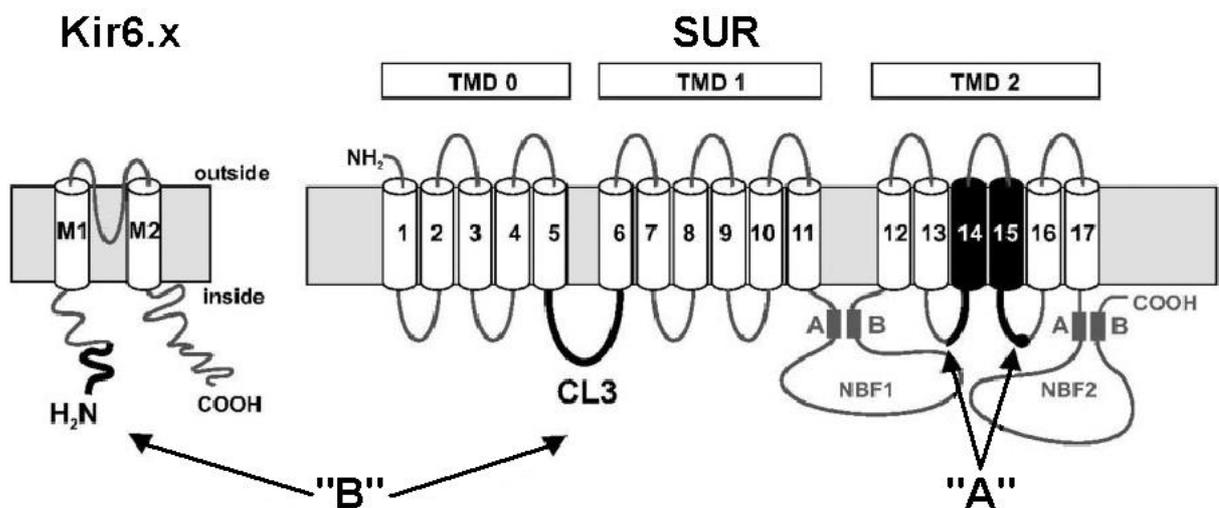
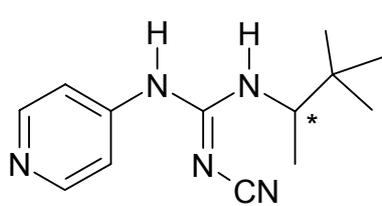


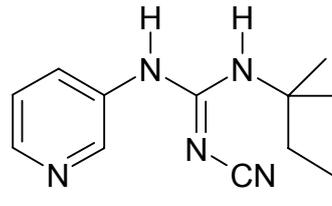
Abb. 1-11: Konzept der zweiteiligen Insulintrop-Bindungstasche am K_{ATP} -Kanal. Hervorhebung der den Bindungsstellen A und B zugeordneten Elemente; Der Kreis in der cytoplasmatischen Schleife zwischen Transmembranhelices TM 15 und 16 symbolisiert Serin 1237; zur Erläuterung vgl. Text; NBF: Nukleotidbindungsfasle.

Erwähnt sei, dass man auch K_{ATP} -Kanal-Blocker kennt, die direkt mit der Kir-Untereinheit interagieren. So entfalten z.B. Cibenzolin (Mukai et al., 1998) und Phentolamin (Proks und Ashcroft, 1997) ihre inhibitorische Wirkung durch Bindung an Kir6.2. Bei U37883A handelt es sich um einen für Kir6.1 selektiven Blocker, der ebenfalls direkt an die porenbildende Untereinheit bindet (Löffler-Walz und Quast, 1998; Surah-Narwal et al., 1999).

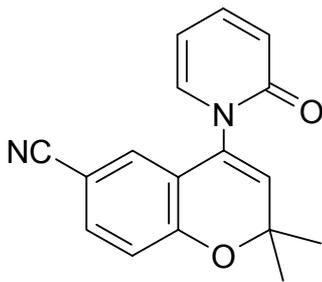
1.2.4.2 K_{ATP} -Kanal-Öffner



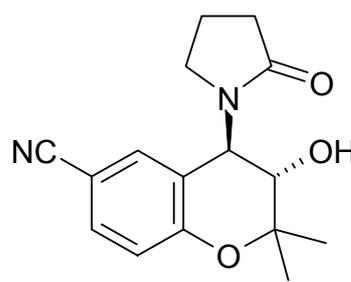
Pinacidil



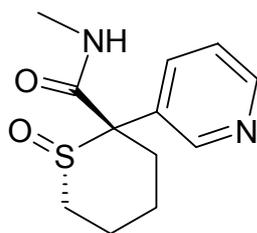
P1075



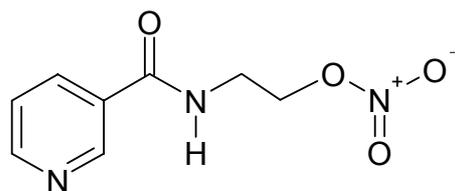
Bimakalim



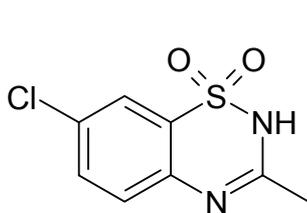
Levcromakalim



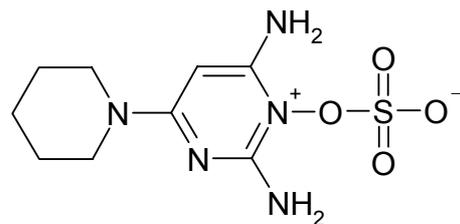
Aprikalim



Nicorandil



Diazoxid



Minoxidilsulfat

Abb. 1-12: Strukturformeln ausgewählter K_{ATP} -Kanal-Öffner.

Zu der hinsichtlich ihrer chemischen Struktur (vgl. Abb. 1-12) sehr heterogenen Gruppe der K_{ATP} -Kanal-Öffner zählen u.a. Cyanoguanidine (z.B. (-)Pinacidil, P1075), Benzopyrane (z.B. Bimakalim, Levromakalim), Thioformamide (z.B. Aprikalim), Pyridylnitrate (z.B. Nicorandil), Pyrimidinsulfate (z.B. Minoxidilsulfat) und Benzothiadiazine (z.B. Diazoxid). Ihr potentielles therapeutisches Spektrum ist recht ausgedehnt und umfasst u.a. Hypoglykämien, Bluthochdruck, Herzrhythmusstörungen, Angina Pectoris und Asthma (Lawson, 1996). Ist die Hypoglykämie die Folge eines durch Mutationen in Kir6.2 oder SUR1 bedingten Fehlens funktioneller pankreatischer K_{ATP} -Kanäle (vgl. Kap. 1.2.2.1), bringen K_{ATP} -Kanal-Öffner keine Verbesserung des Krankheitsbilds, bei leichteren „loss-of-function“-Mutationen helfen sie jedoch oftmals, eine Pankreatektomie zu vermeiden. Dies gilt auch, wenn die Kanäle selbst uneingeschränkt funktionsfähig sind, d.h. wenn Hyperinsulinismus und Hypoglykämie andere Ursachen haben, z.B. aktivierende („gain-of-function“) Mutationen von Glutamatdehydrogenase (Stanley et al., 1998) oder Glucokinase (Glaser et al., 1998) bzw. Defekte („loss-of-function“) der Short-Chain L-3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase (SCHAD) (Clayton et al., 2001). Hier ist in vielen Fällen eine Therapie mit dem Öffner Diazoxid möglich. Dieser bindet als einziger der K_{ATP} -Kanal-Öffner aus Abb. 1-12 mit nennenswerter Affinität an SUR1, während die anderen Verbindungen hohe Selektivität für SUR2 zeigen. Dieser Umstand wurde von Uhde et al., 1999 genutzt, durch Untersuchung diverser Chimären aus SUR1 und SUR2B zwei Bereiche (KCO I: T1059-L1087 und KCO II: R1218-N1320; Nummerierung: SUR2 aus Ratte) in TMD2 als entscheidend für die Bindung dieser Öffner zu identifizieren. KCO I entspricht einem Abschnitt der cytoplasmatischen Schleife (CL 7), die TM 13 und 14 verbindet, während sich KCO II von TM 16 über TM 17 hinaus bis in NBF2 erstreckt (vgl. Abb. 1-13). Substitution von Methionin 1290 in SUR1 (Ratte) durch das korrespondierende Threonin 1253 (Ratte) aus der KCO II von SUR2 verleiht SUR1 in patch-clamp-Messungen mit Kir6.2 (Moreau et al., 2000) und Radioligandbindungsstudien (Hambrock et al., 2004) SUR2-ähnliche Öffnerempfindlichkeit. Moreau et al., 2005a zeigten, dass dieses Verhalten durch die Größe der Aminosäureseitenkette an dieser Position von TM 17 bestimmt wird und dass räumlich benachbarte aromatische Aminosäuren die Bindung der Nicht-Diazoxid-Öffner modulieren, möglicherweise durch π - π -Wechselwirkungen mit deren aromatischen Molekülabschnitten.

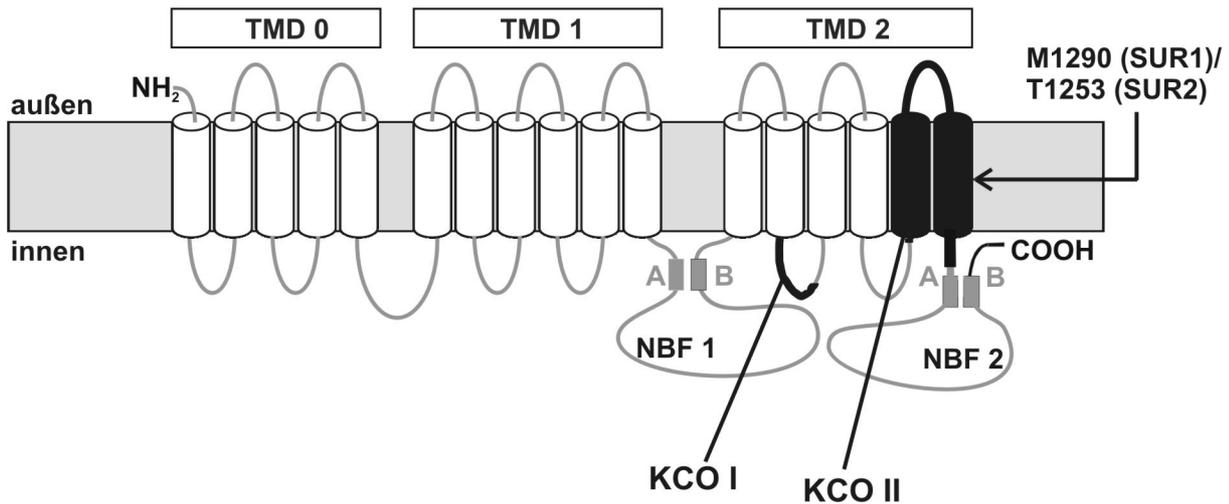


Abb. 1-13: Mutmaßliche SUR-Bindungsstelle für K_{ATP} -Kanal-Öffner. Die schwarz hervorgehobenen Bereiche KCO I und KCO II in TMD2 sind von entscheidender Bedeutung für die Bindung der Öffner P1075, Pinacidil und Levromakalim an SUR2 (Uhde et al., 1999). Der Pfeil verweist auf M1290 in TM17 von SUR1. Dessen Substitution gegen das korrespondierende T1253 aus SUR2 verleiht SUR1 Empfindlichkeit für ansonsten SUR2-selektive Öffner (Moreau et al., 2000; Hambrock et al., 2004). Im Fall von Diazoxid scheinen auch TMD1 und NBF1 und/oder NBF2 eine wichtige Rolle zu spielen (vgl. Text).

Von den beiden SUR2-Spleißvarianten zeigt SUR2B in Bindungsstudien eine ca. vierfach höhere Affinität für K_{ATP} -Kanal-Öffner (inkl. Diazoxid) als SUR2A (Schwanstecher et al., 1998; Hambrock et al., 1999).

Am Beispiel von Bimakalim und einem Sulfonsäurederivat davon demonstrierten Stephan et al., 2006a, dass der Zugang der Benzopyrane zur Öffner-Bindungsstelle von der cytoplasmatischen Seite der Membran erfolgt.

Diazoxid und seine Derivate haben innerhalb der Gruppe der K_{ATP} -Kanal-Öffner eine Sonderstellung, da sie wie erwähnt am pankreatischen K_{ATP} -Kanal wirksam sind. Auch der SUR2B-basierte vaskuläre K_{ATP} -Kanal wird durch Diazoxid aktiviert (Quast und Cook, 1989). Eine vergleichbare Wirkung an Kir6.2/SUR2A wird jedoch nur in Gegenwart von MgADP (100 μ M) erzielt (D'hahan et al., 1999). Auf der Suche nach der Diazoxid-Bindungsstelle beobachteten Babenko et al., 2000a, dass der Austausch von TMD1 + NBF1 in SUR2A gegen die homologen Segmente aus SUR1 zu einer Chimären führt, die bei Co-Expression mit Kir6.2 ähnlich starke Aktivierung durch Diazoxid erfährt, wie der wildtypische Kir6.2/SUR1-Kanal. Dabrowski et al., 2002 identifizierten mit einer ähnlichen Strategie TM 8-11 (aus TMD1) und NBF2 als relevant für eine Aktivierung durch das Diazoxid-Analogon NNC 55-9216. Am K_{ATP} -Kanal aus Kir6.2 und einer SUR2A-Chimäre, die TM 8-11 und NBF2 aus SUR1 enthält, ruft NNC 55-9216 eine gegenüber Kir6.2/SUR2A signifikant stärkere Aktivierung hervor, ohne jedoch das selbe Ausmaß wie am Kir6.2/SUR1 zu

erreichen. Die Abhängigkeit der Diazoxid-Wirkung von TMD1 könnte auf eine eigene Bindungstasche von Diazoxid hinweisen. TMD1 könnte jedoch auch einen allosterischen Einfluss auf die Öffnerbindungsstelle in TMD2 ausüben (Babenko et al., 2000a).

In hoher Konzentration sind einige Öffner auch in Abwesenheit von Mg^{2+} wirksam (Russ et al., 2003), im allgemeinen sind für Bindung und Effekt sämtlicher K_{ATP} -Kanal-Öffner jedoch ATP und Mg^{2+} (oder Mn^{2+}) erforderlich. Dabei kann ATP nicht durch nicht-hydrolysierbare Analoga (AMP-PNP, AMP-PCP) ersetzt werden. Mutation eines konservierten Lysins im Walker-A-Motiv von NBF1 (\rightarrow K711R) oder NBF2 (\rightarrow K1352R) eliminiert den aktivierenden Effekt von MgATP auf die Öffnerbindung (Nummerierung: humaner SUR2B; jeweils Schwanstecher et al., 1998). In ABC-Transportern sind die für den Transport der jeweiligen Substrate auf die andere Seite der Zellmembran erforderlichen Konformationsänderungen an die Bindung und Hydrolyse von ATP an den NBFs gekoppelt (Higgins und Linton, 2004). Die als Bestandteil der K_{ATP} -Kanal-Öffner-Bindungsstelle identifizierte TM 17 des Sulfonylharnstoffrezeptors zeigt relativ starke Homologie zur entsprechenden Helix verschiedener ABC-Transporter (Moreau et al., 2005b), welcher entscheidende Bedeutung bei deren Substratbindung zukommt (Loo und Clarke, 1997). Dies lädt zu Spekulationen ein, dass K_{ATP} -Kanal-Öffner wie P1075 die Rolle der Transportsubstrate einnehmen, wobei hier der SUR keinen Transportprozess, sondern die Aktivierung des K_{ATP} -Kanals vermittelt. Konform mit diesem Modell ist die Erhöhung der ATPase-Aktivität des myocardialen K_{ATP} -Kanals durch verschiedene Öffner (Bienengraeber et al., 2000). Dennoch ist das Verständnis der SUR-vermittelten Regulation des K_{ATP} -Kanals (vgl. auch Kap. 1.2.3.1.2) und des genauen Wirkmechanismus der Öffner noch unvollständig.

1.3 Fragestellung

Zentrales Thema der vorliegenden Dissertation waren Untersuchungen zu Struktur-Funktionsbeziehungen ATP-empfindlicher Kaliumkanäle (K_{ATP}) und ihrer Liganden. An dieser Stelle soll ein knapper Überblick über die Fragestellungen und Zielsetzungen der Arbeit gegeben werden, eine ausführlichere Formulierung findet sich jeweils am Anfang der entsprechenden Kapitel.

In Radioligandbindungsstudien mit [3H]GBC wurde untersucht, wie sich Unterschiede zwischen SUR1, SUR2A und SUR2B auf die Bindung verschiedener Klassen insulinotroper Substanzen auswirken, welche Rolle dabei der Kir-Untereinheit zukommt, welche Folgen ein

Austausch von Tyrosin 1206 in der Bindungstasche von SUR2 gegen Serin (vgl. Kap. 1.2.4.1) auf die Affinität der Liganden hat und inwieweit diese Faktoren zu einer gewissen Selektivität der getesteten Substanzen für einzelne K_{ATP} -Kanal-Subtypen führen. In dieses Projekt waren mehrere Mitglieder der Arbeitsgruppe eingebunden, der Beitrag des Autors bestand in der Bestimmung der Affinität von Glibenclamid und Repaglinid für Kir6.1/SUR2B und Kir6.2/SUR2B (vgl. Kap. 3).

Die Bindung dieser Inhibitoren wird durch Hydrolyse von MgATP an den NBFs von SUR (vgl. Kap. 1.2.3.1.2) geschwächt. Die Arbeit ging der Frage nach, wie eine Hemmung der ATPase durch gezielte Stabilisierung eines prä- bzw. posthydrolytischen Zustands sich auf die [3H]GBC-Bindung an Kir6.2/SUR1(Q1178R) auswirkt. Diese Mutante wurde gewählt, da hier ein besonders starker Effekt von MgATP auf die GBC-Bindung auftritt (vgl. Kap. 4).

In einem weiteren Kapitel wurde ein möglicher Einfluß der Transmembrandomäne TMD0, einem Strukturelement, welches SUR mit nur wenigen anderen Vertretern der ABC-Proteinfamilie teilt (vgl. Abb. 1-7, S. 9), auf die Bindung verschiedener Liganden (GBC, REP, P1075) geprüft. In Kombination mit Co-Immunopräzipitationsexperimenten sollten hieraus auch Erkenntnisse gewonnen werden, inwieweit TMD0 für Wechselwirkungen der SUR2-Proteine untereinander bzw. mit Kir6.2 erforderlich ist (vgl. Kap. 5).

Schließlich wurde die Funktion des Kir6.2-N-Terminus bei der Steuerung („gating“) des K_{ATP} -Kanals näher erforscht. Der Schwerpunkt lag hier in einer umfassenden Charakterisierung der V59G-Mutation in der Gleithelix (vgl. Abb. 1-2, S. 3) von Kir6.2 und einem Vergleich mit den Folgen einer N-terminalen Verkürzung von Kir6.2 bei intakter Gleithelix (vgl. Kap. 6).

Im Zuge der Arbeiten zu obigen Themen ergaben sich Hinweise auf einen bislang unbekanntem Mechanismus bei der Hemmung des K_{ATP} -Kanals durch Tetrapentylammonium (TPA), sowie eine unterschiedliche Wirkung verschiedener K_{ATP} -Kanal-Inhibitoren in whole-cell- und inside-out-Konfiguration der Patch-Clamp-Technik. Diesen Phänomenen wurde separat von den Kernfragen der Dissertation nachgegangen (vgl. Kap. 7 und 8).

Abgerundet werden sollte die Dissertation durch die Suche nach Interaktionspartnern von Kir6.1, der porenbildenden Untereinheit des vaskulären K_{ATP} -Kanals. Hierfür wurde ein Ubiquitin-basiertes Hefe-Zwei-Hybrid-System für Membranproteine (MY2H) eingesetzt (vgl. Kap. 9).

2 Materialien und Methoden

2.1 Software

Unter anderem wurde folgende Software benutzt:

- CSC Camera Controller 1.11 (Raytest, Straubenhardt, D)
- Gene Runner Version 3.05 (Hastings Software, Hastings-on-Hudson, USA)
- Microsoft Excel 2000 (Microsoft, Unterschleißheim, D)
- Pulse Version 9.78 (HEKA, Lambrecht/Pfalz, D)
- SigmaPlot Version 9.01 (Systat Software, Erkrath, D)
- SigmaStat Version 2.03 (Systat Software, Erkrath, D)

2.2 Geräte

Autoklav

- Autoklav Typ 2540MK (tuttnauer, Jerusalem, ISR)

Brutschränke

- B 5060 EC-CO2 (Heraeus, Hanau, D)
- Memmert INE 500 (Memmert, Schwabach, D)

Detektionssystem für Chemilumineszenz

- CSC Chemoluminescence Detection Module (Raytest, Straubenhardt, D)

Elektroblotter

- PerfectBlue Sedec M (Peqlab, Erlangen, D)

Elektrophoresekammern

- für Agarosegele: Gelsystem PerfectBlue Mini M (Peqlab, Erlangen, D)
- für PAGE: MINI-Vertikal-Doppel-Elektrophoresekammer (Roth, Karlsruhe, D)

Emissionssperrfilter (Mikroskopie)

- 505-530 nm (Zeiss, Jena, D)
- > 520 nm (Nikon, Düsseldorf, D)

Gefrierschränke

- Gefrierschrank –20 °C (Liebherr, Bulle, CH)
- Gefriertruhe –80 °C (GFL, Burgwedel, D)

Geldokumentationssystem

- UV-Tisch TFX-20M UV Transilluminator (GIBCO/Invitrogen, Paisley, UK) mit Kamera (Kodak, Rochester, USA)

Feinwaagen

- Precisa 290-9829/E 100A-300M (PAG Oerlikon AG, Zürich, CH)
- Sartorius portable PT1200 (Sartorius, Aubagne, F)

Filtrationsapparatur

- (H. Hölzer Laborgeräte, Dorfen, D)

Heizblock

- neoBlock 1 (neoLab, Heidelberg, D)

Heizschüttler

- Universalschüttler SM 30 A mit Aufsatz Combifix SM (A) und Inkubationshaube TH 30 (alles von Edmund Bühler, Hechingen, D)

Homogenisator

- Polytron PT 3000 (KINEMATICA AG, Littau, CH)

Kreisschüttler

- IKA-VIBRAX-VXR (IKA Werke, Staufen, D)

Lichtmikroskop

- Nikon TMS (Nikon, Düsseldorf, D)
- Eclipse TS100 (Nikon, Düsseldorf, D)
- Axiovert 100 (Zeiss, Jena, D)

Magnetrührer (heizbar)

- IKAMAG RCT (IKA Werke, Staufen, D)

Microplate Reader

- MR 5000 (Dynatech Laboratories/Dynex Technologies, Berlin, D)

Mikroliterpipetten

- Biohit Typ Proline (Biohit, Rosbach v. d. Höhe, D)
- Eppendorf Typ Reference und Typ Research (Eppendorf, Hamburg, D)
- Gilson Typ Pipetman P (Gilson, Limburg-Offheim, D)
- Rotilabo Typ Proline (Roth, Karlsruhe, D)

Mikromanipulatoren (Elektrophysiologie)

- PatchMan (Eppendorf, Hamburg, D)
- STM-3 (Märzhäuser Wetzlar, Wetzlar, D)

Osmometer

- Osmomat 030 (GONOTECH, Berlin, D)

PCR-Cycler

- GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Darmstadt, D)

pH-Meter und -Messkette

- pH-Meter pH 525 (WTW, Weilheim, D)
- pH-Messkette SenTix 81 (WTW, Weilheim, D)

Photometer

- U3000 Spectrophotometer (Hitachi, Düsseldorf, D)
- Biophotometer (Eppendorf, Hamburg, D)

„Puller“ für Patch-Pipetten

- DMZ-Universalpuller (Zeitz, Martinsried, D)

Rollenmischer

- Taumel-Rollenmischer (5 Rollen, 35 U/min) (neoLab, Heidelberg, D)

Rotationsmischer

- Macsmix (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D)

Rotoren

- 45 Ti (Beckman Coulter, Krefeld, D)
- GSA (DuPont/Sorvall, Wilmington, USA)
- SS34 (DuPont/Sorvall, Wilmington, USA)

Schlauchklemmventile (elektrisch)

- (sirai, Bussero, I)

Spannungsquellen

- für Elektrophorese: CONSORT E132 (Consort, Turnhout, B)
- für Western Blot: CONSORT EV231 (Consort, Turnhout, B)

Sterilbank (Laminar Flow)

- Sicherheitswerkbank HS 12 (Heraeus, Hanau, D)

Stickstofftank

- MVE XLC 511 (MVE/Chart, Garfield Heights, USA)

Szintillationszähler

- 2000CA TRI-CARB (Packard/PerkinElmer, Waltham, USA)

Ultraschallbad

- Sonorex RK 52 (BANDELIN electronic, Berlin, D)

Vakuumpumpe

- Membran-Vakuumpumpe N 026.3 (KNF Neuberger, Freiburg, D)

Verstärkersysteme (Elektrophysiologie)

- EPC-9 bzw. EPC-10 (HEKA, Lambrecht/Pfalz, D)

Vortexer

- diverse, z.B. Vortex-Genie 2 (Roth, Karlsruhe, D)

Wasserbäder

- GFL Typ 1013 (GFL, Burgwedel, D)
- Thermomix 1441 (B. Braun, Melsungen, D)
- W12 (P-D Industriegesellschaft, Prüfgerätewerk Dresden, D)

Zentrifugen

- Biofuge Primo (Heraeus, Hanau, D)
- Galaxy MiniStar (VWR, Darmstadt, D)
- Mikroliter (Hettich, Tuttlingen, D)
- RC-5 Superspeed (DuPont/Sorvall, Wilmington, USA)
- Ultrazentrifuge Optima L-70 (Beckman Coulter, Krefeld, D)

2.3 Verbrauchsmaterial

1.5- und 2-ml-Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, D
10- und 50-ml-Luer-Lock-Spritzen	BD, Heidelberg, D
14- und 50-ml-Falcons	BD, Heidelberg, D
35-mm-Petrischalen (Falcon 353801)	BD, Heidelberg, D
94-mm-Schalen für Zellkultur	greiner bio-one, Frickenhausen, D
96-well-Platten	greiner bio-one, Frickenhausen, D
Blotting-Papier 3MM CHR	Whatman, Maidstone, UK
Deckgläschen für Elektrophysiologie	Menzel, Braunschweig, D
Einfrierröhrchen Cryo.s (2 ml)	greiner bio-one, Frickenhausen, D
GF/B Filter	Whatman, Maidstone, UK
GF/C Filter	Whatman, Maidstone, UK
Glaskapillaren (für Agar-Brücken)	Kimble Chase, Vineland, USA
Glaskapillaren GC150 und GC150T	Harvard Apparatus, Edenbridge, UK
Glaskügelchen (d = 0.5 mm)	Roth, Karlsruhe, D
Küvetten („Uvetten“)	Eppendorf, Hamburg, D
Laborfett (Glisseal)	Borer Chemie, Zuchwil, CH
Microloader	Eppendorf, Hamburg, D
Mikroliterpipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, D
Nitrocellulose-Membran BA-S 83 Optitran 0.2 µm	Whatman, Maidstone, UK
PCR-Gefäße Multi-Ultra Tubes 0.2 ml	Roth, Karlsruhe, D
Petrischalen (100 x 15 mm)	neoLab, Heidelberg, D
Silberdraht	Sigma-Aldrich, Hamburg, D
Sterilfilter FP 30/0.2 CA-S (0.20 µm)	neoLab, Heidelberg, D
Sterilfilter Minisart (0.20 µm)	Sartorius, Aubagne, F

2.4 Substanzen**2.4.1 Antikörper**

Monoklonaler Anti-c-MYC 9E10 (Maus)	Santa Cruz, Heidelberg, D
Monoklonaler Anti-FLAG M2 (Maus)	Sigma-Aldrich, Hamburg, D
Polyklonaler Anti-VP16 (Kaninchen)	abcam, Cambridge, UK
AP-konjugierter Anti-(Maus IgG+IgM) (Ziege)	Applied Biosystems, Darmstadt, D
AP-konjugierter Anti-(Kaninchen IgG+IgM) (Ziege)	Applied Biosystems, Darmstadt, D

2.4.2 Enzyme

Sofern nicht anders angegeben stammten die verwendeten Enzyme von New England Biolabs (Frankfurt, D).

2.4.3 Plasmide

Für die Mehrzahl der in dieser Dissertation beschriebenen Experimente wurden die K_{ATP} -Kanal-Untereinheiten in HEK293-Zellen exprimiert. Als Expressionsvektor dienten hierbei meist pcDNA3.1(+) und pcDNA3.1/Zeo(+) (Invitrogen, Paisley, UK), welche sich lediglich durch unterschiedliche Resistenzgene unterscheiden (vgl. Kap. 2.7.5). Die Transkription steht hier unter der Kontrolle eines humanen CMV-Promotors. In einigen Fällen handelte es sich beim Expressionsvektor um pECE (Ellis et al., 1986), welcher allerdings einen schwächeren Promotor (SV40) aufweist.

Für das „MYC-Tagging“ (vgl. Kap. 2.8.1) wurden die für Kir6 bzw. SUR codierenden cDNAs in den Fusionsvektor pCS2+MT (Turner und Weintraub, 1994) kloniert. Die Expression erfolgt hier von einem sCMV-Promotor.

Für Patch-Clamp-Messungen wurde den Transfektionen pEGFP-C1 (Clontech, Palo Alto, USA) zugefügt, um später erfolgreich transfizierte Zellen mit Hilfe des von diesem Plasmid codierten GFP zu identifizieren (vgl. Kap. 2.10).

Die Hefe-Expressionsvektoren aus dem MY2H-System werden in Kap. 2.12 beschrieben.

2.4.4 DNA-Oligomere

DNA-Oligomere für Klonierungen wurden bei Operon (Köln, D) oder biomers.net (Ulm, D) erworben. Sequenzierprimer wurden durch das mit der Sequenzierung beauftragte Unternehmen (vgl. Kap. 2.6.11) organisiert.

DNA-Oligomere für Klonierungen

224pcD-Oli1: catctggcggccgcctagctgttaaccttatggtgtccatgactttcaaacggagcc

224pcD-Oli2: gcattgtctagacactcaggcaggcaggttaaggaggtggtggc

2Bin416_Pr2: gctagggccgaggcggcctttcacatgtctgcacggacaaacg

2Bin416Sfi_1bm: gctagggccattacggccatgagcctttcttttgggaacaac

2BYS-Eco: cgatcgatcgcctatgtctgcacggacaaacgagge

2flag: cggtagggccgcccaccatggattacaaggatgacgacgataaggctagcactataaggacgatgatg
acaaggtaactctag

2flag-rev: ctagagttaacctgtcatcatcgtccttatagtcgctagccttatcgtcgtcatccttgaatccatggtggcgg
ccgccaccg

3sfi2Bminusstop: cgtagggccgaggcggccttcatgtctgcacggacaaacg

61Hpa: cgatcgtaaacgctgattctgatggacactggttctctctgg

61inSTE_gcA: gctagggccattacggccatggttgcaaggaagagcatcatccc

61inSTE_Pr2: gctagggccgaggcggcctttgattctgatggacactggttctcttc

bamMCScla-1: gcggcgatccgcactagtaccggtgctccttagggcacgcgtagcगतatcaaatcgatgcggc

bamMCScla-2: gccgcatcgatttgatatcgtacgcgtgccctaggagcaccggtcactagtgcggatccgccgc

Kir-Eco: cgatcgatatcgcggacagggaatctggagagatgc

Spe-2BYS: ggatcactagtgccgccaccatgagcctttcttttgggg

Spe-2BYSΔ: ggctaactagtgccgccaccatgaatccccagaaagtgaagc

Spe61: ccatcactagtgccgccaccatggtggccaggaagagcatcatccc

Spe-Kir: ggatcactagttcaccggagccatgctgtccc

Sequenzierprimer

CS2: gacgtaaattgggcggtag

dslnx_seqfw: gtcgaaaattcaagacaagg

dslnx_seqrv: aagcgtgacataactaattac

pcDNA3.1-FP: ctctggctaactagagaac

pcDNA3.1-RP/1: caaacaacagatggctggc

T7-981079: taatacgactcactatag

2.4.5 Synthetische K_{ATP} -Kanal-Modulatoren

[³ H]Glibenclamid (~ 40-50 Ci/mmol)	PerkinElmer, Waltham, USA
[³ H]P1075 (~ 120 Ci/mmol)	Amersham/GE Healthcare, Freiburg, D
Glibenclamid (GBC)	Sigma-Aldrich, Hamburg, D
Meglitinid (MEG)	Sanofi-Aventis, Frankfurt, D
Repaglinid (REP)	Toronto Research Chemicals, Toronto, CAN
P1075	Tocris/Biozol, Eching, D

2.4.6 Sonstige Substanzen

In den vorhergehenden Unterkapiteln nicht erfasste Substanzen (diverse Chemikalien, Kulturmedien, Salze, Antibiotika, etc.) sind nachfolgend mit Herstellerangabe (vgl. Legende am Kapitelende) aufgelistet.

3-Amino-1,2,4-Triazol (3-AT)	d	FBS	h	Neomycin	d
6-Aminohexansäure	e	Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagens (2 N)	d	OptiMEM I	h
6x Gelladepuffer für DNA	f	GDP	e	Pepton	e
Aceton	f	Geneticin	h, i	Poly-D-Lysin	e
Adenin (Ade)	e	Gentamicin	h	Polyethylenglycol 4000	f
ADP	e	Glycerin	d	Protein G PLUS-Agarose	n
Agar	e, o	Glycin	f	Proteinstandard Kaleidoscope	k
Agarose NEEO	f	HCl	d	Rotiphorese Gel 40 (37.5:1)	f
Ampicillin	f	Hefeextrakt	e, o	SDS	f
APS	f	HEPES	f	ssDNA (DNA-Natriumsalz aus Lachshoden)	e
ATP	e, m	K ⁺ /Na ⁺ -Tartrat	d	Szintillationsflüssigkeit (UltimaGold)	p
BaCl ₂	d	Kanamycin	f	TEMED	f
BeSO ₄	d	KCl	c	Tetrapentylammoniumbromid	d
Bromphenolblau	f	K-Glutamat	d	Trichloressigsäure (TCA)	f
BSA	e	KH ₂ PO ₄	a	Tris	e
CaCl ₂	a	L-Histidin (His)	e	Triton X 100	f
CDP-Star	l	LiOAc	e	Tunicamycin	e
Complete-Proteaseinhibitor	m	Lipofectamine2000	h	Tween 20	b
CuSO ₄	a	L-Leucin (Leu)	e	UDP	e
D(+)-Glucose	e, f	L-Tryptophan (Trp)	e	Uracil (Ura)	e
DMSO	a	Magermilchpulver	g	Yeast Nitrogen Base (YNB)	e
Drop-out-Mix (-Leu, -Trp, -His, -Ura)	e	Naturaflor	g	Zeocin	h, j
Drop-out-Mix (-Leu, -Trp, -His, -Ura, -Ade)	q	MEM mit Earle's Salzen und L-Glutamin	h	β-ME	f
EDTA	d	MeOH	a		
EGTA	e	MgCl ₂	a		
Ethidiumbromid	f	Na ₂ CO ₃	a		
EtOH	a	Na ₂ HPO ₄	a		
		NaCl	a		
		NaHCO ₃	a		
		NaOH	a		
		Natriumorthovanadat	e		

Legende zu den Herstellerangaben aus obiger Liste:

a	Merck, Darmstadt, D
b	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, D
c	VWR, Darmstadt, D
d	Fluka, Buchs, CH
e	Sigma-Aldrich, Hamburg, D

f	Roth, Karlsruhe, D
g	Töpfer, Dietmannsried, D
h	GIBCO/Invitrogen, Paisley, UK
i	Biochrom, Berlin, D
j	InvivoGen, Toulouse, F

k	BIO-RAD, München, D
l	Applied Biosystems, Darmstadt, D
m	Roche, Mannheim, D
n	Santa Cruz, Heidelberg, D

o	MP Biomedicals, Illkirch, F
p	Packard/PerkinElmer, Waltham, USA
q	USBiological, Swampscott, USA

2.4.7 „Kits“

DNA-Extraktion

NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel, Düren, D)

DNA-Präparation

- „Miniprep“: e.Z.N.A. Plasmid Mini Kit I (OMEGA bio-tek, Norcross, USA)
- „Maxiprep“: EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden, D)
- „Megaprep“: EndoFree Plasmid Mega Kit (Qiagen, Hilden, D)

MY2H

- DUALmembrane kit 2 (Dualsystems Biotech, Schlieren, CH)

Ortsgerichtete Mutagenese

- QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, Cedar Creek, USA)

β-Galactosidase-Assay

- Y2H β-Galactosidase Kit (MoBiTec, Göttingen, D)

2.5 *E. coli*-Kultur zur Gewinnung von Plasmid-DNA

2.5.1 LB-Medium

Obwohl ursprünglich als Abkürzung für „lysogeny broth“ gedacht, versteht man „LB-Medium“ heute im allgemeinen als Abkürzung für „Luria-Bertani-Medium“ (nach Salvador Luria und Giuseppe Bertani).

Das in dieser Arbeit verwendete LB-Medium hatte die folgende Zusammensetzung:

Hefeextrakt: 0.5 % (w/v)

Pepton: 1 % (w/v)

NaCl: 1 % (w/v)

Der pH wurde auf 7.0 eingestellt, das Medium 60 min autoklaviert und bei 6 °C gelagert. Antibiotika (100 µg/ml Ampicillin oder 30 µg/ml Kanamycin) wurden dem Medium jeweils direkt vor Animpfen mit *E. coli* zugesetzt. Für LB-Agarplatten wurde das Medium mit 1.5 % (w/v) Agar und einem Magnetrührfisch autoklaviert (typischerweise ca. 200 ml in einer 500-ml-Schottflasche). Antibiotika wurden in diesem Fall nach Abkühlen des Mediums auf ca. 50 °C zugesetzt. Aus 200 ml resultierten im Schnitt neun 100-mm-Platten, die bis zum Gebrauch bei 6 °C gelagert wurden.

2.5.2 Herstellung von *E. coli*-Stammkulturen

Bei der erstmaligen Präparation einer bestimmten Plasmid-DNA wurde stets eine Stammkultur der mit diesem Plasmid transformierten *E. coli* angelegt. Hierzu wurden 850 µl Kultur mit ca. 150 µl Glycerin in einem Einfrierröhrchen gemischt, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80 °C eingelagert. Für spätere DNA-Präparationen (vgl. Kap. 2.6.4) konnte dann auf diese Stammkultur zurückgegriffen werden, indem ein Aliquot aus der teilweise aufgetauten Kultur zum Animpfen des Kulturmediums verwendet wurde.

2.6 Allgemeine Techniken zur Isolierung, Modifizierung, Analyse, Amplifikation und sonstigen Manipulation von DNA

2.6.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen

Die Bestimmung von Konzentration (und Reinheit) einer DNA-Lösung erfolgte photometrisch nach Verdünnung mit H₂O gegen H₂O als Referenz. Eine Absorption von 1 A₂₆₀ bei einer Küvettschichtdicke von 1 cm entspricht einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml.

2.6.2 Elution von Plasmid-DNA aus Filterpapier

Wenn Plasmide nur „trocken“, d.h. auf Filterpapier vorlagen, musste die DNA zunächst eluiert werden. Hierzu wurde der entsprechende Bereich des Filterpapiers ausgeschnitten, in ein 1.5-ml-Reaktionsgefäß gesteckt, mit 200 µl TE-Puffer (aus EndoFree Plasmid Maxi Kit) versetzt und 30 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert (alle 10 min gevortext). Anschließend wurde der Ansatz kurz zentrifugiert, der Überstand in ein frisches 1.5-ml-Reaktionsgefäß

überführt, die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt und ca. 5 ng für die Transformation kompetenter *E. coli* verwendet.

2.6.3 Transformation von *E. coli*

Bei den verwendeten chemisch-kompetenten *E. coli* handelte es sich in den meisten Fällen um One Shot Mach1-T1 (Invitrogen, Paisley, UK), die gemäß Herstelleranweisung transformiert, auf LB + Ampicillin bzw. Kanamycin (vgl. Kap. 2.5.1) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert wurden.

2.6.4 DNA-Präparation in unterschiedlichem Größenmaßstab

Das Animpfen von *E. coli*-Flüssigkulturen (LB + Amp. bzw. Kan.) erfolgte aus Stammkulturen (vgl. Kap. 2.5.2) bzw. durch Picken geeigneter Kolonien von Agarplatten. Abhängig von der Art des Plasmids und der angestrebten DNA-Ausbeute betrug das Gesamtvolumen des Kulturmediums 5-6 ml („Miniprep“), 150 ml („Maxiprep“) oder 1000-1250 ml („Megaprep“). Letztere war ausschließlich für den pECE-Vektor erforderlich. Die Durchführung erfolgte gemäß Herstelleranweisung zum jeweiligen DNA-Präparations-Kit.

2.6.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die Einführung geeigneter Restriktionsschnittstellen mittels PCR wurde die AccuPrime Pfx DNA Polymerase (Invitrogen) entsprechend den Herstellervorgaben eingesetzt.

2.6.6 Hybridisierung (Annealing) von DNA-Oligomeren

10x Annealing Puffer	Tris/HCl pH 7.5:	100 mM
	NaCl:	1 M
	EDTA:	10 mM

Zum „Annealing“ zweier komplementärer Einzelstrang-DNA-Oligomere wurde in einem 1.5-ml-Reaktionsgefäß folgender Ansatz zusammenpipettiert:

- 22.5 µl 100 µM Oligo 1
- 22.5 µl 100 µM Oligo 2
- 5 µl 10x Annealing Puffer

Der Ansatz wurde 5 min bei 95 °C inkubiert, dann bei RT langsam abgekühlt, schließlich auf Eis gestellt und eine 1:10-Verdünnung mit H₂O hergestellt, resultierend in einer Endkonzentration des nun doppelsträngigen Oligomers von 4.5 µM.

2.6.7 Restriktionsverdau

Zum Schneiden von DNA im Zuge von Klonierungen oder zu analytischen Zwecken wurden diverse Restriktionsenzyme eingesetzt. Die jeweiligen Bedingungen wie Enzymmenge, Ansatzvolumen, Pufferwahl, Inkubationstemperatur, etc. waren jeweils abhängig von der DNA-Menge, den eingesetzten Enzymen und ihren jeweiligen Pufferpräferenzen. Bei Klonierungen waren es zuweilen angebracht, den geschnittenen Vektor durch Zusatz von alkalischer Phosphatase (CIP) zu dephosphorylieren, um eine Selbstligation (d.h. ohne „insert“) zu verhindern.

2.6.8 Horizontale Agarose-Gelelektrophorese und DNA-Extraktion

TAE-Puffer	Tris:	40 mM
	CH ₃ COOH:	20 mM
	EDTA:	1 mM

Die Agarosekonzentration der Gele lag typischerweise bei 0.7 oder 1 % (w/v), betrug für die Untersuchung kleiner DNA-Fragmente in Einzelfällen jedoch auch 2-3 %. Die entsprechende Menge Agarose wurde in 50 ml TAE-Puffer suspendiert und durch Kochen auf der Heizplatte eines Magnetrührers zum Schmelzen gebracht. Nach mehrminütiger Abkühlung bei Raumtemperatur wurde die Gellösung in die Gelkammer gegossen und die gewünschten Kämme gesteckt. Nach Verfestigung der Lösung zu einem Gel wurden die Kämme entfernt, das Gel gegebenenfalls mit einem Skalpell zurecht geschnitten (nicht sofort benötigte Gelsektionen wurden in Frischhaltefolie gewickelt und bis zum Gebrauch für bis zu 2-3 Wochen im Kühlschrank gelagert), der Laufpuffer in die Kammer gefüllt und die mit 6x Gelladepuffer gemischten DNA-Proben in die Geltaschen pipettiert. Teilweise wurde der 6x Gelladepuffer 1:20 mit 30 % (v/v) Glycerin verdünnt, um die Konzentration der Farbmarker Bromphenolblau und Xylencyanolblau herabzusetzen, so dass diese nicht die Detektion geringer DNA-Mengen in den entsprechenden Gelabschnitten erschweren konnten.

Beim Laufpuffer handelte es sich um TAE-Puffer + 0.5 µg/ml Ethidiumbromid, so dass die DNA-Banden direkt im Anschluß an die Elektrophorese (Spannung: ~ 85 V) auf einem UV-Tisch sichtbar gemacht werden konnten. Falls erforderlich (→ Klonierungen) wurden einzelne Banden mit einem vorher abgeflammt Skalpell ausgeschnitten und in vorbereitete 1.5-ml-Reaktionsgefäße überführt. Die Extraktion der DNA erfolgte dann mit Hilfe des Kits NucleoSpin Extract II.

2.6.9 Ligation von DNA

Die Ligation zweier DNA-Fragmente wurde in 20-µl-Ansätzen mit 400 U T4 DNA Ligase erreicht. Die Inkubation bei RT dauerte in der Regel 1 h (DNA-Fragmente mit überhängenden („sticky“) Enden) oder 2 h (stumpfe („blunt“) Enden), in Einzelfällen wurden auch längere Inkubationszeiten (z.B. über Nacht bei 4 °C, gefolgt von 2 h bei RT) angewandt. Anschließend wurden die Ansätze auf Eis gekühlt und jeweils 5-10 µl für die Transformation kompetenter *E. coli* verwendet (vgl. Kap. 2.6.3).

2.6.10 Ortsgerichtete Mutagenese

Punktmutationen wurden mit Hilfe des QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kits erzeugt.

2.6.11 DNA-Sequenzierung

Sequenzierungen wurden extern durchgeführt (GATC Biotec, Konstanz, D).

2.7 HEK293-Zellkultur

Die Zelllinie HEK293 wurde durch Transformation einer humanen embryonalen Nierenzellkultur mit gescherter (d.h. fragmentierter) DNA aus Adenovirus Typ 5 hergestellt (Graham et al., 1977). Dank der vergleichsweise unkomplizierten Kultivierung und Transfizierbarkeit findet sie in vielen Forschungsgruppen Verwendung.

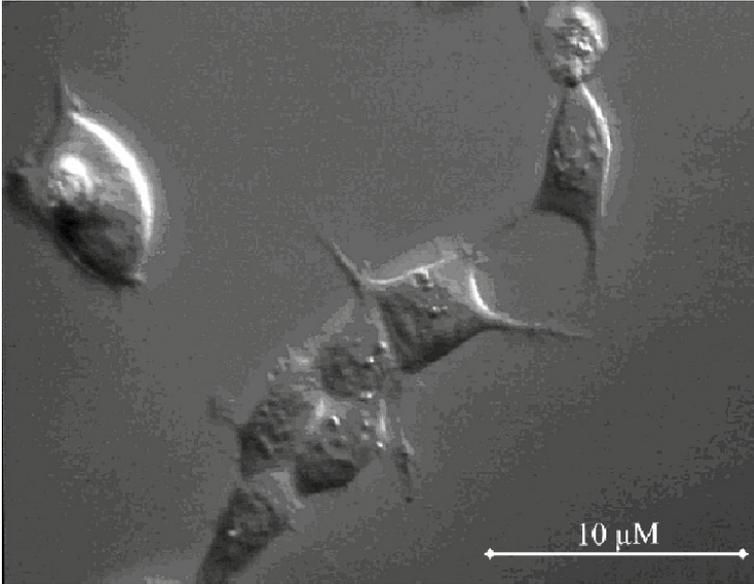


Abb. 2-1: HEK293-Zellen unter dem Mikroskop.

2.7.1 Standard-Kulturbedingungen

Als Standard-Kulturmedium diente „MEM (Minimum Essential Medium) mit Earle’s Salzen und L-Glutamin“ + 10 % (v/v) Fötale Rinderserum (FBS) + 20 μg/ml Gentamicin. Bevor es zum MEM gegeben wurde, wurde das FBS 1-2 h bei 55 °C im Wasserbad inkubiert, um mögliche Restaktivitäten von Serumproteasen zu eliminieren. Das fertige Standard-Kulturmedium wurde bei 6 °C gelagert und jeweils vor Benutzung im Wasserbad auf 37 °C aufgewärmt.

Die HEK293-Zellen wuchsen adhärent in 94-mm-Kulturschalen. Die Schalen enthielten 10 ml Standard-Kulturmedium und wurden im Brutschrank bei 37 °C in wasserdampfgesättigter, mit 5 % CO₂ angereicherter Atmosphäre inkubiert. Im Abstand von 3-4 Tagen wurden die Zellen passagiert, d.h. verdünnt in frische Kulturschalen ausgesät. Hierzu wurde das alte Medium abgesaugt, die Zellen mit 3-4 ml frischem (auf 37 °C vorgewärmtem) Standard-Kulturmedium abgelöst und je 1 ml Zellsuspension in jede neue Kulturschale pipettiert (zu vorgelegten 9 ml frischem Medium). Bei ungewöhnlich hoher oder niedriger Konfluenz (Zelldichte) wurde die Verdünnung der Zellen (d.h. das Volumen, in dem die Zellen abgelöst wurden) angepasst. Nach etwa 40 Zellpassagen, wurden die Zellen verworfen und durch neu aufgetaute Zellen ersetzt (vgl. Kap. 2.7.3). Diese und andere Arbeiten (Transfektion, etc.), bei denen eine Kontamination der Kulturen vermieden werden sollte, erfolgten an der Sterilbank. Jedweder Manipulation der Zellen ging die lichtmikroskopische Kontrolle der Kulturen hinsichtlich Konfluenz, potentieller Kontamination und sonstigem Zustand voraus.

2.7.2 Einfrieren von HEK293

Die zum Einfrieren von HEK293 verwendeten „Gefriermedien“ A und B hatten folgende Zusammensetzung:

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

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

Zur dauerhaften Lagerung in flüssigem Stickstoff wurden die Zellen einer oder mehrerer äquivalenter 94-mm-Kulturschalen mit je 4 ml Gefriermedium A abgelöst, in einem 50-ml-Falcon vereinigt und zentrifugiert (2 min, 500 g). Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet mit Gefriermedium A (0.5 ml pro Schale) suspendiert und auf eine entsprechende Anzahl an Einfrierröhrchen verteilt (je 500 µl pro Röhrchen). Zu jedem Einfrierröhrchen wurden dann 500 µl Gefriermedium B pipettiert, die Lösung gemischt und sofort auf Eis gekühlt. Schließlich wurden diese Zellsuspensionen über Nacht bei -80 °C eingelagert und am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff überführt.

2.7.3 Auftauen von HEK293

Um eingefrorene HEK293 (vgl. Kap. 2.7.2) wieder aufzutauen und in Kultur zu nehmen, wurden zunächst 20 ml Standard-Kulturmedium in einem 50-ml-Falcon auf 37 °C erwärmt. Mit diesem Medium wurden die Zellen aufgetaut und suspendiert, indem mehrfach warmes Medium zu den gefrorenen HEK293 gegeben und zusammen mit den aufgetauten Zellen in das 50-ml-Falcon zurücktransferiert wurde, bis sämtliche Zellen überführt waren. Daraufhin wurden die Zellen zentrifugiert (2 min, 500 g), das Pellet in 1 ml Standard-Kulturmedium resuspendiert und in eine 94-mm-Kulturschale pipettiert (zu vorgelegten 9 ml frischem Standard-Kulturmedium). Am nächsten Tag wurde je nach Konfluenz der Zellen das Kulturmedium erneuert oder bereits passagiert (vgl. Kap. 2.7.1).

2.7.4 (Transiente) Transfektion

Zur Expression von Kir, SUR, etc. in HEK293 mussten Letztere zunächst mit den entsprechenden Plasmiden transfiziert werden. Das Medium in den für die Transfektion vorgesehenen 94-mm-Kulturschalen wurde durch 6 ml gentamicinfreies vorgewärmtes Kulturmedium (MEM + 10 % (v/v) FBS) ausgetauscht. Die Transfektion erfolgte mit dem auf kationischen Lipiden basierenden Reagens Lipofectamine2000. Für jeden

Transfektionsansatz wurden zwei sterile 2-ml-Reaktionsgefäße mit 750 µl OptiMEM I vorbereitet. In dem einen wurde die Plasmid-DNA (meist 10 µg), in dem anderen 37.5 µl Lipofectamine2000 gelöst. Nach 5-minütiger Inkubation wurde die DNA-Lösung in den Ansatz mit dem Lipofectamine2000-Lösung gegeben, vorsichtig gemischt und weitere 20 min inkubiert. Schließlich wurden die DNA-Liposomen-Komplexe tropfenweise auf der jeweiligen Kulturschale verteilt, bevor diese zur Inkubation in den Brutschrank zurückgestellt wurde.

2.7.5 Herstellung und Kultivierung „permanent transfizierter“ HEK293-Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide (vgl. Kap. 2.4.3) werden in HEK293 nicht episomal repliziert, d.h. für jedes neue Experiment war eine neue (transiente) Transfektion (vgl. Kap. 2.7.4) erforderlich. Um diese zeit- und kostenintensive Prozedur teilweise zu umgehen, bzw. um damit verbundene experimentelle Nachteile (vgl. Kap. 3.3.1) zu vermeiden, wurde in Einzelfällen auf permanent transfizierte Zelllinien zurückgegriffen, deren Herstellung sich an dem von Giblin et al., 1999 beschriebenen Protokoll orientierte. Hierbei werden nach der Transfektion durch Zusatz entsprechender Antibiotika zum Kulturmedium Zellen selektiert, die die transfizierten Plasmide durch Rekombination in ihre chromosomale DNA integriert haben und somit dauerhaft replizieren und exprimieren. Diese Zellen können sich in Anwesenheit der Antibiotika teilen und ausbreiten, während andere Zellen unter diesen Verhältnissen absterben und sich vom Schalenboden ablösen. Vitale Klone werden in frische Kulturschalen überführt und dort weiter kultiviert. Konkret wurden das Aminoglycosid Geneticin für pcDNA3.1(+) und das Glycopeptid Zeocin für die Selektion auf pcDNA3.1/Zeo(+) eingesetzt. Die Konzentrationen wurden im Verlauf des Selektionsprozesses von anfangs 727 (Geneticin) und 364 (Zeocin) µg/ml schrittweise gesenkt, bis hin zur dauerhaften Kultivierung der Zelllinien in Standard-Kulturmedium + 297 µg/ml Geneticin (und gegebenenfalls 148 µg/ml Zeocin). Die so hergestellten Klone wurden in Radioligandbindungsexperimenten und/oder in der Elektrophysiologie überprüft.

2.7.6 Gewinnung nicht-fraktionierter Membranen aus HEK293-Zellen

Hypotoner Lysepuffer	HEPES:	10 mM
	EGTA:	1 mM
	pH (6 °C):	7.4

Isotoner Membranpräparationspuffer	HEPES:	5 mM
	NaCl:	139 mM
	KCl:	5 mM
	pH (6 °C):	7.4

Zur Präparation von Zellmembranen wurde von den betreffenden Schalen das Kulturmedium bis auf ca. 4 ml abgenommen. In dem verbliebenen Restvolumen wurden die Zellen durch Triturieren vom Schalenboden abgelöst und in ein 50-ml-Falcon überführt. Nach Zentrifugation (4 min, 500 g) wurde das Zellpellet in eisgekühltem hypotonem Lysepuffer (4 ml pro 94-mm-Schale) suspendiert und das Zelllysat 30 min bei 100000 g zentrifugiert (4 °C). Die pelletierten Membranen wurden mit 2x 5 ml isotonem Membranpräparationspuffer gewaschen, in 1.5- oder 2-ml-Reaktionsgefäße überführt und nach Zusatz von 0.5 ml isotonem Membranpräparationspuffer bei -80 °C gelagert. Wenn eine Aliquotierung auf mehrere Reaktionsgefäße erwünscht war, wurden die Membranen zunächst in isotonem Membranpräparationspuffer (0.5 ml pro Schale) am Polytron-Homogenisator homogenisiert, dann auf die Reaktionsgefäße verteilt und eingefroren. Im Fall von transient transfizierten HEK293 erfolgte die Membranpräparation zwei Tage nach Transfektion.

2.8 Immunopräzipitation (IP), SDS-PAGE und Western Blot

2.8.1 FLAG- und MYC-Tagging für IP und Western Blot

Für IP und Detektion im Western Blot wurden SUR2B(YS), SUR2B(YS) Δ TMD0, Kir6.2 und Kir6.1 durch Klonierung in den Vektor pCS2+MT C-terminal mit sechs Kopien des c-MYC-Epitoptags fusioniert. Hierzu wurde zunächst die multiple Klonierungsstelle (MCS) von pCS2+MT um Schnittstellen für die Restriktionsenzyme EcoR V und Spe I erweitert, indem die komplementären Oligos bamMCScla-1 und bamMCScla-2 annealt, mit BamH I und Cla I geschnitten und in den analog geschnittenen Vektor eingefügt wurden. Mittels PCR wurden die für obige K_{ATP} -Kanal-Untereinheiten codierenden cDNAs unter Einführung von Schnittstellen für Spe I und EcoR V oder Hpa I (erzeugt wie EcoR V stumpfe Enden) und Deletion des jeweiligen Stop-Codons amplifiziert, teilweise bei gleichzeitiger Optimierung der Kozak-Sequenz (Kozak, 1987nar). Bei den PCR-Primern (vgl. Kap. 2.4.4) handelte es sich um Spe-2BYS und 2BYS-Eco (SUR2B(YS)), Spe-2BYS Δ und 2BYS-Eco (SUR2B(YS) Δ TMD0), Spe-Kir und Kir-Eco (Kir6.2), sowie Spe61 und 61Hpa (Kir6.1). Der Erfolg der Klonierung

wurde durch Sequenzierung des fertigen Plasmids im Bereich der Ligationstellen überprüft (Primer: CS2, T7-981079).

Alternativ wurden an SUR2B(YS) und SUR2B(YS) Δ TMD0 N-terminal zwei FLAG-Epitoptags angefügt (beide SURs in pcDNA3.1(+)). Hierzu wurde per PCR unmittelbar vor dem ursprünglichen Startcodon die Sequenz „gtaacctt“ und somit eine Hpa I-Schnittstelle erzeugt, die beiden komplementären DNA-Oligos 2flag und 2flag-rev annealt, mit Not I und Hpa I geschnitten und in den analog geschnittenen Vektor eingefügt.

Die Funktionalität von Kir6.2-MYC, SUR2B(YS)-MYC und SUR2B(YS)-FLAG wurde erfolgreich in elektrophysiologischen Tests überprüft.

Bei den im MY2H-System identifizierten Interaktionspartnern wurde analog verfahren bzw. der zweifache FLAG-Tag bereits bei der Gensynthese integriert (vgl. Kap. 2.12.12).

2.8.2 Solubilisation von Membranproteinen und Co-Immunopräzipitation (Co-IP)

1.3x IP-Puffer	Tris:	32.9 mM
	NaCl:	197.4 mM
	EDTA:	5.3 mM
	pH (6 °C):	7.4

Die Membranen von 1 oder 2 Schalen (94 mm) HEK293-Zellen (Präparation: vgl. Kap. 2.7.6) wurden auf Eis in einem 2-ml-Reaktionsgefäß mit 760 μ l 1.3x IP-Puffer, 40 μ l 25x Complete-Proteaseinhibitor und 200 μ l 5 % (v/v) Triton X 100 versetzt. Nach Homogenisierung am Polytron-Homogenisator wurden die Ansätze mit kleinen Magnetrührfischen bestückt und 1 h bei niedriger Geschwindigkeit gerührt (6 °C). Danach wurden die Rührfische entfernt, die Ansätze zentrifugiert (15 min, 14000 g, 4 °C) und die Überstände (die Lysate) in frische 2-ml-Reaktionsgefäße überführt. 30- oder 40- μ l-Aliquote wurden entnommen und bei -20 °C gelagert.

Vor der eigentlichen Immunopräzipitation wurde ein „preclearing“ durchgeführt, das dazu diente, Proteine abzutrennen, die unspezifisch an Protein G PLUS-Agarose binden. Dafür wurden pro Ansatz 20 μ l Protein G PLUS-Agarose mit IP-Puffer + 1 % (v/v) Triton X 100 gewaschen und den Lysaten zugesetzt. Die Lysate rotierten daraufhin kopfüber (Macsmix) für 30 min bei 4 °C. Anschließend wurden die Ansätze in 1.5-ml-Reaktionsgefäße überführt, kurz zentrifugiert, um die Agarosekügelchen („beads“) zu sedimentieren, und die Überstände in frische 2-ml-Reaktionsgefäße überführt.

Schließlich wurde den Lysaten je 10 µl Anti-MYC-Antikörper zugefügt. Die Lysate rotierten dann über Nacht auf dem Rotationsmischer (Macsmix) bei 4 °C. Am nächsten Tag wurden zu jedem Ansatz 30-40 µl mit IP-Puffer + 0.1 % (v/v) Triton X 100 gewaschene Protein G PLUS-Agarose gegeben, die Ansätze 3 h bei 4 °C rotierend weiter inkubiert. Im Anschluß wurden die IP-Ansätze in 1.5-ml-Reaktionsgefäße überführt, kurz zentrifugiert, und die Überstände verworfen. Die „beads“ wurden 6-10 mal mit je 600 µl IP-Puffer + 0.1 % (v/v) Triton X 100 gewaschen (jeweils kurzes Zentrifugieren nach Zugabe des Waschpuffers). Wenn geplant war, FLAG-getaggte *und* MYC-getaggte Proteine des *selben* IP-Ansatzes zu detektieren, wurden die „beads“ im Zuge des letzten Waschschriffs auf je zwei 1.5-ml-Reaktionsgefäße aufgeteilt. Schließlich wurden die „beads“, sowie die am Vortag entnommenen Aliquote der Lysate, mit je 40 µl 2x Lämmli-Gelladepuffer (vgl. Kap. 2.8.3) versetzt, 15 min bei RT inkubiert, mittels PAGE aufgetrennt und einem Western Blot unterzogen (vgl. Kap. 2.8.4).

2.8.3 SDS-PAGE

2x Lämmli-Gelladepuffer

Tris/HCl pH 6.8: 120 mM

Glycerin: 20 % (v/v)

SDS: 4 % (w/v)

Bromphenolblau: 0.01 % (w/v)

β-ME: 10 % (v/v) (β-ME jeweils erst vor kurz vor Gebrauch frisch zugesetzt)

Elektrophorese-Laufpuffer

Tris: 25 mM

Glycin: 250 mM

SDS: 0.1 % (w/v)

Der pH des Laufpuffers (8.3) musste nicht eingestellt werden, sondern folgte direkt aus der Zusammensetzung des Puffers.

Die Polyacrylamidgele bestanden aus einem Trenn- und einem Sammelgel der folgenden Zusammensetzung:

Trenngel (a %)

Tris/HCl pH 8.8:	375 mM	Rezept für 20 ml Gellösung:
Acrylamid:	a % (w/v)	- (14.6 – a/2) ml H ₂ O
SDS:	0.1 % (w/v)	- 5 ml 1.5 M Tris/HCl pH 8.8
TEMED:	0.04 % (v/v)	- a/2 ml Rotiphorese Gel 40 (37.5:1)
APS:	0.1 % (w/v)	- 200 µl 10 % (w/v) SDS
		- 8 µl TEMED
		- 200 µl 10 % (w/v) APS

Die APS-Lösung wurde jeweils frisch angesetzt.

Der Acrylamidanteil des Trenngels richtete sich nach der Größe der jeweils untersuchten Proteine und betrug zwischen 6 und 10 %. Die Trenngele hatten eine Länge von etwa 5.5 cm bei einer Breite von 7 cm und einer Dicke von 1 mm. Vor dem Gießen der Trenngele wurden die Gießkammern mit je 300 µl einer heißen 0.25 % (w/v) Agaroselösung abgedichtet (Rezept für 10 ml Gellösung):

- 25 mg Agarose
- 7.5 ml H₂O
- 2.5 ml 1.5 M Tris/HCl pH 8.8

Sammelgel (4 %)

Tris/HCl pH 6.8:	126 mM	Rezept für 10 ml Gellösung:
Acrylamid:	4 % (w/v)	- 7.5 ml H ₂ O
SDS:	0.1 % (w/v)	- 1.26 ml 1 M Tris/HCl pH 6.8
TEMED:	0.1 % (v/v)	- 1 ml Rotiphorese Gel 40 (37.5:1)
APS:	0.1 % (w/v)	- 100 µl 10 % (w/v) SDS
		- 10 µl TEMED
		- 100 µl 10 % (w/v) APS

Die APS-Lösung wurde jeweils frisch angesetzt.

Die Sammelgele hatten eine Länge von etwa 1 cm bei einer Breite von 7 cm und einer Dicke von 1 mm. Die Breite der Geltaschen wurde dem Probenvolumen angepasst und betrug 4-10 mm.

Die Elektrophorese erfolgte unter Wasserkühlung bei einer Spannung von anfangs 120 V, die mit sinkender Stromstärke auf 200 V erhöht wurde. Als Größenmarker wurden 4 µl eines farbigen Proteinstandards (Kaleidoscope) aufs Gel geladen.

2.8.4 Western Blot und Immunodetektion

Transferpuffer für Western Blot

Für die Western-Blots (Semi-Dry-Verfahren) kam ein 3-Puffer-System zum Einsatz:

Anodenpuffer 1	Tris:	300 mM
	MeOH:	20 % (v/v)
Anodenpuffer 2	Tris:	25 mM
	MeOH:	20 % (v/v)
Kathodenpuffer	Tris:	25 mM
	MeOH:	20 % (v/v)
	6-Aminohexansäure:	40 mM

Die pH-Werte von ca. 10.4 (Anodenpuffer 1 und 2) bzw. 9.4 (Kathodenpuffer) wurden nicht eingestellt, sondern resultierten direkt aus der Pufferzusammensetzung.

Puffer für Immunodetektion

PBS	Na ₂ HPO ₄ :	48 mM
	KH ₂ PO ₄ :	18 mM
	NaCl:	147 mM
	pH:	7.2
TBS	Tris:	50 mM
	NaCl:	138 mM
	KCl:	2.7 mM
	pH:	8.0
TBST	TBS + 0.05 % (v/v) Tween 20	
TBS (ab)	Tris:	20 mM
	NaCl:	137 mM
	pH:	7.6
TBST (ab)	TBS (ab) + 0.1 % (v/v) Tween 20	
Assaypuffer für Chemilumineszenz	Tris:	200 mM
	MgCl ₂ :	10 mM
	pH:	9.5

Für den Western Blot wurden die SDS-Polyacrylamidtrenngele zurechtgestutzt (Entfernung von ungenutzten Gelspuren, etc.) und kurz mit etwas H₂O abgespült. Blotting-Papier und Nitrocellulose-Membran wurden auf die Größe des Gels zurechtgeschnitten, mit den entsprechenden Transferpuffern (vgl. Abb. 2-2) getränkt und mit dem Gel im Elektroblocher zu dem in Abb. 2-2 illustrierten „Sandwich“ gestapelt. Der Proteintransfer erfolgte im „Semi-Dry-Verfahren“ bei einer konstanten Stromstärke von 200 mA (1 Gel) bzw. 350 mA (2 Gele) über einen Zeitraum von 80-120 min.

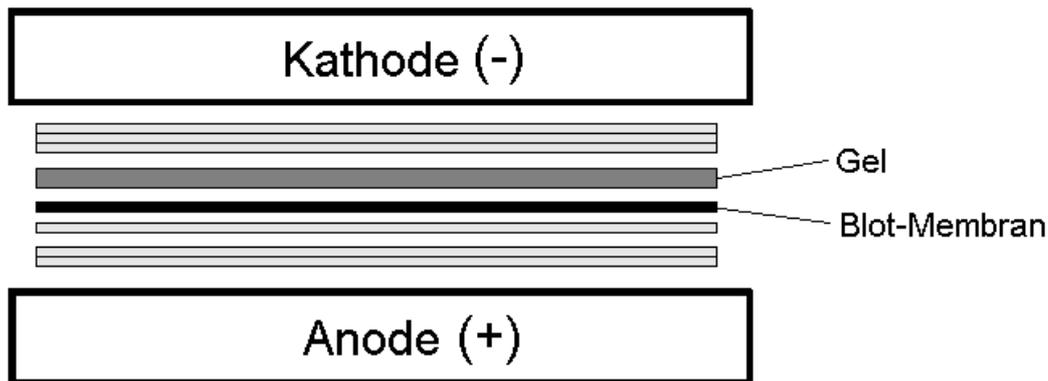


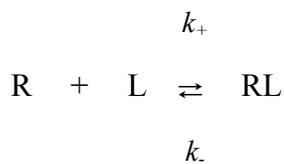
Abb. 2-2: Aufbau „Semi-Dry“ Western Blot. Von unten (Anode) nach oben (Kathode) folgen zwei Lagen Blotting-Papier (getränkt mit Anodenpuffer 1; hellgrau dargestellt), eine Lage Blotting-Papier (Anodenpuffer 2; hellgrau), Blot-Membran (Anodenpuffer 2; schwarz), SDS-Gel (dunkelgrau), drei Lagen Blotting-Papier (Kathodenpuffer; hellgrau). Die durch SDS negativ geladenen Proteine wandern im elektrischen Feld Richtung Anode und werden dabei auf die Blot-Membran übertragen.

Nach Beendigung des Proteintransfers wurde die Membran zum Blockieren freier unspezifischer Protein-Bindungsstellen über Nacht unter leichtem Schütteln in PBS + 4 % (w/v) Magermilchpulver inkubiert (Plastikschale, 4 °C). Am nächsten Tag wurde die Membran 1x kurz mit TBS gewaschen (dieser und alle folgenden Schritte bei RT), dann leicht gebogen in ein 50-ml-Falcon gesteckt und in 6 ml TBS + 3 % (w/v) Magermilchpulver + 6 µl Anti-FLAG-Antikörper bzw. 12 µl Anti-MYC-Antikörper auf einem Rollenmischer inkubiert (1-1½ h). Danach wurde die Membran 1x mit (10 ml) TBS gewaschen und mit dem sekundären AP-gekoppelten Antikörper (1:10000 in 10 ml TBS + 1 % BSA) weitere 1-1½ h auf dem Rollenmischer inkubiert. Danach wurde der Blot aus dem Falcon genommen und in einer Plastikschale über einen Zeitraum von 20 min mit insgesamt 150 ml TBST gewaschen (mehrfacher Austausch des Waschpuffers). Schließlich wurde die Membran 2x 2 min mit Assaypuffer für Chemilumineszenz gewaschen und in Plastikfolie mit ~ 600 µl CDP-Star 1 h bei RT inkubiert. Chemilumineszierende Proteinbanden wurden mit dem CSC

Chemoluminescence Detection Module bei Steuerung über das Programm CSC Camera Controller 1.11 detektiert.

2.9 Radioligandbindungsstudien

Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien sind ein wertvolles Werkzeug zur molekularen Charakterisierung von Rezeptoren, insbesondere zur Bestimmung der Affinität zwischen Rezeptor und Radioligand bzw. unmarkierten, kreuzreagierenden Liganden. Bei den in dieser Arbeit beschriebenen Experimenten handelte es sich fast ausnahmslos um Kompetitionsexperimente unter Gleichgewichtsbedingungen. Letzteres bedeutet, dass gemäß dem Massenwirkungsgesetz das Erreichen der Gleichgewichtslage vorausgesetzt wird, d.h. die Inkubationszeit wird so festgelegt, dass nach ihrem Ablauf keine signifikante zeitliche Änderung der Konzentration des Rezeptor-Ligand-Komplexes [RL] mehr festgestellt werden kann. Die Reaktionsgleichung für dessen Bildung und Dissoziation aus bzw. zu dem freien Rezeptor R und dem freien Liganden L lautet:



Die zeitliche Änderung von [RL] ist dann gegeben als

$$\frac{d[\text{RL}]}{dt} = k_+ \cdot [\text{L}] \cdot ([\text{R}]_0 - [\text{RL}]) - k_- \cdot [\text{RL}]$$

bzw. mit $k_{app} := k_+ \cdot [\text{L}] + k_-$

$$\frac{d[\text{RL}]}{dt} = k_+ \cdot [\text{L}] \cdot [\text{R}]_0 - k_{app} \cdot [\text{RL}]$$

Gleichung 2-1

Ist die Rezeptorgesamtkonzentration $[\text{R}]_0$ wesentlich kleiner als die Ligandgesamtkonzentration $[\text{L}]_0$, d.h. $[\text{R}]_0 \ll [\text{L}]_0$, so gilt $[\text{L}] \approx [\text{L}]_0$ und die gewöhnliche Differentialgleichung 2-1 lässt sich für $[\text{RL}](t=0) = 0$ lösen als

$$[RL](t) = \frac{k_+ \cdot [L] \cdot [R]_0}{k_{app}} \cdot (1 - e^{-k_{app}t}) = [RL](t = \infty) \cdot (1 - e^{-k_{app}t}) \quad \text{Gleichung 2-2}$$

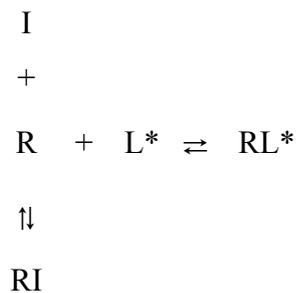
Nach $t_{1/2} = \ln 2 / k_{app}$ ist [RL] halb so groß wie die Konzentration im Gleichgewicht, d.h. für $t \rightarrow \infty$. Bei einer Inkubationszeit, die dem vier- bis fünffachen dieser Halbwertszeit entspricht, werden gemäß Gleichung 2-2 bereits 94 % bzw. 97 % dieser Endkonzentration erreicht, so dass das System in guter Näherung als Gleichgewichtszustand behandelt werden kann.

Diese Inkubationszeiten wurden von C. Löffler-Walz (Abt. Molpharm.) ermittelt und variierten je nach Radioligand ($[^3\text{H}]$ GBC oder $[^3\text{H}]$ P1075), Rezeptor (SUR1 oder SUR2B) und Rezeptormaterial (intakte Zellen oder Membranen).

Kompetition bestand jeweils zwischen einem markierten und einem unmarkierten Liganden um im Idealfall ein und dieselbe Rezeptorbindungsstelle. Im Einzelfall (z.B. Verdrängung von $[^3\text{H}]$ P1075 durch GBC) ist eine strikte Kompetitivität nicht gegeben (vgl. Kap. 1.2.4), jedoch lässt sich unter Gleichgewichtsbedingungen in vielen Fällen die selbe Mathematik zur Berechnung einer apparenten Bindungskonstanten anwenden.

2.9.1 Theoretische Grundlagen der Kompetitionsexperimente

Die Analyse der Bindungsdaten aus den Kompetitionsexperimenten stützte sich auf folgendes Modell:



Der Inhibitor I kompetitiert mit dem Radioliganden L^* um den Rezeptor R. Die beobachtbare Größe ist $[RL^*]$. Diese Konzentration nimmt mit steigender Inhibitorkonzentration $[I]$ ab.

Gemäß Massenwirkungsgesetz gilt im Gleichgewicht für die Dissoziationskonstanten:

$$K_D = \frac{[R] \cdot [L^*]}{[RL^*]} \quad \text{und} \quad K_I = \frac{[R] \cdot [I]}{[RI]}$$

Für die Rezeptorgesamtkonzentration $[R]_0$ gilt:

$$[R]_0 = [R] + [RL^*] + [RI]$$

Wenn ferner für die Radioligand- und Inhibitorgesamtconzentrationen $[L^*]_0$ und $[I]_0$ die Bedingung erfüllt ist, dass $[R]_0 \ll [L^*]_0, [I]_0$, so gilt $[L^*] \approx [L^*]_0$ und $[I] \approx [I]_0$.

Unter diesen Voraussetzungen kann man schreiben:

$$[RL^*] = [R]_0 \cdot \frac{[L^*]_0 / K_D}{1 + [L^*]_0 / K_D} \cdot \frac{K_I \cdot (1 + [L^*]_0 / K_D)}{K_I \cdot (1 + [L^*]_0 / K_D) + [I]_0} \quad \text{Gleichung 2-3}$$

Der Term $[R]_0 \cdot \frac{[L^*]_0 / K_D}{1 + [L^*]_0 / K_D}$ in Gleichung 2-3 gibt die Konzentration $[RL^*](0)$ des gebundenen Radioliganden in Abwesenheit des Inhibitors (d.h. $[I]_0 = 0$) an. Im Vergleich dazu ist $[RL^*]$ bei $[I]_0 = K_I \cdot (1 + [L^*]_0 / K_D)$ nur noch halb so groß (50 %), weshalb diese Inhibitorkonzentration als IC_{50} bezeichnet wird:

$$IC_{50} = K_I \cdot \left(1 + \frac{[L^*]_0}{K_D} \right) \quad \text{Gleichung 2-4}$$

Gleichung 2-4 wird als Cheng-Prusoff-Gleichung bezeichnet (Cheng und Prusoff, 1973). Im Fall der homologen Konkurrenz, d.h. der Verdrängung des Radioliganden durch sein unmarkiertes Analogon, ist $K_D = K_I$ und Gleichung 2-4 vereinfacht sich zu:

$$IC_{50} = K_D + [L^*]_0 \quad \text{Gleichung 2-5}$$

Gleichung 2-3 lässt sich schreiben als:

$$[RL^*] = [RL^*](0) \cdot \frac{IC_{50}}{IC_{50} + [I]_0}$$

Äquivalent ist die Darstellung:

$$[RL^*] = [RL^*](0) \cdot \frac{1}{1 + 10^{(pIC_{50} - p[I]_0)}} \quad \text{Gleichung 2-6}$$

mit $pIC_{50} = -\lg IC_{50}$ und $p[I]_0 = -\lg [I]_0$

Gelegentlich nimmt $[RL^*]$ mit steigendem $[I]_0$ schneller oder langsamer ab, als es Gleichung 2-6 beschreibt. In diesem Fall erfolgt eine Verallgemeinerung der Gleichung durch Einführung des sogenannten Hill-Koeffizienten n_H (Hill, 1910) in Form von:

$$[RL^*] = [RL^*](0) \cdot \frac{1}{1 + 10^{n_H \cdot (pIC_{50} - p[I]_0)}} \quad \text{Gleichung 2-7}$$

Für $n_H = 1$ entspricht Gleichung 2-7 Gleichung 2-6. $n_H > 1$ ist ein Hinweis auf positive Kooperativität, d.h. mehrere Ligandmoleküle binden mit steigender Affinität. Umgekehrt kann $n_H < 1$ negative Kooperativität bedeuten, d.h. die Bindung eines ersten Ligandmoleküls erschwert die Bindung weiterer Ligandmoleküle. Häufiger ist die Ursache für $n_H < 1$ jedoch im Vorliegen von verschiedenen Klassen an Bindungsstellen in der Präparation zu suchen. Wenn diese sich in ihrer Affinität für den Liganden um weniger als einen Faktor von ca. 30-100 unterscheiden, können die einzelnen Komponenten nicht mehr deutlich getrennt werden, so dass sich eine homogen flach abfallende Kurve ergibt.

Aus der Radioligandbindung in Abwesenheit eines Inhibitors ist es möglich, bei bekanntem K_D und $[L^*]_0$ die Rezeptorgesamtkonzentration $[R]_0$ zu berechnen. Es gilt dann $[R]_0 = [R] + [RL^*](0)$ und mit $K_D = [R] \cdot [L^*] / [RL^*]$ erhält man für $[L^*] \approx [L^*]_0$:

$$[R]_0 = [RL^*](0) \cdot \left(1 + \frac{K_D}{[L^*]_0} \right)$$

Setzt man $[R]_0$ ins Verhältnis zur Gesamtproteinkonzentration im jeweiligen Experiment, lässt sich so der Gehalt des Rezeptors (Expression) in verschiedenen Präparationen vergleichen. Bei Verwendung der selben Präparation für mehrere Experimente sollte die Berechnung dieses Verhältnisses (bezeichnet als „ B_{\max} “ für „maximale spezifische Bindung des Radioliganden“) in den verschiedenen Einzelexperimente theoretisch den selben Wert ergeben. Dies stellt eine Kontrollmöglichkeit hinsichtlich Korrektheit der Datenauswertung, insbesondere der Bestimmung von K_D dar:

$$B_{\max} = B_s(0) \cdot \left(1 + \frac{K_D}{[L^*]_0} \right) \quad \text{Gleichung 2-8}$$

In der Praxis bindet der Radioligand auch an endogene Bindungsstellen bzw. haftet an Oberflächen. Diese „nicht-spezifische“ Bindung (NSB) geht zusätzlich zur spezifischen Bindung B_s (entspricht $[RL^*]$ bzw. ist hierzu proportional) in die gemessene Gesamtbindung B_{tot} ein. Man schreibt dann:

$$B_{\text{tot}} = B_s(0) \cdot \frac{1}{1 + 10^{n_H \cdot (pIC_{50} - p[I]_0)}} + NSB \quad \text{Gleichung 2-9}$$

Für die nicht-spezifische Bindung (NSB) selbst lässt sich in gewisser Analogie zur spezifischen Bindung (vgl. Gleichung 2-8) formulieren:

$$B_{\max,NS} = NSB \cdot \left(1 + \frac{K_{D,NS}}{[L^*]_0} \right) \quad \text{Gleichung 2-10}$$

bzw.

$$NSB = B_{\max,NS} \cdot \frac{[L^*]_0}{[L^*]_0 + K_{D,NS}} \quad \text{Gleichung 2-11}$$

Meist erfolgt die nicht-spezifische Bindung mit geringer Affinität, d.h. $[L^*]_0 \ll K_{D,NS}$, so dass sich Gleichung 2-11 vereinfacht zu:

$$NSB = \frac{B_{\max,NS}}{K_{D,NS}} \cdot [L^*]_0 = b \cdot [L^*]_0 \quad \text{Gleichung 2-12}$$

In diesem Fall nimmt die nicht-spezifische Bindung bei gleichbleibender Proteinkonzentration linear mit der Konzentration des Radioliganden zu.

Je nach Affinität von Radioligand und Kompetitor kann Letzterer Ersteren ab einer gewissen Konzentration auch von nicht-spezifischen Bindungsstellen verdrängen. Zuweilen ist die Affinität zu manchen endogenen Proteinen groß genug, dass diese Verdrängung bereits bei Konzentrationen einsetzt, bei denen der spezifisch gebundene Radioligand noch nicht vollständig verdrängt worden ist. Trifft dies zu, so ist NSB in Gleichung 2-9 nicht konstant, sondern selbst eine Funktion von $[I]_0$. Die sorgfältige Unterscheidung zwischen spezifischer und nicht-spezifischer Bindung und Verdrängung des Radioliganden ist dann ein besonders kritischer Aspekt in der Analyse der experimentellen Daten.

2.9.2 Theoretische Grundlagen der Sättigungsexperimente

Die hohe Affinität von SUR1 für GBC führte dazu, dass die in Konkurrenzexperimenten an diesem Rezeptor eingesetzte Konzentration an $[^3\text{H}]$ GBC oftmals sogar größer als die K_D war. Für eine genaue Bestimmung der K_D , wie sie in Kap. 4 bei der Untersuchung des Einflusses von BeF_x auf die GBC-Bindung an Kir6.2/SUR1(Q1178R) angestrebt wurde, ist dies problematisch, da sich in diesem Fall potentielle Ungenauigkeiten bei der Ermittlung der Radioligandkonzentration massiv auf die gemäß Gleichung 2-5 als Differenz von IC_{50} und $[L^*]_0$ berechnete K_D auswirken. Daher wurde in diesem Fall die K_D nicht durch Verdrängung

von [^3H]GBC mit unmarkiertem GBC ermittelt, sondern durch Verfolgen der mit steigender [^3H]GBC-Konzentration zunehmenden Absättigung der Rezeptorbindungsstellen.

Mit Hilfe der Dissoziationskonstanten $K_D = \frac{[R] \cdot [L^*]}{[RL^*]}$ des Gleichgewichts $R + L^* \rightleftharpoons RL^*$ und

$[R]_0 = [R] + [RL^*]$ lässt sich hier für die der spezifischen Bindung B_s entsprechende Konzentration des Rezeptor-Radioligand-Komplexes $[RL^*]$ formulieren:

$$[RL^*] = [R]_0 \cdot \frac{[L^*]}{K_D + [L^*]} = \frac{[R]_0}{1 + 10^{(p[L^*] - pK_D)}}$$

bzw.

$$B_s = \frac{B_{\max}}{1 + 10^{(p[L^*] - pK_D)}} \quad \text{Gleichung 2-13}$$

mit $p[L^*] = -\lg [L^*]$ und $pK_D = -\lg K_D$

Die nicht-spezifische Bindung (NSB), die in der Addition mit B_s die Gesamtbindung (B_{tot}) ausmacht, ist wie bereits gezeigt (vgl. Gleichung 2-12) meist eine lineare Funktion der Radioligandkonzentration, so dass mit Gleichung 2-13 folgt:

$$B_{\text{tot}} = B_s + \text{NSB} = \frac{B_{\max}}{1 + 10^{(p[L^*] - pK_D)}} + b \cdot [L^*]$$

mit $b = B_{\max, \text{NS}} / K_{D, \text{NS}}$ (vgl. Gleichung 2-12)

Zu beachten ist, dass $[L^*]$ hier nicht grundsätzlich durch $[L^*]_0$ ersetzt werden kann, da für kleine $[L^*]_0$ unter Umständen ein beträchtlicher Anteil des Radioliganden in rezeptorgebundener Form vorliegen kann. Daher wurde für jeden einzelnen Ansatz die Konzentration an freiem, d.h. nicht-gebundenem [^3H]GBC ($[L^*]$) ermittelt (vgl. Kap. 2.9.5.3).

2.9.3 Inkubations- und Waschpuffer für Radioligandbindungsexperimente

2.9.3.1 Inkubationspuffer für Bindungsexperimente an intakten Zellen

In den Radioligandbindungsexperimenten an intakten HEK293 wurde folgender Inkubationspuffer verwendet:

HEPES:	10 mM
NaCl:	129 mM
KCl:	5 mM
MgCl ₂ :	1.2 mM
NaHCO ₃ :	5 mM
D(+)-Glucose:	11 mM
CaCl ₂ :	1.25 mM

Der Puffer wurde zunächst ohne Glucose und Ca²⁺ angesetzt und bei 6 °C gelagert. Zum Experiment wurde ein entsprechendes Volumen (meist 100 ml) bei 37 °C im Wasserbad mit Sauerstoff begast, der pH (7.4) eingestellt bzw. kontrolliert, Glucose und CaCl₂ zugefügt und der Puffer weiter begast (vgl. Kap. 2.9.4).

2.9.3.2 Inkubationspuffer für Bindungsexperimente an Membranen

Der Inkubationspuffer für Bindungsexperimente an Membranen hatte meist die selbe Zusammensetzung wie der isotone Membranpräparationspuffer (vgl. Kap. 2.7.6), der pH (7.4) wurde jedoch am auf 37 °C erwärmten Puffer eingestellt (entsprechend der Inkubationstemperatur in den Bindungsstudien).

In den Bindungsexperimenten an Kir6.2/SUR1(Q1178R) kamen BeF_x und V_i zum Einsatz (vgl. Kap. 4). Dies machte folgende Modifikationen des Inkubationspuffers notwendig:

Fluorid-Inkubationspuffer	HEPES:	5 mM
	NaCl:	129 mM
	KCl:	5 mM
	NaF:	10 mM
1.11x Hoch-HEPES-Inkubationspuffer	HEPES:	22.2 mM
	NaCl:	154.4 mM
	KCl:	5.6 mM

Beide Inkubationspuffer wurden analog zum „normalen“ Inkubationspuffer bei 37 °C auf pH 7.4 eingestellt.

2.9.3.3 Waschpuffer

Waschpuffer	Tris:	50 mM
(für Filtration der Radioligandbindungsansätze)	NaCl:	154 mM
	pH (6 °C):	7.4

Der Puffer wurde durch Verdünnung einer zehnfach konzentrierten Stammlösung mit H₂O hergestellt, der pH nach Abkühlung auf 6 °C eingestellt (mit HCl).

2.9.4 Bindungsexperimente an intakten HEK293-Zellen

Die Bindungsexperimente an intakten Zellen waren ausnahmslos vom Typ „Kompetition“ (vgl. Kap. 2.9.1) und erfolgten im Fall von transient transfizierten HEK293 zwei Tage nach Transfektion.

Die Ansätze wurden in 2-ml-Reaktionsgefäßen nach folgendem Schema zusammengefügt (Gesamtvolumen: 1 ml):

- 25 µl Radioligand aus Vorverdünnung (s.u.)
- 8 µl unmarkierter Ligand (Vorverdünnung) bzw. Lösungsmittelausgleich (s.u.)
- 467 µl Inkubationspuffer (vgl. Kap. 2.9.3.1)
- 500 µl Zellsuspension (s.u.)

Die ethanolische Stammlösung des Radioliganden wurde mit Inkubationspuffer für Membranen so vorverdünnt, dass die 1:40-Verdünnung bei Herstellung des Bindungsansatzes (siehe obiges Schema) in der gewünschten Endkonzentration resultierte. Für die unmarkierten Liganden wurden in 1:1 (v/v) Ethanol/DMSO geeignete Verdünnungsreihen hergestellt, die bei –20 °C gelagert und mehrfach verwendet wurden. Aus diesen Verdünnungsreihen wurden am Versuchstag mit Inkubationspuffer für Membranen 1:1-Verdünnungen hergestellt, aus denen je 8 µl in den entsprechenden Bindungsansatz pipettiert wurden (s.o.). In frühen Experimenten wurde eine stärkere Vorverdünnung (Verdünnungsfaktor 10) gewählt, aus der je 10 µl eingesetzt wurden, jedoch ist nach obigem Schema durch den höheren Anteil an organischem Lösungsmittel in den Vorverdünnungen die Gefahr geringer, Liganden mit teils hydrophoben Eigenschaften durch unspezifische Wechselwirkung mit der Polypropylenoberfläche der Reaktionsgefäße zu verlieren (mit entsprechenden Konsequenzen für die jeweilige Endkonzentration). Beim Lösungsmittelausgleich handelte es sich um im

analogen Verhältnis mit Inkubationspuffer für Membranen gemischtes Ethanol/DMSO. Die Endkonzentration an Ethanol/DMSO im Reaktionsansatz war nie größer als 1 % (v/v). Der Inkubationspuffer für Bindung an intakten Zellen wurde wie in Kap. 2.9.3.1 beschrieben bei 37 °C mit Sauerstoff begast, mit Glucose und CaCl₂ versetzt und nach pH-Kontrolle weiter begast. Die Zellen wurden von den typischerweise 1-3 Kulturschalen (eine 94-mm-Schale entsprach bei einer Konfluenz um die 90 % einer Zahl von ca. 18 Millionen Zellen) mit O₂-begastem Inkubationspuffer abgelöst, in 50-ml-Falcons in insgesamt 20 ml Inkubationspuffer für 4 min bei 500 g zentrifugiert, mit 20 ml Inkubationspuffer resuspendiert, erneut pelletiert und schließlich mit je nach Experiment ca. 8 ml Inkubationspuffer in ein 14-ml-Falcon überführt. Die Zellsuspension wurde vor der erstmaligen Entnahme von 500 µl für den ersten Reaktionsansatz 10 min im Wasserbad bei 37 °C vorinkubiert und in der Folge nur für die Entnahme von jeweils 500 µl Zellen aus dem Wasserbad geholt. Für eine spätere Proteinbestimmung wurden 70 µl Zellsuspension bzw. 70 µl begaster Inkubationspuffer mit 0.1 M NaOH verdünnt (vgl. Kap. 2.9.7). Je nach Rezeptor und Affinität des Radioliganden variierte die Proteinkonzentration in den Reaktionsansätzen stark und lag zwischen 0.03 und 0.8 µg/µl, wobei 1 mg Protein ca. 5 Millionen Zellen entsprach.

Radioligand und unmarkierter Ligand (s.o.) wurden zu Beginn des Experiments für alle Ansätze vorgelegt. Im Abstand von 2 oder 3 min (variierte zwischen verschiedenen Experimenten) wurden die Reaktionsansätze durch Zufügen von 467 µl Inkubationspuffer und 500 µl Zellsuspension (gefolgt von vorsichtigem Vortexen) gestartet. Nach 30-minütiger Inkubation im Wasserbad (37 °C) wurde ungebundener Radioligand durch Filtration abgetrennt. Hierzu wurden 3x 300 µl entnommen, in je 10 ml eisgekühlten Waschpuffer pipettiert und sofort mit Hilfe von durch eine Membranpumpe erzeugtem Unterdruck über Whatman GF/C Filter filtriert. Die Filter wurden durch Filtration von je 2x 10 ml eisgekühltem Waschpuffer gewaschen.

Die Filter wurden in Szintillationsfläschchen mit je 4.5 ml Szintillationsflüssigkeit (Ultima Gold) versetzt und die gebundene Radioaktivität (B_{tot}) im Szintillationszähler quantifiziert. Für jeden Reaktionsansatz wurde aus den drei Messwerten das arithmetische Mittel berechnet. Die spezifische Bindung (B_s) des Radioliganden ist wie in Kap. 2.9.1 und 2.9.2 erläutert die Differenz aus Gesamtbindung (B_{tot}) und nicht-spezifischer Bindung (NSB). Letztere wiederum wurde durch den Einsatz von 100 nM GBC (SUR1) bzw. 100 µM P1075 (SUR2) bestimmt, als der durch diese Konzentrationen an unmarkiertem Liganden nicht verdrängbare Anteil der Radioligandbindung (vgl. Kap. 3.2.1). Die Gesamtkonzentration an [³H]GBC in den Reaktionsansätzen wurde ermittelt, indem aus drei Ansätzen direkt im Anschluss an die

Filtration je 10 µl des Restvolumens in Szintillationsfläschchen pipettiert und mit 4.5 ml Szintillationsflüssigkeit vermessen wurden. Im Fall des weniger hydrophoben [³H]P1075 wurden am Ende des Experiments die Restvolumina sämtlicher Reaktionsansätze vereinigt und 2-3x 30 µl entnommen und mit Szintillationsflüssigkeit vermessen.

2.9.5 Bindungsexperimente an Membranen

2.9.5.1 Standardbedingungen für Konkurrenzexperimente

Für Konkurrenzexperimente wurden die Ansätze in 2-ml-Reaktionsgefäßen nach folgendem Schema zusammengefügt:

- 792 µl Radioligand aus Vorverdünnung in Inkubationspuffer (vgl. Kap. 2.9.3.2)
- 8 µl unmarkierter Ligand (Vorverdünnung) bzw. Lösungsmittelausgleich (vgl. Kap. 2.9.4)
- 200 µl Membranhomogenisat (s.u.)

Da hier im Gegensatz zu den Bindungsstudien an intakten Zellen (vgl. Kap. 2.9.4) keine Begasung des Inkubationspuffers nötig war, konnte dieser bereits zu Beginn des Experiments in Form der Radioligand-Vorverdünnung für alle Ansätze vorgelegt werden. Für Experimente in Anwesenheit von 1 mM MgATP, enthielt diese Lösung zusätzlich MgCl₂ und ATP, so dass die Endkonzentrationen im Reaktionsansatz 2 mM MgCl₂ und 1 mM ATP betrug. In diesem Fall wurden die Ansätze bis zur Zugabe des Membranhomogenisats auf Eis gekühlt. Die Membranen (zur Herstellung vgl. Kap. 2.7.6) wurden mit eisgekühltem Inkubationspuffer für Membranen auf ein Gesamtvolumen von ca. 3-4 ml (variierte zwischen einzelnen Experimenten) gebracht, am Polytron-Homogenisator homogenisiert und auf Eis gestellt. Für die spätere Proteinbestimmung wurden 70 µl dieser Suspension bzw. 70 µl Inkubationspuffer mit 0.1 M NaOH verdünnt (vgl. Kap. 2.9.7). Je nach Rezeptor und Affinität des Radioliganden variierte die Proteinkonzentration in den Reaktionsansätzen stark und lag zwischen 0.05 und 0.5 µg/µl.

Analog zu den Messungen an intakten Zellen, wurde die Reaktion jeweils durch Zusatz der Proteinkomponente gestartet, woraufhin die Ansätze im Wasserbad bei 37 °C inkubiert wurden. Die Inkubationszeit betrug für [³H]GBC unabhängig vom SUR-Subtyp 15 min, für [³H]P1075 30 min (SUR2B). Für die Filtration wurden Whatman GF/B Filter verwendet. Vor Zugabe der Szintillationsflüssigkeit wurden diese im Vergleich zu GF/C dickeren Filter mit je 200 µl H₂O befeuchtet, um ein effizienteres Herauslösen der gebundenen Radioaktivität durch

die Szintillationsflüssigkeit zu bewirken. Der sonstige Verlauf der Experimente war analog zur Bindung an intakten Zellen (vgl. Kap. 2.9.4).

2.9.5.2 Konkurrenzexperimente an Kir6.2/SUR1(Q1178R) in Gegenwart von BeF_x und V_i

In den Konkurrenzexperimenten an Membranen von Kir6.2/SUR1(Q1178R) exprimierenden HEK293-Zellen mussten die Versuchsbedingungen wegen des Einsatzes von BeF_x und V_i gegenüber den in obigem Kapitel beschriebenen Bedingungen etwas abgeändert werden. So war der Zusatz von NaF (10 mM) erforderlich, um BeF_x zu erzeugen (s.u.). Um einem Ausfällen von MgF_2 (Löslichkeitsprodukt $\sim 10^{-8}$) vorzubeugen, wurde die Mg^{2+} -Konzentration dabei im Vergleich zu den Standardbedingungen (vgl. Kap. 2.9.5.1) auf 1 mM gesenkt. ATP wurde nur bis zu einer Konzentration von 0.3 M eingesetzt, um sicherzustellen, dass es trotz niedrigerer Mg^{2+} -Konzentration (nahezu) vollständig in Form von MgATP vorlag. In den Experimenten mit V_i war es hingegen zur Stabilisierung des pH-Werts nötig, die HEPES-Konzentration des Inkubationspuffers auf 20 mM zu erhöhen (s.u.). Die Inkubationsdauer betrug in beiden Fällen 30 min.

In den Konkurrenzexperimenten zur Untersuchung der Effekte von BeF_x wurden die Ansätze (in 2-ml-Reaktionsgefäßen) nach folgendem Schema zusammengefügt:

- 763 μl [^3H]GBC aus Vorverdünnung in Fluorid-Inkubationspuffer
- 6.7 μl 15 μM GBC zur Ermittlung der unspez. Bindung bzw. Lösungsmittelausgleich
- 10 μl 0.1 M MgCl_2 (\rightarrow Endkonzentration 1 mM) bzw. Inkubationspuffer
- 10 μl ATP-Lösung bzw. Fluorid-Inkubationspuffer
- 10 μl 0.1 M BeSO_4 (\rightarrow Endkonzentration 1 mM) bzw. H_2O
- 200 μl Membranhomogenisat

Die 15 μM GBC-Lösung wurde durch Verdünnung einer 30 μM Stammlösung (1:1 (v/v) Ethanol/DMSO) mit Fluorid-Inkubationspuffer hergestellt, der Lösungsmittelausgleich analog aus Ethanol/DMSO und Fluorid-Inkubationspuffer. Bei der ATP-Lösung handelte es sich um entsprechende Verdünnungen einer 100 mM Stammlösung mit Fluorid-Inkubationspuffer. BeSO_4 wurde jeweils kurz vor den in Fluorid-Inkubationspuffer homogenisierten Membranen zugefügt. Unter diesen Bedingungen bildet Be^{2+} die Fluoridkomplexe BeF_3^- und BeF_4^{2-} (Goldstein, 1964), die hier als „ BeF_x “ zusammengefasst werden.

Das Pipettierschema für die Experimente mit V_i lautete:

- 673 μl [^3H]GBC aus Vorverdünnung in 1.11x Hoch-HEPES-Inkubationspuffer
- 6.7 μl 15 μM GBC (\rightarrow Endkonzentration 0.1 μM) zur Ermittlung der unspez. Bindung bzw. Lösungsmittelausgleich
- 10 μl 0.2 M MgCl_2 (\rightarrow Endkonzentration 2 mM) bzw. 1.11x Hoch-HEPES-Inkubationspuffer
- 10 μl ATP-Lösung bzw. 1.11x Hoch-HEPES-Inkubationspuffer
- 100 μl 10 mM V_i (\rightarrow Endkonzentration 1 mM) bzw. H_2O
- 200 μl Membranhomogenisat

Die 10 mM V_i -Lösung wurde an jedem Versuchstag frisch durch Lösen von Natrium-orthovanadat in ca. 20 ml H_2O in einem 50-ml-Falcon hergestellt und 15 min im kochenden Wasserbad erhitzt, um etwaige Vanadat-Oligomere zu eliminieren. Nach Abkühlen der Lösung bei RT wurde den Ansätzen entsprechend dem obigen Pipettierschema 100 μl 10 mM V_i (\rightarrow Endkonzentration 1 mM) bzw. H_2O zugesetzt, jeweils unmittelbar vor Start der 30-minütigen Inkubation durch Zugabe der Membranen. Die Herstellung der übrigen Lösungen inkl. Homogenisierung der Membranen erfolgte analog zu den Experimenten mit BeF_x , jedoch unter Verwendung von 1.11x Hoch-HEPES- anstelle von Fluorid-Inkubationspuffer. Der höhere HEPES-Gehalt dieses Puffers (Endkonzentration 20 mM) gewährleistete auch nach Zusatz der stark basischen V_i -Lösung den gewünschten pH-Wert von 7.4.

2.9.5.3 Sättigungsexperimente an Kir6.2/SUR1(Q1178R)

In diesen Experimenten wurde in Gegenwart von 300 μM MgATP der Einfluss von BeF_x (1 mM) auf die Sättigung der [^3H]GBC-Bindungsstellen von Kir6.2/SUR1(Q1178R) durch steigende Konzentrationen des Radioliganden untersucht.

Die Ansätze setzten sich wie folgt zusammen:

- 25 μl [^3H]GBC-Vorverdünnung
- 6.7 μl 15 μM GBC zur Ermittlung der unspez. Bindung bzw. Lösungsmittelausgleich
- 758 μl Fluorid-Inkubationspuffer + 395 μM ATP + 1.32 mM Mg^{2+}
- 10 μl 0.1 M BeSO_4 bzw. H_2O
- 200 μl Membranhomogenisat

Die ethanolische [^3H]GBC-Stammlösung wurde zunächst mit Fluorid-Inkubationspuffer so verdünnt, dass bei obigem Pipettierschema die im jeweiligen Experiment höchste angestrebte

Konzentration an [^3H]GBC resultierte. Für niedrigere Konzentrationen wurde diese Vorverdünnung entsprechend weiter verdünnt. Der hierfür verwendete Fluorid-Inkubationspuffer hatte eine zur ersten Vorverdünnung äquivalenten Ethanolgehalt, so dass schließlich sämtliche Ansätze gleichviel organisches Lösungsmittel enthielten ($< 1\%$). Nach Ablauf der 30-minütigen Inkubationszeit ($37\text{ }^\circ\text{C}$) und Filtration von $3 \times 300\ \mu\text{l}$ (vgl. Kap. 2.9.4) wurden anders als in den Konkurrenzexperimenten bei jedem Reaktionsansatz zwei Aliquots (je nach erwartetem [^3H]GBC-Gehalt $15\text{-}44\ \mu\text{l}$) für die Bestimmung der [^3H]GBC-Gesamtkonzentration entnommen. Die für die Auswertung der Experimente benötigten Konzentrationen an freiem Radioliganden konnten somit jeweils als Differenz aus der Gesamtkonzentration an [^3H]GBC und der Konzentration des gebundenen [^3H]GBC (per Filtration ermittelt) berechnet werden. Die lineare Zunahme der unspezifischen [^3H]GBC-Bindung wurde durch Regressionsanalyse der mit $100\ \text{nM}$ nicht-markiertem GBC versetzten Ansätze nach Gleichung 2-12 ermittelt und von der Gesamtbindung (B_{tot}) der übrigen Ansätze subtrahiert. Die resultierende spezifische Bindung (B_s) wurde schließlich einer Regressionsanalyse gemäß Gleichung 2-13 zur Bestimmung von B_{max} und K_D unterzogen.

2.9.6 Korrektur bei Abnahme der spezifischen Radioligandbindung während eines Experiments

Die einzelnen Reaktionsansätze eines Radioligandbindungsversuchs wurden zeitlich versetzt durch Zugabe des Proteins (intakte Zellen oder Membranpräparation) gestartet und nach Ende der Inkubationszeit im selben zeitlichen Abstand filtriert (vgl. Kap. 2.9.4). In mehreren Experimenten wurde dabei beobachtet, dass Ansätze, die zu einem späteren Zeitpunkt des Versuchs gestartet wurden, am Ende oftmals eine bis zu ca. 30% geringere spezifische Bindung aufwiesen als Ansätze mit identischer Zusammensetzung, die in der Anfangsphase des Experiments gestartet wurden.

Dieser „Zeittrend“ wurde wie folgt korrigiert: Für sämtliche Ansätze wurde die mittels $100\ \mu\text{M}$ P1075 bzw. $100\ \text{nM}$ GBC (vgl. Kap. 2.9.4) bestimmte und über den zeitlichen Verlauf eines Experiments meist konstantbleibende nicht-spezifische Bindung (NSB) subtrahiert. Aus der spezifischen Bindung $B_s(0)$ in je einem frühen, mittleren und späten Reaktionsansatz ohne Zusatz von unmarkiertem Liganden wurden ein oder zwei Geraden berechnet, die eine lineare Abnahme der spezifischen Bindung mit der Zeit beschrieben. Hieraus wurde jeweils für die Zeitpunkte, zu denen die verschiedenen Ansätze durch Zugabe der Zellen gestartet worden waren, ein theoretischer Wert $B_s(0)(t)$ berechnet. Die jeweiligen Kehrwerte multipliziert mit

dem $B_s(0)$ -Wert zum Zeitpunkt des ersten Reaktionsansatzes ohne unmarkierten Liganden ergaben dann die Korrekturfaktoren, mit denen die spezifische Bindung der einzelnen Reaktionsansätze multipliziert wurde, bevor die eingangs abgezogene nicht-spezifische Bindung wieder addiert wurde. Die beschriebene Korrektur wurde nur für die Ansätze durchgeführt, in denen die Bindung (B_{tot}) über dem für das jeweilige Experiment ermittelten NSB-Wert lag, die übrigen Ansätze wurden für die Erstellung der Regressionskurve zur Ermittlung der IC_{50} wegen der bei hohen Konzentrationen an unmarkiertem Liganden auftretenden Verdrängung von unspezifisch gebundenem [3H]GBC nicht berücksichtigt (vgl. Kap. 3.2.1).

2.9.7 Proteinbestimmung nach Lowry

Die Methode von Lowry et al., 1951 beruht auf zwei Reaktionen. Im ersten Schritt bildet sich in alkalischer Lösung ein Komplex zwischen den Peptidbindungen und den Kupfer(II)-Ionen aus (Biuretreaktion). Dieser Komplex reduziert im zweiten Schritt das gelbe Folin-Ciocalteu-Reagens zu einem blauen Farbstoff (Molybdänblau), der photometrisch quantifiziert wird.

Eine Bestimmung der Proteinkonzentration war im Rahmen der Radioligandbindungsstudien zur Berechnung von B_{max} erforderlich (vgl. Kap. 2.9.1). Typischerweise wurden dabei ein Aliquot der Zell- oder Membransuspension (vgl. Kap. 2.9.4 und 2.9.5), sowie ein Aliquot des verwendeten Puffers 1:10 oder 1:20 mit 0.1 M NaOH verdünnt und bis zur Durchführung der Proteinbestimmung bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt.

Die für die Proteinbestimmung verwendeten Lösungen hatten folgende Zusammensetzung:

Lowry A: 2 % (w/v) Na_2CO_3 , 0.1 M NaOH

Lowry B: 1 % (w/v) CuSO_4

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

Lowry D: Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagens (2 N)

Lowry E: Lowry A + C + B (in dieser Reihenfolge zugefügt) im Volumenverhältnis 98:1:1

Lowry F: Lowry D + H_2O im Volumenverhältnis 1:1

Lowry A-D wurden bei RT aufbewahrt (Lowry D lichtgeschützt), Lowry E und F für jede Proteinbestimmung frisch angesetzt.

Für die Messung wurden von jedem Ansatz 3x 200 μl in Halbmikroküvetten vorgelegt und mit je 1 ml Lowry E versetzt. Nach fünfminütiger Inkubation erfolgte die Zugabe von je 100

μl Lowry F, woraufhin der Küvetteninhalt gemischt und 20 min inkubiert wurde (RT). Danach wurde für die Proben in der selben Reihenfolge und selben Zeitabständen die Absorption bei 770 nm (A_{770}) gemessen und die Mittelwerte zusammengehöriger Triplets berechnet. Für den Nullabgleich diente ein Ansatz aus 200 μl 0.1 M NaOH + 1 ml Lowry E + 100 μl Lowry F. Da die in den Radioligandbindungsstudien eingesetzten HEPES-Puffer mit den Lowry-Lösungen auch in Abwesenheit von Protein eine Farbänderung bewirken, wurde von den Messwerten der Proteinlösungen jeweils die A_{770} der proteinfreien Proben subtrahiert. Aus den so erhaltenen Werten wurde über eine Eichung mit BSA (vgl. Abb. 2-3) die Proteinkonzentration berechnet.

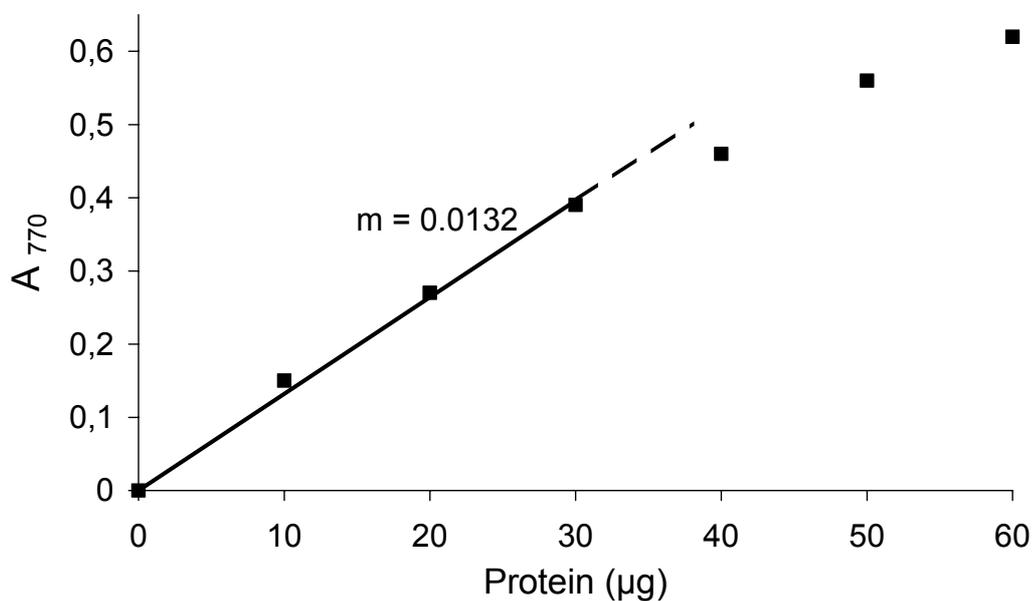


Abb. 2-3: Eichung zur Lowry-Proteinbestimmung. Die BSA-Eichgerade mit Steigung $m = 0.0132$ $A_{770}/\mu\text{g}$ Protein wurde von C. Löffler-Walz erstellt und in späteren Wiederholungen durch P. Kühner und M. Winkler (alle Abt. Molpharm.) bestätigt. Für $A_{770} > 0.5$ wurde die Proteinkonzentration mit Hilfe einer nicht-linearen Eichkurve oder durch Wiederholung der Lowry-Methode mit weniger Protein bestimmt. Die auf der Abszisse aufgetragene Proteinmenge bezieht sich auf den Inhalt der Küvette. Für die Bindungsstudien konnte unter Berücksichtigung der verschiedenen Verdünnungsschritte die Proteinkonzentration in den Reaktionsansätzen berechnet werden.

2.10 Elektrophysiologische Experimente („Patch-Clamp“)

2.10.1 Das Prinzip der Saugelektrodeentechnik (Patch-Clamp-Technik)

Ein weiteres Werkzeug für die Untersuchungen des K_{ATP} -Kanals war die elektrophysiologische Methode der Saugelektrodeentechnik (Patch-Clamp-Technik). Für die Entwicklung dieser Technik (Hamill et al., 1981), die die rauscharme Messung von Ionenströmen bis hin zum Einzelkanalniveau ermöglicht, wurden Erwin Neher und Bert

Sakmann 1991 mit dem Nobelpreis für Physiologie oder Medizin ausgezeichnet. Sie beruht auf der Erzeugung eines hohen Abdichtwiderstands (Gigaohm-Bereich) zwischen der Zellmembran und einer dünn ausgezogenen (Öffnungsdurchmesser: ca. 1 μm), mit einer leitfähigen Lösung gefüllten Glaskapillare, in die ein mit Silberchlorid beschichteter Silberdraht taucht. Dieses „Sealing“ wird durch leichten Unterdruck erreicht, der am hinteren Ende der Pipette angelegt wird (\rightarrow „Saugelektrodenteknik“). Diesen Status bezeichnet man als „cell-attached“. Er ist Ausgangspunkt für verschiedene Messkonfigurationen (vgl. Abb. 2-4), die die Untersuchung unterschiedlicher Fragestellungen ermöglichen. In der vorliegenden Arbeit wurden Messungen in der „whole-cell“ („Ganzzell“)- und der „inside-out“-Konfiguration durchgeführt. Im ersten Fall wird durch einen kurzen Spannungspuls (bei gleichzeitigem leichtem Saugen) das Membranstück („Patch“) unter der Pipettenöffnung zerstört und so Zugang zum Cytoplasma hergestellt. Die inside-out-Konfiguration hingegen wird durch „Herausreißen“ des „Patch“ erreicht. In dieser Konfiguration ist es möglich über einen Zufluss („Pipe“), Substanzen direkt auf die Membraninnenseite zu applizieren.

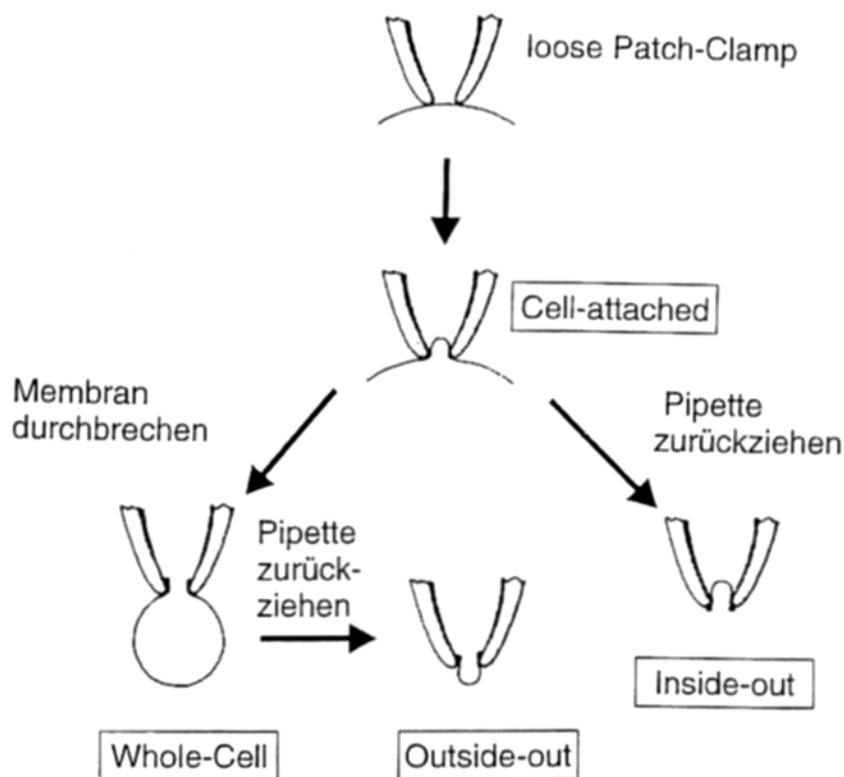


Abb. 2-4: Verschiedene Konfigurationen der Patch-Clamp-Technik. Durch Ausbilden eines hohen Abdichtwiderstands zwischen Zellmembran und aufgesetzter Glaspipette entsteht die cell-attached-Konfiguration. Wird im zweiten Schritt der Patch aus der Zelle herausgelöst, resultiert die inside-out-Konfiguration, die die Applikation gewünschter Substanzen auf die (ursprüngliche) Innenseite der Membran ermöglicht. Wird die Membran hingegen durchbrochen, geht die cell-attached- in die whole-cell-Konfiguration über. Aus dieser kann bei Bedarf durch Zurückziehen der Pipette die outside-out-Konfiguration hergestellt werden, in der der Patch im Vergleich zur inside-out-Konfiguration eine entgegengesetzte Orientierung aufweist. (Abb. verändert nach Hamill et al., 1981)

2.10.2 Physikalische Grundlage des „Voltage-Clamp“-Verfahrens („Spannungsklemme“)

Der elektrische Widerstand R ist gemäß dem Ohmschen Gesetz definiert als Quotient aus Spannung U und Stromstärke I :

$$R = U / I \quad \text{Gleichung 2-14}$$

Die elektrische Leitfähigkeit G entspricht dem Kehrwert des Widerstands ($G = 1 / R$), so dass man anstelle von Gleichung 2-14 schreiben kann:

$$I = U \cdot G \quad \text{Gleichung 2-15}$$

Die hier beschriebenen Messungen wurden nach dem „Voltage-Clamp“-Verfahren („Spannungsklemme“) durchgeführt, d.h. die Spannung wird konstant auf einem vorgegebenen Wert U_{Soll} gehalten („geklemmt“). In den Ganzzell-Messungen war die Konzentration an Kaliumionen im Zellinneren ein vielfaches höher als im Badpuffer (vgl. Kap. 2.10.8.1). Die Folge ist ein Ruhemembranpotential E_m , dessen Differenz zu U_{Soll} die für den K_{ATP} -Strom entscheidende Spannung U in Gleichung 2-15 darstellt:

$$I = (U_{\text{Soll}} - E_m) \cdot G \quad \text{Gleichung 2-16}$$

Hängt E_m im wesentlichen nur von einem Ionentyp ab, ist es nach Nernst gegeben als:

$$E_m = - \frac{R \cdot T}{z_e \cdot F} \cdot \ln \frac{c_{\text{intrazellulär}}}{c_{\text{extrazellulär}}} \quad \text{Gleichung 2-17}$$

Handelt es sich bei besagtem Ionentyp um K^+ mit $z_e = +1$ (Ladung des relevanten Ions als Vielfaches der Elementarladung), so vereinfacht sich Gleichung 2-17 mit $R = 8.3 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$

(allgemeine Gaskonstante) und $F = 96500 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$ (Faraday-Konstante) für eine Temperatur von $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ($= 310 \text{ K}$) zu:

$$E_m = -61.4 \text{ mV} \cdot \lg \frac{[K^+]_{\text{intrazellulär}}}{[K^+]_{\text{extrazellulär}}} \quad \text{Gleichung 2-18}$$

Das Vorzeichen des Stroms I folgt der Konvention, den Strom generell aus Sicht der Zelle zu betrachten. Ein Einwärtsstrom positiver (Kalium-)Ionen wird definitionsgemäß mit negativem Vorzeichen dargestellt.

2.10.3 Allgemeiner Aufbau der Patch-Clamp-Apparatur

Die Messungen erfolgten innerhalb eines Faradayschen Käfigs auf einem pneumatisch betriebenen schwingungsgedämpften Tisch (vgl. Abb. 2-5).

Das inverse Mikroskop verfügte über ein Okular mit 10-facher und u.a. ein Objektiv mit 40-facher Vergrößerung. Zur Identifizierung transient transfizierter HEK293 wurde das von diesen exprimierte GFP-Protein (vgl. Kap. 2.10.7) bei 450-490 nm angeregt, so dass die entsprechenden Zellen unter dem Mikroskop grün fluoreszierten.

Ein Deckgläschen mit adhären HEK293 (vgl. Kap. 2.10.7) wurde zwischen einer Petrischale ($\varnothing 35 \text{ mm}$) und einem Plexiglaseinsatz eingeklemmt. Schalenboden und Einsatz wiesen in der Mitte eine kreisförmige Ausfräsung ($\varnothing \text{ ca. } 1 \text{ cm}$) auf. Die Messkammer wurde gegen Flüssigkeitsaustritt abgedichtet, indem in einem Kreis um die Bodenöffnung vor Einsetzen des Deckgläschens und des Plexiglaseinsatzes etwas Laborfett aufgetragen wurde. Die fertig präparierte Messkammer wurde auf dem Objektisch des Mikroskops positioniert. Je nach Positionierung der Absaugung (vgl. Abb. 2-5) betrug das Volumen des Perfusionsbads ca. 1 ml.

Die Experimente wurden mit Hilfe der Verstärkersysteme EPC-9 bzw. EPC-10 unter Steuerung durch die auf einem konventionellen PC installierte Pulse-Software durchgeführt. Die Signale des Hauptverstärkers wurden mit einem integrierten 4-pol-Bessel-Tiefpassfilter mit 200 Hz gefiltert und die über einen Analog-Digital-Wandler digitalisierten Signale mit einer Samplingrate von 1 kHz aufgenommen.

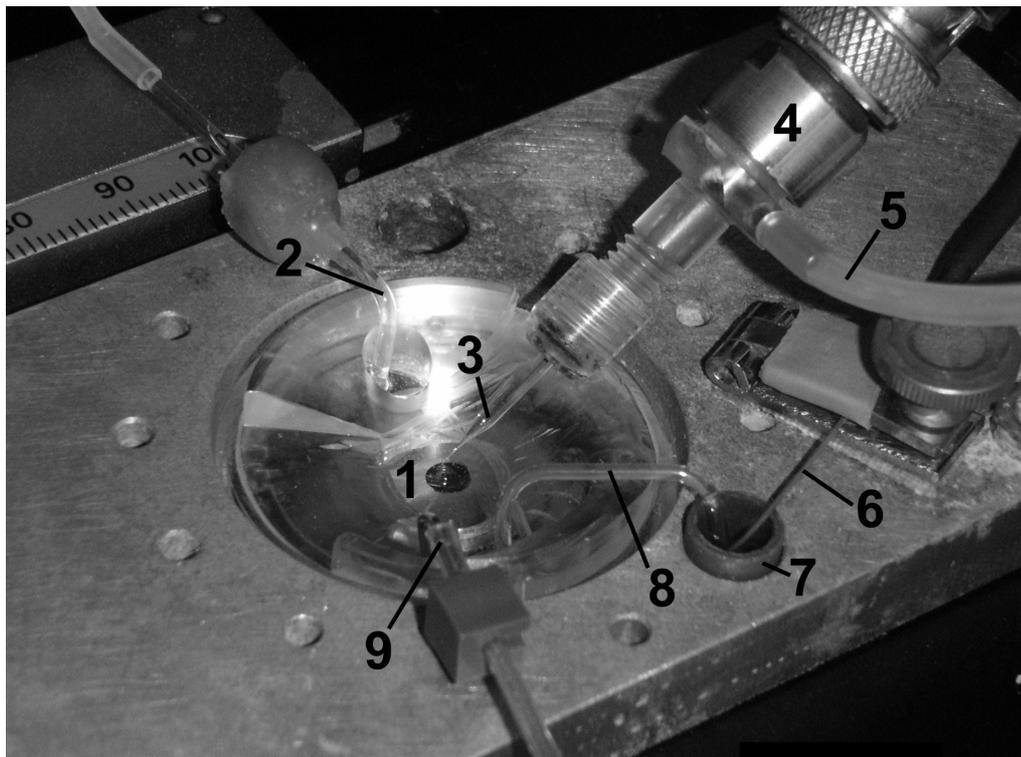
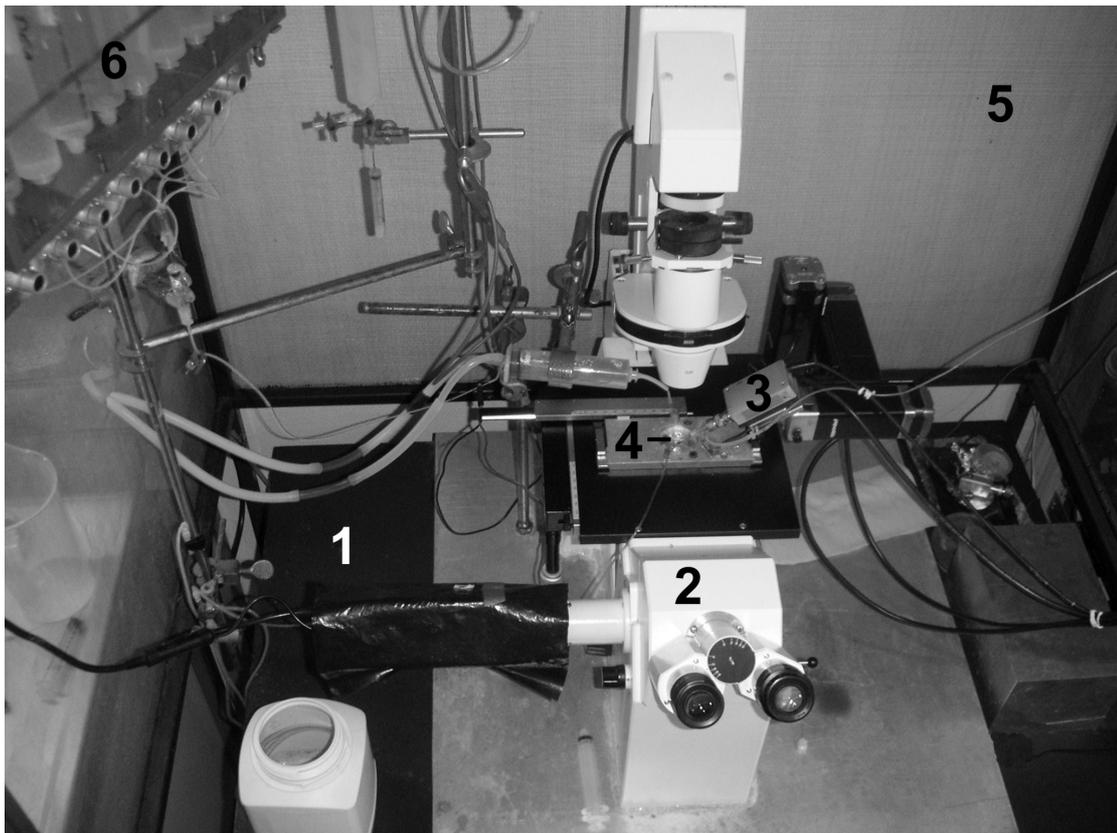


Abb. 2-5: Aufbau der Patch-Clamp-Apparatur (whole-cell-Konfiguration). oben: 1: schwingungsgedämpfter Tisch, 2: Mikroskop, 3: Vorverstärker, 4: Messkammer, 5: Faradayscher Käfig, 6: Vorratsgefäße für w.c.-Badpuffer ($\pm K_{ATP}$ -Kanal-Modulatoren). unten (Nahaufnahme Objektstisch mit Messkammer): 1: Deckgläschen mit Zellen im Perfusionsbad (darunter ist das Objektiv des Mikroskops zu erkennen), 2: Zufluss für Badpuffer, 3: Glasspipette, 4: Pipettenhalter, 5: Silikonschlauch zur Erzeugung von Über-/Unterdruck, 6: Referenzelektrode, 7: Referenzbad, 8: KCl/Agar-Brücke, 9: Absaugung.

2.10.4 Pipetten

Die für die Herstellung der Patch-Pipetten verwendeten Borosilikat-Glaskapillaren hatten einen Außendurchmesser von 1.5 mm und einen Innendurchmesser von 1.17 mm (GC150T; für „inside-out“) bzw. 0.86 mm (GC150; für „whole-cell“). Aus jeweils einem 7.5 cm langen Rohling wurden, nach Hitzepolierung der beiden Enden, mit einem DMZ-Universalpuller zwei gebrauchsfertige Patch-Pipetten hergestellt. Deren elektrischer Widerstand betrug für die Ganzzell-Messungen typischerweise 3-5 M Ω (GC150), für die inside-out-Messungen ca. 1 M Ω (GC150T).

Die Pipettenlösungen wurden zur Abtrennung von Schmutzpartikeln filtriert (Porengröße 0.2 μ m). Die Patch-Pipetten wurden mit Hilfe einer Spritze befüllt und nach Einführen der Messelektrode in Standardpipettenhalter von HEKA eingesetzt. Über einen Schlauch wurde mit Hilfe eines wassergefüllten U-Rohrs Druck auf die Pipettenlösung ausgeübt, was die Gefahr von Schmutzablagerungen beim und nach dem Eintauchen der Pipettenspitze in die Badlösung verringert. Nach dem Aufsetzen der Pipette auf der Zelle (gesteuert per Mikromanipulator unter mikroskopischer Kontrolle) wurde dieser Überdruck weggenommen, um das „Sealing“ (Ausbildung der „cell-attached“-Konfiguration) zu ermöglichen.

2.10.5 Silberelektroden

Mess- und Referenzelektrode bestanden aus 0.5 mm dickem Silberdraht, der durch zehnmündige Elektrolyse in 3 M KCl (Stromstärke: ca. 1 mA) chloriert wurde. Elektroden mit gleichmäßiger, intakter Ag/AgCl-Schicht zeigten lediglich geringen Drift des Pipettenpotentials. Die mit dem Vorverstärker verbundene Referenzelektrode tauchte als Erdung in ein mit der jeweiligen Pipettenlösung gefülltes Reservoir, das über eine KCl/Agar-Brücke mit der Messkammer verbunden war (vgl. Abb. 2-5).

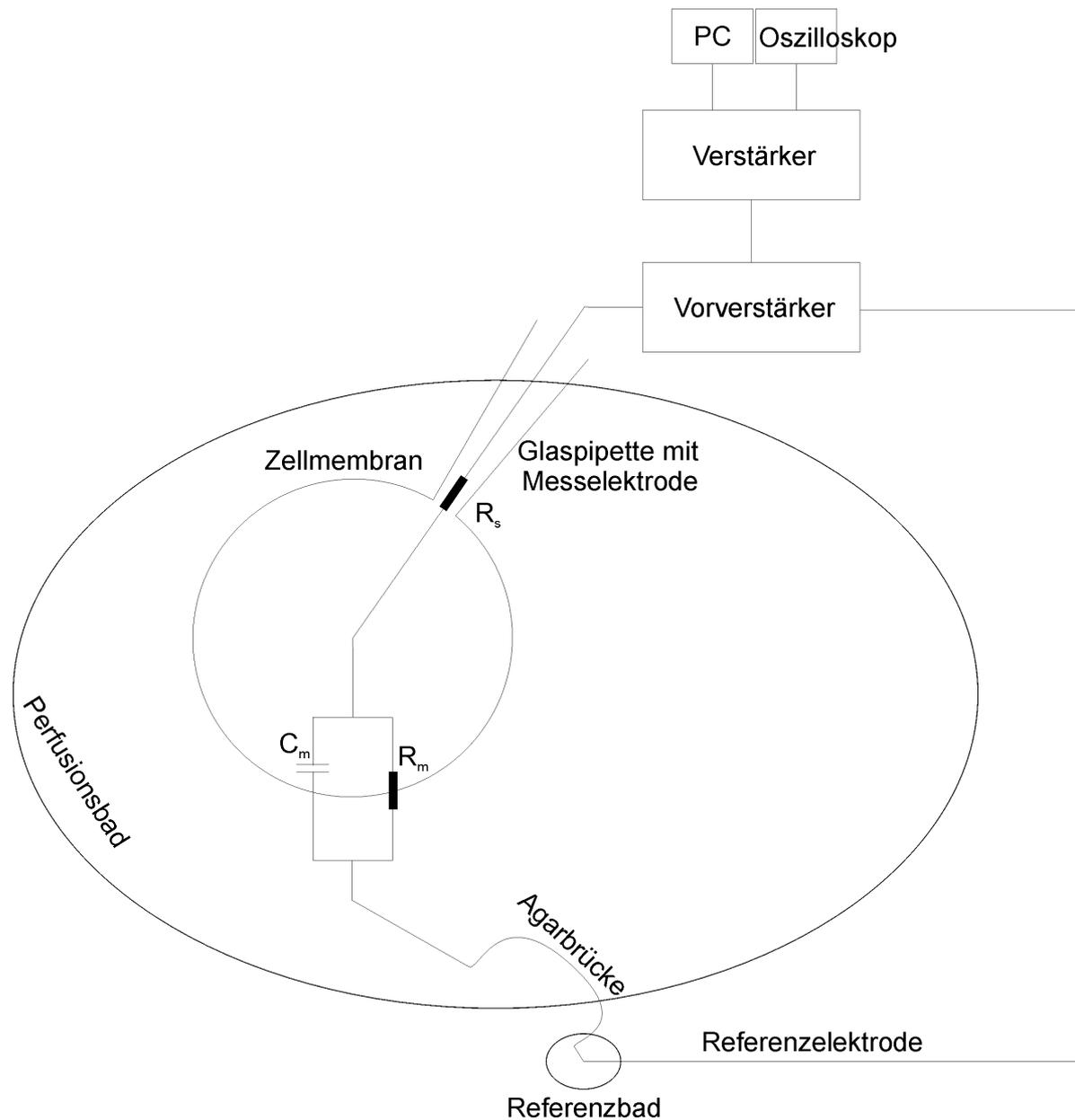


Abb. 2-6: Schematische Darstellung der Patch-Clamp-Messung (whole-cell-Konfiguration). Der Serienwiderstand R_s wird wesentlich durch den Durchmesser der Pipettenöffnung bestimmt. Der Membranwiderstand R_m nimmt bei Öffnung der K_{ATP} -Kanäle ab und spiegelt so deren Aktivität wider, während die elektrische Kapazität der Zellmembran C_m der Größe der Zelloberfläche proportional ist.

2.10.6 KCl-Agar-Brücken

Zur Herstellung der für die Verbindung von Referenzelektrodenreservoir und Messkammer verwendeten Agarbrücken (vgl. Abb. 2-5 und Abb. 2-6) wurden zunächst ca. 7.5 cm lange Glaskapillaren mit einem Durchmesser von 1.2-1.5 mm in der Bunsenbrennerflamme zurechtgebogen. 1.5 % (w/v) Agar wurde in 200 mM KCl klargekocht und die Agarbrücken

durch Eintauchen in die heiße Lösung gefüllt (→ Kapillarkräfte). Die fertigen Agarbrücken wurden bei 6 °C in 200 mM KCl gelagert.

2.10.7 Präparation der Zellen

10 µl 0.1 % (w/v) Poly-D-Lysin und 200 µl H₂O wurden auf Deckgläschen (Ø 30 mm) in 35-mm-Petrischalen pipettiert und über Nacht bei geschlossenem Deckel inkubiert (RT). Die Poly-Lysin-Beschichtung verbessert die Haftung der HEK293-Zellen während der elektrophysiologischen Messungen. Am nächsten Tag wurde die Lösung abgesaugt und die geöffneten Schalen 1-2 h unter UV-Licht sterilisiert. HEK293-Zellen in 94-mm-Kulturschalen wurden mit 5 ml frischem, auf 37 °C vorgewärmtem Standardkulturmedium abgelöst, mit weiterem Standardkulturmedium verdünnt und jeweils 3 ml in die vorbereiteten 35-mm-Schalen mit den Deckgläschen aliquotiert. Im Fall von transient transfizierten Zellen geschah dies einen Tag nach Transfektion. Beginnend mit dem Tag nach dem Aussäen (d.h. zwei Tage nach Transfektion) konnten die Zellen drei Tage lang für Experimente genutzt werden.

Hierzu wurden die Deckgläschen mit einer Kanüle aus den Kulturschälchen gehoben, die Deckgläschen auf der Unterseite vorsichtig abgetrocknet und wie in Kap. 2.10.3 beschrieben in die Messkammer eingesetzt.

Bei transients Transfektion (vgl. auch Kap. 2.7.4) richtete sich die Menge der eingesetzten DNA danach, ob Messungen in der whole-cell- oder inside-out-Konfiguration geplant waren. Während für inside-out-Untersuchungen in der Regel 10 µg DNA transfiziert wurden, um eine möglichst hohe Kanaldichte und entsprechend große Ströme zu erzielen, wurde für whole-cell-Messungen oft nur 1 µg DNA transfiziert, da in dieser Konfiguration zu hohe Ströme technisch nicht kontrollierbar waren (vgl. Kap. 2.10.8.2). In beiden Fällen wurde zusätzlich 1 µg pEGFP-C1 cotransfiziert. Dieser Vektor codiert für eine Variante des erstmalig bei Shimomura et al., 1962 erwähnten Grün Fluoreszierenden Proteins (GFP), welche die Unterscheidung zwischen transfizierten und untransfizierten Zellen mit Hilfe von UV-Licht ermöglicht (vgl. Kap. 2.10.3).

2.10.8 Messungen in der whole-cell-Konfiguration

2.10.8.1 Lösungen

Badpuffer (whole-cell)	NaCl:	142 mM
	HEPES:	10 mM
	D(+)-Glucose:	11 mM
	MgCl ₂ :	1 mM
	CaCl ₂ :	1 mM
	KCl:	2.8 mM
	pH:	7.4
Pipettenlösung (Standard)	K ⁺ -Glutamat:	132 mM
	HEPES:	10 mM
	NaCl:	10 mM
	MgCl ₂ :	2 mM
	EGTA:	1 mM
	ATP:	1 mM
	GDP:	0.3 mM
pH:	7.2	
Pipettenlösung (nukleotidfrei)	K ⁺ -Glutamat:	132 mM
	HEPES:	10 mM
	NaCl:	10 mM
	MgCl ₂ :	1 mM
	pH:	7.2

2.10.8.2 Experimenteller Ablauf

Als Vorratsgefäße für whole-cell-Badpuffer und darin gelöste Substanzen dienten acht 50-ml-Luer-Lock-Spritzen, die über elektrische Schlauchklemmventile gesteuert wurden (vgl. Abb. 2-5). Der Zufluss in die Messkammer wurde mittels Heizdraht (bzw. in frühen Experimenten über ein Wasserbad) so temperiert, dass an den Zellen (d.h. am Ort der Messung) eine Temperatur von 37 ± 2 °C erreicht wurde. Die über eine Schlauchklemme regulierte Perfusionsgeschwindigkeit betrug etwa 0.5 Tropfen pro Sekunde, bei paralleler Absaugung des alten Badpuffers, so dass ein Lösungswechsel ca. 1 min benötigte.

Für die Messungen ausgewählte Zellen lagen einzeln oder paarweise, da bei größeren Zellverbänden keine korrekte Bestimmung der Kapazität C_s (entspricht der Kapazität der Zellmembran C_m in Abb. 2-6) und daraus resultierend des Serienwiderstands R_s mehr möglich ist, was zur Folge hat, dass die an die Zelle angelegte Spannung nicht mehr verlässlich U_{Soll} (vgl. Kap. 2.10.2) entspricht. Eine Patch-Pipette wurde wie in Kap. 2.10.4 beschrieben vorbereitet und mit Hilfe des Mikromanipulators an die Zelle angenähert. An der Pipettenöffnung kam es dabei über eine kleine Grenzfläche zum Aufeinandertreffen zweier Lösungen (Pipettenlösung und Badpuffer) unterschiedlicher Ionenzusammensetzung. Das durch die unterschiedlich schnelle Diffusion der verschiedenen Ionen resultierende Potential (das sog. „Liquid-Junction-Potential“) von ca. 10 mV wurde zusammen mit weiteren existierenden Potentialen auf 0 abgeglichen (\rightarrow „Offset-Korrektur“). Da ab Ausbildung des „Seals“ zwischen Pipette und Zellmembran besagte Diffusion und daraus resultierendes Potential nicht mehr gegeben waren, wichen die angestrebten U_{Soll} -Werte um die vorherige Überkorrektur von den tatsächlichen Spannungen ab. Diesem Umstand wurde durch nachträgliche Subtraktion von 10 mV Rechnung getragen.

Nach der erläuterten „Offset-Korrektur“ und Speichern des Pipettenwiderstands, wurde die Pipette auf der Zelle aufgesetzt und die cell-attached-Konfiguration hergestellt (vgl. Abb. 2-4). Ein erfolgreiches „Sealing“ war u.a. an der Zunahme des elektrischen (Pipetten-) Widerstands in den Gigaohm-Bereich zu erkennen. Nach Übergang in die whole-cell-Konfiguration (vgl. Kap. 2.10.1) wurden ausgehend vom Haltepotential (-60 mV) alle 12 s sieben Spannungssprünge (von jeweils 500 ms Dauer) auf -110, -90, -70, -50, -30, -10 und +10 mV (korrigierte Werte) ausgeführt. Nach diesem Protokoll war eine Abschätzung des Umkehrpotentials möglich, d.h. der Spannung, bei der der Strom sein Vorzeichen wechselt, und gemäß Gleichung 2-16 $U_{Soll} = E_m$ gilt (vgl. Abb. 2-7). Vernachlässigt man endogene Ionenkanäle der HEK293-Zellen und führt deren Ruhemembranpotential ausschließlich auf K^+ zurück, so berechnet sich nach Gleichung 2-18 für $[K^+]_{intrazellulär} = 132$ mM und $[K^+]_{extrazellulär} = 2.8$ mM (vgl. Kap. 2.10.8.1) ein Umkehrpotential von ca. -100 mV. Zellen, deren Umkehrpotential größer (d.h. näher an 0) als ca. -70 mV war, wurden wegen der diesen Umkehrpotentialen zugrunde liegenden Leckströme (d.h. schlechter „Seal“) verworfen. Die quantitative Auswertung der Effekte von getesteten Substanzen erfolgte an der beim Haltepotential (-60 mV) gemessenen Stromspur. Die Kapazitäten der Zellen und auftretenden Serienwiderstände betragen typischerweise 10-20 pF bzw. 10-20 M Ω . Bei Strömen $> \sim 1$ nA (-60 mV) schlug die Bestimmung bzw. Korrektur der Zellkapazitäten fehl, zudem traten Systeminstabilitäten und Zerstörung des Seals auf.

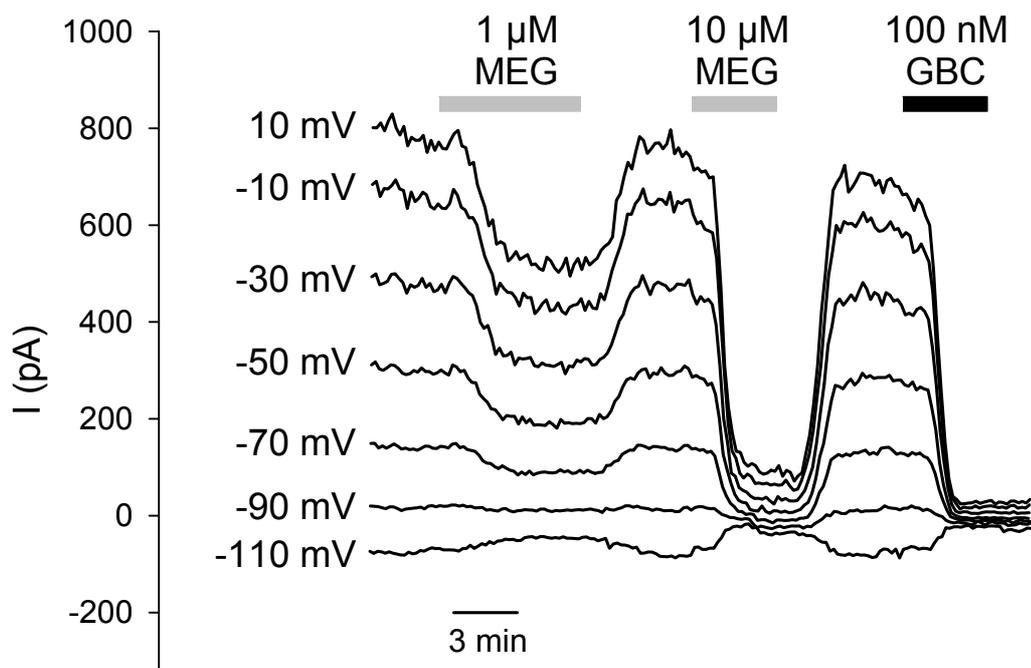


Abb. 2-7: Patch-Clamp-Experiment (Kir6.2/SUR1) zur Veranschaulichung des Protokolls für Messungen in der whole-cell-Konfiguration. Alle 12 s erfolgten ausgehend vom Haltepotential von -60 mV sieben Spannungssprünge (von jeweils 500 ms Dauer) auf -110 , -90 , -70 , -50 , -30 , -10 und $+10$ mV. Das Umkehrpotential, d.h. die Spannung, bei der der Strom sein Vorzeichen wechselt, liegt im hier gezeigten Experiment bei ca. -90 mV und somit nahe dem durch K^+ bestimmten Ruhemembranpotential. Dies spricht für einen guten „Seal“, d.h. es treten infolge einer guten Abdichtung zwischen Pipette und Zellmembran kaum Leckströme auf (vgl. Text).

2.10.9 Messungen in der inside-out-Konfiguration

2.10.9.1 Lösungen

2.10.9.1.1 Badpuffer

Badpuffer	KCl:	142 mM
(inside-out)	HEPES:	10 mM
	D(+)-Glucose:	11 mM
	MgCl ₂ :	1 mM
	CaCl ₂ :	1 mM
	NaCl:	2.8 mM
	pH:	7.4

Bei Verwendung hochosmolarer Pipe-Lösungen wurde die NaCl-Konzentration des Badpuffers erhöht (vgl. Kap. 2.10.9.1.2).

2.10.9.1.2 Perfusionslösung („Pipe-Lösung“)

Pipe-Lösung (Mg ²⁺ -frei)	KCl:	142 mM
	HEPES:	10 mM
	D(+)-Glucose:	11 mM
	EDTA:	1 mM
	pH:	7.2
Pipe-Lösung (mit Mg ²⁺)	KCl:	142 mM
	HEPES:	10 mM
	D(+)-Glucose:	11 mM
	EGTA:	0.1 mM
	MgCl ₂ :	0.7 mM
	pH:	7.2

Bei obigen Angaben handelt es sich um die „Grundrezeptur“ der Pipe-Lösungen für die inside-out-Experimente. Zu testende Substanzen wie Nukleotide, Sulfonylharnstoffe, etc. wurden in diesen „Basislösungen“ gelöst, wobei es teilweise erforderlich war, die Rezepturen etwas abzuwandeln (im folgenden beschrieben).

Nukleotide

Bei Pipe-Lösungen mit Nukleotiden wie ATP oder UDP wurden diese als letzte Komponente gelöst, der pH-Wert unverzüglich auf 7.2 eingestellt und die resultierenden Pipe-Lösungen auf Eis gekühlt bzw. aliquotiert (zu 10 ml) und eingefroren (Lagerung bei -20 °C). Für Experimente mit Mg²⁺ wurde zusätzliches MgCl₂ in Äquivalenz zur Nukleotidkonzentration eingesetzt (z.B. für 1 mM ATP: $[\text{Mg}^{2+}]_{\text{gesamt}} = (0.7 + 1) \text{ mM} = 1.7 \text{ mM}$, so dass $[\text{Mg}^{2+}]_{\text{frei}} \approx 0.7 \text{ mM}$).

Bei Untersuchungen an Kir6.2(V59G) (vgl. Kap. 6) wurden teilweise sehr hohe (bis zu 30 mM) ATP-Konzentrationen eingesetzt, was die Osmolarität der entsprechenden Pipe-Lösung deutlich erhöhte. Diesem Umstand wurde Rechnung getragen, indem in diesen Messungen den Pipe-Lösungen ohne bzw. mit weniger ATP, sowie dem Badpuffer (vgl. Kap. 2.10.9.1.1) NaCl zugesetzt wurde, um starke Osmolaritätsänderungen im Verlauf einer Messung zu vermeiden. Die im folgenden angegebenen NaCl-Konzentrationen (gerundet) orientierten sich an Osmolaritätsmessungen an einem kryoskopischen Osmometer.

Messbedingungen	Lösung	zugeseztes NaCl
- Mg ²⁺ -frei - maximale ATP-Konzentration: 30 mM	Pipelsg. mit 30 mM ATP	+ 0 mM NaCl
	“ 10 mM ATP	+ 35 mM NaCl
	“ 1 mM ATP	+ 50 mM NaCl
	“ 0 mM ATP	+ 50 mM NaCl
	Badpuffer	+ 50 mM NaCl

Messbedingungen	Lösung	zugeseztes NaCl
- Mg ²⁺ -frei - maximale ATP-Konzentration: 10 mM	Pipelsg. mit 10 mM ATP	+ 0 mM NaCl
	“ 3 mM ATP	+ 3 mM NaCl
	“ 1 mM ATP	+ 10 mM NaCl
	“ 0 mM ATP	+ 10 mM NaCl
	Badpuffer	+ 10 mM NaCl

Messbedingungen	Lösung	zugeseztes NaCl
- mit Mg ²⁺ - maximale ATP-Konzentration: 30 mM	Pipelsg. mit 30 mM ATP	+ 0 mM NaCl
	“ 10 mM ATP	+ 50 mM NaCl
	“ 1 mM ATP	+ 80 mM NaCl
	“ 0 mM ATP	+ 80 mM NaCl
	Badpuffer	+ 80 mM NaCl

Messbedingungen	Lösung	zugeseztes NaCl
- mit Mg ²⁺ - maximale ATP-Konzentration: 10 mM	Pipelsg. mit 10 mM ATP	+ 0 mM NaCl
	“ 3 mM ATP	+ 8 mM NaCl
	“ 1 mM ATP	+ 25 mM NaCl
	“ 0 mM ATP	+ 25 mM NaCl
	Badpuffer	+ 25 mM NaCl

Ba²⁺

Als zweiwertiges Ion bildet Ba²⁺ Komplexe mit EDTA und EGTA. Daher wurden diese Verbindungen Ba²⁺-haltigen Pipe-Lösungen *nicht* zugesezt.

Glibenclamid (GBC), Repaglinid (REP), Meglitinid (MEG) und P1075

Bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagerte Stammlösungen (EtOH/DMSO (1:1)) der K_{ATP} -Kanalinhhibitoren GBC, REP und MEG, sowie des Öffners P1075 wurden im erforderlichen Verhältnis mit Pipe-Lösung verdünnt.

Oleoyl-CoA (OCoA) und Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂)

Bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagerte wässrige Stammlösungen der Konzentration 1 mM wurden aufgetaut, 20 min im Eisbad soniziert, entsprechende Volumina mit Pipe-Lösung verdünnt und unter Eiskühlung weitere 20 min im Ultraschallbad inkubiert.

Gentamicin

Die molare Konzentration einer 50 mg/ml Stammlösung wurde für ein Molekulargewicht von ca. 500 g/mol zu etwa 100 mM abgeschätzt. Für Endkonzentrationen von 0.1 und 1 mM wurden entsprechende Volumina mit Pipe-Lösung verdünnt und der hierdurch leicht absinkende pH wieder auf 7.2 eingestellt.

Neomycin

Neomycin (~ 80 % Neomycin B) wurde direkt in Pipe-Lösung zu 10 mM gelöst und mit der selben Pipe-Lösung weiter verdünnt.

Poly-D-Lysin

Das verwendete Poly-D-Lysin besaß ein mittleres Molekulargewicht von 41.4 kD, was einer durchschnittlichen Kettenlänge von etwa 320 Aminosäuren entspricht. Eine wässrige Lösung des Hydrobromids der Konzentration 10 mg/ml wurde mit Pipe-Lösung zur erwünschten Endkonzentration verdünnt.

Tetrapentylammonium (TPA)

Tetrapentylammoniumbromid wurde in EtOH/DMSO (1:1) zu 20 mM gelöst und mit dem selben Lösungsmittel eine 0.2 mM Verdünnung hergestellt. Erforderliche Volumina wurden mit Pipe-Lösung so verdünnt, dass die EtOH/DMSO-Endkonzentration nie 1 % überschritt.

„Pipe-Lösung“ für Inhibition von Kir6.2/SUR1 durch Meglitinid

Für inside-out-Messungen mit Meglitinid wurden die selben Bedingungen gewählt wie bei Stephan et al., 2006b (vgl. Kap. 8):

Pipe-Lösung (Messungen mit MEG)	KCl:	142 mM
	HEPES:	10 mM
	D(+)-Glucose:	11 mM
	EGTA:	5 mM
	MgCl ₂ :	1.1 mM
	ATP:	0.03 mM
	UDP:	0.3 mM
	pH:	7.2

2.10.9.2 Experimenteller Ablauf

Die Experimente in der inside-out-Konfiguration wurden bei RT durchgeführt. Der verwendete Badpuffer, der auch als Pipettenlösung diente, wurde mit einer Tropfgeschwindigkeit von ca. 0.5 Tropfen pro Minute in die Messkammer geleitet. Bei zunächst zu den whole-cell-Experimenten analogem Vorgehen (vgl. Kap. 2.10.8.2) wurde nach Erreichen der cell-attached-Konfiguration durch Zurückziehen der Pipette ein Membranstück („Patch“) aus der Membran gelöst. Die Pipettenspitze mit dem Membranstück wurde daraufhin in die Endung eines Sammelrohrs („Pipe“, hergestellt aus einem abgeschnittenen Microloader) manövriert, in das die Zuflüsse von acht Vorratsgefäßen (10-ml-Luer-Lock-Spritzen) mündeten, die über elektrische Schlauchklemmventile gesteuert wurden. Über die Pipe konnten die jeweiligen Lösungen so direkt auf die Innenseite der Zellmembran appliziert werden. Der Strom wurde bei einem Haltepotential von -50 mV gemessen (in Sonderfällen bei $+50$ mV: vgl. Kap. 6). Da Pipettenlösung und Badpuffer identisch waren, traten hier die für whole-cell-Messungen geschilderten „liquid junctions“ (vgl. Kap. 2.10.8.2) und die damit verbundene Korrektur nicht auf. Weitere experimentelle Vorteile im Vergleich zur whole-cell-Konfiguration bestanden darin, dass die ausgewählte Zelle nicht einzeln liegen musste (da der Patch herausgelöst wird) und dass auch Ströme > 1 nA problemlos zu messen waren.

2.11 Statistik und Fehlerrechnung

Die durch Regressionsanalyse unter Verwendung der SigmaPlot-Software ermittelten Amplituden und pIC_{50} -Werte der Konzentrations-Wirkungskurven in den Radioligandbindungsstudien und Patch-Clamp-Experimenten sind normalverteilt (Christopoulos, 1998). Für die Berechnung von 95-%-Konfidenzintervallen wurde der doppelte SEM (standard error of the mean) herangezogen, z.B. $pIC_{50} \pm 2 \text{ SEM}$.

Beim Vergleich zweier aus jeweils normalverteilten Einzelwerten gemittelter Werte, wurde auf Grundlage eines mit der SigmaStat-Software (vgl. Kap. 2.1) durchgeführten t-Tests beurteilt, ob ein statistisch signifikanter Unterschied vorlag.

Bei Berechnung einer Größe y aus ihrerseits fehlerbehafteten Werten a und b , wurden für die Bestimmung des Fehlers dieser neuen Größe die Regeln der Fehlerrechnung angewandt (Bevington, 1969).

So gilt für den Fehler σ_y von $y = f(a,b)$:

$$\sigma_y^2 = \left(\frac{\partial y}{\partial a}\right)^2 \cdot \sigma_a^2 + \left(\frac{\partial y}{\partial b}\right)^2 \cdot \sigma_b^2$$

Für $y = a \pm b$ folgt hieraus:

$$\sigma_y = \sqrt{\sigma_a^2 + \sigma_b^2}$$

Für $y = a \cdot b$ und $y = a \cdot b^{-1}$ gilt:

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

2.12 Das Hefe-Zweihybrid-System für Membranproteine (MY2H)

2.12.1 Funktionsprinzip

Das Prinzip des von Stagljar et al., 1998 entwickelten MY2H-Systems zur Suche nach Interaktionspartnern („Beuteproteinen“) eines spezifischen Membranproteins (des „Ködners“) ist in Abb. 2-8 veranschaulicht. Der „Köder“ wird als Fusionsprotein mit dem Cub-LexA-VP16-Modul exprimiert. Bei „Cub“ handelt es sich um die C-terminale Hälfte von Ubiquitin,

LexA-VP16 stellt einen artifiziellen Transkriptionsaktivator dar. Die potentiellen Interaktionspartner sind mit der N-terminalen Hälfte von Ubiquitin fusioniert. In Letzterer ist das Isoleucin 13 durch Glycin substituiert (\rightarrow „NubG“), was die Affinität zur C-terminalen Ubiquitinhälfte entscheidend schwächt: Nur wenn „Köder-“ und „Beuteprotein“ interagieren und hierdurch die beiden Ubiquitinhälften in unmittelbare Nachbarschaft bringen, ist es Cub und NubG möglich, Ubiquitin zu rekonstituieren. Dieses wird dann durch hefeeigene ubiquitinspezifische Proteasen erkannt, die daraufhin den LexA-VP16-Transkriptionsaktivator freisetzen. LexA-VP16 aktiviert nun im Zellkern die Transkription entsprechender Reportergene (vgl. Kap. 2.12.3.1), die die initiale Interaktion zwischen „Köder“ und „Beute“ anzeigen.

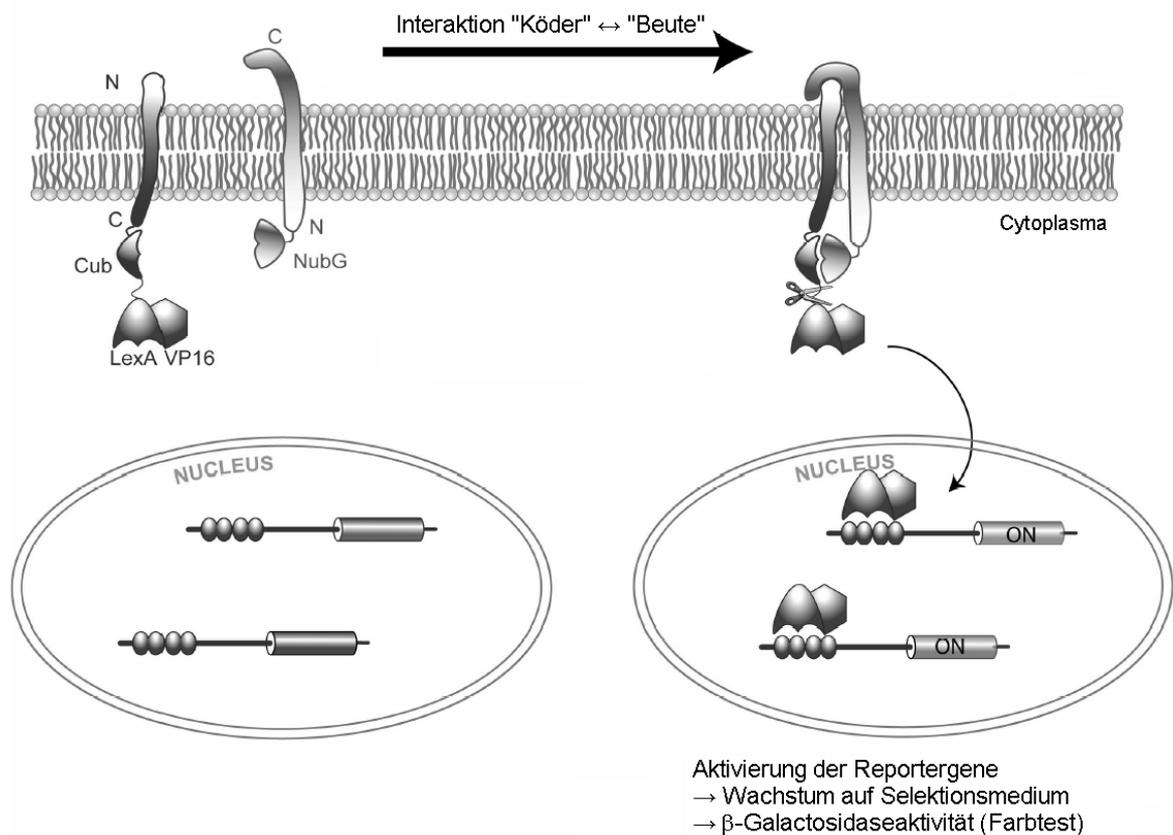


Abb. 2-8: Funktionsprinzip des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems für Membranproteine (MY2H), zur Erläuterung siehe Text. (Abbildung (leicht modifiziert) entnommen aus der Anleitung zum DUALmembrane kit 2 (Dualsystems))

2.12.2 Verlauf der MY2H-Suche

Die Suche („Screen“) nach Interaktionspartnern des „Köder“-Membranproteins gliedert sich in die folgenden zentralen Schritte:

- Klonierung des „Köders“ in den entsprechenden Vektor (→ Fusion mit Cub-LexA-VP16); Transformation des Vektors in den geeigneten *S. cerevisiae*-Stamm und Überprüfung der Expression.
- Transformation der entsprechenden cDNA-Bibliothek potentieller Interaktionspartner („Beute“) und Selektion hinsichtlich aktivierter Reportergene (→ Wachstum auf Selektionsmedium und β -Galactosidaseaktivität).
- Isolierung der aktivierenden „Beutevektoren“; Bestätigung der Aktivierung und Identifizierung der positiven Klone (→ Sequenzierung).

Die in den folgenden Kapiteln beschriebenen Protokolle für das Hefe-Zweihybrid-System für Membranproteine (MY2H) beruhen auf den Anleitungen zum DUALmembrane kit 2 und dem „Y2H β -Galactosidase Kit“ bzw. der Homepage von Dualsystems Biotech (www.dualsystems.com). Die Kultivierung der Hefen (in Flüssig- wie auf Festmedium) erfolgte stets bei 30 °C.

2.12.3 Hefe-Stamm und Kulturmedien

2.12.3.1 Hefe-Stamm: Genotyp und Reportergene

Der für das MY2H-System verwendete *S. cerevisiae*-Stamm NMY51 besitzt folgenden Genotyp:

*MATa his3delta200 trp1-901 leu2-3,112 ade2 LYS2::(lexAop)4-HIS3
ura3::(lexAop)8-lacZ (lexAop)8-ADE2 GAL4*

Transformation mit dem „Ködervektor“ pCCW-STE ermöglicht NMY51 das Wachstum auf leucinfreiem Medium, Transformation mit dem Bibliotheksvektor pDSL-Nx Wachstum auf tryptophanfreiem Medium. Aktivierung der Reportergene *ade2*, *his3* und *lacZ* bei erfolgreicher Interaktion von „Köder“ und „Beute“ führt schließlich auch zum Wachstum von NMY51 in Abwesenheit von exogenem Histidin und Adenin, sowie zur Expression von β -Galactosidase.

2.12.3.2 Stammlösungen zur Komplementierung der Kulturmedien

Folgende Stammlösungen (in H₂O) wurden hergestellt:

- a) 50 % (w/v) Glucose
- b) 1 % (w/v) Leu
- c) 0.5 % (w/v) Trp
- d) 1 % (w/v) His
- e) 0.2 % (w/v) Ura
- f) 1 M 3-AT

Die 3-AT-Lösung wurde sterilfiltriert, die Glucose-Lösung autoklaviert (20 min), die übrigen Lösungen waren nicht steril. Die 3-AT-Lösung wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert, die Uracil-Lösung bei RT (Ura fiel bei 6 °C aus), die übrigen Lösungen bei 6 °C. Von Adenin wurde keine Stammlösung hergestellt, sondern das Sulfatsalz jeweils direkt eingewogen.

2.12.3.3 Herstellung der Kulturmedien

Im folgenden ist die Herstellung der Flüssigkulturmedien beschrieben. Für die Herstellung von Agarplatten wurden diese Medien mit 1.6 % (w/v) Agar und einem Magnetrührfisch autoklaviert (typischerweise ca. 200 ml in einer 500-ml-Schottflasche). Zusatz von Glucose und (wenn erforderlich) 3-AT erfolgte nach Abkühlen des Mediums auf ca. 50 °C. Aus 200 ml resultierten im Schnitt neun 100-mm-Platten. Flüssig- und Festmedien wurden bis zum Gebrauch bei 6 °C gelagert.

YPAD und 2x YPAD

YPAD-Medium enthielt 1 % (w/v) Hefeextrakt, 2 % (w/v) Pepton, 2 % (w/v) Glucose und 0.004 % (w/v) Adenin. Im Fall von 2x YPAD waren die Konzentrationen mit Ausnahme von Adenin (0.004 %) doppelt so hoch. Hefeextrakt, Pepton und Adenin wurden zusammengefügt, in H₂O gelöst, autoklaviert (20 min) und nach dem Abkühlen mit Glucose-Stammlösung (vgl. Kap. 2.12.3.2) supplementiert.

SD-Medien

Die für das synthetische, definierte Minimalmedium (SD-Medium) verwendeten „Drop-out-Mixe“, synthetische Mischungen aus Aminosäuren und anderen essentiellen Substraten,

waren frei von Leucin, Tryptophan, Histidin und Uracil, sowie (für adeninfreies SD-Medium) Adenin. Leucin, Tryptophan, Histidin und Uracil wurden wenn erforderlich in folgender Endkonzentration zugefügt:

- Leu: 380 mg/l
- Trp: 76 mg/l
- His: 76 mg/l
- Ura: 76 mg/l

Im Drop-out-Mix nicht enthaltene essentielle Vitamine und Salze wurden dem Medium in Form von aminosäurefreier „Yeast Nitrogen Base“ (YNB) zugeführt. 0.67 % (w/v) YNB wurden mit 0.14 % (w/v) Drop-out-Mix (adeninhaltig) bzw. 0.2 % (w/v) Drop-out-Mix (adeninfrei) und gegebenenfalls Leucin, Tryptophan, Histidin und Uracil in oben genannter Konzentration gelöst, der pH auf 5.8 eingestellt und das Medium autoklaviert (20 min). Nach Abkühlen (s.o.) wurden Glucose (2 % (w/v)) und wenn nötig 3-AT zugefügt. Medium mit 3-AT wurde nicht später als einen Monat nach Herstellung verwendet.

2.12.4 Herstellung und Verwendung von *S. cerevisiae*-Stammkulturen

Die Zellen wurden alternativ über Nacht in Flüssigmedium kultiviert und anschließend pelletiert oder von frisch inkubierten Agarplatten gekratzt, in 2x YPAD (vgl. Kap. 2.12.3.3) + 25 % (v/v) Glycerin suspendiert und bei -80 °C gelagert (kein Schockgefrieren mit Stickstoff).

Zur Entnahme von Zellen wurde mit einer sterilen Impföse etwas Material von der gefrorenen Stammkultur gekratzt, auf YPAD bzw. dem entsprechenden Selektionsmedium ausgestrichen und 2-3 Tage im Brutschrank inkubiert.

2.12.5 Klonierung der Gene für Kir6.1 (bzw. SUR2B) in die entsprechenden Hefe-Expressionsvektoren

2.12.5.1 Klonierung in pCCW-STE

Der Ködervektor pCCW-STE war Bestandteil des DUALmembrane kit 2. Er enthält das Gen *leu2*, welches transformierten NMY51 das Wachstum auf leucinfreiem Medium ermöglicht.

Die Gene für Kir6.1 und SUR2B (jeweils Maus) wurden unter Einführung von Sfi I-Restriktionsschnittstellen (an 5'- und 3'-Ende) und Deletion des jeweiligen Stop-Codons

PCR-amplifiziert. Die verwendeten Primer waren 61inSTE_gcA und 61inSTE_Pr2 (Kir6.1) bzw. 2Bin416Sfi_1bm und 3sfi2Bminusstop (SUR2B). Die PCR-Produkte wurden gereinigt und mit Sfi I geschnitten. Nach Agarose-Gelelektrophorese, Extraktion und Reinigung der DNA erfolgte die Ligation mit dem analog behandelten Vektor pCCW-STE. Es folgte die Transformation in *E. coli*, Selektion auf LB + 30 µg/ml Kanamycin, DNA-Präparation und -Analyse. Die erhaltenen Ködervektoren wurden mit „pCCW-STE-Kir6.1“ (bzw. „pCCW-STE-SUR2B“) bezeichnet.

2.12.5.2 Klonierung von SUR2B in p416CYC

Der Vektor p416CYC enthält das für die Uracil-Synthese benötigte Gen *ura3*. Der ursprüngliche Plan sah vor, zum eigentlichen Köder Kir6.1, SUR2B cozuexprimieren. Hierzu wurde zunächst die multiple Klonierungsstelle (MCS) von pCCW-STE in den Vektor p416CYC transferiert (mit Xba I und Bam HI ausgeschnitten), um die Sfi I-Schnittstellen nutzen zu können und SUR2B N-terminal mit dem STE-Peptid zu fusionieren. In dieses Konstrukt wurde die mit den Primern 2Bin416Sfi_1bm und 2Bin416_Pr2 amplifizierte SUR2B-Sequenz über die Sfi I-Schnittstellen eingefügt (analog zu Kap. 2.12.5.1, jedoch Selektion mit 100 µg/ml Ampicillin).

2.12.6 Einfaches Transformationsprotokoll für *S. cerevisiae* (niedrige Transformationseffizienz)

2.12.6.1 Transformationsreagenzien

1 M LiOAc

Lithiumacetat-Dihydrat wurde zu 1 M in H₂O gelöst und sterilfiltriert.

10x TE-Puffer

Der 10x Puffer der Zusammensetzung 100 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 7.5 wurde ebenfalls sterilfiltriert.

50 % (w/v) Polyethylenglycol (PEG)

Polyethylenglycol 4000 wurde in H₂O gelöst und sterilfiltriert. Die Qualität dieser Lösung hat entscheidenden Einfluss auf die Transformationseffizienz. Für die Transformation der cDNA-

Bibliothek (vgl. Kap. 2.12.9) wurde die PEG-Lösung daher am Transformationstag (oder Vortag) jeweils frisch angesetzt.

ssDNA

Die Einzelstrang-DNA (DNA-Natriumsalz aus Lachshoden) wurde durch kontinuierliches Rühren bei 6 °C über Nacht in H₂O gelöst (2 mg/ml), in sterile 1.5-ml-Reaktionsgefäße aliquotiert, 5 min bei 99 °C gekocht (Heizblock), im Eisbad abgekühlt und bei -20 °C gelagert.

2.12.6.2 Transformationsprotokoll

Wenn keine hohe Transformationseffizienz erforderlich war (z.B. Transformation des Ködervektors pCCW-STE-Kir6.1 in den Ausgangsstamm NMY51), wurde das folgende vergleichsweise schnelle Protokoll angewendet:

- pro Transformationsansatz eine Impfschlinge Zellen von einer möglichst frischen Platte (nicht älter als vier Wochen) in 100 µl sterilem H₂O suspendieren
- PEG/LiOAc-Master-Mix vorbereiten (Gesamtvolumen der Zahl der Transformationsansätze anpassen): 1.2 ml 50 % (w/v) PEG, 180 µl 1 M LiOAc, 125 µl 2 mg/ml ssDNA (vgl. Kap. 2.12.6.1)
- für jeden Ansatz den entsprechenden Vektor (typischerweise 0.1-1 µg DNA) in steriles 1.5-ml-Reaktionsgefäß vorlegen, 300 µl PEG/LiOAc-Master-Mix zupipettieren und kurz vortexen
- 100 µl Zellsuspension zupipettieren und 1 min vortexen
- 45 min bei 42 °C im Wasserbad inkubieren
- Zellen pelletieren (5 min, 700 g)
- Pellets in je 100 µl 0.9 % NaCl (steril) resuspendieren und auf entsprechendem Selektionsmedium ausplattieren
- mit Parafilm verschlossene Platten 2-3 Tage bei 30 °C inkubieren

Für den funktionellen Test der Köderproteine (vgl. Kap. 9.2.1) wurde obiges Protokoll mit folgenden Abweichungen angewendet:

Die Zellen wurden nicht von einer Platte gekratzt. Stattdessen wurden 50 ml Über-Nacht-Kultur (SD -Leu) bis zu einer OD₅₄₆ von 0.6-0.8 geschüttelt, danach zentrifugiert (5 min, 2500 g) und das Pellet in 2.5 ml sterilem H₂O resuspendiert. Es wurde jeweils 1 µg DNA

eingesetzt. Gegen Ende der Transformation wurden die Pellets in je 200 μl (statt 100 μl) 0.9 % NaCl resuspendiert und je 50 μl auf den verschiedenen Selektionsplatten ausgestrichen.

2.12.7 Herstellung von *S. cerevisiae*-Zelllysaten für Western Blot

SDS-Probenpuffer (DS) für <i>S. cerevisiae</i> -Zelllysate	Tris/HCl pH 6.8:	25 mM
	Harnstoff:	9 M
	EDTA:	1 mM
	SDS:	1 % (w/v)
	Glycerin:	10 % (v/v)
	Bromphenolblau:	0.01 % (w/v)
	β -ME:	0.7 M

Obige Rezeptur des für die PAGE der Hefelysate verwendeten SDS-Probenpuffers wurde der Anleitung zum DUALmembrane kit 2 entnommen. Der Puffer wurde zunächst ohne β -ME hergestellt und bei RT gelagert, das β -ME jeweils frisch zugesetzt.

Um die Expression der relevanten Proteine in den transformierten Hefen zu überprüfen wurden nach folgendem Protokoll Zelllysate für Western Blot Analysen hergestellt:

- Hefen über Nacht in Selektionsmedium zu einer OD_{546} von 0.6-1 heranwachsen lassen
- je 10 ml Über-Nacht-Kultur in 14-ml-Falcon zentrifugieren (5 min, 700 g)
- Pellets einmal mit 1 mM EDTA waschen
- Pellets mit je 200 μl 2 M NaOH suspendieren, in 1.5-ml-Reaktionsgefäß überführen und 10 min auf Eis inkubieren
- 200 μl 50 % (w/v) TCA zugeben, mischen und (mindestens) 60 min weiter auf Eis inkubieren
- 20 min bei Maximalgeschwindigkeit zentrifugieren (4 °C)
- Überstand verwerfen
- Pellet einmal mit 200 μl eiskaltem Aceton waschen
- Pellet mit 200 μl 5 % (w/v) SDS suspendieren
- 200 μl SDS-Probenpuffer (DS) (enthält Bromphenolblau; s.o.) zugeben und mischen
- 2-3 Tropfen 2 M Tris/HCl, pH 9 zugeben (\rightarrow Farbumschlag von gelb nach blau)
- Ansätze 15 min bei 37 °C schütteln
- 5 min bei 14000 g zentrifugieren
- Extrakte auf SDS-Gel laden bzw. zunächst bei -20 °C einlagern

2.12.8 Western Blot zur Detektion der Cub-LexA-VP16-Fusionsproteine

Bedingt durch die konkreten Herstellerempfehlungen für den zum Nachweis der Cub-LexA-VP16-Fusionsproteine verwendeten Anti-VP16-Antikörper wich die Entwicklung der Western Blots etwas vom Protokoll aus Kap. 2.8.4 ab:

Die Nitrocellulosemembran wurde 1 h bei 4 °C in TBS (ab) + 5 % Milchpulver geblockt. Danach wurde der Blot 5 s mit TBST (ab) gewaschen, in ein 50-ml-Falcon gesteckt und über Nacht mit 5 µl Anti-VP16 in 6 ml TBST (ab) + 2 % Milchpulver auf dem Rollenmischer inkubiert (4 °C). Am nächsten Tag wurde er 3x 10 min mit TBST (ab) gewaschen, dann 2 h mit dem sekundären AP-konjugierten Anti-Kaninchen-Antikörper (1:10000 in 10 ml TBST (ab) + 0.5 % BSA) bei RT auf dem Rollenmischer inkubiert. Anschließend wurde die Membran 2x 10 min mit TBST (ab) und 2x 2 min mit Assaypuffer für Chemilumineszenz gewaschen und in Plastikfolie mit ~ 600 µl CDP-Star 1 h bei RT inkubiert.

2.12.9 Transformation der cDNA-Bibliothek (hohe Transformationseffizienz)

Die verwendete cDNA-Bibliothek (vom Hersteller des DUALmembrane kit 2) beruhte auf aus Herzgewebe (Maus) isolierter Gesamt-RNA. Die cDNAs waren über Sfi I-Schnittstellen so in den Bibliotheksvektor pDSL-Nx inseriert, dass die von ihnen codierten potentiellen Interaktionspartner (komplettes Protein oder Fragment) an ihrem N-Terminus mit NubG (der N-terminalen, modifizierten Hälfte von Ubiquitin) fusioniert waren. Die Komplexität der Bibliothek wurde mit 5.2 Millionen Klonen, die Konzentration mit 0.65 µg/µl angegeben.

Das Protokoll für die Transformation der cDNA-Bibliothek, bei der eine möglichst hohe Effizienz angestrebt wurde, gliederte sich wie folgt:

- 10 ml SD –Leu mit dem den Köder exprimierenden Stamm animpfen und 8 h bei 30 °C schütteln (Vorkultur)
- 100 ml SD –Leu mit der (kompletten) Vorkultur animpfen und über Nacht im Heizschüttler inkubieren
- Bestimmung der OD₅₄₆, hierzu entweder 1:10-Verdünnung eines Aliquots mit H₂O vermessen oder (bei niedriger Zelldichte) Zellen aus 1 ml Kultur pelletieren (5 min, 2500 g), in 1 ml H₂O resuspendieren und vermessen
- 30 OD₅₄₆-Einheiten in 50-ml-Falcon pelletieren (5 min, 700 g)
- Pellet in 200 ml vorgewärmtem (30 °C) 2x YPAD suspendieren (1-l-Erlmeyerkolben) und bei 30 °C schütteln

- direkt nach dem Animpfen die OD_{546} bestimmen (sollte 0.15 betragen)
- Zellen bis zu einer OD_{546} von 0.6 weiterschütteln (2 Verdopplungen; Dauer: ~ 6 h)
- ssDNA vorbereiten: 5 min Inkubation der Stammlösung (2 mg/ml) bei 99 °C, direkt im Anschluß Transfer in Eisbad, nach Abkühlen Wiederholung dieser Prozedur
- LiOAc/TE-Mix vorbereiten: 1.1 ml 1 M LiOAc, 1.1 ml 10x TE (DS) pH 7.5, 7.8 ml H_2O
- PEG/LiOAc-Master-Mix vorbereiten: 1.2 ml 1 M LiOAc, 1.2 ml 10x TE (DS) pH 7.5, 9.6 ml 50 % (w/v) PEG
- die 200-ml-Kultur nach Erreichen der oben genannten Zelldichte auf vier 50-ml-Falcons verteilen und zentrifugieren (5 min, 700 g)
- die Pellets in jeweils 600 μ l LiOAc/TE-Mix resuspendieren
- in vier 50-ml-Falcons jeweils 7 μ g der cDNA-Bibliothek vorlegen
- je 100 μ l der vorbereiteten ssDNA zugeben
- je 600 μ l Zellsuspension zupipettieren und kurz vortexen
- je 2.5 ml PEG/LiOAc-Master-Mix hinzufügen und 1 min gründlich vortexen
- 45 min im Wasserbad (30 °C) inkubieren, dabei alle 15 min kurz mischen (vortexen)
- zu jedem Ansatz 160 μ l DMSO pipettieren, sofort danach mischen und in zweitem Wasserbad 20 min bei 42 °C inkubieren
- Zellen pelletieren (5 min, 700 g)
- Pellets in jeweils 1.5 ml 0.9 % NaCl (steril) resuspendieren, Ansätze vereinigen und Zellen auf Selektionsmedium (SD –Leu-Trp-His-Ade + 1 mM 3-AT) ausplattieren (je 100 μ l pro 100-mm-Platte); für die Ermittlung der Transformationseffizienz mit 0.9 % NaCl (steril) 1:100, 1:1000 und 1:10000-Verdünnungen der Zellen herstellen und auf SD –Leu-Trp ausplattieren (ebenfalls 100 μ l pro Platte)
- Schalen mit Parafilm oder in Kunststoffbeutel vor Austrocknung schützen und mindestens 4 Tage im Brutschrank inkubieren
- Transformationseffizienz berechnen, Klone von den Selektionsplatten picken und (auf dem selben Medium) frisch ausstreichen

Die im Vorfeld der cDNA-Bibliotheks-Transformationen durchgeführten „Pilot-Transformationen“ zur Optimierung der Selektionsbedingungen (\rightarrow 3-AT-Konzentration) wurden mit dem leeren pDSL-Nx-Bibliotheksvektor durchgeführt (Negativkontrolle \rightarrow Erkennung/Vermeidung von unspezifischem Wachstum). Statt 200 ml 2x YPAD wurden hier nur 100 ml eingesetzt, die mit 15 OD_{546} -Einheiten angeimpft wurden (d.h. zwei Transformationsansätze statt vier).

2.12.10 Test der β -Galactosidaseaktivität

Interaktionen zwischen Köder- und Beuteprotein führen zu einer Aktivierung der Reportergene *ade2*, *his3* und *lacZ* (vgl. Kap. 2.12.1). Letzteres codiert für das Enzym β -Galactosidase, welches das Substrat X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid) zu einem blauen Farbstoff umsetzt.

Die Enzymaktivität in den verschiedenen Klonen wurde mit Hilfe eines entsprechenden Kits (vgl. Kap. 2.4.7) nach folgendem Protokoll verglichen:

- für jeden zu testenden Klon 1 ml SD –Leu-Trp animpfen und über Nacht im Heizschüttler inkubieren
- Zellen pelletieren (5 min, 2000 g)
- für die Lyse 9.95 ml „One-Step Lysis and Assay Reagent“ mit 50 μ l „Dye stock solution“ mischen (bzw. Gesamtvolumen der Zahl der Ansätze anpassen)
- die Zellpellets in jeweils 100 μ l der obigen Lyse-Lösung suspendieren
- je 80 μ l von jeder Suspension in 96-well-Platte überführen
- nach ca. 1.5, 2.5 und 3.5 h die Absorption bei 630 nm messen (Microplate Reader); vor jeder Messung Mischung der Proben durch automatisiertes mehrsekündiges Rütteln der Platten; jeweils zweimal messen und Mittelwert bilden)

Der Referenzwert eines Klons ohne aktivierende Interaktionen (gepickt von einer SD –Leu-Trp-Platte; vgl. Kap. 2.12.3.1) wurde von den anderen Werten subtrahiert.

2.12.11 Isolierung der „Beutevektoren“ aus „positiven“ Klonen und erneuter Test auf Aktivierung im MY2H-System zum Ausschluss von „Falsch-Positiven“

Zur Isolierung („recovery“) jener Vektoren der cDNA-Bibliothek, die eine deutliche Aktivierung der Reportergene bewirkt hatten, wurden jeweils 5 ml SD –Trp (in 14-ml-Falcons) mit dem entsprechenden Klon angeimpft und 2 Tage bei 30 °C geschüttelt. Nach dem Pelletieren der Zellen (5 min, 4000 g) wurden die Zellen in 250 μ l „solution I“ (Miniprepkit e.Z.N.A.) suspendiert und enzymatisch (Lyticase) oder mechanisch („beads“) aufgeschlossen. Für den enzymatischen Aufschluss wurden der Zellsuspension 50 U Lyticase (Sigma-Aldrich, Hamburg, D) zugefügt und der Ansatz ca. 1-2 h bei 37 °C (Heizblock) inkubiert. Alternativ wurden jeweils ca. 100-150 μ l Glaskügelchen („beads“) in die Ansätze gegeben. In diesem Fall folgten sechs Zyklen aus einminütigem Vortexen und zweiminütigem Kühlen auf Eis. In beiden Fällen wurde nach dem Lyseschritt mit dem „normalen“ (d.h. für *E.*

coli entwickelten) Protokoll des e.Z.N.A. Kits fortgeföhren. Je 5 µl der im letzten Schritt eluierten DNA wurden für die Transformation von kompetenten *E. coli* verwendet, die auf LB + 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert wurden. Aus je zwei der resultierenden Kolonien wurde die Vektor-DNA isoliert (nach Standardprotokoll; vgl. Kap. 2.6.4) und per Sfi I-Restriktionsverdau und anschließender Agarosegelelektrophorese überprüft, ob sie in beiden Fällen „inserts“ der selben Größe enthielt (in diesem Fall wurde angenommen, dass es sich um identische „inserts“ handelte). Trat der seltene Fall ein, dass unterschiedliche „inserts“ festgestellt wurden, d.h. wenn der jeweilige Hefeklon zwei verschiedene Beutevektoren aufgenommen hatte, wurden beide Vektoren (einzeln) auf erneute Aktivierung im MY2H-System getestet, andernfalls nur einer.

Hierzu wurde NMY51 zunächst mit pCCW-STE-Kir6.1 transformiert (vgl. Kap. 2.12.5.1). Mit den resultierenden Transformanten wurde eine SD –Leu-Flüssigkultur angeimpft und über Nacht im Heizschüttler bis zu einer OD₅₄₆ von 0.6 inkubiert. Ein bestimmtes Volumen (pro Transformationsansatz 2 ml) wurde zentrifugiert (5 min, 700 g), die pelletierten Zellen in H₂O suspendiert (1/20 des Volumens vor der Zentrifugation). Der weitere Ablauf der Transformation entsprach dem Protokoll aus Kap. 2.12.6.2, bis zur Resuspension der Zellen in 200 µl 0.9 % NaCl (steril). Aus dieser Zellsuspension wurden je 100 µl auf SD –Leu-Trp (→ Kontrolle der Transformationseffizienz) und SD –Leu-Trp-His-Ade + 1 mM 3-AT (→ Test auf Aktivierung) ausplattiert. Nach 3, 4, 5 und 6 Tagen Inkubation bei 30 °C wurde das Wachstum auf den Platten überprüft. Für erneut positive Klone wurde der Beutevektor sequenziert. Sequenzierprimer war *dslnx_seqfw*, teilweise zusätzlich *dslnx_seqrv* (vgl. Kap. 2.4.4).

2.12.12 FLAG-Tagging der potentiellen Interaktionspartner für die Überprüfung der im MY2H-System gefundenen Interaktionen durch Co-Immunopräzipitation

Muriner Kir6.1 bzw. humaner Kir6.2 wurden durch Subklonierung in den Vektor pCS2+MT C-terminal (sechsfach) MYC-getaggt (vgl. Kap. 2.8.1). Die vier in der MY2H-Suche identifizierten Proteine wurden N-terminal mit je zwei FLAG Epitoptags fusioniert und für die Expression in den Säugerzellen in den pcDNA3.1(+)-Vektor kloniert.

Die für *Laptm4a* codierende Sequenz war in Klon 224 vollständig enthalten (vgl. Kap. 9.2.3). Sie wurde mit den PCR-Primern 224pcD-Oli1 und 224pcD-Oli2 amplifiziert und unter Nutzung der hierbei eingeföhrteten Schnittstellen für Not I und Xba I in pcDNA3.1(+) kloniert. Im zweiten Schritt wurde wie in Kap. 2.8.1 für SUR2B(YS) beschrieben ein für zwei FLAG-

Tags codierendes DNA-Oligomer eingefügt. Die Gene der anderen drei Interaktionspartner waren in den „Beutevektoren“ jeweils nur abschnittsweise enthalten, die Co-IPs sollten jedoch mit den kompletten Proteinen durchgeführt werden. Daher wurden diese Gene (inklusive FLAG-Tags und Schnittstellen für Not I und Xba I) neu synthetisiert (Epoch Biolabs, Sugar Land, USA) und anschließend ebenfalls in pcDNA3.1(+) kloniert.

Der Ablauf der Co-IPs und des sich jeweils anschließenden Western Blots ist in Kap. 2.8 beschrieben.

3 Bindung von Sulfonylharnstoffen und Gliniden der Klassen A, B und A+B: Einfluss von Kir- und SUR-Subtypen

3.1 Fragestellung

Das Modell der zweiteiligen Bindungstasche für insulinotrope Substanzen und deren Klassifizierung als A-, B-, und A+B-Liganden (vgl. Kap. 1.2.4.1) wurde ursprünglich für den pankreatischen K_{ATP} -Kanal Kir6.2/SUR1 entwickelt. Elektrophysiologische Messungen der Kanalinhibition stellten dabei die Hauptuntersuchungsmethode dar (Ashfield et al., 1999; Proks et al., 2002). Ein Projekt der Abteilung Molekularpharmakologie bestand darin, zu prüfen, inwieweit dieses Modell auf SUR2-Kanäle übertragbar ist. Hierfür wurden die Bindungseigenschaften von zehn verschiedenen Sulfonylharnstoffen und Gliniden (vgl. Abb. 1-10) in Konkurrenzexperimenten mit [3 H]GBC untersucht. Bestandteil der Analyse waren die Frage nach dem Einfluss der porenbildenden Untereinheit auf die Bindungsaffinitäten, sowie die Auswirkungen der Mutation SUR2(Y1206S) (Nummerierung: SUR2 aus Maus), d.h. der Umkehrung der S1237Y-Mutation aus SUR1 (vgl. Kap. 1.2.4.1). Schließlich wurden die Affinitäten der Insulinotrope zu verschiedenen gewebspezifischen K_{ATP} -Kanal-Subtypen verglichen, um Aussagen zur Selektivität der Liganden bzw. Ligandenklassen zu treffen. In diese umfangreichen Untersuchungen waren mehrere Mitglieder der Arbeitsgruppe eingebunden. Vom Autor der vorliegenden Dissertation wurde die Verdrängung von [3 H]GBC durch GBC bzw. REP an Kir6.1/SUR2B und Kir6.2/SUR2B untersucht. Die Experimente wurden wie in Kap. 2.9.4 beschrieben an intakten HEK293-Zellen durchgeführt, die den jeweiligen Kanal permanent (Kir6.1/SUR2B) oder transient (Kir6.2/SUR2B) exprimierten. In Kap. 3.3 werden die Ergebnisse dieser Messungen im Kontext der Gesamtergebnisse diskutiert.

3.2 Ergebnisse

In Radioligandbindungsstudien an intakten HEK293-Zellen wurde die Selektivität diverser insulinotroper A-, B- und A+B-Liganden für die verschiedenen K_{ATP} -Kanal-Subtypen bestimmt. Dabei wurde geprüft, wie die porenbildende Untereinheit Kir6.1 bzw. Kir6.2 die Bindung der verschiedenen Ligandenklassen an den jeweiligen SUR verändert. Auch die Bedeutung von Serin 1237 in SUR1 bzw. der korrespondierenden Aminosäure Tyrosin 1206 in SUR2 für die Affinität der Inhibitoren war Gegenstand der Nachforschungen.

Der experimentelle Beitrag des Autors zu diesen umfangreichen Arbeiten bestand in der Untersuchung der kompetitiven Verdrängung von [^3H]GBC durch GBC bzw. REP an Kir6.1/SUR2B und Kir6.2/SUR2B in HEK293-Zellen, die diese Kanäle permanent (Kir6.1/SUR2B) oder transient (Kir6.2/SUR2B) exprimierten.

3.2.1 Unterscheidung von spezifisch und nicht-spezifisch gebundenem [^3H]GBC

Einen kritischen Punkt bei der Datenanalyse stellte die Unterscheidung von spezifischer und nicht-spezifischer Bindung/Verdrängung von [^3H]GBC dar. „Nicht-spezifisch“ meint in diesem Zusammenhang die Bindung des Radioliganden an endogene Bindungsstellen in HEK293 bzw. das Haften an Oberflächen inklusive der für die Filtration der Reaktionsansätze verwendeten Filter. Dagegen werden die Wechselwirkungen mit dem K_{ATP} -Kanal bzw. seinen Untereinheiten als „spezifisch“ bezeichnet.

Die Affinität von SUR2B für GBC ist deutlich geringer als die von SUR1, so dass die spezifische Komponente (Bindung an SUR2B) der Verdrängung nicht mehr ohne weiteres von den unspezifischen Komponenten (s.o.) zu trennen war. Dies wird in Abb. 3-1 deutlich, die die homologe Verdrängung von [^3H]GBC an Kir6.1/SUR2B-exprimierenden HEK293-Zellen zeigt.

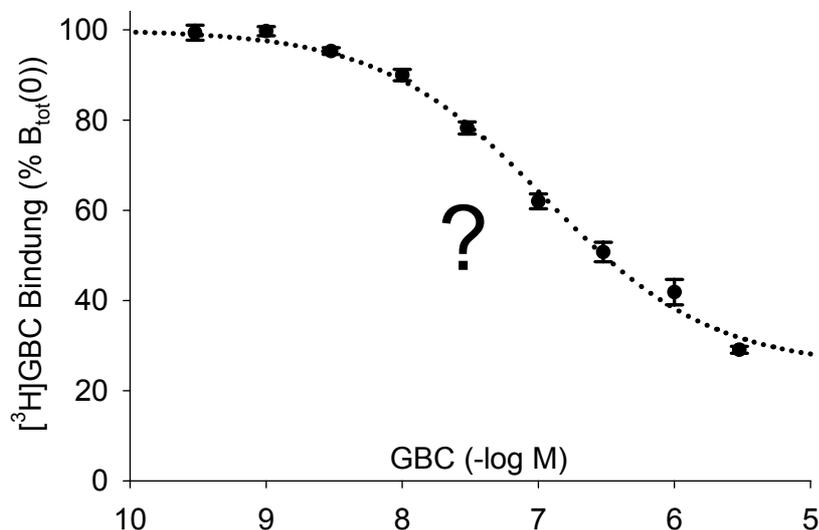


Abb. 3-1: Homologe Verdrängung von [^3H]GBC (5 nM) an Kir6.1/SUR2B-exprimierenden HEK293-Zellen. Aufgetragen ist B_{tot} in % von $B_{\text{tot}}(0)$, d.h. die Menge des gebundenen Radioliganden bei unterschiedlichen GBC-Konzentrationen in Relation zur [^3H]GBC-Bindung in Abwesenheit von unmarkiertem Liganden. Die Datenpunkte sind Mittelwerte aus zwölf Experimenten. Die gepunktete Kurve ist das Resultat einer Regression nach Gleichung 2-9, die durchgehend einen konstanten Betrag an nicht-spezifischer Bindung (NSB) voraussetzt. Der Hill-Koeffizient dieser Kurve von 0.7 ist jedoch ein Indiz dafür, dass diese Voraussetzung nicht erfüllt ist und es hier zu einer Überschneidung in der Verdrängung von spezifisch und nicht-spezifisch gebundenem [^3H]GBC kommt. Eine mathematische Auflösung der beiden Komponenten ist jedoch ohne weitere Informationen nicht möglich bzw. potentiell mit sehr großem Fehler behaftet.

Zur Lösung des Problems wurden zwei Strategien geprüft. Die Erste bestand darin, zunächst in Messungen an untransfizierten bzw. mit „leerem“ pcDNA3.1(+)-Vektor transfizierten HEK293 die Verdrängung von nicht-spezifisch gebundenem [³H]GBC durch unmarkiertes GBC bzw. REP zu quantifizieren, die Zweite in der Annahme, dass P1075 die [³H]GBC-Bindung von SUR2B vollständig verdrängt (Hambrock et al., 2001; Löffler-Walz et al., 2002). Ersteres, d.h. die Verdrängung von nicht-spezifisch gebundenem [³H]GBC durch unmarkiertes GBC bzw. REP an untransfizierten bzw. mit „leerem“ pcDNA3.1(+)-Vektor transfizierten Zellen, ist in Abb. 3-2 zu sehen.

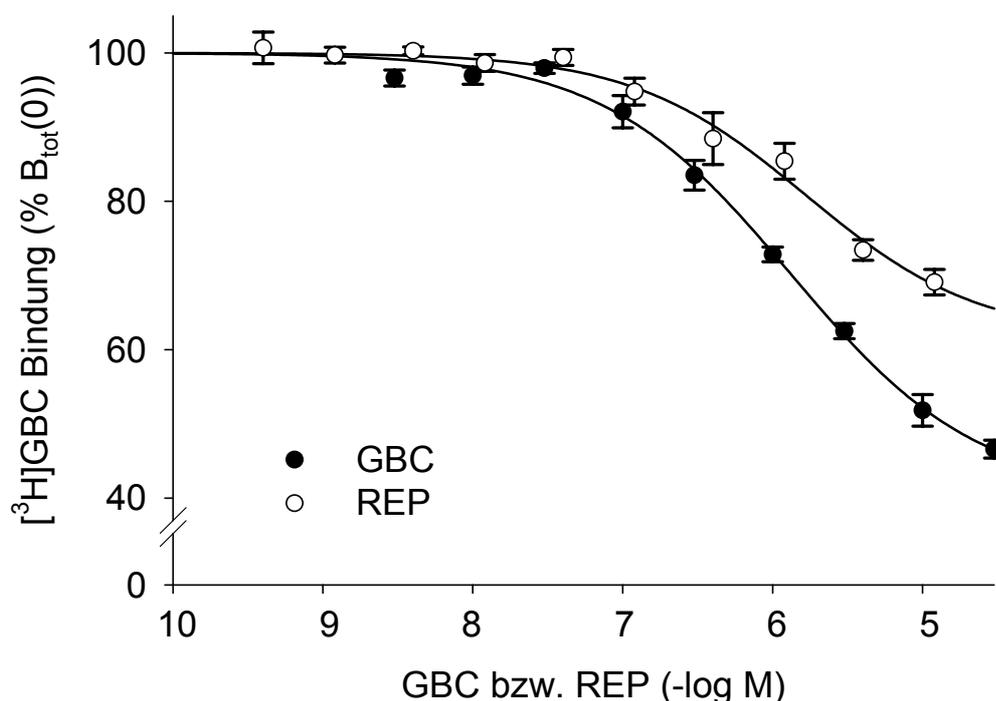


Abb. 3-2: Homologe Verdrängung von [³H]GBC (5 nM) von endogenen „nicht-spezifischen“ Bindungsstellen. Aufgetragen ist B_{tot} in % von $B_{tot}(0)$, d.h. die Menge des gebundenen Radioliganden bei unterschiedlichen GBC- bzw. REP-Konzentrationen in Relation zur [³H]GBC-Bindung in Abwesenheit von unmarkiertem Liganden. Die Datenpunkte sind Mittelwerte aus drei (GBC) bzw. acht (REP) Experimenten an untransfizierten bzw. mit leerem pcDNA3.1(+)-Vektor transfizierten HEK293-Zellen. Die nicht-lineare Regression erfolgte gemäß der Gleichung

$$B_{tot} = NSB1(0) \cdot \frac{1}{1 + 10^{n_H \cdot (pIC_{50} - px)}} + NSB2, \text{ wobei } NSB1 \text{ den verdrängbaren Teil der nicht-}$$

spezifischen Bindung darstellt, NSB2 den bei den eingesetzten GBC- bzw. REP-Konzentration nicht-verdrängbaren Teil ($pIC_{50} = -\lg IC_{50}$ und analog $px = -\lg x$ mit $x = [GBC]_0$ bzw. $[REP]_0$). Ergebnis: GBC: $n_H = 0.69 \pm 0.06$, $pIC_{50} = 5.88 \pm 0.09$; REP: $n_H = 0.75 \pm 0.15$, $pIC_{50} = 5.78 \pm 0.24$. B_{max} , die Anzahl an endogenen GBC-Bindungsstellen mit $pIC_{50} = 5.88$ ($K_D = 1.3 \mu M$) relativ zur Proteinmenge, betrug ca. 13 pmol/mg (berechnet nach Gleichung 2-10).

Die Analyse aus Abb. 3-2 ermöglichte nun, in Gleichung 3-1 und Gleichung 3-2, die eine Erweiterung von Gleichung 2-9 darstellen, die Parameter für die Verdrängung von nicht-spezifisch gebundenem [³H]GBC durch unmarkiertes GBC bzw. REP festzusetzen:

$$B_{tot} = B_s(0) \cdot \frac{1}{1+10^{(pIC_{50}-p[GBC]_0)}} + NSB1(0) \cdot \frac{1}{1+10^{0.69 \cdot (5.88-p[GBC]_0)}} + NSB2 \quad \text{Gleichung 3-1}$$

$$B_{tot} = B_s(0) \cdot \frac{1}{1+10^{(pIC_{50}-p[REP]_0)}} + NSB1(0) \cdot \frac{1}{1+10^{0.75 \cdot (5.78-p[REP]_0)}} + NSB2 \quad \text{Gleichung 3-2}$$

Die erste Komponente stellt jeweils die Abnahme der spezifischen Bindung B_s mit steigender Ligandkonzentration dar und lässt sich mit einem Hill-Koeffizienten von $n_H := 1$ beschreiben. NSB1 ist der Anteil der nicht-spezifischen Bindung dessen Abhängigkeit von der Konzentration an unmarkiertem Liganden in Abb. 3-2 bestimmt wurde. Die entsprechenden Parameter wurden für obige Gleichungen festgesetzt. Bei NSB2 handelt es sich um eine zweite Komponente der nicht-spezifischen Bindung, die jedoch im Gegensatz zu NSB1 durch experimentell relevante Konzentrationen an unmarkiertem Liganden nicht beeinflusst wird. Sie beruht auf der [³H]GBC-Bindung an noch wesentlich niedriger affine endogene Bindungsstellen und auf nicht ganz vollständiger Entfernung des proteinungebundenen Radioliganden bei der Filtration.

Strategie 2, der andere Weg, zwischen spezifischer und nicht-spezifischer Bindung zu differenzieren, nutzte die hochspezifische Verdrängung von [³H]GBC (an SUR2) durch den Öffner P1075 (Hambrock et al., 2001). Hierzu wurde einzelnen Bindungsansätzen statt unmarkiertem GBC oder REP 100 μ M P1075 zugesetzt.

Für die Daten aus Abb. 3-1 (homologe Verdrängung von [³H]GBC an Kir6.1/SUR2B-exprimierenden HEK293-Zellen) wurden zwei Regressionen nach Gleichung 3-1 durchgeführt, das eine Mal bei freiem $B_s(0)$, das andere Mal wurde $B_s(0)$ festgesetzt als die durch P1075 verdrängbare [³H]GBC-Bindung. Die resultierenden Regressionskurven sind in Abb. 3-3 dargestellt und weisen für Amplitude und pIC_{50} der spezifischen Bindung recht ähnliche Werte auf (vgl. Text zu Abb. 3-3).

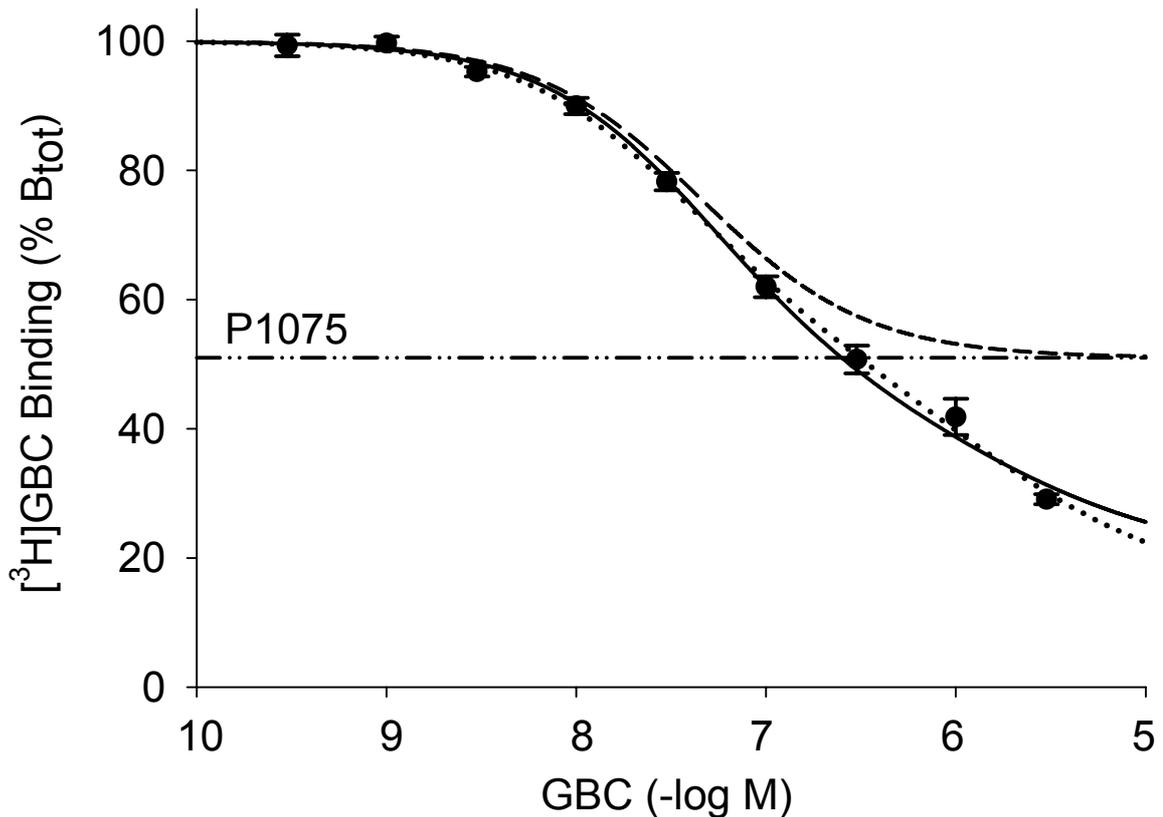


Abb. 3-3: Homologe Verdrängung von $[^3\text{H}]\text{GBC}$ (5 nM) an Kir6.1/SUR2B-exprimierenden HEK293-Zellen. Aufgetragen ist B_{tot} in % von $B_{\text{tot}}(0)$, d.h. die Menge des gebundenen Radioliganden bei unterschiedlichen GBC-Konzentrationen in Relation zur $[^3\text{H}]\text{GBC}$ -Bindung in Abwesenheit von unmarkiertem Liganden. Die Datenpunkte sind Mittelwerte aus zwölf Experimenten. Die gepunktete und die durchgezogene Kurve beruhen beide auf Regression nach Gleichung 3-1. Im Fall der gepunkteten Kurve wurde die Amplitude der spezifischen Bindung ($B_s(0)$) frei gelassen, d.h. sie wurde durch die Regression berechnet als $41 \pm 3 \% B_{\text{tot}}(0)$ (mit $\text{NSB1}(0) = 47 \pm 6 \%$ u. $\text{NSB2} = 13 \pm 3 \%$). Dagegen wurde bei der durchgezogenen Kurve $B_s(0) = 49 \% B_{\text{tot}}(0)$ festgesetzt, entsprechend der durch P1075 erzielten Verdrängung (markiert durch die horizontale Linie bei $51 \% B_{\text{tot}}(0)$). $\text{NSB1}(0)$ und NSB2 wurden hier zu $32 \pm 3 \%$ und $19 \pm 2 \%$ bestimmt. Für diese Regression stellt die gestrichelte Kurve die Komponente der spezifischen Bindung dar, mit einem pIC_{50} von 7.33 ± 0.06 . Dieser Wert liegt nahe bei dem für ein nicht-vorgegebenes $B_s(0)$ ermittelten pIC_{50} von 7.48 ± 0.08 ($\Delta\text{pIC}_{50} = 0.15 \pm 0.10$; $10^\Delta = 1.41$ (0.9;2.2)).

Ein vergleichbares Bild ergibt das analoge Verfahren (d.h. Regression nach Gleichung 3-2 mit freiem bzw. durch P1075 definiertem $B_s(0)$) für die $[^3\text{H}]\text{GBC}$ -Verdrängung durch REP (vgl. Abb. 3-4):

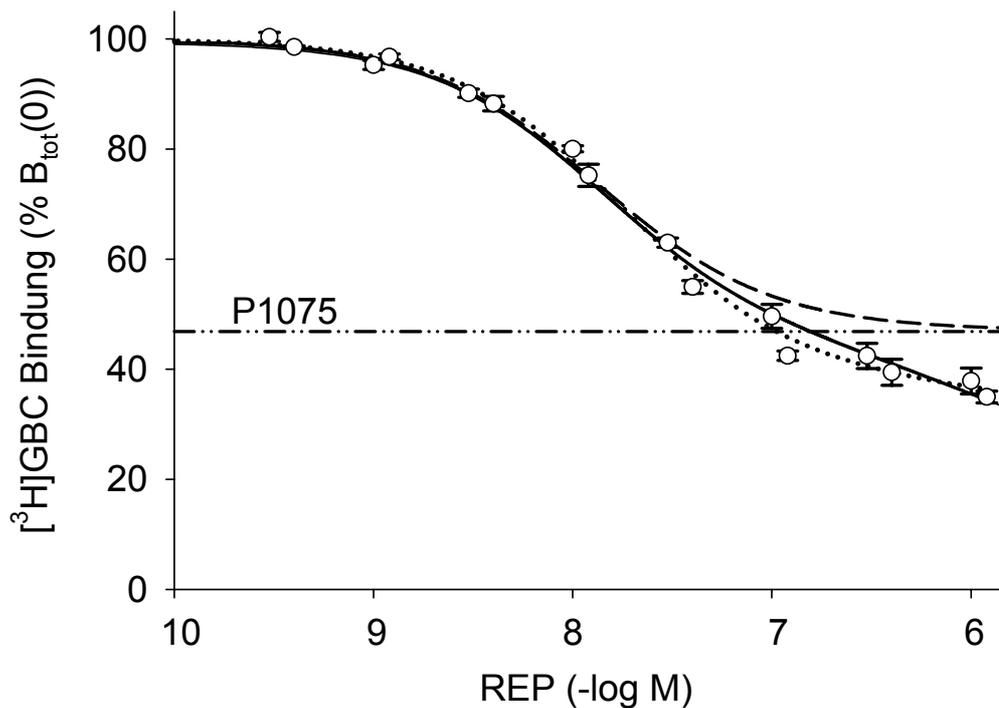


Abb. 3-4: Heterologe Verdrängung von $[^3\text{H}]\text{GBC}$ (5 nM) durch REP an Kir6.1/SUR2B-exprimierenden HEK293-Zellen. Aufgetragen ist B_{tot} in % von $B_{\text{tot}}(0)$, d.h. die Menge des gebundenen Radioliganden bei unterschiedlichen REP-Konzentrationen in Relation zur $[^3\text{H}]\text{GBC}$ -Bindung in Abwesenheit von unmarkiertem Liganden. Die Datenpunkte sind Mittelwerte aus acht Experimenten. Die gepunktete und die durchgezogene Kurve beruhen beide auf Regression nach Gleichung 3-2. Im Fall der gepunkteten Kurve wurde die Amplitude der spezifischen Bindung ($B_s(0)$) frei gelassen, d.h. sie wurde durch die Regression berechnet als $61 \pm 3\%$ $B_{\text{tot}}(0)$ (mit $\text{NSB1}(0) = 7 \pm 8\%$ u. $\text{NSB2} = 32 \pm 5\%$). Dagegen wurde bei der durchgezogenen Kurve $B_s(0) = 53\%$ $B_{\text{tot}}(0)$ festgesetzt, entsprechend der durch P1075 erzielten Verdrängung (markiert durch die horizontale Linie bei 47% $B_{\text{tot}}(0)$). $\text{NSB1}(0)$ und NSB2 wurden hier zu $29 \pm 5\%$ und $18 \pm 4\%$ bestimmt. Für diese Regression stellt die gestrichelte Kurve die Komponente der spezifischen Bindung dar, mit einem pIC_{50} von 7.85 ± 0.06 . Dieser Wert liegt nahe bei dem für ein nicht-vorgegebenes $B_s(0)$ ermittelten pIC_{50} von 7.73 ± 0.05 ($\Delta\text{pIC}_{50} = 0.12 \pm 0.08$; $10^{\Delta} = 1.32$ (0.9;1.9)).

Dank der Kontrolluntersuchungen an untransfizierten Zellen konnte somit bestätigt werden, dass die Bestimmung der nicht-spezifischen (und somit auch der spezifischen) Bindung mit Hilfe von P1075 ein zulässiges Verfahren darstellt. Dies entspricht den früher erhobenen Befunden mit der Mutanten SUR2B(Y1206S) (Hambrock et al., 2001).

In der Praxis wurde Strategie 2 bevorzugt, und es wurden für die Regression nur die Datenpunkte von Inhibitorkonzentrationen verwendet, bei denen keine nennenswerte Verdrängung von nicht-spezifischer $[^3\text{H}]\text{GBC}$ -Bindung beobachtet wurde. Der in diesem Bereich konstante NSB wurde als der durch 100 μM P1075 nicht-verdrängbare Teil der $[^3\text{H}]\text{GBC}$ -Bindung festgesetzt und die Regression (mit $n_H := 1$) nach Gleichung 2-9 durchgeführt. Diese Methode wird in Abb. 3-5 für GBC, in Abb. 3-6 für REP demonstriert.

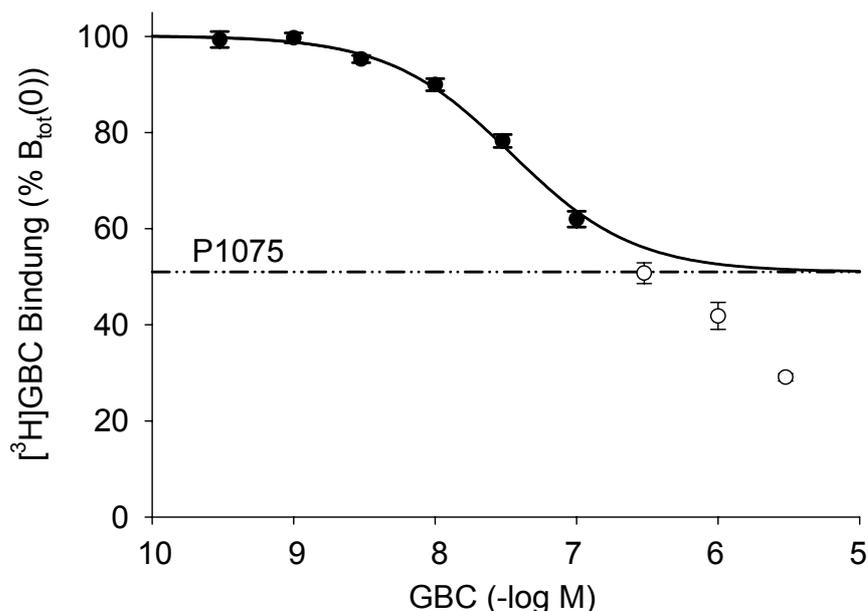


Abb. 3-5: Homologe Verdrängung von [³H]GBC (5 nM) an Kir6.1/SUR2B-exprimierenden HEK293-Zellen. Bei dem Datensatz handelt es sich um den selben wie in Abb. 3-1 und Abb. 3-3. Die durch 100 μM P1075 erzielte Verdrängung von [³H]GBC ist durch die horizontale Linie bei 51 % B_{tot}(0) markiert und wurde für die Regression (nach Gleichung 2-9 mit n_H := 1) als NSB festgesetzt. Nur die durch ausgefüllte Kreise dargestellten Datenpunkte wurden für die Regression berücksichtigt. Der so ermittelte pIC₅₀ beträgt 7.46 ± 0.03 und liegt somit im Bereich der in Abb. 3-3 nach den dort beschriebenen Verfahren erhaltenen Werte (etwas näher an der Regression mit freiem B_s(0)).

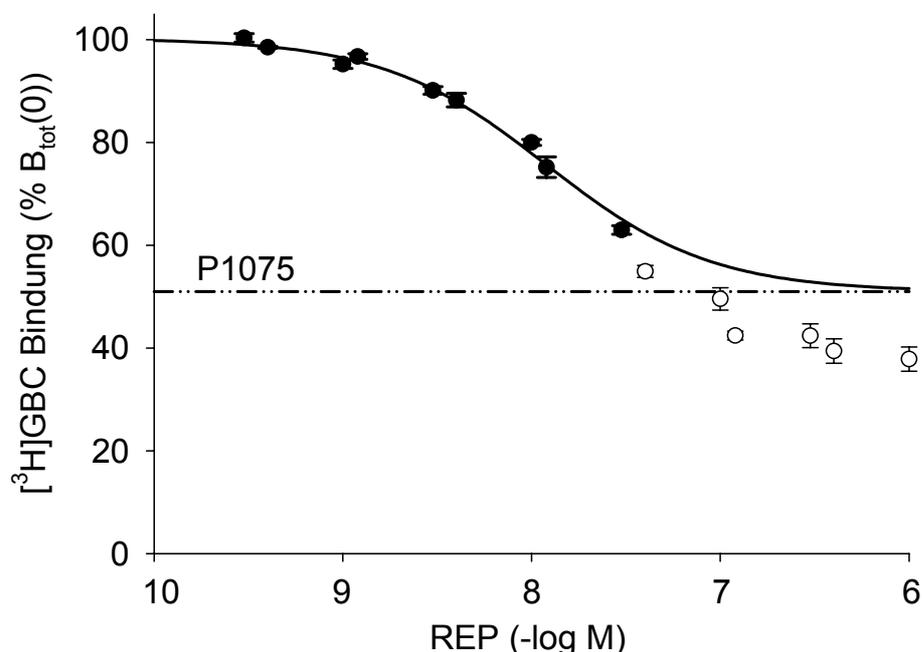


Abb. 3-6: Heterologe Verdrängung von [³H]GBC (5 nM) an Kir6.1/SUR2B-exprimierenden HEK293-Zellen. Bei dem Datensatz handelt es sich um den selben wie in Abb. 3-4. Die durch 100 μM P1075 erzielte Verdrängung von [³H]GBC ist durch die horizontale Linie bei 47 % B_{tot}(0) markiert und wurde für die Regression (nach Gleichung 2-9 mit n_H := 1) als NSB festgesetzt. Nur die durch ausgefüllte Kreise dargestellten Datenpunkte wurden für die Regression berücksichtigt. Der so ermittelte pIC₅₀ beträgt 7.84 ± 0.03 und liegt somit im Bereich der in Abb. 3-4 nach den dort beschriebenen Verfahren erhaltenen Werte (etwas näher an der Regression mit festgesetztem B_s(0)).

3.2.2 Verdrängung von [³H]GBC durch GBC und REP an Kir6.1/SUR2B

Zur möglichst präzisen Bestimmung der K_D - und K_I -Werte wurde jedes Konkurrenzexperiment mehrfach wiederholt. Um die Ergebnisse anschaulich darzustellen, wurde am Schluss für jede getestete Inhibitorkonzentration die in den verschiedenen Einzelexperimenten beobachtete [³H]GBC-Verdrängung (in % $B_{\text{tot}}(0)$) gemittelt und eine gemeinsame Regressionskurve erstellt. Für die Verdrängung von [³H]GBC durch GBC und REP an Kir6.1/SUR2B wurden diese Graphen bereits im Zuge der Beschreibung der Bestimmung von spezifischer und nicht-spezifischer Bindung präsentiert (Abb. 3-5 und Abb. 3-6). Für die „endgültige“ Auswertung wurde jedoch der Mittelwert aus den in den Einzelexperimenten bestimmten pK_D - bzw. pK_I -Werten gebildet. Dieses Ergebnis ist in Tab. 3-1 gezeigt.

Tab. 3-1: Verdrängung von [³H]GBC durch GBC und REP an Kir6.1/SUR2B (intakte HEK293-Zellen): Gemittelte Ergebnisse der Einzelexperimente (mit SEM).

	n^1	[³ H]GBC (nM)	$B_s(0)$ (% $B_{\text{tot}}(0)$)	$B_s(0)$ (pmol/mg)	B_{max} (pmol/mg) ²	pK_D bzw. pK_I	K_D bzw. K_I ³ (nM)
GBC	17	5.0 ± 0.1	50 ± 1	0.15 ± 0.02	1.13 ± 0.15	7.49 ± 0.04	32.4 (26.8; 38.7)
REP	8	4.9 ± 0.1	53 ± 2	0.15 ± 0.02	1.21 ± 0.14	7.81 ± 0.03	15.5 (13.5; 17.8)

¹: Zahl der Einzelexperimente. ²: Maß für die Expression (von SUR2B) in pmol spezifisch gebundenes [³H]GBC pro mg Gesamtprotein, berechnet nach Gleichung 2-8. ³: in Klammern das 95%-Konfidenzintervall.

3.2.3 Verdrängung von [³H]GBC durch GBC und REP an Kir6.2/SUR2B

In Abb. 3-7 (GBC) und Abb. 3-8 (REP) sind die jeweiligen Einzelexperimente zur Verdrängung von [³H]GBC an Kir6.2/SUR2B für eine gemeinsame Regressionskurve vereinigt (wie für Kir6.1/SUR2B in Kap. 3.2.2 erläutert).

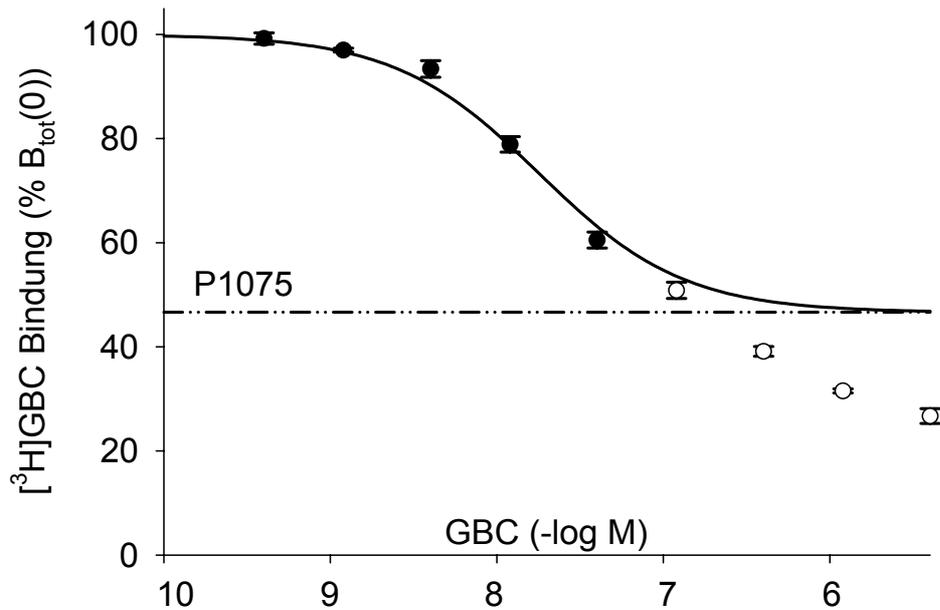


Abb. 3-7: Homologe Verdrängung von $[^3\text{H}]\text{GBC}$ (3 nM) an Kir6.2/SUR2B-exprimierenden HEK293-Zellen. B_{tot} (Mittelwerte aus drei Experimenten) ist analog zu Abb. 3-5 in % von $B_{\text{tot}}(0)$ in Abhängigkeit von der GBC-Konzentration aufgetragen. Die durch 100 μM P1075 erzielte Verdrängung von $[^3\text{H}]\text{GBC}$ ist durch die horizontale Linie bei 47 % $B_{\text{tot}}(0)$ markiert und wurde für die Regression (nach Gleichung 2-9 mit $n_{\text{H}} := 1$) als NSB festgesetzt. Nur die durch ausgefüllte Kreise dargestellten Datenpunkte wurden für die Regression berücksichtigt. Der pIC_{50} der Kurve beträgt 7.75 ± 0.06 .

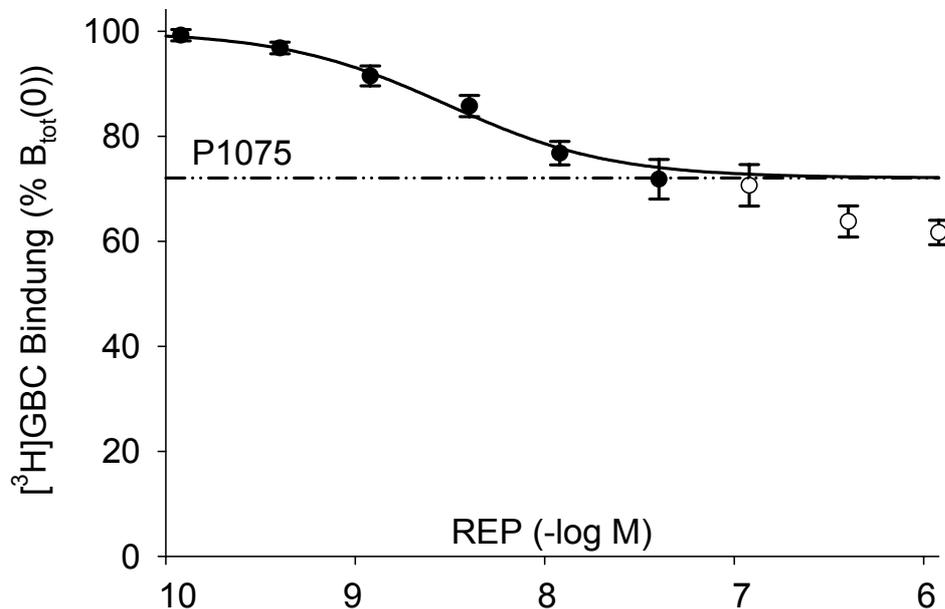


Abb. 3-8: Homologe Verdrängung von $[^3\text{H}]\text{GBC}$ (3 nM) an Kir6.2/SUR2B-exprimierenden HEK293-Zellen. B_{tot} in % von $B_{\text{tot}}(0)$ ist in Abhängigkeit von der REP-Konzentration aufgetragen (jeweils Mittelwert aus neun Experimenten). Die durch 100 μM P1075 erzielte Verdrängung von $[^3\text{H}]\text{GBC}$ ist durch die horizontale Linie bei 72 % $B_{\text{tot}}(0)$ markiert und wurde für die Regression (nach Gleichung 2-9 mit $n_{\text{H}} := 1$) als NSB festgesetzt. Die Gründe für die recht mäßige Expression des Kanals in dieser Versuchsreihe (vgl. auch B_{max} in Tab. 3-2), die ihren Ausdruck in dem im Vergleich zu Abb. 3-7 deutlich niedrigeren Anteil der spezifischen Bindung $B_{\text{s}}(0)$ findet, liegen vermutlich bei (nicht mehr nachvollziehbaren) Unregelmäßigkeiten im Bereich der Zellkultur/Transfektion. Nur die durch ausgefüllte Kreise dargestellten Datenpunkte wurden für die Regression berücksichtigt. Der pIC_{50} der Kurve beträgt 8.52 ± 0.05 .

Analog zu den Experimenten an Kir6.1/SUR2B (Kap. 3.2.2) wurden die „endgültigen“ K_D - und K_I -Werte durch Bildung des arithmetischen Mittels aus den in den Einzelexperimenten ermittelten pK_D - bzw. pK_I -Werten berechnet (vgl. Tab. 3-2).

Tab. 3-2: Verdrängung von [3 H]GBC durch GBC und REP an Kir6.2/SUR2B: Gemittelte Ergebnisse der Einzelexperimente (mit SEM).

	n^1	[3 H]GBC (nM)	$B_s(0)$ (% $B_{tot}(0)$)	$B_s(0)$ (pmol/mg)	B_{max} (pmol/mg) 2	pK_D bzw. pK_I	K_D bzw. K_I 3 (nM)
GBC	3	2.7 ± 0.1	53 ± 4	0.06 ± 0.01	0.46 ± 0.13	7.83 ± 0.12	14.8 (8.5; 25.7)
REP	9	3.2 ± 0.2	28 ± 2	$0.03 \pm 3 \cdot 10^{-3}$	0.15 ± 0.02	8.55 ± 0.13	2.8 (1.5; 5.1)

1 : Zahl der Einzelexperimente. 2 : Maß für die Expression (von SUR2B) in pmol spezifisch gebundenes [3 H]GBC pro mg Gesamtprotein, berechnet nach Gleichung 2-8. 3 : in Klammern das 95-%-Konfidenzintervall.

3.3 Diskussion

3.3.1 Einfluss der porenbildenden Untereinheit auf die Bindung verschiedener Liganden (-klassen)

Vergleicht man die Daten für Kir6.1/SUR2B (Tab. 3-1) und Kir6.2/SUR2B (Tab. 3-2), stellt man fest, dass die Bindungsaffinitäten von GBC und REP u.a. auch durch die Kir-Untereinheit beeinflusst werden. So ist die Affinität von Glibenclamid für Kir6.1/SUR2B nur etwa halb so groß wie für Kir6.2/SUR2B. Um in den Bindungsexperimenten mit [3 H]GBC dennoch auch für Kir6.1/SUR2B ein ausreichend hohes Maß an spezifischer Bindung zu erzielen, musste für diesen Typ K_{ATP} -Kanal daher erst eine permanent transfizierte Zelllinie mit hoher Expressionsdichte generiert werden (vgl. Kap. 2.7.5).

Der Einfluss des Kir beschränkt sich jedoch nicht auf GBC und REP, sowie obige Kanalsubtypen. Tatsächlich konnte für sämtliche in unserer Abteilung untersuchten insulinotropen Substanzen (vgl. Abb. 1-10) gezeigt werden, dass ihre Affinität zu SUR1 bzw. SUR2A(YS) durch Kir6.2 und ihre Affinität zu SUR2B(YS) durch Kir6.1 (Ausnahme: ULDF 9) signifikant verbessert wird (vgl. Tab. 3-3). Die YS-Mutation war für diesen Vergleich

Voraussetzung, da in Abwesenheit von Kir die Affinität von SUR2 zu GBC zu niedrig ist, um einen für eine zuverlässige Datenauswertung erforderlichen Anteil an spezifischer [^3H]GBC-Bindung zu erzielen (vgl. Kap. 1.2.4.1).

Tab. 3-3: Inhibition der [^3H]GBC-Bindung an verschiedene SUR-Subtypen bzw. rekombinante K_{ATP} -Kanäle in intakten HEK293-Zellen durch Sulfonylharnstoffe und Glinide (Daten aus Winkler et al., 2007). Die Nummerierung von 1-10 bezieht sich auf die Korrelationen in Abb. 3-9 u. Abb. 3-10.

Insulintrop	Typ Ligand	Nr.	pK _I (\pm SEM)		
			SUR1	SUR2A(YS)	SUR2B(YS)
Glibenclamid (GBC)	A+B	1	8.84 \pm 0.02	8.30 \pm 0.03	8.18 \pm 0.05
Glimepirid	A+B	2	8.67 \pm 0.03	7.93 \pm 0.10	7.93 \pm 0.05
Gliquidon	A+B	3	8.05 \pm 0.03	7.40 \pm 0.06	7.25 \pm 0.03
Gliclazid	A	4	5.87 \pm 0.04	5.39 \pm 0.05	5.31 \pm 0.02
Glibornurid	A	5	5.80 \pm 0.07	5.33 \pm 0.01	5.31 \pm 0.09
Nateglinid	A	6	5.98 \pm 0.03	5.61 \pm 0.02	5.43 \pm 0.08
Meglitinid	B	7	4.75 \pm 0.03	4.70 \pm 0.04	5.04 \pm 0.03
UL-DF 9	B	8	3.95 \pm 0.04	4.41 \pm 0.07	4.62 \pm 0.05
Repaglinid (REP)	B	9	7.04 \pm 0.04	7.33 \pm 0.06	7.30 \pm 0.06
(-)-AZ-DF 265	B	10	5.86 \pm 0.03	5.90 \pm 0.05	5.89 \pm 0.06
pK _I (\pm SEM)					
	Kir6.2/ SUR1	Kir6.2/ SUR2A	Kir6.1/ SUR2B	Kir6.2/ SUR2A(YS)	Kir6.1/ SUR2B(YS)
Glibenclamid (GBC)	9.35 \pm 0.08	8.21 \pm 0.02	7.49 \pm 0.04	9.28 \pm 0.06	8.75 \pm 0.08
Glimepirid	9.24 \pm 0.02	7.98 \pm 0.02	7.15 \pm 0.02	9.16 \pm 0.05	8.73 \pm 0.01
Gliquidon	8.51 \pm 0.05	6.93 \pm 0.02	6.06 \pm 0.04	8.19 \pm 0.02	7.52 \pm 0.07
Gliclazid	6.16 \pm 0.06	5.13 \pm 0.01	4.14 \pm 0.04	6.20 \pm 0.07	5.76 \pm 0.06
Glibornurid	6.44 \pm 0.02	5.17 \pm 0.02	5.11 \pm 0.10	6.28 \pm 0.04	5.90 \pm 0.02
Nateglinid	6.46 \pm 0.01	4.99 \pm 0.04	4.93 \pm 0.04	6.04 \pm 0.02	5.69 \pm 0.03
Meglitinid	5.50 \pm 0.03	6.08 \pm 0.05	5.67 \pm 0.06	5.53 \pm 0.05	5.25 \pm 0.02
UL-DF 9	4.38 \pm 0.01	5.52 \pm 0.11	5.06 \pm 0.03	4.67 \pm 0.05	4.48 \pm 0.01
Repaglinid (REP)	9.14 \pm 0.04	8.81 \pm 0.02	7.81 \pm 0.03	9.08 \pm 0.02	7.95 \pm 0.01
(-)-AZ-DF 265	8.43 \pm 0.06	7.60 \pm 0.02	6.58 \pm 0.05	7.37 \pm 0.05	6.26 \pm 0.03

An den einzelnen SUR-Subtypen fällt jeweils die Affinitätserhöhung durch die Kir-Untereinheit für A- und A+B-Liganden (vgl. Kap. 1.2.4.1) sehr ähnlich aus (vgl. Tab. 3-3, Tab. 3-4 und Abb. 3-9). Im Fall der A-Liganden kommt die Affinitätsänderung unerwartet, gilt der N-Terminus des Kir doch als Bestandteil der B-Bindungsstelle (Vila-Carriles et al., 2007). Eine mögliche Interpretation liegt in der Annahme, dass A- und B-Bindungsstelle überlappen und in diesem Bereich die Bindung der allen getesteten Verbindungen gemeinsamen negative Ladung und/oder des benachbarten Phenylrings erfolgt. Der Kir-N-Terminus könnte Bestandteil dieser Bindungsstelle sein oder mit ihr allosterisch wechselwirken.

Unter den B-Liganden ist die Kir-bedingte Affinitätsverbesserung für Meglitinid und UL-DF 9 ähnlich wie bei den A- und A+B-Liganden. An Kir6.1/SUR2B(YS) gilt dies auch für (-)-AZ-DF 265 und REP, an SUR2A(YS) und besonders SUR1 dagegen erfahren sie durch Kir6.2 eine weit überdurchschnittliche Affinitätserhöhung (vgl. Abb. 3-9), was auf den Piperidinosubstituenten (vgl. Abb. 1-10) zurückgeführt wird, der diesen beiden Substanzen eine Sonderstellung unter den B-Liganden verleiht (Hansen et al., 2005; Winkler et al., 2007). Möglicherweise interagiert der N-Terminus von Kir6.2 als Bestandteil der B-Bindungsstelle mit dieser Piperidinogruppe, sei es direkt oder durch Induktion einer Konformationsänderung in dem die Piperidinogruppe aufnehmenden Bereich der B-Bindungstasche.

Die Co-Expression mit Kir6.2 bewirkt einen stärkeren Effekt als mit Kir6.1. Dies zeigt nicht nur der eingangs des Kapitels erwähnte Vergleich von GBC und REP an Kir6.1/SUR2B und Kir6.2/SUR2B. Auch dass die K_I -Werte der verschiedenen Inhibitoren an Kir6.2/SUR2A(YS) im Vergleich zu Kir6.1/SUR2B(YS) niedriger (und somit die Affinitäten höher) sind, während sie für SUR2A(YS) und SUR2B(YS) (also in Abwesenheit von Kir) im wesentlichen identisch sind, spricht dafür, dass die Kopplung von Kir6.2 mit SUR2 weitreichender ist, als bei Kir6.1. Für die Piperidino-Glinide (-)-AZ-DF 265 und REP wirken sich diese Unterschiede besonders stark aus.

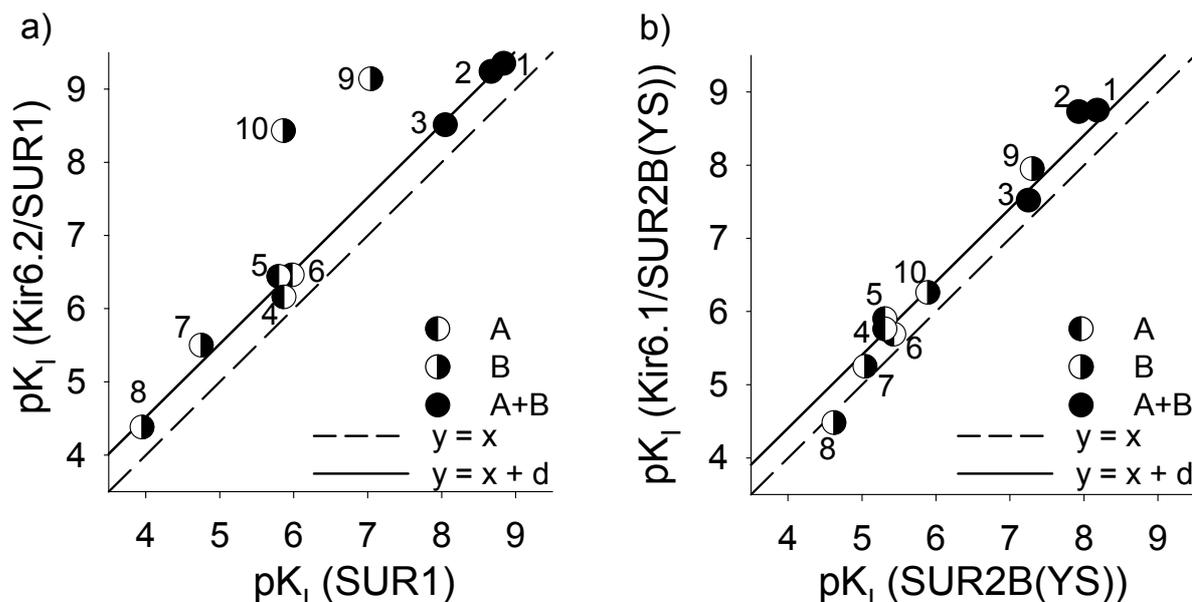


Abb. 3-9: Korrelationsanalyse zur Illustration des Effekts von Kir6.2 (a) bzw. Kir6.1 (b) auf die Affinität diverser Liganden (zur Nummerierung vgl. Tab. 3-3) zu SUR1 (a) bzw. SUR2B(YS) (b). Die gestrichelte 1. Winkelhalbierende des Koordinatensystems stellt die „Identitätslinie“ ($y = x$) dar. Bei der durchgezogenen Linie handelt es sich um eine Regressionsgerade der Steigung 1, deren Abstand zur Identitätslinie mit d bezeichnet wird ($y = x + d$). Die pK_i -Werte sind in Tab. 3-3, die Korrelationsdaten in Tab. 3-4 gelistet.

Tab. 3-4: Korrelationsanalyse zum Vergleich der Bindungsaffinitäten der Insulintrope für verschiedene K_{ATP} -Kanäle und Sulfonylharnstoffrezeptoren (SUR). Regressionsgeraden mit Steigung 1 wurden für die jeweils genannten Liganden erstellt und aus dem Abstand d dieser Geraden von der Identitätslinie ein Faktor f berechnet, der die Präferenz dieser Liganden zugunsten eines der beiden betrachteten Rezeptoren ausdrückt (vgl. auch Abb. 3-9 und Abb. 3-10). Die Korrelationsdaten sind entnommen aus Winkler et al., 2007 und beruhen auf den pK_i -Werten aus Tab. 3-3.

Rezeptoren (y vs. x)	Liganden (n) ¹	d ²	$f = 10^{\pm d}$ ($f > 1$)
Kir6.2/SUR1 vs. SUR1	alle außer 9 u. 10 (8)	0.52 ± 0.05	3.3 (2.6; 4.2)
Kir6.2/SUR2A(YS) vs. SUR2A(YS)	alle außer 9 u. 10 (8)	0.79 ± 0.11	6.8 (3.7; 10)
Kir6.1/SUR2B(YS) vs. SUR2B(YS)	alle (10)	0.41 ± 0.09	2.6 (1.7; 3.9)
SUR2A(YS) vs. SUR1	A u. (A+B) (6)	-0.54 ± 0.05	3.5 (2.8; 4.4)
SUR2B(YS) vs. SUR2A(YS)	alle (10)	0	-
Kir6.2/SUR2A(YS) vs. Kir6.2/SUR2A	A u. (A+B) (6)	1.12 ± 0.03	13 (11; 15)
Kir6.1/SUR2B(YS) vs. Kir6.1/SUR2B	A u. (A+B) (6)	1.25 ± 0.16	19 (9.1; 40)
Kir6.1/SUR2B(YS) vs. Kir6.2/SUR2A(YS)	alle außer 9 u. 10 (8)	-0.41 ± 0.05	2.6 (2.0; 3.2)
Kir6.2/SUR2A vs. Kir6.2/SUR1	A u. (A+B) (6)	-1.29 ± 0.08	19 (13; 28)
Kir6.1/SUR2B vs. Kir6.2/SUR1	A u. (A+B) (6)	-1.88 ± 0.16	76 (36; 160)
Kir6.1/SUR2B vs. Kir6.2/SUR2A	alle außer 5 u. 6 (8)	-0.79 ± 0.08	6.2 (4.2; 8.9)

¹: Art und Gesamtzahl (n) der für die Regressionsgerade verwendeten Liganden. ²: Abstand der Regressionsgeraden von der Identitätslinie (logarithmische Skala); $d \cdot 5.9$ ergibt die Differenz der freien Bindungsenergie (Affinität) in kJ/mol.

3.3.2 Auswirkung der Y1206S-Mutation in SUR2 auf die Affinität für A-, A+B- und B-Liganden

Der Austausch von Serin 1237 in der A-Bindungsstelle von SUR1 gegen Tyrosin (der korrespondierenden Aminosäure in SUR2) zieht den Verlust der Hochaffinitätsbindung von GBC und der Hochaffinitätskomponente der Kanalinhibition durch die A-Liganden Tolbutamid und Nateglinid nach sich (Ashfield et al., 1999; Chachin et al., 2003). Umgekehrt erhöht die YS-Mutation die Affinität der A- und A+B-Liganden für Kir6.2/SUR2A um durchschnittlich Faktor 13 (vgl. Tab. 3-4) und für Kir6.1/SUR2B um durchschnittlich Faktor 19 (vgl. Tab. 3-4 und Abb. 3-10). Daraus, dass SUR2A(YS) und SUR2B(YS) dabei nicht die K_T -Werte von SUR1 erreichen (vgl. Tab. 3-3), muss man schließen, dass noch weitere Aminosäuren entscheidend zur Bindung in der A-Bindungsstelle beitragen. Interessanterweise wirkt sich die YS-Mutation auch (wenngleich nur moderat) auf die Bindung der B-Liganden aus. So verringert sie die Affinität von UL-DF 9 und Meglitinid zu Kir6.1/SUR2B um den Faktor 3.8 bzw. 2.6 (vgl. Tab. 3-3 und Abb. 3-10). Noch geringer ist der Effekt auf die Piperidino-Glinide (-)-AZ-DF 265 (Verschlechterung um Faktor 2.1) und REP (Verbesserung um Faktor 1.4). Hieraus lassen sich im wesentlichen zwei Schlussfolgerungen ziehen: Erstens verändert die Y1206S-Mutation in der A-Bindungsstelle die Bindungstasche als Ganzes (d.h. auch die B-Bindungsstelle) oder zumindest den Teil der A-Bindungsstelle, der mit der B-Bindungsstelle überlappt. Zweitens spricht das heterogene Verhalten der B-Liganden für einen Aufbau der B-Bindungsstelle aus zwei Subkompartimenten, von denen eines durch alle B-Liganden besetzt wird, während das andere die Piperidinogruppe von (-)-AZ-DF 265 und REP aufnimmt.

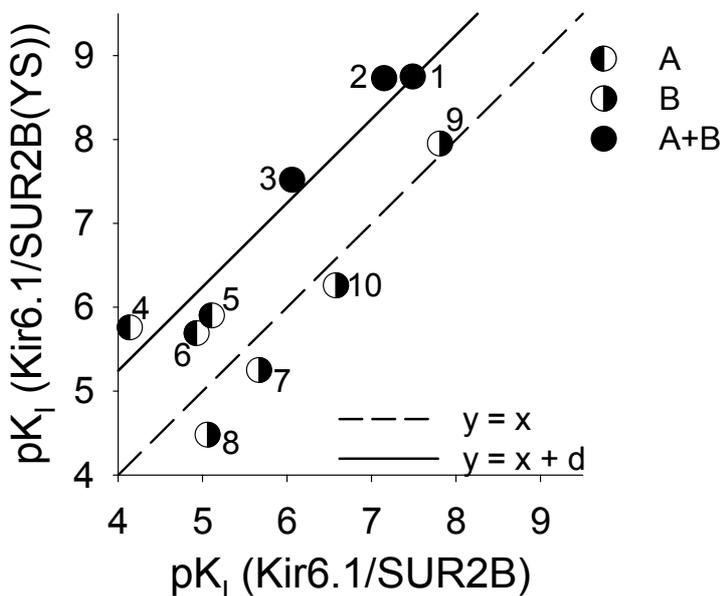


Abb. 3-10: Korrelationsanalyse zur Illustration des Effekts der Mutation Y1206S auf die Affinität diverser Liganden (zur Nummerierung vgl. Tab. 3-3) zu Kir6.1/SUR2B. Die gestrichelte 1. Winkelhalbierende des Koordinatensystems stellt die „Identitätslinie“ ($y = x$) dar. Bei der durchgezogenen Linie handelt es sich um eine Regressionsgerade der Steigung 1, deren Abstand zur Identitätslinie mit d bezeichnet wird ($y = x + d$). Die pK_T -Werte sind in Tab. 3-3, die Korrelationsdaten in Tab. 3-4 gelistet.

3.3.3 K_{ATP} -Kanal-Subtyp-Selektivität der Insulinotrope in Bindung und Elektrophysiologie

Verschiedene elektrophysiologische Experimente, Radioligandbindungsstudien und Photoaffinitätsmarkierungen führten zu dem Ergebnis, dass primär entscheidend für die Subtypspezifität einer insulinotropen Substanz ihre Wechselwirkungen mit der A-Bindungsstelle des jeweiligen SUR sind (Ashfield et al., 1999; Proks et al., 2002; Vila-Carriles et al., 2007). Auch ein Vergleich der Affinitäten von GBC und Meglitinid, welches dem B-Teil von GBC entspricht (vgl. Abb. 1-10), kommt zu diesem Ergebnis. So ist die Affinität von GBC an Kir6.2/SUR1 ca. 7100 mal höher als die von Meglitinid, an Kir6.2/SUR2A dagegen nur 130 mal höher (vgl. Tab. 3-3). Einen wichtigen Beitrag für die zum pankreatischen K_{ATP} -Kanal höhere Affinität der A- und A+B-Liganden leistet Serin 1237 in der A-Bindungsstelle des SUR1, an dessen Position SUR2 ein Tyrosin aufweist (vgl. 1.2.4.1).

Vergleicht man die in den Bindungsstudien ermittelten Affinitäten von z.B. GBC und REP mit ihrer Potenz in elektrophysiologischen Messungen (Stephan et al., 2006b), stellt man fest, dass die IC_{50} der K_{ATP} -Strom-Inhibition am Kir6.2/SUR1 gegenüber der Bindungskurve um einen Faktor von ≥ 2.4 (REP) bzw. ≥ 9 (GBC) nach links verschoben ist. Am vaskulären und ventrikulär-myocardialen Kanal dagegen handelt es sich um eine Rechtsverschiebung um einen Faktor < 2 (Kir6.1/SUR2B) bzw. 8-10 (Kir6.2/SUR2A). D.h. die tatsächliche „funktionelle“ Selektivität von GBC und REP für den pankreatischen K_{ATP} -Kanal ist deutlich größer, als es die Bindungsdaten suggerieren (vgl. Tab. 3-5). Das erklärt, warum der Einsatz dieser Verbindungen in der Therapie von Diabetes trotz teilweise anders lautender Studienergebnisse (Simpson et al., 2006) vermutlich kein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko mit sich bringt (UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group, 1998; Stevens et al., 2004).

Tab. 3-5: Selektivität von GBC und REP für den pankreatischen gegenüber ventrikulär-myocardialem und vaskulärem K_{ATP} -Kanal, bestimmt in Bindungsstudien und elektrophysiologischen Experimenten. Die Zahlen stellen den Quotienten der K_I - (Bindung) bzw. IC_{50} -Werte (Elektrophysiologie) der jeweils verglichenen Kanäle dar. (Daten aus Stephan et al., 2006b)

	Kir6.2/SUR2A vs. Kir6.2/SUR1		Kir6.1/SUR2B vs. Kir6.2/SUR1	
	Bindung	Elektrophysiologie	Bindung	Elektrophysiologie
GBC	14	≥ 1000	72	≥ 1000
REP	2	≥ 30	21	≥ 100

Die Ursachen für die Diskrepanz zwischen den Bindungsaffinitäten und den Daten aus der Elektrophysiologie sind vielschichtig. Wie in der Einleitung erläutert (vgl. Kap. 1.2.1) setzt sich der K_{ATP} -Kanal aus vier Kir- und vier SUR-Untereinheiten zusammen und besitzt somit (mindestens) vier Bindungsstellen für GBC und andere insulinotrope Substanzen. Die Literatur (Dörschner et al., 1999; Russ et al., 2009) beschreibt, dass die Besetzung von einer der vier Bindungsstellen durch GBC ausreicht, um eine Kanalschließung zu induzieren. Hieraus folgt rechnerisch eine gegenüber der K_D um den Faktor 5.3 geringere IC_{50} für die Hemmung des K_{ATP} -Stroms (Russ et al., 1999). Dies erklärt jedoch keine Linksverschiebung der Inhibitionskurve um einen Faktor ≥ 9 und erst recht keine Rechtsverschiebung wie man sie an Kir6.2/SUR2A und Kir6.1/SUR2B beobachtet (s.o.). Man muss daher komplexere allosterische Einflüsse annehmen, die dazu führen, dass die Transduktion der Ligandbindung in eine Schließung des K_{ATP} -Kanals für Kir6.2/SUR1 besonders effizient verläuft, während sie für die kardiovaskulären K_{ATP} -Kanäle erschwert ist. Von Bedeutung ist in diesem Zusammenhang die unterschiedliche Wirkung von Magnesiumnukleotiden auf SUR1- und SUR2-regulierte Kanäle. So verbessert MgADP die Inhibition des pankreatischen Kanals durch insulinotrope Liganden, während die Inhibition von Kir6.2/SUR2 nicht beeinflusst oder sogar abgeschwächt wird (Gribble et al., 1998; Reimann et al., 2003).

Die Konzentrationen der A-Liganden Tolbutamid (Gribble et al., 1998), Gliclazid (Gribble und Ashcroft, 1999) und Nateglinid (Chachin et al., 2003), die für die Hemmung von Kir6.2/SUR2A und/oder Kir6.1/SUR2B erforderlich sind, ähneln jenen Konzentrationen, die einen Porenblock (d.h. eine SUR-unabhängige Kanalinhition) bewirken. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass das hemmende Prinzip auf der Bindung dieser Liganden an den Kir beruht und die Bindung an den SUR für die Inhibition keine bzw. eine untergeordnete Rolle spielt.

3.3.4 Anwendbarkeit des Konzepts von A-, B- und A+B-Liganden auf Kir6/SUR2

Zusammenfassend ist festzustellen, dass das Modell einer zweiteiligen Bindungsstelle für insulinotrope Substanzen von Kir6.2/SUR1 (Rufer und Losert, 1979; Brown und Foubister, 1984; vgl. Kap. 1.2.4.1) mit geringen Modifikationen auf Kir6/SUR2 übertragbar ist. Wie selektiv die verschiedenen Substanzen binden, hängt stark von der A-Bindungsstelle des SUR ab, jedoch verleiht die B-Bindungsstelle auch B-Liganden ein gewisses Maß an Selektivität. Die B-Bindungsstelle in SUR2 bleibt von der Mutation Y1206S nicht unberührt. Der zur B-Bindungsstelle zählenden Kir-N-Terminus ist anscheinend an der Bindung der sämtlichen

Insulinotropen gemeinsamen negativen Ladung und/oder des benachbarten Phenylrings (vgl. Abb. 1-10) beteiligt, darüber hinaus werden ihm direkte oder allosterische Wechselwirkungen mit dem Piperidinosubstituenten entsprechender B-Liganden zugeschrieben.

4 Modulierung der Glibenclamid-Bindung in Gegenwart von MgATP durch Orthovanadat (V_i) und Berylliumfluorid (BeF_x)

4.1 Fragestellung

Neben der Kir-vermittelten Hemmung übt ATP in Gegenwart von Mg^{2+} über den SUR auch einen aktivierenden Einfluss auf den K_{ATP} -Kanal aus (vgl. Kap. 1.2.3.1.2). D.h. durch Bindung und Hydrolyse von MgATP am SUR wird dieser in einen Zustand überführt, der die Aktivität des K_{ATP} -Kanals steigert.

Dank ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu anorganischem Phosphat (PO_4^{3-} , P_i) können Orthovanadat (VO_4^{3-} , V_i) und Berylliumfluorid ($\text{BeF}_3^-/\text{BeF}_4^{2-}$, BeF_x) anstelle des γ -Phosphats von ATP zusammen mit MgADP das katalytische Zentrum verschiedener ATPasen besetzen und deren Aktivität durch Ausbildung stabiler Enzym-Nukleotid-Komplexe hemmen (Werber et al., 1992). Während BeF_x die ATPase in einer prähydrolytischen Konformation arretiert, stabilisiert V_i einen posthydrolytischen Zustand des Enzyms. Die inhibitorische Wirkung von 0.5 mM MgATP auf die Aktivität des Kir6.2/SUR2A-Kanals wird daher durch V_i (0.5 mM) weitestgehend aufgehoben, nicht jedoch durch BeF_x (1 mM), welches vielmehr eine starke Hemmung der in Gegenwart von 0.5 mM MgADP beobachteten Kanalaktivität bewirkt. Anscheinend korreliert der stabilisierte Komplex im ersten Fall (V_i) mit einem aktiven, im zweiten Fall (BeF_x) mit einem inaktiven Zustand des K_{ATP} -Kanals (Zingman et al., 2001).

Anders als die Bindung/Hydrolyse von MgATP, stabilisiert die Bindung des Inhibitors Glibenclamid (GBC) eine SUR-Konformation, die die Kanalaktivität herabsetzt. Es überrascht daher nicht, dass in Radioligandbindungsstudien mit zunehmender MgATP-Konzentration eine Reduktion der [^3H]GBC-Bindung beobachtet wird (Schwanstecher et al., 1992a; Schwanstecher et al., 1992b; Hambrock et al., 2002a). Da V_i in den Experimenten von Zingman die aktivierende Komponente der MgATP-Wirkung entscheidend verstärkte, kann mit V_i möglicherweise auch die Hemmung der [^3H]GBC-Bindung durch MgATP gesteigert werden. Hingegen sollte BeF_x aus analogen Überlegungen heraus die [^3H]GBC-Bindung in Gegenwart von MgATP eher verbessern. In einem Teilprojekt der vorliegenden Dissertation sollte zur Überprüfung dieser Hypothese die MgATP-Inhibition der [^3H]GBC-Bindung in An- und Abwesenheit von V_i und BeF_x verglichen werden.

Frühere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe hatten ergeben, dass die spezifische Bindung von [^3H]GBC (~ 1 nM) an Kir6.2/SUR1 (Membranen) durch MgATP lediglich um ca. 20 % reduziert wird (Hambrock et al., 2002a). Durch Mutagenese von Glutamin 1178 in SUR1 zu Arginin kann dieser Wert jedoch auf ca. 70 % erhöht werden (B. Rüdiger, Dissertation in

Vorbereitung). Aus der Überlegung heraus, dass diese stärkere Abhängigkeit der [^3H]GBC-Bindung von MgATP die Analyse potentieller V_i - und insbesondere BeF_x -Effekte erleichtern sollte, wurden diese daher an Kir6.2/SUR1(Q1178R) untersucht.

4.2 Ergebnisse

Wie im letzten Unterkapitel erklärt, sollte ein möglicher Einfluss von V_i und BeF_x auf die Bindung von [^3H]GBC an Kir6.2/SUR1(Q1178R) geprüft werden. Die entsprechenden Experimente erfolgten an Membranpräparationen von diesen Kanal transient exprimierenden HEK293-Zellen.

Nachdem in einigen Vorversuchen tatsächlich ein Effekt von BeF_x und V_i auf die Inhibition der GBC-Bindung durch MgATP beobachtet wurde, mussten für die Folgeexperimente zunächst geeignete BeF_x - und V_i -Konzentrationen festgelegt werden. Für gereinigten SUR1 wurde eine vollständige Inhibition der ATPase-Aktivität durch BeF_x mit einer K_i von $16 \pm 11 \mu\text{M}$ beschrieben (de Wet et al., 2007), für den vollständigen K_{ATP} -Kanal Kir6.2/SUR1 liegen hingegen keine entsprechenden Literaturdaten vor. In den in diesem Kapitel vorgestellten Experimenten wies der verwendete SUR1 die Mutation Q1178R auf. Da außerdem Kir6.2 bekanntermaßen die ATPase-Aktivität von SUR1 etwa zehnfach erhöht (de Wet et al., 2007), ist unklar, in welchem Umfang obiger Befund für BeF_x von SUR1 auf Kir6.2/SUR1(Q1178R) übertragbar ist.

Die ATPase-Hemmung durch V_i erfolgt laut Zingman et al., 2001 im Fall der isolierten NBF2 von SUR2 mit einer K_i von $273 \mu\text{M}$ ($n_H = 0.9$) und ist vermutlich vollständig (keine höheren V_i -Konzentrationen als 1 mM untersucht). Da aber in den Untersuchungen von de Wet et al., 2007 selbst zwischen den isolierten NBFs von SUR1 und dem vollständigen SUR1-Protein substantielle Unterschiede bzgl. ATPase-Aktivität und deren Hemmung auftraten, ist es nicht möglich, auf Grundlage der Messungen an NBF2 von SUR2 quantitative Aussagen über die Wirkung von V_i am vollständigen SUR2, geschweige denn an Kir6.2/SUR1(Q1178R) zu machen. Daher wurde zunächst geprüft, wie sich eine Variation der BeF_x - bzw. V_i -Konzentration auf die Bindung von [^3H]GBC an Kir6.2/SUR1(Q1178R) in Gegenwart von MgATP auswirkt. Letzteres wurde jeweils in Konzentrationen vorgelegt, bei denen in den Vorversuchen 1 mM BeF_x bzw. 1 mM V_i einen ausgeprägten Effekt gezeigt hatten. Wie in Abb. 4-1(a) zu sehen, nahm die Inhibition der [^3H]GBC-Bindung durch 0.3 mM MgATP bei Erhöhung der BeF_x -Konzentration von $30 \mu\text{M}$ auf 3 mM stetig ab. Eine vollständige Aufhebung der MgATP-Wirkung schien wenn überhaupt jedoch erst bei sehr hohen BeF_x -

Konzentrationen (> 10 mM) erreichbar zu sein. Dies wäre jedoch mit gewissen experimentellen Problemen verbunden, z.B. könnten die dann notwendigen hohen Fluoridkonzentrationen zum Ausfallen von Magnesiumfluorid führen. Daher wurde schließlich für die Folgeexperimente die BeF_x -Konzentration zu 1 mM festgesetzt.

Eine klare Abhängigkeit zwischen der Wirkung von $30 \mu\text{M}$ MgATP auf die $[^3\text{H}]$ GBC-Bindung und der Konzentration des zugesetzten V_i konnte im Rahmen der in Abb. 4-1(b) zusammengefassten Untersuchungen nicht etabliert werden. Es schien jedoch so zu sein, dass die mit 1 mM V_i erzielten Effekte durch noch höhere V_i -Konzentrationen nicht gravierend verstärkt wurden. Um auch bei Letzteren einen pH von 7.4 in den Reaktionsansätzen zu gewährleisten, wäre außerdem eine im Vergleich zur moderaten Erhöhung der HEPES-Konzentration für 1 mM V_i (vgl. Kap. 2.9.3) wesentlich stärkere Modifikation des Inkubationspuffers erforderlich gewesen. Daher wurde auch für V_i in den nachfolgenden Bindungsstudien eine Konzentration von 1 mM gewählt. In Abwesenheit von MgATP zeigten bei dieser Konzentration weder V_i noch BeF_x einen nennenswerten Einfluss auf die Glibenclamid-Bindung.

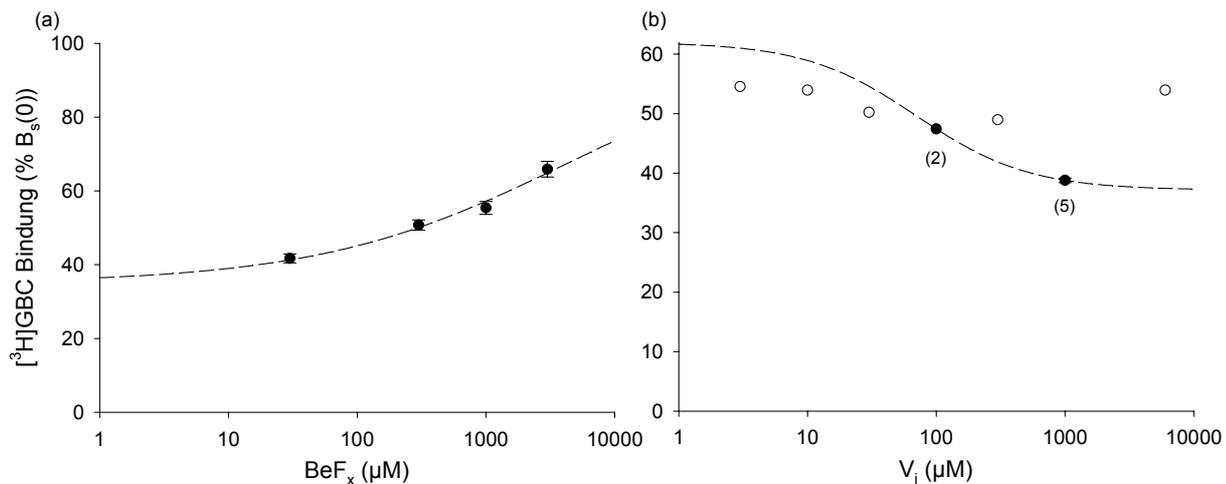


Abb. 4-1: Untersuchungen zur Konzentrationsabhängigkeit der Effekte von (a) BeF_x und (b) V_i auf die Reduktion der $[^3\text{H}]$ GBC-Bindung an Kir6.2/SUR1(Q1178R) durch MgATP. Dargestellt ist jeweils die spezifische $[^3\text{H}]$ GBC-Bindung im Verhältnis zur Bindung in Abwesenheit von MgATP und BeF_x/V_i . (a) 0.3 mM MgATP bewirkten eine Abnahme der $[^3\text{H}]$ GBC-Bindung um ca. 65 %. Mit zunehmender Konzentration an BeF_x fiel diese Abnahme immer geringer aus, konnte jedoch auch durch 3 mM BeF_x nicht eliminiert werden. Um letztgenannte Konzentration untersuchen zu können betrug die NaF-Konzentration des Fluorid-Inkubationspuffers abweichend von den Angaben in Kap. 2.9.3.2 in diesem Experiment 20 mM (statt 10 mM). (b) $30 \mu\text{M}$ MgATP führten zu einem Rückgang der $[^3\text{H}]$ GBC-Bindung auf 62 %. Bereits in der niedrigsten erprobten Konzentration ($3 \mu\text{M}$) bewirkte V_i eine Verstärkung dieses Effekts. Eine genaue quantitative Analyse der Konzentrationsabhängigkeit ist anhand der erhobenen Daten nicht möglich, die Wirkung der in mehr als einem Experiment eingesetzten V_i -Konzentrationen (ausgefüllte Kreise, Zahl der gemittelten Einzelwerte in Klammern) lässt jedoch vermuten, dass bei 1 mM V_i bereits ein Großteil des durch V_i erzielbaren Effekts erreicht wurde. In dem Experiment, in dem V_i in einer Konzentration von bis zu 6 mM eingesetzt wurde, betrug die HEPES-Konzentration im Reaktionsansatz 100 mM (statt 20 mM, wie in Kap. 2.9.3.2 angegeben).

Abb. 4-2 zeigt den Einfluss der beiden P_i -Analoge auf die MgATP-Abhängigkeit der GBC-Bindung. Wie aus Abb. 4-2(a) ersichtlich, riefen in Gegenwart von V_i (1 mM) bereits 3 μ M MgATP eine deutliche Hemmung der [3 H]GBC-Bindung hervor. Die IC_{50} der mit V_i wesentlich flacheren Hemmkurve ($n_H \approx 1$ vs. $n_H = 1.55 \pm 0.14$ (- V_i)) lag mit 7.9 μ M (7.4;8.4) entsprechend niedriger als in den Experimenten ohne V_i (32 μ M (28;37)). Die Amplitude, d.h. die maximale durch MgATP induzierbare Inhibition, konnte durch V_i jedoch nicht gesteigert werden (vgl. Abb. 4-2(a)).

Ein anderes Bild zeigte sich in den Experimenten mit BeF_x (1 mM). Hier war der prominenteste Effekt, der durch BeF_x hervorgerufen wurde, eine Verringerung dieser Amplitude, während sich die IC_{50} und der Hill-Koeffizient der Hemmkurve in geringerem Maße änderten (vgl. Abb. 4-2(b)).

Um zu klären, ob die durch BeF_x verursachten Unterschiede der [3 H]GBC-Bindung bei hohen MgATP-Konzentrationen (vgl. Abb. 4-2(b)) auf einer veränderten K_D für GBC oder einer veränderten Zahl an Bindungsstellen (Änderung von B_{max}) beruhen, wurden bei einer Konzentration von 0.3 mM MgATP Sättigungsexperimente mit [3 H]GBC in An- und Abwesenheit von 1 mM BeF_x durchgeführt (vgl. Kap. 2.9.5.3). Die normierten Messergebnisse sind in Abb. 4-3 dargestellt. Es zeigte sich, dass BeF_x sowohl eine Verringerung der apparenten K_D von 1.4 nM (1.2;1.7) auf 0.93 nM (0.79;1.1), als auch eine Zunahme von B_{max} von 54 ± 2 % auf 62 ± 2 % der maximalen Bindung in Abwesenheit von MgATP bewirkt.

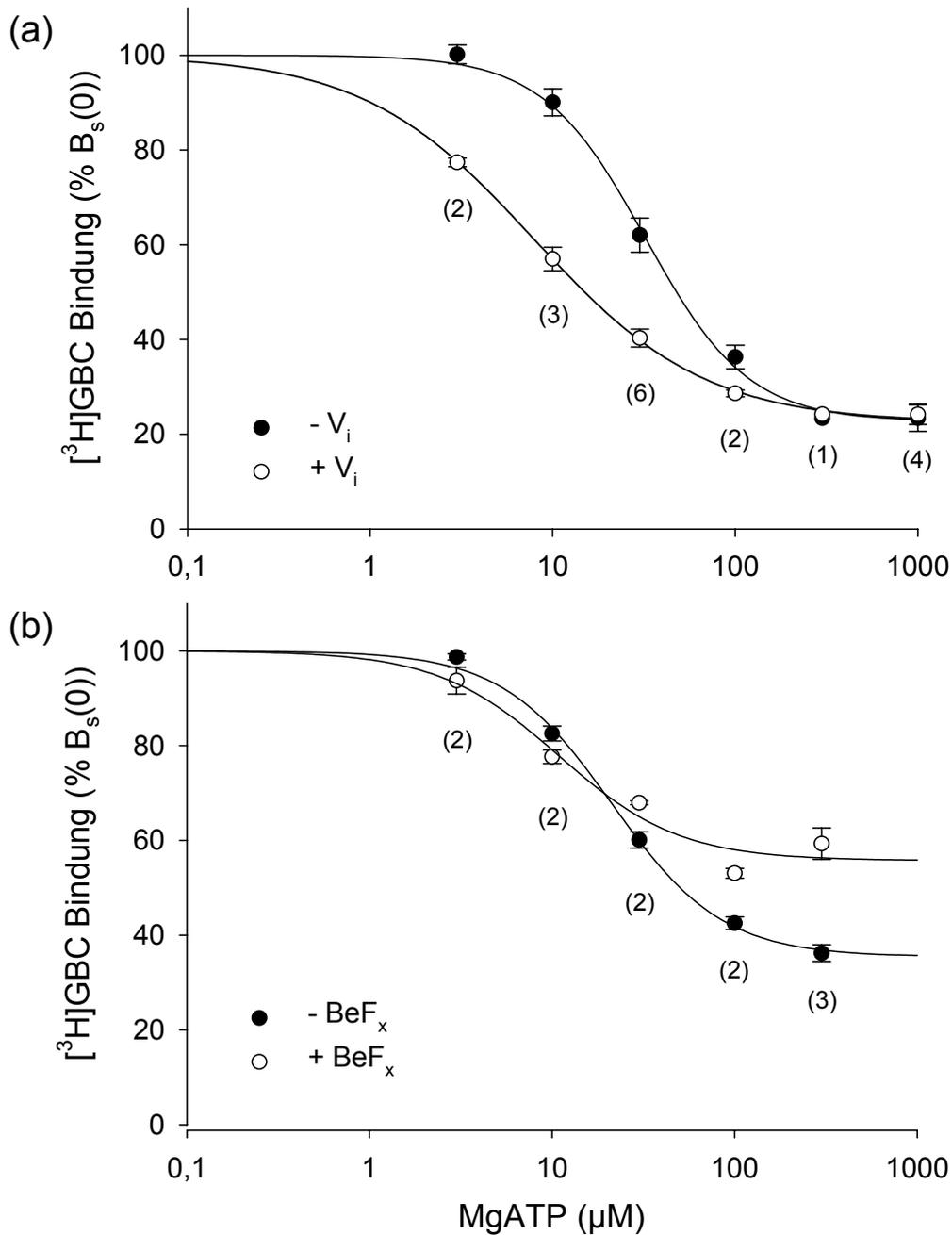


Abb. 4-2: Inhibition der $[^3H]GBC$ -Bindung ($\sim 1\text{ nM}$) an Kir6.2/SUR1(Q1178R) durch $MgATP$ in Ab- bzw. Anwesenheit von $1\text{ mM } V_i$ (a) oder $1\text{ mM } BeF_x$ (b). Aufgetragen ist jeweils die spezifische $[^3H]GBC$ -Bindung im Verhältnis zur Bindung bei $[MgATP] = 0$. Die Zahlen in Klammern geben an, wie viele Einzelerperimente für die Datenpunkte jeweils gemittelt wurden. Die

Regressionsanalyse mit $100\% \cdot \frac{B_s}{B_s(0)} = \frac{a}{1 + 10^{n_H \cdot (pIC_{50} - p[MgATP])}} + (100\% - a)$, wobei a den durch

$MgATP$ inhibierbaren Anteil der spezifischen $[^3H]GBC$ -Bindung darstellt, ergab folgende Werte:

(a)

$pIC_{50} = 4.49 \pm 0.03$, $a = 77 \pm 2\%$, $n_H = 1.55 \pm 0.14$ ($-V_i$)

$pIC_{50} = 5.10 \pm 0.01$, $a = 78 \pm 1\%$, $n_H = 0.93 \pm 0.03$ ($+V_i$)

(b)

$pIC_{50} = 4.67 \pm 0.03$, $a = 65 \pm 2\%$, $n_H = 1.44 \pm 0.14$ ($-BeF_x$)

$pIC_{50} = 4.96 \pm 0.12$, $a = 44 \pm 4\%$, $n_H = 1.31 \pm 0.42$ ($+BeF_x$)

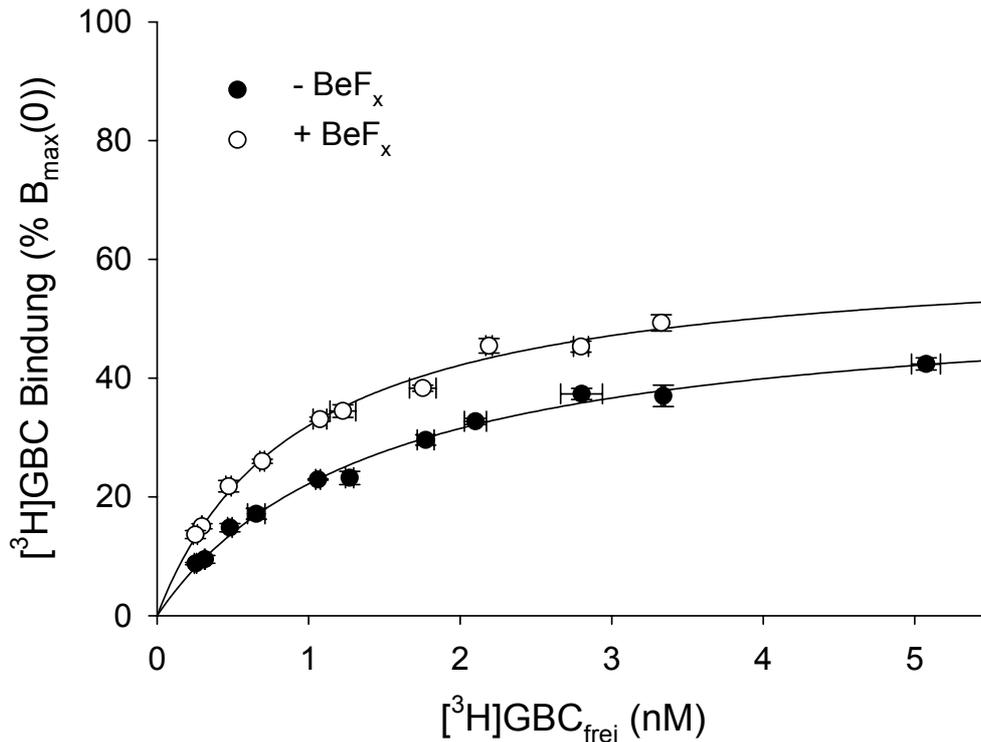


Abb. 4-3: [³H]GBC-Sättigungsexperimente an Kir6.2/SUR1(Q1178R) in Gegenwart von 0.3 mM MgATP und 0 bzw. 1 mM BeF_x . Beide Datensätze ($\pm \text{BeF}_x$) stellen die Zusammenfassung zweier Einzelexperimente dar. Die Normierung der [³H]GBC-Bindung auf die maximale Bindung in Abwesenheit von MgATP (d.h. $100\% \triangleq B_{\max}([\text{MgATP}] = 0)$) erfolgte auf Basis des von B. Rüdiger (Abt. Molpharm.) für Kir6.2/SUR1(Q1178R) ermittelten Verhältnisses $\frac{B_{\max}([\text{MgATP}] = 1 \text{ mM})}{B_{\max}([\text{MgATP}] = 0)} \approx 55\%$. Die Regressionskurven entstanden nach der Gleichung

$$100\% \cdot \frac{B_s}{B_{\max}([\text{MgATP}] = 0)} = \frac{a}{1 + 10^{(px - pIC_{50})}}, \text{ wobei } x \text{ der Konzentration des ungebundenen}$$

Radioliganden entspricht (vgl. Kap. 2.9.2). Die ermittelten Parameter lauten $pIC_{50} = 8.84 \pm 0.04$, $a = 54 \pm 2\%$ ($-\text{BeF}_x$) bzw. $pIC_{50} = 9.03 \pm 0.04$, $a = 62 \pm 2\%$ ($+\text{BeF}_x$).

4.3 Diskussion

Die unterschiedlichen Effekte der ATPase-Hemmer V_i und BeF_x auf Kir6.2/SUR2A inspirierten Zingman et al., 2001 zur Entwicklung des in Abb. 4-4 dargestellten Modells. Die posthydrolytischen Zustände $\text{SUR}^{**}\text{-MgADP-P}_i$ und $\text{SUR}^{***}\text{-MgADP}$ korrelieren hier mit einer erhöhten Offenwahrscheinlichkeit des Kanals, sind jedoch bei niedriger MgADP-Konzentration nur kurzlebig, so dass der K_{ATP} -Kanal keine bzw. nur geringe Aktivität zeigt. Hohe MgADP-Konzentrationen verlangsamen hingegen die Dissoziation dieser Komplexe und erhöhen so die Kanalaktivität. Einen vergleichbaren Effekt schreibt das Modell V_i zu, welches demnach an die Stelle von P_i treten und einen $\text{SUR}^{**}\text{-MgADP-P}_i$ ähnelnden, jedoch

deutlich stabileren Komplex bilden kann. Wird P_i dagegen nicht durch V_i , sondern BeF_x ersetzt, ähnelt die Konformation des resultierenden Komplexes eher einem prähydrolytischen Zustand, dessen Stabilisierung den Anteil der SURs in einer posthydrolytischen Konformation verringert. BeF_x wirkt daher einer Aktivierung des Kanals durch MgATP entgegen.

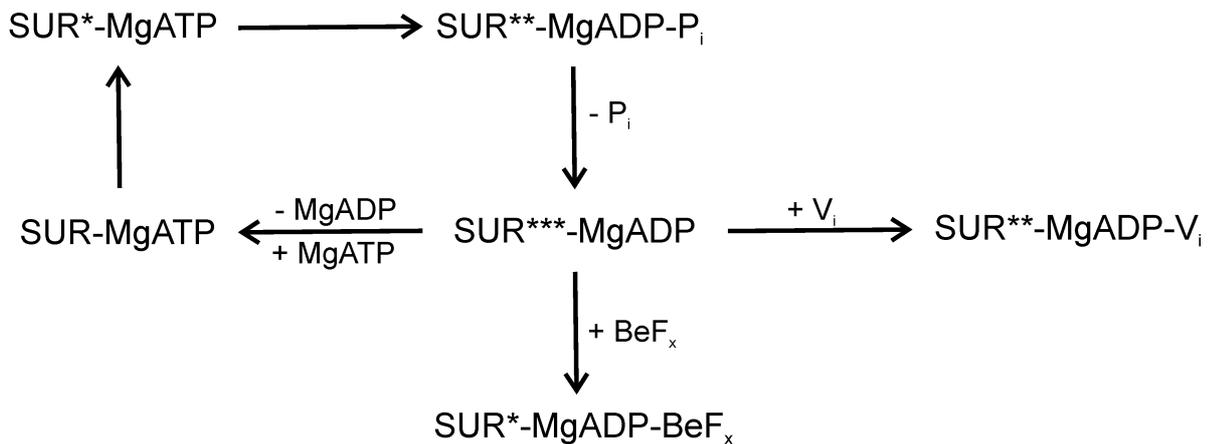


Abb. 4-4: Modell zur SUR-vermittelten Aktivierung/Hemmung des K_{ATP} -Kanals durch V_i/BeF_x (nach Zingman et al., 2001). Links oben der reguläre ATPase-Zyklus, in dem der SUR verschiedene (durch die Sternsymbole gekennzeichnete) Zustände durchläuft. Nach Hydrolyse von MgATP dissoziiert zunächst P_i und anschließend MgADP, welches durch neues MgATP ersetzt wird. Zusammen mit MgADP vermag V_i den SUR in einer posthydrolytischen Konformation zu stabilisieren. In seinem posthydrolytischen Zustand begünstigt SUR eine Öffnung des K_{ATP} -Kanals, wohingegen die Aktivität im prähydrolytischen Zustand niedrig bleibt. Letzterer wird im Komplex mit MgADP und BeF_x eingenommen, was die gegensätzliche Wirkung von V_i und BeF_x erklärt.

Die Bindung des Sulfonylharnstoffs Glibenclamid an den K_{ATP} -Kanal wird durch MgATP inhibiert (vgl. Abb. 4-2), nicht jedoch durch nicht-hydrolysierbare ATP-Analoga bzw. ATP in Abwesenheit von Mg^{2+} (Ashcroft und Ashcroft, 1992; Hambrock et al., 2002a). Eine naheliegende Interpretation dieses Sachverhalts besteht in der Annahme, dass der SUR im Verlauf der MgATP-Hydrolyse Zustände einnimmt, die nur eine geringe Affinität für GBC aufweisen. Sofern dies, sowie das Modell von Zingman zutreffen, demnach man mit V_i und BeF_x das Mengenverhältnis der verschiedenen Zustände manipulieren kann, sollten diese Substanzen in Anwesenheit von MgATP auch die Bindung von GBC beeinflussen.

Tatsächlich war die durch 0.3 mM MgATP hervorgerufene Abnahme von B_{max} in Gegenwart von BeF_x schwächer als in dessen Abwesenheit (vgl. Abb. 4-3). Dieses Verhalten entspricht den Erwartungen, wenn man davon ausgeht, dass der SUR in einer durch BeF_x begünstigten prähydrolytischen Konformation eine wesentlich höhere Affinität für den Inhibitor GBC

aufweist als in einem posthydrolytischen Zustand, der mit einer verstärkten Kanalaktivität korreliert.

Allerdings wurde auch mit BeF_x eine starke Reduktion der mit den in den Sättigungsexperimenten verwendeten [^3H]GBC-Konzentrationen detektierbaren Bindungsstellen durch MgATP beobachtet (vgl. Abb. 4-3). Eine Erhöhung der BeF_x -Konzentration von 1 mM auf 3 mM führte in dem Experiment aus Abb. 4-1(a) zu einer deutlichen Verbesserung der [^3H]GBC-Bindung, ein mögliches Indiz dafür, dass die komplette Inhibition der ATPase-Aktivität von Kir6.2/SUR1(Q1178R) höhere BeF_x -Konzentrationen erfordert als im Fall des isolierten (wildtypischen) SUR1 ($K_I = 16 \pm 11 \mu\text{M}$ (de Wet et al., 2007)). In einem ähnlichen Experiment an SUR1 gelang es jedoch ebenfalls nicht, die Hemmung der [^3H]GBC-Bindung durch MgATP mit BeF_x (0.03-3 mM) vollends aufzuheben (nicht gezeigt), obwohl hier gemäß der von de Wet et al., 2007 ermittelten K_I ($16 \pm 11 \mu\text{M}$) eine nahezu vollständige Inhibition der ATPase-Aktivität durch 3 mM BeF_x zu erwarten gewesen wäre. Möglicherweise führten Unterschiede in den Versuchsbedingungen, z.B. Verwendung einer Membranpräparation (diese Dissertation) gegenüber gereinigtem SUR1-Protein (de Wet et al., 2007), dazu dass hier ein solch hohes Maß an ATPase-Hemmung nicht erreicht wurde. Eine alternative Erklärung wäre, dass die Affinität des prähydrolytischen Zustands für GBC zwar viel höher als die des posthydrolytischen Zustands ist, aber signifikant niedriger als die des nukleotidungebundenen SUR. In diesem Fall würde BeF_x zwar die [^3H]GBC-Bindung in Anwesenheit von MgATP steigern, jedoch nicht bis auf das unter nukleotidfreien Bedingungen erreichbare Niveau.

Die apparente K_D für GBC bei einer MgATP-Konzentration von 0.3 mM wurde durch BeF_x etwas kleiner (vgl. Abb. 4-3). Die wohl einfachste Erklärung wäre, dass die durch BeF_x mit MgADP induzierte prähydrolytische Konformation zwar ähnlich zu der MgATP-gebundenen prähydrolytischen Konformation ist, aber nicht mit ihr identisch, resultierend in einer geringfügig unterschiedlichen K_D .

In den Experimenten zur MgATP-Hemmung der [^3H]GBC-Bindung schien BeF_x bei niedrigen MgATP-Konzentrationen die Hemmung etwas zu verstärken (vgl. Abb. 4-2). Wenn die durch BeF_x verstärkte Ausbildung des prähydrolytischen Zustands bei niedrigen MgATP-Konzentrationen zunächst zu Lasten des Anteils an nukleotidfreiem SUR erfolgt und Letzterer eine höhere Affinität für GBC aufweist als der prähydrolytische Zustand, könnte dies evtl. obige Beobachtung erklären. Die selbe Hypothese wurde bereits als potentielle Erklärung dafür angeführt, dass MgATP auch in Gegenwart von BeF_x eine Schwächung der GBC-Bindung hervorruft (s.o.).

Anders als BeF_x sollte V_i gemäß Modell die Hemmung der [3H]GBC-Bindung durch MgATP noch verstärken, da für einen durch V_i stabilisierten posthydrolytischen Zustand nur eine sehr geringe Affinität für GBC angenommen wird. Die maximale durch MgATP erzielbare Inhibition der [3H]GBC-Bindung wurde durch V_i jedoch nicht gesteigert (vgl. Abb. 4-2(a)). Kir6.2/SUR1(Q1178R) erfährt im Vergleich zum wildtypischen Kanal eine stärkere Aktivierung durch MgATP, vermutlich aufgrund einer langsameren Dissoziation des posthydrolytischen Komplexes (Babenko, 2008). SUR1(Q1178R) gilt daher als Ursache für den permanenten neonatalen Diabetes mellitus (PNDM) eines für diese Mutation heterozygoten Patienten (Christesen et al., 2005). Dass der mutante SUR bereits ohne V_i verstärkt in der posthydrolytischen Konformation vorliegt, ist jedoch nicht der Grund, warum V_i keine zusätzliche Hemmung der [3H]GBC-Bindung bewirkt. Dies ergab ein Kontroll-experiment (nicht gezeigt) mit wildtypischem Kir6.2/SUR1, in dem ebenfalls keine Steigerung der maximalen Hemmung beobachtet wurde.

Wenngleich V_i die Effizienz von MgATP also nicht verbessern konnte, d.h. die Inhibition der [3H]GBC-Bindung bei hohen MgATP-Konzentrationen unabhängig von V_i war, so konnte doch eine Steigerung der Potenz in Form einer Abnahme der IC_{50} festgestellt werden (vgl. Abb. 4-2(a)). Bei niedrigen Konzentrationen an MgATP kam es somit in der Tat durch V_i zu einer vom Modell aus Abb. 4-4 vorhergesagten Verstärkung des MgATP-Effekts auf die [3H]GBC-Bindung.

Die Hypothese, dass die Bindung von GBC an den K_{ATP} -Kanal in Anwesenheit von MgATP durch V_i und BeF_x moduliert werden kann, wird durch die hier beschriebenen Untersuchungen bestätigt. In einem gewissen Rahmen bekräftigen die Ergebnisse so auch die dem Modell aus Abb. 4-4 zugrundeliegenden Annahmen. Warum die Amplitude der MgATP-Hemmung der [3H]GBC-Bindung durch BeF_x reduziert wurde, während die Verstärkung dieses Effekts durch V_i über eine Änderung der IC_{50} und des Hill-Koeffizienten erreicht wurde, lässt sich mit der einfachen Form des Modells allerdings wohl kaum erklären. Ein genaueres, hierdurch freilich wesentlich komplexeres Modell müsste u.a. berücksichtigen, dass im K_{ATP} -Kanal-Komplex ein Tetramer aus vier miteinander interagierenden SUR-Untereinheiten vorliegt, die ihrerseits nicht nur eine, sondern je zwei Nukleotidbindungsstellen mit ATPase-Aktivität aufweisen (wenngleich Letztere im Fall von NBF1 nur gering ausgeprägt ist; vgl. Kap. 1.2.3.1.2). Eine genaue quantitative Beschreibung der Experimente aus Abb. 4-2 und Abb. 4-3 wäre freilich selbst mit solch einem aufwendigen Modell nicht trivial. So gilt es auch zu berücksichtigen, dass aufgrund der durch V_i bzw. BeF_x

verminderten Hydrolyserate gegen Ende der Inkubation das ATP/ADP-Verhältnis in den Ansätzen mit V_i bzw. BeF_x langsamer abnahm als in den Ansätzen ohne diese ATPase-Hemmer.

Beim Vergleich der Hemmkurve ohne ATPase-Hemmer in Abb. 4-2(a) mit der entsprechenden Kurve in Abb. 4-2(b) fällt auf, dass zwischen diesen ein moderater aber statistisch signifikanter Unterschied hinsichtlich IC_{50} und Amplitude besteht. Anscheinend wirkten sich hier Unterschiede in der Zusammensetzung der jeweiligen Inkubationspuffer aus ($[\text{Mg}^{2+}]$, $[\text{F}^-]$, $[\text{HEPES}]$; vgl. Kap. 2.9.3.2). Dies wurde jedoch nicht weiter verfolgt.

Die Patch-Clamp-Experimente, in denen Zingman et al., 2001 eine K_{ATP} -Kanal-Aktivierung durch V_i demonstrierten, wurden bei 30 °C durchgeführt. Bei 20 °C konnten sie hingegen keine Aktivierung innerhalb der Versuchsdauer beobachten, was mit der bei der niedrigeren Temperatur verminderten ATPase-Aktivität erklärt wurde.

Erwähnt sei, dass Decavanadat, welches insbesondere bei hohen Vanadatkonzentrationen und leicht saurem pH durch Oligomerisierung von Orthovanadat entsteht (Csermely et al., 1985), ebenfalls zur Modulierung der K_{ATP} -Kanal-Aktivität eingesetzt werden kann. Hierfür ist keine ATP-Hydrolyse erforderlich. Sequenzunterschiede im Bereich der ersten sechs Transmembranhelices von SUR sind dafür verantwortlich, dass Decavanadat auf Kir6.2/SUR1 inhibierend, auf Kir6.2/SUR2A und Kir6.2/SUR2B hingegen aktivierend wirkt (Proks et al., 1999).

5 Struktur-Funktionsbeziehungen des Sulfonylharnstoffrezeptors – Charakterisierung von SUR2B(YS) Δ TMD0

5.1 Fragestellung

Bis heute ist keine vollständige hochauflösende Struktur eines K_{ATP} -Kanals verfügbar. Sofern bekannt, wurden die Wechselwirkungen der Kir- und SUR-Untereinheiten daher zum großen Teil experimentell erschlossen, d.h. aus den durch Manipulationen (Mutagenese, Deletionen, Chimärenbildung, etc.) veränderten Eigenschaften der Kanalproteine wurden Rückschlüsse auf die Bedeutung und Funktion entsprechender Proteinabschnitte gezogen. So gelang es Tinker et al., 1996, die M2-Helix und den hierzu proximalen Teil des cytosolischen C-Terminus von Kir6.1 und anderen einwärts gleichrichtenden Kaliumkanälen als entscheidend für deren homotypische Assoziation zu identifizieren. Unklar sind die Verhältnisse hinsichtlich der Interaktion von Kir6.2 mit dem Sulfonylharnstoffrezeptor: Während Giblin et al., 1999 hierfür dem C-Terminus von Kir6.2 große Wichtigkeit beimessen, deuten Experimente von Schwappach et al., 2000 auf eine kritische Rolle von N-Terminus und M1-Helix hin.

Ein hohes Maß an Interesse bei der Erforschung des SUR erfuhr die Transmembrandomäne 0 (TMD0), da dieses Strukturelement eine Besonderheit einer kleinen Gruppe innerhalb der Familie der ABC-Proteine darstellt (vgl. Kap. 1.2.1.1.1). Es zeigte sich, dass die TMD0-Domäne von SUR1 ausreicht, um eine Co-IP von Kir6.2, eine Verbesserung der Zelloberflächenexpression (\rightarrow „trafficking“) von Kir6.2 Δ C26 und eine Steigerung der Kanalaktivität zu bewirken, in einem Ausmaß ähnlich dem vollständigen SUR1 (Chan et al., 2003; Babenko und Bryan, 2003). Auch für TMD0 aus SUR2 wurde ein Zusammenspiel mit Kir6.2 (sowie Kir6.1) berichtet. Co-Immunopräzipitation von Kir6.2 ist auch mit einem Fragment möglich, welches von einschließlich TMD2 bis zum C-Terminus von SUR1 reicht, wenngleich diese Wechselwirkungen deutlich schwächer zu sein scheinen, als zwischen Kir6.2 und TMD0 (Chan et al., 2003). Am SUR2 konnten Rainbow et al., 2004 im Bereich des Walker-A-Motivs von NBF2 (vgl. Abb. 1-7) ein 65 Aminosäuren langes Peptid identifizieren, welches bei Co-Expression mit Kir6.2/SUR2A, Kir6.2/SUR2B, Kir6.2/SUR1 und Kir6.1/SUR2B die Oberflächenexpression der jeweiligen K_{ATP} -Kanäle signifikant reduziert, vermutlich durch Konkurrenz mit dem vollständigen SUR um die entsprechende Assoziationsstelle am Kir.

Ziel in der vorliegenden Arbeit war es, zu untersuchen, wie ein Fehlen von TMD0 (d.h. Deletion der ersten 196 AS) sich auf die Bindung verschiedener Liganden an SUR2B(YS) in An- und Abwesenheit von Kir6.2 auswirkt. Neben einem erweiterten Verständnis der Kir-SUR-Beziehungen sollten diese Experimente u.a. dazu dienen, zu überprüfen, ob eine für SUR2B(YS) postulierte Tetramerisierung in Abwesenheit der porenbildenden Untereinheit (Löffler-Walz et al., 2002) von TMD0 abhängt. Potentielle Interaktionen sollten mittels Co-Immunopräzipitation verifiziert werden. Schließlich sollte in elektrophysiologischen Messungen kontrolliert werden, ob SUR2B(YS) Δ TMD0 im Gegensatz zu SUR1 Δ TMD0 (Chan et al., 2003) mit Kir6.2 einen funktionellen K_{ATP} -Kanal bilden kann.

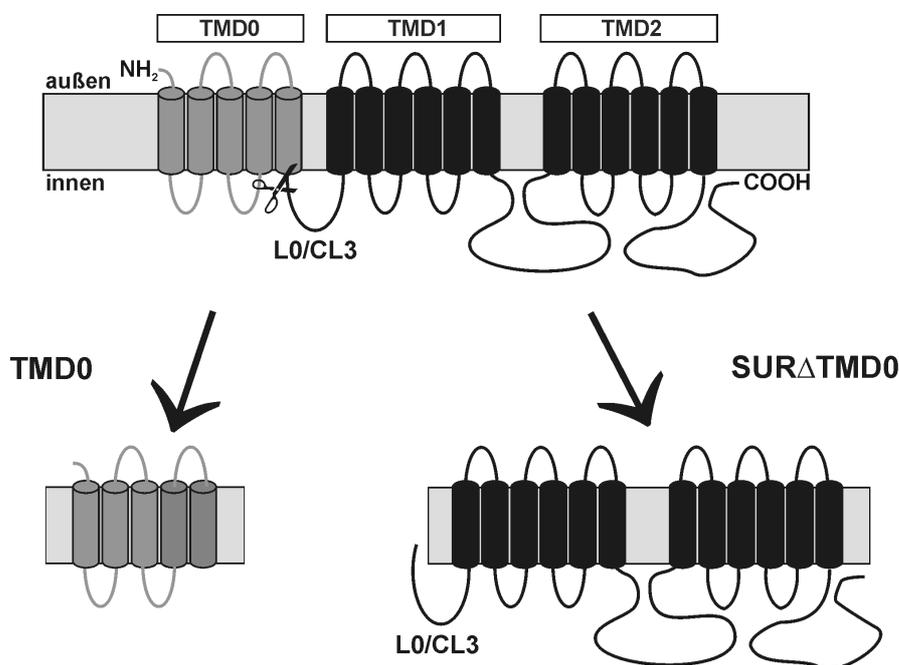


Abb. 5-1: Illustration von SUR Δ TMD0.

5.2 Ergebnisse

Wie in Kap. 1.2.4.1 beschrieben ist die cytoplasmatische Schleife L0/CL3, die die Transmembrandomänen TMD0 und TMD1 des Sulfonylharnstoffrezeptors verbindet, Bestandteil des B-Abschnitts der Bindungsstelle für diverse insulinotrope Verbindungen. In Radioligandbindungsversuchen sollte geprüft werden, ob auch der N-terminal von L0 gelegene Bereich (= TMD0) Bedeutung für die Bindung der Liganden Glibenclamid (GBC), Repaglinid (REP) und P1075 an SUR2B(Y1206S) besitzt oder ob SUR2B(YS) Δ TMD0 ein unverändertes Bindungsverhalten aufweist. Die Mutation Y1206S war dabei Voraussetzung für den Einsatz von [3 H]GBC, da die niedrige Affinität des wildtypischen SUR2B für Glibenclamid zu einem experimentell ungünstigen Verhältnis von

spezifisch zu unspezifisch gebundenem Radioliganden führt (vgl. Kap. 1.2.4.1). Die Radioligandbindungsstudien ergaben Hinweise darauf, dass SUR2B(YS) auch ohne TMD0 mit sich selbst bzw. Kir6.2 interagieren kann (vgl. Kap. 5.2.1). Das war Anlass für eine Überprüfung dieser Befunde mittels Co-Immunopräzipitation (Co-IP), sowie in elektrophysiologischen Messungen.

5.2.1 Radioligandbindungsstudien an SUR2B(YS) und SUR2B(YS) Δ TMD0 in An- und Abwesenheit von Kir6.2

Tab. 5-1: Radioligandbindungsstudien an Membranen: Bindungseigenschaften von SUR2B(YS) und SUR2B(YS) Δ TMD0 in An- und Abwesenheit von Kir6.2.

Radioligand	Competitor	[MgATP] (mM)	K_D bzw. K_I (nM)			
			SUR2B(YS)	SUR2B(YS) Δ TMD0	Kir6.2/ SUR2B(YS)	Kir6.2/ SUR2B(YS) Δ TMD0
[³ H]GBC	GBC	0	7.3 (7.0;7.7) (3)	13 ^a (9.3;20) (7)	2.7 (2.4;3.0) (3)	11 (6.5;19) (6)
“	“	1	n.b.	13 ^b (10;18) (4)	2.7 ^c (2.3;3.0) (3)	? ^d
“	REP	0	45 (39;52) (3)	62 (55;70) (4)	7.9 ^e (7.3;8.7) (3)	40 (36;45) (4)
“	P1075	0	1200 (1100;1300) (4)	2300 (2200;2300) (3)	n.b.	n.b.
“	“	1	$K_{I,1}$: 5.6 ^c (3.4;9.3) $K_{I,2}$: 660 (480;910) (6)	$K_{I,1}$: 7.3 ^f (2.3;23) $K_{I,2}$: 450 (180;1100) (4)	n.b.	n.b.
[³ H]P1075	P1075	1	10 (9;12) (3)	15 ^a (13;19) (3)	n.b.	n.b.
“	GBC	1	230 (160;330) (4)	490 ^a (350;690) (4)	$K_{I,1}$: 4.4 ^c (2.8;6.9) $K_{I,2}$: 288 (191;437) (4)	900 (700;1200) (4)

n.b.: nicht bestimmt. ^a: Wert signifikant höher als für SUR2B(YS) ($P < 0.05$). ^b: MgATP verringerte die Zahl der GBC-Bindungsstellen (B_{max}) um $\sim 2/3$. ^c: Werte aus Hambrock et al., 2001. ^d: konnte nicht bestimmt werden, da Signal zu klein. ^e: Wert signifikant kleiner als in Abwesenheit von Kir6.2. ($P < 0.01$) ^f: Da P1075 die K_D von GBC erhöht (vgl. Kap. 5.3), ist hier die Cheng-Prusoff-Korrektur (vgl. Gleichung 2-4) formal nicht ganz korrekt; Die ursprünglichen IC_{50} -Werte lauteten (~ 4.8 nM [³H]GBC) $IC_{50,1} = 10$ nM (3.1;32), $IC_{50,2} = 620$ nM (240;1600).

Die Ergebnisse der Bindungsstudien sind in Tab. 5-1 zusammengefasst. In Abwesenheit von Kir6.2 zeigten sich keine sehr gravierenden Unterschiede zwischen den Bindungseigenschaften von SUR2B(YS) und SUR2B(YS) Δ TMD0, wenngleich die Deletion von TMD0 die Affinitäten von GBC, REP und P1075 ein wenig verschlechterte (statistisch signifikant: vgl. Tab. 5-1). Bemerkenswert war, dass bei SUR2B(YS) Δ TMD0 auch die Biphasizität der Verdrängung von [3 H]GBC durch P1075 in Gegenwart von MgATP (1 mM) erhalten blieb (vgl. Abb. 5-2). Besagte Biphasizität wurde bei SUR2B(YS) als Folge einer Tetramerbildung interpretiert, die laut jener Hypothese auch in Abwesenheit von Kir6.2 erfolgt (Löffler-Walz et al., 2002). Das Auftreten einer biphasischen Verdrängungskurve bei SUR2B(YS) Δ TMD0 wäre demnach ein Indiz dafür, dass TMD0 für eine solche Tetramerisierung nicht zwingend erforderlich ist.

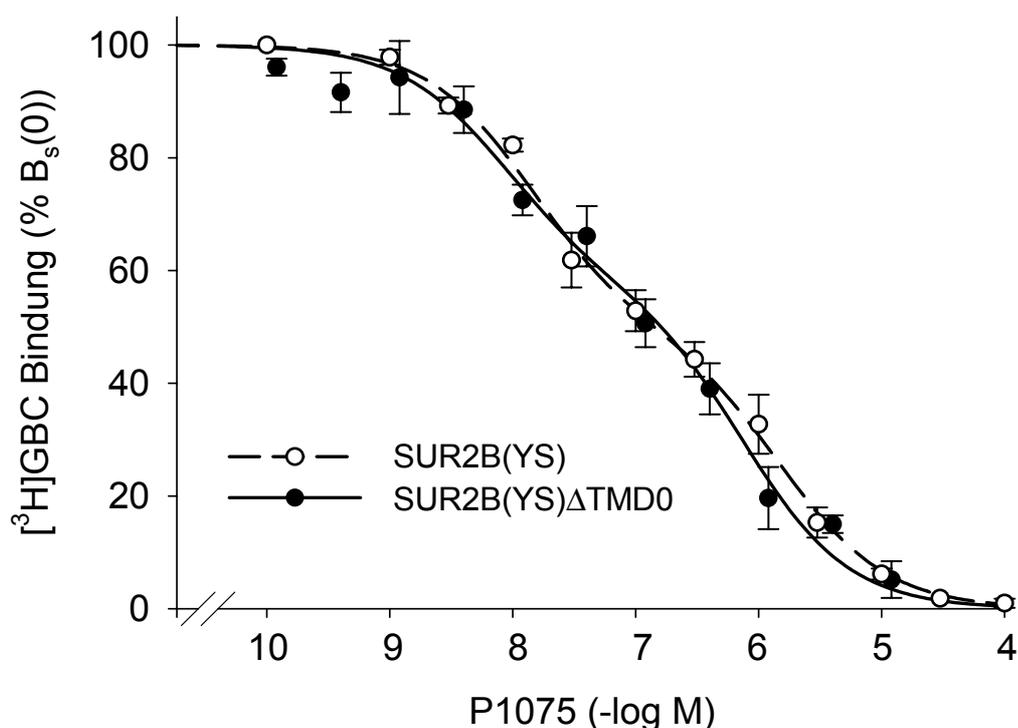


Abb. 5-2: Biphasische Verdrängung von [3 H]GBC durch P1075 ([MgATP] = 1 mM). Deletion von TMD0 führte zu keiner statistisch signifikanten Änderung des Kurvenverlaufs (vgl. Tab. 5-1). Die Datenpunkte stellen die Mittelwerte der spezifischen [3 H]GBC-Bindung aus sechs (SUR2B(YS); Hambrock et al., 2001) bzw. vier (SUR2B(YS) Δ TMD0) Einzelexperimenten an Membranen dar.

Die Affinität von SUR2B(YS) für GBC und REP (jeweils unter MgATP-freien Bedingungen) wird durch Kir6.2 deutlich verbessert. Im Fall von SUR2B(YS) Δ TMD0 ist dieser Effekt schwächer ausgeprägt, dennoch stellt die K_1 der Repaglinidbindung an

Kir6.2/SUR2B(YS) Δ TMD0 einen statistisch signifikant ($P < 0.01$) niedrigeren Wert dar als bei SUR2B(YS) Δ TMD0 alleine (vgl. Tab. 5-1 und Abb. 5-3). Dies spricht dafür, dass der verkürzte SUR noch in der Lage ist, einen Komplex mit Kir6.2 auszubilden.

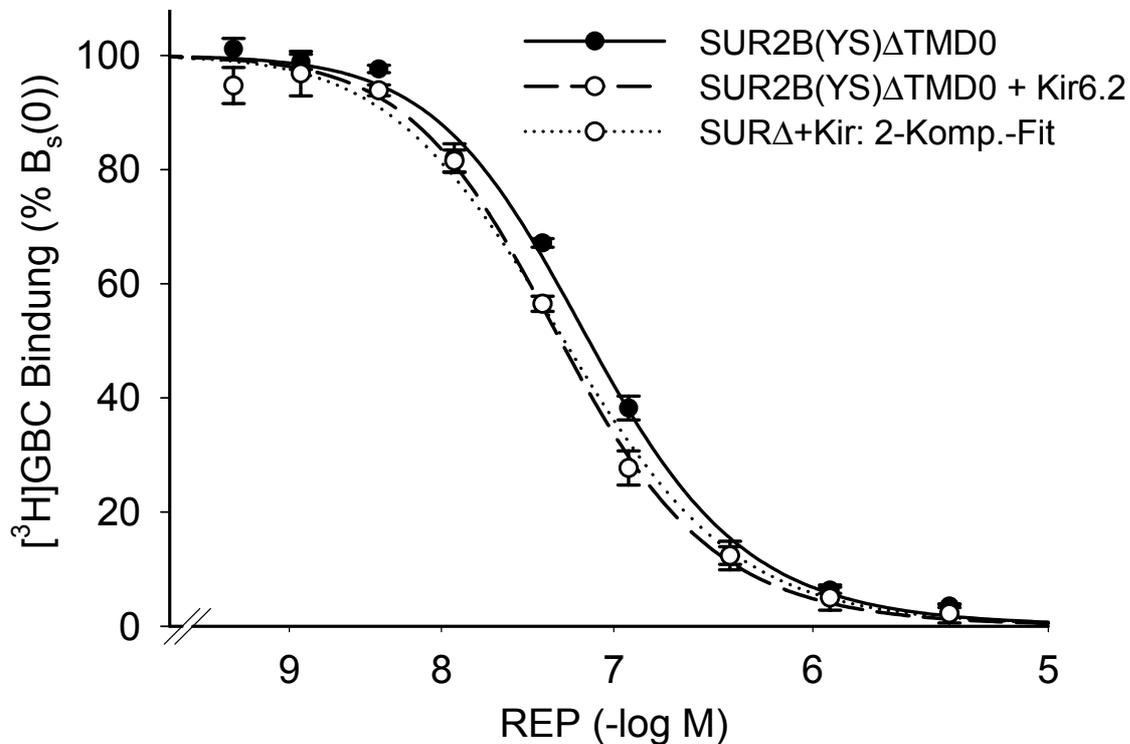


Abb. 5-3: Inhibition der [3 H]GBC-Bindung an SUR2B(YS) Δ TMD0 durch Repaglinid (REP) in Gegenwart bzw. Abwesenheit von Kir6.2 ($[MgATP] = 0$). Die Affinität für REP wird durch Kir6.2 statistisch signifikant ($P < 0.01$) erhöht (vgl. Tab. 5-1). Die gepunktete Linie stellt die Regression der Co-Expressionsdaten nach Gleichung

$$\frac{B_s}{B_s(0)} = B_{s,1}(0) \cdot \frac{1}{1 + 10^{(7.86 - p[REP]_0)}} + B_{s,2}(0) \cdot \frac{1}{1 + 10^{(7.11 - p[REP]_0)}}$$

dar. Diese Analyse berücksichtigt

die Möglichkeit, dass nur ein Teil von SUR2B(YS) Δ TMD0 im Komplex mit Kir6.2 vorliegen könnte ($\rightarrow B_{s,1}$). Die Festsetzung des K_I -Werts für die Bindung von REP an diesen Komplex erfolgte hier unter der Annahme, dass Kir6.2 die Affinität von SUR2B(YS) Δ TMD0 für REP um den selben Faktor (5.7; vgl. Tab. 5-1) verbessert, wie die Affinität von SUR2B(YS). Die K_I -Werte wurden gemäß Gleichung 2-4 für eine [3 H]-GBC-Konzentration von ~ 3 nM und eine K_D von ~ 12 nM in die entsprechenden IC_{50} -Werte umgerechnet und als pIC_{50} in obige Gleichung eingesetzt. Mit diesen Vorgaben wurde für $B_{s,1}$ ein Wert von 24 ± 4 % ermittelt, d.h. demnach hätte etwa ein Viertel der SUR2B(YS) Δ TMD0-Proteine im Komplex mit Kir6.2 vorgelegen.

5.2.2 Verifizierung der Ergebnisse aus den Radioligandbindungsstudien mittels Co-Immunopräzipitation

FLAG-getaggtter SUR und/oder MYC-getaggtter SUR wurden in HEK293 exprimiert. Aus dem Solubilisat der Membranen wurde (so denn enthalten) SUR-MYC mit Hilfe eines an Agarosekügelchen immobilisierten Anti-MYC-Antikörpers immunopräzipitiert (vgl. Kap. 2.8.2). Im anschließenden Western Blot wurde mittels eines primären Anti-FLAG-Antikörpers geprüft, ob es zu einer Co-IP des FLAG-getaggtten Proteins gekommen war. Das Ergebnis dieser Experimente besagt, dass sowohl SUR2B(YS) als auch SUR2B(YS) Δ TMD0 Multimere bilden (vgl. Abb. 5-4).

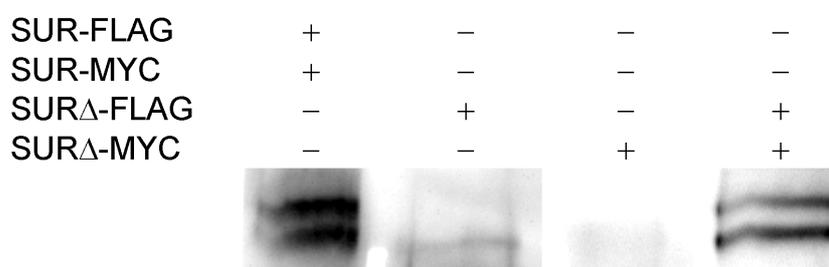


Abb. 5-4: Immunopräzipitation (Anti-MYC) mit anschließendem Western Blot (Anti-FLAG). „+“ kennzeichnet die Expression des jeweiligen Proteins in den für die IP verwendeten HEK293, „SUR“ und „SUR Δ “ sind Abkürzungen für „SUR2B(YS)“ und „SUR2B(YS) Δ TMD0“. IP von MYC-getaggttem SUR2B(YS) Δ TMD0 führte zur Co-IP von co-exprimiertem SUR2B(YS) Δ TMD0-FLAG (rechte Spalte), analog zur Co-IP von SUR2B(YS)-FLAG durch SUR2B(YS)-MYC (linke Spalte).

Analoge Experimente belegten, dass das Fehlen von TMD0 SUR2B(YS) nicht daran hindert, einen Komplex mit Kir6.2 einzugehen (vgl. Abb. 5-5).



Abb. 5-5: Immunopräzipitation (Anti-MYC) mit anschließendem Western Blot (Anti-FLAG). „+“ kennzeichnet die Expression des jeweiligen Proteins in den für die IP verwendeten HEK293, „SUR Δ “ steht für „SUR2B(YS) Δ TMD0“. IP von MYC-getaggttem Kir6.2 führte zur Co-IP von co-exprimiertem SUR2B(YS) Δ TMD0-FLAG (rechte Spalte) und SUR2B(YS)-FLAG (nicht gezeigt).

Auffällig war, dass sowohl SUR2B(YS) Δ TMD0-FLAG als auch SUR2B(YS)-FLAG bei Co-IP durch ihre MYC-getaggte Form zwei Banden, bei Co-IP durch den MYC-getagkten Kir6.2 hingegen nur eine Bande im Western Blot hervorriefen. Die einzelne Bande schien der unteren der zwei Banden zu entsprechen (vgl. Abb. 5-6). Der Zusatz von Tunicamycin, einem Inhibitor der Proteinglycosylierung, ins Kulturmedium der HEK-Zellen änderte nichts am Auftreten der zweiten Bande (vgl. Abb. 5-7), so dass es sich vermutlich nicht um unterschiedlich glycosylierte SUR-Formen handelte.

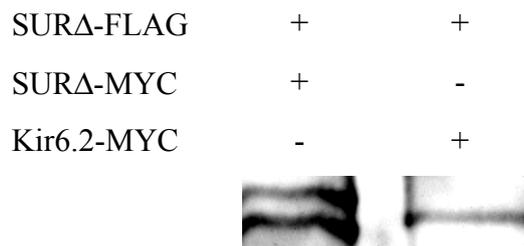


Abb. 5-6: Immunopräzipitation (Anti-MYC) mit anschließendem Western Blot (Anti-FLAG). „+“ kennzeichnet die Expression des jeweiligen Proteins in den für die IP verwendeten HEK293, „SUR Δ “ steht für „SUR2B(YS) Δ TMD0“. Co-IP von SUR2B(YS) Δ TMD0-FLAG durch SUR2B(YS) Δ TMD0-MYC führt im anschließenden Western Blot zu zwei Banden (linke Spalte), Co-IP durch Kir6.2-MYC zu einer Bande (rechte Spalte).

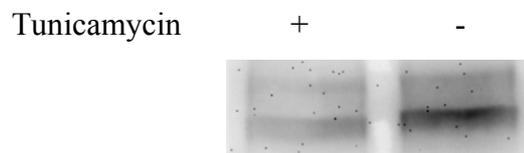


Abb. 5-7: Western Blot (Anti-FLAG) von Zelllysaten (aus Solubilisierung von Membranen) mit SUR2B(YS) Δ TMD0-FLAG. „+“ kennzeichnet, dass das Kulturmedium der für die IP verwendeten HEK293 in der Zeit zwischen Transfektion und Membranpräparation 5 μ g/ml Tunicamycin enthielt. In beiden Fällen, d.h. unabhängig von Tunicamycin, finden sich zwei Proteinbanden (untere Bande jeweils stärker).

5.2.3 Elektrophysiologische Untersuchungen an SUR2B(YS) Δ TMD0 exprimierenden Zellen

Die Bestätigung der Multimerisierung von SUR2B(YS) Δ TMD0 und der Interaktion mit Kir6.2 in den Co-IPs warf die Frage auf, ob besagte Wechselwirkungen ausreichen, um einen funktionellen K_{ATP} -Kanal zu bilden. Dies sollte in Patch-Clamp-Messungen geklärt werden. Zunächst wurden Kir6.2 und SUR2B(YS) Δ TMD0 co-exprimiert, es konnte jedoch kein K_{ATP} -Strom detektiert werden. Um die Möglichkeit auszuschließen, dass der Grund hierfür eine

Retention des Kanalkomplexes im Zellinneren als Folge einer möglicherweise unzureichenden Maskierung des RKR-Motivs von Kir6.2 durch den verkürzten SUR war, wurde SUR2B(YS) Δ TMD0 in der Folge zusammen mit Kir6.2 Δ C26 exprimiert. Dieser C-terminal verkürzte Kir6.2 ist nicht auf die SUR-Untereinheit angewiesen, um die Zellmembran zu erreichen und einen funktionellen Kanal auszubilden (vgl. Kap. 1.2.1). Die daraufhin messbaren Ströme zeigten jedoch keinerlei Reaktion auf P1075 und GBC (w.c.) bzw. MgUDP und GBC (i.o.; vgl. Abb. 5-8) und waren signifikant kleiner als nach Transfektion mit Kir6.2 Δ C26 und intaktem SUR2B(YS) (vgl. Abb. 5-9(a)). Hinsichtlich Aktivität und ATP-Empfindlichkeit konnte kein Unterschied zwischen mit Kir6.2 Δ C26 und SUR2B(YS) Δ TMD0 im Vergleich zu nur mit Kir6.2 Δ C26 transfizierten Zellen entdeckt werden. Dies galt auch für Größe der gemessenen Ströme (vgl. Abb. 5-9(b)).

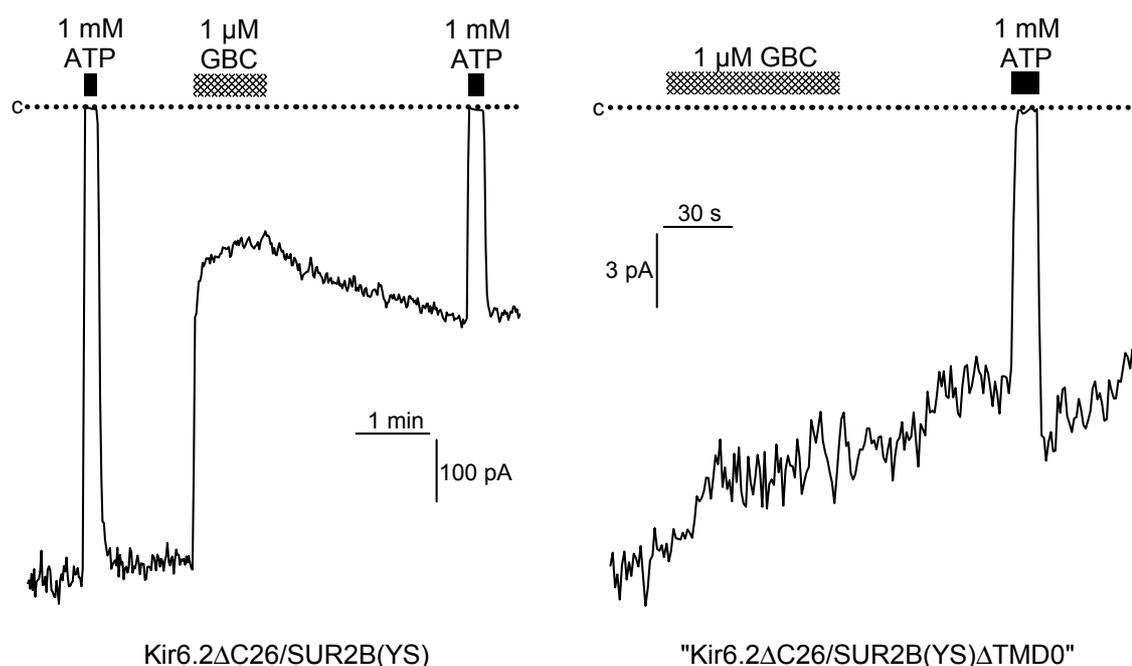


Abb. 5-8: Inside-out-Patch-Clamp-Experimente (-50 mV) zur Wirkung von Glibenclamid (GBC) bei Co-Expression von Kir6.2 Δ C26 und SUR2B(YS) (links) bzw. Kir6.2 Δ C26 und SUR2B(YS) Δ TMD0 (rechts). Während im ersten Fall GBC die erwartete Inhibition hervorrief, wurde im zweiten Fall keine Änderung des Stroms beobachtet. „Kir6.2 Δ C26/SUR2B(YS) Δ TMD0“ wurde bei der Beschriftung des Experiments daher in Anführungszeichen gesetzt, weil unklar ist, ob die dem aufgezeichneten Strom zugrundeliegenden K_{ATP} -Kanäle die SUR-Untereinheit enthielten.

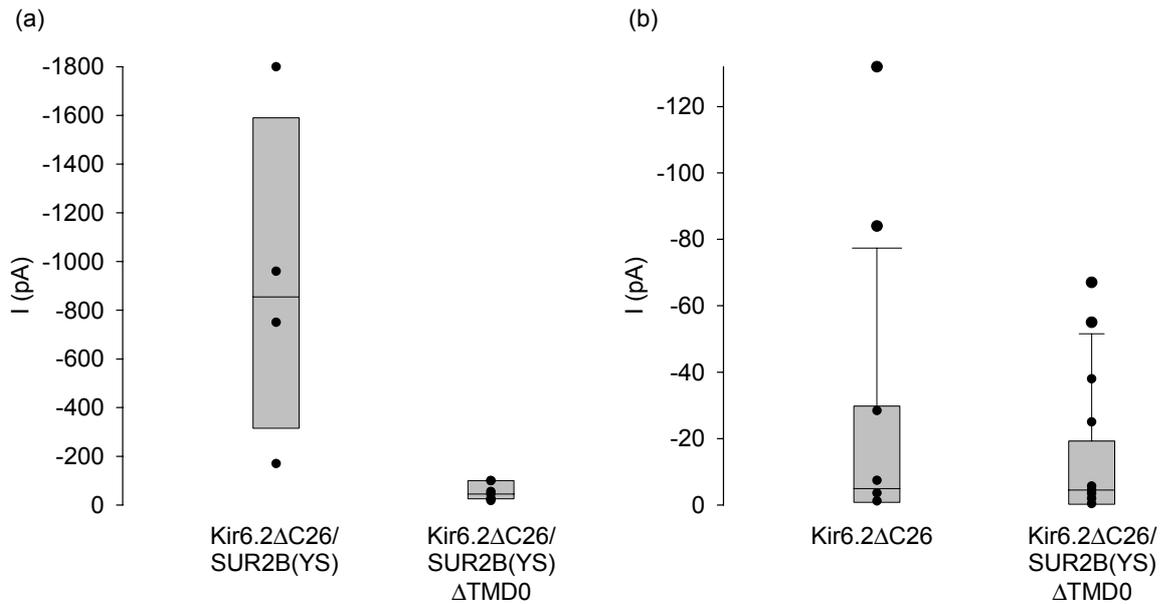


Abb. 5-9: Vergleich von Stromgrößen in inside-out-Messungen (-50 mV). Die Datenpunkte stellen einzelne Experimente dar, der Querstrich in den durch das obere und untere Quartil begrenzten grau schattierten Kästen (\rightarrow „box plot“) den jeweiligen Median. (a) Die Beträge der Ströme nach Transfektion von HEK293 mit Kir6.2 Δ C26 und SUR2B(YS) waren signifikant größer als nach Transfektion mit Kir6.2 Δ C26 und SUR2B(YS) Δ TMD0 (Mann-Whitney-Rangsummentest: $P < 0.01$). (b) Kein statistisch signifikanter Unterschied fand sich hingegen zwischen mit Kir6.2 Δ C26 und mit Kir6.2 Δ C26 und SUR2B(YS) Δ TMD0 transfizierten Zellen. Die jeweils miteinander verglichenen Daten wurden am selben Messtag erhoben.

5.3 Diskussion

Die Co-Immunopräzipitation von FLAG-getaggttem SUR2B(YS) Δ TMD0 durch MYC-getaggtten Kir6.2 (vgl. Abb. 5-5) ist ein klarer Beleg für eine Interaktion der beiden Proteine. Für ein Segment von SUR1, das sich von einschließlich TMD2 bis zum C-Terminus erstreckt, war bereits aus früheren Arbeiten (Chan et al., 2003) bekannt, dass damit eine Co-IP von Kir6.2 möglich ist. Am SUR2 konnten Rainbow et al., 2004 den hierfür kritischen Bereich auf einen Teilabschnitt von NBF2 eingrenzen, der daher vermutlich auch bei der Bildung des SUR2B(YS) Δ TMD0-Kir6.2-Komplexes eine Rolle spielt.

Bisher unbekannt war, ob der Einfluss des Kir auf die Ligandbindung des SUR in Abwesenheit von TMD0 bestehen bleibt. Dass dem so ist, demonstriert die Verbesserung der Affinität von SUR2B(YS) Δ TMD0 für Repaglinid durch Kir6.2 (vgl. Abb. 5-3). Dieser Effekt von Kir6.2 auf die Repaglinid-Bindung scheint für SUR2B(YS) Δ TMD0 schwächer auszufallen als für SUR2B(YS). Alternativ könnten die Daten dahingehend interpretiert werden, dass der Effekt jeweils ähnlich stark ist, jedoch nur ein Teil der SUR2B(YS) Δ TMD0-Proteine im

Komplex mit Kir6.2 vorlag (vgl. Abb. 5-3). Allerdings gaben die Co-IP-Experimente keinen Hinweis darauf, dass die Komplexbildung von Kir6.2 mit SUR2B(YS) Δ TMD0 schwächer ist als mit SUR2B(YS). So oder so spricht eine Modulation der Repaglinid-Bindung durch Co-Expression von Kir6.2 dafür, dass Kontakte zwischen L0/CL3 des SUR und dem N-Terminus von Kir6.2, welche zusammen den B-Teil der Bindungsstelle für Insulinotrope bilden (vgl. Abb. 1-11), im Komplex aus SUR2B(YS) Δ TMD0 und Kir6.2 zumindest teilweise erhalten bleiben. Andererseits deuteten bestimmte Bindungsexperimente darauf hin, dass das Fehlen von TMD0 die Wechselwirkungen zwischen Kir6.2 und SUR2B(YS) durchaus verändert, z.B. verlief die Verdrängung von [³H]P1075 durch GBC an Kir6.2/SUR2B(YS) biphasisch, an Kir6.2/SUR2B(YS) Δ TMD0 hingegen monophasisch (vgl. Tab. 5-1).

Bei Konkurrenz von [³H]GBC und P1075 um die Bindung an SUR2B(YS) ergibt sich in Gegenwart von MgATP eine biphasische Verdrängung des Radioliganden. Zur Erklärung dieses Umstands entwickelten Löffler-Walz et al., 2002 eine Hypothese, die davon ausgeht, dass SUR2B(YS) auch ohne Kir ein Tetramer ausbildet. MgATP induziert nach diesem Modell eine starke negative allosterische Kopplung zwischen den vier GBC-Bindungsstellen, derart, dass die Bindung des ersten Glibenclamidmoleküls die Affinität der übrigen drei SUR-Untereinheiten für Glibenclamid (und andere Insulinotrope) stark verringert. Dies würde erklären, warum die spezifische [³H]GBC-Bindung an SUR2B(YS) durch MgATP um 75 % reduziert wird. Die hochaffine Bindung des Öffners P1075 an die GBC-freien Untereinheiten des Tetramers erhöht dann die K_D von GBC und führt somit zu einem teilweisen Abdissoziieren von [³H]GBC, entsprechend der ersten Komponente der biphasischen Verdrängung. Die zweite Komponente entspricht dann der direkten Konkurrenz von [³H]GBC und P1075 an der selben SUR-Untereinheit (Löffler-Walz et al., 2002).

Ein derartiges Verhalten, d.h. ein durch 1 mM MgATP verursachter Rückgang der maximalen GBC-Bindung (B_{max}) bei unveränderter K_D , sowie eine biphasische Verdrängung von [³H]GBC durch P1075 in Anwesenheit von MgATP, wurde auch für SUR2B(YS) Δ TMD0 beobachtet (vgl. Tab. 5-1 und Abb. 5-2). Erklärt man dies mit dem Modell von Löffler-Walz und Kollegen, folgt daraus, dass TMD0 keine Voraussetzung für die Bildung des Tetramers ist. Tatsächlich konnte durch die Co-Immunopräzipitationsexperimente sowohl für SUR2B(YS), als auch für SUR2B(YS) Δ TMD0 eine Multimerisierung nachgewiesen werden (vgl. Abb. 5-4). Bei Gelfiltration von SUR1 eluiert Letzterer laut Berichten von de Wet et al., 2007 in Form von Monomeren und Tetrameren (in einer Mischung mit höhermolekularen Oligomeren). Die Nukleotidbindungsfalten NBF1 und NBF2 von SUR1 (vgl. Abb. 1-7) bilden jedoch auch noch in isolierter Form Homo-, in einer Mischung auch Heteromultimere

(Mikhailov und Ashcroft, 2000; de Wet et al., 2007). Wahrscheinlich ermöglicht nicht zuletzt diese Eigenschaft auch die Ausbildung von Multimeren aus SUR2B(YS) bzw. SUR2B(YS) Δ TMD0.

Im Rahmen der Co-IPs fiel auf, dass sowohl SUR2B(YS)-FLAG als auch SUR2B(YS) Δ TMD0-FLAG nach IP durch Kir6.2-MYC eine Bande, nach IP durch SUR-MYC (in Abwesenheit von Kir) hingegen zwei Banden im Western Blot hervorriefen (vgl. Abb. 5-5 und Abb. 5-4). Bei der Suche nach den Gründen für das Auftreten zweier Proteinbanden wurde eine mögliche Existenz unterschiedlich glycosylierter SUR2B(YS)-Spezies in Betracht gezogen, da für SUR1 bekannt ist, dass dieser an Asparagin 10 und 1050 (Nummerierung für SUR1 aus Hamster) eine Glycosylierung erfährt (Raab-Graham et al., 1999). Entsprechende Zellslysate enthalten in der Regel eine Mischung von teilglycosyliertem („Core-glycosyliertem“) und vollständig („terminal“) glycosyliertem SUR1, die in Western Blots zwei Banden mit einem apparenten Molekulargewichtsunterschied von ca. 10-30 kD hervorrufen. Kir6.2 wird hauptsächlich im Komplex mit dem vollständig glycosylierten SUR1 gefunden (Clement IV et al., 1997). Bei Inhibition der Glycosylierung durch das Nucleosidantibiotikum Tunicamycin oder nachträglicher Deglycosylierung mit Peptid-N-Glycosidase F (PNGase F) findet sich nur noch eine Proteinbande: unglycosylierter SUR1, dessen Molekulargewicht ca. 3 kD kleiner als das des Core-glycosylierten SUR1 ist (Nelson et al., 1996). Zur Glycosylierung von SUR2 finden sich in der Literatur keine Angaben. In der extrazellulären Schleife zwischen TM12 und 13, welche bei SUR1 N1050 (Hamster) enthält, weist der murine SUR2B(YS) jedoch kein entsprechendes Asparagin auf, und eine etwaige Glycosylierung an N9 (entspricht N10 in SUR1 aus Hamster) kann im Fall von SUR2B(YS) Δ TMD0 wegen des Fehlens von TMD0 inkl. N9 nicht der Grund für das Auftreten zweier Banden sein. Die Konsensussequenz N-X-S/T (X: beliebige Aminosäure), die die potentielle Glycosylierung des in ihr enthaltenen Asparagins anzeigt (Marshall, 1972), findet sich in den gemäß Gonoï und Seino, 2000 extrazellulären Abschnitten von SUR2B(YS) nur an Position 9 und 330. Anders als N9 bleibt N330 zwischen TM 6 und 7 auch bei Deletion von TMD0 erhalten, so dass eine Glycosylierung an dieser Stelle eine Erklärung für die Beobachtung zweier SUR2B(YS) Δ TMD0-Proteinbanden (Core- bzw. terminal glycosyliert) darstellen würde. Allerdings führte die Kultivierung der SUR2B(YS) Δ TMD0-FLAG exprimierenden HEK293 in tunicamycinhaltigem Medium zu keiner Änderung des Bandenmusters im anschließenden Western Blot (vgl. Abb. 5-7). PNGase F-Behandlung führte zu keinem eindeutigen Ergebnis (nicht gezeigt), da die von vornherein schwächere

obere Bande, die dem terminal glycosylierten Protein entsprechen würde und bei enzymatischer Deglycosylierung verschwinden müsste, auch in einem zur Kontrolle analog, jedoch ohne Zusatz des Enzyms, behandelten Ansatz, im anschließenden Western Blot zu diffus war, um sie vom Hintergrund klar unterscheiden zu können. Die einzelne Bande, die bei Co-IP von SUR2B(YS) Δ TMD0-FLAG durch Kir6.2-MYC beobachtet wurde, entsprach in ihrem Laufverhalten der unteren der beiden Banden, die bei Co-IP von SUR2B(YS) Δ TMD0-FLAG durch SUR2B(YS) Δ TMD0-MYC auftraten (vgl. Abb. 5-6). Wenn die Banden tatsächlich unterschiedliche Glycoformen darstellen, würde dies bedeuten, dass Kir6.2 vorzugsweise mit dem Core-glycosylierten SUR2B(YS) Δ TMD0 (bzw. SUR2B(YS)) einen Komplex bildet. Dies erscheint wenig plausibel, zumal für SUR1 ein gegenteiliges Verhalten beschrieben wurde (Clement IV et al., 1997).

Die obere SUR2B(YS) Δ TMD0-FLAG-Bande war in der Mehrzahl der Western Blots deutlich schwächer ausgeprägt als die untere Bande (vgl. Abb. 5-7). Falls die Wechselwirkungen zwischen SUR2B(YS) Δ TMD0-Molekülen stärker als zwischen SUR2B(YS) Δ TMD0 und Kir6.2 sind, würde man erwarten, dass bei Co-IP durch Kir6.2-MYC die relative Intensität beider Banden abnimmt. In einzelnen Experimenten könnte dann die Menge an immunopräzipitierter apparent höhermolekularer Form von SUR2B(YS) Δ TMD0-FLAG unter der Nachweisgrenze liegen, während die Menge an immunopräzipitierter apparent niedermolekularer Form noch nachweisbar ist. Selbst wenn diese Annahme tatsächlich zutreffen sollte, erklärt sie jedoch nicht, warum überhaupt zwei unterschiedliche SUR-Spezies entstehen.

Art und Entstehung der zweiten Bande konnten somit nicht aufgeklärt werden. Da in den entsprechenden Negativkontrollen keine der beiden Banden erschien (vgl. Abb. 5-4), stellen die Experimente nichtsdestotrotz einen klaren Beweis dar, dass SUR2B(YS) Δ TMD0 sowohl mit sich selbst als auch mit Kir6.2 einen Proteinkomplex ausbildet.

Trotz der in den Bindungsstudien und Co-IPs nachgewiesenen Interaktionen zwischen SUR2B(YS) Δ TMD0 und Kir6.2, ergaben die elektrophysiologischen Untersuchungen keinerlei Hinweise auf funktionelle Kir6.2/SUR2B(YS) Δ TMD0-Kanäle. Dies lag nicht an einer etwaigen unzureichenden Maskierung des Retentionsmotivs von Kir6.2. So waren die Ströme, die nach Co-Expression von Kir6.2 Δ C26 und SUR2B(YS) Δ TMD0 auftraten, nicht nur völlig unempfindlich gegen Glibenclamid (vgl. Abb. 5-8), P1075 und MgUDP, sondern auch durchwegs kleiner als bei Kir6.2 Δ C26/SUR2B(YS) (vgl. Abb. 5-9(a)), d.h. die Aktivitätssteigerung, die SUR2B(YS) bei Kir6.2 Δ C26 hervorrief, blieb im Fall von

SUR2B(YS) Δ TMD0 aus. Auf Grundlage der durchgeführten Messungen lässt sich ein Szenario nicht ausschließen, in dem SUR2B(YS) Δ TMD0 mit Kir6.2 Δ C26 (nicht jedoch mit Kir6.2) die Zellmembran erreicht, bedingt durch das Fehlen von TMD0 jedoch keinerlei Einfluss auf die Aktivität dieses K_{ATP} -Kanals ausüben kann. Wahrscheinlicher aber ist, dass SUR2B(YS) Δ TMD0 bzw. ein Komplex aus SUR2B(YS) Δ TMD0 und Kir vom Kontrollsystem des ER/Golgi als fehlerhaft erkannt und zurückgehalten wird. Dies wäre im Einklang mit der Beobachtung von Chan et al., 2003, dass SUR1 Δ TMD0 bei Co-Expression mit TMD0 und Kir6.2 selbst dann nicht an der Zelloberfläche nachgewiesen werden kann, wenn das RKR-Retentionsmotiv in SUR1 Δ TMD0 zu AAA mutiert wurde.

Falls auch SUR2B(YS) Δ TMD0 im Zellinneren verbleibt, sollten Wechselwirkungen mit Kir6.2 Δ C26 dessen Oberflächenexpression reduzieren („trapping“; Schwappach et al., 2000). Außerdem sollten Zellen, deren Translationssystem nicht mit der Herstellung von SUR2B(YS) Δ TMD0 belastet wird, tendenziell eine größere Menge an Kir6.2 Δ C26 produzieren können. Tatsächlich aber war kein signifikanter Unterschied im Stromniveau bei Expression von Kir6.2 Δ C26 allein im Vergleich zur Co-Expression mit SUR2B(YS) Δ TMD0 festzustellen (vgl. Abb. 5-9(b)). Anscheinend wird nur ein geringer Anteil von Kir6.2 Δ C26 komplexiert. Andererseits waren die Bindungskräfte zwischen SUR2B(YS) Δ TMD0 und Kir6.2 stark genug, um eine Co-IP von SUR2B(YS) Δ TMD0 durch Kir6.2 zu ermöglichen (vgl. Abb. 5-5), und die Radioligandbindungsexperimente in Anwesenheit von Kir6.2 ergaben keinen Hinweis auf unkomplexierten SUR2B(YS) Δ TMD0. Daher ist die trotz Co-Expression von SUR2B(YS) Δ TMD0 scheinbar unveränderte Oberflächenexpression von Kir6.2 Δ C26 wohl auf einen Überschuss der porenbildenden Untereinheit als Folge einer langsameren Biosynthese und/oder schnelleren Abbaus von SUR2B(YS) Δ TMD0 zurückzuführen. Eine genaue quantitative Analyse ist jedoch schwierig und anhand der relativ geringen Zahl an Einzelexperimenten ohnehin nicht möglich.

Die Untersuchungen belegen, dass SUR2B(YS) Δ TMD0 Homo- und mit Kir6.2 Heteromultimere (vermutlich Tetramere) bildet, was sich u.a. auf die Affinität von SUR2B(YS) Δ TMD0 für Repaglinid auswirkt. Das bedeutet, dass relevante Interaktionen zwischen den SUR- bzw. SUR- und Kir-Untereinheiten existieren, die nicht auf TMD0 angewiesen sind. Die Ergebnisse unterstreichen dennoch die elementare Bedeutung von TMD0, da aus Co-Expression von Kir6.2 und SUR2B(YS) Δ TMD0 keine funktionellen K_{ATP} -Kanäle resultieren.

6 Charakterisierung der DEND-Mutation Kir6.2(V59G) – Implikationen für die Funktion von Kir-N-Terminus und Gleithelix

6.1 Fragestellung

Die schwerwiegenden pathologischen Symptome des DEND-Syndroms wurden in Kap. 1.2.2.1 angeführt. Wie an selber Stelle beschrieben kennt man heute eine ganze Reihe von Kir6.2- und SUR1-Mutationen, die dieses Krankheitsbild als Folge einer drastisch erhöhten K_{ATP} -Kanalaktivität hervorrufen, darunter die Mutante Kir6.2(V59G) (vgl. Tab. 1-2, S. 18). Die Lokalisation von Valin 59 in der sog. Gleithelix (vgl. Abb. 1-2, S. 3) wirft die Frage nach der Rolle des Kir6.2-N-Terminus im allgemeinen und der Gleithelix im besonderen bei der Regulation des K_{ATP} -Kanals auf. Um diesbezüglich neue Erkenntnisse zu gewinnen, sollte eine gründliche Charakterisierung obiger Mutanten vorgenommen werden, ergänzt durch Experimente an der i-DEND-Mutanten Kir6.2(V59A), einem N-terminal um zehn Aminosäuren verkürzten Kir6.2 („Kir6.2 Δ N10“), sowie dem analog zu Kir6.2(V59G) mutierten Kir6.1(I60G).

6.2 Ergebnisse

In einer umfassenden Charakterisierung wurde die Sensitivität von humanem Kir6.2(V59G)/SUR1 auf Ba^{2+} , ATP, Glibenclamid, Repaglinid, die Phospholipide Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat (PIP_2) und Oleoyl-CoA, sowie die Polykationen Neomycin, Gentamicin und Poly-D-Lysin untersucht und mit der jeweiligen Reaktion des wildtypischen Kanals verglichen. Ergänzt wurden diese Untersuchungen durch Experimente an Kir6.2(V59A)/SUR1, Kir6.2 Δ N10/SUR1 und Kir6.1/SUR1 bzw. Kir6.1(I60G)/SUR1. Die Messungen an Kir6.2(V59A)/SUR1 wurden von U. Ruß, an den Kir6.1-Kanälen von R. Lutz (beide Abt. Molpharm.) durchgeführt. Ziel des Projekts war ein verbessertes Verständnis der Funktion von Kir-N-Terminus und Gleithelix.

6.2.1 Sekundärstrukturvorhersagen: (Zer-)Stört Glycin 59 die Gleithelix?

Die Bioinformatik hat eine Vielzahl an Algorithmen für die Berechnung und Vorhersage von Proteinstrukturen und –Eigenschaften auf Grundlage der jeweiligen Aminosäuresequenz entwickelt. Fünf über das Internet frei zugängliche Programme (PREDATOR, Jpred, PSIPRED, nnpredict und PHD; für Referenzen siehe Rost, 2003) wurden verwendet, um *in*

silico potentielle Strukturänderungen der Gleithelix infolge der V59G-Mutation zu erkunden. Mit Ausnahme von Jpred erkannten sämtliche dieser Programme in der wildtypischen Kir6.2-Sequenz die Gleithelix, d.h. eine V59 umfassende Helix. Während PSIPRED und PHD für Kir6.2(V59G) die selbe Sekundärstruktur berechneten wie für den Wildtyp, sagten PREDATOR und nnpredict voraus, dass der Austausch von Valin 59 gegen Glycin (nicht jedoch gegen Alanin) die Ausbildung der Gleithelix verhindert. Zu analogen Ergebnissen kamen die Programme jeweils für die Mutation I60G in Kir6.1.

6.2.2 Identischer Block von Kir6.2/SUR1 (wt) und Kir6.2(V59G)/SUR1 durch Ba²⁺

Die Nulllinie des K_{ATP}-Stroms, d.h. dessen Unterscheidung von „Leckströmen“, die bei unvollständiger Abdichtung zwischen Zellmembran und Messpipette auch bei 100 % Inhibition der K_{ATP}-Kanäle bestehen bleiben, wurde in inside-out-Messungen am wildtypischen Kanal mit Hilfe von 1 mM ATP (bzw. MgATP) bestimmt. Im Fall von Kir6.2(V59G)/SUR1 war dies jedoch aufgrund dessen drastisch verminderter ATP-Empfindlichkeit (vgl. Kap. 6.2.3) so nicht möglich. Ba²⁺ schien hingegen in ersten Tests sowohl am wildtypischen als auch am mutanten Kanal ein effizienter Blocker zu sein, woraufhin in der inside-out-Konfiguration eine genaue Untersuchung des Ba²⁺-Blocks durchgeführt wurde. Da das auf die Innenseite der Zellmembran applizierte Ba²⁺ sich bei negativem Potential von den K_{ATP}-Kanälen wegbewegt, bzw. von den einströmenden Kaliumionen aus der Pore gedrängt wird und somit wirkungslos bleibt, wurden diese Experimente bei einer Spannung von +50 mV durchgeführt. Wie aus Abb. 6-1 ersichtlich, kann mit Ba²⁺ unabhängig von der V59G-Mutation ein vollständiger und reversibler Block des pankreatischen K_{ATP}-Kanals erreicht werden (IC₅₀ = 4 μM). Dies wurde genutzt, um am Anfang aller nachfolgenden inside-out-Experimente mit dem V59G-Kanal jeweils zunächst den mit 1 mM Ba²⁺ bei +50 mV verbleibenden Leckstrom zu bestimmen, um diesen nach Umkehr des Vorzeichens als Nulllinie des K_{ATP}-Stroms bei -50 mV festzusetzen. Auch in whole-cell-Messungen erwies sich Ba²⁺ als effizienter Blocker von wildtypischem und mutantern Kanal (vgl. Abb. 6-2(b)).

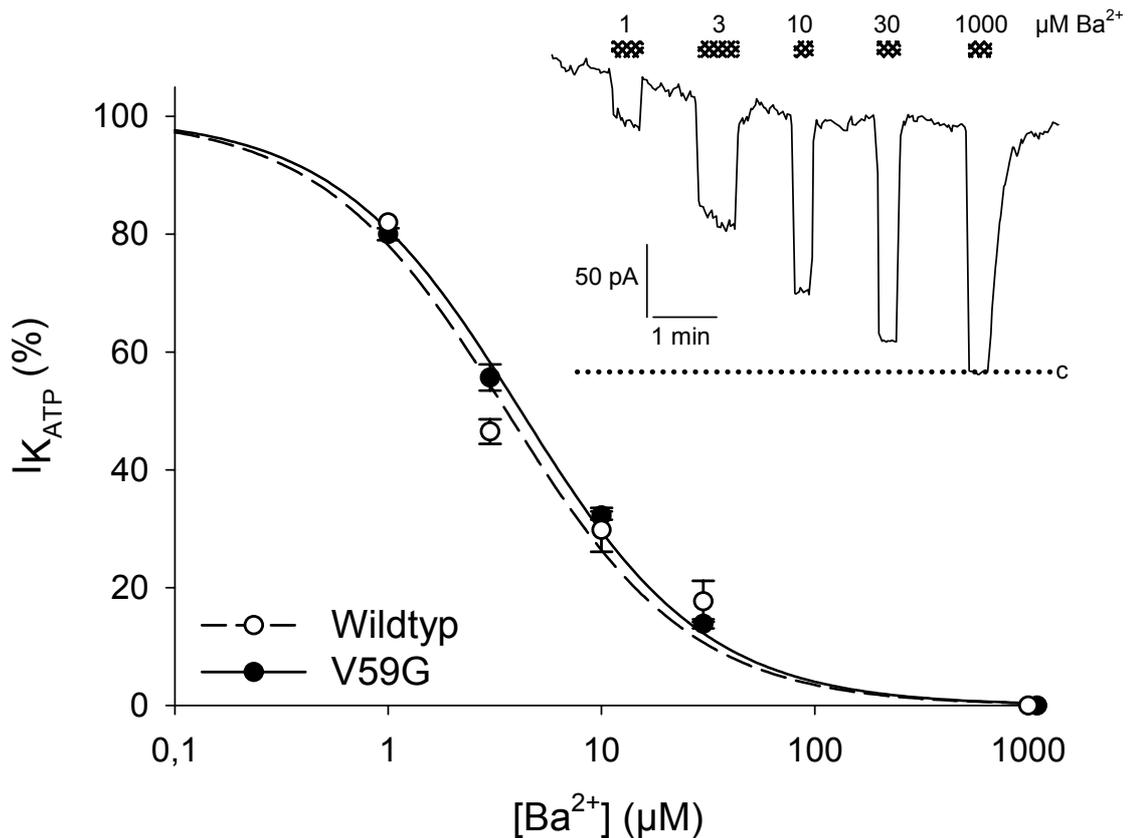


Abb. 6-1: Konzentrations-Wirkungs-Kurve zum Block von Kir6.2/SUR1 und Kir6.2(V59G)/SUR1 durch Ba^{2+} bei einer Spannung von +50 mV in der inside-out-Konfiguration der Patch-Clamp-Technik. Aufgetragen ist der K_{ATP} -Strom I in % vom Ausgangsstrom I_0 (bei $[\text{Ba}^{2+}] = 0$). Die Datenpunkte stellen die Mittelwerte aus sechs (wt) bzw. acht (V59G) Einzelerperimenten dar. Die Regression der Daten mit Hill-Koeffizient $n_H := 1$ nach der Gleichung $100 \% \cdot \frac{I}{I_0} = 100 \% \cdot \frac{1}{1 + 10^{pI_{C_{50}} - p[\text{Ba}^{2+}]}}$ ergab einen $pI_{C_{50}}$ von 5.45 ± 0.07 (wt) bzw. 5.38 ± 0.02 (V59G). Dies stellt keinen statistisch signifikanten Unterschied dar, d.h. die Mutation V59G hat keinen Einfluss auf die Inhibition des Kanals durch Ba^{2+} ($IC_{50} \approx 4 \mu\text{M}$). Die eingefügte Spur zeigt ein typisches Einzelerperiment (V59G).

6.2.3 Inhibition durch ATP, Glibenclamid und Repaglinid

Proks et al., 2004 berichteten, dass bei Co-Expression von wildtypischem Kir6.2 mit Kir6.2(V59G) (\rightarrow Simulation des heterozygoten Zustands) und SUR1 in *Xenopus* Oocyten 500 μM Tolbutamid lediglich 41 % der whole-cell-Ströme inhibieren (im Vergleich zu 100 % am Wildtyp). Ein erster Schritt bei der Charakterisierung von Kir6.2(V59G) in unserer Arbeitsgruppe bestand darin, die Empfindlichkeit des K_{ATP} -Kanals für Sulfonylharnstoffe zu untersuchen, wenn jede Kir-Untereinheit die V59G-Mutation enthält (\rightarrow homozygoter Zustand). Hierzu wurden humaner Kir6.2(V59G) und humaner SUR1 in HEK293 exprimiert

und in der whole-cell-Konfiguration die Wirkung von Glibenclamid in einer Konzentration von bis zu 1 μM getestet.

Bereits vor Applikation von GBC fiel ein elementarer Unterschied zwischen wildtypischem Kir6.2/SUR1 und der Mutanten auf: Während Ersterer erst unter dem Einfluss der Nukleotide (1 mM MgATP, 0.3 mM GDP) der Pipettenlösung Kanalaktivität entwickelte, waren die V59G-Kanäle von Anfang an aktiv. Diese Aktivität wurde durch Glibenclamid (1 μM) in keinerlei Weise beeinträchtigt, wohingegen der Sulfonylharnstoff am Wildtyp eine schnelle und komplette Inhibition induzierte (vgl. Abb. 6-2).

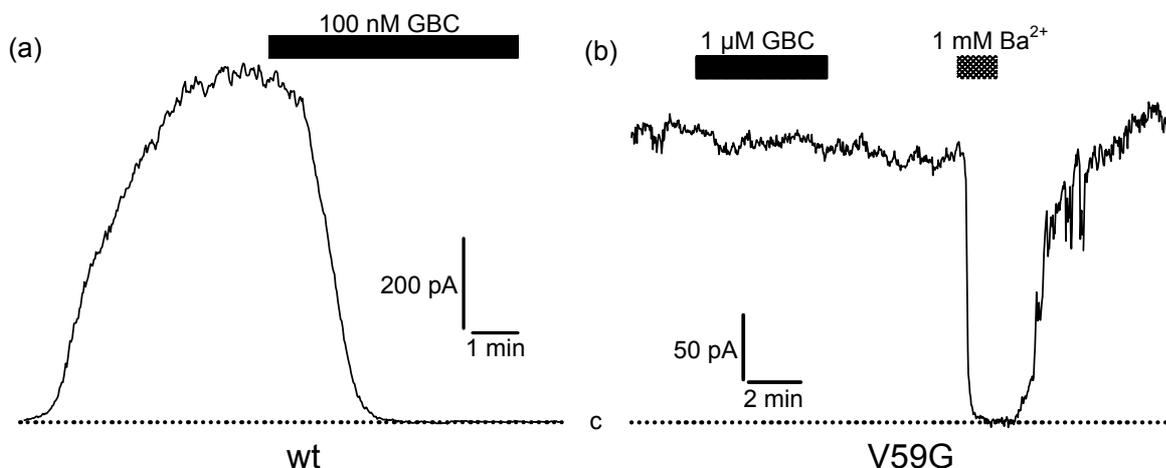


Abb. 6-2: Whole-cell-Patch-Clamp-Experimente (-60 mV): Wirkung von Glibenclamid (GBC) auf (a) Kir6.2/SUR1 und (b) Kir6.2(V59G)/SUR1. Die gepunktete Linie stellt jeweils das „Null-Niveau“ des K_{ATP} -Stroms dar. Die Dialyse der Zelle mit der Pipettenlösung (1 mM MgATP, 0.3 mM MgGDP; vgl. Kap. 2.10.8.1) nach Herstellung der whole-cell-Konfiguration (vgl. Kap. 2.10.1) führte zur Aktivierung der zunächst geschlossenen wildtypischen Kanäle, während die mutanten Kanäle bereits von Anfang an aktiv waren. 100 nM GBC hemmten den Wildtyp vollständig und (für die Dauer des Experiments) irreversibel, im Gegensatz zur Mutanten, die durch GBC (1 μM) überhaupt nicht, jedoch vollständig durch Ba^{2+} (1 mM) gehemmt wurde. Gezeigt ist je eines von insgesamt neun (wt) bzw. zwölf (V59G) Einzelexperimenten.

Auch Kir6.2(V59A)/SUR1 zeigte in analogen Ganzzell-Experimenten von Anfang an Aktivität. GBC (1 μM) rief hier jedoch anders als bei Kir6.2(V59G)/SUR1 eine Inhibition von ca. 40 % des Ausgangsstroms hervor. Bei einer höheren Nukleotidkonzentration (10 mM MgATP) der Pipettenlösung erzielte Glibenclamid auch im Fall von Kir6.2(V59G)/SUR1 eine gewisse Hemmung ($20 \pm 4 \%$, $n = 4$). Dieses Phänomen einer „Potenzierung“ der GBC-Wirkung durch hohe ATP-Konzentrationen (bzw. umgekehrt) sollte daraufhin in inside-out-Messungen näher erforscht werden.

Abb. 6-3 zeigt die starken Effekte von ATP und GBC auf den wildtypischen Kir6.2/SUR1. Dieser wurde durch ATP (1 mM) vollständig, durch GBC (10 nM) zu ca. 70-80 % (Wert schwankte zwischen einzelnen Patches) inhibiert.

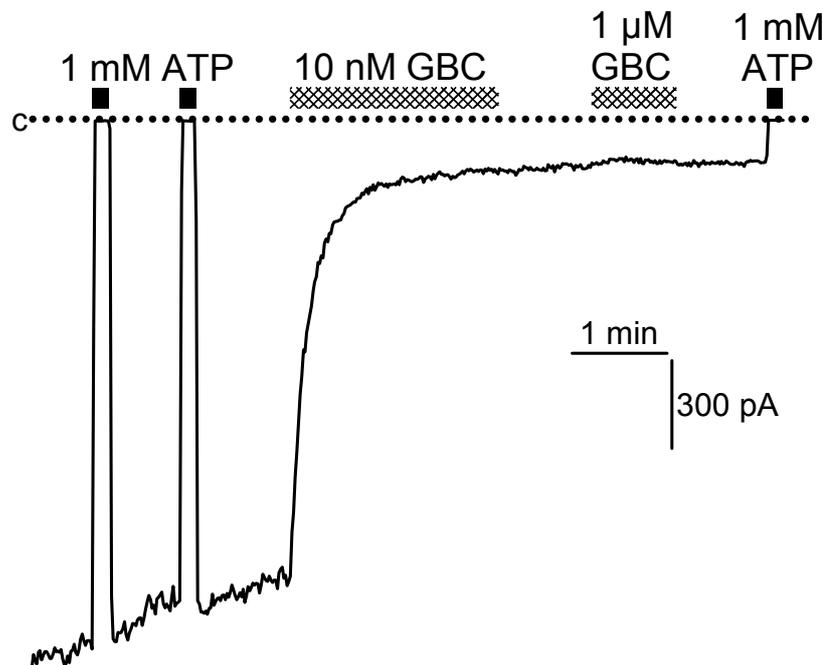


Abb. 6-3: Kir6.2/SUR1: Inside-out-Patch-Clamp-Experiment (-50 mV) zur Wirkung von Glibenclamid (GBC) und ATP. Der wildtypische Kanal wurde durch 1 mM ATP komplett inhibiert. GBC rief bereits in einer Konzentration von 10 nM eine maximale Hemmung von durchschnittlich ca. 70-80 % (hier: ~ 90 %) des Ausgangsstroms hervor. Der Effekt war im Zeitrahmen der Experimente irreversibel.

An Kir6.2(V59G)/SUR1 hingegen bewirkten 10 mM MgATP in den i.o.-Messungen nur eine sehr mäßige Inhibition. Erfolgte die Applikation jedoch in Gegenwart von 1 μ M Glibenclamid, so war der Hemmeffekt wesentlich ausgeprägter (Steigerung von < 10 auf ca. 25 % in Abb. 6-4(a)), obwohl der Sulfonylharnstoff in Abwesenheit von Nukleotiden völlig wirkungslos blieb. Konsistent mit der hohen Affinität von SUR1 für Glibenclamid (vgl. Abb. 3-3), wurde solch eine Verbesserung der ATP-Inhibition bereits bei niedrigeren GBC-Konzentrationen als 1 μ M beobachtet. So genügte in dem repräsentativen Experiment aus Abb. 6-4(c) eine Konzentration von 10 nM für die maximale GBC-bedingte Steigerung der Inhibition durch 30 mM MgATP von ca. 15 auf ca. 75 %. Die Konzentrationsabhängigkeit der inhibitorischen Wirkung von MgATP auf Kir6.2(V59G)/SUR1 in An- und Abwesenheit von Glibenclamid ist in Abb. 6-5(a) dargestellt. Für den Fall, dass bei extrem hohen MgATP-Konzentrationen stets eine vollständige Hemmung des mutanten Kanals erreicht wird, liefert die Regressionsanalyse der Daten IC_{50} -Werte von ca. 200 mM (ohne GBC) bzw. 20 mM (mit GBC) (vgl. Abb. 6-5(a) und Tab. 6-1).

In Mg^{2+} -freier Lösung erwies sich ATP, dessen SUR-vermittelte Aktivierung des K_{ATP} -Kanals in Abwesenheit von Mg^{2+} unterbleibt (vgl. Kap. 1.2.3.1.2), auch am mutanten Kanal als deutlich potenterer Inhibitor. Glibenclamid, das sich auch unter diesen Bedingungen in Abwesenheit von ATP als wirkungslos erwies, steigerte die Potenz des Nukleotids von $IC_{50} = 21$ mM auf $IC_{50} = 3.1$ mM (exemplarische Einzelexperimente: Abb. 6-4(b,d); Analyse und Zusammenfassung: Abb. 6-5(b) und Tab. 6-1).

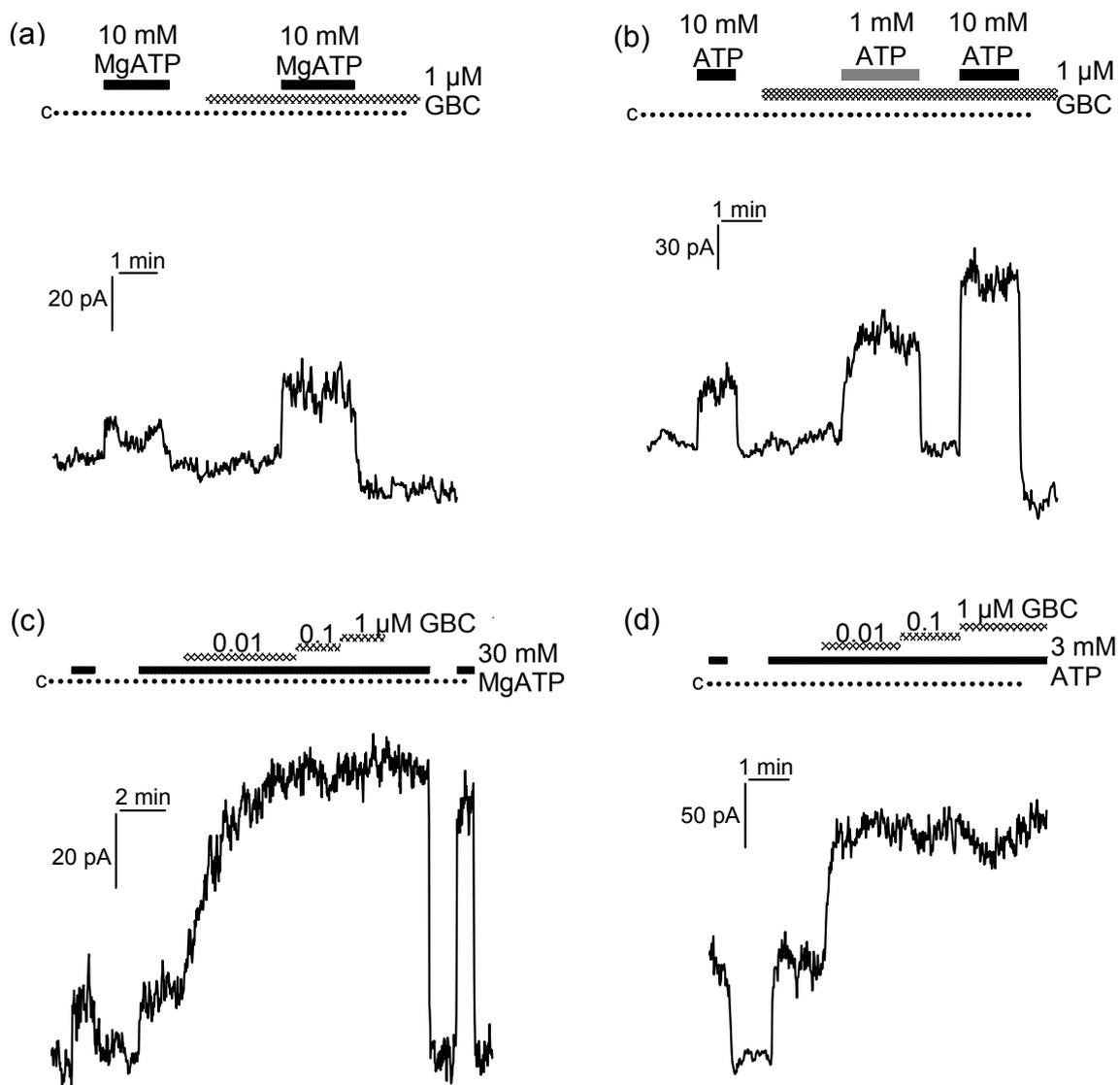


Abb. 6-4: Inhibition von Kir6.2(V59G)/SUR1 in der i.o.-Konfiguration durch MgATP bzw. ATP in An- und Abwesenheit von Glibenclamid bei -50 mV: repräsentative Einzelexperimente. Die gepunktete Linie stellt jeweils das „Null-Niveau“ des K_{ATP} -Stroms dar (vgl. Text). (a) GBC (1 μ M) allein war wirkungslos, erhöhte jedoch die Inhibition durch 10 mM MgATP von < 10 auf ca. 25 %. (b) Ohne Mg^{2+} wurden hier mit 10 mM ATP 20 % Inhibition erzielt, ein Wert, der in Gegenwart von GBC bereits mit 1 mM ATP übertroffen und mit 10 mM ATP auf ca. 50 % gesteigert wurde. (c,d) Für die maximale Verstärkung der Hemmwirkung von MgATP (30 mM) bzw. ATP (3 mM) genügt eine GBC-Konzentration von 10 nM.

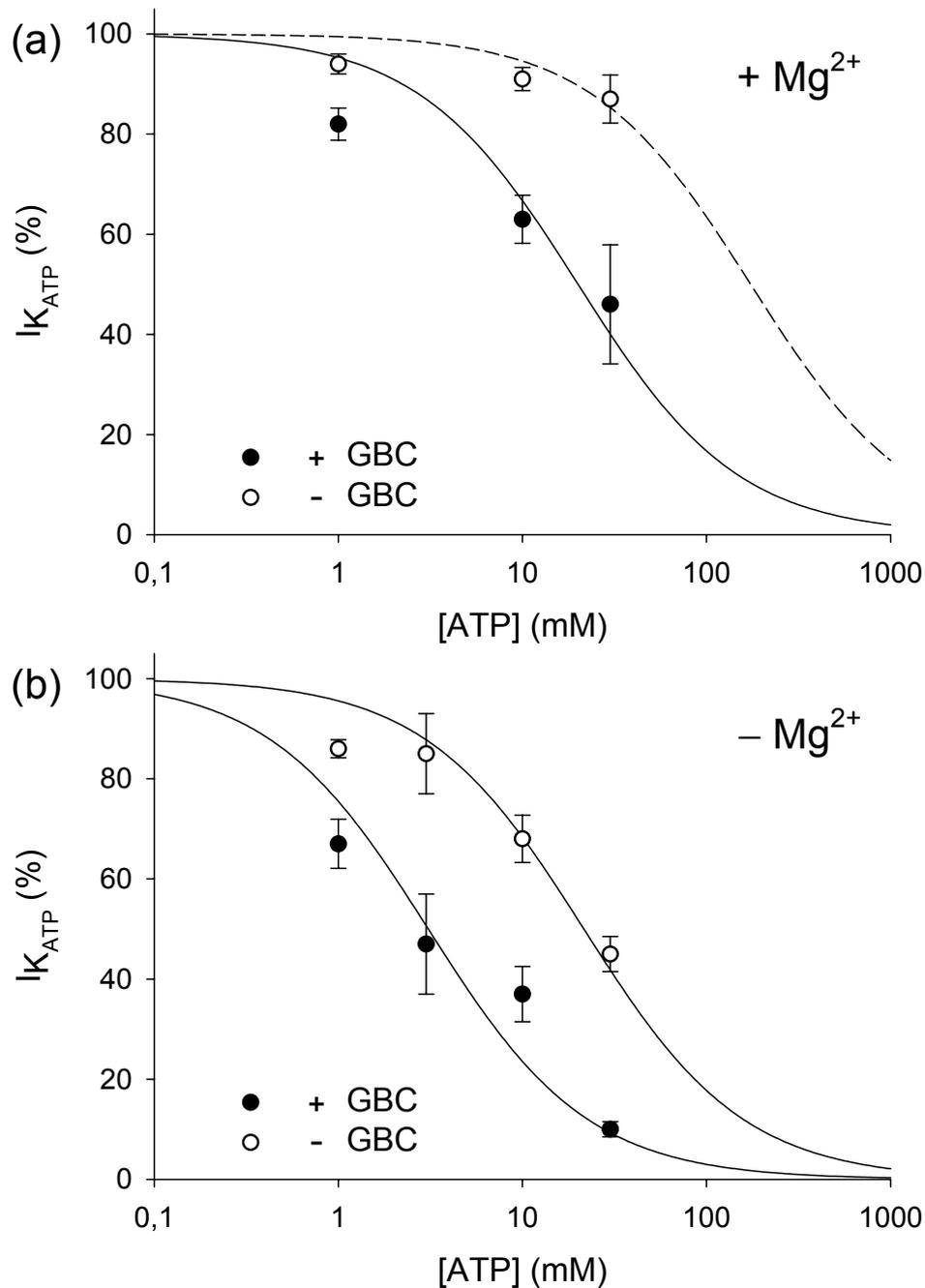


Abb. 6-5: Inhibition von Kir6.2(V59G)/SUR1 in der i.o.-Konfiguration durch MgATP bzw. ATP in An- und Abwesenheit von Glibenclamid bei -50 mV; Bestimmung der IC_{50} -Werte. Aufgetragen ist der Strom I in % von I_0 (Strom in Abwesenheit von ATP) als Funktion der (a) MgATP- bzw. (b) ATP-Konzentration. Die Datenpunkte stellen die Mittelwerte aus je 3-14 Einzelerperimenten dar.

Regressionsanalyse nach der Gleichung $100 \% \cdot \frac{I}{I_0} = 100 \% \cdot \frac{1}{1 + 10^{pIC_{50} - p[ATP]}}$ ergab pIC_{50} -Werte von

(a) 0.76 ± 0.15 (- GBC) und 1.70 ± 0.14 (+ GBC)

(b) 1.67 ± 0.08 (- GBC) und 2.51 ± 0.11 (+ GBC) (vgl. auch Tab. 6-1)

Die ATP-Empfindlichkeit von Kir6.2(V59A)/SUR1 war im Vergleich zum Wildtyp stark verringert, aber dennoch deutlich höher als die des V59G-Kanals. Erneut wurde eine

Verstärkung der ATP-Hemmung durch GBC beobachtet (vgl. Tab. 6-1). Letzteres erwies sich in Abwesenheit von ATP als wenig effizienter Inhibitor (vgl. Tab. 6-2).

Tab. 6-1: ATP-Inhibition von Kir6.2(V59G)/SUR1 und Kir6.2(V59A)/SUR1 in An- (+) und Abwesenheit (-) von GBC und Mg^{2+} (vgl. auch Abb. 6-5).

Mg^{2+} ^a	GBC (1 μ M)	V59G	V59A	
		IC ₅₀ ^b (mM)	IC ₅₀ ^b (mM)	n _H ^c
+	-	~ 200 ? ^d	2.3 (0.9,5.9)	0.47 ± 0.13
+	+	20 (10,38)	0.36 (0.28,0.48)	0.85 ± 0.10
-	-	21 (15,31) ^e	0.32 (0.21,0.49)	1.3 ± 0.2
-	+	3.1 (1.9,5.1) ^f	0.11 (0.077,0.15)	1.3 ± 0.2

^a: Die Mg^{2+} -Gesamtkonzentration war äquivalent der ATP-Konzentration plus 0.7 mM, d.h. $[Mg^{2+}]_{\text{frei}} \approx 0.7$ mM. ^b: IC₅₀ mit jeweiligem 95%-Konfidenzintervall. ^c: Für V59G wurde der Hill-Koeffizient zu 1.0 festgesetzt. ^d: unsicherer Wert (vgl. Abb. 6-5). ^e: signifikant unterschiedlich von den Werten in Anwesenheit von Mg^{2+} oder GBC ($P < 0.05$), aber nicht von Mg^{2+} und GBC. ^f: signifikant unterschiedlich vom Wert in Anwesenheit von GBC und Mg^{2+} ($P < 0.05$). Die statistischen Tests wurden jeweils mit den zugehörigen normal-verteilten pK_I -Werten durchgeführt (vgl. Kap. 2.11).

Repaglinid anstelle von Glibenclamid verbesserte in analogen Experimenten ebenfalls die Hemmung des V59G-Kanals durch 10 mM MgATP ($5 \pm 2\% \rightarrow 50 \pm 7\%$ ($n = 4$); vgl. Abb. 6-6). Für diese Substanz ist aus Bindungsstudien bekannt, dass Kir6.2 ihre Affinität im Vergleich zur Bindung an SUR1 alleine (d.h. ohne Kir) drastisch erhöht (von $K_I \approx 90$ nM auf < 1 nM; vgl. Tab. 3-3). Konkurrenzexperimente zur Verdrängung von [³H]GBC durch Repaglinid an Kir6.2(V59G)/SUR1 (intakte HEK293-Zellen) ergaben einen K_I , der mit 0.70 nM (0.55;0.87) ($n = 3$) im Rahmen des experimentellen Fehlers identisch mit am wildtypischen Kanal erhobenen Daten ist (vgl. Tab. 3-3). Die Mutation interferiert also offensichtlich nicht mit der Rolle von Kir6.2 bei der Bindung der untersuchten Insulinotrope, jedoch entscheidend mit der Transduktion dieser Bindung in eine Schließung des Kanals.

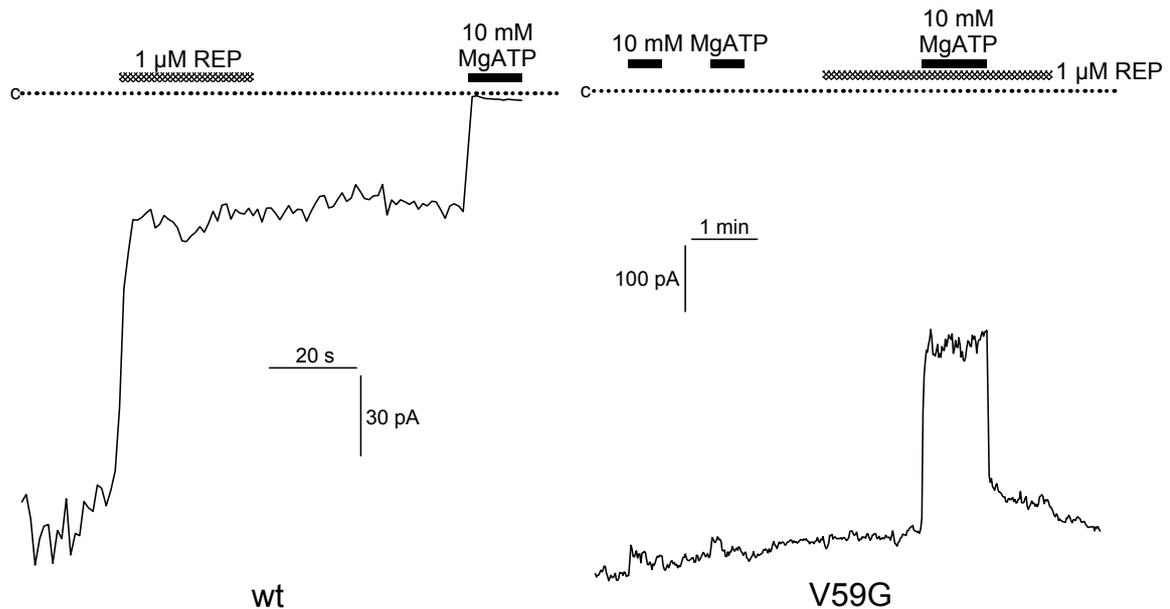


Abb. 6-6: Inhibition von Kir6.2/SUR1 (wt) und Kir6.2(V59G)/SUR1 durch Repaglinid (REP) und MgATP (i.o./-50 mV); repräsentative Einzelexperimente. Die gepunktete Linie stellt jeweils das „Null-Niveau“ des K_{ATP} -Stroms dar. Während der wildtypische Kanal durch Repaglinid (1 μ M) zu ca. 70 % und durch MgATP (10 mM) komplett inhibiert wurde, war Repaglinid an der Mutanten in Abwesenheit von Nukleotiden völlig wirkungslos. Bei gleichzeitiger Applikation von 10 mM MgATP verstärkt REP jedoch den Hemmeffekt des Nukleotids, hier von ca. 2 auf etwa 40 %, im Durchschnitt von 5 ± 2 auf 50 ± 7 % ($n = 4$).

Ähnlich wie die V59G-Mutation zieht auch die Verkürzung des Kir6.2-N-Terminus eine Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit nach sich (Reimann et al., 1999b), so dass sich in diesem Zusammenhang die Frage nach der GBC-Empfindlichkeit dieses Kanals (Kir6.2 Δ N10/SUR1) stellte. Wie in Tab. 6-2 festgehalten, erwies sich diese als im Vergleich zum Wildtyp stark reduziert.

6.2.4 Aktivierung durch Phospholipide – Inhibition durch Polykationen

Die Wirkung von Phospholipiden und inhibitorischen Polykationen wurde in der inside-out-Konfiguration studiert. Exemplarische Einzelexperimente sind in Abb. 6-7 gezeigt, eine Zusammenfassung findet sich in Tab. 6-2. PIP₂ (10 μ M) und Oleoyl-CoA (1 μ M) riefen am wildtypischen Kanal eine Steigerung der Aktivität auf 900 ± 390 % ($n = 13$) bzw. 300 ± 90 % ($n = 11$) des K_{ATP} -Stroms vor ihrer Applikation hervor. Während der PIP₂-Effekt auch nach Ende der Applikation anhielt (vgl. Abb. 6-7(a)), erwies sich die Aktivierung durch Oleoyl-CoA nach Umschalten auf phospholipidfreie Lösung als schnell reversibel (nicht gezeigt). Die

hohe Aktivität von Kir6.2(V59G)/SUR1 hingegen konnte durch PIP₂ und Oleoyl-CoA nicht noch weiter erhöht werden. Dies ließ zwei Schlüsse zu: Entweder reicht für diesen Kanal die Menge an endogenen, d.h. bereits in der Zellmembran enthaltenen Phospholipiden bereits für eine maximale Aktivierung aus oder Kir6.2(V59G)/SUR1 ist für seine hohe Offenwahrscheinlichkeit überhaupt nicht mehr auf diese Aktivatoren angewiesen. Um diese Frage zu klären, kamen Polykationen zum Einsatz, deren Wechselwirkungen mit den Phospholipiden die aktivierende Wirkung der Letzteren auf den K_{ATP}-Kanal unterbinden. Kir6.2/SUR1 wurde von diesen Verbindungen mit IC₅₀-Werten von ~ 16 µM (Neomycin), ~ 82 µM (Gentamicin) und < 1 µg/ml (Poly-Lysin) inhibiert, wobei die Hemmung im Fall von Neomycin und Gentamicin reversibel, im Fall von Poly-Lysin irreversibel war (vgl. Abb. 6-7(b,c)). Am mutanten Kanal waren die Effekte wesentlich schwächer. So war die Hemmung durch 1 mM Neomycin bzw. Gentamicin < 20 % (n = 5), während Poly-Lysin in Konzentrationen von 1 µg/ml, 10 µg/ml und 100 µg/ml eine Hemmung von 27 ± 3, 29 ± 3 und 34 ± 6 % hervorrief, was dafür spricht, dass eine vollständige Inhibition nicht möglich ist.

Die Aktivität von Kir6.2(V59A)/SUR1 wurde durch PIP₂ nur sehr geringfügig erhöht, die Hemmung durch Neomycin war etwas stärker als im Fall der V59G-Mutanten, jedoch wesentlich schwächer als am Wildtyp (vgl. Tab. 6-2).

Der ΔN10-Kanal nahm in diesen Experimenten eine Art Zwischenstellung ein, da seine Reaktion auf PIP₂ und Neomycin signifikant schwächer als die des Wildtyps, aber deutlich stärker als die von Kir6.2(V59G)/SUR1 ausfiel (vgl. Tab. 6-2).

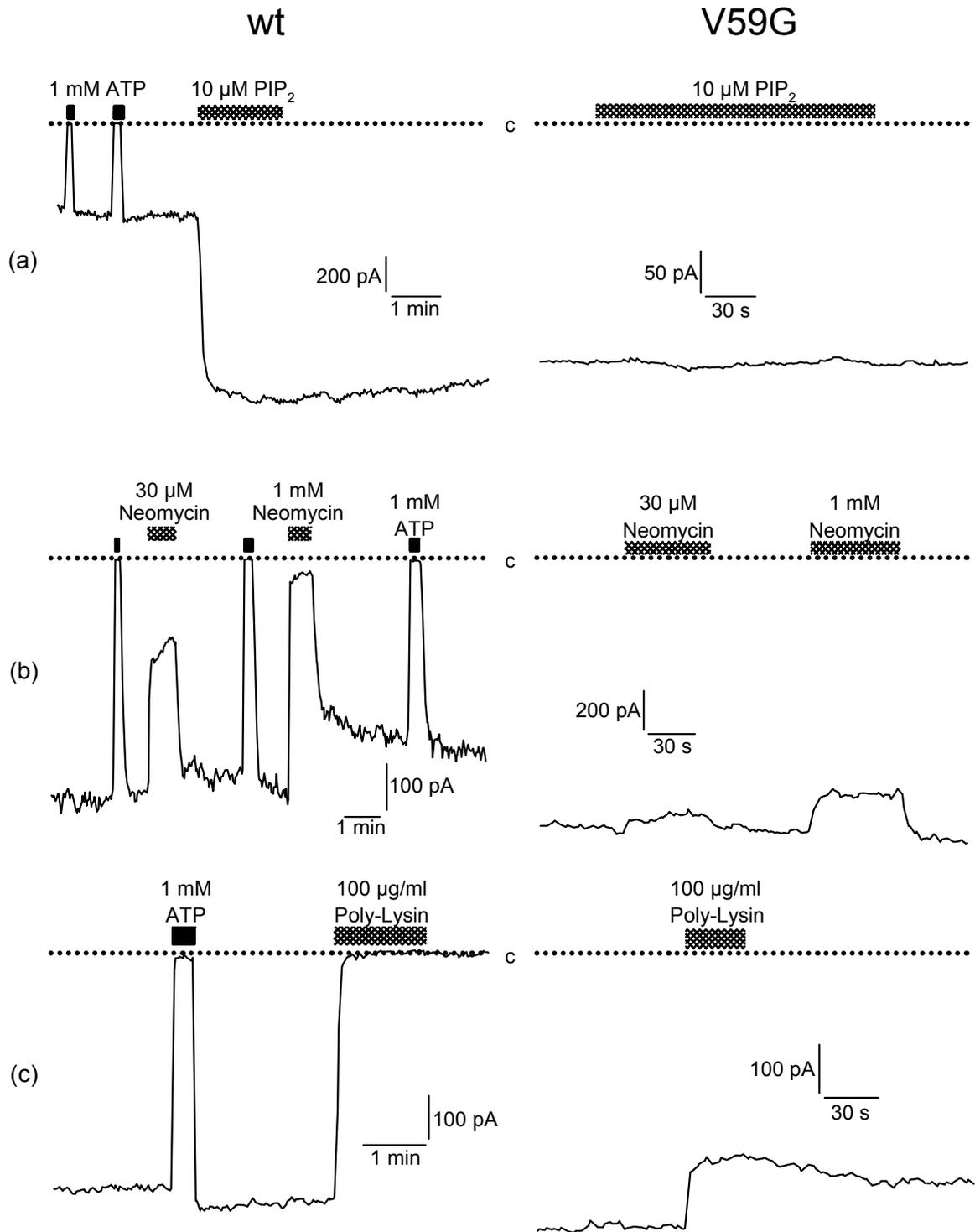


Abb. 6-7: Wirkung von Phospholipiden (PIP₂) und inhibitorischen Polykationen (Neomycin, Poly-Lysin) auf Kir6.2/SUR1 (linke Spalte) und Kir6.2(V59G)/SUR1 (rechte Spalte) (i.o., -50 mV). (a) Während PIP₂ (10 μM) die Aktivität des wildtypischen Kanals stark erhöht (in diesem Einzelexperiment etwa Verdreifachung des Stroms), zeigt der V59G-Kanal keine Reaktion. (b) Der starken Hemmung des Wildtyps durch Neomycin (1 mM) steht ein nur schwacher (ebenfalls reversibler) Effekt an der Mutanten gegenüber. (c) Ähnlich wie Neomycin führt Poly-Lysin (100 μg/ml) zu einer starken Inhibition des Wildtyps, bei sehr moderater Wirkung auf die Mutante. Im Gegensatz zu Neomycin sind die Effekte jedoch irreversibel.

Tab. 6-2: Eigenschaften von Kir6.2-Wildtyp (wt), -V59G, -V59A und - Δ N10 (jeweils co-exprimiert mit SUR1) in inside-out-Patches (Mg^{2+} -freie Lösungen). In Klammern angegeben ist jeweils die Zahl der gemittelten Einzelexperimente.

Kir6.2	P_o^a	GBC (1 μ M) % Inhibition	PIP ₂ (10 μ M) I _{PIP2} / I ₀ (%) ^b	Neomycin % Inhibition	
				30 μ M	1 mM
wt	0.53 \pm 0.02 (8)	71 \pm 10 (4)	900 \pm 390 (12)	57 \pm 5 (9)	96 \pm 2 (7)
V59G	0.83 \pm 0.01 (8)	0 (10)	0 (4)	3 \pm 2 (5)	16 \pm 2 (5)
V59A	0.86 \pm 0.01 (4)	15 \pm 8 (7)	5 \pm 3 (5)	17 \pm 6 (6)	50 \pm 11 (6)
Δ N10	0.61 \pm 0.08 (4) (Δ N9)	9 \pm 5 (12)	270 \pm 40 (4)	17 \pm 4 (10)	60 \pm 8 (7)

^a: P_o ist die Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle in Abwesenheit von Nukleotiden. Die angegebenen Werte stammen aus Reimann et al., 1999b (Δ N9) bzw. Proks et al., 2004 (wt und V59G). Reimann gibt für den Wildtyp eine P_o von 0.32 \pm 0.10 (5), was nicht nur dafür spricht, dass die P_o des Δ N9-Kanals signifikant höher als die des wt ist, sondern auch dafür dass der Unterschied zwischen der P_o von Δ N9 und V59G wohl kleiner ist, als die Tabelle suggeriert. Die P_o von Kir6.2(V59A)/SUR1 wurde von U. Ruß (Abt. Molpharm.) bestimmt. ^b: I₀ stellt hier den K_{ATP} -Strom vor Applikation von PIP₂ dar.

6.2.5 Kir6.1(I60G)

Isoleucin 60 in Kir6.1 stellt die korrespondierende Aminosäure zu Valin 59 in Kir6.2 dar. Wie eingangs erläutert, wurden die Auswirkungen einer Substitution an dieser Position durch Glycin auch für Kir6.1/SUR1 untersucht. Die nachfolgend zusammengefassten Ergebnisse dieser durch R. Lutz (Abt. Molpharm.) durchgeführten Experimente sind Bestandteil der Publikation Winkler et al., 2009.

In Kap. 6.2.3 wurde beschrieben, dass Kir6.2(V59G)/SUR1 in den Patch-Clamp-Experimenten bei Herstellung der whole-cell-Konfiguration bereits aktiv war, während der wildtypische Kanal erst im Zuge der Dialyse der Zelle mit der Pipettenlösung Aktivität entwickelte (vgl. Abb. 6-2). Dieses Verhalten wurde analog auch für Kir6.1(I60G)/SUR1 und Kir6.1/SUR1 beobachtet. Wurde eine Pipettenlösung mit 10 mM MgATP (statt 1 mM MgATP, 0.3 mM MgGDP; vgl. Kap. 2.10.8.1) verwendet, wurde für Kir6.1(I60G)/SUR1 keine Verringerung des initialen Stroms im Zuge der Zelldialyse festgestellt, was ein Indiz dafür ist, dass die Mutation auch bei Kir6.1 die Empfindlichkeit für eine Hemmung durch ATP reduziert. Bei Verwendung einer nukleotidfreien Pipettenlösung kam es dagegen zu

einer stetigen Abnahme des Stroms, was dafür spricht, dass der Kir6.1-Kanal trotz I60G-Mutation auf den aktivierenden Einfluss von Nukleotiden angewiesen bleibt.

Ein wesentlicher Unterschied zwischen Kir6.2(V59G)/SUR1 und Kir6.1(I60G)/SUR1 ist die Inhibition des Letzteren durch Sulfonylharnstoffe. So führten 100 und 300 μM Tolbutamid in der Ganzzell-Konfiguration zu einer Hemmung von Kir6.1(I60G)/SUR1 um 89 ± 6 bzw. 91 ± 4 % (bei vollständiger Hemmung des Wildtyps durch 100 μM). Auch in der cell-attached-Konfiguration wurde die Mutante durch Tolbutamid inhibiert.

Eine Erhöhung der Aktivität durch den Öffner Diazoxid (100 μM) konnte für Kir6.1(I60G)/SUR1 im Gegensatz zum Wildtyp nicht beobachtet werden.

6.3 Diskussion

Valin 59 (Kir6.2) bzw. Isoleucin 60 (Kir6.1), deren Mutagenese zu Glycin die beschriebenen tiefgreifenden Änderungen bezüglich Aktivität und Regulation der entsprechenden K_{ATP} -Kanäle nach sich zieht (vgl. Kap. 6.2), befinden sich ziemlich genau in der Mitte der sog. Gleithelix, die wiederum einen wichtigen Bestandteil des Kir-N-Terminus darstellt. Diesem kommt in mehrerlei Hinsicht zentrale Bedeutung für die Steuerung des Kanals zu. So finden sich im N-Terminus von Kir6.2 nicht nur Aminosäuren, für die eine Beteiligung an der Bindung von ATP und PIP_2 angenommen wird (vgl. Kap. 1.2.3), sondern auch ein Segment (S37-V45), das wesentlich zur unterschiedlichen Aktivität von Kir6.2 und Kir6.1 in nukleotidfreier Lösung beiträgt (Kondo et al., 1998). Des Weiteren weisen mehrere Befunde auf eine Interaktion mit CL3/L0 des SUR hin (z.B. Babenko und Bryan, 2002). Der Gleithelix kommt in diesem System vermutlich die Aufgabe zu, die durch Nukleotide, Phospholipide und den SUR induzierten Konformationsänderungen direkt an die Pore weiterzuleiten. Dabei scheinen die Wechselwirkungen des Kir-N-Terminus mit der SUR-Untereinheit von inhibitorischer Natur zu sein, da Deletionen am initialen N-Terminus die Offenwahrscheinlichkeit P_o des Kanals erhöhen (Koster et al., 1999b; Babenko et al., 1999b; Reimann et al., 1999b). Letzteres wird am intakten Kir6.2/SUR1 auch mittels eines dem Kir-N-Terminus entsprechenden Peptids erreicht, vermutlich durch Verdrängung des endogenen N-Terminus (Babenko und Bryan, 2002). Eine Störung der Gleithelix-Struktur in Kir6.2(V59G) bzw. Kir6.1(I60G), wie sie durch PREDATOR und nnpredict vorhergesagt wird (vgl. Kap. 6.2.1), würde nach diesem Modell die Übertragung der inhibitorischen Signale vom N-Terminus des Kir stark beeinträchtigen und die Potenz von ATP, Glibenclamid, etc., den Kanal auf diesem Weg zu hemmen, entsprechend reduzieren.

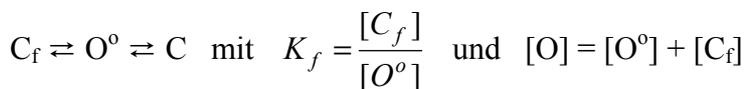
Interessanterweise kommen obige Programme, die für Kir6.2(V59G) ein Kollabieren der Gleithelix prophezeien, für Kir6.2(V59M) und Kir6.2(V59A) nicht zu dieser Vorhersage. Das etwas mildere Krankheitsbild, das die letztgenannten Mutationen (in heterozygoten Patienten) hervorrufen (vgl. Tab. 1-2), ist somit möglicherweise eine direkte Folge von im Vergleich zu V59G weniger gravierenden strukturellen Änderungen in der Gleithelix.

6.3.1 Ba²⁺-Block

In quantitativen Untersuchungen des Ba²⁺-Blocks wurde für wildtypischen wie mutanten Kir6.2/SUR1 eine IC₅₀ von etwa 4 µM festgestellt (vgl. Abb. 6-1). Die Innenseite des Selektivitätsfilters, als der für den Ba²⁺-Block entscheidende Bereich (Jiang und MacKinnon, 2000), wird offenbar durch die Mutation der Gleithelix nicht beeinträchtigt.

6.3.2 Reduzierung der ATP-Empfindlichkeit durch die V59G-Mutation

Übergänge zwischen dem offenen (O) und dem geschlossenen (C) Zustand der inneren, ligandgesteuerten Pforte des K_{IR}-Kanals werden durch das Gleichgewicht $O \rightleftharpoons C$ ausgedrückt. Ein offenes „ligand gate“ bedeutet jedoch nicht, dass der Kanal in dieser Zeit ständig für K⁺-Ionen passierbar ist. Vielmehr führt das schnelle Öffnen und Schließen des „fast gate“ (zweite Kanalpforte im Bereich des Selektivitätsfilters (vgl. Kap. 1.1.3)) dazu, dass der Kanal zwischen dem Offenzustand und einem kurzlebigen Geschlossenzustand C_f hin und her wechselt. Das obige Gleichgewicht muss daher um diesen Zustand erweitert werden:



„O“ steht hier für eine geöffnete ligandgesteuerte Pforte. Im Fall von „O^o“ ist zusätzlich auch die schnelle Pforte geöffnet, so dass ein K⁺-Fluss möglich ist, während Letztere im Fall von „C_f“ vorübergehend geschlossen ist. Für den kurzlebigen Geschlossenzustand C_f werden die selben Ligandbindungseigenschaften wie für O^o angenommen, so dass beide im nachfolgend vorgestellten Modell aus Abb. 6-8 zur Hemmung des K_{ATP}-Kanals durch ATP als ein einziger Zustand O behandelt werden, in dem der Kanal „offen“ im Sinne einer Abgrenzung zum langlebigen Geschlossenzustand C vorliegt. Zu beachten ist, dass die mit dem Modell

berechneten Offenwahrscheinlichkeiten ($P_o^{Mod.}$) infolgedessen höher sind als die experimentell bestimmbaren Werte ($P_o^{exp.}$). Es gilt:

$$P_o^{exp.} = \frac{[O^o]}{[C]+[O]} = \frac{1}{1+K_f} \cdot \frac{[O]}{[C]+[O]} = \frac{1}{1+K_f} \cdot P_o^{Mod.} \quad \text{Gleichung 6-1}$$

K_f ist wegen der Schnelligkeit des Übergangs schwer zu bestimmen. Koster et al., 1999b gingen zur Interpretation ihrer Daten von einem Wert von 0.15 aus. Für $K_f = 0.15$ erhöhen sich die Literaturwerte für $P_o(0)$ von 0.53 (wt) und 0.83 (V59G) des pankreatischen K_{ATP} -Kanals (vgl. Tab. 6-2) im Modell entsprechend auf 0.61 (wt) und 0.95 (V59G).

Das Modell soll die Grundlage für die Diskussion möglicher Ursachen der geringen ATP-Empfindlichkeit von Kir6.2(V59G)/SUR1 bilden. Diese ist in Abwesenheit von Mg^{2+} mit einer IC_{50} von 21 mM (vgl. Tab. 6-1) etwa 2000 mal schwächer als am Wildtyp ($IC_{50} \approx 10 \mu M$; Tucker et al., 1997).

Das Modell (Abb. 6-8) macht folgende Annahmen:

1. Die Bindung von ATP erfolgt nicht kooperativ, d.h. für die Bindung eines ATP-Moleküls an eine ATP-Bindungsstelle ist irrelevant, ob bereits eine (oder mehrere) der anderen drei Bindungsstellen mit ATP besetzt ist.
2. Die vier Kirs liegen (unabhängig davon, ob sie ATP gebunden haben oder nicht) stets in der selben Konformation vor, d.h. entweder alle in der offenen oder alle in der geschlossenen Konformation, entsprechend dem Gesamtzustand des Kanals.

Insbesondere die zweite Annahme stellt eine starke Vereinfachung der tatsächlichen Verhältnisse dar (Enkvetchakul und Nichols, 2003), ermöglicht jedoch eine sehr einfache mathematische Beschreibung der ATP-Hemmung.

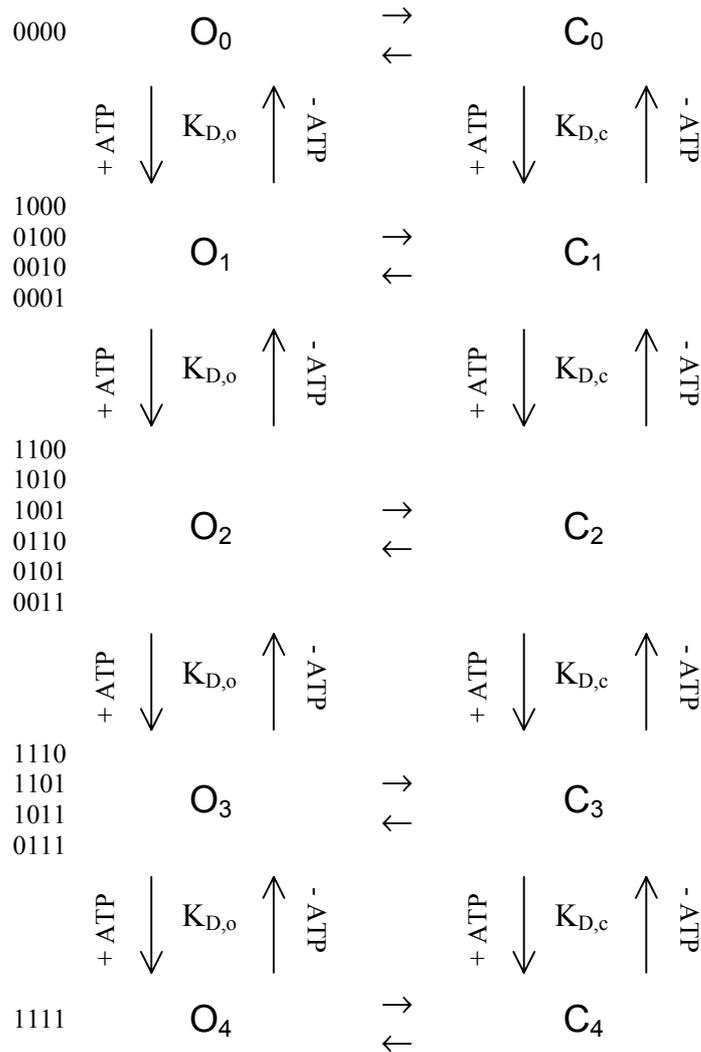


Abb. 6-8: Modell zur ATP-Bindung und Hemmung des K_{ATP} -Kanals. Es werden sowohl für den langlebigen geschlossenen (C: closed) als auch für den offenen (O: open) Zustand jeweils vier identische, unabhängige ATP-Bindungsstellen vorausgesetzt. Des Weiteren geht das Modell davon aus, dass die vier Kirs entweder alle in der offenen oder alle in der geschlossenen Konformation vorliegen, so dass die Bindung eines ATP-Moleküls an den Offenzustand des Kanals stets mit $K_{D,o}$ erfolgt, an den Geschlossenzustand entsprechend mit $K_{D,c}$. Affinere Bindung von ATP an den geschlossenen Kanal (d.h. $K_{D,c} < K_{D,o}$) bedingt die Stabilisierung des Geschlossenzustands und somit die Inhibition der Kanalaktivität. Die Indices geben jeweils die Anzahl der mit ATP besetzten Kir-Untereinheiten im Kanalkomplex an. In der linken Spalte sind die jeweils hierfür möglichen Anordnungen von besetzten (gekennzeichnet durch „1“) und freien („0“) Bindungsstellen des Tetramers dargestellt. Die Zahl dieser Möglichkeiten folgt der Binomialverteilung.

Für die Abhängigkeit der Offenwahrscheinlichkeit von der ATP-Konzentration erhält man (zur Herleitung dieser und weiterer Gleichungen siehe Kap. 6.4):

$$P_o([ATP]) = \frac{1}{1 + \left(\frac{1}{P_o(0)} - 1 \right) \cdot \left(\frac{K_{D,o}}{K_{D,c}} \right)^4 \cdot \left(\frac{K_{D,c} + [ATP]}{K_{D,o} + [ATP]} \right)^4}$$

$P_o(0)$ stellt die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals in Abwesenheit von ATP dar. Für $P_o(\infty)$, die Offenwahrscheinlichkeit für $[ATP] \rightarrow \infty$, gilt:

$$P_o(\infty) = \lim_{[ATP] \rightarrow \infty} P_o([ATP]) = \frac{1}{1 + \left(\frac{1}{P_o(0)} - 1 \right) \cdot \left(\frac{K_{D,o}}{K_{D,c}} \right)^4} \quad \text{Gleichung 6-2}$$

Für $K_{D,o} \rightarrow \infty$, d.h. wenn ATP nur an den Geschlossenenzustand bindet, nimmt $P_o(\infty)$ den Wert 0 an, d.h. hier wird bei hohen ATP-Konzentrationen eine vollständige Hemmung des Kanals erreicht. Ist der Unterschied zwischen $K_{D,o}$ und $K_{D,c}$ hingegen nur moderat, bleibt gemäß Modell stets ein Mindestmaß an ATP-unempfindlicher Kanalaktivität erhalten. Im Extremfall $K_{D,o} = K_{D,c}$ wäre $P_o(\infty) = P_o(0)$, d.h. der Kanal wäre komplett unempfindlich gegenüber einer Hemmung durch ATP. Für $K_{D,o} < K_{D,c}$ würde die Bindung von ATP an den Kir gar eine Aktivierung hervorrufen.

Für die IC_{50} als die ATP-Konzentration, bei der 50 % der maximal möglichen Inhibition erzielt werden, gilt:

$$IC_{50} = K_{D,c} \cdot \frac{\left(\sqrt[4]{\frac{2 - P_o(0) - P_o(\infty)}{(P_o(0) + P_o(\infty)) \cdot \left(\frac{1}{P_o(0)} - 1 \right)} - 1} \right)}{1 - \frac{K_{D,c}}{K_{D,o}} \cdot \sqrt[4]{\frac{2 - P_o(0) - P_o(\infty)}{(P_o(0) + P_o(\infty)) \cdot \left(\frac{1}{P_o(0)} - 1 \right)}}} \quad \text{Gleichung 6-3}$$

Im Gegensatz zur maximalen Hemmwirkung von ATP (vgl. Gleichung 6-2) hängt der IC_{50} -Wert somit nicht nur vom Verhältnis von $K_{D,o}$ zu $K_{D,c}$ ab, sondern auch von deren Absolutwerten.

Die IC_{50} für die Hemmung von wildtypischem Kir6.2/SUR1 beträgt etwa 10 μM (Tucker et al., 1997). Bei einer Offenwahrscheinlichkeit in Abwesenheit von Nukleotiden von $P_o(0) = 0.61$ ($\triangleq P_o(0)^{\text{exp.}} = 0.53$; s.o.) wird eine solche IC_{50} bei Berechnung nach Gleichung 6-3 für $K_{D,c} \approx 20 \mu\text{M}$ erreicht. $K_{D,o}$ hat für $P_o(0) = 0.61$ und $K_{D,c} = 20 \mu\text{M}$ nur sehr geringen Einfluss auf die IC_{50} , wie Abb. 6-9 zeigt, in der die Abhängigkeit der IC_{50} von $K_{D,o}$ für verschiedene $P_o(0)$ -Werte graphisch dargestellt ist (jeweils $K_{D,c} := 20 \mu\text{M}$). Für den Wildtyp ($P_o(0) = 0.61$) nimmt die IC_{50} bei beliebiger $K_{D,o}$ stets Werte zwischen 7 und 22 μM an.

Allerdings muss $K_{D,o}$ mindestens ~ 3 -5 mal so groß sein wie $K_{D,c}$, um die in den Experimenten beobachtete Effizienz der ATP-Hemmung, d.h. die praktisch vollständige Inhibition von Kir6.2/SUR1 durch 1 mM ATP zu erklären.

Wie die Abbildung verdeutlicht nähert sich die IC_{50} für $K_{D,o} \rightarrow K_{D,c}$ eben diesem Wert von $K_{D,c}$ an. Hiervon ausgehend wächst die IC_{50} für zunehmende $K_{D,o}$ -Werte zunächst an, um nach Erreichen eines lokalen Maximums gegen einen Grenzwert für $K_{D,o} \rightarrow \infty$ zu streben.

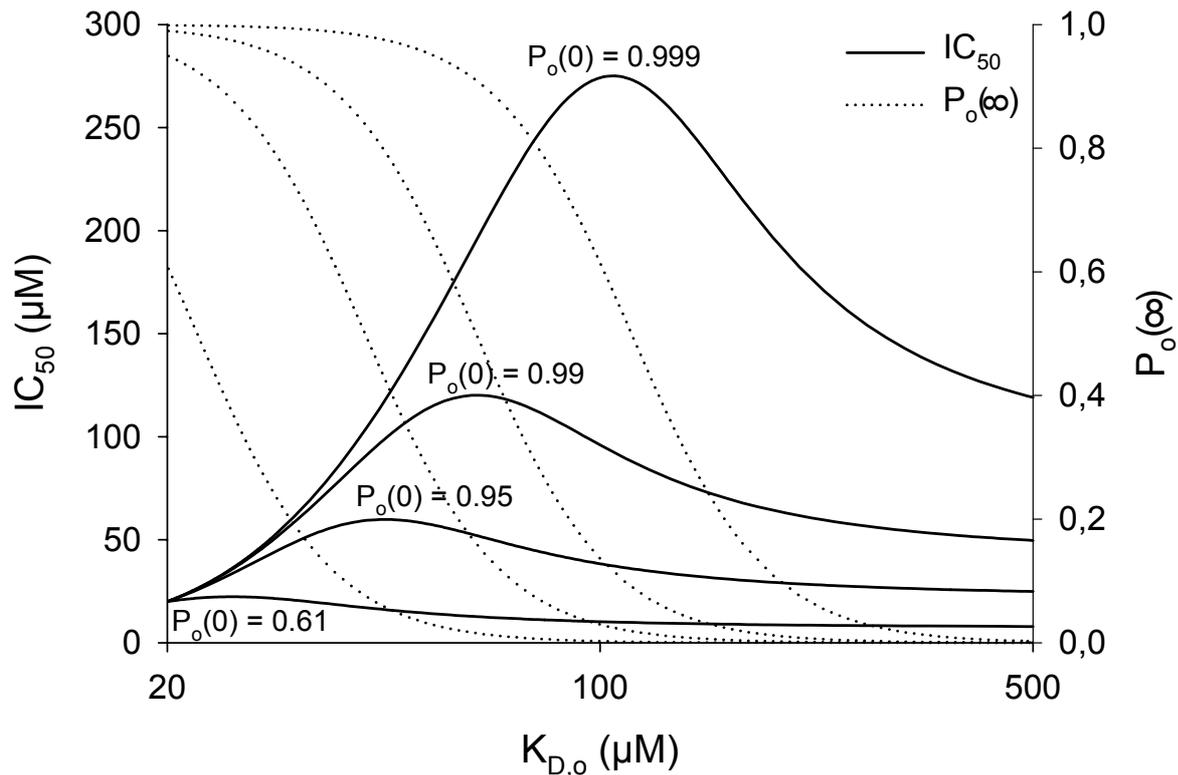


Abb. 6-9: Abhängigkeit der ATP-Hemmung (IC_{50} und $P_o(\infty)$) von $K_{D,o}$ und $P_o(0)$ bei konstanter $K_{D,c}$ (20 μM). Berechnung gemäß den aus dem Modell (Abb. 6-8) abgeleiteten Gleichung 6-2 und Gleichung 6-3. IC_{50} nimmt (wie auch $P_o(\infty)$) mit wachsender $P_o(0)$ zu, erreicht aber selbst bei $P_o(0) = 0.999$ noch keine millimolaren Konzentrationen.

Der $K_{D,o}$ -Wert, für den die IC_{50} jeweils ihr Maximum einnimmt, lässt sich theoretisch aus der ersten Ableitung von IC_{50} nach $K_{D,o}$ in Gleichung 6-3 ermitteln, allerdings wird der resultierende Term so komplex, dass eine Berechnung mit einfachen mathematischen Methoden nicht möglich ist. Für den Grenzwert bei $K_{D,o} \rightarrow \infty$ gilt:

$$\lim_{K_{D,o} \rightarrow \infty} IC_{50} = \left(\sqrt[4]{\frac{2 - P_o(0)}{1 - P_o(0)}} - 1 \right) \cdot K_{D,c} \quad \text{Gleichung 6-4}$$

Dieser Term unterstreicht, dass grundsätzlich eine erhöhte Offenwahrscheinlichkeit als alleinige Ursache für die verminderte ATP-Empfindlichkeit von Kir6.2(V59G)/SUR1 in

Frage kommt. Wegen $\lim_{P_o(0) \rightarrow 1} \left(\sqrt[4]{\frac{2 - P_o(0)}{1 - P_o(0)}} - 1 \right) = \infty$ können theoretisch beliebig große IC_{50} -

Werte erreicht werden. Allerdings sagt das Modell für eine Zunahme der $P_o(0)$ von 0.61 auf 0.95 bei unveränderter $K_{D,c} = 20 \mu\text{M}$ nur eine moderate Erhöhung der IC_{50} auf einen Wert $< 100 \mu\text{M}$ voraus (vgl. Abb. 6-9). Bei einer $P_o(0)$ von 0.95 muss angesichts potentieller experimenteller Fehler bei der Bestimmung von $P_o(0)$ und K_f die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass der korrekte $P_o(0)$ -Wert noch höher, d.h. nahezu 1 ist. Da aber in Abb. 6-9 selbst für eine $P_o(0)$ von 0.999 noch keine millimolaren IC_{50} -Werte erreicht werden, während für Kir6.2(V59G)/SUR1 eine IC_{50} von 21 mM ermittelt wurde (vgl. Tab. 6-1), erscheint es plausibler, dass die V59G-Mutation auch eine Beeinträchtigung der nicht weit entfernt liegenden ATP-Bindungsstelle in Form einer Zunahme von $K_{D,o}$ und $K_{D,c}$ verursacht. So lange sich das Verhältnis von $K_{D,c}$ zu $K_{D,o}$ nicht ändert, ist die IC_{50} für eine gegebene $P_o(0)$ direkt proportional zu $K_{D,c}$ (vgl. Gleichung 6-3).

Zur Zusammenfassung und Veranschaulichung der bisherigen Erkenntnisse zeigt Tab. 6-3 anhand ausgewählter Zahlenbeispiele, wie sich $P_o(\infty)$ und IC_{50} bei Änderungen von $P_o(0)$, $K_{D,c}$ und $K_{D,o}$ entwickeln.

Tab. 6-3: Zahlenbeispiele für die durch das diskutierte Modell vorhergesagten Änderungen von Effizienz ($P_o(\infty)$) und Potenz (IC_{50}) der ATP-Hemmung in Abhängigkeit von der Offenwahrscheinlichkeit in Abwesenheit von Nukleotiden $P_o(0)$, sowie den Dissoziationskonstanten der Bindung von ATP an den langlebigen Geschlossenenzustand ($K_{D,c}$) bzw. den Offenzustand ($K_{D,o}$) des pankreatischen K_{ATP} -Kanals (wt bzw. V59G). Die Berechnungen sprechen dafür, dass die V59G-Mutation nicht nur $P_o(0)$, sondern auch die ATP-Bindung beeinflusst und so die hohe IC_{50} von 21 mM (vgl. Tab. 6-1) des mutanten Kanals verursacht.

$P_o(0)^*$	$K_{D,c}$ (μM)	$K_{D,o}$ (μM)	$P_o(\infty)$	IC_{50} (μM)
0.61 (wt)	20	60	0.02	13
0.61 (wt)	20	≥ 100	~ 0	7-10
0.95	20	60	0.19	54
0.95	20	≥ 100	≤ 0.03	23-38
0.999	20	100	0.62	274
0.999	20	≥ 200	≤ 0.09	92-189
0.999999999	20	4000	0.38	$11 \cdot 10^3$
0.95	10000	50000	0.03	$19 \cdot 10^3$
0.999	2000	20000	0.09	$19 \cdot 10^3$

*: Bei 0.61 und 0.95 handelt es sich um die Anpassung der experimentell bestimmten Offenwahrscheinlichkeiten $P_o^{\text{exp}}(0) = 0.53$ (wt) und $P_o^{\text{exp}}(0) = 0.83$ (V59G) an das Modell (vgl. Gleichung 6-1).

6.3.3 V59G-Mutation vs. Verkürzung des Kir-N-Terminus: ATP-Empfindlichkeit und Offenwahrscheinlichkeit

Eine Deletion der ersten bis zu 44 N-terminalen Aminosäuren von Kir6.2 erhöht die Offenwahrscheinlichkeit von Kir6.2/SUR1, bei gleichzeitiger Verringerung der ATP-Empfindlichkeit. Wenngleich dieses Verhalten an Kir6.2(V59G)/SUR1 erinnert, so bestehen doch eklatante Unterschiede zwischen den Δ N- und den V59G-Kanälen. So vergrößert die N-terminale Deletion die IC_{50} der ATP-Hemmung um einen Faktor von ca. 10-20, was im Vergleich zu V59G einen deutlich kleineren Effekt darstellt. Vor allem aber zeigen sich die Auswirkungen der Verkürzung von Kir6.2 nur im Komplex mit SUR1, in Abwesenheit von SUR1 weisen Kir6.2 Δ C25 und Kir6.2 Δ N30 Δ C25 (die Entfernung des C-terminalen Retentionsmotivs ist Voraussetzung für die funktionelle Expression von Kir6.2 alleine; vgl. Kap. 1.2.1) jeweils eine $P_o^{exp}(0)$ von ~ 0.16 und eine IC_{50} (ATP) von $\sim 120 \mu\text{M}$ auf (Koster et al., 1999b). Co-Expression mit SUR1 führt im Fall des Wildtyps zu einer Erhöhung von $P_o^{exp}(0)$ auf 0.57 ± 0.08 (im Rahmen des angegebenen Fehlers äquivalent zum von Proks et al., 2004 ermittelten Wert 0.53 ± 0.02). Dass gleichzeitig die IC_{50} (ATP) auf $12 \mu\text{M}$ sinkt, spricht dafür, dass andererseits die ATP-Bindung durch SUR1 verbessert wird. Vernachlässigt man angesichts der praktisch vollständigen Inhibition des K_{ATP} -Stroms bei genügend hohen ATP-Konzentrationen (Koster et al., 1999b) die Bindung von ATP an den Offenzustand des Kanals (d.h. $K_{D,o} \rightarrow \infty$), lässt sich ein solches Verhalten nach dem Modell aus Abb. 6-8 für eine Abnahme von $K_{D,c}$ von ca. $540 \mu\text{M}$ (Kir allein) auf $30 \mu\text{M}$ (Kir6.2/SUR1) beschreiben (vgl. Tab. 6-4).

Für einen Kanal aus Kir6.2 Δ N30 und SUR1 berichtete Koster eine $P_o^{exp}(0)$ von 0.86 ± 0.02 , was im Modell gemäß Gleichung 6-1 einem Wert von 0.97-1.0 entspricht. Diese sehr hohe Offenwahrscheinlichkeit dürfte hauptverantwortlich dafür sein, dass die ATP-Empfindlichkeit von Kir6.2 Δ N30/SUR1 mit $IC_{50} = 124 \mu\text{M}$ signifikant niedriger als die von Kir6.2/SUR1 ist. Möglicherweise wird außerdem die für Kir6.2 Δ C25 und Kir6.2 Δ N30 Δ C25 alleine offensichtlich äquivalente $K_{D,c}$ im Fall des Δ N-Kanals durch SUR1 nicht ganz so stark gesenkt, wie am Wildtyp (vgl. Tab. 6-4).

Tab. 6-4: Interpretation der ATP-Hemmung von Kir6.2 und Kir6.2 Δ N30 in Ab- und Anwesenheit von SUR1 durch das Modell aus Abb. 6-8. Die gemessenen IC_{50} -Werte werden für die ebenfalls experimentell bestimmten Offenwahrscheinlichkeiten im Modell durch die nach Gleichung 6-4 berechneten $K_{D,c}$ -Werte erklärt. Da elektrophysiologischen Messungen auf eine vollständige Inhibition der Kanäle bei genügend hohen ATP-Konzentrationen hinwiesen ($P_o(\infty) \approx 0$), wurde $K_{D,o} \gg K_{D,c}$ vorausgesetzt. (experimentelle Daten aus Koster et al., 1999b)

^a	$P_o^{\text{exp.}}(0)$	$P_o^{\text{Mod.}}(0)^b$	IC_{50} (μM)	$K_{D,c}$ (μM)
Kir6.2 Δ C	0.16	0.18	120	~ 540
Kir6.2 Δ N30 Δ C	“	“	“	“
Kir6.2/SUR1	0.57	0.66	12	~ 30
Kir6.2 Δ N30/SUR1	0.86	0.99	124	~ 60

^a: „ Δ C“ steht für die Deletion des ER-Retentionsmotivs (vgl. Kap. 1.2.1) durch Verkürzung des Kir-C-Terminus; „ Δ N30“ markiert die Deletion der ersten 30 N-terminalen Aminosäuren am Kir-N-Terminus. ^b: Anpassung der experimentell bestimmten Offenwahrscheinlichkeiten an das Modell gemäß Gleichung 6-1.

Die hohe Offenwahrscheinlichkeit, die durch die Verkürzung des Kir6.2-N-Terminus erreicht wird, sowie die Abhängigkeit dieser Aktivitätssteigerung von SUR1, sprechen für die bereits eingangs von Kap. 6.3 vorgestellte Hypothese, dass Wechselwirkungen zwischen SUR und dem N-Terminus des Kir ein wichtiges inhibitorisches Element darstellen (Babenko und Bryan, 2002). Die ebenfalls durch Manipulation (in Form einer Punktmutation) am N-Terminus hervorgerufene hohe Aktivität von Kir6.2(V59G)/SUR1 lädt zu Spekulationen ein, dass auch hier die inhibitorischen Interaktionen von SUR1 mit dem Kir6.2-N-Terminus entscheidend gestört sind. Zwar ist in diesem Fall der N-Terminus noch vorhanden, doch möglicherweise hebt die Mutation in der Gleithelix die Kopplung dieser Interaktionen mit einer Schließung des Kanals auf. Im Gegensatz zu Kir6.2 Δ N30 unterscheidet sich Kir6.2(V59G) jedoch bereits in Abwesenheit von SUR1 dramatisch vom Wildtyp. So weist Kir6.2(V59G) Δ C eine $P_o^{\text{exp.}}(0)$ von 0.78 ± 0.03 und eine IC_{50} (ATP) von 1.7 ± 0.1 mM auf (Antcliff et al., 2005). Die V59G-Mutation bewirkt also nicht nur eine indirekte Aktivierung durch Aufhebung inhibitorischer Einflüsse des Kir-N-Terminus, sondern induziert direkt eine Konformationsänderung, die den Offenzustand des Kanals stabilisiert. Wie bereits erörtert (vgl. Kap. 6.3.2) kommt es neben der erhöhten Offenwahrscheinlichkeit höchstwahrscheinlich auch zu einer Schwächung der ATP-Bindung. Diese wird möglicherweise beim V59G anders als am Wildtyp durch SUR1 nicht verbessert.

Die Offenwahrscheinlichkeit von Kir6.2(V59G) Δ C (ohne SUR1) wird in der Literatur mit 0.78 ± 0.03 (Antcliff et al., 2005), die $P_o(0)$ von Kir6.2(V59G)/SUR1 mit 0.83 ± 0.01 (Proks

et al., 2004) angegeben (s.o.). Wenngleich dieser Unterschied wenig signifikant erscheint, erst recht wegen der Bezugnahme auf verschiedene Publikationen, so spricht der Umstand, dass die in unserer Arbeitsgruppe für Kir6.2(V59G)/SUR1 bestimmte IC_{50} (ATP) mit 21 mM (vgl. Tab. 6-1) etwa zehnfach höher als die von Antcliff und Kollegen für Kir6.2(V59G) Δ C veröffentlichte IC_{50} (ATP) von 1.7 mM ist, dafür, dass SUR1 die hohe $P_o(0)$ von Kir6.2(V59G) tatsächlich noch ein wenig steigern kann.

Damit im Einklang steht der Befund, dass die Hemmung von Kir6.2(V59G)/SUR1 durch MgATP noch schwächer war als in Abwesenheit von Mg^{2+} (Faktor ~ 10 ; vgl. Tab. 6-1). Da Mg^{2+} die hemmende Wirkung von ATP am (wildtypischen) Kir nicht beeinflusst (Tucker et al., 1997), spricht dies dafür, dass die SUR-vermittelte MgATP-Stimulation des Kanals durch die V59G-Mutation nicht verhindert wird. Dies ist in Übereinstimmung mit der Aussage von Babenko und Bryan, 2002, dass Interaktionen zwischen Kir und SUR, die die Aktivität des Kanals erhöhen, vorrangig durch die Transmembrandomänen erfolgen, während inhibitorische Wechselwirkungen meist durch cytoplasmatische Proteinabschnitte vermittelt werden.

6.3.4 ATP-Empfindlichkeit von Kir6.1(I60G)/SUR1

Ganzzell-Messungen mit Kir6.1(I60G)/SUR1 belegten, dass auch die Aktivität dieses K_{ATP} -Kanals im Vergleich zum Wildtyp erhöht ist (vgl. Kap. 6.2.5). Der Grund dürfte auch hier eine verringerte Empfindlichkeit für die Hemmung durch ATP sein, wenngleich auch eine stärkere Aktivierbarkeit dieser Mutanten durch MgATP nicht ausgeschlossen werden kann. In Abwesenheit von Mg^{2+} und aktivierender Nukleotide zeigten jedoch weder der mutante, noch der wildtypische Kir6.1/SUR1-Kanal Aktivität, d.h. die I60G-Mutation reicht nicht aus, um die Nukleotidabhängigkeit des Kir6.1-Kanals zu überwinden. Dies, zusammen mit der im Vergleich zu Kir6.2 geringeren Leitfähigkeit des Kir6.1 (bei möglicherweise schwächerer Expression), verhinderte eine zu den Experimenten an Kir6.2(V59G)/SUR1 analoge, umfassende Untersuchung von Kir6.1(I60G)/SUR1 in der inside-out-Konfiguration. Kondo et al., 1998 konnten zwei kurze Abschnitte im N- und C-Terminus identifizieren, die hauptverantwortlich für die stärkere Abhängigkeit der Kir6.1-Kanäle von der Aktivierung durch Mg^{2+} -Nukleotide sind. Der zugrundeliegende Mechanismus ist noch nicht vollständig aufgeklärt, möglicherweise kommt es zu einer stärkeren Bindung des Kir6.1-N-Terminus an den SUR und somit zu einer Steigerung der aus dieser Interaktion resultierenden inhibitorischen Wirkung (Babenko und Bryan, 2002).

6.3.5 Der „GBC-Effekt“: Potentierung der ATP-Hemmung

Wie in Kap. 1.2.4.1 eingehend erläutert, gilt der N-Terminus des Kir6.2 als Bestandteil der B-Bindungsstelle des K_{ATP} -Kanals und erhöht dessen Affinität für Glibenclamid (GBC), Repaglinid (REP) und andere Insulinotrope. Speziell für Repaglinid fällt die Änderung des K_I -Werts mit einer Verschiebung von ~ 90 nM (SUR1 alleine, d.h. ohne Kir) zu < 1 nM (Kir6.2/SUR1) besonders gravierend aus. Dieser Effekt bleibt bei Substitution von Valin an Position 59 von Kir6.2 durch Glycin in vollem Umfang erhalten. Die ausbleibende Inhibition des Kanals muss daher als Störung der Transduktion von GBC- bzw. REP-Bindung in eine Kanalschließung interpretiert werden, d.h. der Offenzustand wird durch die V59G-Mutation so nachhaltig stabilisiert, dass er weder durch Glibenclamid noch durch Repaglinid sichtbar geschwächt wird. Nichtsdestotrotz wurde die Potenz von ATP durch diese Substanzen signifikant gesteigert (vgl. Abb. 6-5). Der naheliegendste Grund hierfür dürfte eine Erhöhung der Affinität der Bindungsstellen für ATP sein. Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass GBC und REP die Offenwahrscheinlichkeit bereits in Abwesenheit von ATP geringfügig senken, da sehr kleine Effekte experimentell schwer von messtechnisch bedingten Schwankungen des K_{ATP} -Stroms unterscheidbar sind. Sollten K_f (Koster et al., 1999b) und/oder die Offenwahrscheinlichkeit von Kir6.2(V59G)/SUR1 (Proks et al., 2004) „unterbestimmt“ worden sein, d.h. sollte $P_o^{Mod.}(0)$ nahezu 1 sein, könnte solch eine leichte durch GBC induzierte Abnahme der Offenwahrscheinlichkeit von z.B. 0.999 auf 0.98 laut Modell unter Umständen ausreichen, um selbst bei unveränderter ATP-Bindung ($K_{D,c}$, $K_{D,o}$) den beobachteten Rückgang der IC_{50} (ATP) zu erklären (vgl. Tab. 6-5).

Tab. 6-5: Potentielle Mechanismen für die Verbesserung der ATP-Hemmung von Kir6.2(V59G)/SUR1 durch GBC. Vermutlich verbessert GBC die ATP-Bindung (in Form einer Verkleinerung von insbesondere $K_{D,c}$) und bewirkt so die Abnahme der IC_{50} (ATP) von 21 mM (15,31) auf 3.1 mM (1,9,5.1) (vgl. Tab. 6-1). Sollte allerdings die Offenwahrscheinlichkeit $P_o^{Mod.}(0)$ noch größer sein, als aus den Daten von Proks et al., 2004 und Koster et al., 1999b berechnet, so würde laut Modell bereits ein leichter GBC-induzierter Rückgang dieser $P_o^{Mod.}(0)$ (im Rechenbeispiel von 0.999 auf 0.98) die erhöhte ATP-Empfindlichkeit erklären. $K_{D,c}$ und $K_{D,o}$ wurden gezielt so gewählt, dass für die jeweilige $P_o^{Mod.}(0)$ ein IC_{50} -Wert resultierte (Gleichung 6-3), der im Rahmen des statistischen Fehlers den Werten aus Tab. 6-1 entsprach.

GBC	$P_o^{Mod.}(0)$	$K_{D,c}$ (μ M)	$K_{D,o}$ (μ M)	$P_o(\infty)$	IC_{50} (μ M)
-	0.95	10000	50000	0.03	$19 \cdot 10^3$
+	0.95	2500	50000	~ 0	$3.2 \cdot 10^3$
-	0.999	2000	20000	0.09	$19 \cdot 10^3$
+	0.98	2000	20000	0.05	$4.5 \cdot 10^3$

Dass der N-Terminus des wildtypischen Kir6.2 Interaktionen mit SUR1 eingeht, die die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals senken (Babenko und Bryan, 2002) und dass bei seiner progressiven Verkürzung die Wirkung von Glibenclamid unter nukleotidfreien Bedingungen verloren geht (vgl. Tab. 6-2 und Babenko et al., 1999c), suggeriert (ohne einen Beweis darzustellen), dass Glibenclamid besagte inhibitorische Interaktionen zwischen Kir-N-Terminus und SUR1 begünstigt. Möglicherweise wird dabei eine Konformation eingenommen, die zusätzlich zur reduzierten Offenwahrscheinlichkeit auch eine verbesserte ATP-Bindung aufweist.

Die im Vergleich zu ATP schwächere Hemmung von Kir6.2(V59G)/SUR1 durch MgATP (vgl. Tab. 6-1) spricht dafür, dass die SUR1-vermittelte aktivierende Wirkung von MgATP im mutanten Kanal erhalten ist. Sulfonylharnstoffe wie Tolbutamid und Glibenclamid heben diese Aktivierung auf (Gribble et al., 1997c), nicht jedoch die inhibitorische Wirkung von MgATP am Kir, so dass die „Potentierung“ der ATP-Hemmung durch Glibenclamid in Anwesenheit von Mg^{2+} besonders eindrucksvoll ist. Etwas überraschend ist, dass ATP und MgATP in Gegenwart von Glibenclamid mit $IC_{50} = 3.1 \text{ mM}$ und $IC_{50} = 20 \text{ mM}$ unterschiedliche Potenzen aufwiesen (vgl. Tab. 6-1). Dies könnte bedeuten, dass am V59G-Kanal entweder Glibenclamid die MgATP-Aktivierung nicht komplett aufhebt oder dass Mg^{2+} -freies ATP mit etwas höherer Affinität an Kir6.2(V59G) bindet (bzw. wirkt) als MgATP.

6.3.6 Phospholipide und Polykationen

Die hohe Aktivität von Kir6.2(V59G)/SUR1 konnte durch PIP_2 und Oleoyl-CoA nicht noch weiter gesteigert werden. Polykationen wie Gentamicin, Neomycin und Poly-Lysin, die am wildtypischen Kir6.2/SUR1 die Wirkung der Phospholipide aufheben, zeigten am V59G-Kanal nur eine partielle Hemmung. Der Grund für dieses Verhalten dürfte darin bestehen, dass der Offenzustand durch die V59G-Mutation so stark begünstigt wird, dass der Kanal nicht mehr auf die aktivierende Wirkung der Phospholipide angewiesen ist. Ein gewisses Maß an Hemmung durch Polykationen mag auf einen partiellen Porenblock bei hohen Konzentrationen zurückzuführen sein. Grundsätzlich würde auch eine massive Erhöhung der Affinität von Kir6.2 für Phospholipide die experimentellen Befunde erklären. In diesem Fall wäre Kir6.2(V59G) von Anfang an mit endogenen Phospholipiden besetzt, die durch Polykationen nicht bzw. nur schlecht verdrängt werden könnten. Da Kir6.2 Δ N10/SUR1

bereits infolge der Deletion aktiver ist als Kir6.2/SUR1, fällt die relative Änderung seiner Aktivität durch PIP₂/Neomycin etwas schwächer aus als am Wildtyp, aber stärker als am V59G- und V59A-Kanal, deren Offenwahrscheinlichkeit noch höher ist (vgl. Tab. 6-2).

6.4 Anhang: P_o(0), P_o(∞) und IC₅₀ als Funktion von [ATP]: Mathematische Herleitung der Gleichungen zum Modell aus Abb. 6-8

Für die Bindung von ATP an eine *bestimmte* Untereinheit des geschlossenen Kanals gilt

$$K_{D,c} = \frac{[C_{i-1}] \cdot [ATP]}{[C_i]} \quad \text{bzw.} \quad [C_i] = [C_{i-1}] \cdot \frac{[ATP]}{K_{D,c}}$$

An welche der vier Untereinheiten ATP bindet, spielt jedoch im hier behandelten Modell keine Rolle, weshalb die Spezies des geschlossenen Kanals mit je gleicher Anzahl an besetzten Bindungsstellen (vgl. linke Spalte in Abb. 6-8) als C₀, C₁, C₂, C₃ bzw. C₄ zusammengefasst werden. Die Zahl besagter Spezies, die jeweils zu C_i beitragen, ist durch

den Binomialkoeffizienten $\binom{4}{i}$ gegeben, so dass gilt:

$$[C_i] = \binom{4}{i} \cdot [C_0] \cdot \left(\frac{[ATP]}{K_{D,c}} \right)^i$$

Für die Gesamtkonzentration des geschlossenen Kanals [C] folgt daraus:

$$\begin{aligned} [C] &= \sum_{i=0}^4 [C_i] = [C_0] \cdot \left(1 + 4 \cdot \frac{[ATP]}{K_{D,c}} + 6 \cdot \left(\frac{[ATP]}{K_{D,c}} \right)^2 + 4 \cdot \left(\frac{[ATP]}{K_{D,c}} \right)^3 + \left(\frac{[ATP]}{K_{D,c}} \right)^4 \right) = [C_0] \cdot \left(1 + \frac{[ATP]}{K_{D,c}} \right)^4 = \\ &= [C_0] \cdot \left(\frac{K_{D,c} + [ATP]}{K_{D,c}} \right)^4 \end{aligned}$$

Analog gilt für den offenen Kanal:

$$[O] = \sum_{i=0}^4 [O_i] = [O_0] \cdot \left(\frac{K_{D,o} + [ATP]}{K_{D,o}} \right)^4$$

Die Offenwahrscheinlichkeit P_o ist definiert als:

$$P_o = \frac{[O]}{[O] + [C]}$$

Die Offenwahrscheinlichkeit in Abwesenheit von ATP, $P_o(0)$, kann benutzt werden, um $[C_0]$ durch $[O_0]$ auszudrücken:

$$P_o(0) = \frac{[O_0]}{[O_0] + [C_0]} \rightarrow \frac{1}{P_o(0)} = 1 + \frac{[C_0]}{[O_0]} \rightarrow [C_0] = \left(\frac{1}{P_o(0)} - 1 \right) \cdot [O_0]$$

Mit Hilfe der zuletzt hergeleiteten Gleichungen lässt sich die Abhängigkeit der Offenwahrscheinlichkeit von der ATP-Konzentration ausdrücken als:

$$\begin{aligned} P_o([ATP]) &= \frac{[O]}{[O] + [C]} = \frac{[O_0] \cdot \left(\frac{K_{D,o} + [ATP]}{K_{D,o}} \right)^4}{[O_0] \cdot \left(\frac{K_{D,o} + [ATP]}{K_{D,o}} \right)^4 + \left(\frac{1}{P_o(0)} - 1 \right) \cdot [O_0] \cdot \left(\frac{K_{D,c} + [ATP]}{K_{D,c}} \right)^4} \\ &= \frac{1}{1 + \left(\frac{1}{P_o(0)} - 1 \right) \cdot \left(\frac{K_{D,o}}{K_{D,c}} \right)^4 \cdot \left(\frac{K_{D,c} + [ATP]}{K_{D,o} + [ATP]} \right)^4} \end{aligned}$$

und

$$P_o(\infty) = \lim_{[ATP] \rightarrow \infty} P_o([ATP]) = \frac{1}{1 + \left(\frac{1}{P_o(0)} - 1 \right) \cdot \left(\frac{K_{D,o}}{K_{D,c}} \right)^4}$$

Für $[ATP] = IC_{50}$ wird die halbmaximale Inhibition erreicht, d.h.

$$P_o(IC_{50}) = P_o(\infty) + \frac{1}{2} \cdot (P_o(0) - P_o(\infty)) = \frac{1}{2} \cdot (P_o(0) + P_o(\infty)),$$

so dass gilt:

$$P_o(IC_{50}) = \frac{1}{1 + \left(\frac{1}{P_o(0)} - 1 \right) \cdot \left(\frac{K_{D,o}}{K_{D,c}} \right)^4 \cdot \left(\frac{K_{D,c} + IC_{50}}{K_{D,o} + IC_{50}} \right)^4} = \frac{1}{2} \cdot (P_o(0) + P_o(\infty))$$

Durch schrittweises Umformen dieser Gleichung erhält man:

$$1 + \left(\frac{1}{P_o(0)} - 1 \right) \cdot \left(\frac{K_{D,o}}{K_{D,c}} \right)^4 \cdot \left(\frac{K_{D,c} + IC_{50}}{K_{D,o} + IC_{50}} \right)^4 = \frac{2}{P_o(0) + P_o(\infty)}$$

$$\left(\frac{K_{D,c} + IC_{50}}{K_{D,o} + IC_{50}}\right)^4 = \frac{\frac{2}{P_o(0) + P_o(\infty)} - 1}{\left(\frac{1}{P_o(0)} - 1\right) \cdot \left(\frac{K_{D,o}}{K_{D,c}}\right)^4} = \frac{2 - (P_o(0) + P_o(\infty))}{(P_o(0) + P_o(\infty)) \cdot \left(\frac{1}{P_o(0)} - 1\right)} \cdot \left(\frac{K_{D,c}}{K_{D,o}}\right)^4$$

Auflösen dieser Gleichung nach IC_{50} ergibt schließlich:

$$IC_{50} = K_{D,c} \cdot \frac{\left(\sqrt[4]{\frac{2 - P_o(0) - P_o(\infty)}{(P_o(0) + P_o(\infty)) \cdot \left(\frac{1}{P_o(0)} - 1\right)} - 1}\right)}{1 - \frac{K_{D,c}}{K_{D,o}} \cdot \sqrt[4]{\frac{2 - P_o(0) - P_o(\infty)}{(P_o(0) + P_o(\infty)) \cdot \left(\frac{1}{P_o(0)} - 1\right)}}}$$

Für $K_{D,o} \rightarrow \infty$ und somit $P_o(\infty) \rightarrow 0$ nimmt der Nenner in obigem Bruch den Wert $1 - 0 = 1$

an, der Zähler vereinfacht sich zu $\left(\sqrt[4]{\frac{2 - P_o(0)}{1 - P_o(0)}} - 1\right)$, so dass gilt:

$$\lim_{K_{D,o} \rightarrow \infty} IC_{50} = \left(\sqrt[4]{\frac{2 - P_o(0)}{1 - P_o(0)}} - 1\right) \cdot K_{D,c}$$

Den kleinstmöglichen Wert $\sqrt[4]{2} - 1 \approx 0.2$ weist der Faktor $\left(\sqrt[4]{\frac{2 - P_o(0)}{1 - P_o(0)}} - 1\right)$ für $P_o(0) \rightarrow 0$ auf.

Für $P_o(0) \rightarrow 1$ wird er und damit die IC_{50} hingegen beliebig groß.

7 Mechanismus der K_{ATP} -Kanal-Hemmung durch Tetrapentylammonium (TPA)

7.1 Fragestellung

Die hemmende Wirkung von quartären Alkylammoniumsalzen auf K^+ -Kanäle wurde bereits vor mehreren Jahrzehnten erkannt. Quast, 1996 untersuchte in $^{86}\text{Rb}^+$ -Efflux-Experimenten an Rattenaorten die Inhibition des vaskulären K_{ATP} -Kanals durch verschiedene symmetrische Tetra-n-Alkylammoniumionen und identifizierte Tetrapentylammonium (TPA) als den potentesten Vertreter der getesteten Hemmstoffe ($\text{pIC}_{50} = 6.89$).

Als Mechanismus der Hemmung wurde ein direktes Blockieren der Kanalpore vermutet (z.B. French und Shoukimas, 1981). Da die V59G-Mutation in Kir6.2(V59G)/SUR1 keinerlei Einfluss auf die Wirkung des Porenblockers Ba^{2+} zeigte (vgl. Kap. 6.2.2), war es daher überraschend, dass die Sensitivität des mutanten Kanals für TPA im Vergleich zum wildtypischen Kir6.2/SUR1 stark reduziert war (vgl. Kap. 7.2). Weiterführende Patch-Clamp-Experimente an Kir6.2(V59G)/SUR1 und Kir6.2/SUR1 unter verschiedenen Bedingungen sollten Aufschluss geben, inwieweit das ursprüngliche Modell von TPA als reinem Porenblocker aufrechterhalten werden kann, bzw. welche alternativen Mechanismen der Hemmwirkung von TPA zugrunde liegen könnten.

7.2 Ergebnisse

Die reduzierte ATP-Empfindlichkeit von Kir6.2(V59G)/SUR1 erschwerte die Bestimmung des „Nullniveaus“ in inside-out-Messungen (vgl. Kap. 6.2). Auf der Suche nach einem effizienten Ersatz für ATP wurde neben Ba^{2+} auch TPA erprobt. Wie erläutert hatte die V59G-Mutation keinerlei Einfluss auf Ba^{2+} , welches den mutanten, wie auch den wildtypischen Kanal vollständig blockte (vgl. Kap. 6.2.2). Für TPA wurde ein analoger Wirkmechanismus und daher ein ähnliches Verhalten an Kir6.2/SUR1 und Kir6.2(V59G)/SUR1 erwartet. In dieser Versuchsreihe wurde der K_{ATP} -Strom durch schnelle Spannungssprünge in der i.o.-Konfiguration parallel bei -50 und $+50$ mV aufgezeichnet. So zeigen Abb. 7-1(b) und Abb. 7-1(c) den Stromverlauf in ein und demselben Experiment an Kir6.2(V59G)/SUR1 bei unterschiedlichen Potentialen. Bei -50 mV erwiesen sich sowohl TPA ($100 \mu\text{M}$) als auch Ba^{2+} (1 mM) als nur sehr schwache Blocker des V59G-Kanals (Abb. 7-1(b)), während bei $+50$ mV (Abb. 7-1(c)) eine signifikante Hemmung des Stroms

beobachtet wurde. Die Effekte von TPA und Ba^{2+} am mutanten Kanal waren somit qualitativ ähnlich, wenngleich in den eingesetzten Konzentrationen TPA nur etwa 20 %, Ba^{2+} dagegen 100 % Inhibition induzierte. Am wildtypischen Kanal war TPA jedoch auch bei negativem Potential wirksam (Abb. 7-1(a)) und verursachte bereits in einer Konzentration von 10 μ M eine Hemmung von 86 ± 2 % ($n = 9$). 100 μ M TPA sorgten mit 99 ± 1 % ($n = 6$) für eine fast vollständige Inhibition bei sowohl -50 als auch $+50$ mV. PIP_2 (10 μ M) aktivierte den durch TPA inhibierten Kir6.2/SUR1 wieder (Abb. 7-1(a)).

Auch in der Ganzzell-Konfiguration wurden beim Einsatz von TPA Unterschiede zwischen dem V59G-Kanal und dem Wildtyp sichtbar. Zwar riefen 100 μ M TPA eine starke Hemmung des mutanten Kanals hervor (88 ± 4 %; $n = 4$), die Inhibition des Wildtyps war bei dieser TPA-Konzentration jedoch vollständig ($n = 6$) und folgte einer schnelleren Kinetik (vgl. Abb. 7-1(d,e)).

Zusammen sprechen diese Ergebnisse dafür, dass TPA nicht nur als (im Vergleich zu Ba^{2+} schwächerer) Porenblocker wirkt, sondern noch auf mindestens einem weiteren Weg eine hemmende Wirkung entfaltet.

Um zu prüfen, ob für diesen zweiten Mechanismus, der anscheinend durch die V59G-Mutation des Kir6.2 weitestgehend aufgehoben wird, der SUR erforderlich ist, wurde die Wirksamkeit von TPA auch an Kir6.2 Δ C26 untersucht. Dieser C-terminal verkürzte Kir benötigt für den Transport in die Cytoplasmamembran keinen SUR und bildet auch ohne Letzteren einen funktionellen K_{ATP} -Kanal aus (vgl. Kap. 1.2.1). Abb. 7-2 belegt, dass sowohl TPA ($IC_{50} \approx 0.8$ μ M) als auch PIP_2 ihre jeweilige Wirkung auch in Abwesenheit des SUR entwickeln.

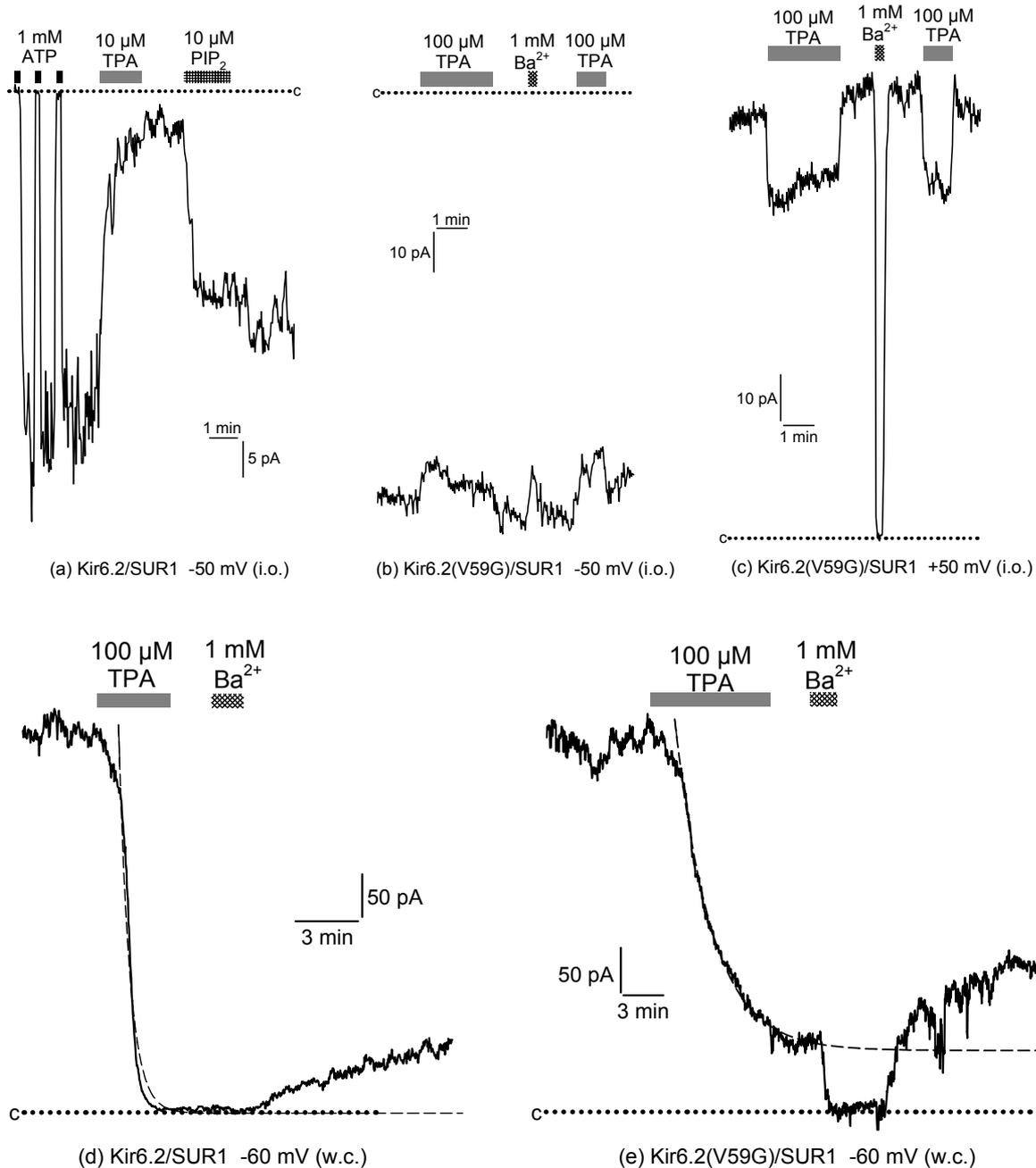


Abb. 7-1: Hemmwirkung von TPA auf Kir6.2/SUR1 und Kir6.2(V59G)/SUR1. (a) wt: i.o./-50 mV; TPA (10 μ M) bewirkt eine starke (hier: \sim 90 %) Hemmung des Wildtyps, der durch anschließende Applikation von PIP₂ (10 μ M) wieder aktiviert wird. (b,c) V59G: i.o.; Dargestellt ist jeweils das selbe Experiment (vgl. Text), das parallel bei -50 mV (b) und bei +50 mV (c) aufgezeichnet wurde. Beim negativen Potential zeigen TPA (100 μ M) und Ba²⁺ (1 mM) nur einen geringen Effekt auf Kir6.2(V59G)/SUR1, bei +50 mV hingegen einen vollständigen (Ba²⁺) bzw. ca. 20 % (TPA) Porenblock. Der Block ist komplett reversibel. (d) wt: w.c./-60 mV; In der whole-cell-Konfiguration ruft TPA (100 μ M) eine vollständige Inhibition des wildtypischen Kanals hervor. Aus der durch Anpassung einer Exponentialfunktion der Form $y = y_0 + a \cdot e^{-bx}$ an den abfallenden Strom erhaltenen Kurve (gestrichelte Linie) berechnet sich eine Halbwertszeit der Hemmung von ca. 20 s. (e) V59G: w.c./-60 mV; Im Fall von Kir6.2(V59G)/SUR1 reduzieren 100 μ M TPA den K_{ATP} -Strom auf etwa 15 % des Ausgangswerts. Die Inhibition erfolgt mit einer Halbwertszeit von fast 2 min und somit merklich langsamer als am Wildtyp.

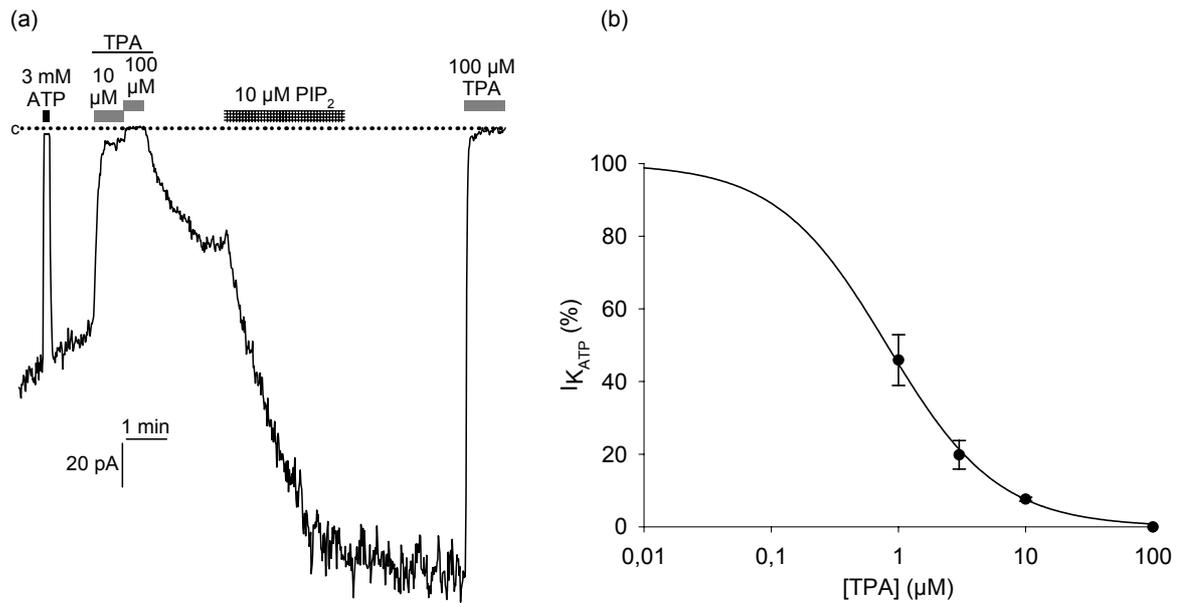


Abb. 7-2: Wirkung von TPA und PIP_2 auf Kir6.2 Δ C26 (i.o./-50 mV). (a) Repräsentatives Einzelexperiment: TPA (100 μ M) hemmt den Kanal komplett, PIP_2 (10 μ M) führt zu einer starken Aktivierung, die durch TPA wieder aufgehoben wird. Die gepunktete Linie stellt das „Null-Niveau“ des Stroms dar. (b) Konzentrations-Wirkungskurve zur Hemmung von Kir6.2 Δ C26 durch TPA. Aufgetragen ist der Strom I in % von I_0 (Strom in Abwesenheit von TPA) als Funktion der TPA-Konzentration. Die Datenpunkte stellen die Mittelwerte aus 3-7 Einzelexperimenten dar. Regressionsanalyse nach Gleichung $100 \% \cdot \frac{I}{I_0} = 100 \% \cdot \frac{1}{1 + 10^{pIC_{50} - p[TPA]}}$ ergibt einen pIC_{50} -Wert von 6.09 ± 0.02 , entsprechend einer IC_{50} von $\sim 0.8 \mu$ M.

7.3 Diskussion

Dass in der inside-out-Konfiguration der Patch-Clamp-Technik TPA (10-100 μ M) analog zu Ba^{2+} Kir6.2(V59G)/SUR1 bei -50 mV nur geringfügig hemmte, bei +50 mV aber eine starke Inhibition hervorrief (Abb. 7-1(b,c)), spricht dafür, dass TPA wie Ba^{2+} einen direkten Block der Kanalpore verursacht. Während der Porenblock durch Ba^{2+} jedoch von der Kir6.2-Mutation V59G in keinerlei Weise beeinträchtigt wurde (vgl. Kap. 6.2.2), zeigten sich im Fall von TPA sowohl in whole-cell- als auch in inside-out-Messungen deutliche Unterschiede zwischen wildtypischem und mutantern K_{ATP} -Kanal. So erwies sich TPA (100 μ M) in der i.o.-Konfiguration bei negativem Potential an Kir6.2(V59G)/SUR1 als fast wirkungslos, während der Wildtyp eine nahezu vollständige Hemmung erfuhr (vgl. Abb. 7-1(a,b)). In der whole-cell-Konfiguration konnte eine starke Inhibition des V59G-Kanals beobachtet werden, die jedoch nicht das Ausmaß der Hemmung am Wildtyp erreichte und insgesamt langsamer verlief (vgl. Abb. 7-1(d,e)). All dies suggeriert, dass für TPA am Wildtyp mindestens ein weiterer Hemmmechanismus existieren muss, der am Kir6.2(V59G)/SUR1 nicht mehr

funktioniert. Ein solcher Mechanismus könnte u.a. eine Störung der Kir-SUR-Kopplung oder eine Interferenz mit der Phospholipid-Aktivierung des Kanals beinhalten.

Bei Verkürzung seines C-Terminus und der damit einhergehenden Deletion des RKR-Retentionsmotivs bildet Kir6.2 auch ohne SUR einen funktionellen Kanal aus (vgl. Kap. 1.2.1). Die Offenwahrscheinlichkeit dieses Kanals ist mit 0.08 ± 0.02 (Antcliff et al., 2005) jedoch deutlich niedriger als die des vollständigen Kanals aus Kir6.2 und SUR1, welche von Proks et al., 2004 mit 0.53 ± 0.08 angegeben wird. D.h. auch in Abwesenheit von Nukleotiden ist der Einfluss von SUR1 entscheidend für einen Großteil der Kanalaktivität. Sollte TPA diesen Einfluss vollständig unterdrücken, würde dies rechnerisch einen Rückgang des K_{ATP} -Stroms um $85 \pm 4 \%$ nach sich ziehen. Für den mutanten Kanal hingegen wäre der Aktivitätsverlust allenfalls gering, da die Offenwahrscheinlichkeit von Kir6.2 Δ C26(V59G) (d.h. ohne SUR1) mit 0.78 ± 0.03 (Antcliff et al., 2005) nur knapp unter der von Kir6.2(V59G)/SUR1 mit 0.83 ± 0.01 (Proks et al., 2004) liegt. Wie aus Abb. 7-2 deutlich wird, erwies sich TPA jedoch auch als effizienter Inhibitor von Kir6.2 Δ C26 (d.h. in Abwesenheit von SUR1), so dass der Hemmmechanismus dieser Substanz nicht in einer Störung der Kir-SUR-Kopplung zu suchen ist. Denkbar wäre hingegen ein Interferieren von TPA mit der aktivierenden Wirkung von Phospholipiden wie PIP₂ oder Oleoyl-CoA (vgl. Kap. 1.2.3.1.3). Für verschiedene kationische Verbindungen wie Neomycin, Poly-Lysin, etc. wird vermutet, dass sie Komplexe mit zellulären Phospholipiden ausbilden und so deren Interaktionen mit der Kir-Untereinheit des K_{ATP} -Kanals unterbinden (vgl. Kap. 6.2.4). Die positive Ladung von TPA in Kombination mit seinen lipophilen Pentylketten lassen es als potentiell gut geeignet für derartige Wechselwirkungen erscheinen. Tatsächlich ließ sich der wildtypische Kanal nach Inhibition mit TPA durch PIP₂ wieder aktivieren (Abb. 7-1(a)). Da der SUR für die PIP₂-Aktivierung nicht erforderlich ist (vgl. Abb. 7-2(a) und Enkvetchakul et al., 2000), ist auch die TPA-Hemmung von Kir6.2 Δ C26 (vgl. Abb. 7-2) vereinbar mit der Hypothese, dass TPA die Aktivierung durch Phospholipide aufhebt. Für Kir6.2(V59G)/SUR1 wurde in Kap. 6.2.4 demonstriert, dass die hohe Offenwahrscheinlichkeit dieses Kanals durch PIP₂ nicht noch weiter erhöht werden kann. Entsprechend unempfindlich wäre der mutante Kanal gegen eine Hemmung durch TPA nach dem beschriebenen Mechanismus.

In der whole-cell-Konfiguration begünstigt das negative Haltepotential von -60 mV den Porenblock durch das extrazellulär applizierte TPA. Ein Grund dafür, dass $100 \mu\text{M}$ TPA am Kir6.2(V59G)/SUR1 mit $88 \pm 4 \%$ (vgl. Abb. 7-1(e)) einen vierfach stärkeren Block hervorrufen als in der inside-out-Konfiguration bei $+50$ mV (vgl. Abb. 7-1(c)), könnte sein, dass der Selektivitätsfilter aufgrund seiner asymmetrischen Lage in der Membran (vgl. Abb.

1-2) von der extrazellulären Seite möglicherweise besser zugänglich ist. Es wird angenommen, dass dieser Kanalabschnitt die Bindungsstelle für effiziente Porenblocker wie Ba^{2+} darstellt (Jiang und MacKinnon, 2000).

Die Untersuchungen belegen, dass die hemmende Wirkung des Kaliumkanalblockers TPA im Vergleich zu Ba^{2+} neben dem Porenblock nach mindestens einem zusätzlichen Mechanismus erfolgt. Hierfür diskutiert wurde die Hypothese einer Unterdrückung der Phospholipidaktivierung. Ein noch besseres Verständnis der molekularen Effekte von TPA vorausgesetzt, könnte die Substanz ein nützliches Werkzeug bei der Charakterisierung bestimmter Mutanten insbesondere des K_{ATP} -Kanals darstellen.

8 Vergleich der Hemmstärke in whole-cell- und inside-out-Konfiguration der Patch-Clamp-Technik: Messungen mit Meglitinid

8.1 Fragestellung

D. Stephan (Abt. Molpharm.) ermittelte in elektrophysiologischen Messungen an HEK293-Zellen die Selektivität von GBC und REP (vgl. Tab. 3-5) für den pankreatischen im Vergleich zu den kardiovaskulären K_{ATP} -Kanälen (Stephan et al., 2006b). Untersuchungen der verschiedenen K_{ATP} -Kanal-Subtypen in der whole-cell-Konfiguration erwiesen sich dabei im Fall von Kir6.2/SUR1 als problematisch, da bereits bei niedrigen Inhibitorkonzentrationen (1 nM GBC bzw. 10 nM REP) eine fast vollständige, irreversible Hemmung des Stroms erreicht wurde, diese sich jedoch so langsam einstellte, dass experimentell bedingt keine noch niedrigeren Konzentrationen getestet werden konnten. Aus einer Inhibition von $\geq 95\%$ des Stroms bei obigen Ligandkonzentrationen, wurden IC_{50} -Werte von ≤ 0.05 nM (GBC) und ≤ 0.5 nM (REP) abgeschätzt. Inside-out-Messungen hingegen ergaben eine IC_{50} von 0.48 nM (GBC) bzw. 0.79 nM (REP) (Stephan et al., 2006b).

Vor diesem Hintergrund sollte nun unter zu den Arbeiten von Stephan analogen Messbedingungen ein Ligand mit geringerer Potenz als GBC und REP untersucht werden, der eine reversible Hemmung des pankreatischen K_{ATP} -Kanals hervorruft. Das Verhältnis der IC_{50} -Werte dieses Liganden in Ganzzell- und i.o.-Konfiguration sollte dazu dienen, aus den für GBC und REP in den inside-out-Messungen erhaltenen IC_{50} -Werten (s.o.) die auf direktem Weg nicht genau bestimmbare (s.o.) Potenz dieser Verbindungen in der Ganzzell-Konfiguration abzuschätzen. Als eine für diese Aufgabe geeignete Substanz erschien Meglitinid (MEG), ein B-Ligand (REP zählt ebenfalls zu den B-Liganden, GBC ist ein A+B-Ligand; vgl. Kap. 1.2.4.1) mit einer moderaten Bindungsaffinität von ca. 3 μ M (vgl. Tab. 3-3).

8.2 Ergebnisse

Aufgabe war es, in Patch-Clamp-Messungen die Inhibition von Kir6.2/SUR1 durch Meglitinid (MEG) in inside-out- und whole-cell-Konfiguration zu untersuchen, um anhand dieser Ergebnisse die Potenz von GBC und REP in der whole-cell-Konfiguration abzuschätzen, nachdem eine direkte Bestimmung sich für die beiden letztgenannten insulinotropen Substanzen als experimentell problematisch herausgestellt hatte (vgl. Kap. 8.1).

Zunächst wurde die Potenz in der inside-out-Konfiguration bestimmt. Abb. 8-1 zeigt in einem typischen Einzelexperiment die konzentrationsabhängige reversible Inhibition von Kir6.2/SUR1 durch Meglitinid. Dieses erreichte in einer Konzentration von 100 μM das selbe Ausmaß an Hemmung wie 100 nM GBC.

Ein exemplarisches Experiment zur Wirkung von Meglitinid in der Ganzzell-Konfiguration findet sich in Abb. 8-2.

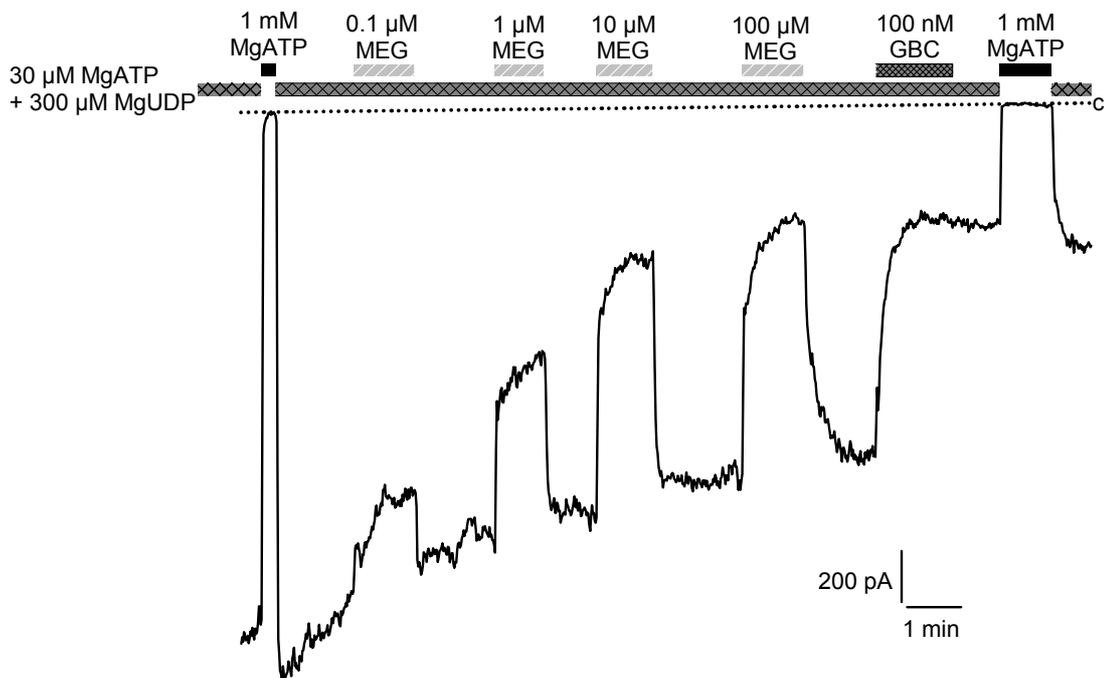


Abb. 8-1: Inhibition des rekombinanten K_{ATP} -Kanals aus Kir6.2 (Maus) und SUR1 (Ratte) durch Meglitinid (MEG), sowie ATP und Glibenclamid (GBC) in der inside-out-Konfiguration (repräsentatives Einzelexperiment). Die gepunktete Linie stellt das „Null-Niveau“ des Stroms dar, definiert durch die vollständige Hemmung der Kanäle durch 1 mM MgATP.

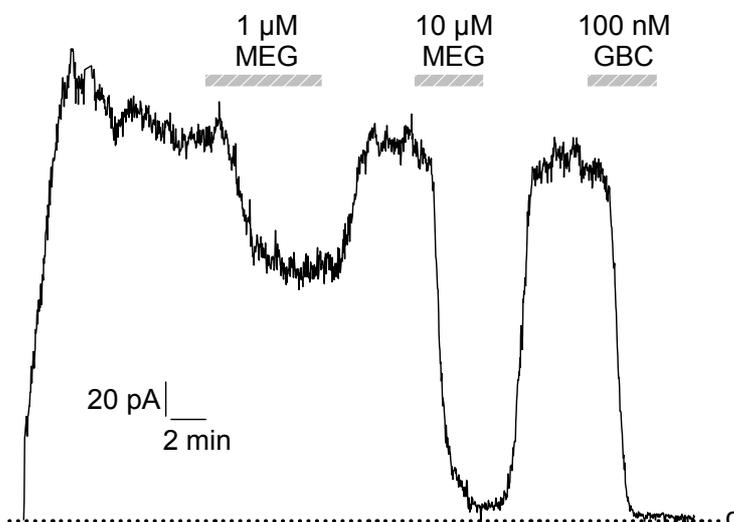


Abb. 8-2: Inhibition des pankreatischen K_{ATP} -Kanals Kir6.2/SUR1 durch Meglitinid (MEG) und Glibenclamid (GBC) in der whole-cell-Konfiguration (repräsentatives Einzelexperiment). Die gepunktete Linie stellt das „Null-Niveau“ des Stroms dar. Man beachte das charakteristische anfängliche Anwachsen des Stroms im Zuge der Zeldialyse mit der Pipettenlösung (1 mM MgATP, 0.3 mM MgGDP; vgl. Kap. 2.10.8.1).

In Abb. 8-3 ist die Bestimmung der IC_{50} der MEG-Inhibition aus den gemittelten Einzelexperimenten dargestellt. Die Regression lieferte für die inside-out-Konfiguration einen Wert (angegeben mit 95%-Konfidenzintervall) von $0.27 \mu\text{M}$ ($0.22, 0.32$), für die Ganzzell-Konfiguration hingegen $1.51 \mu\text{M}$ ($1.32, 1.74$) (vgl. Tab. 8-1).

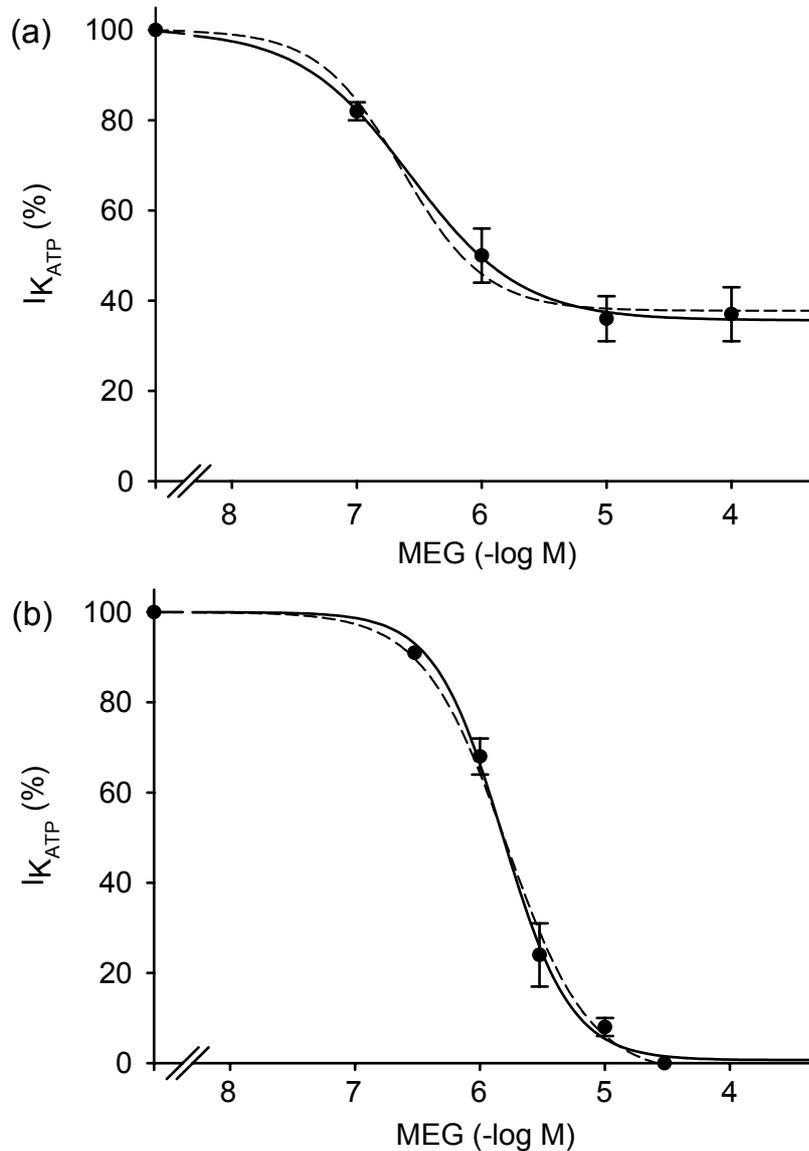


Abb. 8-3: Konzentrations-Wirkungs-Kurve zur Inhibition von Kir6.2/SUR1 durch Meglitinid in der (a) inside-out-Konfiguration (Mittelwerte aus 21 Einzelexperimenten) und der (b) whole-cell-Konfiguration (Mittelwerte aus 11 Einzelexperimenten). Dargestellt ist der K_{ATP} -Strom I in % vom maximalen Strom I_0 in Abwesenheit vom Inhibitor. In Analogie zur für die Bindungsstudien hergeleiteten Gleichung 2-9 (vgl. Kap. 2.9.1) wurden die Kurven durch Regression nach folgender Formel erstellt: $100 \% \cdot \frac{I}{I_0} = a \cdot \frac{1}{1 + 10^{n_H \cdot (pIC_{50} - p[MEG])}} + (100 \% - a)$, wobei $[MEG]$ die molare

Meglitinidkonzentration, n_H den Hillkoeffizienten und a den prozentualen Anteil des durch Meglitinid hemmbaren Stroms an I_0 darstellt. Die gestrichelten Kurven beruhen auf einer Regression mit vorgegebenem Hill-Koeffizienten $n_H := 1.3$ (vgl. Kap. 8.3). Die Regression führte zu folgenden Ergebnissen (\pm SEM): (a) i.o.: $pIC_{50} = 6.57 \pm 0.04$, $a = (64.3 \pm 1.2) \%$, $n_H = 0.98 \pm 0.08$ (bzw. $pIC_{50} = 6.63 \pm 0.08$, $a = (62.2 \pm 2.0) \%$ für $n_H := 1.3$); (b) w.c.: $pIC_{50} = 5.82 \pm 0.03$, $a = (99.3 \pm 2.4) \%$, $n_H = 1.59 \pm 0.15$ (bzw. $pIC_{50} = 5.79 \pm 0.04$, $a = (102.7 \pm 2.8) \%$ für $n_H := 1.3$); vgl. Tab. 8-1.

Meglitinid erwies sich somit unter den gewählten Bedingungen in der inside-out-Konfiguration im Vergleich zur Ganzzell-Konfiguration als ca. sechsmal potenterer Inhibitor von Kir6.2/SUR1. Dies steht im Kontrast zu den Messungen mit Glibenclamid und Repaglinid, deren Potenz in der whole-cell-Konfiguration höher war (vgl. Tab. 8-1), so dass die indirekte Bestimmung der Letzteren über einen Vergleich mit Meglitinid nicht möglich ist.

Tab. 8-1: Inhibition von Kir6.2/SUR1 durch Meglitinid, Glibenclamid und Repaglinid in inside-out- und whole-cell-Konfiguration. a gibt den durch die jeweilige Verbindung hemmbaren Anteil des K_{ATP} -Stroms an (vgl. Abb. 8-3) und ist wie auch der Hill-Koeffizient n_H zusammen mit dem zugehörigen SEM angegeben. Die IC_{50} wird jeweils mit dem 95%-Konfidenzintervall vorgestellt. Die Werte zu MEG stammen aus der Regressionsanalyse in Abb. 8-3, die Daten zu GBC und REP aus Stephan et al., 2006b.

	MEG		GBC		REP	
	i.o.	w.c.	i.o.	w.c.	i.o.	w.c.
a (%)	64 ± 1	99 ± 2	86 ± 1	100	86 ± 1	100
IC_{50}	0.27 µM (0.22;0.32)	1.51 µM (1.32;1.74)	0.48 nM (0.47;0.49)	≤ 0.05 nM	0.79 nM (0.68;0.91)	≤ 0.5 nM
n_H	0.98 ± 0.08	1.59 ± 0.15	1*	-	1*	-

*: $n_H := 1$ festgesetzt

8.3 Diskussion

Für die Inhibition des rekombinanten pankreatischen K_{ATP} -Kanals durch Meglitinid wurde in guter Übereinstimmung mit Literaturdaten ein IC_{50} von 0.27 µM (inside-out) bzw. 1.5 µM (whole cell) ermittelt. So wurden IC_{50} -Werte von 0.5 µM (Schwanstecher et al., 1994), 0.26 µM (Gribble et al., 1998) und 1.2 µM (Dörschner et al., 1999) beschrieben (jeweils i.o.-Konfiguration). Die seltener angewendete Ganzzellkonfiguration verwendeten Zücker et al., 1988, um für Meglitinid an pankreatischen β -Zellen eine IC_{50} von 2.1 µM zu bestimmen. Geringe Unterschiede können neben den üblichen experimentellen Schwankungen u.a. mit unterschiedlichen Expressionssystemen (β -Zellen, HEK, COS, *Xenopus* Oocyten, etc.), Messtemperaturen und Nukleotidkonzentrationen begründet werden.

Mögliche Ursachen für die Diskrepanz dieser Werte von dem in Radioligandbindungsexperimenten bestimmten K_I von ca. 3 µM (vgl. Tab. 3-3) wurden bereits in Kap. 3.3.3 angesprochen. So lässt sich schon allein unter der Annahme, dass auch im Fall von Meglitinid bereits die Besetzung einer Inhibitorbindungsstelle für eine Schließung des Kanals

ausreicht, eine Linksverschiebung der Hemmkurve gegenüber der Bindungsaffinität vorhersagen. Damit verbunden wäre nach diesem Modell auch ein im Vergleich zu den Bindungsstudien steilerer Kurvenverlauf, genauer gesagt ein Hill-Koeffizient n_H von ca. 1.3 (Dörschner et al., 1999 und eigene Berechnungen). Die Hill-Koeffizienten der Regressionskurven liegen bei ca. 1.0 (i.o.; Abb. 8-3(a)) und 1.6 (w.c.; Abb. 8-3(b)), jedoch sollten diese Abweichungen nicht überbewertet werden. Tatsächlich führt in beiden Fällen eine Regression mit festem $n_H := 1.3$ zu Regressionskurven, die den Verlauf der Datenpunkte unter Berücksichtigung der jeweiligen Fehlerbalken sehr gut wiedergeben und dabei im Vergleich zur Regression mit freiem Hill-Koeffizienten jeweils sehr ähnliche IC_{50} -Werte berechnen (vgl. Abb. 8-3).

Dennoch gibt es neben den unterschiedlichen IC_{50} -Werten einen weiteren klaren Gegensatz zwischen den i.o.- und w.c.-Experimenten: die Effizienz, d.h. das Ausmaß der Inhibition. Während in den Ganzzell-Messungen Meglitinid und Glibenclamid bei einer Konzentration von 30 μM (MEG) bzw. 100 nM (GBC) eine komplette Hemmung des K_{ATP} -Stroms herbeiführten, riefen die selben oder höhere Konzentrationen in der inside-out-Konfiguration trotz der im Fall von Meglitinid sogar niedrigeren IC_{50} nur eine Hemmung von etwa 60-80 % des durch ATP inhibierbaren Stroms hervor. Dieses Phänomen wurde von Gribble et al., 1997c am Beispiel von Tolbutamid ergründet: 500 μM dieses Sulfonylharnstoffs inhibierten (genauso wie 10 μM Meglitinid bzw. 100 nM Glibenclamid) in intakten *Xenopus* Oocyten Kir6.2/SUR1 zu ca. 95 % (Gribble et al., 1997a), während in i.o.-Messungen in Abwesenheit von Nukleotiden nur 59 % Hemmung erzielt wurden. Der letztgenannte Wert erhöhte sich jedoch in Anwesenheit von 100 μM MgADP auf 84 % (jeweils Gribble et al., 1997c). Umgekehrt wurde in unserer Arbeitsgruppe beobachtet, dass Glibenclamid und Repaglinid auch in der whole-cell-Konfiguration keine komplette Inhibition von Kir6.2/SUR1 mehr hervorrufen, wenn eine nukleotidfreie, EDTA-haltige (5 mM) Pipettenlösung verwendet wird (R. Prager, unveröffentlicht).

Ohne Tolbutamid oder andere Insulinotrope übt MgADP auf K_{ATP} -Kanäle gleichzeitig einen inhibitorischen (über Kir) und einen aktivierenden (über SUR) Effekt aus, wobei in einer Konzentration von 100 μM die aktivierende Wirkung überwiegt (Tucker et al., 1997; Gribble et al., 1997b). Tolbutamid, so die Hypothese von Gribble und Kollegen, unterdrückt die SUR1-vermittelte Aktivierung vollständig und demaskiert den hemmenden Effekt von MgADP auf die porenbildende Untereinheit. Dazu passend werden die in Gegenwart von Tolbutamid verbleibenden K_{ATP} -Ströme durch zusätzlich appliziertes MgADP (100 μM) nicht erhöht, sondern noch weiter reduziert. Diese Verstärkung der Tolbutamid-Hemmung wird bei

Verwendung von MgGDP, dessen inhibierende Wirkung auf den Kir bei einer Konzentration von 100 μM vernachlässigbar klein ist (Trapp et al., 1997), nicht beobachtet (Gribble et al., 1997c). Somit dürfte auch die unterschiedliche Effizienz von Meglitinid an Kir6.2/SUR1 in den inside-out- (64 %; Abb. 8-3(a)) und den whole-cell-Experimenten (99 %; Abb. 8-3(b)) ganz wesentlich auf die unterschiedlichen Nukleotidkonzentrationen zurückzuführen sein (i.o.: 30 μM MgATP, 0.3 mM MgUDP; w.c.: 1 mM ATP, 0.3 mM MgGDP).

Etwas anders stellt sich die Situation am ventrikulär-myocardialen K_{ATP} -Kanal Kir6.2/SUR2A dar. Während Kir6.2/SUR1 und Kir6.2/SUR2A in Abwesenheit von Nukleotiden durch 100 nM Glibenclamid in ähnlichem Ausmaß (ca. 70 %) gehemmt werden, und 100 μM MgADP bei Kir6.2/SUR1 konsistent mit obigem Modell den Block auf ca. 90 % verbessern, bewirkt das Nukleotid am Kir6.2/SUR2A das Gegenteil: eine Verringerung der Inhibition auf ca. 10 % (Gribble et al., 1998). Anscheinend ist Glibenclamid hier nicht in der Lage, die SUR-vermittelte Aktivierung des Kanals durch MgADP aufzuheben. Dies wirkt sich auch auf die Effizienz von Glibenclamid in der whole-cell-Konfiguration aus. So beträgt unter den selben Bedingungen, unter denen mit GBC eine vollständige Hemmung von Kir6.2/SUR1 erreicht wird, die Inhibition von Kir6.2/SUR2A im Mittel lediglich 56 % (Stephan et al., 2006b).

An dieser Stelle sei erwähnt, dass Tolbutamid, Glibenclamid und andere Insulintrope bei sehr hohen Konzentrationen am Kir einen nukleotidunabhängigen „Porenblock“ hervorrufen, für den, wie Experimente mit Kir6.2 ΔC36 (vgl. Kap. 1.2.1) zeigten, die SUR-Untereinheit nicht erforderlich ist. Die IC_{50} dieser niederaffinen Inhibition ist im Vergleich zur SUR-vermittelten Inhibition jedoch um mehrere Größenordnungen höher (z.B. Tolbutamid: 2 mM, GBC: 110 μM ; Gribble et al., 1998) und ist somit physiologisch irrelevant.

Wie eingangs von Kap. 8.2 erläutert, wurde die IC_{50} für die Inhibition von Kir6.2/SUR1 durch Meglitinid in i.o.- und w.c.-Konfiguration mit der Absicht bestimmt, über das Verhältnis dieser beiden Werte die Potenz von Glibenclamid und Repaglinid in der Ganzzell-Konfiguration abzuschätzen. Letztere konnte nicht direkt bestimmt werden, da auch bei niedrigen Konzentrationen noch eine praktisch vollständige Inhibition des Kanals beobachtet wurde, diese jedoch einer sehr langsamen Kinetik folgte (Stephan et al., 2006b). Da aber die Hemmung des pankreatischen K_{ATP} -Kanals durch Glibenclamid und auch Repaglinid (im Gegensatz zu Meglitinid) im zeitlichen Rahmen der Experimente irreversibel war, war es nicht möglich, nach Stabilisierung des Effekts das gebundene Glibenclamid wieder auszuwaschen. So konnte nicht geprüft werden, ob die vorher beobachtete Hemmung tatsächlich auf die applizierte Konzentration oder auf andere Phänomene („run-down“)

zurückzuführen war, was Messungen bei noch niedrigeren Konzentrationen und entsprechend längeren Applikationszeiten unzuverlässig gemacht hätte. Immerhin ließen die whole-cell-Untersuchungen darauf schließen, dass die IC_{50} -Werte nicht größer als 0.05 nM (GBC) bzw. 0.5 nM (REP) sein dürften. In der inside-out-Konfiguration hingegen wurden mit 0.48 nM (GBC) und 0.79 nM (REP) jeweils höhere IC_{50} -Werte ermittelt (Stephan et al., 2006b), so dass auch für Meglitinid eine höhere Potenz unter den Ganzzell-Bedingungen erwartet wurde. Tatsächlich aber zeigte Meglitinid die kleinere IC_{50} in der inside-out-Konfiguration (i.o.: 0.27 μ M, w.c.: 1.51 μ M; vgl. Tab. 8-1), so dass hieraus offensichtlich keine Rückschlüsse auf die Potenzen von Glibenclamid und Repaglinid möglich sind.

Dass die IC_{50} -Werte einer Substanz in i.o.- und w.c.-Konfiguration voneinander abweichen kann verschiedene Gründe haben. Die unterschiedliche Zusammensetzung von Pipetten (w.c.) und Patch-Lösung (i.o.) spielt sicher eine ganz wesentliche Rolle. Insbesondere Nukleotide können sich durch ihre bivalente Wirkung auf Kir und SUR (s.o.) nicht nur auf die Effizienz der verschiedenen Liganden, d.h. die mit diesen Substanzen maximal mögliche Inhibition, sondern auch auf deren Bindungsaffinitäten auswirken. Beispielsweise erhöht sich die K_D für die Bindung von Glibenclamid an den pankreatischen K_{ATP} -Kanal durch MgATP um einen Faktor von ca. 4-8 (Schwanstecher et al., 1991; Schwanstecher et al., 1992b), was nicht ohne Konsequenzen für die IC_{50} in der Elektrophysiologie bleiben kann. Auch muss davon ausgegangen werden, dass die Offenwahrscheinlichkeit (P_o) des Kanals unter den i.o.-Bedingungen wegen der im Vergleich zu den w.c.-Messungen deutlich niedrigeren ATP-Konzentration (30 μ M vs. 1 mM) entsprechend höher war. Dies sollte ebenfalls die IC_{50} von Inhibitoren beeinflussen, die den Geschlossenzustand des Kanals stabilisieren. Ein weiterer Unterschied zwischen den beiden Messkonfigurationen besteht darin, dass das Cytoskelett in whole-cell-Messungen weitestgehend intakt bleibt. Diverse cytosolische Faktoren inkl. verschiedener Enzyme wie Kinasen, Phosphatasen, etc. (vgl. Kap. 1.2.3) können somit weiterhin die Kanalaktivität beeinflussen, während sie bei einem Ausreißen des patch in der inside-out-Konfiguration verloren gehen. Schließlich muss auch die Messtemperatur berücksichtigt werden, die hier einmal bei 37 °C (w.c.) und einmal bei Raumtemperatur (ca. 23 °C) (i.o.) lag, mit entsprechenden Auswirkungen auf die Aktivität diverser Enzyme inkl. der ATPasen in den NBFs des Sulfonylharnstoffrezeptors.

Schwieriger ist die Interpretation, warum Glibenclamid und Repaglinid einerseits und Meglitinid andererseits unterschiedlich auf den Wechsel der Messbedingungen reagieren, d.h. warum bei analogen Bedingungen Glibenclamid und Repaglinid in der whole-cell-, Meglitinid dagegen in der inside-out-Konfiguration höhere Potenz zeigt. Glibenclamid zählt

zur Gruppe der A+B-Liganden (vgl. Kap. 1.2.4.1). Meglitinid entspricht dem B-Teil von Glibenclamid, so dass man gegenteilige Effekte des Konfigurationswechsels auf A- und B-Bindungsstelle von SUR1 vermuten könnte. Andererseits handelt es sich bei Repaglinid ebenfalls um einen B-Liganden, wenngleich ihm als Piperidinoglinid innerhalb der Gruppe der B-Liganden eine gewisse Sonderstellung zukommt (vgl. Kap. 3.3). Um das Phänomen tatsächlich verstehen zu können, wäre es wohl unabdingbar, noch weitere Messungen anzuschließen, idealerweise bei in beiden Messkonfigurationen identischen Nukleotidkonzentrationen. Die Experimente könnten ähnlich zu den in Kap. 3 beschriebenen Bindungsstudien eine Charakterisierung von verschiedenen A-, B- und wenn möglich A+B-Liganden in w.c.- und i.o.-Konfiguration beinhalten. Auch vergleichende Experimente an Kir6.2/SUR2A, sowie gezielte Variation, besonders der eingesetzten Nukleotidkonzentrationen wären ein Ansatz zur Identifizierung der kritischen Komponenten, was wiederum die Voraussetzung für das Verständnis der entscheidenden Mechanismen darstellt.

9 Identifizierung bislang unbekannter Interaktionspartner von Kir6.1 mit Hilfe des Hefe-Zweihybrid-Systems für Membranproteine (MY2H)

9.1 Fragestellung

Wie in Kap. 1.2.3 ausgeführt liegt der (Kir/SUR)₄-Komplex keineswegs isoliert vor, sondern assoziiert (transient oder permanent) mit einer Reihe verschiedener Faktoren. Unter den bislang identifizierten Interaktionspartnern finden sich u.a. so unterschiedliche Proteine wie Kinasen, Caveolin, SNARE-Proteine, Glycolyse-Enzyme, Guaninnukleotidaustauschfaktoren, Lactatdehydrogenase oder Komponenten des Cytoskeletts (vgl. Kap. 1.2.3). Unter welchen Bedingungen und auf welche Art und Weise diese Faktoren auf die Aktivität der K_{ATP}-Kanäle Einfluss nehmen, ist nach wie vor nicht vollständig aufgeklärt. Auch wurden die beschriebenen Interaktionen in vielen Fällen nur für z.B. den ventrikulär-myocardialen K_{ATP}-Kanal nachgewiesen. Ob sie auch in anderen Geweben, an anderen K_{ATP}-Kanal-Subtypen auftreten bzw. welche physiologische Bedeutung ihnen dort zukommt, ist nicht bzw. nur unzureichend erforscht.

Ein Ziel dieser Arbeit bestand in der Suche nach (weiteren) Interaktionspartnern von Kir6.1 bzw. Kir6.1/SUR2B (aber vgl. Kap. 9.2.1). Für einen solchen „Screen“ sollte ein für die Erforschung von Membranproteinen modifiziertes Hefe-Zweihybrid-System zum Einsatz kommen. Insbesondere galt das Interesse der potentiellen Identifikation von spezifisch mit Kir6.1 wechselwirkenden Proteinen, die möglicherweise zu den teilweise sehr ausgeprägten Unterschieden bei der Regulation und Aktivität von Kir6.1- und Kir6.2-Kanälen beitragen (vgl. Kap. 1.2.3 und Kap. 6).

9.2 Ergebnisse

Für die Suche nach bislang unbekanntem Interaktionspartnern des vaskulären K_{ATP}-Kanals Kir6.1/SUR2B wurde das Ubiquitin-basierte Hefe-Zwei-Hybrid-System für Membranproteine („MY2H“) eingesetzt (vgl. Kap. 2.12.1). Die ursprüngliche Strategie sah vor, jeweils Kir6.1 oder SUR2B als den eigentlichen „Köder“ einzusetzen und das jeweils andere Protein co-zuexprimieren. Da es jedoch nicht gelang, die Expression von SUR2B nach Transformation des Hefestamms NMY51 mit den entsprechenden Vektoren nachzuweisen (s.u.), musste die Suche schließlich auf Interaktionspartner von Kir6.1 (in Abwesenheit von SUR2B) beschränkt werden.

9.2.1 Klonierung des „Köders“, Transformation, Nachweis der Expression und Optimierung der Selektionsbedingungen

Per PCR wurde das Stopcodon des Kir6.1-Gens entfernt, sowie Schnittstellen für Sfi I zur anschließenden Klonierung in den Vektor pCCW-STE eingefügt. Dies bedeutete zum einen die N-terminale Erweiterung von Kir6.1 um ein Leitpeptid von 19 Aminosäuren, welches dem N-Terminus des Hefeproteins Ste2 entstammt und die Expression in *S. cerevisiae* verbessern soll. Des weiteren resultierte am C-Terminus die Fusion mit dem Cub-LexA-VP16-Modul (vgl. Abb. 2-8). Mit diesem Konstrukt wurde NMY51 transformiert und die Zellen auf SD –Leu ausplattiert. Nach 2-3-tägiger Inkubation (30 °C) wurden mehrere Klone gepickt, aus denen Zelllysate für Western Blot-Analysen hergestellt wurden. Als Positivkontrolle wurde in einem parallelen Ansatz NMY51 mit pCCW-Alg5 transformiert. Die Expression dieses Fusionsproteins aus Alg5 (ein Transmembranenzym aus *S. cerevisiae*) und Cub-LexA-VP16 konnte mit dem verwendeten Anti-VP16-Antikörper eindeutig nachgewiesen werden. Ein Nachweis von STE-Kir6.1-Cub-LexA-VP16 gelang jedoch bei keinem der getesteten Klone (vgl. Abb. 9-1).

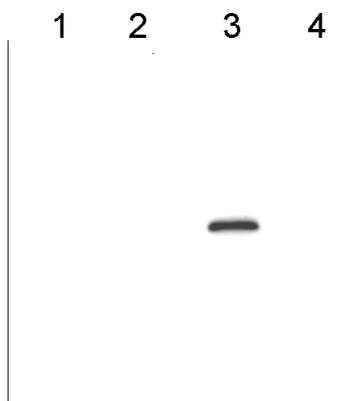


Abb. 9-1: Western Blot zum Nachweis von Cub-LexA-VP16-Fusionsproteinen in Hefelysaten. Die Hefeklone der Lysate 1, 2 und 4 waren mit dem Vektor pCCW-STE-Kir6.1, die Hefen für Lysat 3 (Positivkontrolle) mit pCCW-Alg5 transformiert worden. Nur im letztgenannten Fall konnte die Expression des entsprechenden Fusionsproteins nachgewiesen werden (primärer Antikörper: Anti-VP16).

Da eine schwache Expression des Kir-Konstrukts dennoch nicht auszuschließen war, wurde „NMY51-Kir6.1“ (der mit pCCW-STE-Kir6.1 transformierte Hefestamm) funktionell getestet. Hierzu wurde NMY51-Kir6.1 mit dem Vektor pAI-Alg5 bzw. pDL2-Alg5 (Negativkontrolle) transformiert und auf unterschiedlich stringente Selektionsmedien ausplattiert. Die beiden letztgenannten Vektoren codieren für Fusionsproteine aus der N-terminalen Hälfte von Ubiquitin und Alg5. Für pAI-Alg5 (im Gegensatz zu pDL2-Alg5) entspricht die Ubiquitinsequenz dem Wildtyp, so dass die Affinität für die Cub-Sequenz des „Köderproteins“ (so denn dieses exprimiert wird) stark genug ist, um auch ohne direkte Wechselwirkungen zwischen Kir6.1 und Alg5 eine Aktivierung auszulösen und Wachstum

auf den entsprechenden Selektionsmedien zu ermöglichen. Die Kolonien auf histidin- und/oder adeninfreiem Medium belegten die Expression des Kir6.1-Fusionsproteins (vgl. Tab. 9-1).

Tab. 9-1: Test auf funktionelle Expression des „Köders“ STE-Kir6.1-Cub-LexA-VP16 durch Transformation des Hefestamms mit pAI-Alg5 bzw. pDL2-Alg5. Wachstum auf tryptophanfreiem Medium belegt die erfolgreiche Transformation mit den letztgenannten Vektoren, Wachstum auf histidin- und/oder adeninfreiem Selektionsmedium nach Transformation mit pAI-Alg5 stellt einen indirekten Nachweis des Köders dar (zur Erklärung vgl. Text).

Selektionsmedium	Zahl der Hefekolonien	
	NMY51-Kir6.1 + pAI-Alg5	NMY51-Kir6.1 + pDL2-Alg5
SD -Leu-Trp	255	515
SD -Leu-Trp-His	15	0
SD -Leu-Trp-Ade	20	0
SD -Leu-Trp-His-Ade	36	0

Wie in Tab. 9-1 zu sehen, war die Zahl der Kolonien bei Selektion auf Aktivierung der Reportergene (vgl. Kap. 2.12.3.1) relativ klein. Es wurde jedoch keine Abnahme mit zunehmender Stringenz (von –His über –Ade zu –His-Ade) beobachtet, so dass die Anwendung der stringentesten Bedingungen (SD –Leu-Trp-His-Ade) möglich schien. Eine weitere Verfeinerung der Selektionsbedingungen wurde durch Zusatz von 3-Amino-1,2,4-Triazol (3-AT) erzielt. 3-AT inhibiert die von dem Reportergen *his3* codierte Imidazolglycerolphosphat-Dehydratase, deren basale Expression bei längerer Inkubation auch ohne spezifische Aktivierung zum Auftreten von „falsch-positiven“ Klonen führt. 3-AT-Konzentrationen zwischen 1 und 10 mM wurden getestet. Da bereits 1 mM 3-AT das Auftreten falsch positiver Klone in entsprechenden Tests deutlich reduzierte, wurde für die weiteren Experimente SD –Leu-Trp-His-Ade + 1 mM 3-AT festgelegt.

Für SUR2B wurde analog verfahren, jedoch gaben hier weder der Western Blot noch der funktionelle Test (Aktivierung durch pAI-Alg5) einen Hinweis auf erfolgreiche Expression. Auf eine Co-Expression von SUR2B (d.h. mit dem STE-Peptid fusionierter, ansonsten aber unveränderter SUR2B) mit dem „Köder“ STE-Kir6.1-Cub-LexA-VP16 musste ebenfalls verzichtet werden, nachdem sich in Bindungstests mit [³H]P1075 an Membranen

entsprechend transformierter Hefen keine spezifische Bindung und somit auch kein Hinweis auf Expression von SUR2B ergeben hatte (nicht gezeigt).

9.2.2 Transformation der cDNA-Bibliothek, Identifizierung, Isolierung und erneute Transformation potentieller Interaktionspartner

Die cDNA-Bibliothek wurde wie in Kap. 2.12.9 beschrieben in den das Kir6.1-Fusionsprotein exprimierenden Hefestamm transformiert. Nachdem in den ersten Transformationen insgesamt nur etwas mehr als eine Million Transformanten erhalten wurden, erreichte eine weitere Transformation die gewünschte höhere Effizienz, so dass insgesamt etwa 6.4 Millionen Transformanten erzielt wurden. Von den Platten mit SD –Leu-Trp-His-Ade + 1 mM 3-AT (d.h. dem Medium, mit dem auf Aktivierung der Reportergene selektiert wurde) konnten nach mehrtägiger Inkubation (30 °C) 229 Klone gepickt werden, die auf frischen Platten (SD –Leu-Trp-His-Ade + 1 mM 3-AT) ausgestrichen wurden. Viele dieser Klone zeigten bei der anschließenden Inkubation (30 °C) mäßiges oder schwaches Wachstum, vereinzelt wuchsen sie überhaupt nicht mehr heran.

Für sämtliche Klone wurde semiquantitativ die β -Galactosidaseaktivität ermittelt (vgl. Kap. 2.12.10). Dieses Enzym wird durch das *lacZ* Gen codiert, dessen Aktivierung ebenfalls eine Folge positiver Interaktionen zwischen dem „Köder-“ und einem „Beuteprotein“ ist. Aus insgesamt 26 Klonen, die starkes Wachstum auf SD –Leu-Trp-His-Ade + 1 mM 3-AT zeigten und/oder hohe β -Galactosidaseaktivität aufwiesen, wurde der Beutevektor isoliert und in NMY51-Kir6.1 retransformiert. Als Kontrollen wurden pAI-Alg5 (Positivkontrolle) und pDSL-Nx bzw. pDL2-Alg5 (Negativkontrollen) transformiert. Das Wachstum der retransformierten Klone auf SD –Leu-Trp-His-Ade + 1 mM 3-AT war insgesamt sehr mäßig. In vielen Fällen ließ es sich nicht von den Negativkontrollen unterscheiden (d.h. einige wenige sehr kleine Kolonien nach mehrtägiger Inkubation). In keinem Fall wurden auch nur annähernd so viele Kolonien gezählt wie bei der Positivkontrolle (pAI-Alg5: mehrere hundert Kolonien). Bei vier Klonen wurde dennoch ein im Vergleich zu den Negativkontrollen signifikant stärkeres Wachstum festgestellt (je ca. 10 mittelgroße Kolonien), d.h. die Aktivierung des Köders (durch Bindung des jeweiligen Beuteproteins) wurde erneut beobachtet. Bei einem fünften Klon (Klon 224) wurden neben etlichen kleinen Kolonien immerhin ca. 40 mittelgroße bis sehr große Kolonien gefunden.

Die besagten fünf Klone wurden sequenziert (vgl. Kap. 2.12.11).

9.2.3 Sequenzierergebnis der „positiven“ Klone

Die fünf Beutevektoren, die bei Transformation in die den Kir6.1-Köder exprimierenden Hefen eine reproduzierbare Aktivierung der Reportergene hervorgerufen hatten (vgl. Kap. 9.2.2), wurden sequenziert, um die von ihnen codierten mutmaßlichen Kir6.1-Interaktionspartner zu identifizieren. Das Ergebnis der Sequenzierung ist nachfolgend aufgeführt.

Klon 96: NCU-G1

Bei Klon 96 war NubG (vgl. Kap. 2.12.1) mit der C-terminalen Hälfte (V192-N404) des Proteins NCU-G1 (UniProtKB Q9JHJ3) fusioniert, einem Transkriptionsfaktor (vgl. Kap. 9.3.2.1).

Klon 151: ATP Synthase Untereinheit a

Im Fall von Klon 151 war NubG mit A126-T226 der ATP Synthase Untereinheit a (Synonym: ATPase Protein 6) (UniProtKB P00848) fusioniert. Dieses Protein ist Teil des mitochondrialen ATP-Synthase-Komplexes der den in der Atmungskette erzeugten Protonengradient zur Herstellung von ATP aus ADP nutzt (vgl. Kap. 9.3.2.2).

Klon 212: LEM domain-containing protein 2

Beim von Klon 212 codierten Protein handelte es sich um eine Fusion aus NubG und P180-R511 des „LEM domain containing protein 2“ (LEM2, UniProtKB Q6DVA0). Das Protein ist in der inneren Kernmembran lokalisiert und spielt eine Rolle bei der Organisation der Zellkernstrukturen (vgl. Kap. 9.3.2.3).

Klon 219: Ubc-Protein

Das von der cDNA in Klon 219 codierte Protein deckte sich weitestgehend mit Abschnitten des Ubc Proteins (UniProtKB Q922Z8). Dieses Protein ist an der Modifizierung (Ubiquitinierung) anderer Proteine beteiligt und besteht im wesentlichen aus sechs Kopien des 76 Aminosäuren langen Ubiquitinmotivs (Hershko et al., 2000). Da es sich hierbei natürlich um die wildtypische Sequenz ohne die I13G-Mutation handelt, muss davon ausgegangen werden, dass die Aktivierung im MY2H-System durch Interaktion mit dem mit Kir6.1

fusionierten Ubiquitinfragment Cub hervorgerufen wurde (vgl. Kap. 2.12.1). Dieser Klon wurde daher verworfen und nicht weiter analysiert.

Klon 224: Laptm4a Protein

Das von Klon 224 codierte Protein beinhaltet die komplette Sequenz von Laptm4a („lysosomal-associated protein transmembrane 4A“), wobei anstelle von R193 der in UniProtKB erfassten Sequenz (Q8BG66) in Klon 224 Glycin steht. Laptm4a scheint in intrazelluläre Transportprozesse involviert zu sein (vgl. 9.3.2.4).

9.2.4 Überprüfung der im MY2H-System gefundenen Interaktionen durch Co-Immunopräzipitation

Die Wechselwirkungen zwischen Kir6.1 und NCU-G1, ATP Synthase Untereinheit a, LEM2 bzw. Laptm4a sollten per Co-Immunopräzipitation (Co-IP) überprüft werden. Im Fall eines positiven Ergebnisses sollte untersucht werden, ob die Interaktionen Kir6.1-spezifisch sind oder auch mit Kir6.2 auftreten.

Für diese Experimente wurden die mutmaßlichen Interaktionspartner in ihrer vollständigen Sequenz eingesetzt (d.h. nicht nur die im Beutevektor enthaltenen Fragmente; vgl. Kap. 9.2.3), zusätzlich versehen mit zwei N-terminalen FLAG-Epitoptags, während Kir6.1 und Kir6.2 an ihrem C-Terminus mit MYC-Tags markiert wurden (vgl. Kap. 2.12.12). Vor den Co-IP-Experimenten wurde zunächst die Expression der verschiedenen getaggtten Proteine überprüft. Dazu wurden HEK293 transfiziert, Membranen hergestellt, diese solubilisiert, die Lysate einer PAGE unterzogen und per Western Blot analysiert. Auf diesem Weg konnten die MYC-getaggtten Kirs, sowie die FLAG-getaggtten LEM2- und Laptm4a-Proteine nachgewiesen werden, jedoch nicht die FLAG-getaggtten Proteine NCU-G1 und ATP Synthase Untereinheit a. Auch im zweiten Anlauf (diesmal direkte Solubilisierung der HEK-Zellen ohne Membranpräparation) konnten Letztere nicht detektiert werden, so dass eine Bestätigung des Ergebnisses der MY2H-Untersuchungen für diese beiden Proteine mittels Co-IP so nicht möglich war.

Für die Co-IPs wurde Kir6.1-MYC allein (Negativkontrolle) oder zusammen mit dem FLAG-getaggtten zu untersuchenden Partner (LEM2 oder Laptm4a) in HEK293 exprimiert. Membranen wurden präpariert, solubilisiert und Kir6.1-MYC mit Hilfe eines Anti-MYC-Antikörpers und Protein G PLUS-Agarose immunopräzipitiert. Nach PAGE wurde im

anschließenden Western Blot auf Co-Immunopräzipitation der FLAG-getaggten Interaktionspartner geprüft.

Abb. 9-2 und Abb. 9-3 belegen sowohl für FLAG-LEM2, als auch für FLAG-Laptm4a eine Co-IP durch Kir6.1-MYC. In geringen Mengen wurde FLAG-LEM2 auch in Abwesenheit von Kir6.1-MYC präzipitiert (Abb. 9-2, Spur 4). Vergleicht man jedoch jeweils die Intensität der Banden für die beiden Lysate und die IPs, stellt man fest, dass sich das Verhältnis durch die IP umkehrt, d.h. die relative Anreicherung von FLAG-LEM im Ansatz mit Kir6.1-MYC ist auf die Interaktion dieser beiden Proteine zurückzuführen (das Ergebnis aus Abb. 9-2 wurde durch zweifache Wiederholung des Experiments bestätigt).

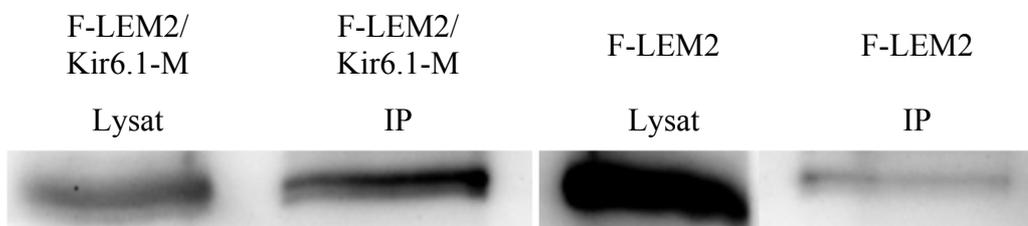


Abb. 9-2: Western Blot (Anti-FLAG) nach Co-IP (Anti-MYC). FLAG-LEM2 wurde durch Kir6.1-MYC co-immunopräzipitiert (Spur 2). Wenngleich auch nach IP in Abwesenheit von Kir6.1-MYC eine schwache Bande an FLAG-LEM2 auftrat (4. Spur), spricht eine Vergleich mit der Proteinmenge im jeweiligen Lysat (Spur 1 u. 3) dafür, dass die prägnante Bande in Spur 2 auf eine Interaktion von Kir6.1-MYC und FLAG-LEM2 zurückzuführen ist.

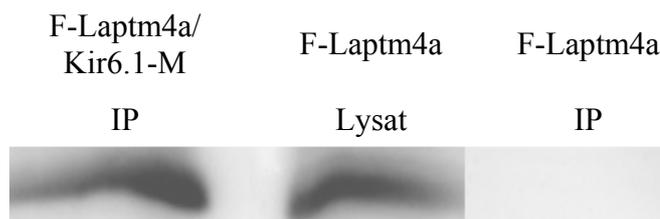


Abb. 9-3: Western Blot (Anti-FLAG) nach Co-IP (Anti-MYC). FLAG-Laptm4a wurde durch Kir6.1-MYC co-immunopräzipitiert (Spur 1). Nach Co-IP in Abwesenheit von Kir6.1-MYC wurde kein FLAG-Laptm4a im Western Blot nachgewiesen (Spur 3).

Schließlich sollte geklärt werden, ob die gefundenen Wechselwirkungen spezifisch für Kir6.1 sind, oder auch mit Kir6.2 auftreten. Dazu wurden obige IP-Experimente analog mit MYC-getaggttem Kir6.2 anstelle von Kir6.1 durchgeführt.

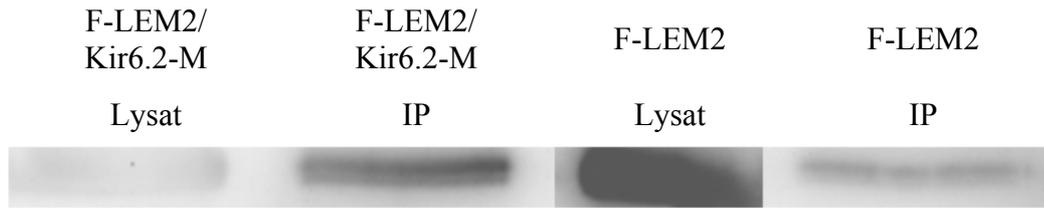


Abb. 9-4: Western Blot (Anti-FLAG) nach Co-IP (Anti-MYC). Analog zu Abb. 9-2 wurde FLAG-LEM2 auch durch Kir6.2-MYC co-immunopräzipitiert (Spur 2), während in Abwesenheit von Kir nur geringe Mengen LEM2 im IP-Ansatz nachgewiesen wurden (Spur 4).

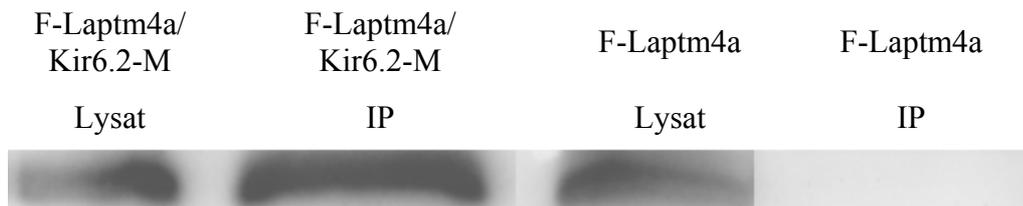


Abb. 9-5: Western Blot (Anti-FLAG) nach Co-IP (Anti-MYC). Analog zu Abb. 9-3 wurde FLAG-Laptm4a auch durch Kir6.2-MYC co-immunopräzipitiert (Spur 2). Nach Co-IP in Abwesenheit von Kir6.2-MYC wurde kein FLAG-Laptm4a im Western Blot nachgewiesen (Spur 4).

Das Ergebnis in Abb. 9-4 und Abb. 9-5 zeigt, dass LEM2 und Laptm4a auch mit Kir6.2 interagieren.

9.3 Diskussion

9.3.1 Limitationen des MY2H-Screens

Wie in Kap. 1.2.3 erläutert, wurden in den letzten Jahren bereits für mehrere Proteine Interaktionen mit dem K_{ATP} -Kanal nachgewiesen. Überraschenderweise befand sich keiner dieser Vertreter unter den im hier beschriebenen MY2H-System identifizierten Proteinen. Auch Kir (Kir6.1, Kir6.2) und SUR (SUR1, SUR2) als zentrale Bestandteile des K_{ATP} -Kanals waren nicht unter den „aktivierenden“ Klonen (vgl. Kap. 9.2.3).

Bei der Suche nach potentiellen Gründen hierfür müssen mehrere Umstände in Betracht gezogen werden. Der in diesem Zusammenhang wahrscheinlich kritischste Aspekt dürfte sein, dass der Köder Kir6.1 in Abwesenheit der SUR-Untereinheit exprimiert wurde. Während die Expression von STE-Kir6.1-Cub-LexA-VP16 zwar nicht auf direktem Weg im Western Blot, jedoch im funktionellen Test (Aktivierung der Reportergene bei Co-Expression mit Nub-Alg5) nachgewiesen werden konnte, scheiterten im Fall von STE-SUR2B-Cub-LexA-VP16

beide Nachweisverfahren, so dass ein Einsatz von SUR als Köder nicht in Frage kam (vgl. Kap. 9.2.1). Die Idee, STE-SUR2B (d.h. ohne Fusion mit Cub-LexA-VP16) zusammen mit dem Köder STE-Kir6.1-Cub-LexA-VP16 zu exprimieren, konnte ebenfalls nicht realisiert werden, da eine Membranpräparation entsprechend transformierter Hefen keine spezifische Bindung von [³H]P1075 zeigte. Da für die letztgenannte Untersuchung keine Positivkontrolle verfügbar war, konnte keine gesicherte Aussage über eine etwaige (schwache) Expression von STE-SUR2B getroffen werden. Um innerhalb eines klar definierten Systems zu arbeiten, wurde daher entschieden, den MY2H-Screen mit Kir6.1 (als Fusionsprotein STE-Kir6.1-Cub-LexA-VP16) als alleinigem Köder durchzuführen. Da aber die SUR-Untereinheiten im vollständigen K_{ATP}-Kanal die Kir-Untereinheiten im Zentrum zum großen Teil umschließen (vgl. Abb. 1-5), erscheinen Erstere günstiger positioniert, um Kontakte mit weiteren Faktoren herzustellen. So erfolgt beispielsweise die Assoziation von Creatinkinase mit dem cardialen K_{ATP}-Kanal allein über SUR2A und nicht über Kir6.2 (Crawford et al., 2002b). Selbst wenn die Bindung eines Interaktionspartners über die Kir-Untereinheiten vermittelt wird, könnte eine solche Bindung im Einzelfall möglicherweise durch ein Fehlen des SUR verändert oder geschwächt werden.

Sowohl Kir, als auch SUR beinhalten ein Retentionsmotiv, welches in Säugerzellen verhindert, dass Kir bzw. SUR ohne ihren jeweiligen Partner die Cytoplasmamembran erreichen (vgl. Kap. 1.2.1). Sollte dieser Mechanismus auch in *S. cerevisiae* intakt sein, so würde der fehlende SUR bedingen, dass der Köder Kir6.1 im endoplasmatischen Reticulum (ER) zurückgehalten wird. Es ist unklar, inwieweit dieser Umstand Wechselwirkungen mit potentiellen Bindungspartnern erschwert. So könnte beispielsweise die Konzentration einzelner für die Cytoplasmamembran bestimmter Transmembranproteine im ER (d.h. vor ihrer Weiterleitung zur Cytoplasmamembran) zu klein sein, um genügend Komplexe mit Kir6.1 und somit eine detektierbare Aktivierung der Reportergene auslösen zu können. Alternativ könnte für besagte Komplexbildung eine Modifikation von Kir und/oder Interaktionspartner erforderlich sein, die erst in der Cytoplasmamembran erfolgt. Schließlich wäre eine Störung der Komplexbildung durch endoplasmatische Proteine vorstellbar.

Ein weiteres Problem könnten die für das MY2H-System erforderlichen Fusionstags (vgl. Kap. 2.12.1) darstellen. Sowohl das Cub-LexA-VP16-Segment des Köderproteins als auch das NubG-Peptid der Beuteproteine könnten im Einzelfall die Bindung von Kir6.1 an seinen Partner verhindern. Handelt es sich bei dem Partner um ein Transmembranprotein, ist außerdem die cytoplasmatische Lokalisation von NubG Voraussetzung, damit die Interaktion zwischen Köder und Beute eine Aktivierung der Reportergene bewirken kann (vgl. Abb. 2-8).

Abschließend muss angemerkt werden, dass aufgrund anfänglicher experimenteller Probleme nur ca. 6.4 Millionen Transformanten (d.h. getestete Interaktionspartner) erzielt wurden. Bei einer 5.2 Millionen Klone umfassenden cDNA-Bibliothek wäre eine bessere Abdeckung wünschenswert, um die Wahrscheinlichkeit klein zu halten, mögliche Interaktionspartner durch eine zu niedrige Gesamtzahl an Transformanten zu verlieren.

9.3.2 Mit Hilfe des MY2H-Systems identifizierte Interaktionspartner von Kir6.1

Trotz der im letzten Kapitel erwähnten Schwierigkeiten und Limitationen des MY2H-Screens konnten mit diesem System vier Proteine identifiziert werden, zu denen bislang keine Verbindung zum K_{ATP} -Kanal bekannt war. Sie sollen im folgenden näher vorgestellt werden.

9.3.2.1 NCU-G1

Humanes NCU-G1 wird in verschiedensten Geweben, besonders stark jedoch in Prostata, Leber und Nieren exprimiert. Es bindet als Transkriptionsaktivator direkt an ein DNA-Element des Genpromotors von CRBP1 (cellular retinol-binding protein type 1), einem Regulator des Vitamin A Metabolismus. Darüber hinaus fungiert NCU-G1 auch als sekundärer Co-Aktivator von PPAR-alpha (peroxisome proliferator-activated receptor-alpha) bei der Transkription dessen Zielgene. Der Mechanismus, der die Lokalisation von NCU-G1 im Zellkern bewirkt, ist unbekannt. Möglicherweise gelangt das mit 44 kD eher kleine Protein per Diffusion durch die Kernporen in den Nukleus und wird dort durch Bindung an andere nukleäre Proteine festgehalten. Alternativ wird eine Translokation nach Maskierung zweier potentieller Kernexportsignale durch einen entsprechenden Rezeptor diskutiert (Steffensen et al., 2007).

Das N-terminal mit einem FLAG-Tag fusionierte NCU-G1 konnte in entsprechend transfizierten HEK293 nicht detektiert werden, so dass eine Verifizierung der Komplexbildung mit Kir6.1 mittels Co-IP nicht möglich war (vgl. Kap. 9.2.4). Die Gründe hierfür sind nicht bekannt, das Fusionieren mit einem Epitop-Tag ist jedoch grundsätzlich mit einem gewissen Risiko verbunden, die Struktur des getaggten Proteins nachhaltig zu stören. Im Einzelfall kann dies zum kompletten Verlust der (funktionellen) Expression führen.

9.3.2.2 ATP-Synthase Untereinheit a

Die Aufgabe der ATP-Synthase besteht im wesentlichen darin, in den Mitochondrien mit Hilfe des in der Atmungskette erzeugten Protonengradienten ATP zu gewinnen. Der Synthasekomplex setzt sich aus der katalytischen Domäne F_1 und dem Protonenkanal der Membran F_0 zusammen. F_1 umfasst fünf verschiedene Untereinheiten in der Stöchiometrie $(\alpha\beta)_3\gamma\delta\epsilon$, während F_0 im wesentlichen aus drei verschiedenen Untereinheiten (abc_{10}) besteht. Die Generierung von ATP geht mit der Rotation von F_1 um F_0 einher, welche ihrerseits an die Translokation von (drei bis vier) Protonen durch den F_0 -Protonenkanal gekoppelt ist (Stock et al., 2000). Interessanterweise wurde die F_1F_0 -ATP-Synthase inzwischen bei vielen verschiedenen Zelltypen nicht nur in den Mitochondrien, sondern auch in den Caveolen der Cytoplasmamembran nachgewiesen. Ihr werden dort Aufgaben bei der Regulation des intrazellulären pH, der zellulären Antwort auf Antiangiogenesefaktoren (Angiostatin) und der Cholesterinhomöostase zugeschrieben (Übersicht bei Chi und Pizzo, 2006). Dieser Umstand ist interessant, da auch für den pankreatischen und den vaskulären K_{ATP} -Kanal Hinweise auf eine Lokalisation in den Caveolen existieren (vgl. Kap. 1.2.3.5.1).

Die im MY2H-System beobachtete Interaktion von Kir6.1 und der ATP Synthase Untereinheit a konnte nicht per Co-IP überprüft werden, da keine Expression des FLAG-getaggten Proteins in HEK293 nachweisbar war (vgl. Kap. 9.2.4). Schwierigkeiten bei der Analyse von Untereinheit a werden in der Literatur an mehreren Stellen erwähnt. So ruft die a-Untereinheit der ATP-Synthase von *E. coli* bei zu starker Expression eine Inhibition der Proteinsynthese (von Meyenburg et al., 1985) und des Zellwachstums (Eya et al., 1989) hervor. Außerdem wird Untereinheit a nur in Anwesenheit der b- und c-Untereinheiten von F_0 in die Plasmamembran eingefügt (Hermolin und Fillingame, 1995). Da Untereinheit a in *E. coli* ein Substrat der Protease FtsH darstellt (Akiyama et al., 1996), muss ferner davon ausgegangen werden, dass homologe Proteasen auch in HEK293 etwaige nicht-native a-Untereinheiten innerhalb kurzer Zeit degradieren.

9.3.2.3 LEM2 (LEM domain containing protein 2)

LEM2 ist Bestandteil der inneren Kernmembran, interagiert mit Lamin A und C wirkt so an der Organisation der Kernlamina und des Chromatins mit. Es zeichnet sich durch eine N-terminale LEM (lamina-associated polypeptide-emerin-MAN1) Domäne und eine C-terminale MSC (MAN1-Src1p C-terminal) Domäne aus, die gemäß Strukturvorhersage durch zwei Transmembranhelices getrennt werden (Brachner et al., 2005). Die LEM-Domäne ermöglicht

die Interaktion mit dem Protein BAF (barrier-to-autointegration factor), welches seinerseits u.a. mit Lamin A, verschiedenen Transkriptionsfaktoren und doppelsträngiger DNA interagiert (Übersicht bei Segura-Totten und Wilson, 2004), während die MSC-Domäne DNA bindet und vermutlich dazu beiträgt, die Chromosomen mit der Kernhülle zu verbinden (Mans et al., 2004). Für die Lokalisation von LEM2 in der Kernmembran sind sowohl eine Transmembranhelix, als auch ein N-terminales Kernretentionssignal im Bereich zwischen LEM-Domäne und der ersten Transmembranhelix erforderlich. So findet sich LEM2 bei weitreichender Deletion des N-Terminus vornehmlich im ER wieder (Brachner et al., 2005). Da der N-Terminus von LEM2 nicht im MY2H-Klon 212 enthalten war (vgl. Kap. 9.2.3), erfolgte die Interaktion mit Kir6.1 im MY2H-System vermutlich auch im ER. Mittels Co-IP konnte jedoch auch für das vollständige LEM2-Protein eine Bindung an Kir6.1 (sowie Kir6.2) gezeigt werden (vgl. Kap. 9.2.4).

9.3.2.4 Laptm4a (Lysosomal-associated protein transmembrane 4A)

Das hochkonservierte, 27 kD schwere und vermutlich vier Transmembranhelices umfassende Laptm4a wurde ursprünglich als „mouse transporter protein“ (MTP) bezeichnet (Hogue et al., 1996). Es findet sich in späten Endosomen und Lysosomen, deren Aufgabe im Abbau von intrazellulären Makromolekülen, sowie durch Endocytose aufgenommenem extrazellulären Material besteht (Cabrita et al., 1999). Die Lokalisation von Laptm4a in diesen intrazellulären Membranen beruht auf zwei tyrosinhaltigen Signalmotiven im C-Terminus (Hogue et al., 2002). Deletion des hydrophilen C-Terminus inkl. besagter Lokalisationssignale erlaubt die Expression von Laptm4a in der Plasmamembran von *Xenopus* Oocyten. Entsprechende Oocyten zeigten die Fähigkeit zur Aufnahme von Thymidin, Uridin und Adenosin (Hogue et al., 1996). Expression von Laptm4a in einem *S. cerevisiae* Stamm änderte dessen Empfindlichkeit gegenüber Analoga von Nukleosiden und Nukleobasen, Antibiotika, Anthracyclinen, Ionophoren und Steroidhormonen. Diese Laptm4a-vermittelte Resistenz bzw. Hypersensitivität wurde teilweise durch Modulatoren unterdrückt, die auch die Funktion des ABC-Transporters PgP aufheben. Die Beteiligung von Laptm4a an der subzellulären Verteilung dieser Verbindungen spricht dafür, dass es eine Rolle bei multipler Resistenz von Zellen gegen Chemotherapeutika spielen könnte. In diesem Zusammenhang wäre Laptm4a ein potentieller Angriffspunkt („target“) für die Entwicklung neuer Medikamente. Hinsichtlich des Wirkmechanismus von Laptm4a wird ein direkter Transport der entsprechenden Substanzen bzw. die Regulation anderer Transporter durch direkte Protein-

Protein-Wechselwirkungen oder Änderungen der Membranlipide, Ionengradienten oder der Inhalte des lysosomalen bzw. endosomalen Lumens diskutiert (Hogue et al., 1999).

Bemerkenswert an *Laptm4a* ist, dass sein Gen eines der wenigen in Säugern bekannten Beispiele für „intergenic splicing“ (die Kombination von Exons verschiedener Gene) darstellt. So wurde in der Placenta ein Hybridtranskript nachgewiesen, in dem das erste Exon von *Matrilin-3* (*MATN3*) durch die ersten beiden Exons (entsprechen den ersten 77 Aminosäuren) von *Laptm4a* ersetzt ist (Maeda et al., 2005). Die *Matrilin* bilden eine Familie von nicht-kollagenen extrazellulären Matrixproteinen (ECM). *Matrilin-3* findet sich u.a. im Knorpelgewebe (Deák et al., 1999). Falls *Laptm4a* über seinen N-Terminus mit Kir6.1 (bzw. Kir6.2) interagiert, wäre folglich auch eine Wechselwirkung zwischen Letzteren und dem *Laptm4a*-*MATN3*-Protein vorstellbar.

Analog zu LEM2 konnte auch für *Laptm4a* die Interaktion mit Kir6.1 mittels Co-IP bestätigt werden. Erneut war die Co-IP auch mit Kir6.2 möglich.

9.3.3 Intrazelluläre Lokalisierung von K_{ATP} -Kanälen

Mit Ausnahme der ATP-Synthase, die zwar vor allem in den Mitochondrien, darüber hinaus jedoch auch in der Cytoplasmamembran angetroffen wird (vgl. Kap. 9.3.2.2) sind sämtliche im MY2H-Screen entdeckten Interaktionspartner von Kir6.1 intrazellulär lokalisiert. Eine Interaktion von insbesondere NCU-G1 und LEM2 (Zellkern), sowie *Laptm4a* (Lysosomen) mit den K_{ATP} -Kanälen der Cytoplasmamembran erscheint daher kaum möglich. Tatsächlich aber wurden Sulfonylharnstoffrezeptoren und K_{ATP} -Kanäle nicht nur in der Cytoplasmamembran, sondern auch in u.a. sekretorischen Vesikeln, Mitochondrien, dem ER und dem Nukleus beschrieben (Übersicht bei Quesada und Soria, 2004). Untersuchungen an pankreatischen β -Zellen wiesen auf eine Modulation der entsprechenden Organellen sowie eine Beteiligung der intrazellulären K_{ATP} -Kanäle an Prozessen wie Signaltransduktion, Ionentransport, Genexpression und Exocytose hin.

Mitochondriale K_{ATP} -Kanäle (*mitoK_{ATP}*) spielen eine wichtige Rolle für den K^+ -Kreislauf (Garlid, 1996). Diese erstmalig 1991 beschriebenen Kanäle werden durch Glibenclamid inhibiert (Inoue et al., 1991), ihre genaue Zusammensetzung ist jedoch bis zum heutigen Tag nicht geklärt. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass sie analog zu den K_{ATP} -Kanälen der Cytoplasmamembran aus einer Kir-ähnlichen porenbildenden Untereinheit (*mitoKir*) und einem Sulfonylharnstoffrezeptor (*mitoSUR*) bestehen (Bajgar et al., 2001). Bindungsstudien an mitochondrialen Membranen wiesen auf die Gegenwart eines Sulfonylharnstoffrezeptors

hin, dessen Größe jedoch geringer als die des SUR in der Cytoplasmamembran zu sein schien (Szewczyk et al., 1997). Während mehrere Publikationen vom Nachweis von Kir6.2 und Kir6.1 in mitochondrialen Membranen berichten (Bajgar et al., 2001; Suzuki et al., 1997; Zhou et al., 1999; Zhou et al., 2005), wurde in anderen Fällen keine Lokalisation dieser Proteine in Mitochondrien festgestellt (Hu et al., 1999), so dass auch die Identität der porenformenden Untereinheit noch nicht gesichert ist. Den mitoK_{ATP}-Kanälen wird eine wichtige Rolle bei u.a. der Regulation der K⁺-Konzentration, des Transmembranpotentials und des Protonengradienten dieser Organellen zugeschrieben. Auf eine mögliche Beteiligung an der ischämischen Präkonditionierung (IPC) wurde bereits in Kap. 1.2.2.4 hingewiesen.

Eine ganze Reihe von Kanälen ist an der Kontrolle des Ionentransports durch die Kernmembranen beteiligt. Zu ihren Aufgaben gehört vermutlich der Ladungsausgleich bei Proteintransportvorgängen und die Modulation der Ca²⁺-Konzentration, die ihrerseits nukleäre Prozesse bis hin zur Genexpression beeinflusst (Übersicht bei Berridge et al., 2003). Die elektrischen und pharmakologischen Eigenschaften der nukleären K_{ATP}-Kanäle (nK_{ATP}) von pankreatischen β -Zellen ähneln denen der K_{ATP}-Kanäle der Cytoplasmamembran (Quesada et al., 2002). Dies impliziert, dass metabolische Signale, wie eine Änderung des ATP/ADP-Verhältnisses, nicht nur auf die cytoplasmatischen, sondern auch auf die nukleären K_{ATP}-Kanäle der β -Zelle wirken. In Verbindung mit einer hierdurch induzierten Änderung der nukleären Ca²⁺-Konzentration, würde solch ein Signalweg eine Form der Kopplung von metabolischem Zustand der Zelle und Gentranskription im Nukleus darstellen.

Auch im endoplasmatischen Reticulum (ER) und Golgi verschiedener Zellen wurden K_{ATP}-Kanäle und Sulfonylharnstoffrezeptoren nachgewiesen (Makhina und Nichols, 1998; John et al., 1998; Zhou et al., 2005), Funktionalität und Funktion sind jedoch unklar. Evtl. haben sie bei der Aufnahme bzw. Freisetzung von Ca²⁺ aus bzw. in das Cytoplasma Bedeutung (Ishida et al., 1992; Chopra et al., 1992).

Die Erforschung der intrazellulären K_{ATP}-Kanäle ist noch nicht sehr weit gediehen, da diese aufgrund ihrer Lokalisation im Vergleich zu den cytoplasmatischen Kanälen experimentell schwer zugänglich sind. Zukünftige Fortschritte auf diesem Forschungssektor werden Aufschluss geben, welche physiologische Bedeutung den in dieser Dissertation dokumentierten Interaktionen zwischen Kir6.1 und Laptm4a, LEM2, NCU-G1 bzw. ATP-Synthase zukommt. Im Fall von Laptm4a könnte ein experimenteller Ansatz in der Co-

Expression des K_{ATP} -Kanals mit einem C-terminal verkürzten Lptm4a bestehen, da eine solche Deletion die Lokalisation des Proteins in der Cytoplasmamembran zur Folge hat (Hogue et al., 1996).

10 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit verschiedenen Fragestellungen zur Struktur und Funktion von ATP-empfindlichen Kaliumkanälen (K_{ATP}).

K_{ATP} -Kanäle sind Heterooktamere aus vier porenbildenden Untereinheiten (Kir6) und vier permanent assoziierten Sulfonylharnstoffrezeptoren (SUR) aus der Familie der ABC-Proteine. Je nach Gewebe/Organ handelt es sich bei besagten Untereinheiten um Kir6.1 oder Kir6.2 bzw. SUR1, SUR2A oder SUR2B, so dass in Bauchspeicheldrüse, Herz, Skelettmuskel, glatter Muskulatur, Gehirn, etc. verschiedene Kanal-Subtypen mit spezifischen Eigenschaften vorliegen. Ihren Namen verdanken K_{ATP} -Kanäle ihrer Sensitivität gegenüber Nukleotiden. Während ATP bei Bindung an Kir6 eine Hemmung des Kanals hervorruft, induziert vor allem ADP eine SUR-vermittelte, Mg^{2+} -abhängige Aktivierung, so dass es u.a. über das ATP/ADP-Verhältnis zu einer Kopplung des Membranpotentials an den metabolischen Zustand der Zelle kommt. So ruft ein Anstieg des ATP/ADP-Verhältnisses bei erhöhtem Glucosespiegel in den β -Zellen des Pankreas eine Hemmung der K_{ATP} -Kanäle hervor. Die damit verbundene Depolarisation der Zellmembran führt zu Aktivierung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle, das einströmende Ca^{2+} zur Freisetzung von Insulin ins Blut. Darüber hinaus sind K_{ATP} -Kanäle essentiell für die Adaptation der Cardiomyocyten an adrenergen Stress und die Regulation der Coronardurchblutung. In Herz und Gehirn verringert die unter Hypoxie erfolgende Aktivierung der dortigen K_{ATP} -Kanäle die Erregbarkeit der betroffenen Zellen, was deren ATP-Reserven schont und so ihre Stressresistenz verbessert.

Bindung von Sulfonylharnstoffen und Gliniden — Zur Beeinflussung der K_{ATP} -Kanäle wurden verschiedene synthetische Inhibitoren und Aktivatoren („Öffner“) entwickelt. Zu Ersteren zählen Sulfonylharnstoffe und Glinide. Aufgrund ihrer Struktur geht man von einer Zweiteilung ihrer Bindungsstelle am SUR in einen A- und einen B-Abschnitt aus. Die verschiedenen Inhibitoren werden je nachdem, ob sie einer der beiden oder beiden Bindungsstellen zugeordnet werden, entsprechend als A-, B- oder A+B-Liganden klassifiziert. In der vorliegenden Arbeit wurde in einem Gemeinschaftsprojekt mehrerer Mitglieder der Abteilung das Bindungsverhalten ausgewählter A-, B- und A+B-Liganden an SUR1 und SUR2 in An- und Abwesenheit von Kir6 untersucht. Die Affinität von Glibenclamid und Repaglinid für Kir6.1/SUR2B und Kir6.2/SUR2B wurde vom Autor dieser Dissertation

bestimmt. Es zeigte sich, dass das ursprünglich für SUR1 entwickelte Modell einer zweiteiligen Bindungstasche auch auf SUR2 anwendbar ist.

Kir6.2 (in schwächerem Maße auch Kir6.1) erhöhte in diesen Radioligandbindungsstudien die Affinität von SUR für die getesteten Substanzen, wobei die Präsenz des Kir-N-Terminus essentiell für den Effekt der Co-Expression ist. Obwohl der N-Terminus des Kir als Bestandteil der B-Bindungsstelle gilt, wirkte sich die Co-Expression auch auf die A-Liganden aus. Möglicherweise ist der Kir-N-Terminus Bestandteil eines Bereichs, in dem A- und B-Bindungsstelle überlappen, oder geht mit diesen allosterischen Wechselwirkungen ein. Sehr stark fällt der Kir-bedingte Affinitätsgewinn für (-)-AZ-DF 265 und Repaglinid aus, insbesondere im Vergleich SUR1 vs. Kir6.2/SUR1 um einen Faktor 370 ((-)-AZ-DF 265) bzw. 130 (Repaglinid). Dies wird auf den Piperidinosubstituenten zurückgeführt, der diese beiden Substanzen von anderen getesteten B-Liganden unterscheidet.

Aus der Literatur ist bekannt, dass ein Serin an Position 1237 in SUR1 von elementarer Bedeutung für die A-Liganden ist. Deren Hochaffinitätsbindung geht bei Substitution von Serin durch Tyrosin (die korrespondierende Aminosäure an Position 1206 in SUR2) verloren. Umgekehrt erhöhte in den Bindungsstudien unserer Arbeitsgruppe die entsprechende YS-Mutation in SUR2 die Affinität der A- und A+B-Liganden für Kir6.2/SUR2A um durchschnittlich Faktor 13 und für Kir6.1/SUR2B um durchschnittlich Faktor 19. Interessanterweise wirkte sich die YS-Mutation auch (wenngleich nur moderat) auf die Bindung der B-Liganden aus. Anscheinend verändert die YS-Mutation in der A-Bindungsstelle die Bindungstasche als Ganzes (d.h. auch die B-Bindungsstelle) oder zumindest den Teil der A-Bindungsstelle, der mit der B-Bindungsstelle überlappt.

Die erhobenen Daten belegen, dass insbesondere A- und A+B-Liganden eine höhere Affinität für den pankreatischen K_{ATP} -Kanal (Kir6.2/SUR1) aufweisen als für Kir6.2/SUR2A (Herzventrikel) oder Kir6.1/SUR2B (Blutgefäße). In elektrophysiologischen Messungen erwies sich diese Selektivität u.a. aufgrund subtypspezifischer Nukleotideffekte sogar noch ausgeprägter als in den Bindungsstudien, eine wichtige Erkenntnis für den Einsatz dieser Substanzen in der Behandlung von Diabetes Typ II.

Modulierung der Glibenclamid-Bindung durch V_i und BeF_x — Die Bindung eines Inhibitors wie des Sulfonylharnstoffs Glibenclamid (GBC) an den SUR stabilisiert den Geschlossenenzustand des K_{ATP} -Kanals. MgATP hingegen übt (parallel zur Kir-vermittelten Hemmung) über den SUR einen aktivierenden Einfluss auf den K_{ATP} -Kanal aus, begünstigt

also eine andere Konformation als GBC. Es überrascht daher nicht, dass mit zunehmender MgATP-Konzentration eine Reduktion der GBC-Bindung beobachtet wird. Für diesen Effekt scheint die Hydrolyse des SUR-gebundenen MgATP zu MgADP und Orthophosphat (P_i) erforderlich zu sein, da in Abwesenheit von Mg^{2+} oder bei Einsatz nicht-hydrolysierbarer ATP-Analoga die GBC-Bindung nicht beeinflusst wird. Es wird daher vermutet, dass insbesondere der posthydrolytische Zustand nur eine geringe Affinität für GBC aufweist.

Dies sollte in Radioligandbindungsexperimenten mit Hilfe der ATPase-Hemmer Orthovanadat (V_i) und Berylliumfluorid (BeF_x) überprüft werden. Die Messungen wurden an Membranpräparationen von Kir6.2/SUR1(Q1178R) exprimierenden HEK293-Zellen durchgeführt. Die Mutante wurde ausgewählt, da hier ein besonders starker Effekt von MgATP auf die GBC-Bindung auftritt.

MgATP inhibierte die Bindung von [3H]GBC (1 nM) an Kir6.2/SUR1(Q1178R) in Abwesenheit von V_i mit einer IC_{50} von 30 μM , bei Zusatz von V_i (1 mM) mit einer IC_{50} von 8 μM . Die Stabilisierung einer posthydrolytischen Konformation durch V_i erhöhte also die Potenz von MgATP. Die Amplitude der Hemmkurve und somit die bei hohen (≥ 0.3 mM) MgATP-Konzentrationen verbleibende [3H]GBC-Bindung wurde allerdings durch V_i nicht verändert.

Anders als V_i stabilisiert BeF_x die ATPase in ihrer prähydrolytischen Form. Während die IC_{50} , mit der MgATP die Bindung von [3H]GBC (1 nM) hemmte, durch BeF_x nur geringfügig verändert wurde, verringerte sich die Amplitude der Hemmkurve, d.h. der maximale MgATP-Effekt auf die [3H]GBC-Bindung war in Gegenwart von BeF_x (1 mM) geringer. Sättigungsexperimente mit [3H]GBC ergaben, dass BeF_x bei einer MgATP-Konzentration von 0.3 mM sowohl die apparente K_D für GBC herabsetzt als auch die Gesamtzahl der GBC-Bindungsstellen erhöht.

Die Ergebnisse sprechen somit für die Hypothese, dass der SUR im Lauf eines ATPase-Zyklus Zustände mit unterschiedlicher Affinität für Glibenclamid durchläuft. Ändert sich deren Zahlenverhältnis, z.B. bei Begünstigung bestimmter Zustände durch V_i oder BeF_x , hat dies entsprechende Konsequenzen für die Bindung des Sulfonylharnstoffs. Das System ist jedoch sehr komplex, viele Details noch unverstanden. So lassen sich ohne eine genaue Kenntnis des Ablaufs der ATP-Hydrolyse durch den SUR Art (Änderung der IC_{50} vs. Änderung der Amplitude) und Ausmaß der beobachteten Änderungen schwerlich interpretieren.

Charakterisierung von SUR2B(Y1206S) Δ TMD0 — Nach heutigem Wissensstand weisen SUR1 und SUR2 17 Transmembranhelices auf, die in Form von drei Transmembrandomänen (TMD0, TMD1 und TMD2) organisiert sind. Während TMD1 und TMD2 zusammen mit den beiden cytosolischen Nukleotidbindungsfalten die für ABC-Proteine typischen Strukturelemente ausmachen, findet sich TMD0 nur bei einer kleinen Gruppe innerhalb dieser Proteinfamilie.

Ziel in der vorliegenden Arbeit war es, zu untersuchen, wie sich eine Deletion von TMD0 auf die Eigenschaften von SUR2B(Y1206S) auswirkt. Insbesondere sollte in Radioligandbindungsstudien die Bindung verschiedener Liganden (Glibenclamid, Repaglinid, sowie der Öffner P1075) an SUR2B(YS) Δ TMD0 und SUR2B(YS) verglichen werden. Die YS-Mutation erhöht die Affinität von SUR2 für Glibenclamid, Voraussetzung für Experimente mit [³H]GBC (s.o.).

Es zeigte sich, dass die Bindungseigenschaften von SUR2B(YS) nur in relativ geringem Maß von TMD0 abhängen. So wurde die biphasische Hemmung der [³H]GBC-Bindung durch P1075 an SUR2B(YS) auch an SUR2B(YS) Δ TMD0 beobachtet. Da die Biphasizität im Fall von SUR2B(YS) mit der Existenz von SUR-Tetrameren erklärt wird, stellt dieser Befund einen Hinweis darauf dar, dass derartige Tetramere auch von SUR2B(YS) Δ TMD0 ausgebildet werden. Auch Wechselwirkungen zwischen SUR2B(YS) Δ TMD0 und Kir6.2 sind anscheinend möglich, da Kir6.2 eine moderate, aber signifikante Verbesserung der Affinität von SUR2B(YS) Δ TMD0 für Repaglinid bewirkte. In beiden Fällen konnten die Interaktionen mittels Co-Immunopräzipitation bestätigt werden: FLAG-getaggt SUR2B(YS) Δ TMD0 wurde sowohl durch MYC-getaggt SUR2B(YS) Δ TMD0 als auch durch MYC-getaggt Kir6.2 komplexiert. Allerdings ergaben Patch-Clamp-Messungen keinen Hinweis auf funktionelle K_{ATP}-Kanäle aus Kir6.2 und SUR2B(YS) Δ TMD0, anscheinend ist TMD0 für den Transport des Proteinkomplexes zur Cytoplasmamembran erforderlich.

Funktion von Kir-N-Terminus und Gleithelix — Kir6.2(V59G) zählt zu den Mutationen, die das sog. DEND-Syndrom hervorrufen, bei dem ein permanenter neonataler Diabetes mellitus (PNDM) von Entwicklungsstörungen, Muskelschwäche und Epilepsie begleitet wird. Ursache ist die hohe Offenwahrscheinlichkeit (P_o) des mutanten K_{ATP}-Kanals bei stark reduzierter ATP-Empfindlichkeit. Valin 59 ist Bestandteil der sog. Gleithelix, die im Bereich der Grenzfläche zwischen Membran und Cytoplasma lokalisiert ist und für die eine

Beteiligung am „gating“, d.h. am Öffnen und Schließen der inneren Kanalpforte angenommen wird.

Um neue Erkenntnisse über die Funktion des Kir6.2-N-Terminus im allgemeinen und der Gleithelix im besonderen zu erlangen, wurde in dieser Dissertation eine gründliche Charakterisierung des Kir6.2(V59G)/SUR1-Kanals vorgenommen. Ergänzt wurden die Untersuchungen durch Experimente an der i-DEND-Mutanten Kir6.2(V59A), einem N-terminal um zehn Aminosäuren verkürzten Kir6.2 („Kir6.2 Δ N10“), sowie dem analog zu Kir6.2(V59G) mutierten Kir6.1(I60G) (jeweils co-exprimiert mit SUR1).

Ba²⁺ verursachte an Kir6.2(V59G)/SUR1 und Kir6.2/SUR1 einen identischen Porenblock. 30 mM ATP bewirkten in inside-out-Patch-Clamp-Messungen unter Mg²⁺-freien Bedingungen an Kir6.2(V59G)/SUR1 hingegen lediglich eine Abnahme des K_{ATP}-Stroms um etwas mehr als die Hälfte. Dies stellt eine im Vergleich zum wildtypischen Kanal (IC₅₀ \approx 10 μ M) drastisch verminderte ATP-Empfindlichkeit dar. Vermutlich ist dies nicht nur eine indirekte Folge der hohen Offenwahrscheinlichkeit, sondern auch auf eine schwächere Bindung (d.h. höhere K_D) von ATP zurückzuführen. Die Hemmung durch MgATP fiel sogar noch schwächer aus, Indiz dafür, dass die SUR-vermittelte aktivierende Wirkung von MgATP im mutanten Kanal erhalten bleibt. Glibenclamid und Repaglinid (je 1 μ M) erwiesen sich an Kir6.2(V59G)/SUR1 in Abwesenheit von ATP als völlig wirkungslos, verbesserten jedoch bei gleichzeitiger Applikation mit ATP dessen Hemmstärke. Kir6.2 Δ N10/SUR1 wurde durch Glibenclamid nur geringfügig gehemmt. Die ATP-Empfindlichkeit ist laut Literatur hingegen nur etwa dreimal niedriger als bei Kir6.2/SUR1. Anders als beim V59G-Kanal ist dieser Unterschied mit der höheren P_o erklärbar, d.h. hier muss keine bzw. nur eine moderat veränderte K_D vorausgesetzt werden.

Das hohe Maß an Aktivität von Kir6.2(V59G)/SUR1 konnte durch Phospholipide wie PIP₂ (10 μ M) nicht noch weiter gesteigert werden. Auch Polykationen wie Neomycin (1 mM), die die aktivierende Wirkung endogener Phospholipide aufheben und wildtypische K_{ATP}-Kanäle daher inhibieren, zeigten kaum Wirkung. An Kir6.2 Δ N10/SUR1 waren PIP₂ und Neomycin hingegen sehr wirkungsvoll, wenn auch nicht ganz so stark wie am wildtypischen Kanal.

Kir6.2(V59A)/SUR1 verhielt sich in den Messungen tendenziell ähnlich wie Kir6.2(V59G)/SUR1, die Effekte der Mutation waren jedoch jeweils nicht so drastisch ausgeprägt. Offenbar sind die Konsequenzen einer Substitution von Valin 59 der Gleithelix durch Alanin nicht ganz so schwerwiegend für die Struktur des Kanals wie im Fall des als „Helixbrecher“ bekannten Glycin. Kir6.1(I60G)/SUR1 zeigte infolge der Mutation ebenfalls erhöhte Aktivität, sowie eine etwas verminderte Empfindlichkeit gegenüber Sulfonyl-

harnstoffen. Allerdings hob die Mutation nicht die für Kir6.1 typische Nukleotidabhängigkeit auf, d.h. ohne Nukleotide konnte weder mit Kir6.1/SUR1 noch mit Kir6.1(I60G)/SUR1 ein K_{ATP} -Strom nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse sind vereinbar mit der Vorstellung, dass verschiedene regulatorische Signale am Kir-N-Terminus ansetzen und über die Gleithelix an die Pore des K_{ATP} -Kanals weitergeleitet werden. Zu diesen Signalen/Liganden zählen Nukleotide (vor allem ATP) und Phospholipide, aber auch Interaktionen mit dem SUR. Letztgenannte Wechselwirkungen sind inhibitorischer Natur, da Deletionen am initialen N-Terminus von Kir6 die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals erhöhen. Bei Kir6.2(V59G) ist der N-Terminus zwar noch vorhanden, doch die Transduktion der Signale in eine Schließung des Kanals ist durch die Mutation in der Gleithelix gestört. Die V59G-Mutation bewirkt jedoch nicht nur eine indirekte Aktivierung durch Aufhebung inhibitorischer Einflüsse des Kir-N-Terminus, sondern stabilisiert auch in Abwesenheit von SUR1 den Offenzustand des Kanals und erhöht vermutlich die K_D der ATP-Bindung.

Die mit der Bindung/Hydrolyse von MgATP an SUR1 verbundene K_{ATP} -Kanalaktivierung wird durch die V59G-Mutation nicht verhindert. Dafür spricht der Befund, dass die ATP-Hemmung von Kir6.2(V59G)/SUR1 in Gegenwart von Mg^{2+} noch wesentlich schwächer ausfällt als in Abwesenheit. Vom SUR ausgehende inhibitorische und aktivierende Signale werden offensichtlich auf unterschiedlichen Wegen auf den Kir übertragen.

Mechanismus der K_{ATP} -Kanal-Hemmung durch Tetrapentylammonium — Im Rahmen der Patch-Clamp-Experimente mit Kir6.2(V59G)/SUR1 (s.o.) wurde beobachtet, dass die Sensitivität dieses Kanals für Tetrapentylammonium (TPA) im Vergleich zum wildtypischen Kir6.2/SUR1 stark reduziert ist. Dies war überraschend, da bislang als Ursache für die inhibitorische Wirkung dieser Verbindung ein direktes Blockieren der Kanalpore vermutet wurde und der Porenblock mit Ba^{2+} durch die V59G-Mutation nicht beeinträchtigt wurde.

Die neuen Daten sprechen daher dafür, dass TPA nicht nur als Porenblocker wirkt, sondern noch auf mindestens einem weiteren Weg eine hemmende Wirkung entfaltet. Dieser zweite Mechanismus, der anscheinend durch die V59G-Mutation des Kir6.2 weitestgehend aufgehoben wird, erfordert nicht die Anwesenheit des SUR. Dies belegten weiterführende Patch-Clamp-Experimente an Kir6.2 Δ C26. Dieser C-terminal verkürzte Kir benötigt für den Transport in die Cytoplasmamembran keinen SUR und bildet auch ohne Letzteren einen funktionellen K_{ATP} -Kanal aus. Kir6.2 Δ C26 wurde durch TPA mit einer IC_{50} von $\sim 0.8 \mu M$

gehemmt. Als potentieller Wirkmechanismus von TPA wäre hingegen ein Interferieren von TPA mit dem aktivierenden Effekt von Phospholipiden wie PIP_2 denkbar. Kationische Verbindungen wie Neomycin bilden – so die gängige Vorstellung – Komplexe mit zellulären Phospholipiden und unterbinden so deren Interaktionen mit der Kir-Untereinheit des K_{ATP} -Kanals. Möglicherweise ist auch TPA mit seiner positiven Ladung in Kombination mit seinen lipophilen Pentylketten in der Lage, derartige Wechselwirkungen einzugehen. Die hohe Offenwahrscheinlichkeit von Kir6.2(V59G)/SUR1 wurde durch PIP_2 nicht und durch Polykationen wie Neomycin nur wenig beeinflusst (s.o.). Entsprechend unempfindlich wäre der mutante Kanal gegen eine Hemmung durch TPA nach dem diskutierten Mechanismus.

Vergleich: IC_{50} in whole-cell- und inside-out-Konfiguration — In Patch-Clamp-Messungen wurde für eine Inhibition von Kir6.2/SUR1 durch Glibenclamid (GBC) und Repaglinid (REP) in der inside-out-Konfiguration eine IC_{50} von 0.48 nM (GBC) und 0.79 nM (REP) ermittelt. In der whole-cell-Konfiguration verlief die im Zeitrahmen der Experimente irreversible Hemmung bei niedrigen Inhibitorkonzentrationen so langsam, dass eine Bestimmung der IC_{50} aus messtechnischen Gründen nicht möglich war. Aus der starken Hemmwirkung bei 1 nM GBC bzw. 10 nM REP konnte jedoch auf IC_{50} -Werte von ≤ 0.05 nM (GBC) und ≤ 0.5 nM (REP) geschlossen werden, d.h. die Potenz der beiden Substanzen war hier größer als in den inside-out-Messungen. Um einen genaueren Wert für die IC_{50} von GBC und REP in der whole-cell-Konfiguration zu erhalten, wurde der Plan gefasst, die analogen Messungen mit einem Liganden (Meglitinid) zu wiederholen, der eine reversible Hemmung von Kir6.2/SUR1 bewirkt, so dass eine Bestimmung der IC_{50} sowohl in der inside-out- als auch in der whole-cell-Konfiguration möglich ist. Das Verhältnis der IC_{50} -Werte von Meglitinid in den beiden Messkonfigurationen sollte dazu dienen, aus den für GBC und REP in den inside-out-Messungen erhaltenen IC_{50} -Werten (s.o.) die auf direktem Weg nicht genau bestimmbare Potenz dieser Verbindungen in der whole-cell-Konfiguration abzuschätzen.

Es stellte sich jedoch heraus, dass ein solches Verfahren nicht zulässig ist, da Meglitinid (MEG) überraschenderweise anders als GBC und REP in der inside-out-Konfiguration eine kleinere IC_{50} (0.27 μM) aufwies als in der whole-cell-Konfiguration (1.5 μM). Für in den beiden Messkonfigurationen unterschiedliche IC_{50} -Werte einer Substanz kann man verschiedene Gründe anführen, etwa unterschiedliche Nukleotidkonzentrationen und Mess-temperaturen, weitestgehend intaktes Cytoskelett bei whole-cell-Messungen, etc.. Schwieriger ist es, zu erklären, warum GBC und REP einerseits und MEG andererseits unterschiedlich auf

den Konfigurationswechsel reagieren. Hierfür wäre es wohl unabdingbar, weitere Messungen anzuschließen, unter Einbeziehung weiterer Substanzen und unter gezielter Variation der Messbedingungen.

Identifizierung neuer Interaktionspartner von Kir6.1 — Man kennt inzwischen eine ganze Reihe von Proteinen, die transient oder permanent mit dem K_{ATP} -Kanal assoziieren und zu seiner Regulation beitragen. Mit Hilfe eines für die Erforschung von Membranproteinen modifizierten Hefe-Zweihybrid-Systems (MY2H) wurde im letzten Abschnitt der Arbeit nach weiteren Interaktionspartnern von Kir6.1 gesucht.

Hierzu wurde ein Fusionsprotein aus Kir6.1, der C-terminalen Hälfte von Ubiquitin und einem artifiziellen Transkriptionsfaktor in *S. cerevisiae* exprimiert. Die potentiellen Interaktionspartner wurden mit der (modifizierten) N-terminalen Hälfte von Ubiquitin fusioniert, so dass bei einer Assoziation von „Köder“ und „Beute“ Ubiquitin rekonstituiert wurde, woraufhin eine Abspaltung des Transkriptionsfaktors durch hefeeigene ubiquitinspezifische Proteasen erfolgte. In diesem Fall kam es zu einer Aktivierung der Reportergene, so dass diese Hefeklonen auf entsprechendem Nährmedium selektiert und der Interaktionspartner identifiziert werden konnte.

Mit diesem Verfahren wurden für NCU-G1, LEM2, Laptm4a, sowie die Untereinheit a der F_1F_0 -ATP-Synthase Wechselwirkungen mit Kir6.1 nachgewiesen. Für LEM2 und Laptm4a konnte in HEK293 auch eine Co-Immunopräzipitation mit Kir6.1 (sowie mit Kir6.2) demonstriert werden. Es gelang nicht, die beiden anderen Proteine in getaggeter Form in HEK293 zu exprimieren bzw. nachzuweisen. Die mit dem MY2H-System entdeckten Interaktionspartner von Kir6.1 finden sich im Zellkern (NCU-G1, LEM2), in Lysosomen (Laptm4a) und Mitochondrien (ATP-Synthase (auch Berichte über Lokalisation in Cytoplasmamembran)). Dies lenkt die Aufmerksamkeit auf die in der Literatur mehrfach erwähnten, aber nur wenig erforschten intrazellulären K_{ATP} -Kanäle unbekannter Zusammensetzung. Zukünftige Fortschritte auf diesem Forschungssektor werden die physiologische Bedeutung der in dieser Dissertation festgestellten Interaktionen klären.

11 Veröffentlichungen

Inhalte dieser Dissertation finden sich in den nachfolgend aufgeführten Publikationen (z.T. noch in Vorbereitung) und wurden 2005-2008 im Rahmen der alljährlichen Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT) in Mainz präsentiert.

Stephan D, Winkler M, Kühner P, Russ U und Quast U (2006)

Selectivity of repaglinide and glibenclamide for the pancreatic over the cardiovascular K_{ATP} channels. *Diabetologia* **49**:2039-2048.

Winkler M, Stephan D, Bieger S, Kühner P, Wolff F und Quast U (2007)

Testing the bipartite model of the sulfonylurea receptor binding site: binding of A-, B-, and A+B-site ligands. *J Pharmacol Exp Ther* **322**:701-708.

Winkler M, Lutz R, Russ U, Quast U und Bryan J (2009)

Analysis of two KCNJ11 neonatal diabetes mutations, V59G and V59A, and the analogous KCNJ8 I60G substitution: differences between the channel subtypes formed with SUR1. *J Biol Chem* **284**:6752-6762.

Winkler M, Kühner P, Russ U, Ortiz D, Quast U und Bryan J

Role of the SUR2B amino-terminal transmembrane domain for ligand binding, oligomerisation and coupling to Kir6.2. *in Vorbereitung*

Rüdiger B, Winkler M, Bryan J und Quast U

Effects of a permanent neonatal diabetes mellitus-causing mutation, Q1178R in Sulphonylurea Receptor 1 (SUR1), on ligand binding. *in Vorbereitung*

Amann T, Schell S, Kühner P, Winkler M, Schwanstecher M, Schwanstecher C, Russ U und Quast U

Substitution of the Walker A-Lys by Arg in the nucleotide binding domains of Sulfonylurea Receptor B: Effects on ligand binding and channel activity. *in Vorbereitung*

12 Literaturverzeichnis

- Abraham MR, Selivanov VA, Hodgson D, Pucar D, Zingman LV, Wieringa B, Dzeja PP, Alekseev AE und Terzic A (2002) Coupling of cell energetics with membrane metabolic sensing - Integrative signaling through creatine kinase phosphotransfer disrupted by *M-CK* gene knock-out. *J Biol Chem* **277**:24427-24434.
- Ackermann S, Hiller S, Osswald H, Lösle M, Grenz A und Hambrock A (2009) 17 β -Estradiol modulates apoptosis in pancreatic β -cells by specific involvement of the sulfonylurea receptor (SUR) isoform SUR1. *J Biol Chem* **284**:4905-4913.
- 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.
- Akiyama Y, Kihara A und Ito K (1996) Subunit *a* of proton ATPase F_0 sector is a substrate of the FtsH protease in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **399**:26-28.
- Antcliff JF, Haider S, Proks P, Sansom MSP und Ashcroft F (2005) Functional analysis of a structural model of the ATP-binding site of the K_{ATP} channel Kir6.2 subunit. *EMBO J* **24**:229-239.
- Ardehali H und O'Rourke B (2005) Mitochondrial K_{ATP} channels in cell survival and death. *J Mol Cell Cardiol* **39**:7-16.
- Ashcroft FM (2005) ATP-sensitive potassium channelopathies: focus on insulin secretion. *J Clin Invest* **115**:2047-2058.
- Ashcroft FM und Rorsman P (1989) Electrophysiology of the pancreatic β -cell. *Prog Biophys Mol Biol* **54**:87-143.
- Ashcroft SJ und Ashcroft FM (1992) The sulfonylurea receptor. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1175**:45-59.
- 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.
- Babenko AP, Gonzalez G, Aguilar-Bryan L und Bryan J (1999a) Sulfonylurea receptors set the maximal open probability, ATP sensitivity and plasma membrane density of K_{ATP} channels. *FEBS Lett* **445**:131-136.
- Babenko AP (2005) K_{ATP} channels "vingt ans apres": ATG to PDB to Mechanism. *J Mol Cell Cardiol* **39**:79-98.
- Babenko AP (2008) A novel ABCC8 (SUR1)-dependent mechanism of metabolism-excitation uncoupling. *J Biol Chem* **283**:8778-8782.
- Babenko AP und Bryan J (2001) A conserved inhibitory and differential stimulatory action of nucleotides on $K_{IR6.0}$ /SUR complexes is essential for excitation-metabolism coupling by K_{ATP} channels. *J Biol Chem* **276**:49083-49092.

- Babenko AP und Bryan J (2002) SUR-dependent modulation of K_{ATP} channels by an N-terminal $K_{IR6.2}$ peptide. Defining intersubunit gating interactions. *J Biol Chem* **277**:43997-44004.
- Babenko AP und Bryan J (2003) SUR domains that associate with and gate K_{ATP} pores define a novel gatekeeper. *J Biol Chem* **278**:41577-41580.
- Babenko AP, Gonzalez G, Aguilar-Bryan L und Bryan J (1998) Reconstituted human cardiac K_{ATP} channels - Functional identity with the native channels from the sarcolemma of human ventricular cells. *Circ Res* **83**:1132-1143.
- Babenko AP, Gonzalez G und Bryan J (1999b) The N-terminus of $K_{IR6.2}$ limits spontaneous bursting and modulates the ATP-inhibition of K_{ATP} channels. *Biochem Biophys Res Commun* **255**:231-238.
- Babenko AP, Gonzalez G und Bryan J (1999c) The tolbutamide site of SUR1 and a mechanism for its functional coupling to K_{ATP} channel closure. *FEBS Lett* **459**:367-376.
- Babenko AP, Gonzalez G und Bryan J (2000a) Pharmaco-topology of sulfonylurea receptors - Separate domains of the regulatory subunits of K_{ATP} channel isoforms are required for selective interaction with K^+ channel openers. *J Biol Chem* **275**:717-720.
- Babenko AP, Gonzalez GC und Bryan J (2000b) Hetero-concatemeric $K_{IR6.X4}/SUR1_4$ channels display distinct conductivities but uniform ATP inhibition. *J Biol Chem* **275**:31563-31566.
- Bajgar R, Seetharaman S, Kowaltowski AJ, Garlid KD und Paucek P (2001) Identification and properties of a novel intracellular (mitochondrial) ATP-sensitive potassium channel in brain. *J Biol Chem* **276**:33369-33374.
- Bakos É, Evers R, Calenda G, Tuszáný GE, Szakacs G, Váradi A und Sarkadi B (2000) Characterization of the amino-terminal regions in the human multidrug resistance protein (MRP1). *J Cell Sci* **113**:4451-4461.
- Bancila V, Cens T, Monnier D, Chanson F, Faure C, Dunant Y und Bloc A (2005) Two SUR1-specific histidine residues mandatory for zinc-induced activation of the rat K_{ATP} channel. *J Biol Chem* **280**:8793-8799.
- Bancila V, Nikonenko I, Dunant Y und Bloc A (2004) Zinc inhibits glutamate release via activation of pre-synaptic K_{ATP} channels and reduces ischaemic damage in rat hippocampus. *J Neurochem* **90**:1243-1250.
- Baron A, van Bever L, Monnier D, Roatti A und Baertschi AJ (1999) A novel K_{ATP} current in cultured neonatal rat atrial appendage cardiomyocytes. *Circ Res* **85**:707-715.
- Baukrowitz T und Fakler B (2000a) K -ATP channels gated by intracellular nucleotides and phospholipids. *Eur J Biochem* **267**:5842-5848.
- Baukrowitz T und Fakler B (2000b) K_{ATP} channels: Linker between phospholipid metabolism and excitability. *Biochem Pharmacol* **60**:735-740.

- Béguin P, Nagashima K, Nishimura M, Gonoï T und Seino S (1999) PKA-mediated phosphorylation of the human K_{ATP} channel: separate roles of Kir6.2 and SUR1 subunit phosphorylation. *EMBO J* **18**:4722-4732.
- Berridge MJ, Bootman MD und Roderick HL (2003) Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**:517-529.
- Bevington PR (1969) *Data reduction and error analysis for the physical sciences*, pp 55-65 and 92-118, McGraw-Hill, New York.
- Bichet D, Haass FA und Jan LY (2003) Merging functional studies with structures of inward-rectifier K^+ channels. *Nat Rev Neurosci* **4**:957-967.
- Bienengraeber M, Alekseev AE, Abraham MR, Carrasco AJ, Moreau C, Vivaudou M, Dzeja PP und Terzic A (2000) ATPase activity of the sulfonylurea receptor: a catalytic function for the K_{ATP} channel complex. *FASEB J* **14**:1943-1952.
- Bloc A, Cens T, Cruz H und Dunant Y (2000) Zinc-induced changes in ionic currents of clonal rat pancreatic β -cells: activation of ATP-sensitive K^+ channels. *J Physiol* **529**:723-734.
- Bonev AD und Nelson MT (1996) Vasoconstrictors inhibit ATP-sensitive K^+ channels in arterial smooth muscle through protein kinase C. *J Gen Physiol* **108**:315-323.
- Börjesson SI und Elinder F (2008) Structure, Function, and Modification of the Voltage Sensor in Voltage-Gated Ion Channels. *Cell Biochemistry and Biophysics* **52**:149-174.
- Brachner A, Reipert S, Foisner R und Gotzmann J (2005) LEM2 is a novel MAN1-related inner nuclear membrane protein associated with A-type lamins. *J Cell Sci* **118**:5797-5810.
- Brown GR und Foubister AJ (1984) Receptor binding sites of hypoglycemic sulfonylureas and related [(acylamino)alkyl]benzoic acids. *J Med Chem* **27**:79-81.
- Bryan J, Crane A, Vila-Carriles WH, Babenko AP und Aguilar-Bryan L (2005) Insulin secretagogues, sulfonylurea receptors and K_{ATP} channels. *Curr Pharm Design* **11**:2699-2716.
- Cabrita MA, Hobman TC, Hogue DL, King KM und Cass CE (1999) Mouse transporter protein, a membrane protein that regulates cellular multidrug resistance, is localized to lysosomes. *Cancer Res* **59**:4890-4897.
- Carrasco AJ, Dzeja PP, Alekseev AE, Pucar D, Zingman LV, Abraham MR, Hodgson D, Bienengraeber M, Puceat M, Janssen E, Wieringa B und Terzic A (2001) Adenylate kinase phosphotransfer communicates cellular energetic signals to ATP-sensitive potassium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:7623-7628.
- Chachin M, Yamada M, Fujita A, Matsuoka T, Matsushita K und Kurachi Y (2003) Nateglinide, a D-phenylalanine derivative lacking either a sulfonylurea or benzamido moiety, specifically inhibits pancreatic β -cell-type K_{ATP} channels. *J Pharmacol Exp Ther* **304**:1025-1032.

- Chan KW, Wheeler A und Csanady L (2008) Sulfonylurea receptors type 1 and 2A randomly assemble to form heteromeric K_{ATP} channels of mixed subunit composition. *J Gen Physiol* **131**:43-58.
- Chan KW, Zhang H und Logothetis DE (2003) N-terminal transmembrane domain of the SUR controls trafficking and gating of Kir6 channel subunits. *EMBO J* **22**:3833-3843.
- Cheng WWL, Tong A, Flagg TP und Nichols CG (2008) Random assembly of SUR subunits in K_{ATP} channel complexes. *Channels* **2**:34-38.
- Cheng Y und Prusoff WH (1973) Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 % inhibition (IC_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* **22**:3099-3108.
- Chi SL und Pizzo SV (2006) Cell surface F_1F_0 ATP synthase: A new paradigm? *Annals of Medicine* **38**:429-438.
- Chopra LC, Twort CH und Ward JPT (1992) Direct action of BRL 38227 and glibenclamide on intracellular calcium stores in cultured airway smooth muscle of rabbit. *Br J Pharmacol* **105**:259-260.
- Christesen HBT, Sjöblad S, Brusgaard K, Papadopoulou D und Jacobsen BB (2005) Permanent neonatal diabetes in a child with an ABCC8 gene mutation. *Horm Res* **64**; **Suppl. 3**:135.
- Christopoulos A (1998) Assessing the distribution of parameters in models of ligand-receptor interaction: to log or not to log. *Trends Pharmacol Sci* **19**:351-357.
- Chutkow WA, Makielski JC, Nelson DJ, Burant CF und Fan Z (1999) Alternative splicing of *sur2* exon 17 regulates nucleotide sensitivity of the ATP-sensitive potassium channel. *J Biol Chem* **274**:13656-13665.
- Clayton PT, Eaton S, Aynsley-Green A, Edginton M, Hussain K, Krywawych S, Datta V, Malingré HEM, Berger R und van den Berg IET (2001) Hyperinsulinism in short-chain L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency reveals the importance of β -oxidation in insulin secretion. *J Clin Invest* **108**:457-465.
- 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.
- Cole WC, Malcolm T, Walsh MP und Light PE (2000) Inhibition by protein kinase C of the K_{NDP} subtype of vascular smooth muscle ATP-sensitive potassium channel. *Circ Res* **87**:112-117.
- Crawford RM, Budas GR, Jovanovic S, Ranki HJ, Wilson TJ, Davies AM und Jovanovic A (2002a) M-LDH serves as a sarcolemmal K_{ATP} channel subunit essential for cell protection against ischemia. *EMBO J* **21**:3936-3948.
- Crawford RM, Ranki HJ, Botting CH, Budas GR und Jovanovic A (2002b) Creatine kinase is physically associated with the cardiac ATP-sensitive K^+ channel in vivo. *FASEB J* **16**:102-104.

- Csermely P, Martonosi A, Levy GC und Ejchart AJ (1985) ^{51}V -n.m.r. analysis of the binding of vanadium(V) oligoanions to sarcoplasmic reticulum. *Biochem J* **230**:807-815.
- Cui N, Kang Y, He Y, Leung Y-M, Xie H, Pasyk EA, Gao X, Sheu L, Hansen JB, Wahl P, Tsushima RG und Gaisano HY (2004) H3 domain of syntaxin 1A inhibits K_{ATP} channels by its actions on the sulfonylurea receptor 1 nucleotide-binding folds-1 and -2. *J Biol Chem* **279**:53259-53265.
- 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.
- D'hahan N, Moreau C, Prost A-L, Jacquet H, Alekseev AE, Terzic A und Vivaudou M (1999) Pharmacological plasticity of cardiac ATP-sensitive potassium channels toward diazoxide revealed by ADP. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:12162-12167.
- Dabrowski M, Wahl P, Holmes WE und Ashcroft FM (2001) Effect of repaglinide on cloned beta cell, cardiac and smooth muscle types of ATP-sensitive potassium channels. *Diabetologia* **44**:747-756.
- Dabrowski M, Ashcroft FM, Ashfield R, Lebrun P, Pirotte B, Egebjerg J, Hansen JB und Wahl P (2002) The novel diazoxide analog 3-isopropylamino-7-methoxy-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide is a selective Kir6.2/SUR1 channel opener. *Diabetes* **51**:1896-1906.
- Davis-Taber R, Choi W, Feng J, Hoogenboom L, McNally T, Kroeger P, Shieh CC, Simmer R, Brioni JD, Sullivan JP, Gopalakrishnan M und Scott VES (2000) Molecular characterization of human SUR2-containing K_{ATP} channels. *Gene* **256**:261-270.
- De Vos A, Heimberg H, Quartier E, Huypens P, Bouwens L, Pipeleers D und Schuit F (1995) Human and rat beta cells differ in glucose transporter but not in glucokinase gene expression. *J Clin Invest* **96**:2489-2495.
- de Wet H, Mikhailov MV, Fotinou C, Dreger M, Craig TJ, Vénien-Bryan C und Ashcroft FM (2007) Studies of the ATPase activity of the ABC protein SUR1. *FEBS J* **274**:3532-3544.
- Deák F, Wagener R, Kiss I und Paulsson M (1999) The matrilins: a novel family of oligomeric extracellular matrix proteins. *Matrix Biology* **18**:55-64.
- Dhar-Chowdhury P, Harrell MD, Han SY, Jankowska D, Parachuru L, Morrissey A, Srivastava S, Liu W, Malester B, Yoshida H und Coetzee WA (2005) The glycolytic enzymes, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, triose-phosphate isomerase, and pyruvate kinase are components of the K_{ATP} channel macromolecular complex and regulate its function. *J Biol Chem* **280**:38464-38470.
- Dong K, Tang L-Q, MacGregor GG, Leng Q und Hebert SC (2005) Novel nucleotide-binding sites in ATP-sensitive potassium channels formed at gating interfaces. *EMBO J* **24**:1318-1329.
- 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.

- 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.
- 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.
- Eya S, Maeda M, Tomochika K-I, Kanemasa Y und Futai M (1989) Overproduction of truncated subunit *a* of H⁺-ATPase causes growth inhibition of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **171**:6853-6858.
- Flagg TP, Kurata HT, Masia R, Caputa G, Magnuson MA, Lefter DJ, Coetzee WA und Nichols CG (2008) Differential structure of atrial and ventricular K_{ATP} - Atrial K_{ATP} channels require SUR1. *Circ Res* **103**:1458-U228.
- Flanagan SE, Clauin S, Bellanné-Chantelot C, de Lonlay P, Harries LW, Gloyn AL und Ellard S (2009) Update of mutations in the genes encoding the pancreatic beta-cell K_{ATP} channel subunits Kir6.2 (KCNJ11) and sulfonylurea receptor 1 (ABCC8) in diabetes mellitus and hyperinsulinism. *Hum Mutat* **30**:170-180.
- Florez JC, Burt N, de Bakker PIW, Almgren P, Tuomi T, Holmkvist J, Gaudet D, Hudson TJ, Schaffner SF, Daly MJ, Hirschhorn JN, Groop L und Altshuler D (2004) Haplotype structure and genotype-phenotype correlations of the sulfonylurea receptor and the islet ATP-sensitive potassium channel gene region. *Diabetes* **53**:1360-1368.
- French RJ und Shoukimas JJ (1981) Blockage of squid axon potassium conductance by internal tetra-*N*-alkylammonium ions of various sizes. *Biophys J* **34**:271-291.
- Garlid KD (1996) Cation transport in mitochondria - The potassium cycle. *Biochim Biophys Acta-Bioenergetics* **1275**:123-126.
- Giblin JP, Cui Y, Clapp LH und Tinker A (2002) Assembly limits the pharmacological complexity of ATP-sensitive potassium channels. *J Biol Chem* **277**:13717-13723.
- Giblin JP, Leaney JL und Tinker A (1999) The molecular assembly of ATP-sensitive potassium channels - Determinants on the pore forming subunit. *J Biol Chem* **274**:22652-22659.
- 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. *New England Journal of Medicine* **338**:226-230.
- Goldstein G (1964) Equilibrium distribution of metal-fluoride complexes. *Anal Chem* **36**:243-244.
- Goldstein SAN, Bayliss DA, Kim D, Lesage F, Plant LD und Rajan S (2005) International Union of Pharmacology. LV. Nomenclature and molecular relationships of two-P potassium channels. *Pharmacol Rev* **57**:527-540.

- Gonoi T und Seino S (2000) Structure and function of ATP-sensitive K⁺ channels, in *Pharmacology of Ionic Channel Function: Activators and Inhibitors* (Endo M, Kurachi Y und Mishina M eds) pp 271-295, Springer Verlag, New York.
- 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 und Ashcroft FM (1999) Differential sensitivity of beta-cell and extrapancreatic K_{ATP} channels to gliclazide. *Diabetologia* **42**:845-848.
- Gribble FM, Ashfield R, Ämmälä C und Ashcroft FM (1997a) Properties of cloned ATP-sensitive K⁺ currents expressed in *Xenopus* oocytes. *J Physiol* **498**:87-98.
- Gribble FM, Tucker SJ und Ashcroft FM (1997b) The essential role of the Walker A motifs of SUR1 in K-ATP channel activation by Mg-ADP and diazoxide. *EMBO J* **16**:1145-1152.
- Gribble FM, Tucker SJ und Ashcroft FM (1997c) The interaction of nucleotides with the tolbutamide block of cloned ATP-sensitive K⁺ channel currents expressed in *Xenopus* oocytes: a reinterpretation. *J Physiol* **504**:35-45.
- Gribble FM, Tucker SJ, Seino S und Ashcroft FM (1998) Tissue specificity of sulfonylureas: Studies on cloned cardiac and β-cell K_{ATP} channels. *Diabetes* **47**:1412-1418.
- Gros L, Trapp S, Dabrowski M, Ashcroft FM, Bataille D und Blache P (2002) Characterization of two novel forms of the rat sulphonylurea receptor SUR1A2 and SUR1B Delta 31. *Br J Pharmacol* **137**:98-106.
- Gutman GA, Chandy KG, Grissmer S, Lazdunski M, Mckinnon D, Pardo LA, Robertson GA, Rudy B, Sanguinetti MC, Stühmer W und Wang X (2005) International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev* **57**:473-508.
- Haider S, Tarasov A, Craig TJ, Sansom MSP und Ashcroft FM (2007) Identification of the PIP₂-binding site on Kir6.2 by molecular modelling and functional analysis. *EMBO J* **26**:3749-3759.
- 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**: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 und Quast U (2002a) Glibenclamide binding to sulphonylurea receptor subtypes: dependence on adenine nucleotides. *Br J Pharmacol* **136**:995-1004.
- Hambrock A, Löffler-Walz C, Russ U, Lange U und Quast U (2001) Characterization of a mutant 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.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B und Sigworth FJ (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch* **391**:85-100.
- Han J, So I, Kim EY und Earm YE (1993) ATP-sensitive potassium channels are modulated by intracellular lactate in rabbit ventricular myocytes. *Pflügers Arch* **425**:546-548.
- Hansen AMK, Hansen JB, Carr RD, Ashcroft FM und Wahl P (2005) Kir6.2-dependent high-affinity repaglinide binding to β -cell K_{ATP} channels. *Br J Pharmacol* **144**:551-557.
- Harvey J und Ashford MLJ (1998a) Insulin occludes leptin activation of ATP-sensitive K^+ channels in rat CRI-G1, insulin secreting cells. *Journal of Physiology-London* **511**:695-706.
- Harvey J und Ashford MLJ (1998b) Role of tyrosine phosphorylation in leptin activation of ATP-sensitive K^+ channels in the rat insulinoma cell line CRI-G1. *J Physiol* **510**:47-61.
- Harvey J, Hardy SC, Irving AJ und Ashford MLJ (2000) Leptin activation of ATP-sensitive K^+ (K_{ATP}) channels in rat CRI-G1 insulinoma cells involves disruption of the actin cytoskeleton. *J Physiol* **527**:95-107.
- Harvey J, McKenna F, Herson PS, Spanswick D und Ashford MLJ (1997) Leptin activates ATP-sensitive potassium channels in the rat insulin-secreting cell line, CRI-G1. *Journal of Physiology-London* **504**:527-535.
- Hayabuchi Y, Dart C und Standen NB (2001a) Evidence for involvement of A-kinase anchoring protein in activation of rat arterial K_{ATP} channels by protein kinase A. *J Physiol* **536**:421-427.
- Hayabuchi Y, Davies NW und Standen NB (2001b) Angiotensin II inhibits rat arterial K_{ATP} channels by inhibiting steady-state protein kinase A activity and activating protein kinase C ϵ . *J Physiol* **530**:193-205.
- Heginbotham L, Lu Z, Abramson T und MacKinnon R (1994) Mutations in the K^+ channel signature sequence. *Biophys J* **66**:1061-1067.
- Hermolin J und Fillingame RH (1995) Assembly of F_0 sector of *Escherichia coli* H^+ ATP synthase. Interdependence of subunit insertion into the membrane. *J Biol Chem* **270**:2815-2817.
- 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.
- Hershko A, Ciechanover A und Varshavsky A (2000) The ubiquitin system. *Nat Med* **6**:1073-1081.

- Higgins CF und Linton KJ (2004) The ATP switch model for ABC transporters. *Nat Struct Mol Biol* **11**:918-926.
- Hill AV (1910) The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves. *J Physiol* **40 Suppl.**:iv-vii.
- Hogue DL, Ellison MJ, Young JD und Cass CE (1996) Identification of a novel membrane transporter associated with intracellular membranes by phenotypic complementation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **271**:9801-9808.
- Hogue DL, Kerby L und Ling V (1999) A mammalian lysosomal membrane protein confers multidrug resistance upon expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **274**:12877-12882.
- Hogue DL, Nash C, Ling V und Hobman TC (2002) Lysosome-associated protein transmembrane 4 α (LAPTM4 α) requires two tandemly arranged tyrosine-based signals for sorting to lysosomes. *Biochem J* **365**:721-730.
- Hu H, Sato T, Seharaseyon J, Liu Y, Johns DC, O'Rourke B und Marban E (1999) Pharmacological and histochemical distinctions between molecularly defined sarcolemmal K_{ATP} channels and native cardiac mitochondrial K_{ATP} channels. *Mol Pharmacol* **55**:1000-1005.
- Hu K, Huang CS, Jan YN und Jan LY (2003) ATP-sensitive potassium channel traffic regulation by adenosine and protein kinase C. *Neuron* **38**:417-432.
- Ibrahim N, Bosch MA, Smart JL, Qiu J, Rubinstein M, Rønnekleiv OK, Low MJ und Kelly MJ (2003) Hypothalamic proopiomelanocortin neurons are glucose responsive and express K_{ATP} channels. *Endocrinology* **144**:1331-1340.
- Inagaki N, Gono T, Clement IV JP, Namba N, Inazawa J, Gonzalez G, Aguilar-Bryan L, Seino S und Bryan J (1995a) Reconstitution of I_{KATP} : an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science* **270**:1166-1170.
- Inagaki N, Gono T, Clement IV JP, Wang CZ, Aguilar-Bryan L, Bryan J und Seino S (1996) A family of sulphonylurea receptors determines the pharmacological properties of ATP-sensitive K^+ channels. *Neuron* **16**:1011-1017.
- Inagaki N, Gono T und Seino S (1997) Subunit stoichiometry of the pancreatic β -cell ATP-sensitive K^+ channel. *FEBS Lett* **409**:232-236.
- Inagaki N, Inazawa J und Seino S (1995b) cDNA sequence, gene structure, and chromosomal localization of the human ATP-sensitive potassium channel, uKATP-1, gene (KCNJ8). *Genomics* **30**:102-104.
- Inoue I, Nagase H, Kishi K und Higuti T (1991) ATP-sensitive K^+ channel in the mitochondrial inner membrane. *Nature* **352**:244-247.
- Irani BG, Le Foll C, Dunn-Meynell A und Levin BE (2008) Effects of leptin on rat ventromedial hypothalamic neurons. *Endocrinology* **149**:5146-5154.

- Ishida Y, Honda H und Watanabe TX (1992) Ca^{2+} release from isolated sarcoplasmic reticulum of guinea-pig psoas muscle induced by K^+ -channel blockers. *Br J Pharmacol* **106**:764-765.
- Ishihara H, Maechler P, Gjinovci A, Herrera P-L und Wollheim CB (2003) Islet β -cell secretion determines glucagon release from neighbouring α -cells. *Nat Cell Biol* **5**:330-335.
- 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.
- Jiang Y und MacKinnon R (2000) The barium site in a potassium channel by x-ray crystallography. *J Gen Physiol* **115**:269-272.
- Jiao J, Garg V, Yang B, Elton TS und Hu KL (2008) Protein kinase C- ϵ induces caveolin-dependent internalization of vascular adenosine 5'-triphosphate sensitive K^+ channels. *Hypertension* **52**:499-506.
- John SA, Monck JR, Weiss JN und Ribalet B (1998) The sulphonylurea receptor SUR1 regulates ATP-sensitive mouse Kir6.2 K^+ channels linked to the green fluorescent protein in human embryonic kidney cells (HEK 293). *J Physiol* **510**:333-345.
- John SA, Weiss JN und Ribalet B (2005) ATP sensitivity of ATP-sensitive K^+ channels: role of the $\{\gamma\}$ phosphate group of ATP and the R50 residue of mouse Kir6.2. *J Physiol* **568**:931-940.
- Jovanovic S, Du Q, Crawford RM, Budas GR, Stajlar I und Jovanovic A (2005) Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase serves as an accessory protein of the cardiac sarcolemmal K_{ATP} channel. *EMBO Rep* **6**:848-852.
- Jovanovic S und Jovanovic A (2005) High Glucose Regulates the Activity of Cardiac Sarcolemmal ATP-Sensitive K^+ Channels via 1,3-Bisphosphoglycerate: A Novel Link Between Cardiac Membrane Excitability and Glucose Metabolism. *Diabetes* **54**:383-393.
- Kamp F, Kizilbash N, Corkey BE, Berggren P-O und Hamilton JA (2003) Sulfonylureas rapidly cross phospholipid bilayer membranes by a free-diffusion mechanism. *Diabetes* **52**:2526-2531.
- Kang G, Chepurny OG, Malester B, Rindler MJ, Rehmann H, Bos JL, Schwede F, Coetzee WA und Holz GG (2006a) cAMP sensor Epac as a determinant of ATP-sensitive potassium channel activity in human pancreatic β cells and rat INS-1 cells. *J Physiol* **573**:595-609.
- Kang Y, Leung Y-M, Manning-Fox JE, Xia F, Xie H, Sheu L, Tsushima RG, Light PE und Gaisano HY (2004) Syntaxin-1A inhibits cardiac K_{ATP} channels by its actions on nucleotide binding folds 1 and 2 of sulfonylurea receptor 2A. *J Biol Chem* **279**:47125-47131.
- Kang Y, Ng B, Leung Y-M, He Y, Xie H, Lodwick D, Norman RI, Tinker A, Tsushima RG und Gaisano HY (2006b) Syntaxin-1A actions on sulfonylurea receptor 2A can block acidic pH-induced cardiac K_{ATP} channel activation. *J Biol Chem* **281**:19019-19028.

- Kawamura S, Yoshida K-I, Miura T, Mizukami Y und Matsuzaki M (1998) Ischemic preconditioning translocates PKC- δ and - ϵ , which mediate functional protection in isolated rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **275**:H2266-H2271.
- Kessler C, Löffler C, Linde C, Baumlin Y und Quast U (1997) Activators of protein kinase A induce a glibenclamide-sensitive $^{86}\text{Rb}^+$ efflux in rat isolated aorta. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **355**:483-490.
- Kieffer TJ, Keller RS, Leech CA, Holz GG und Habener JF (1997) Leptin suppression of insulin secretion by the activation of ATP-sensitive K^+ channels in pancreatic beta-cells. *Diabetes* **46**:1087-1093.
- Kiss L, Deitch EA und Szabó C (2008) Hydrogen sulfide decreases adenosine triphosphate levels in aortic rings and leads to vasorelaxation via metabolic inhibition. *Life Sci* **83**:589-594.
- Klein I, Sarkadi B und Váradi A (1999) An inventory of the human ABC proteins. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes* **1461**:237-262.
- Koh SD, Bradley KK, Rae MG, Keef KD, Horowitz B und Sanders KM (1998) Basal activation of ATP-sensitive potassium channels in murine colonic smooth muscle cell. *Biophys J* **75**:1793-1800.
- Kondo C, Repunte VP, Satoh E, Yamada M, Horio Y, Matsuzawa Y, Pott L und Kurachi Y (1998) Chimeras of Kir6.1 and Kir6.2 reveal structural elements involved in spontaneous opening and unitary conductance of the ATP-sensitive K^+ channels. *Receptors Channels* **6**:129-140.
- Kono Y, Horie M, Takano M, Otani H, Xie L-H, Akao M, Tsuji K und Sasayama S (2000) The properties of the Kir6.1-6.2 tandem channel co-expressed with SUR2A. *Pflügers Arch* **440**:692-698.
- Korchev YE, Negulyaev YA, Edwards CRW, Vodyanoy I und Lab MJ (2000) Functional localization of single active ion channels can the surface of a living cell. *Nat Cell Biol* **2**:616-619.
- Koster JC, Sha Q und Nichols CG (1999a) Sulfonylurea and K^+ -channel opener sensitivity of K_{ATP} channels - *Functional coupling of Kir6.2 and SUR1 subunits*. *J Gen Physiol* **114**:203-213.
- Koster JC, Sha Q, Shyng S-L und Nichols CG (1999b) ATP inhibition of K_{ATP} channels: control of nucleotide sensitivity by the N-terminal domain of the Kir6.2 subunit. *J Physiol* **515**:19-30.
- Krauter T, Ruppertsberg JP und Baukowitz 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 M, Quayle JM und Standen NB (1997) Angiotensin II inhibition of ATP-sensitive K^+ currents in rat arterial smooth muscle cells through protein kinase C. *J Physiol* **503**:489-496.

- Kubo Y, Adelman JP, Clapham DE, Jan LY, Karschin A, Kurachi Y, Lazdunski M, Nichols CG, Seino S und Vandenberg CA (2005) International Union of Pharmacology. LIV. Nomenclature and molecular relationships of inwardly rectifying potassium channels. *Pharmacol Rev* **57**:509-526.
- Kwan EP und Gaisano HY (2009) Rescuing the subprime meltdown in insulin exocytosis in diabetes. *Ann N Y Acad Sci* **1152**:154-164.
- Lamensdorf I, Meiri N, Harvey-White J, Jacobowitz DM und Kopin IJ (1999) Kir6.2 oligoantisense administered into the globus pallidus reduces apomorphine-induced turning in 6-OHDA hemiparkinsonian rats. *Brain Res* **818**:275-284.
- Larsson O, Ämmälä C, Bokvist K, Fredholm B und Rorsman P (1993) Stimulation of the K_{ATP} channel by ADP and diazoxide requires nucleotide hydrolysis in mouse pancreatic β -cells. *J Physiol* **463**:349-365.
- Lawson K (1996) Potassium channel activation: A potential therapeutic approach? *Pharmacol Ther* **70**:39-63.
- Lee K, Dixon AK, Richardson PJ und Pinnock RD (1999) Glucose-receptive neurones in the rat ventromedial hypothalamus express K_{ATP} channels composed of Kir6.1 and SUR1 subunits. *J Physiol* **515**:439-452.
- Lee MW und Severson DL (1994) Signal transduction in vascular smooth muscle: diacylglycerol second messengers and PKC action. *Am J Physiol Cell Physiol* **267**:C659-C678.
- Leung YM, Kang Y, Gao X, Xia F, Xie H, Sheu L, Tsuk S, Lotan I, Tsushima RG und Gaisano HY (2003) Syntaxin 1A binds to the cytoplasmic C terminus of Kv2.1 to regulate channel gating and trafficking. *J Biol Chem* **278**:17532-17538.
- Li RA, Leppo M, Miki T, Seino S und Marban E (2000) Molecular basis of electrocardiographic ST-segment elevation. *Circ Res* **87**:837-839.
- Light PE, Bladen C, Winkfein RJ, Walsh MP und French RJ (2000) Molecular basis of protein kinase C-induced activation of ATP-sensitive potassium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:9058-9063.
- Light PE, Cordeiro JM und French RJ (1999) Identification and properties of ATP-sensitive potassium channels in myocytes from rabbit Purkinje fibres. *Cardiovasc Res* **44**:356-369.
- Light PE, Manning Fox JE, Riedel MJ und Wheeler MB (2002) Glucagon-like peptide-1 inhibits pancreatic ATP-sensitive potassium channels via a protein kinase A- and ADP-dependent mechanism. *Mol Endocrinol* **16**:2135-2144.
- Lim JJ, Liu Y-H, Khin ESW und Bian J-S (2008) Vasoconstrictive effect of hydrogen sulfide involves downregulation of cAMP in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **295**:C1261-C1270.
- Lin Y-F, Jan YN und Jan LY (2000) Regulation of ATP-sensitive potassium channel function by protein kinase A-mediated phosphorylation in transfected HEK293 cells. *EMBO J* **19**:942-955.

- Lin Y-F, Raab-Graham K, Jan YN und Jan LY (2004) NO stimulation of ATP-sensitive potassium channels: Involvement of Ras/mitogen-activated protein kinase pathway and contribution to neuroprotection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:7799-7804.
- Linde C, Löffler C und Quast U (1997) Inhibition by protein kinase C of the $^{86}\text{Rb}^+$ efflux and vasorelaxation induced by P1075, a K_{ATP} channel opener, in rat isolated aorta. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **356**:425-432.
- Linde C und Quast U (1995) Potentiation of P1075-induced K^+ channel opening by stimulation of adenylate cyclase in rat isolated aorta. *Br J Pharmacol* **115**:515-521.
- Liss B, Bruns R und Roeper J (1999) Alternative sulfonylurea receptor expression defines metabolic sensitivity of K_{ATP} channels in dopaminergic midbrain neurons. *EMBO J* **18**:833-846.
- Liss B und Roeper J (2001) Molecular physiology of neuronal K_{ATP} channels. *Molecular Membrane Biology* **18**:117-127.
- Löffler-Walz C, Hambrock A und Quast U (2002) Interaction of K_{ATP} channel modulators with sulfonylurea receptor SUR2B: implication for tetramer formation and allosteric coupling of subunits. *Mol Pharmacol* **61**:407-414.
- Löffler-Walz C und Quast U (1998) Interaction of the diuretics torasemide and U-37883A with the K_{ATP} channel in rat isolated aorta. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **358**:230-237.
- Loo TW und Clarke DM (1997) Identification of residues in the drug-binding site of human P-glycoprotein using a thiol-reactive substrate. *J Biol Chem* **272**:31945-31948.
- Löscher W und Potschka H (2005) Blood-brain barrier active efflux transporters: ATP-binding cassette gene family. *NeuroRx* **2**:86-98.
- Lotshaw DP (2007) Biophysical, pharmacological, functional characteristics of cloned and native mammalian two-pore domain K^+ channels. *Cell Biochemistry and Biophysics* **47**:209-256.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL und Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**:265-275.
- Lu T, Ye D, Wang X, Seubert JM, Graves JP, Bradbury JA, Zeldin DC und Lee H-C (2006) Cardiac and vascular K_{ATP} channels in rats are activated by endogenous epoxyeicosatrienoic acids through different mechanisms. *J Physiol* **575**:627-644.
- Maeda K, Horikoshi T, Nakashima E, Miyamoto Y, Mabuchi A und Ikegawa S (2005) *MATN* and *LAPTM* are parts of larger transcription units produced by intergenic splicing: Intergenic splicing may be a common phenomenon. *DNA Res* **12**:365-372.
- Makhina EN und Nichols CG (1998) Independent trafficking of K_{ATP} channel subunits to the plasma membrane. *J Biol Chem* **273**:3369-3374.
- Malsam J, Kreye S und Söllner TH (2008) Membrane fusion: SNAREs and regulation. *Cellular and Molecular Life Sciences* **65**:2814-2832.

- Mans BJ, Anantharaman V, Aravind L und Koonin EV (2004) Comparative genomics, evolution and origins of the nuclear envelope and nuclear pore complex. *Cell Cycle* **3**:1612-1637.
- Markworth E, Schwanstecher C und Schwanstecher M (2000) ATP⁴⁻ mediates closure of pancreatic β -cell ATP-sensitive potassium channels by interaction with 1 of 4 identical sites. *Diabetes* **49**:1413-1418.
- Marshall RD (1972) Glycoproteins. *Annu Rev Biochem* **41**:673-702.
- Matsuo M, Dabrowski M, Ueda K und Ashcroft FM (2002) Mutations in the linker domain of NBD2 of SUR inhibit transduction but not nucleotide binding. *EMBO J* **21**:4250-4258.
- Matsuo M, Kimura Y und Ueda K (2005) K_{ATP} channel interaction with adenine nucleotides. *J Mol Cell Cardiol* **38**:907-916.
- Matsuo M, Tanabe K, Kioka N, Amachi T und Ueda K (2000) Different binding properties and affinities for ATP and ADP among sulfonylurea receptor subtypes, SUR1, SUR2A, and SUR2B. *J Biol Chem* **275**:28757-28763.
- Matsuoka T, Matsushita K, Katayama Y, Fujita A, Inageda K, Tanemoto M, Inanobe A, Yamashita S, Matsuzawa Y und Kurachi Y (2000) C-terminal tails of sulfonylurea receptors control ADP-induced activation and diazoxide modulation of ATP-sensitive K⁺ channels. *Circ Res* **87**:873-880.
- Matsushita K, Kinoshita K, Matsuoka T, Fujita A, Fujikado T, Tano Y, Nakamura H und Kurachi Y (2002) Intramolecular interaction of SUR2 subtypes for intracellular ADP-induced differential control of K_{ATP} channels. *Circ Res* **90**:554-561.
- Mederos y Schnitzler M, Derst C, Daut J und Preisig-Müller R (2000) ATP-sensitive potassium channels in capillaries isolated from guinea-pig heart. *J Physiol* **525**:307-317.
- 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.
- Mikhailov MV, Campbell JD, de Wet H, Shimomura K, Zadek B, Collins RF, Sansom MSP, Ford RC und Ashcroft FM (2005) 3-D structural and functional characterization of the purified K_{ATP} channel complex Kir6.2-SUR1. *EMBO J* **24**:4166-4175.
- Miki T, Liss B, Minami K, Shiuchi T, Saraya A, Kashima Y, Horiuchi M, Ashcroft F, Minokoshi Y, Roeper J und Seino S (2001) ATP-sensitive K⁺ channels in the hypothalamus are essential for the maintenance of glucose homeostasis. *Nat Neurosci* **4**:507-512.
- Mirshamsi S, Laidlaw HA, Ning K, Anderson E, Burgess LA, Gray A, Sutherland C und Ashford MLJ (2004) Leptin and insulin stimulation of signalling pathways in arcuate nucleus neurones: PI3K dependent actin reorganization and K_{ATP} channel activation. *BMC Neurosci* **5**:54.

- Moreau C, Gally F, Jacquet-Bouix H und Vivaudou M (2005a) The size of a single residue of the sulfonylurea receptor dictates the effectiveness of K_{ATP} channel openers. *Mol Pharmacol* **67**:1026-1033.
- Moreau C, Jacquet H, Prost A-L, D'hahan N und Vivaudou M (2000) The molecular basis of the specificity of action of K_{ATP} channel openers. *EMBO J* **19**:6644-6651.
- Moreau C, Prost A-L, Dérand R und Vivaudou M (2005b) SUR, ABC proteins targeted by K_{ATP} channel openers. *J Mol Cell Cardiol* **38**:951-963.
- Mukai E, Ishida H, Horie M, Noma A, Seino Y und Takano M (1998) The antiarrhythmic agent cibenzoline inhibits K_{ATP} channels by binding to Kir6.2. *Biochem Biophys Res Commun* **251**:477-481.
- Mutafova-Yambolieva VN und Keef KD (1997) Adenosin-induced hyperpolarizations in guinea pig coronary artery involves A2b receptors and KATP channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **273**:H2687-H2695.
- Nelson DA, Bryan J, Wechsler S, Clement JP, IV und Aguilar-Bryan L (1996) The high-affinity sulfonylurea receptor: distribution, glycosylation, purification, and immunoprecipitation of two forms from endocrine and neuroendocrine cell lines. *Biochem* **35**:14793-14799.
- Newton AC (1995) Protein kinase C: structure, function, and regulation. *J Biol Chem* **270**:28495-28498.
- Newton AC (2009) Lipid activation of protein kinases. *J Lipid Res* **50**:S266-S271.
- Ng B, Kang Y, Xie H, Sun H und Gaisano HY (2008) Syntaxin-1A inhibition of P-1075, cromakalim, and diazoxide actions on mouse cardiac ATP-sensitive potassium channel. *Cardiovasc Res* **80**:365-374.
- Nguyen T-S, Winn HR und Janigro D (2000) ATP-sensitive potassium channels may participate in the coupling of neuronal activity and cerebrovascular tone. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **278**:H878-H885.
- Nichols CG (2006) K_{ATP} channels as molecular sensors of cellular metabolism. *Nature* **440**:470-476.
- 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* **435**:595-603.
- Ozaki N, Shibasaki T, Kashima Y, Miki T, Takahashi K, Ueno H, Sunaga Y, Yano H, Matsuura Y, Iwanaga T, Takai Y und Seino S (2000) cAMP-GEFII is a direct target of cAMP in regulated exocytosis. *Nat Cell Biol* **2**:805-811.
- Park WS, Ko EA, Han J, Kim N und Earm YE (2005) Endothelin-1 acts via protein kinase C to block K_{ATP} channels in rabbit coronary and pulmonary arterial smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol* **45**:99-108.

- Pasyk EA, Kang Y, Huang X, Cui N, Sheu L und Gaisano HY (2004) Syntaxin-1A binds the nucleotide-binding folds of sulphonylurea receptor 1 to regulate the K_{ATP} channel. *J Biol Chem* **279**:4234-4240.
- 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 und Ashcroft FM (1997) Phentolamine block of K_{ATP} channels is mediated by Kir6.2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:11716-11720.
- Proks P, Ashfield R und Ashcroft FM (1999) Interaction of vanadate with the cloned beta cell K_{ATP} channel. *J Biol Chem* **274**:25393-25397.
- Proks P, Reimann F, Green N, Gribble F und Ashcroft F (2002) Sulphonylurea stimulation of insulin secretion. *Diabetes* **51**:S368-S376.
- Pu J-L, Ye B, Kroboth SL, McNally EM, Makielski JC und Shi N-Q (2008) Cardiac sulphonylurea receptor short form-based channels confer a glibenclamide-insensitive K_{ATP} activity. *J Mol Cell Cardiol* **44**:188-200.
- Puddu A, Salani B, Cordera R, Viviani GL und Maggi D (2008) Caveolin-1 is essential for glimepiride-induced insulin secretion in the pancreatic β TC-6 cell line. *Biochem Biophys Res Commun* **375**:235-237.
- Quast U (1996) Effects of potassium channel activators in isolated blood vessels, in *Potassium Channels and their Modulators: From Synthesis to Clinical Experience* (Evans JM, Hamilton TC, Longman SD und Stemp G eds) pp 173-195, Taylor & Francis, London.
- Quast U und Cook NS (1989) In vitro and in vivo comparison of two K⁺ channel openers, diazoxide and cromakalim, and their inhibition by glibenclamide. *J Pharmacol Exp Ther* **250**:261-271.
- Quayle JM, Bonev AD, Brayden JE und Nelson MT (1994) Calcitonin gene-related peptide activated ATP-sensitive K⁺ currents in rabbit arterial smooth muscle via protein kinase A. *J Physiol* **475**:9-13.
- Quesada I und Soria B (2004) Intracellular location of K_{ATP} channels and sulphonylurea receptors in the pancreatic β -cell: New targets for oral antidiabetic agents. *Curr Med Chem* **11**:2707-2716.
- Quesada I, Rovira JM, Martin F, Roche E, Nadal A und Soria B (2002) Nuclear K_{ATP} channels trigger nuclear Ca²⁺ transients that modulate nuclear function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:9544-9549.

- Quinn KV, Cui Y, Giblin JP, Clapp LH und Tinker A (2003) Do anionic phospholipids serve as cofactors or second messengers for the regulation of activity of cloned ATP-sensitive K⁺ channels? *Circ Res* **93**:646-655.
- 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.
- Raab-Graham KF, Cirilo LJ, Boettcher AA, Radeke CM und Vandenberg CA (1999) Membrane topology of the amino-terminal region of the sulfonylurea receptor. *J Biol Chem* **274**:29122-29129.
- Rainbow RD, James M, Hudman D, Al Johi M, Singh H, Watson PJ, Ashmole I, Davies NW, Lodwick D und Norman RI (2004) Proximal C-terminal domain of sulphonylurea receptor 2A interacts with pore-forming Kir6 subunits in K_{ATP} channels. *Biochem J* **379**:173-181.
- Reimann F, Dabrowski M, Jones P, Gribble FM und Ashcroft FM (2003) Analysis of the differential modulation of sulphonylurea block of beta-cell and cardiac ATP-sensitive K⁺ (K_{ATP}) channels by Mg-nucleotides. *J Physiol* **547**:159-168.
- Reimann F, Gribble FM und Ashcroft FM (2000) Differential response of K_{ATP} channels containing SUR2A or SUR2B subunits to nucleotides and pinacidil. *Mol Pharmacol* **58**:1318-1325.
- Reimann F, Ryder TJ, Tucker SJ und Ashcroft FM (1999a) The role of lysine 185 in the Kir6.2 subunit of the ATP-sensitive channel in channel inhibition by ATP. *J Physiol* **520**:661-669.
- Reimann F, Tucker SJ, Proks P und Ashcroft FM (1999b) Involvement of the N-terminus of Kir6.2 in coupling to the sulphonylurea receptor. *J Physiol* **518**:325-336.
- Repunte VP, Nakamura H, Fujita A, Horio Y, Findlay I, Pott L und Kurachi Y (1999) Extracellular links in Kir subunits control the unitary conductance of SUR/Kir6.0 ion channels. *EMBO J* **18**:3317-3324.
- Rost B (2003) Prediction in 1D: secondary structure, membrane helices, and accessibility. *Methods Biochem Anal* **44**:559-587.
- Rufer C und Losert W (1979) Blood glucose lowering sulfonamides with asymmetric carbon atoms. 3. Related N-substituted carbamoylbenzoic acids. *J Med Chem* **22**:750-752.
- 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, Kühner P, Prager R, Stephan D, Bryan J und Quast U (2009) Incomplete dissociation of glibenclamide from wild-type and mutant pancreatic K_{ATP} channels limits their recovery from inhibition. *Br J Pharmacol* **156**:354-361.
- Russ U, Lange U, Löffler-Walz C, Hambrock A und Quast U (2003) Binding and effect of K_{ATP} channel openers in the absence of Mg²⁺. *Br J Pharmacol* **139**:368-380.

- Sakura H, Trapp S, Liss B und Ashcroft FM (1999) Altered functional properties of K_{ATP} channel conferred by a novel splice variant of SUR1. *J Physiol* **521**:337-350.
- Sampson LJ, Davies LM, Barrett-Jolley R, Standen NB und Dart C (2007) Angiotensin II-activated protein kinase C targets caveolae to inhibit aortic ATP-sensitive potassium channels. *Cardiovasc Res* **76**:61-70.
- Sampson LJ, Hayabuchi Y, Standen NB und Dart C (2004) Caveolae localize protein kinase A signaling to arterial ATP-sensitive potassium channels. *Circ Res* **95**:1012-1018.
- Schwanstecher M, Löser S, Rietze I und Panten U (1991) Phosphate and thiophosphate group donating adenine and guanine nucleotides inhibit glibenclamide binding to membranes from pancreatic islets. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **343**:83-89.
- Schwanstecher M, Behrends S, Brandt C und Panten U (1992a) The binding properties of the solubilized sulfonylurea receptor from a pancreatic B-cell line are modulated by the Mg^{++} -complex of ATP. *J Pharmacol Exp Ther* **262**:495-502.
- Schwanstecher M, Schaupp U, Löser S und Panten U (1992b) The binding properties of the particulate and solubilized sulfonylurea receptor from cerebral cortex are modulated by the Mg^{2+} complex of ATP. *J Neurochem* **59**:1325-1335.
- Schwanstecher M, Schwanstecher C, Dickel C, Chudziak F, Moshiri A und Panten U (1994) Location of the sulphonylurea receptor at the cytoplasmic face of the β -cell membrane. *Br J Pharmacol* **113**:903-911.
- 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.
- Schwappach B, Zerangue N, Jan YN und Jan LY (2000) Molecular basis for K_{ATP} assembly: Transmembrane interactions mediate association of a K^+ channel with an ABC transporter. *Neuron* **26**:155-167.
- Segura-Totten M und Wilson KL (2004) BAF: roles in chromatin, nuclear structure and retrovirus integration. *Trends Cell Biol* **14**:261-266.
- Seino S und Miki T (2003) Physiological and pathophysiological roles of ATP-sensitive K^+ channels. *Prog Biophys Mol Biol* **81**:133-176.
- Shi W, Cui N, Shi Y, Zhang X, Yang Y und Jiang C (2007a) Arginine vasopressin inhibits Kir6.1/SUR2B channel and constricts the mesenteric artery via V1a receptor and protein kinase C. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **293**:R191-R199.
- Shi Y, Chen X, Wu Z, Shi W, Yang Y, Cui N, Jiang C und Harrison RW (2008a) cAMP-dependent protein kinase phosphorylation produces interdomain movement in SUR2B leading to activation of the vascular K_{ATP} channel. *J Biol Chem* **283**:7523-7530.
- Shi Y, Cui N, Shi W und Jiang C (2008b) A short motif in Kir6.1 consisting of four phosphorylation repeats underlies the vascular K_{ATP} channel inhibition by protein kinase C. *J Biol Chem* **283**:2488-2494.

- Shi Y, Wu Z, Cui N, Shi W, Yang Y, Zhang X, Rojas A, Ha BT und Jiang C (2007b) PKA phosphorylation of SUR2B subunit underscores vascular K_{ATP} channel activation by beta-adrenergic receptors. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **293**:R1205-R1214.
- Shibasaki T, Sunaga Y, Fujimoto K, Kashima Y und Seino S (2004a) Interaction of ATP sensor, cAMP sensor, Ca²⁺ sensor, and voltage-dependent Ca²⁺ channel in insulin granule exocytosis. *J Biol Chem* **279**:7956-7961.
- Shibasaki T, Sunaga Y und Seino S (2004b) Integration of ATP, cAMP, and Ca²⁺ signals in insulin granule exocytosis. *Diabetes* **53 Suppl 3**:S59-S62.
- Shimomura O, Johnson FH und Saiga Y (1962) Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol* **59**:223-239.
- Shyng S-L, Ferrigni T und Nichols CG (1997) Control of rectification and gating of cloned K_{ATP} channels by the Kir6.2 subunit. *J Gen Physiol* **110**:141-153.
- Shyng S-L und Nichols CG (1997) Octameric stoichiometry of the K_{ATP} channel complex. *J Gen Physiol* **110**:655-664.
- Simpson SH, Majumdar SR, Tsuyuki RT, Eurich DT und Johnson JA (2006) Dose-response relation between sulfonylurea drugs and mortality in type 2 diabetes mellitus: a population-based cohort study. *Can Med Assoc J* **174**:169-174.
- Spanswick D, Smith MA, Groppi VE, Logan SD und Ashford MLJ (1997) Leptin inhibits hypothalamic neurons by activation of ATP-sensitive potassium channels. *Nature* **390**:521-525.
- Spanswick D, Smith MA, Mirshamsi S, Routh VH und Ashford MLJ (2000) Insulin activates ATP-sensitive K⁺ channels in hypothalamic neurons of lean, but not obese rats. *Nat Neurosci* **3**:757-758.
- Speechly-Dick ME, Grover GJ und Yellon DM (1995) Does ischemic preconditioning in the human involve protein kinase C and the ATP-dependent K⁺ channel? Studies of contractile function after simulated ischemia in an atrial in vitro model. *Circ Res* **77**:1030-1035.
- Stagljar I, Korostensky C, Johnsson N und te Heesen S (1998) A genetic system based on split-ubiquitin for the analysis of interactions between membrane proteins *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:5187-5192.
- Stanley CA, Lieu YK, Hsu BYL, Burlina AB, Greenberg CR, Hopwood NJ, Perlman K, Rich BH, Zammarchi E und Poncz M (1998) Hyperinsulinism and hyperammonemia in infants with regulatory mutations of the glutamate dehydrogenase gene. *N Engl J Med* **338**:1352-1357.
- Stefani MR, Nicholson GM und Gold PE (1999) ATP-sensitive potassium channel blockade enhances spontaneous alternation performance in the rat: A potential mechanism for glucose-mediated memory enhancement. *Neuroscience* **93**:557-563.

- Steffensen KR, Bouzga M, Skjeldal F, Kasi C, Karahasan A, Matre V, Bakke O, Guérin S und Eskild W (2007) Human NCU-GI can function as a transcription factor and as a nuclear receptor co-activator. *BMC Mol Biol* **8**:
- Stephan D, Salamon E, Weber H, Ruß U, Lemoine H und Quast U (2006a) K_{ATP} channel openers of the benzopyran type reach their binding site via the cytosol. *Br J Pharmacol* **149**:199-205.
- Stephan D, Stauß E, Lange U, Felsch H, Löffler-Walz C, Hambrock A, Russ U und Quast U (2005) The mutation Y1206S increases the affinity of the sulphonylurea receptor SUR2A for glibenclamide and enhances the effects of coexpression with Kir6.2. *Br J Pharmacol* **144**:1078-1088.
- Stephan D, Winkler M, Kühner P, Russ U und Quast U (2006b) Selectivity of repaglinide and glibenclamide for the pancreatic over the cardiovascular K_{ATP} channels. *Diabetologia* **49**:2039-2048.
- Stevens RJ, Coleman RL, Adler AI, Stratton IM, Matthews DR und Holman RR (2004) Risk factors for myocardial infarction case fatality and stroke case fatality in type 2 diabetes: UKPDS 66. *Diabetes Care* **27**:201-207.
- Stock D, Gibbons C, Arechaga I, Leslie AGW und Walker JE (2000) The rotary mechanism of ATP synthase. *Curr Opin Struct Biol* **10**:672-679.
- Surah-Narwal S, Xu SZ, McHugh D, McDonald RL, Hough E, Cheong A, Partridge C, Sivaprasadarao A und Beech DJ (1999) Block of human aorta Kir6.1 by the vascular K_{ATP} channel inhibitor U37883A. *Br J Pharmacol* **128**:667-672.
- Suzuki M, Kotake K, Fujikura K, Inagaki N, Suzuki T, Gono T, Seino S und Takata K (1997) Kir6.1: A possible subunit of ATP-sensitive K⁺ channels in mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* **241**:693-697.
- Szabó C (2007) Hydrogen sulphide and its therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov* **6**:917-935.
- Szakács G, Váradi A, Özvegy-Laczka C und Sarkadi B (2008) The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox). *Drug Discovery Today* **13**:379-393.
- Szewczyk A, Wójcik G, Lobanov NA und Nalecz MJ (1997) The mitochondrial sulphonylurea receptor: Identification and characterization. *Biochem Biophys Res Commun* **230**:611-615.
- Tamaro P, Girard C, Molnes J, Njølstad PR und Ashcroft FM (2005) Kir6.2 mutations causing neonatal diabetes provide new insights into Kir6.2-SUR1 interactions. *EMBO J* **24**:2318-2330.
- Teramoto N, Zhu H-L, Shibata A, Aishima M, Walsh EJ, Nagao M und Cole WC (2009) ATP-sensitive K⁺ channels in pig urethral smooth muscle cells are heteromultimers of Kir6.1 and Kir6.2. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **296**:F107-F117.

- Thorneloe KS, Maruyama Y, Malcolm AT, Light PE, Walsh MP und Cole WC (2002) Protein kinase C modulation of recombinant ATP-sensitive K⁺ channels composed of Kir6.1 and/or Kir6.2 expressed with SUR2B. *J Physiol* **541**:65-80.
- Tinker A, Jan YN und Jan LY (1996) Regions responsible for the assembly of inwardly rectifying potassium channels. *Cell* **87**:857-868.
- Trapp S, Tucker SJ und Ashcroft FM (1997) Activation and inhibition of K-ATP currents by guanine nucleotides is mediated by different channel subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:8872-8877.
- Tricarico D, Mele A, Lundquist AL, Desai RR, George ALJr und Conte Camerino D (2006) Hybrid assemblies of ATP-sensitive K⁺ channels determine their muscle-type-dependent biophysical and pharmacological properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:1118-1123.
- Tucker SJ und Baukrowitz T (2008) How highly charged anionic lipids bind and regulate ion channels. *J Gen Physiol* **131**:431-438.
- Tucker SJ, Gribble FM, Proks P, Trapp S, Ryder TJ, Haug T, Reimann F und Ashcroft FM (1998) Molecular determinants of K_{ATP} channel inhibition by ATP. *EMBO J* **17**:3290-3296.
- 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.
- Turner DL und Weintraub H (1994) Expression of achaete-scute homolog 3 in *Xenopus* embryos converts ectodermal cells to a neural fate. *Genes Dev* **8**:1434-1447.
- Tusnády GE, Bakos E, Varadi A und Sarkadi B (1997) Membrane topology distinguishes a subfamily of the ATP-binding cassette (ABC) transporters. *FEBS Lett* **402**:1-3.
- Ueda K, Inagaki N und Seino S (1997) MgADP antagonism to Mg²⁺-independent ATP binding of the sulfonylurea receptor SUR1. *J Biol Chem* **272**:22983-22986.
- Ueda K, Komine J, Matsuo M, Seino S und Amachi T (1999) Cooperative binding of ATP and MgADP in the sulfonylurea receptor is modulated by glibenclamide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:1268-1272.
- Uhde I, Toman A, Gross I, Schwanstecher C und Schwanstecher M (1999) Identification of the potassium channel opener site on sulfonylurea receptors. *J Biol Chem* **274**:28079-28082.
- UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group (1998) Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* **352**:837-853.
- van Bever L, Poitry S, Faure C, Norman RI, Roatti A und Baertschi AJ (2004) Pore loop-mutated rat KIR6.1 and KIR6.2 suppress K_{ATP} current in rat cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **287**:H850-H859.

- Vila-Carriles WH, Zhao G und Bryan J (2007) Defining a binding pocket for sulfonylureas in ATP-sensitive potassium channels. *FASEB J* **21**:18-25.
- von Meyenburg K, Jørgensen BB, Michelsen O, Sørensen L und McCarthy JEG (1985) Proton conduction by subunit a of the membrane-bound ATP synthase of *Escherichia coli* revealed after induced overproduction. *EMBO J* **4**:2357-2363.
- Walker JE, Saraste M, Runswick MJ und Gay NJ (1982) Distantly related sequences in the α - and β -subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J* **1**:945-951.
- Wei AD, Gutman GA, Aldrich R, Chandy KG, Grissmer S und Wulff H (2005) International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and molecular relationships of calcium-activated potassium channels. *Pharmacol Rev* **57**:463-472.
- Werber MM, Peyser YM und Muhlrud A (1992) Characterization of stable beryllium fluoride, aluminum fluoride, and vanadate containing myosin subfragment 1-nucleotide complexes. *Biochem* **31**:7190-7197.
- Wheeler A, Wang C, Yang K, Fang K, Davis K, Styer AM, Mirshahi U, Moreau C, Revilloud J, Vivaudou M, Liu S, Mirshahi T und Chan KW (2008) Coassembly of different sulfonylurea receptor subtypes extends the phenotypic diversity of ATP-sensitive potassium (K_{ATP}) channels. *Mol Pharmacol* **74**:1333-1344.
- Winkler M, Lutz R, Russ U, Quast U und Bryan J (2009) Analysis of two KCNJ11 neonatal diabetes mutations, V59G and V59A, and the analogous KCNJ8 I60G substitution: differences between the channel subtypes formed with SUR1. *J Biol Chem* **284**:6752-6762.
- Winkler M, Stephan D, Bieger S, Kühner P, Wolff F und Quast U (2007) Testing the bipartite model of the sulfonylurea receptor binding site: binding of A-, B-, and A+B-site ligands. *J Pharmacol Exp Ther* **322**:701-708.
- Wiser O, Bennett MK und Atlas D (1996) Functional interaction of syntaxin and SNAP-25 with voltage-sensitive L- and N-type Ca^{2+} channels. *EMBO J* **15**:4100-4110.
- Wu J, Cui N, Piao H, Wang Y, Xu H, Mao J und Jiang C (2002) Allosteric modulation of the mouse Kir6.2 channel by intracellular H^+ and ATP. *J Physiol* **543**:495-504.
- 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* **499**:715-720.
- Zawar C, Plant TD, Schirra C, Konnerth A und Neumcke B (1999) Cell-type specific expression of ATP-sensitive potassium channels in the rat hippocampus. *Journal of Physiology-London* **514**:327-341.
- Zerangue N, Schwappach B, Jan YN und Jan LY (1999) A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane K_{ATP} channels. *Neuron* **22**:537-548.
- Zhao W, Zhang J, Lu Y und Wang R (2001) The vasorelaxant effect of H_2S as a novel endogenous gaseous K_{ATP} channel opener. *EMBO J* **20**:6008-6016.

- Zhou M, Tanaka O, Sekiguchi M, Sakabe K, Anzai M, Izumida I, Inoue T, Kawahara K und Abe H (1999) Localization of the ATP-sensitive potassium channel subunit (Kir6.1/uK_{ATP}-1) in rat brain. *Mol Brain Res* **74**:15-25.
- Zhou M, Tanaka O, Sekiguchi M, He H, Yasuoka Y, Itoh H, Kawahara K und Abe H (2005) ATP-sensitive K⁺-channel subunits on the mitochondria and endoplasmic reticulum of rat cardiomyocytes. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **53**:1491-1500.
- Zingman LV, Alekseev AE, Bienengraeber M, Hodgson D, Karger AB, Dzeja PP und Terzic A (2001) Signaling in channel/enzyme multimers: ATPase transitions in SUR module gate ATP-sensitive K⁺ conductance. *Neuron* **31**:233-245.
- Zingman LV, Hodgson DM, Bast PH, Kane GC, Perez-Terzic C, Gumina RJ, Pucar D, Bienengraeber M, Dzeja PP, Miki T, Seino S, Alekseev AE und Terzic A (2002) Kir6.2 is required for adaptation to stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:13278-13283.
- Zünkler BJ, Lenzen S, Männer K, Panten U und Trube G (1988) Concentration-dependent effects of tolbutamide, meglitinide, glipizide, glibenclamide and diazoxide on ATP-regulated K⁺ currents in pancreatic B-cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **337**:225-230.
- Zünkler BJ, Trube G und Panten U (1989) How do sulfonylureas approach their receptor in the β-cell plasma membrane? *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **340**:328-332.

Danksagung

Für die erfahrene Hilfsbereitschaft während meiner Zeit in Tübingen möchte ich mich herzlich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie bedanken.

An erster Stelle gebührt mein Dank Herrn Prof. Ulrich Quast, für die Betreuung der vorliegenden Dissertation, sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit, sowie das entgegengebrachte Vertrauen und die Wertschätzung meiner Arbeit.

Vielen Dank auch an Herrn PD Ulrich Ruß für seine Unterweisung in die Patch-Clamp-Technik inkl. der Unterstützung/Diskussion selbiger Experimente. Ebenso war er als Ansprechpartner für jedwede Art von Computerproblemen unverzichtbar.

Herr Prof. Michael Schwarz war so freundlich, als Mitbetreuer die Dissertation in der Fakultät für Chemie und Pharmazie zu vertreten, sowie als 2. Berichterstatter zu fungieren.

Von meinen unmittelbaren Laborkollegen möchte ich besonders Frau Petra Kühner und Herrn Damian Stephan danken, die mich besonders lange „aushalten“ mussten und mir gerade auch in meiner Anfangszeit die Einarbeitung sehr erleichtert haben. Auch an Herrn Felix Wolff, Herrn Jochen Lichtenberg, Herrn Ulf Lange, Herrn Alexander Stehle, Frau Anke Leichtle, Frau Renate Prager, Herrn Tobias Amann, Frau Rebekka Lutz, Frau Sophie Schell, Herrn Benjamin Rüdiger, sowie unsere Sekretärin Frau Elke Schenk ein herzliches Dankeschön für die sehr gute und angenehme Zusammenarbeit.

Für ihre hervorragende Kollegialität möchte ich mich des weiteren bei Frau Prof. Doris Kloor, Frau PD Annette Hambrock, Frau Marina Hermes, Frau Renate Riehle, Frau Christine Piesch, Frau Sabrina Hiller, Frau Stefanie Ackermann, Frau Martina Lösle, Frau Claudia Müller, Frau Claudia Bernardo de Oliveira Franz und Herrn Albert Braeuning bedanken.

Ich bedanke mich bei Herrn Daniel Auerbach (Dualsystems Biotech, Schlieren, CH) für die exzellente Kommunikation/Unterstützung während des MY2H-Screens.

Die Dissertation profitierte von Kooperationen mit Herrn Prof. Joseph Bryan (Pacific Northwest Diabetes Research Institute, Seattle, USA) und Herrn Prof. Horst Lemoine (Institut für Lasermedizin, Uni Düsseldorf).

Die Arbeiten wurden durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) und die Dr. Karl Kuhn-Stiftung finanziert.

Schließlich danke ich meinem Bruder und vor allem meinen Eltern für ihre fortwährende Unterstützung.

Akademische Lehrer

Prof. Dr. U. Quast

PD Dr. U. Ruß

Prof. Dr. M. Herberhold

Prof. Dr. H. Hoffmann

Prof. Dr. K. Hoffmann

Prof. Dr. L. Kador

Prof. Dr. S. Klautke

Prof. Dr. D. Kleiner

Prof. Dr. W. Köhler

Prof. Dr. E. Komor

Prof. Dr. G. Krausch

Prof. Dr. G. Krauss

Prof. Dr. C. Lehner

Prof. Dr. O. Meyer

Prof. Dr. P. Morys

Prof. Dr. A. Müller

Prof. Dr. F. Schmid

Prof. Dr. G. Schneider

Prof. Dr. W. Schumann

Prof. Dr. G. Spittler

Prof. Dr. M. Sprinzl

Prof. Dr. H. Sticht

Prof. Dr. C. Unverzagt

Prof. Dr. K. Weiss

Prof. Dr. B. Wrackmeyer