Aus dem Institut für Lasermedizin der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf Arbeitsgruppe Molekulare Wirkstoff-Forschung Leitung: Prof. Dr. H. Lemoine

Charakterisierung neuartiger K_{ATP}-Kanalöffner vom Benzothiadiazin-, Benzofuran-, Benzothiophen- und Benzothiazol-Typ an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)- und CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen

Funktioneller Nachweis einer dritten Bindungsstelle für Benzothiadiazin-Derivate am (SUR2B/Kir6.1)-K_{ATP}-Kanal

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

> vorgelegt von Claas Schmidt

> > 2012

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez. Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf Dekan

Referent:Prof. Dr. LemoineKorreferent:Univ.-Prof. Dr. Klöcker

Für meine Eltern

Teile der vorliegenden Dissertation finden sich in nachfolgend genannten Publikationen:

Lachenicht S, Fischer A, Schmidt C, Winkler M, Rood A, Lemoine H, Braun M (2009) Synthesis of modified 4H-1,2,4-benzothiadiazine-1,1-dioxides and determination of their affinity and selectivity for different types of K(ATP) channels. ChemMedChem 4:1850–1858.

Fischer A, Schmidt C, Lachenicht S, Grittner D, Winkler M, Wrobel T, Rood A, Lemoine H, Frank W, Braun M (2010) Synthesis of benzofuran, benzothiophene, and benzothiazole-based thioamides and their evaluation as K(ATP) channel openers. ChemMedChem 5:1749–1759.

Weiterhin wurden Ergebnisse der vorliegenden Arbeit im Rahmen der alljährlichen Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT) 2010-2011 präsentiert:

Schmidt C, Fischer A, Grittner D, Braun M, Lemoine H (2010) Synthesis and selective action of diazoxide derivatives on SUR2B-type K_{ATP} channels. Naunyn-Schmied Arch Pharmacol 381:35.

Schmidt C, Fischer A, Grittner D, Braun M, Lemoine H (2011) Allosteric interaction of diazoxide derivatives and [³H]-P 1075 on SUR2B-type K_{ATP} channels. Naunyn-Schmied Arch Pharmacology 383:39

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung1				
1.1	ATP-9	sensitive Kaliumkanäle	1		
1.2	Aufbau von K _{ATP} -Kanälen				
	1.2.1	Aufbau und Stöchiometrie des KATP-Kanals	1		
	1.2.2	Die regulatorische Sulfonylharnstoff-Untereinheit (SURx)	1		
	1.2.3	Die porenbildende Untereinheit (Kir6.y)	3		
	1.2.4	Gewebsspezifischer Aufbau des KATP-Kanals	4		
1.3	Funkt	tion und Regulation des K _{ATP} -Kanals	5		
	1.3.1	Physiologische Funktion der KATP-Kanäle	5		
	1.3.2	Regulation der K _{ATP} -Kanäle durch Nukleotide	5		
	1.3.3	Pharmakologische Beeinflussung der Nukleotid-Bindung	7		
	1.3.4	Regulation der KATP-Kanäle durch andere physiologische Substanzen	7		
		1.3.4.1 Phospholipide	7		
		1.3.4.2 pH-Wert	8		
		1.3.4.3 Phosphorylierung	8		
		1.3.4.4 Proteine	9		
	1.3.5	Bedeutung der Stöchiometrie für die Funktion des Kanals	9		
	1.3.6	Funktion des SUR1/Kir6.2-K _{ATP} -Kanal der β-Zelle des Pankreas	9		
	1.3.7	Funktion des SUR2B/Kir6.1-KATP-Kanal der glatten Gefäßmuskulatur	11		
1.4	Катр	-Kanal-Blocker	12		
	1.4.1	Wirkmechanismus und klinische Relevanz	12		
	1.4.2	Substanzgruppen	13		
		1.4.2.1 Sulfonylharnstoffe	13		
		1.4.2.2 Cyanoguanidine	13		
		1.4.2.3 Pyrido- und Thieno-Thiadiazine	14		
1.5	Agoni	sten des KATP-Kanals	14		
	1.5.1	Therapeutisches Potential für KATP-Kanalöffner	14		
	1.5.2	Non-Diazoxid-K _{ATP} -Kanalöffner	15		
		1.5.2.1 Cyanoguanidine	15		
		1.5.2.2 Benzopyrane	15		
		1.5.2.3 Weitere vaskuläre K _{ATP} -Kanalöffner	16		
	1.5.3	Diazoxid und seine Derivate	17		
		1.5.3.1 Funktionelle Sonderstellung des Diazoxids unter den KATP-Kanalöffnern	17		

		1.5.3.2 Benzo- und Pyrido-Thiadiazine	18
		1.5.3.3 Thieno-Thiadiazine	18
		1.5.3.4 Modell für SUR1- oder SUR2B-selektive KCO	19
1.6	Bindu	ingsstellen am SUR	20
	1.6.1	Allosterie zwischen der Bindungsstelle für Sulfonylharnstoffe und dem	
		Kaliumkanalöffner P1075	20
	1.6.2	Lokalisation der Bindungsstellen synthetischer Liganden am SUR	20
		1.6.2.1 Lokalisation der Bindungsstellen von Diazoxid und Non-Diazoxid-KCO am SUR	20
		1.6.2.2 Lokalisation der Bindungsstellen der Sulfonylharnstoffe am SUR	23
1.7	Ziele	der vorliegenden Arbeit	24
2	Metl	oden und Material	25
2.1	CHO	-(SUR1/Kir6.2)-Zellkultur	25
	2.1.1	Herkunft	25
	2.1.2	Kultivierung	25
	2.1.3	Passagierung	25
	2.1.4	Vorbereitung von Experimenten	26
2.2	НЕК	293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellkultur	26
	2.2.1	Herkunft	26
	2.2.2	Kultivierung und Passagierung	26
	2.2.3	Vorbereitung von Experimenten	26
2.3	Komp	etitionsbindung an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen	27
	2.3.1	Rezeptortheorie und mathematisches Modell	27
	2.3.2	Experimentelle Bedingungen für die Kompetitionsbindung	28
	2.3.3	Auswertung	29
2.4	Disso	ziationsbindung	29
	2.4.1	Rezeptortheorie und mathematisches Modell	29
	2.4.2	Experimentelle Bedingungen der Dissoziationsbindung	30
	2.4.3	Auswertung einer Dissoziationsbindung	31
	2.4.4	Quantitative Auswertung des allosterischen Effekts	31
2.5	Fluor	eszenzphotometrie	35
	2.5.1	Prinzip der Membranpotentialmessung mit DiBAC4(3) oder DyeB	35
	2.5.2	12-Kanal-Fluoreszensmessgeräte	36
	2.5.3	Experimentelle Bedingungen	38
	2.5.4	Versuchsdurchführung zur Erstellung einer Dosiswirkungskurve eines KCO	39

	2.5.5	Analyse und statistische Auswertung der Daten einer Fluoreszenzmessung	41
		2.5.5.1 Mathematisches Modell für Fluoreszenzkinetiken	41
		2.5.5.2 Auswertung einer Dosiswirkungskurve für einen KCO	41
2.6	Math	ematisch-statistische Auswertungsverfahren	43
2.7	Math	ematisches Modell zur Beschreibung des Zusammenhangs	
	zwisc	hen K _D - und EC ₅₀ -Wert am K _{ATP} -Kanal	43
2.8	Mater	rial und Substanzen	44
	2.8.1	Untersuchte Substanzen	44
		2.8.1.1 Standardsubstanzen	44
		2.8.1.2 Diazoxid-Derivate	44
		2.8.1.3 Benzofuran-, Benzothiophen- und Benzothiazol-Derivate	45
	2.8.2	Sonstige Materialien	45
	2.8.3	Zur Messung, Auswertung und Darstellung verwendete Software	46
3	Resu	ltate	47
3.1	Stand	ard-K _{ATP} -Kanalöffner	47
	3.1.1	Physikochemische Eigenschaften	47
	3.1.2	Membranpotentialmessung mittels Fluoreszenz	48
	3.1.3	Kompetitionsbindung	55
3.2	Diazo	xid-Derivate	57
	3.2.1	Physikochemische Eigenschaften	57
	3.2.2	Membranpotentialmessung mittels Fluoreszenz	58
	3.2.3	Kompetitionsbindung	84
3.3	Benzo	furan-Derivate	92
	3.3.1	Physikochemische Eigenschaften	92
	3.3.2	Membranpotentialmessung mittels Fluoreszenz	93
	3.3.3	Kompetitionsbindung	108
3.4	Benzo	thiophen-Derivate	112
	3.4.1	Physikochemische Eigenschaften	112
	3.4.2	Membranpotentialmessung mittels Fluoreszenz	112
	3.4.3	Kompetitionsbindung	116
3.5	Benzo	thiazol-Derivate	117
	3.5.1	Physikochemische Eigenschaften der Benzothiazol-Derivate	117
	3.5.2	Membranpotentialmessung mittels Fluoreszenz	118
	3.5.3	Kompetitionsbindung	125

3.6	Agonistisch nicht wirksame Testsubstanzen zeigen keine antagonistische Wirkung	
	an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)- und CHO-(SUR1/Kir6.2)- Zellen	129
3.7	Die Wirkungen agonistisch wirksamer untersuchter Substanzen am K $_{ m ATP}$ -Kanal	
	werden durch Glibenclamid antagonisiert	129
3.8	Dissoziationskinetiken mit [³ H]-P 1075	130

3.8.1	Diazoxid-Derivate beschleunigen die [³ H]-P 1075-Dissoziation	130
3.8.2	Abschätzung der Diffusionsgeschwindigkeit mittels Fluoreszenzmessung	145
3.8.3	Bestimmung der allosterischen Potenz	

4	Disk	ussion	.151
4.1	Evalu	ation der Messmethodik	151
	4.1.1	Fluoreszenzmessverfahren des Membranpotentials im Vergleich	151
	4.1.2	Messergebnisse der Affinität und relativen Wirkstärke im Vergleich mit Literaturangaben	152
	4.1.3	Vergleich von Affinität und relativer Wirkstärke	154
4.2	Diazo	xid-Derivate	157
	4.2.1	Fehlende Substituierung mit Chlor in Position 7' führt zu Abfall der relativen Wirkstärke	157
	4.2.2	Substituenten in Position 3'	158
		4.2.2.1 Einfluss der Ringgröße von nicht-aromatischen Cycloalkyl-Substituenten	158
		4.2.2.2 Aromatische Substituenten	159
		4.2.2.3 Einfluss eines zusätzlichen Brücken-C-Atoms in Position 3'	159
		4.2.2.4 3'-Butenyl- und Isobutenyl-Derivate	161
		4.2.2.5 Vergleich von 3'-Alkyl- mit 3'-Alkylamino-Substituenten	162
		4.2.2.6 Vergleich der Diazoxid-Derivate mit Thiadiazin-Derivaten anderer	
		Molekülgrundstrukturen	164
		4.2.2.7 Selektivität	165
	4.2.3	Nachweis negativer Allosterie zwischen der Diazoxid- und der klassischen	
		KCO-Bindungstelle	168
		4.2.3.1 Das Cyanoguanidin P1075 und die Benzopyrane Bimakalim und KC399 binden	
		kompetitiv an der gleichen Bindungsstelle wie [³ H]-P 1075	168
		4.2.3.2 Glibenclamid bindet an eine andere Bindungsstelle als [³ H]-P 1075 und wirkt nega	tiv
		allosterisch auf dessen Bindungsstelle	170
		4.2.3.3 Diazoxid-Derivate binden an eine andere Bindungsstelle als [³ H]-P 1075 und wirke	en
		negativ allosterisch auf dessen Bindungsstelle	171
		4.2.3.4 Die Diffusion der KCO durch die Zellmembran intakter Zellen ist kein	
		geschwindigkeitslimitierender Faktor	171

		4.2.3.5 Allosterische Potenz	172
		4.2.3.6 Negativ allosterische Wirkung der Bindungsstelle von [³ H]-P 1075 auf die	
		Bindungsstelle der Diazoxid-Derivate	174
		4.2.3.7 Neubewertung der Ergebnisse der [³ H]-P 1075-Kompetitionsbindung von Diazoxid-	
		Derivaten unter Kenntnis einer dritten Bindungsstelle für Diazoxid-Derivate	175
		4.2.3.8 Einordnung der Diazoxid-Bindungsstelle in ein funktionelles Modell mit drei	
		Bindungsstellen für synthetische Liganden an einer SUR-Einheit	176
4.3	Benzo	furan-, Benzothiophen- und Benzothiazolderivate	179
	4.3.1	Vergleich von Benzofuran- und Benzothiophenderivaten	
		mit 2'- oder 3'-Carbothioamid-Substitution	180
	4.3.2	Einfluss des Substituenten am Stickstoffatom der 2'-Carbothiamid-Gruppe an Benzofuranen.	180
	4.3.3	Einfluss eletronegativer Gruppen in Position 5' des Benzofurans	181
	4.3.4	Vergleich von Benzothiophen- mit Benzofuran-Derivaten	181
	4.3.5	Vergleich von Benzofuran- und Benzothiazol-Derivaten	181
	4.3.6	Benzothiazol-Derivate mit einem Brücken-C-Atom	182
	4.3.7	Die Thioamidgruppe ist bedeutend für eine agonistische Wirkung am SUR2B-KATP-Kanal	183
	4.3.8	Eine Untersuchung der Racemate von Benzothiazolen ist nicht möglich	184
5	Zusa	mmenfassung1	85
6	Lite	ratur- und Quellenverzeichnis1	87
A	Anh	ang2	201

Tabellenverzeichnis

Tab. 1-1: Gewebsspezifischer Aufbau von KATP-Kanälen (jeweils dominierende Variante)4
Tab. 1-2: Potentielle Einsatzgebiete von KATP-Kanal-Agonisten sortiert nach Organsystem14
Tab. 2-1: Zusammensetzung des HBSS-Puffers (Hanks' balanced salt solution)
Tab. 2-2: Vergleich der Membranpotentialmarker DiBAC4(3) mit DyeB
Tab. 2-3: Zusammensetzung der Versuchspuffer zur Membranpotentialmessung mittels Fluoreszenz38
Tab. 3-1: Molekulargewicht und Lipophilie (S+logP) untersuchter Standard-KATP-Kanalöffner
Tab. 3-2: Vergleich von pEC ₅₀ -Werten der Membranpotential-Tests der Standard-KATP-Kanalöffner mit ihren Dissoziationskonstanten aus der Kompetitionsbindung mit [³ H]-P 107554
Tab. 3-3: Molekulargewicht und Lipophilie (S+LogP) der untersuchten Diazoxid-Derivate
Tab. 3-4: Vergleich von pEC ₅₀ -Werten der Membranpotential-Tests der Diazoxid-Derivate mit ihren Dissoziationskonstanten aus der Kompetitionsbindung mit [³ H]-P 1075 (Teil1)82
Tab. 3-5: Vergleich von pEC50-Werten der Membranpotential-Tests der Diazoxid-Derivate mit ihrenDissoziationskonstanten aus der Kompetitionsbindung mit [³ H]-P 1075 (Teil2)
Tab. 3-6: Molekulargewicht und Lipophilie (S+logP) der Benzofuran-Derivate
Tab. 3-7: Vergleich von pEC50-Werten der Membranpotential-Tests der Benzofuran-Derivate mit ihrenDissoziationskonstanten aus der Kompetitionsbindung mit [³ H]-P 1075107
Tab. 3-8: Molekulargewicht und Lipophilie (S+logP) der Benzothiophen-Derivate
Tab. 3-9: Vergleich von pEC50-Werten der Membranpotential-Tests der Benzothiophen-Derivate mit ihren Dissoziationskonstanten aus der Kompetitionsbindung mit [³ H]-P 1075
Tab. 3-10: Molekulargewicht und Lipophilie (S+logP) der Benzothiazol-Derivate
Tab. 3-11: Vergleich von pEC50-Werten der Membranpotential-Tests der Benzothiazol-Derivate mit ihrenDissoziationskonstanten aus der Kompetitionsbindung mit [³ H]-P 1075
Tab. 3-12: Kinetische Daten für die durch Standard-KATP-Kanalliganden induzierte [³ H]-P 1075-Dissoziation an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen
Tab. 3-13: Kinetische Daten für die durch Diazoxid-Derivate induzierte [³ H]-P 1075-Dissoziation an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen (Teil 1)
Tab. 3-14: Kinetische Daten f ür die durch Diazoxid-Derivate induzierte [³ H]-P 1075-Dissoziation an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen (Teil 2)
Tab. 3-15: Abschätzung der Diffusionszeit mittels DyeB-Fluoreszenzmessung
Tab. 3-16: Vergleich der allosterischen Potenz von Diazoxid, seinen Derivaten und Glibenclamid149
Tab. 4-1: Vergleich von Wirksamkeit und Bindungsaffinität von Standard-K _{ATP} -Kanalliganden 153

Abkürzungsverzeichnis

[A]	Konzentration des Liganden A (mol)
ADP	Adenindiphosphat
ASD	Asymptotische Standardabweichung
ATP	Adenintriphosphat
Bo	Totale Bindung des Radioliganden in Abwesenheit von kompetitiven Liganden
B _{max}	Maximale Bindung
B _{ns}	Unspezifische Bindung
В%	sog. Bound (in Gegenwart einer Ligandkonzentration [A] verbleiben- de spezifische Bindung in Prozent normiert auf B _{max})
Bs	Spezifische Bindung
B _{tot}	Totale Bindung
°C	Grad Celsius
$c_{\rm A}$	Analytische Einheit ($[A] / K_D$)
СНО	Chinese hamster ovary (-Zellen)
cpm	counts per minute
DMSO	Dimethylsulfoxide
EC ₅₀	Konzentration bei 50 % agonistischer Wirkung (mol)
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
FKS	Fetales Kälberserum
F _{max}	Maximale Fluoreszenzintensität
F _{min}	Minimale Fluoreszenzintensität
G	Glibenclamid
Gl.	Gleichung
HEK	Human embryo kidney (-Zellen)
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1- ethansulfonsäure
HTS	High-Throughput-Screening
IC ₅₀	Konzentration bei 50 % Hemmung (mol)
IR	Inward rectifier
Kap.	Kapitel
k _{app}	Apparente Geschwindigkeitskonstante (min ⁻¹)
Katp	ATP-sensitiver Kaliumkanal
KCO	Kaliumkanalöffner; hier genauer:
	K _{ATP} -Kanalöffner
K _D	Gleichgewichts- Dissoziationskonstante (mol)

Kir, Kir6.y	Einwärtsgleichrichtender Kaliumkanal
k _{off}	Geschwindigkeitskonstante
	der Dissoziation (min ⁻¹)
kon	Geschwindigkeitskonstante
	der Assoziation (min ⁻¹)
L*	Radioligand
Μ	mol/l
min	Minute
NBF	nucleotide binding fold
n. d.	Not determined
	(Daten nicht bestimmt)
NNC	Novo-Nordisk-Compound
р	Hill slope; Steigung der Funktion
PBS	Phosphate buffered saline
pEC ₅₀	EC ₅₀ (-log M)
pIC ₅₀	IC ₅₀ (-log M)
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
рК _D	K_{D} (-log M)
R	Rezeptor
RASMC	Rat aortic smooth muscles cells
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SU	Sulfonylharnstoff(e)
SUR, SURx	Sulfonylharnstoff-Rezeptor
t	Zeit
t _{1/2}	Halbwertszeit (min)
ТМ	Transmembranhelix
TMD	Transmembrandomäne
УА	Rezeptorbesetzung

1 Einleitung

1.1 ATP-sensitive Kaliumkanäle

ATP-sensitive K⁺-Kanäle (K_{ATP}-Kanäle) stellen eine vielversprechende pharmakologische Zielstruktur dar. Während Blocker des K_{ATP}-Kanals wie der Sulfonylharnstoff Glibenclamid klinisch bereits häufig in der Therapie des Diabetes mellitus eingesetzt werden, zeigen Öffner des K_{ATP}-Kanals aufgrund mangelnder Gewebsselektivität zahlreiche Nebenwirkungen und werden selten eingesetzt. Dabei besitzen sie ein großes therapeutisches Potential, welches sich von der Behandlung des Hypertonus bis hin zu zellprotektiven Effekten erstreckt.

1.2 Aufbau von K_{ATP}-Kanälen

1.2.1 Aufbau und Stöchiometrie des KATP-Kanals

ATP-sensitive K⁺-Kanäle (K_{ATP}-Kanäle) sind Hetero-Oktamere, welche sich aus vier porenbildenden K_{ATP}-Kanal-Untereinheiten (Kir6.1 oder Kir6.2) sowie vier diese regulierenden Sulfonylharnstoffrezeptoren (SURx) in einer tetradimeren Stöchiometrie (SURx/Kir6.y)₄ zusammensetzen (Clement et al., 1997; Inagaki et al., 1997; Shyng and Nichols, 1997; Mikhailov et al., 2005).

Einzeln vorkommende SURx oder Kir6.y-Proteine werden auf Ebene des Endoplasmatischen Retikulums aufgrund von Retentionssignal-Sequenzen zurückgehalten, so Abb. 1.2.1: Ein K_{ATP}-Kanal setzt sich aus 4 porenbildenden Kir6.y-Unterein-

行;

45

ADD. 1.2.1: EIN K_{ATP}-Kanal setzt sich aus 4 porenbildenden Kir6.y-Untereinheiten sowie vier diese regulierende SURx-Untereinheiten in einer (SURx/Kir6.y)₄-Stoichiometrie zusammen

dass nur komplette Hetero-Oktamere durch gegenseitige Maskierung der Retentionssignal-Sequenzen effizient zur Plasmamembran oder intrazellulären Membranen transportiert werden (Zerangue et al., 1999; Neagoe and Schwappach, 2005).

1.2.2 Die regulatorische Sulfonylharnstoff-Untereinheit (SURx)

Sulfonylharnstoff-Rezeptoren (SUR) stellen mit einem Molekulargewicht von 140-170 kDa große Membranproteine dar und gehören zur Subfamilie C der Proteine mit ATP-Bindungskassette (ABC-Proteine; Higgins, 2001). Generell werden die drei Subtypen SUR1, SUR2A und SUR2B unterschieden: während der Subtyp SUR1 durch das humane Gen ABCC8 auf Chromosom 11

(11p15.1, 39 Exons) codiert wird, ist das SUR2-Gen ABCC9 auf Chromosom 12 (12p11.12, 38 Exons) lokalisiert. Durch alternatives Splicen des letzten Exons des SUR2-Gens entstehen die beiden Subtypen SUR2A und SUR2B (Inagaki et al., 1996). Sie unterscheiden sich in den letzten 42 bzw. 45 carboxy-terminalen Aminosäuren im Falle der Maus (Isomoto et al., 1996) respektive Mensch (Aguilar-Bryan et al., 1998). Daneben existieren weitere Splice-Varianten, deren physiologische Funktion bisher weitgehend unbekannt ist (Sakura et al., 1999; Hambrock et al., 2002; Pu et al., 2008). Ein gleichzeitiges Vorkommen verschiedener SUR-Subtypen in einem K_{ATP}-Kanal ist möglich (Chan et al., 2008; Cheng et al., 2008; Wheeler et al., 2008).

Für viele Vertreter aus der Familie der ABC-Proteine sind im Gegensatz zu den SUR aktive Transportfunktionen bekannt. Die Namen bekannter Vertreter, wie dem *Multidrug Resistance Protein (MDR)*, dem *Multidrug Resistance Associated Protein (MRP)* oder dem *Breast Cancer Resistance Protein* (BCRP), zeugen von der Fähigkeit eine Vielzahl unterschiedlicher Substrate, darunter auch Medikamente, zu transportieren (Übersicht: Higgins, 2001). Charakteristisch für ABC-Proteine besitzt auch der SUR zwei Transmembrandomänen TMD1 und TMD2, jeweils aus sechs Helices bestehend, welche zwei cytoplasmatische Nukleotid-Bindungsregionen NBF1 und NBF2 (*nucleotid binding folds*) formen (Abb. 1.2.2). An den NBF findet am SUR eine hydrolytische Spaltung von ATP mit einer ähnlichen Rate statt, wie sie für das MRP bekannt ist (Mikhailov et al., 2005). Die SUR (wie auch das MRP) heben sich von anderen ABC-Proteinen durch eine aus fünf Helices bestehende zusätzliche TMD0 ab; insgesamt besteht ein SUR somit aus 17 Transmembranhelices, wobei sich der Amino-Terminus des SUR extrazelluär und der Carboxy-Terminus intrazellulär befindet (Conti et al., 2001). Die TMD0 übt zusammen mit TMD2 den regulatorischen



Abb. 1.2.2: Schematischer Aufbau einer porenbildenden Kir6.y-Untereinheit sowie einer regulierenden Sulfonylharnstoff-Rezeptor-Einheit (SURx): Eine Kir6.y-Untereinheit besteht aus 2 Transmembranhelices, welche durch eine sog. P-loop miteinander verbunden sind. Eine SURx-Untereinheit besteht aus drei Transmembrandömänen TMD0, TMD1 und TMD2. Zusätzlich eingezeichnet sind die beiden intrazellulär gelegenen *nucleotid binding folds* NBF1 und NBF2. [Abb. modifiziert nach Uhde et al. (1999) und Moreau et al. (2005)]

Einfluss auf die Kir6.y-Untereinheit aus (Babenko and Bryan, 2003; Dupuis et al., 2008). Neben einer regulatorischen Beeinflussung des Kir6.y werden dem SUR1 zusätzliche Funktionen im Zusammenhang mit der Regulation der Insulin-Sekretion sowie der Apoptose von β -Zellen (insbesondere im Zusammenhang mit Sulfonylharnstoffen) zugeschrieben (Maedler et al., 2005; Hambrock et al., 2006; Aittoniemi et al., 2009).

1.2.3 Die porenbildende Untereinheit (Kir6.y)

Vier Kir-Untereinheiten (Kir6.y) bilden gemeinsam als Tetramer die eigentliche Kanalpore eines K_{ATP}-Kanals (vgl. Abb. 1.2.1). Für den Menschen werden die zwei Subtypen Kir6.1 (424 Aminosäuren, 48 kD, Gen: KCNJ8) und Kir6.2 (390 Aminosäuren, Gen:KCNJ11) unterschieden; sie gleichen sich in 71 % ihrer Aminosäuresequenz (Inagaki et al., 1995; Kubo et al., 2005). Darüber hinaus wurde am Zebrafisch eine weitere Kir6.y-Form entdeckt und als zKir6.3 beschrieben (Zhang et al., 2006).

Die Kir6.y-Untereinheiten gehören zur Familie der einwärtsgleichrichtenden Kalium-Kanäle (Übersicht: Nichols and Lopatin, 1997; Kubo et al., 2005). Typisch für diese Kanalfamilie besteht eine Kir6.y-Untereinheit aus zwei Transmembrandomänen M1 und M2, welche durch eine extrazelluläre Schleife (P-loop bzw. H5-loop) verbunden sind (vgl. Abb. 1.2.2). Diese Schleife beinhaltet die Aminosäuresequenz Gly-Phe-Gly und dient als Selektivitätsfilter für Kaliumionen an der äußeren Kanalöffnung (Doupnik et al., 1995).

In ihrer Funktion als schwache Einwärtsgleichrichter zeichnen sich K_{ATP}-Kanäle dadurch aus, dass bei betragsgleicher Triebspannung für K⁺ (Differenz zwischen Membranpotential und Gleichgewichtspotential für K⁺) der Einwärtsstrom größer als der Auswärtsstrom ist; ursächlich blockieren in Abhängigkeit von der Triebspannung für K⁺ Polyamine (z. B. Spermin) und Mg²⁺ die intrazelluläre Kanalöffnung (Nichols and Lopatin, 1997; Bichet et al., 2003). Für (SUR2A/Kir6.y)-K_{ATP}-Kanäle wurde eine Leitfähigkeit von ~ 35 pS (Kir6.1) bzw. ~ 80 pS (Kir6.2) ermittelt (Repunte et al., 1999).

Die Mutanten Kir6.2 Δ 26 und Kir6.2 Δ 36 besitzen durch die Deletion von carboxyterminalen Aminosäuren die Eigenschaft ohne SUR1-Einheit funktionsfähige Kanalporen zu bilden (Tucker et al., 1997). Durch dieses Vorgehen gelang für die isolierte Kir6.2-Untereinheit ohne regulierenden SUR1 der Nachweis einer eigenen ATP-Sensitivität; gleichzeitig besitzt die Kir6.2-Untereinheit keine Sensitivität für aktivierende Nukleotide (z.B. ADP), Sulfonylharnstoffe oder K_{ATP}-Kanalöffner, deren Wirkung allein der SUR-Untereinheit zugeschrieben wird (Tucker et al., 1997). Neben ATP sind für Kir6.y weitere regulierende intrazelluläre Faktoren bekannt, unter denen Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP₂) (Shyng and Nichols, 1998; Ribalet et al., 2005), pH-Wert und die Einleitung

regulierende SUR-Untereinheit besonders hervorzuheben sind. Kir6.1 weist im Gegensatz zu Kir6.2 mögliche Phosphorylierungsmotive auf, welche durch Proteinkinase C (PKC) phosphoryliert werden und den Kir6.1 schließen; dies stellt einen möglichen Wirkmechanismus für Vasokonstriktoren und Neurotransmitter dar (Shi et al., 2008b).

1.2.4 Gewebsspezifischer Aufbau des KATP-Kanals

Die Erstbeschreibungen von ATP-sensitiven Kaliumkanälen am Herzen gehen auf Noma (1983) zurück. Mittlerweile sind für viele weitere Gewebe wie der β -Zelle des Pankreas, der Skelettmuskulatur oder der glatten vaskulären und nicht-vaskulären Muskulatur K_{ATP}-Kanäle beschrieben worden (Übersicht: Seino and Miki, 2003). Tabelle 1-1 gibt einen Überblick über die nach heutigem Kenntnisstand dominierende Kanalform in den jeweiligen Geweben. Dies schließt nicht aus, dass in einem Gewebe andere Zusammensetzungen des K_{ATP}-Kanals gleichzeitig exprimiert werden. So wurden beispielsweise in der Lunge, Leber, Niere und Harnblase sowohl SUR2B als auch SUR1-Transkripte nachgewiesen (Shi et al., 2005).

		SURx	Kir6.y	Quelle
Pankreas (β-Zelle)		SUR1	Kir6.2	Ashcroft et al. (1984)
Gehirn		SUR1/SUR2B	Kir6.2	Ashford et al. (1988) Liss et al. (1999)
Herz	Atrium	SUR1	Kir6.2	Inagaki et al. (1996) Morrissey et al. (2005)
Herz	Ventrikel	SUR2A	Kir6.2	Flagg et al. (2008)
Skelettmuskulatur		SUR2A	Kir6.2	Spruce et al. (1985)
Glatte Muskulatur	Blutgefäße	SUR2B	Kir6.1	Yamada et al. (1997) Ploug et al. (2010)
	Nicht- vaskulär	SUR2B	Kir6.2	Isomoto et al. (1996) Koh et al. (1998)
	Ureter	SUR2B	(Kir6.1) ₃ Kir6.2	Teramoto et al. (2009)

Tab. 1-1: Gewebsspezifischer Aufbau von KATP-Kanälen (jeweils dominierende Variante)

Darüber hinaus kann sich ein einzelner K_{ATP} -Kanal aus unterschiedlichen SUR-Isoformen zusammensetzen, welche in ihrer Kombination neue pharmakologische Eigenschaften aufweisen (Wheeler et al., 2008). Auch für die Kir-Untereinheiten Kir6.1 und Kir6.2 wurden kürzlich "Misch-

kanäle" an Uretheren des Schweines beschrieben, welche in der Form SUR2B/(Kir6.1)₃Kir6.2 vorliegen (Teramoto et al., 2009). Vor dem Hintergrund dieser Variationsmöglichkeiten in der Expression von K_{ATP}-Kanälen gibt Tabelle 1-1 nur einen vorläufigen orientierenden Überblick.

1.3 Funktion und Regulation des K_{ATP}-Kanals

1.3.1 Physiologische Funktion der KATP-Kanäle

 K_{ATP} -Kanäle beeinflussen das Membranpotential in Abhängigkeit vom Metabolismus der Zelle in einer Vielzahl von Geweben. Die Regulation der K_{ATP} -Kanal-Aktivität in Abhängigkeit vom Stoffwechsel der Zelle erfolgt vor allem durch Änderungen der submembranären Nukleotidkonzentrationen (insbesondere ATP und MgADP). Erhöhte Verstoffwechselung von Energieträgern führt zu einem intrazellulären Anstieg der ATP-Konzentration, wodurch K_{ATP} -Kanäle geschlossen werden und eine Depolarisierung erfolgt; umgekehrt führt ein sehr niedriger Metabolismus oder Ischämie (erhöhte ADP-Konzentration) zum Öffnen des Kanals und zu einer Hyperpolarisation der Zelle (Nichols, 2006).

Das Vorkommen von K_{ATP}-Kanälen scheint ubiquitär: Im Gehirn modulieren K_{ATP}-Kanäle die elektrische Aktivität und Transmitterfreisetzung und wirken neuroprotektiv (Liss et al., 1999; Liss and Roeper, 2001; Griesemer et al., 2002). Am Herzen sind sie beteiligt an der kardioprotektiven Reaktion auf kardialen Stress und ischämischer Präkonditionierung (Grover and Garlid, 2000; Abdallah et al., 2010; Zhang et al., 2010). Endokrinologisch sind sie für die Freisetzung von Insulin aus der β -Zelle des Pankreas (Ashcroft et al., 1984), Glucagon aus der α -Zelle des Pankreas (Göpel et al., 2000) und GLP-1 aus L-Zellen (Gribble et al., 2003) bedeutsam.

1.3.2 Regulation der KATP-Kanäle durch Nukleotide

Die submembranäre Konzentration von Nukleotiden bzw. deren Verhältnis zueinander bestimmt maßgeblich die Aktivität von K_{ATP} -Kanälen. Für ATP wird dabei ein blockierender Effekt (Ausnahme: SUR2B/Kir6.1) sowie für MgATP und MgADP (in Gegenwart von Mg²⁺) ein aktivierender Effekt angenommen. Dabei interagieren die Nukleotide sowohl mit der SURx- als auch der Kir6.y-Untereinheit. An der Kir6.y-Untereinheit führt ATP unabhängig vom SURx zu einem Schließen des Kanals (Tucker et al., 1997). Hierfür ist bereits die Bindung eines einzigen ATP-Moleküls an einer der vier Kir6.y des K_{ATP}-Kanals ausreichend (Markworth et al., 2000). Die kanalöffnende Eigenschaft von MgADP wird dagegen nicht dem Kir6.y, sondern allein dem regulierenden SURx zugesprochen (Tucker et al., 1997).



Abb. 1.3.1: Vereinfachtes Schema zur Regulation der Aktivierung des SUR an den *nucleotid binding folds* NBF1 und NBF2 durch Nukleotide. (Abb. modifiziert nach Matsuo et al., 2005)

Am SURx-Protein interagieren Nukleotide mit den beiden *nucleotid binding folds* NBF1 und NBF2 (Abb. 1.3.1). Dabei ist NBF1 deutlich affiner für MgATP (oder ATP) und besitzt eine sehr niedrige bis keine ATP-Hydrolyseaktivität. Der NBF2 besitzt dagegen eine niedrigere Affinität zu MgADP und MgATP und gleichzeitig eine höhere Hydrolyseaktivität. Es wird angenommen, dass das in NBF2 gebundene MgADP den aktivierten Zustand des SURx vermittelt, welcher die Öffnungswahrscheinlichkeit des Kir6.y erhöht und letztendlich zu einer Kanalöffnung führt. Auch MgATP kann an NBF2 binden, wird jedoch zu MgADP, welches den eigentlichen aktivierten Zustand des SUR darstellt, hydrolysiert (Bienengraeber et al., 2000; Matsuo et al., 2000; Zingman et al., 2001). Darüber hinaus wird angenommen, dass die Bindung von MgATP in NBF1 den aktivierten Mg²⁺-komplexierte Nukleotide wie GDP, GTP und UDP steigern die K_{ATP}-Kanal-Aktivität, während freies ADP und freies GTP zu einer Reduktion der Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals führen (Ashcroft and Rorsman, 1989; Schwanstecher et al., 1994).

Unterschiedliche SURx zeigen verschiedene ATP-Hydrolyseraten: so wird für SUR2A im Vergleich zu SUR2B eine höhere Hydrolyserate und eine niedrigere Affinität für MgATP und MgADP im NBF2 angenommen (Matsuo et al., 2000; Reimann et al., 2000). Durch die daraus resultierende kürzere Bindungszeit von MgADP in NBF2 soll die Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals abnehmen (Matsuo et al., 2005).

Auf Grundlage unterschiedlicher Hydrolyseraten und Affinitäten für Nukleotide wird für physiologische intrazelluläre ATP/ADP-Konzentrationen angenommen, dass SUR2-Kanäle überwiegend geschlossen sind, während ein geringer Anteil der SUR1-Kanäle geöffnet ist (Matsuo et al., 2005).

1.3.3 Pharmakologische Beeinflussung der Nukleotid-Bindung

Die Wirkung von pharmakologisch eingesetzten Wirkstoffen kann teilweise anhand der Nukleotidbindung erklärt werden. So wird für Sulfonylharnstoffe wie Glibenclamid vermutet, dass sie eine Dissoziation von MgATP vom NBF1 bewirken (Ueda et al., 1999; Karger et al., 2008). Dadurch erreicht der Kanal auch durch Bindung von MgADP im NBF2 nicht den aktiven Zustand, woraus eine sehr niedrige Öffnungswahrscheinlichkeit des K_{ATP}-Kanals resultiert und die blockierende Eigenschaft von Sulfonylharnstoffen erklärt werden kann.

Auf der anderen Seite wird für K_{ATP}-Kanalöffner (KCO) wie Diazoxid vermutet, dass sie die Bindung von MgADP im NBF2 – also den SUR im aktivierten Zustand – stabilisieren. Dadurch würde die Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals steigen. Masia und Nichols (2008) konnten anhand von Punktmutationen im NBF2 zeigen, dass mit Verlust oder Verstärkung der Wirksamkeit von MgADP eine Veränderung der Wirksamkeit von Diazoxid im gleichen Maße einhergeht. Dies lege einen gleichen Transduktionsweg für aktivierende Nukleotide und Diazoxid nahe.

1.3.4 Regulation der KATP-Kanäle durch andere physiologische Substanzen

Neben der Verzahnung mit dem Metabolismus durch Nukleotide werden K_{ATP}-Kanäle durch zahlreiche andere Substanzen und Proteine in ihrer Funktion reguliert. Da die SUR-Untereinheit zu den ABC-Proteinen gehört, besteht grundsätzlich das Potential der Interaktion mit einer Vielzahl chemisch unterschiedlicher Liganden, welche auch regulierend wirken können. Zusätzlich besitzt auch die Kir6.y-Untereinheit unterschiedliche Regulationsmechanismen, welche zur Komplexität der Funktion des K_{ATP}-Kanals beitragen. Aufgrund der großen Anzahl unterschiedlicher Regulationsmechanismen seien hier nur die wichtigsten kurz genannt:

1.3.4.1 Phospholipide

An der Kir6.y-Untereinheit können Phospholipide mit einer negativen Ladung, insbesondere PIP_2 , binden und den K_{ATP}-Kanal öffnen; sie wirken entgegengesetzt zur inihibierenden Eigenschaft des ATP (Baukrowitz und Fakler, 2000). Gleichzeitig ist für PIP₂ bekannt, dass es die Wirkung von Liganden am SUR moduliert. So hebt PIP₂ die hochaffine Komponente der Hemmung

Einleitung

durch den Sulfonylharnstoff Tolbutamid an SUR1/Kir6.2 auf und verstärkt bei kurzer Applikation die aktivierende Wirkung von Diazoxid und MgADP; nach längerer Applikation wurde die Aktivierung vermindert (Koster et al., 1999). Während für die Kir6.2-Untereinheit eine niedrige Affinität gemessen wurde, konnte für den (SUR2B/Kir6.1)-Kanal eine hohe Affinität für Phospholipide nachgewiesen werden; potentielle physiologische Fluktuationen von Phospholipiden beeinflussen die Aktivität des SUR2B/Kir6.1-Kanals daher kaum (Quinn et al., 2003).

1.3.4.2 pH-Wert

Am SUR1/Kir6.2-Kanal führt ein moderater Abfall des pH-Wertes zu einer Aktivierung des K_{ATP}-Kanals mit einem Maximum zwischen den pH-Werten 6.5 und 6.8 (Wu et al., 2002). Dieser Effekt wurde für den SUR2B/Kir6.1-Kanal bestätigt (Wang et al., 2003).

1.3.4.3 Phosphorylierung

Für den K_{ATP}-Kanal konnte eine Phosphorylierung durch die Proteinkinase A (PKA) sowie die Proteinkinase C (PKC) nachgewiesen werden.

Schon Quayle et al. (1994) zeigten an Zellen der Aorta eines Kaninchens, dass ein durch Adenylylcyclase (AC) vermittelter Anstieg der cAMP-Konzentration und eine damit einhergehende Aktivierung der PKA zu einer Aktivierung des K_{ATP}-Kanals führt. Shi et al. (2007, 2008a) konnten darüber hinaus zeigen, dass aktivierte β_2 -Rezeptoren über diesen cAMP/PKA-Signalweg zu einer Phosphorylierung im NBF2 des SUR2B führen, dessen Aktivität darauf hin gesteigert ist. Am SUR1/Kir6.2-Kanal wurde in Abwesenheit oder geringen Konzentrationen von MgADP (< 0.5 mM) ein hemmender Effekt gefunden, während in Gegenwart von > 0.5 mM ein aktivierender Effekt durch die PKA gezeigt werden konnte (Light et al., 2002).

Während die PKA die SUR2B/Kir6.1-Kanalform durch Phosphorylierung aktiviert, hemmt die Proteinkinase C (PKC) diesen und leistet als Endstrecke eines G-Protein-gekoppelten Signalwegs einen wesentlichen Beitrag zur vasokonstriktiven Wirkung verschiedener Hormone (u. a. Angiotension II, Endothelin, Noradrenalin; Thorneloe et al., 2002; Park et al., 2005; Shi et al., 2007). Die hemmende Wirkung der PKC wird durch die Phosphorylierung von Serin-Resten am C-terminalen Ende der Kir6.1-Untereinheit bewirkt, welche der Kir6.2-Untereinheit fehlen (Shi et al., 2008b). Für die PKC ist an Kir6.2, im Gegensatz zu Kir6.1, eine Phosphorylierung von T180 bekannt, welche die Sensititvität für ATP senkt und damit die Öffnungswahrscheinlichkeit anhebt (Light et al., 2000).

1.3.4.4 Proteine

Insbesondere am Herzen wurden mehrere Hinweise darauf gefunden, dass K_{ATP} -Kanäle mit anderen Proteinen wie der Creatinkinase, Adenylatkinase oder Lactatdehydrogenase (M-LDH) als Komplex vorliegen, welche den K_{ATP} -Kanal in seiner Aktivität beeinflussen (Carrasco et al., 2001; Crawford et al., 2002a, 2002b). In Gegenwart von Creatinkinase ist beispielsweise eine weitere Reduktion der Öffnungswahrscheinlichkeit bekannt und wird durch eine schnellere Dissoziation des MgADP aus NBF2 und direkte Umsetzung zu MgATP durch die Creatinkinase erklärt (Crawford et al., 2002b).

1.3.5 Bedeutung der Stöchiometrie für die Funktion des Kanals

Der tetradimere Aufbau des K_{ATP} -Kanals wirft die Frage auf, wieviele Blockermoleküle (z. B. Sulfonylharnstoffe) an den vier regulierenden SUR-Untereinheiten binden müssen, damit ein Schließen des K_{ATP} -Kanals erfolgt. Dörschner et al. (1999) entwickelten auf Grundlage von Unterschieden zwischen der relativen Wirkstärke (gemessen in Patch-Clamp Versuchen) und der 3 bis 6-fach niedrigeren Affinität (gemessen in Radioligandbindungs-Experimenten) ein Modell, in dem bereits ein einziges gebundenes Molekül Glibenclamid zu einem Schließen des Kanals führt. Dies ist in Einklang mit dem Schließen des Kanals durch Bindung eines einzigen ATP-Moleküls an einer der vier Kir6.y-Untereinheiten (Markworth et al., 2000).

Für K_{ATP}-Kanalöffner konnten Schwanstecher et al. (1998) einen entgegengesetzten Unterschied zwischen relativer Wirkstärke und einer 3 bis 6-fach höheren Affinität finden. Dies lege nahe, dass alle vier SUR-Untereinheiten von einem KCO besetzt sein müssten, bevor eine Aktivierung des Kanals stattfindet. Diese Hypothese wird zusätzlich gestützt durch Experimente an SUR1-Mutanten einer bestimmten Form des neonatalem Diabetes (NDSUR1), welche auch ohne Ligand einen ständig aktivierenden Einfluss auf den Kir6.2 ausüben: die Kombination dieser Mutanten mit SUR1-Wildtypkanälen in unterschiedlichem Verhältnis erbrachte eine vollständige Aktivierung des Kanals erst bei vollständigem Austausch des Wildtyps durch NDSUR1-Mutanten (Babenko, 2008).

1.3.6 Funktion des SUR1/Kir6.2-K_{ATP}-Kanal der β -Zelle des Pankreas

Nachfolgend werden die in der vorliegenden Arbeit näher untersuchten Kanalformen SUR1/Kir6.2 und SUR2B/Kir6.1 (Kap. 1.3.7) beschrieben. In der β-Zelle des Pankreas regulieren SUR1/Kir6.2-K_{ATP}-Kanäle die Insulin-Sekretion. Bei substimulatorischen Glucosespiegeln stabilisieren sie das Ruhemembranpotential bei ca. -70 mV (Ashcroft and Rorsman, 1989). Steigt der Glucosespiegel im Blut, wird vermehrt Glucose durch den Transporter GLUT-2 bzw. GLUT-1 (De Vos

et al., 1995) in die Zelle transportiert und verstoffwechselt, wodurch das intrazelluläre Konzentrationsverhältnis von ATP zu ADP ansteigt. Dies führt zu einem Schließen von (SUR1/Kir6.2)-K_{ATP}-Kanälen mit nachfolgender Depolarisation. Ab einem Membranpotential von ca. -50 mV öffnen sich L-Typ-Calcium-Kanäle und das einströmende Calcium löst die Exocytose von Insulin-Vesikeln aus (vgl. Abb. 1.3.2; Kwan und Gaisano, 2009).

Die Inhibition und damit das Schließen von K_{ATP} -Kanälen durch Sulfonylharnstoffe wie Glibenclamid oder Glinide wie Repaglinid bei Diabetes Mellitus Typ2 stellt die therapeutisch verbreitetste Beeinflussung von K_{ATP} -Kanälen dar. Durch die Schließung kommt es, wie für einen physiologischen ATP-Konzentrationsanstieg typisch, zu einer Depolarisation des Membranpotentials und zur Mobilisierung von Insulin-Reserven (Coghlan et al., 2001)

Blocker von K_{ATP} -Kanälen stehen jedoch auch im Verdacht, die Apoptose von β -Zellen zu fördern, wodurch letztendlich durch β -Zell-Reduktion die Insulinsekretion insgesamt abnehmen kann (Rustenbeck et al., 2004; Maedler et al., 2005; Hambrock et al., 2006, 2007; Ackermann et al., 2009).

Einen entgegengesetzten cytoprotektiven Effekt zeigen K_{ATP} -Kanalöffner, wie z.B. Diazoxid, welche den SUR1- K_{ATP} -Kanal aktivieren (Trube et al., 1986). So konnte eine Verzögerung des Untergangs von β -Zellen bei neu diagnostiziertem Diabetes mellitus Typ1 bei gleichzeitiger Gabe von Diazoxid und intensivierter Insulintherapie nachgewiesen werden (Ortqvist et al., 2004). Dar-



Abb. 1.3.2: Vereinfachtes Modell der Insulinsekretion der β -Zelle des Pankreas unter Beteiligung von (SUR1/Kir6.2)-K_{ATP}-Kanälen. Ein Anstieg des ATP/MgADP-Verhältnisses führt zu einer Inhibition von K_{ATP}-Kanälen. Durch die darauf folgende Depolarisation des Membranpotentials werden spannungsabhängige Ca²⁺-Kanäle aktiviert und Ca²⁺ strömt in die Zelle, welches die Verschmelzung von Insulinvesikeln mit der Membran triggert. (Abb. in Anlehnung an Nichols 2006)

über hinaus konnten Studien mit adipösen Ratten zeigen, dass Diazoxid oder das SUR1-selektive NNC414 zu einer Verbesserung der Glucosespiegel und zu einer Gewichtsabnahme führen (Alemzadeh et al., 1996, 2004).

Für die K_{ATP}-Kanal-Untereinheiten des pankreatischen Kanals (SUR1/Kir6.2 bzw. die Gene ABCC8 und KCNJ11) sind eine Reihe von Mutationen bekannt; während ein Verlust an Kanalaktivität zu einer Hyperinsulinämie führt, resultiert aus einer vermehrten Kanalaktivität eine Hypoinsulinämie (Übersicht: Flanagan et al., 2009). Die kongenitalen Hypoinsulinämien zeigen sich in einem neonatalem Diabetes und machen eine Behandlung mit Insulin oder Sulfonylharnstoffen notwendig. Ein Teil der congenitalen Hyperinsulinämien, sog. PHHI (*persistant hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy*), können konservativ mit dem K_{ATP}-Kanalöffner Diazoxid behandelt werden; meist ist jedoch eine Pankreatektomie erforderlich. Auch für erworbene Hyperinsulinämien, wie dem Insulinom oder PCOS (*polycystic ovary syndrom*), wird Diazoxid zur Minderung der hyperinsulinämischen Symptomatik eingesetzt (de Tullio et al., 2006).

1.3.7 Funktion des SUR2B/Kir6.1-KATP-Kanal der glatten Gefäßmuskulatur

Charakteristisch für die SUR2B-Untereinheit ist ihre Expression in glatter Muskulatur (Übersicht: Teramoto, 2006a). In Kombination mit der Kir6.1-Untereinheit bildet sie einen K_{ATP} -Kanal, der sich von anderen K_{ATP} -Kanalformen unterscheidet. So wird der SUR2B/Kir6.1-Kanal nicht durch physiologische ATP-Konzentrationen gehemmt, bleibt jedoch in Abwesenheit von NDP oder KCO geschlossen. Daher wird der Kanal gelegentlich auch als K_{NDP} -Kanal referenziert. Seine Leitfähigkeit für Kaliumionen wurde in Gegenwart von 140 mM K⁺ auf 33 pS bestimmt (Yamada et al., 1997)

Beim SUR2B/Kir6.1-Kanal handelt es sich neben dem SUR1/Kir6.2-Kanal um die zweite in dieser Arbeit untersuchte K_{ATP}-Kanalform. Da er im gesamten arteriellen Gefäßsystem die dominierende K_{ATP}-Kanalform der glatten Muskulatur bildet (Ploug et al., 2010) stellt er eine Zielstruktur in der Therapie der arteriellen Hypertension dar. Diese Kanalform wird durch K_{ATP}-Kanalöffner (KCO) wie Pinacidil, Cromakalim oder Diazoxid aktiviert, welche durch Hyperpolarisation den Gefäßtonus vermindern und ihre bekannte vasodilatierende blutdrucksenkende Eigenschaft vermitteln (Jahangir et al., 2001). Die Bedeutung dieses Mechanismus wurde durch Knock-out-Mäusen mit fehlender Expression von funktionsfähigen Kir6.1- oder SUR2-Proteinen demonstriert: Diesen Mäuse fehlt dieser vasodilatierende Effekt, dienen als Modell für einen Vasospasmus der Koronararterien (Prinzmetal-Angina), zeigen spontane Angina pectoris-Anfälle und sterben häufig an plötzlichen Herztod (Seino and Miki, 2003). Obwohl der K_{ATP} -Kanalöffner Cromakalim die Phase III der Klinischen Untersuchungen erfolgreich durchlief, besitzen KCO keine klaren Vorteile gegenüber anderen Hypertensiva (Coghlan et al., 2001). Gleichzeitig zeichnen sich KCO aufgrund des ubiquitären Vorkommens von K_{ATP} -Kanäle im menschlichen Körper durch ein ausgeprägtes Nebenwirkungsprofil aus. Bekannte Nebenwirkungen von Diazoxid sind unter anderem Ödeme, Reflextachykardie, Kopfschmerzen oder Hypoinsulinämien; daher wurde die Entwicklung von K_{ATP} -Kanalöffnern mit höherer Selektivität angestrebt (Jahangir et al., 2001).

 K_{ATP} -Kanal-Blocker wie Glibenclamid führen zu einer Depolarisation des Membranpotentials und damit zu einem Anstieg des peripheren Gefäßwiderstandes infolge einer Reduktion des arteriellen Durchmessers (Quayle et al., 1997). Im Zusammenhang mit der Regulation des Gefäßtonus bleibt erwähnenswert, dass auch Neurotransmitter wie Noradrenalin oder Serotonin, sowie einige Vasokonstriktoren wie Angiotensin II oder Endothelin 1 eine blockierende Wirkung auf K_{ATP}-Kanäle besitzen sollen. Auch für Adenosin oder CGRP (calcitonin gene-related peptide) wurden aktivierende Effekte auf K_{ATP}-Kanäle nachgewiesen (Quayle et al., 1997).

1.4 K_{ATP}-Kanal-Blocker

1.4.1 Wirkmechanismus und klinische Relevanz

 K_{ATP} -Kanal-Blocker führen zu einer verminderten Öffnungswahrscheinlichkeit des K_{ATP} -Kanals, einer Reduktion der Leitfähigkeit für Kaliumionen und dadurch zu einer Depolarisation der Zelle. In der Beta-Zelle des Pankreas führt dies analog zu einem Anstieg des ATP/ADP-Verhältnisses zu einer Aktivierung von spannungsabhängigen Ca²⁺-Kanälen und einer vermehrten Insulinsekretion (vgl. Abb. 1.3.2). Die Behandlung von Diabetes mellitus Typ 2 durch Mobilisation von Insulinreserven stellt das hauptsächliche klinische Anwendungsgebiet der K_{ATP}-Kanal-Blocker dar (Rendell, 2004). Mögliche weitere Anwendungszwecke der K_{ATP}-Kanal-Blocker sind beispielsweise die Therapie einer Hypotension durch Endotoxine – z. B. im Rahmen eines septischen Schocks (Landry and Oliver, 1992) – oder der Einsatz als Antiarrhythmika (Billman, 2008).

1.4.2 Substanzgruppen

1.4.2.1 Sulfonylharnstoffe

Die bekannteste und therapeutisch bedeutsamste Gruppe der K_{ATP}-Kanal-Blocker stellen die Sulfonylharnstoffe dar. Ein klassischer Vertreter dieser Gruppe ist Glibenclamid (vgl. Abb. 1.4.1).



Glibenclamid **Abb. 1.4.1:** Strukturformel des Sulfonylharnstoffs Glibenclamid

Sulfonylharnstoffe sind namensgebend für die Sulfonylharnstoffrezeptor-Untereinheit und binden, mit einer Selektivität zugunsten der SUR1-Untereinheit (Geisen et al., 1985; Sturgess et al., 1985).

1.4.2.2 Cyanoguanidine

Aus der Gruppe der Cyanoguanidine, welche auch potente K_{ATP}-Kanalöffner wie Pinacidil oder P 1075 umfasst, stammen K_{ATP}-Kanalblocker wie PNU-96293(R), PNU-99963 oder das Guanidin-Derivat PNU-37883A (Abb. 1.4.2; Khan et al., 1997).



Abb. 1.4.2: Strukturformeln der Cyanoguanidin-Derivate PNU-96283 (R) und PNU-99963 sowie des Guanidin-Derivats PNU-37883A

Während PNU-99963 die SUR1-, SUR2A- als auch SUR2B-K_{ATP}-Kanäle in gleichem Maße blockiert, wurde für PNU-37883A eine Selektivität zu Gunsten des K_{ATP}-Kanals der glatten Gefäßmuskulatur (SUR2B/Kir6.1) nachgewiesen (Cui et al., 2003; Teramoto, 2006b). Während das R-Enantiomer PNU-96293 eine blockierende Eigenschaft am SUR2B/Kir6.2-Kanal besitzt, wirkt das entsprechende S-Enantiomer schwach agonistisch (Lange et al., 2002).

1.4.2.3 Pyrido- und Thieno-Thiadiazine

Auch unter den Pyrido- und Thieno-Thiadiazinen wurden Derivate mit K_{ATP} -Kanal blockierenden Eigenschaften gefunden. Sie werden im Kontext der Diazoxid-Derivate in Kap. 1.5.3.2 und Kap. 1.5.3.3 näher beschrieben.

1.5 Agonisten des K_{ATP}-Kanals

K_{ATP}-Kanalöffner (KCO) stellen eine heterogene Substanzgruppe dar, welche den K_{ATP}-Kanal im Sinne einer erhöhten Öffnungswahrscheinlichkeit aktivieren und damit eine Hyperpolarisation des Membranpotentials bewirken. Sie lassen sich in die Gruppen Benzopyrane (Cromakalim, Levcromakalim, Bimakalim), Cyanoguanidine (Pinacidil, P 1075), Thioformamide (Aprikalim), Nicotinamides (Nicorandil), Pyrimidinsulfate (Minoxidilsulfat), Dihydropyridine (ZM-244085), Thieno-Thiadiazine (NNC414) sowie Benzothiadiazine (Diazoxid und Derivate) unterteilen (vgl. Abb. 1.5.1 bis 1.5.4; Jahangir et al., 2001).

1.5.1 Therapeutisches Potential für KATP-Kanalöffner

Aufgrund der Exprimierung von K_{ATP} -Kanälen in einer Vielzahl von unterschiedlichen Geweben, besitzen K_{ATP} -Kanalöffner zahlreiche Einsatzmöglichkeiten – jedoch auch zahlreiche unerwünschte Nebenwirkungen. Ziel der Entwicklung weiterer KCO ist daher eine hohe Selektivität für das entsprechende Zielgewebe, bei gleichzeitig minimiertem Nebenwirkungsprofil. Eine Übersicht über potentielle therapeutische Einsatzgebiete von KCO findet sich in Tab. 1-2.

Pankreas	Gefäßsystem	Herz	Gehirn
• Angeborene	• Hypertension	• Kardioprotektion	 Neuroprotektion
Hyperinsulinämie	• Koronarspasmen	• Angina pectoris	• Epilepsie
• Angeborene	• Periphere arterielle	• Arrhythmien	Analgesie
Hypoglykämie	Verschlusskrankheit		
Insulinom	(pAVK)		
• Diabetes	• zerebrale Vasospasmen		
	• Impotenz		
Haarfollikel	Blasenmuskulatur	Lunge	
• Haarausfall	Reizblase	• Asthma	

Tab. 1-2: Potentielle Einsatzgebiete von KATP-Kanal-Agonisten sortiert nach Organsystem

(modifiziert nach Jahangir et al., 2001)

1.5.2 Non-Diazoxid-KATP-Kanalöffner

 K_{ATP} -Kanalöffner (KCO) zeichnen sich in charakteristischer Weise durch eine hohe Selektivität zugunsten des SUR2 aus (Ausnahme: Diazoxid und Derivate) und werden aufgrund ihrer vasodilatierenden Eigenschaft (durch Agonismus an SUR2B) auch als vaskuläre K_{ATP} -Kanalöffner bezeichnet. Ursprünglich für die Therapie der Hypertonie entwickelt, wird die erste Generation von KCO wie Pinacidil oder Cromakalim, nur selten eingesetzt. Im Vergleich mit anderen Antihypertensiva bieten sie keine Vorteile und zeigen aufgrund des ubiquitären Vorkommens von SUR2 und der unselektiven Wirkung an SUR2A und SUR2B mehr Nebenwirkungen.

Chemisch entstammen K_{ATP}-Kanalöffner (KCO) verschiedenen Substanzgruppen von denen einige nachfolgend näher beschrieben werden.

1.5.2.1 Cyanoguanidine

Der Prototyp der Cyanoguanidine ist Pinacidil (Abb. 1.5.1). Sein Derivat P 1075 zeichnet sich durch eine gesteigerte Affinität an SUR2B aus und wird in Form von [³H]-P 1075 als Radioligand eingesetzt (Bray and Quast, 1992; Quast et al., 1993).



Abb. 1.5.1: Strukturformeln der Cyanoguanidine Pinacidil und P 1075

1.5.2.2 Benzopyrane

Klassischer Vertreter der Gruppe der Benzopyrane (Abb. 1.5.2) ist Cromakalim bzw. seine aktive Form Levcromakalim. Heute sind Derivate mit höherer Affinität an SUR2 bekannt. Die Benzopyran-Derivate Bimakalim und KC399 besitzen variierte Substituenten in den chemisch zugänglichen Positionen 3', 4' und 6'. Das hochaffine KC399, erreicht mit einer Thioamid-Gruppe in Position 4', pK_D-Werte im nanomolaren Bereich.



Abb. 1.5.2: Strukturformeln der Benzopyrane (-)-Cromakalim, Bimakalim und KC399

1.5.2.3 Weitere vaskuläre KATP-Kanalöffner

Ausgehend von den hochaffinen KCO des Benzopyrantyps stellten Cecchetti et al. (2003) Substanzen mit einem Benzothiazin-Molekül als Grundgerüst vor. Im Vergleich mit dem Benzopyran



Abb. 1.5.3: Strukturformeln der beiden Benzothiazine 3c und 5c aus Cecchetti et al. (2003)

stellt das Benzothiazin durch das Ersetzen des Sauerstoff- durch ein Schwefelatom eine Aufweitung des Pyranringes dar. In Kombination mit einer 4'-Cyclopentenon-Substitution erreichten Benzothiazin-Derivate (Abb. 1.5.3) sogar eine 10.000-fach höhere vasorelaxierende Wirkung als Levcromakalim selbst. Diese Ergebnisse konnten nicht widerspruchsfrei von Carosati et al. (2005) reproduziert werden: so wurden für diese Substanzen um ca. Faktor tausend geringere pK_{D} - und pEC_{50} -Werte bestimmt. Es bleibt zweifelhaft, ob der vasorelaxierende Effekt allein durch die Bindung an der SUR-Untereinheit zu erklären ist.

Neben den bereits genannten KCO existieren zahlreiche weitere KCO, welche in dieser Arbeit nicht eingesetzt werden (Abb. 1.5.4). Sie unterstreichen jedoch die Diversität der KCO. So ist für das Nicotinamid Nicorandil bekannt, dass es seine vasorelaxierende Wirkung an Koronararterien sowohl durch Aktivierung des SUR2B-K_{ATP}-Kanäle -Kanals als auch in der Funktion eines Stick-stoffmonoxid-Donor vermittelt (Cogolludo et al., 1999). Iptakalim unterscheidet sich durch seine



Abb. 1.5.4: Strukturformeln diverser KATP-Kanalöffner

einfache chemische Struktur von anderen KCO. Es wurde als SUR2B-selektiver KCO charakterisiert und besitzt eine geringe antagonistische Wirkung am SUR1/Kir6.2-K_{ATP}-Kanal (Wang et al., 2005; Misaki et al., 2007; Pan et al., 2010).

Minoxidilsulfat gilt ebenfalls als vaskulärer K_{ATP}-Kanalöffner, wird jedoch klinisch vor allem zur Stabilisierung androgener Alopezie eingesetzt (Jahangir and Terzic, 2005). Das Thioformamid Aprikalim ist neben dem Benzopyran KC399 ein weiteres Beispiel für einen potenten KCO mit einer Thioamid-Gruppe.

1.5.3 Diazoxid und seine Derivate

1.5.3.1 Funktionelle Sonderstellung des Diazoxids unter den KATP-Kanalöffnern

Diazoxid (Abb. 1.5.5, 7-chloro-3-methyl-4H-1,2,4-benzothiadiazine-1,1-dioxide) nimmt von allen Kaliumkanalöffnern eine Sonderstellung ein. Im Unterschied zu anderen KCO aktiviert es unselektiv neben SUR2 auch den für die β-Zelle des Pankreas typischen SUR1. Larsson et al. (1993) beschrieben für die β-Zelle des Pankreas (SUR1) die Abhängigkeit der Diazoxid-Wirkung von der Anwesenheit von MgADP. Sie schlugen vor, dass die aktivierende Wirkung von MgADP und Diazoxid auf dem gleichen Wirkmechanismus basiert und Diazoxid eine Amplifikation des MgADP-Effekts bewirkt. Diese Hypothese wird durch Mutationen im NBF2 unterstützt, welche jeweils im gleichen Maße die Wirkung von MgADP und Diazoxid aus SUR1 nahelegen (Shyng et al., 1997; Masia and Nichols, 2008). Während Mutationen im NBF2 zu einem Wirkverlust oder einer starken Wirkabschwächung sowohl von MgADP als auch Diazoxid führen, modulieren Mutationen im NBF1 des SUR1 die Diazoxid-Wirkung und MgADP-Wirkung teils im Sinne einer Verstärkung teils einer Abschwächung (Shyng et al., 1997).

Neben der Aktivierung des SUR1 findet sich eine weitere Besonderheit des Diazoxids in der Aktivierung des SUR2A: während SUR2A durch klassische KCO wie z.B. Pinacidil aktiviert wird (Isomoto et al., 1996), ist dies für Diazoxid erst in Gegenwart von sehr hohen MgADP-Konzentrationen möglich (D'hahan et al., 1999b); die Aktivierung des SUR2B erfordert dagegen keine hohe MgADP-Konzentration. Dabei unterscheiden sich die beiden Spleißvarianten SUR2A und SUR2B nur in den letzten 42 C-terminalen Aminosäuren (Isomoto et al., 1996). Dieser C-terminale Unterschied soll sich in unterschiedlichen Eigenschaften der Nukleotidbindung im NBF2 ausdrücken, welchem eine Schlüsselrolle in der Wirkung der Kaliumkanalöffner zukommt (Bienengraeber et al., 2000; Matsuo et al., 2000; Matsuoka et al., 2000; Zingman et al., 2001). Einleitung

Therapeutisch wird Diazoxid als einziger zugelassener KCO auch in der Behandlung der Hyperinsulinämie eingesetzt, da es auch den SUR1-K_{ATP}-Kanal aktiviert. Aufgrund seiner unselektiven Äquipotenz an SUR1 und SUR2 geht eine Behandlung mit Diazoxid jedoch mit zahlreichen unerwünschten Nebenwirkungen wie Ödemen, Kopfschmerzen, Hypotonie und Hypertrichose einher (Jahangir et al., 2001). Daher begann auf Grundlage des Diazoxid-Moleküls die Suche nach Derivaten mit einer höheren Affinität und Selektivität zugunsten des SUR1-K_{ATP}-Kanals.

1.5.3.2 Benzo- und Pyrido-Thiadiazine

Die Arbeitsgruppe um Bernard Pirotte synthetisierte zunächst Pyrido-Thiadiazine mit einer 3'-Alkylamino-Seitenkette. Das 3'-Alkylamino-Derivat BPDZ 44 (Abb. 1.5.5) stellte sich dabei mit 1.65 Log-Einheiten als besonders SUR1-selektiv heraus (Pirotte et al., 1993, 1994). Umgekehrt zeigt BPDZ 79 mit einer anderen Position des Stickstoffatoms im Pyridoring und einem quartären statt tertiärem β -C-Atom im 3'-Substituenten eine funktionelle Selektivität zu Gunsten des SUR2B: es wirkt antagonistisch am (SUR1/Kir6.2)-K_{ATP}-Kanal, während es an Zellen einer Rattenaorta (SUR2B/Kir6.1) agonistische Effekte zeigt (Schönlau, 2005).

Unter den Benzothiadiazinen sind bisher keine Antagonisten am K_{ATP}-Kanal bekannt. Erwähnenswert sind jedoch SUR1-selektive Benzothiadiazin-K_{ATP}-Kanalöffner wie beispielsweise das 3'-Isopropylamino-Diazoxid-Derivat BPDZ 73 (Abb. 1.5.5; Lebrun et al., 2000).

1.5.3.3 Thieno-Thiadiazine

Auf diesen Ergebnissen aufbauend entwickelte die Arbeitsgruppe um Bodo Hansen mehrere 6chloro-3-alkylamino-Thieno-Thiadiazin-Derivate mit SUR1-selektiver Wirkung (Nielsen et al., 2002). So zeigte beispielsweise das Derivat NNC414 (Abb. 1.5.5) an SUR1/Kir6.2 eine agonistische relativen Wirkstärke von ca. 0.5 μ M und einen vermeintlichem Wirkverlust an SUR2B. Während NNC414 und ähnliche Substanzen die Studienphasen I und II erfolgreich durchliefen, wurde die Markteinführung durch die hepatotoxische Wirkung der Substanz letztendlich verhindert.

Unabhängig davon wurde entdeckt, dass es sich bei den vermeintlichen Wirkversagern am SUR2B-Kanal um K_{ATP}-Kanalblocker handelt. Eine systematische Untersuchung im eigenen Institut (Dissertation Teschner 2011) erbrachte für die 3'-Cyclobutyl-, Cyclopentyl- und Cyclohexylamino-Derivate mit einem tertiärem α -C-Atom, wie z.B. NNC 55,0047 (Abb. 2.4.2), eine antagonistische Wirkung an nativen Zellen der Rattenaorta (SUR2B/Kir6.1). Mit einer zusätzlichen Methylgruppe am α -C-Atom, wie z. B. des Derivats NNC 55,0467 (Abb. 2.4.2), zeigen diese Substanzen agonistische Effekte an Zellen der Rattenaorta (Lemoine et al., 2007, 2009)



Abb. 1.5.5: Darstellung ausgewählter Thiadiazine

1.5.3.4 Modell für SUR1- oder SUR2B-selektive KCO

Zusammenfassend gilt als Rezept für eine SUR1-selektive Substanz ein kurzer, verzweigtkettiger oder kleiner cyclischer 3'-Alkylamino-Substituent am Diazoxid-Molekül in Kombination mit einer kleinen elektronegativen Gruppe (z.B. einem Halogen) am assoziierten aromatischen Ring (in Position 6' der Thieno-Thiadiazine bzw. Position 7' der Benzo-Thiadiazine). Für den SUR2B-K_{ATP}-Kanaltyp sei in Position 3' ein kleiner verzweigtkettiger Alkylrest vorteilhaft, während kleine cyclische Reste zu einem Affinitätsverlust führen; in Position 7' wirken sich elektronegative oder große lipophile Reste positiv hinsichtlich der Affinität am SUR2B aus (Pirotte et al., 2005; de Tullio et al., 2006).

1.6 Bindungsstellen am SUR

1.6.1 Allosterie zwischen der Bindungsstelle für Sulfonylharnstoffe und dem Kaliumkanalöffner P1075

Im Hetero-Oktamer des K_{ATP}-Kanals stellen die vier Sulfonylharnstoffrezeptoren (SUR), welche die vier porenbildenen Kir6.x-Proteine regulieren, das pharmakologische Ziel verschiedener Substanzen dar. Ursprünglich wurde der SUR nur als Rezeptor für die namensgebenden Sulfonylharnstoffe (SU) angesehen (Sturgess et al., 1985). Erst später wurde gezeigt, dass auch die Kaliumkanalöffner wie z. B. das Cyanoguanidin P1075 an einer anderen Bindungsstelle des SUR binden (Bray and Quast, 1992). Eine negative allosterische Wirkung der SU-Bindungsstelle auf die KCO-Bindungsstelle konnte mittels einer Beschleunigung der Dissoziationskinetik von [³H]-P 1075 durch Glibenclamid für den SUR2A- (Dickinson et al., 1997) sowie den SUR2B- (Bray and Quast, 1992; Hambrock et al., 1998) K_{ATP}-Kanaltyp nachgewiesen werden. Umgekehrt wird auch eine negative allosterische Wirkung der Klassischen KCO-Bindungsstelle auf die SU-Bindungsstelle angenommen; so mindert Pinacidil (ebenfalls aus der Gruppe der Cyanoguanidine) in Gegenwart von MgATP an SUR1 die Anzahl der Bindungsstellen für Glibenclamid, jedoch ohne dabei die Affinität des Glibenclamids zu verändern (Schwanstecher et al., 1992). Da Glibenclamid und Pinacidil nicht kompetitiv an unterschiedlichen Stellen des SUR binden, lässt dies auf eine negative allosterische Äffinität der Sulfonylharnstoff-Bindungsstelle schließen.

1.6.2 Lokalisation der Bindungsstellen synthetischer Liganden am SUR

1.6.2.1 Lokalisation der Bindungsstellen von Diazoxid und Non-Diazoxid-KCO am SUR

Die folgenden Ausführungen über die Position der einzelnen mutmaßlichen Bindungsstellen am SUR lassen sich anhand Abb. 1.6.1 nachvollziehen. In molekularbiologischen Versuchen tauschten Uhde et al. (1999) einzelne Domänen von SUR1 und SUR2B gegeneinander aus. Sie postulierten durch den Wirk- und Affinitätsverlust der für SUR2B selektiven KCO P1075, Pinacidil und Levcromakalim an bestimmten Chimären zwei kritische Regionen für die klassischen Kaliumkanalöffner namens KCOI (Thr1059-Leu1087, SUR2B) und KCOII (Arg 1218-Asn1320, SUR2B). KCO I befindet sich dabei in einer cytoplasmatischen Schleife zwischen den Helices 13 und 14, während sich KCO II über die Helices 16 und 17 und einen Teil des NBF2 erstreckt. Uhde et al. (1999) übertrugen ihre Ergebnisse generell auf Kaliumkanalöffner, dabei hebt sich das Benzothiadiazin Diazoxid von den klassischen Kaliumkanalöffnern (z. B. aus den Gruppen der Benzopyrane oder Cyanoguanidine) funktionell deutlich ab (vgl. Kap. 1.5.3.1).



Abb. 1.6.1: Aufbau eines SURx; für den Wirkmechanismus relevante Regionen der Sulfonylharnstoffe (magenta), klassischen KCO (gelb) und Diazoxid (und Derivate) (blau) sind farbig hinterlegt. Mit einem schwarzen Balken (Helix 17) ist die Lokalisation der Aminosäuren M1290 (Sur1) bzw. T1253 (SUR2) markiert, welche für die Wirkung klassischer KCO von Bedeutung sind. Die Aminosäure S1237 ist für die Wirkung von Sulfonylharnstoffen von besonderer Bedeutung (magenta Punkt zwischen Helix 15 und 16).

Die niedrige Wirkstärke von Diazoxid an SUR2A in Abwesenheit hoher MgADP-Konzentrationen im Vergleich zu SUR2B oder SUR1 (vgl. Kap. 1.5.3.1) konnte in molekularbiologischen Experimenten an Chimären aus SUR1 und SUR2A dazu beitragen, relevante Regionen für die Diazoxidwirkung näher einzugegrenzen. D'hahan et al. (1999a) konnten an SUR1~SUR2A-Chimären mittels Patch-Clamp-Technik die TMD2 (Helices 12-17) des SUR2A als kritische Region für die Wirkung des Cromakalim-Analogons SR47063 abgrenzen; für Diazoxid dagegen konnte nur gezeigt werden, dass seine Wirkung weder von dem Austausch von TMD2 noch von NBF2 abhing und Diazoxid vermutlich einen anderen Wirkmechanismus als die klassischen KCO besitzt.

Babenko et al. (2000) teilten den SUR1 und SUR2A etwas feiner in sieben Regionen (N-terminales Ende, TMD0, TMD1, NBD1, TMD2, NBD2 und C-terminales Ende) ein und erzeugten durch Austausch der Regionen zahlreiche SUR1~SUR2A-Chimäre, welche mit Patch-Clamp-Technik untersucht wurden. Die Ergebnisse bestätigten, dass TMD2 die entscheidende Region für die Wirkung (SUR2A) bzw. fehlende Wirkung (SUR1) von klassischen KCO wie Cromakalim oder Pinacidil darstellt. Für Diazoxid wurde ein solcher Zusammenhang zwischen Wirkung und TMD2 nicht gefunden. Vielmehr konnte gezeigt werden, dass NBF1 sowie die Helices 6-11 (TMD1) des SUR1 die entscheidenden Regionen für eine Diazoxid-Wirkung darstellen. Jedoch bleiben diese funktionellen Ergebnisse in Hinblick auf die eindeutige Identifikation einer Bindungsstelle schwierig zu

Einleitung

bewerten, da durch Austausch nur einer dieser beiden Domänen an SUR1 gegen das SUR2A-Äquivalent kein vollständiger Verlust der Diazoxid-Wirkung gemessen wurde.

Dabrowski et al. (2002) grenzte diese Angaben für das Diazoxid-Derivat NNC 55-09216 (Abb. 1.2.1) mittels Versuchen an SUR1/SUR2A-Chimären auf die letzten vier Helices 8-11 von

TMD1 des SUR1 ein. Dabei unterscheidet NNC 55-09216 sich jedoch in einigen Punkten funktionell von Diazoxid. Im Gegensatz zu Diazoxid benötigt das SUR1-selektive NNC 55-09621 zum einen MgATP (und nicht MgADP) um an SUR2A zu wirken. Zum anderen führt der Austausch des NBF2 aus SUR1 gegen den von SUR2A zu einem Wirkverlust von NNC 55-09621, wohingegen die Wirkung für Dia-



Strukturformel von NNC 55-09216

zoxid erhalten bleibt. Der Grund für diese funktionelle Divergenz könnte in der Guanidin-Struktur des 3'-Alkylamino-Diazoxid-Derivates liegen, welches sich sterisch und in der Ladungsverteilung vom einfachen Diazoxid unterscheidet (de Tullio et al., 2006). Zum einen schränkt dieser funktionelle Unterschied die Übertragbarkeit der Ergebnisse des Diazoxid-Derivats auf Diazoxid selbst ein. Zum anderen besitzen beide eine sehr ähnliche Grundstruktur und die identifizierte Region für Diazoxid durch Babenko et al. (2000) und NNC 55-09621 decken sich TMD1 (Helices 8-11, SUR1).

Zusammenfassend kann aus den vorliegenden Studien an Chimären hinsichtlich der Diazoxid-Bindungsstelle gefolgert werden, dass die Helices 8-11 möglicherweise einen Teil der Diazoxid-Bindungsstelle darstellen. Dabei müssen die Ergebnisse der Studien an Chimären in mehrfacher Hinsicht kritisch bewertet werden (Übersicht: Moreau et al., 2005): Zum einen können Studien an artifiziellen SUR1~SUR2A-Chimären nicht zweifelsfrei auf physiologische K_{ATP}-Kanäle übertragen werden. Zum anderen wird in der Literatur die Schwierigkeit der funktionellen Messung des K_{ATP}-Kanals verwiesen. Da dieser durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst wird (vgl. Kap. 1.3) weisen Patch-Clamp-Messungen, welche an Zellmembranen (z.B. inside-out-Konfiguration) durchgeführt werden, eine hohe Variabilität auf (Moreau et al., 2005b; Teramoto et al., 2006). Zusätzlich bemerkte bereits Matsuoka et al. (2000) kritisch, dass von MgADP abhängige Effekte der Diazoxid-Wirkung, wie sie z. B. von Shyng et al. (1997) am NBF2 gezeigt wurden, durch den MgADP-freien Versuchsaufbau von Babenko et al. (2000) nicht erfasst werden. Zugleich wird in Abwesenheit von MgADP die vermutete positive allosterische Wechselwirkung zwischen beiden NBF (Matsuo et al., 2002) nicht berücksichtigt. Eine zusätzliche Beteiligung des NBF2 an der Diazoxid-Wirkung ist durch diese SUR1~SUR2A-Chimären-Versuche somit nicht ausgeschlossen.

Bis auf Uhde et al. (1999) basierten alle an SUR1~SUR2A-Chimären durchgeführten Versuche auf rein funktionellen Untersuchungen. Damit bleibt offen, ob an den für die Diazoxidwirkung

kritischen Regionen tatsächlich Diazoxid bindet oder sie nur eine Bedeutung für den Transduktionsweg von Diazoxid besitzen.

Während die Aussagen über eine Diazoxid-Bindungsstelle dürftig sind, konnten für die Non-Diazoxid-KCO bereits einzelne Aminosäuren für deren Wirkung gefunden werden. So identifizierte Moreau et al. (2000) die beiden Aminosäuren T1253 und L1249 in Helix 17 der TMD II des SUR2A, welchen eine Schlüsselrolle in der Aktivierung des SUR2A durch klassische KCO zukommt. Eine Übertragung dieser beiden Aminosäuren von SUR2A an die entsprechenden Stellen des SUR1-Molekül, führt am SUR1 zu einer deutlich höheren Wirkung der klassischen KCO; dagegen hat diese Mutation auf die Diazoxid-Wirkung nur einen geringen Einfluss (Moreau et al., 2000; Hambrock et al., 2004).

Aufgrund seiner Größe konnte bis heute kein SUR-Molekül mit gebundenen Liganden in seiner Struktur analysiert werden. Es existieren jedoch auf Grundlage von Daten bakterieller Proteine Modelle für den SUR in seiner dreidimensionalen Struktur, welche Rückschlüsse über mögliche Bindungsstellen und Funktionen des SUR zulassen. Dabei sollen die Transmembrandomänen TMD1 und TMD2 analog zu anderen ABCC-Transporterproteinen eine Bindungstasche formen in der die beiden bereits genannten Aminosäuren T1253 und L1249 (TM 17 in TMD2) liegen und einen Bestandteil der Bindungsstelle für die klassischen KCO darstellen (Bryan et al., 2004; Babenko, 2005; Moreau et al., 2005b). Die Aminosäure T1253 (SUR2A) soll einen von der Größe der Seitenkette des Liganden abhängigen Schalter darstellen, während die benachbarten aromatischen Aminosäuren ein hydrophobes Umfeld schaffen; die an SUR1 entsprechende Aminosäure Met1290 verhindert eine Bindung an SUR1 (Moreau et al., 2005a). Diese Aminosäuren besitzen keinen Einfluss auf die Wirkung von Diazoxid.

1.6.2.2 Lokalisation der Bindungsstellen der Sulfonylharnstoffe am SUR

Für Sulfonylharnstoffe wurde das Konzept von zwei Bindungsstellen, *A-Site* und *B-Site*, entwickelt (Vila-Carriles et al., 2007; Winkler et al., 2007). Die *A-Site* entspricht dabei der Bindungsstelle für Tolbutamid auf TMD2 (Babenko et al., 1999), deren kritische Bindungsstelle zwischen Helix 15 und 16 vermutet wird; nach einer Mutation der Aminosäure S1237 (SUR1) zwischen Helix 15 und 16, erlischt deren Funktion (Ashfield et al., 1999). Die B-Site wird in einem Anteil des Linkers L0 sowie dem N-terminalen Ende des Kir6.x selbst vermutet und ist für SUR1 und SUR2 unselektiv (Vila-Carriles et al., 2007).

1.7 Ziele der vorliegenden Arbeit

- I. Charakterisierung neuartiger, in Kooperation mit dem Institut f
 ür Organische Chemie und Makromolekulare Chemie I der Heinrich-Heine-Universit
 ät D
 üsseldorf (AG Prof. Braun) entwickelter *Benzothiadiazin-Derivate* als K_{ATP}-Kanal
 öffner
 - hinsichtlich ihrer Affinität an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen mittels [³H]-P 1075-Kompetitionsbindung
 - hinsichtlich ihrer funktionellen Wirkung und Selektivität an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen und CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen mittels neuer Fluoreszenztechniken
 - Untersuchung einer potentiellen Allosterie zwischen den neuen Diazoxid-Derivaten und vaskulärer KCO an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen mittels [³H]-P 1075- Dissoziationsbindung um folgende Fragestellungen zu beantworten:
 - a) Bindet Diazoxid tatsächlich an einer Bindungsstelle, welche sich von den Bindungsstellen klassischer, vaskulärer KCO unterscheidet?
 - b) Binden die neu entwickelten Diazoxid-Derivate auch an diese Diazoxid-Bindungsstelle?
 - c) Existiert eine allosterische Wechselwirkung zwischen der Diazoxid-Bindungsstelle und der Bindungsstelle herkömmlicher, vaskulärer KCO und lässt sich diese quantifizieren?
 - 4. Welchen Einfluss besitzt die Größe des 3'-Alkyl-Substituenten von Benzothiadiazin-Derivate hinsichtlich Affinität, relativer Wirkstärke und Selektivität am SUR1- bzw. SUR2B-K_{ATP}-Kanal ?
 - 5. Besitzen Benzothiadiazin-Derivate mit einer 3'-Cyclobutyl-, cyclopentyl- oder cyclohexyl-Substitution analog zu strukturähnlichen 3'-Cycloalkylamino-Thieno-Thiadiazinen eine SUR2B-K_{ATP}-Kanal blockierende Eigenschaft ?
- II. Charakterisierung neuartiger, in Kooperation mit dem Institut f
 ür Organische Chemie und Makromolekulare Chemie I der Heinrich-Heine-Universit
 ät D
 üsseldorf (AG Prof. Braun) entwickelter Benzofuran-, Benzothiophen-, Benzothiazol-Derivate als K_{ATP}-Kanalliganden
 - hinsichtlich ihrer Affinität an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen mittels [³H]-P 1075-Kompetitionsbindung.
 - hinsichtlich ihrer funktionellen Wirkung und Selektivität an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen und CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen mittels neuer Fluoreszenztechniken.
2 Methoden und Material

2.1 CHO-(SUR1/Kir6.2)- und CHO-Wildtyp-Zellkultur

2.1.1 Herkunft

Die für die vorliegende Arbeit verwendeten CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen (CHO = <u>Chinese Hamster Ovary</u>) stellen ein stabil transfiziertes, artifizielles Zellsystem dar, welches die für das menschliche Pankreas typische Isoform SUR1/Kir6.2 des K_{ATP} -Kanals exprimiert. Sie wurden freundlicher Weise zusammen mit der entsprechenden CHO-Wildtypzelllinie durch die Firma Bayer AG zur Verfügung gestellt.

2.1.2 Kultivierung

Die CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen wuchsen adhärent mit einer Zelldichte von 6 bis 10 Millionen Zellen auf einer Zellkulturschale (*Greiner Bio-One*) mit einem Durchmesser von 100 mm. Mit 10 ml Kulturmedium und unter den Bedingungen von 37° C, 100% Luftfeuchtigkeit und einer auf 7 % CO₂ ergänzten Luftatmosphäre in einem Brutschrank erreichten die Zellen nach ca. 2 Tagen eine einschichtige Konfluenz.

Als Kulturmedium wurde α -Minimal-Essential-Medium (α -MEM, GIBCO Nr. 22571-038) ergänzt um 10 % fetales Kälberserum (*FKS*), 2 mM L-Glutamin sowie 0.3 mg/ml G418 (*Geneticin, Invitrogen*) als Selektionsfaktor verwendet. Die Kultivierung der CHO-Wildtypzellen erfolgte analog, jedoch ohne G418.

2.1.3 Passagierung

Im 48 Stunden-Rhythmus nach Erreichen von Konfluenz wurden jeweils zwei Millionen Zellen der Mutter-Zellkultur in eine Tochterschale unter einer Cleanbench mit keimfreien Material und Instrumentarium passagiert. Hierzu wurde der Überstand des Kulturmediums abgesaugt, die Zellen anschließend mit 10 ml proteinfreiem PBS-Puffer zweifach gespült und für ca. 2 min bei Raumtemperatur mit 1 ml ¹/₄ Trypsinlösung (*EDTA 0.01 %, Trypsin 0,025 %*) versetzt, bis mikroskopisch eine Auflösung der Zellverbände sichtbar wurde. Diese Lösung wurde durch 10 ml α -MEM ersetzt womit die Zellen abgelöst, resuspendiert und im Verhältnis 1:5 (2 ml auf 10ml; entspricht ca. 1.2 bis 2 Millionen Zellen) in eine neue Zellkulturschale mit 8 ml α -MEM überführt wurden. Die geringe verbleibende Trypsinaktivität verbrauchte sich am Proteinbestandteil des Kulturmediums.

2.1.4 Vorbereitung von Experimenten

Für Experimente mit Fluoreszenzmarkern wurden die Zellen in 12-well-strips (Greiner, TC) im 96-well-Format mit einer Zelldichte von 60.000 je well ausgesiedelt und im Brutschrank ca. 36 bis 48 h bis zur Konfluenz kultiviert. Zellzahlen wurden erhoben, indem 50 µl einer homogenen Zellsuspension im Verhältnis 1:1 mit Trypan-Blau als Vitalitätsindikator versehen und anschließend in der Neubauer-Zählkammer die Zahl der nicht angefärbten Zellen bestimmt wurde.

2.2 HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)- und HEK 293-Wildtyp-Zellkultur

2.2.1 Herkunft

Die Zelllinie HEK 293 leitet sich aus einer humanen embryonalen Nierenzellkultur ab, welche durch Transformation mit gescherter DNS aus Adenovirus Typ5 hergestellt wurde (Graham et al., 1977). Die in dieser Arbeit verwendeten HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen wurden mit der für menschliche glatte Aortenmuskelzellen typischen Isoform SUR2B/Kir6.1 des K_{ATP}-Kanals permanent transfiziert (Winkler, 2009) und freundlicher Weise durch das Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie der Universität Tübingen zusammen mit der ursprünglichen Wildtypzell-linie zur Verfügung gestellt.

2.2.2 Kultivierung und Passagierung

Die Kultivierung der HEK 293-Zellen unterscheidet sich von den in Kapitel 2.1 beschriebenen Verfahren für die CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellkultur in der Verwendung von MEM als Kulturmedium, einem Kulturrhythmus von ca. 3.5 Tagen, sowie der Ablösung der Zellen vom Kulturmaterial ohne den Einsatz von Trypsin. Die Kultivierung der transfizierten HEK293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen erfolgte zusätzliche unter Zugabe von 0,150 mg/ml Zeocin (Zeocin Selection Reagent, InvivoGen) als Selektionsfaktor.

2.2.3 Vorbereitung von Experimenten

Für Experimente wurden HEK 293-Zellen in Poly-(L)-Lysin beschichtete 12-well-strips (96well-Format), sowie (für Radioligandbindungsversuche) in 96-well-Platten mit einer Zelldichte von 50.000/well ausgesiedelt. Nach 3-4 Tagen erreichten die Zellen jeweils eine einschichtige Konfluenz.

2.3 Kompetitionsbindung an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen

2.3.1 Rezeptortheorie und mathematisches Modell

Kompetitionsbindungsstudien beruhen auf der Annahme, dass ein zu untersuchender, radioaktiv nicht markierter Ligand (A) mit dem Radioligand (L*) um eine Rezeptorbindungsstelle (R) konkurriert. Während die Rezeptormenge und die Radioligandkonzentration [L*] konstant gehalten werden, werden steigende Konzentrationen des unmarkierten Liganden [A] hinzugegeben.

Generell können für die Bildung von Ligand-Rezeptor-Komplexen nach dem Massenwirkungsgesetz Gleichgewichtskonstanten bestimmt werden. Dabei ergibt sich die Dissoziationsgleichgewichtskonstante K_D eines Liganden (A) aus seiner Dissoziationsratenkonstanten k_{off} und der allgemeinen Assoziationsratenkonstante k_{on} wie folgt:

$$K_D = \frac{k_{off}(A)}{k_{on}(A)} \tag{1}$$

In Abwesenheit eines weiteren Liganden wird die relative Rezeptorbesetzung y_A eines Liganden A in Abhängigkeit von seiner Konzentration [A] und seines K_D -Wertes wie folgt berechnet:

$$y_A = \frac{[A]}{[A] + K_D} \tag{2}$$

Mit steigender Konzentration des Liganden A ergibt sich somit eine zunehmende Rezeptorbesetzung. Nach Gl. (2) sind in einer Konzentration [A], welche dem K_D-Wert entspricht ([A] = K_D) genau die Hälfte aller Rezeptoren besetzt (y_A =0.5). Um eine Ligandkonzentration [A] in Relation zum K_D-Wert des Liganden zu setzen, wird die analytische Einheit c_A angegeben:

$$c_A = \frac{[A]}{K_D} \tag{3}$$

In Kompetitionsbindungsstudien wird vorausgesetzt, dass der Radioligand L* und der zu untersuchende unmarkierte Ligand A kompetitiv an der gleichen Bindungsstelle binden. Während die Konzentration des Radioliganden [L*] konstant bleibt, wird die Konzentration des zu untersuchenden Liganden [A] variiert. Mit steigender Konzentration [A] steigt somit die statistische Wahrscheinlichkeit des Liganden Α an einer freien Bindungsstelle binden. zu In Kompetitionsbindungsstudien wird jedoch nicht die Bindung des zu untersuchenden Liganden A gemessen, sondern die daraus resultierende verbleibende Bindung des Radioliganden L*. Dabei wird für den Radioliganden die spezifische Bindung am Rezeptor (B_s) von der unspezifischen Bindung (B_{ns}) an sonstigen Zellbestandteilen unterschieden; aufsummiert ergeben sie die totale Bindung (B_{tot}). Die spezifische Bindung (B_s) ist dabei von dem Konzentrationsverhältnis beider Liganden und ihrer Affinität zum Rezeptor abhängig. Die unspezifische Bindung wird ermittelt, indem ein nicht markierter kompetitiver Ligand in einer Konzentration [A] >> 100 * K_D beinahe alle Zielrezeptoren des Radioliganden besetzt und anschließend die dennoch gebundene Menge an Radioligand gemessen wird. Die spezifische Bindung wird durch Subtraktion der unspezifischen Bindung (B_{ns}) von der totalen Bindung (B_{tot}) ermittelt.

Die ermittelte Kompetitionsbindungskurve läßt sich durch folgende Formel beschreiben:

$$B_{S}([A]) = B_{0} - B_{0} \cdot \frac{[A]}{[A] + IC_{50}}$$
(4)

Dabei wird mit $B_s([A])$ die spezifische Bindung des Radioliganden in Gegenwart einer Ligandkonzentration [A] beschrieben. B_0 stellt die spezifische Bindung des Radioliganden am zu untersuchenden Rezeptor in Abwesenheit eines Liganden (A) dar. K_{L*} und K_D bezeichnen die Dissoziations-Gleichgewichtskonstanten des Radioliganden (L*) bzw. des zu untersuchenden Liganden (A). Mit der IC₅₀ wird die Konzentration des Liganden (A) bezeichnet, welche eine halbmaximale Inhibition des Radioliganden (in seiner eingesetzten Konzentration) erreicht.

$$IC_{50} = K_D (1 + [L^*]/K_{L^*})$$

$$\Leftrightarrow K_D = \frac{IC_{50}}{1 + [L^*]/K_{L^*}}$$
(5)

Mit Hilfe des Cheng-Prussof-Faktors $(1 + [L^*]/K_{L^*})$ in Gl. (5) (Cheng und Prusoff, 1973) lässt sich die unter Anwesenheit des Radioliganden ermittelte IC₅₀ in die Dissoziationsgleichgewichtskonstante K_D des Liganden (A) konvertieren. Aus obiger Gl. (5) ergibt sich für den Fall einer homologen Kompetitionsbindung mit der nicht radioaktiv markierten Variante des Radioliganden (self displacement: A = L*):

$$K_D = IC_{50} - [L^*] \tag{6}$$

2.3.2 Experimentelle Bedingungen für die Kompetitionsbindung

Für die Kompetitionsbindungsstudien wuchsen HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen in 96-well-Platten in ca. 2.8 Tagen bis zur einschichtigen Konfluenz. Die Versuche wurden mit dem hydrophilen Radioliganden [³H]-P1075 (N-cyano-N'[1,1-dimethyl-[2,2,3,3,³H]-N''-(3-pyridinyl) durchgeführt. Für eine Kompetitionsbindung wurde je well [³H]-P 1075 in einer Endkonzentration von 2 nM mit steigenden Konzentrationen des zu untersuchenden Liganden in einem Gesamtvolumen von 80 μl HBSS (Hanks' balanced salt solution, Tab. 2-1) bei einer Temperatur von 37° C für 60 min inkubiert. Die Trennung von freiem und gebundenem Radioliganden erfolgte durch dreifachen Lösungswechsel mit HBSS über den am Wellboden haftenden Zellen. Nach Lyse der Zellen mit 0.5 N NaOH wurde der Inhalt eines wells mittels eines Sippers jeweils in ein 1.5 ml Eppendorf-Cup überführt und mit Szintillatorflüssigkeit (Ultima Gold, Packard) auf ein Volumen von 1-2 ml aufgefüllt. Die Strahlung selbst wird in β -Szintillationszählern (Koinzidenzverfahren) (Packard 1500 und 1600) mit Hilfe von speziellen Adaptern für Eppendorf-Cups gemessen. Hierbei wird die Anzahl der singulären Ereignisses eines Zerfalls in einer Minute [cpm] (counts per minute) erfasst; mit Hilfe des Molefaktors kann ein Zusammenhang zwischen cpm und der Menge des Radioliganden herstellt werden.

Tab. 2-1: Zusam	mensetzung des HBSS-
Puffers (Hanks'	balanced salt solution)

HBSS-Puffer		
	137 mM	NaCl
	5.4 mM	KCl
	1.2 mM	MgSO ₄
	0.34 mM	Na ₂ HPO ₄
	4.2 mM	NaHCO ₃
	0.44 mM	$\mathrm{KH}_{2}\mathrm{PO}_{4}$
	1.3 mM	CaCl ₂
	20 mM	HEPES
	5.5 mM	Glucose
<i>pH-Wert</i> :	7.4	
Temperatur:	36° C	

2.3.3 Auswertung

Mittels nicht-linearer Regression (Kap. 2.6) nach Gl. (4) wurde der IC_{50} -Wert eines Liganden A bestimmt und nach Gl. (5) für den pK_D-Wert (-log M) korrigiert.

2.4 Dissoziationsbindung

2.4.1 Rezeptortheorie und mathematisches Modell

Den Beginn der Assoziation markiert die Gabe einer konstanten Konzentration des Radioliganden, welcher an die Rezeptoren statistisch zunehmend bindet, bis sich ein Gleichgewicht aus Assoziation und Dissoziation einstellt. Zu diesem Zeitpunkt wird nun der zu untersuchende, nicht radioaktiv markierte Ligand hinzugefügt.

Sobald der Radioligand vom Rezeptor dissoziiert, ist für einen im Überschuss gegebenen kompetitiven Liganden die Wahrscheinlichkeit höher, dass dieser an die freie Bindungsstelle des Rezeptors bindet. Über die Zeit kommt es zu einer zunehmenden Dissoziation des Radioliganden vom Rezeptor, deren Geschwindigkeit durch die Dissoziationszeit des Radioliganden limitiert ist. Allosterische Liganden können an einer anderen Bindungsstelle als der Radioligand selbst binden und z.B. durch Konformationsänderung des Rezeptors die Dissoziation des Radioliganden im Vergleich zu kompetitiven Liganden beschleunigen.

Die spezifische Bindung des Radioliganden zu einem Zeitpunkt B_s(t) wird durch folgende Gleichung beschrieben:

$$B_{s}(t) = B_{0} \cdot (1 - \exp(-k_{off} \cdot t)) + B_{ns}$$
(7)

Dabei stellt B_0 die spezifische Bindung zum Zeitpunkt (t=0) und B_{ns} die unspezifische Bindung dar. Die Dissoziationskonstante k_{off} bezeichnet die Zeitkonstante der Dissoziation, mit welcher auch die Halbwertszeit $t_{1/2}$ ermittelt werden kann:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_{off}} \tag{8}$$

Um dem Betrachter eine vergleichende Beurteilung der Dissoziationsbindung zu erleichtern wurde die Darstellung der Dissoziationsbindung jeweils auf die minimale spezifische Bindung (B_s) normiert, welche dem Wert der Asymptote für eine unendlich große Zeitmenge entspricht.

2.4.2 Experimentelle Bedingungen der Dissoziationsbindung

Für die vorliegende Arbeit wurden adhärent in 96-well-Platten wachsende bis zur Konfluenz kultivierte HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen mit 1 nM [³H]-P 1075 in 100 µl HBSS-Puffer (Tab. 2-1) für 45 min bei 37 °C inkubiert bis sich ein Assoziationsgleichgewicht einstellte. Darauf wurde die Dissoziation durch zwei mögliche Verfahren induziert: Entweder durch Injektion und sukzessivem Mischen eines kleinen Volumens (11 µl) der zu untersuchenden Substanz (Methode A) oder durch einfachen Austausch der Radioligand-Lösung durch eine Lösung mit den Endkonzentrationen der zu untersuchenden Testsubstanzen (Methode B; "HTS-Methode"). Beide Verfahren wurden im sog. Rückstopp-Verfahren durchgeführt, d.h. die Dissoziation wurde sukzessive zu unterschiedlichen Zeitpunkten gestartet und gemeinsam durch dreifachen Lösungswechsel gestoppt. Der dreifache Lösungswechsel trennt zugleich den gebundenen vom freien Anteil des Radioliganden. Analog zur Kompetitionsbindung (Kap. 2.3.2) wurden die Zellen anschließend mit 0.5 N NaOH-Lösung abgelöst, der gesamte Inhalt eines wells jeweils in Eppendorf-Cups überführt und analog zur Kompetitionsbindung im β -Szintillationszähler gemessen.

2.4.3 Auswertung einer Dissoziationsbindung

Mittels nicht-linearer Regression (Kap. 2.6) wurde nach Gl. (7) der k_{off} -Wert ermittelt, in der die Hälfte des gebundenen Radioliganden vom Rezeptor dissoziiert ist und anhand Gl. (8) in die Halbwertszeit $t_{1/2}$ umgerechnet.

2.4.4 Quantitative Auswertung des allosterischen Effekts

Ausgehend von einem allosterischen Modell existieren für zwei Liganden zwei separate Bindungsstellen am Rezeptor. Je nachdem, welcher Ligand am Rezeptor bindet, kann der Ligand das Vorliegen eines für ihn günstigen Rezeptorzustandes begünstigen. Das in Abb. 2.4.1 dargestellte *ternary*-Modell beschreibt diese Zustände und Bindungsvorgänge und berücksichtigt – im Gegensatz zu einem kompetitiven Modell – den *ternary*-Zustand in dem beide Liganden gleichzeitig am Rezeptor gebunden vorliegen. Nachdem ein Ligand am Rezeptor gebunden hat, wird angenommen, dass diese Bindung einen Rezeptorzustand für diesen Liganden begünstigt (*induced-fit*) und die Affinität des Rezeptors für den jeweils anderen Liganden ändert.

L*



Auf Grundlage des t*ernary*-Modells lässt sich ein mathematisches Modell ableiten, welches einen Zusammenhang zwischen dem gemessenen k_{off} -Wert und kinetischen Parametern des Modells herstellt (Gl. 15 entnommen aus Kühner et al. 2011) :

Def.:	L^*	= $[^{3}H]$ -P 1075 (bzw. Ligand, welcher an die $[^{3}H]$ -
		P 1075-Bindungsstelle bindet)
	G	 Glibenclamid (bzw. <u>allosterischer Ligand</u>, welcher nicht an die [³H]-P 1075-Bindungsstelle bindet)
	R	= freier Rezeptor
	RL*	= Rezeptorkomplex mit L* an R gebunden,
	RG	= Rezeptorkomplex mit G an R gebunden,
	GRL*	= Rezeptorkomplex mit G und L* an R gebunden
	k _{off.L*}	= k _{off} des Radioliganden in Abwesenheit von G
	k _{off.L*} G	$= k_{off}$ des Radioliganden in Gegenwart von G
	koff	$= k_{off}$ des Radioliganden bezogen auf alle rezeptorgebundenen

$$[L^*], [G], [R] \in \mathbb{R}^+$$

Voraus- R_o setzungen: R

$$= R + RL^{*} + GRL^{*} + RG$$

= 0, wenn G im Überschuss über freie R und L*
$$\frac{\partial}{\partial t} \{ [RL^{*}] \} = -k_{off:L^{*}} \cdot [RL^{*}]$$
(9)

$$\frac{\partial}{\partial t} \{ [GRL^*] \} = -k_{off:L^*|G} \cdot [GRL^*]$$
(10)

Aus Gl. (9) und (10) folgt:

$$\frac{\partial}{\partial t} \{ [RL^*] + [GRL^*] \} = -k_{off,L^*} \cdot [RL^*] - k_{off,L^*|G} \cdot [GRL^*]$$
(11)

Aus dem Massenwirkungsgesetz lässt sich die Gleichgewichtskonstante K_{G}' wie folgt definieren:

$$K_{G}' = \frac{[RL^*] \cdot [G]}{[GRL^*]}$$

$$\Leftrightarrow [GRL^*] = [RL^*] \cdot \frac{[G]}{K_{G}'}$$
(12)

Die Gesamtheit aller Rezeptorkomplexe, an denen L* gebunden vorliegt, beschreibt Gl.(13):

$$[RL^*] + [GRL^*] = [RL^*] + [RL^*] \cdot \frac{[G]}{K_G'} = [RL^*] \cdot (1 + \frac{[G]}{K_G'})$$
(13)

Daraus folgt: Aus den Gleichungen (11), (12) und (13) folgt:

$$\frac{\partial}{\partial t} \{ [RL^*] \cdot (1 + \frac{[G]}{K_G'}) \} = - [RL^*] \cdot (k_{off.L^*} + k_{off.L^*|G} \cdot \frac{[G]}{K_G'})$$
(14)

Die Integration ergibt:

$$k_{off} = \frac{k_{off.L^*} + k_{off.L^*|G} \cdot \frac{[G]}{K_{G'}}}{1 + \frac{[G]}{K_{G'}}}$$
(15)

- -

Grenzwerte: $\lim_{off} k_{off}([G] = 0) = k_{off,L*}$ $\lim_{off} k_{off}([G] >> K_G') = k_{off,L*|G}$

Wendepunkt: Für $[G] = K_G'$ gilt:

$$k_{off} = \frac{k_{off,L^*} + k_{off,L^*|G} \cdot 1}{1 + 1} = \frac{k_{off,L^*} + k_{off,L^*|G}}{2}$$



Abb. 2.4.2: Simulation der konzentrationsabhängigen Zunahme von k_{off} durch Variation der Parameter K_G' bzw. $k_{off,L^*|G}$ nach Gl. (15)

Oben: Variation des K_G '-Wertes bei konstantem $k_{off,L^*|G}$ von 0.5 min⁻¹

unten: Variation des $k_{off,L^*|G}$ bei konstantem K_G ' von 300 nM. Simuliert für die eingezeichneten Parameter

Nach Gl. (15) ist der in der Dissoziationskinetik ermittelte k_{off} -Wert sowohl vom $k_{off:L^*|G}$ -Wert des Radioliganden [³H]-P 1075 (bimolekulare Reaktion) als auch vom $k_{off:L^*|G}$ -Wert des Radioliganden in Gegenwart des allosterischen Liganden G (Zerfall des *ternary-complex* L*RG) abhängig; diese Parameter stellen zugleich das Minimum bzw. Maximum von k_{off} dar (vgl. Abb. 2.4.2 oben). Darüber hinaus beschreibt Gl. (15) auch, wie der k_{off} -Wert mit steigender Konzentration des allosterischen Liganden G zunimmt, seinen halbmaximalen Wert für die Konzentration des K_G' -Wertes erreicht Abb. 2.4.2 (unten) und sich in hohen Konzentrationen von G asymptotisch nach $k_{off:L^*|G}$ strebend sättigt. Zur Auswertung der Dissoziationskinetiken wurde k_{off} als Zielvariable gewählt, während $k_{off:L^*|G}$ und K_G' als abhängige Variablen mittels nicht-linearer Regression (Kap. 2.6) geschätzt wurden. Der $k_{off:L^*}$ -Wert wurde durch [³H]-P 1075-Dissoziationskinetiken mit 10 μ M P1075 (>>1000x K_{L^*}) ermittelt. Die Simulation in Abb. 2.4.2 (oben) demonstriert, dass sich der Hyperbel-Graph in einem Konzentrationsbereich, welcher kleiner als der K_G' -Wert ([G] << K_G') ist, durch die folgende Geradengleichung annähern lässt:

$$f([G]) = \varepsilon . [G] + k_{off.L*}$$

$$mit \ \varepsilon = \frac{k_{off.L*|G} - k_{off.A}}{K_G'}$$
(16)

Diese Gerade besitzt den y-Achsenabschnitt von $k_{off,L*}$ (min⁻¹) und die Steigung ε (min⁻¹ M⁻¹), welche nachfolgend auch als *"approximative allosterische Potenz"* bezeichnet wird. Letztere ermöglicht einen einfachen Vergleich der allosterischen Potenz zwischen verschiedenen allosterischen Liganden anhand eines einzigen Parameters.

2.5 Fluoreszenzphotometrie

2.5.1 Prinzip der Membranpotentialmessung mit DiBAC₄(3) oder DyeB

DiBAC₄(3) (bis-(1,3 Dibutyl-barbitursäure)-Trimethinoxonol, Molecular Probes, OR, USA) ist ein Fluoreszenzmarker, welcher durch die Zellmembran diffundieren und im Zellinneren an hydrophobe Bestandteile von Proteinen bindet. Ohne diese Bindung zeigt der Fluoreszenzmarker keine wesentliche Fluoreszenz. Die dadurch geringere extrazelluläre Fluoreszenz wird zusätzlich durch einen nicht membrangängigen Quencher absorbiert; in den Versuchen mit DiBAC₄(3) erfüllte BrilliantBlack diesen Zweck.

Durch negative Ladungen des DiBAC₄(3) verteilt es sich je nach Zustand des Membranpotentials der Zelle: Mit steigender Depolarisation der Zelle erfolgt eine zunehmende Umverteilung des DiBAC₄(3) in die Zelle, welche in Form eines Anstiegs des Fluoreszenzsignals gemessen wird; umgekehrt sinkt das Fluoreszenzsignal in einer Zelle je mehr die Zelle hyperpolarisiert.

Die gemessene Fluoreszenzintensität hängt somit von der Menge des intrazellulär an Proteine gebundenen Fluoreszenzfarbstoffs ab und kann aufgrund dessen spannungsabhängigen Verteilungsverhaltens als Maß für das Membranpotential verwendet werden (Epps et al., 1994).

In der vorliegenden Arbeit wurde mit DyeB (auch bekannt unter den Namen DisBAC₁(3); FMP = FLIPR membrane potential dye R7260; blue component, Molecular Probes, 0.125 mg/ml, 530/550 nm) ein zweiter Fluoreszenzmarker verwendet, welcher sich auch nach dem Zustand des Membranpotentials der Zelle verteilt. Gegenüber DiBAC₄(3) sei vor allem seine sehr schnelle potentialabhängige Verteilung hervorgehoben, welche es ermöglicht die Membranpotentialänderung beinahe in Echtzeit ohne Überlagerung durch die Verteilungskinetik des Fluoreszenzfarbstoffes selbst darzustellen. Gleichzeitig konnten mit DyeB auch Substanzen mit einer Nitrogruppe (z.B. DAD2) untersucht werden, welche in Experimenten mit DiBAC₄(3) zu fehlinterpretierbaren Quencheffekten der Fluoreszenz führen könnten (Whiteaker et al., 2001; Baxter et al., 2002; Wolff et al., 2003).

Für Routineexperimente erwies sich die relativ langsame potentialabhängige Verteilungskinetik des $DiBAC_4(3)$ als robustes Verfahren für die Ermittlung von Wirkeffekten von Substanzen in unterschiedlichen Konzentrationen. Sobald die Fragestellung die Analyse der Kinetik selbst betraf oder Quencheffekte mit DiBAC₄(3) beobachtet wurden, wurde DyeB eingesetzt.

Eigenschaft	DiBAC ₄ (3)	DyeB
Wellenlänge: Excitation	488 oder 505 nm	505 oder 525 nm
Wellenlänge: Emission	LP 515 oder LP 530	LP 530 oder LP 550
Quencher	0.01% BrilliantBlack	Im Produkt bereits enthalten
Eingesetzte Konzentrationen	5 μΜ	0.125 mg/ml

Tab. 2-2: Vergleich der Membranpotentialmarker DiBAC₄(3) mit DyeB

2.5.2 12-Kanal-Fluoreszensmessgeräte

Die Fluoreszenzsignale wurden mit Hilfe von 12-well-Fluoreszenzdetektoren, welche durch unser Institut entwickelt werden, gemessen (vgl. Abb. 2.5.1; Lemoine und Rood, 2006). Sie bieten den Vorteil einer vollkinetischen Messung mit einer Datenfrequenz von bis zu 200 Hz bei gleichzeitiger on-line Überwachung auf einem Monitor. Durch den Verzicht auf jegliche Transportmechanik ist die Messung störunanfällig und der Experimentator kann jederzeit in den Versuch eingreifen. Der Fluoreszenzfarbstoff wird mit herkömmlichen LED (FNL-U500-G11, 505 nm, Forge Europe) von der Unterseite der 12-well-strips durch ein im 45°-Winkel angeordnetes Dichroid (505) angeregt. Für DiBAC₄(3) wird zur Anregung blaues Licht mit einer Wellenlänge von 488 nm, für DyeB grünes Licht mit einer Wellenlänge von 505 nm benutzt. Um unnötiges Fotobleaching des Fluoreszenzfarbstoffs zu vermeiden wurde die Anregungszeit auf 30 ms je Datenpunkt reduziert. Der Fluoreszenzfarbstoff emittiert nach Anregung Licht, welches einen Emissionsfilter (OG, Langpassfilter von Schott) passiert und mit Photodetektoren (OSD15-5T von Centronics) gemessen wird. Durch einen 2-Stufen-Verstärker (*operational amplifiers OPA111 und OPA121, Texas Instruments, USA*) wird das Signal um mehr als Faktor 100.000 verstärkt und noch in der Messmaschine digitalisiert. Anschließend wird das Signal an einen PC gesendet (RS232, 38400 Baud), auf dessen Bildschirm dargestellt, sowie kommasepariert in einer Datei (.csv) zur späteren Analyse gespeichert. Für Lichtversuche mit dem Fluoreszenzliganden DiBAC₄(3) wurde aufgrund dessen langsamer Verteilungskinetik eine adäquate Datenrate von 0.33 Hz gewählt; für DyeB 1 Hz und für Untersuchungen zur Halbwertszeitbestimmung der Fluoreszenzkinetik wurden 3 Hz gewählt.



links: Foto eines 12-Kanal-Fluoreszenzdetektors

rechts: Schematischer Aufbau und Strahlengang eines einzelnen Kanals der eingesetzten Fluoreszenzmessgeräte

2.5.3 Experimentelle Bedingungen

Für die Fluoreszenzmessung wurden drei ähnliche Puffer verwendet, welche nach Gopalakrishnan et al. (1999) auf einem "kaliumarmen" Versuchspuffer basieren; der geringe Anteil von K⁺ führt bei Gabe von K_{ATP}-Kanalöffnern zu einer starken Änderungen der Fluoreszenzintensität (Gopalakrishnan et al., 1999).

		Versuchspuffer A	Versuchspuffer B	Versuchspuffer C
NaCl	120 mM	+	+	+
KCl	2 mM	+	+	+
MgCl ₂	1.0 mM	+	+	+
CaCl ₂	2.0 mM	+	+	+
HEPES	20 mM	+	+	-
BrilliantBlack (BB)	0.01 %	-	+	+
Glucose	10 mM	-	+	+
DiBAC ₄ (3)	5 µM bzw.	-	+	+
oder DyeB	0.125 mg/ml			
pH-Wert:		7.4	7.4	7.4
Temperatur:		32 °C	32 °C	50 °C
Verwendungszweck:		Waschen von Zellen	eigentlicher Versuchspuffer zur Durchführung von Fluoreszenz- Versuchen	Lösung von lipophilen Substanzen

Tab. 2-3: Zusammensetzung der Versuchspuffer zur Membranpotentialmessung mittels Fluoreszenz

+ enthalten - nicht enthalten in Anlehnung an Gopalakrishnan et al. (1999)

Versuchspuffer A wurde ausschließlich zum Waschen von Zellen benutzt, während Versuchspuffer B als Standardpuffer zur Fluoreszenzmessung diente. Zum Anlösen der überwiegend lipophilen Testsubstanzen, wurde standardisiert 1 µl 1 N NaOH in 5 µl Substanz (50 mM oder 100 mM) eingerührt und anschließend bei 50 °C in 500 µl Hepes-freiem Versuchspuffer C gelöst.

Vor der eigentlichen Versuchsdurchführung wurden Zellen in 12-well-strips (96-well-Format) bis zur einlagigen Konfluenz kultiviert. Nach Absaugen des Kulturmediums und zweimaligen Waschen mit 150 µl Versuchspuffer A wurde jedes well mit 225 µl Versuchspuffer B (inkl. Fluoreszenzligand, Quencher und Glucose) aufgefüllt (vgl. Miller et al., 1999). Der Verteilungsprozess des Fluoreszenzliganden wurde in 12-well-Fluoreszenzdetektoren bei 34°C verfolgt.

2.5.4 Versuchsdurchführung zur Erstellung einer Dosiswirkungskurve eines KCO

Permanent (SUR2B/Kir6.1)-transfizierte HEK 293-Zellen wurden 3 Tage bis zur Konfluenz in mit Poly-L-Lysin beschichteten 12-Well-Strips (96-well-Format) in MEM-Medium kultiviert. Vor Versuchsbeginn erfolgte ein zweifacher Lösungswechsel mit Versuchspuffer A um eine Anlagerung des Fluoreszenzliganden an Eiweißbestandteile des Mediums (FKS) zu vermeiden. Bei einem dritten Lösungswechsel wurde der Versuchspuffer mit 5 μ M DiBAC4(3) und 1% Brillant Black (BB) versetzt und das 12-well-Strip sofort in einem 12-Kanal-Fluoreszenzdetektor positioniert; dies entspricht dem Zeitpunkt 0 min in der Abb. 2.5.2 oben. Dort ist auch die anschließende Zunahme der Fluoreszenz (Labelverhalten) der Zellen dargestellt, welche bei ca. 45 min ein Gleichgewicht erreicht. Nach dem elektronischen Kanalabgleich bei 47 min wurde Diazoxid in steigenden Konzentrationen injiziert. Hierdurch ergab sich eine Dosiswirkungskurve für den hyperpolarisierenden Effekt von Diazoxid (siehe gekastelter Bereich im oberen Abbildungsteil, welcher unten vergrößert dargestellt wird). Um die Endkonzentrationen von 0.8 μ M bis 2000 μ M unter jeweils 10-facher Verdünnungsreihe von Diazoxid in Konzentrationen von 8 μ M bis 2000 μ M unter jeweils 10-facher Verdünnung in die einzelnen wells pipettiert. Der Kontrollkanal erhielt ein gleiches Volumen des Versuchspuffers ohne Wirkstoff.

Da sich ein Lichteinfall während der Injektion nicht vermeiden läßt, wurden die Detektoren während der Injektionszeit (ca. 10-20 sec) abgeschaltet. Unmittelbar nach der Injektion ergibt sich ein Abfall des Fluoreszenzsignals (im Sinne einer Hyperpolarisation). Hierbei zeigen höhere Konzentrationen eine schnellere Kinetik. Nach ca. 35 min hat sich in allen Kanälen ein neues Gleichgewicht eingestellt. Daraufhin wird der hochaffine KCO KC399 in einer Endkonzentration von 3 μ M injiziert, welcher in dieser Konzentration erwartungsgemäß einen maximalen agonistischen Stimulus darstellt. Damit lassen sich die Fluoreszenzintensitäten der verschiedenen Diazoxid-Konzentrationen im Gleichgewicht auf ein identisches Maximum zu normieren. Um dem Betrachter das Vergleichen der Wirkung durch 3 μ M KC399 zu erleichtern, wurde die Darstellung der Einzelkurven auf ein gemeinsames agonistisches Maximum unter Erhalt dieser Relation grafisch skaliert (vgl. Abb. 2.5.2 unten).



Abb. 2.5.2: Beispiel zu der in Kap. 2.5.4 beschriebenen Versuchsdurchführung zur Erstellung einer Dosiswirkungskurve für die Hyperpolarisation durch den K_{ATP} -Kanalöffner Diazoxid an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen

oben: vollständiger Versuch mit Verteilungsverhalten des Fluoreszenzfarbstoffs ohne Normierung auf ein Maximum.

unten: Auf ein gemeinsames agonistisches Maximum normierter Ausschnitt der oberen Darstellung.

2.5.5 Analyse und statistische Auswertung der Daten einer Fluoreszenzmessung

2.5.5.1 Mathematisches Modell für Fluoreszenzkinetiken

Die Gabe eines K_{ATP}-Kanal-Öffners (KCO) führt zu einem Abfall des Membranpotentials, dadurch zu einer Umverteilung des Fluoreszenzliganden und letztendlich zu einem Abfall der gemessenen Fluoreszenz. Mit der nachfolgenden Formel lässt sich dieser Abfall der Fluoreszenz für eine bestimmte Konzentration eines Liganden und dessen Fluoreszenzintensität (F([L])) bei Einstellung eines neuen Gleichgewichts beschreiben:

$$F([L]) = \left(1 - \frac{[L]^p}{[L]^p + EC_{50}{}^p}\right) \cdot \Delta F_{max} + F_{min}$$

$$mit \ \Delta F_{max} = F_{max} - F_{min}$$
(17)

Dabei bezeichnet F_{max} die maximale Fluoreszenz gemessen in Abwesenheit eines K_{ATP} -Kanalöffners, F_{min} die gemessene Fluoreszenz in Anwesenheit eines maximal wirksamen KCO und EC₅₀ die Konzentration eines KCO, welche eine halbmaximale Wirkung zeigt. Den Steilheitsfaktor der Hyperbel (*hill slope*) stellt der Exponent p dar.

2.5.5.2 Auswertung einer Dosiswirkungskurve für einen KCO

Für den Beispielversuch aus dem vorhergehenden Kapitel 2.5.4 wurden zur Erstellung von Dosiswirkungskurven für jeden einzelnen Kanal prozentual normierte Effekte bestimmt. Diese entsprechen dem Quotienten aus der Differenz zwischen Kontrolle und Substanzwirkung (ΔF_i) und der Differenz zwischen Kontrolle und Maximaleffekt durch KC399 (ΔF_{max}); für einen einzelnen Kanal (blau) wurde dies in Abb. 2.6.1 (oben) demonstriert.

Die Daten der normierten Effekte aller untersuchten Substanzkonzentrationen von mindestens sechs gleichartigen Experimenten für z.B. Diazoxid an einer HEK 293(SUR2B/Kir6.1)-Zellkultur wurden nach Gl. 17 mittels nicht-linearer Regression zu einer Dosiswirkungskurve zusammengefasst; im Beispiel wurde so eine pEC₅₀ von 5.14 ± 0.02 (-log mol/l) und einer Steilheit p von 1.31 ± 0.08 ermittelt.

Die Angabe der Anzahl der Experimente (\mathbf{n}) bezieht sich dabei nicht auf die Fluoreszenzmessung in Zellen eines einzelnen wells, sondern auf die Daten eines kompletten 12-well-strips. Die Angabe von "n=1 Experimenten" kann daher je nach Anzahl der untersuchten Konzentrationen der Testsubstanz eines 12-well-strips (dies kann der Dosiswirkungskurve entnommen werden) bis zu 10 verschiedene einzeln untersuchte Konzentrationen umfassen.





oben: Darstellung einer Fluoreszenzmessung mit DiBAC₄(3): unbehandelter Kontrollkanal (rot), agonistischer Maximalstimulus mit 3 μM KC399 (rosa), agonistische Wirkung von 12.5 μM Diazoxid (blau). Nach Einstellung einer Gleichgewichtswirkung bei ca. 35 min wird die agonistische Wirkung von Diazoxid (Δ Fi) auf die maximalagonistische Wirkung von 3 μM KC399 bei ca. 45 min prozentual normiert. Die Wirkung im Kontrollkanal (rot) entspricht somit 0%, die des Maximalstimulus 100%. (vgl. Text Kap. 2.5.5.2).

unten: beispielhafte Dosiswirkungskurve für die Hyperpolarisation: Aus sechs Einzelexperimenten (n=6) mit jeweils zehn untersuchten Konzentrationen wird aus den prozentual normierten Daten anhand von GI. 17 mittels nichtlinearer Regression eine Dosiswirkungskurve erstellt. Die vollständige Auswertung von Diazoxid befindet sich in Abb. 3.1.6.

2.6 Mathematisch-statistische Auswertungsverfahren

Mit Hilfe der Statistiksoftware SAS 6.04 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) wurden die Messdaten computergestützt ausgewertet. Für die graphische Darstellung wurde der Standardfehler als Standardabweichung des Mittelwertes (*SEM* = *standard error of the mean*) berechnet.

Die Ergebnisse der nicht-linearen Regression selbst werden als Schätzwerte ± ASD (*asymptotic standard deviation*) angegeben. Dabei wurden ermittelte Ergebnisse der nichtlinearen Regression nur verwertet, wenn einzelne Parameter nicht zu stark voneinander abhingen, wobei die von SAS ermittelten Korrelationskoeffizienten als Kriterium dienten.

Aufgrund der Inhomogenität der Fehlerverteilung in Kompetitions- und Dissoziationsexperimenten wurden mit dem Verfahren von Ehle et al. (1985) transformierte Funktionen für das Regressionsverhalten verwendet, welches statistische Störungen bei der Schätzung der Parameter im Regressionsverfahren vermeidet.

Als Standardfehler von Mittelwerten wird in der vorliegenden Arbeit einheitlich der SEM (*standard error of the mean*) angegeben (Quotienten der Standardabweichung und der Quadratwurzel der Anzahl der Messwerte).

2.7 Mathematisches Modell zur Beschreibung des Zusammenhangs zwischen K_{D} - und EC₅₀-Wert am K_{ATP} -Kanal

Das von der Arbeitsgruppe um M. Schwanstecher vorgeschlagene *four-sites-model* geht von einem SUR-Tetramer aus. An diesem muss ein Kaliumkanalöffner alle vier SUR-Einheiten besetzen, um eine Kanalöffnung zu bewirken. Vom *four-sites-model* des SUR-Tetramers ausgehend, beträgt die Aktivität E eines Agonisten A an einem K_{ATP}-Kanal.

$$E = b^4 \tag{18}$$

Wobei b die Wahrscheinlichkeit der Ligandbindung in Gegenwart einer Konzentration [A] darstellt. Durch ersetzen der Wahrscheinlichkeit b durch die Rezeptorbesetzung y_A (vgl. Gl. 2) eines Agonisten A ergibt sich

$$E = (y_A)^4$$
(19)

Für den halbmaximalen Effekt (E = 1/2) eines Agonisten A (entsprechend der EC₅₀) folgt:

$$E = \frac{1}{2} = (y_A)^4 \iff y_A = 2^{\frac{1}{4}}$$
 (20)

$$pEC_{50} = pK_D + \log(\frac{1}{y_A + 1})$$
(21)

Und in Kombination mit Gl. 20:

$$pEC_{50} = pK_{D} + \log(2^{\frac{1}{4}} - 1)$$

$$mit \quad \log(2^{\frac{1}{4}} - 1) = -0.7231$$

$$bzw. EC_{50} = K_{D} * 5.28 \quad oder \quad pEC_{50} = pK_{D} - 0.7231$$
(22)

Für den Zusammenhang zwischen K_{D} - und EC_{50} -Wert folgt daraus, dass für einen halbmaximalen Effekt (EC_{50}) eine 5.28-fach höhere Konzentration des K_{D} -Wertes benötigt wird.

2.8 Material und Substanzen

2.8.1 Untersuchte Substanzen

2.8.1.1 Standardsubstanzen

Material	Herkunft
Bimakalim	Merck (Darmstadt, GER)
Diazoxid	Sigma (St. Louis, USA)
KC399	Chugai Pharmaceutical Co, JAP (Tamura et al., 1994)
Glibenclamid	Leo (Ballerup, DK)
NNC414	Novo Nordisk (Bagsværd, DK)
P1075	Leo (Ballerup, Dänemark)
[³ H]-P 1075 (Radioligand)	Amersham Pharmacia (UK)

Die Strukturformeln der Standardsubstanzen können Abb. 3.1.1 (S. 49) entnommen werden.

2.8.1.2 Diazoxid-Derivate

In einer Kooperation mit dem Institut für Organische Chemie und Makromolekulare Chemie I wurden alle Diazoxid-Derivate durch die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. M. Braun synthetisiert und unserer Arbeitsgruppe aufgereinigt zur Verfügung gestellt. Substanzen beginnend mit dem Kürzel "DAD" oder "DSL" wurden durch Herrn Dr. Stefan Lachenicht, Substanzen beginnend mit dem Kürzel "AF" durch Herrn Dipl. Chem. Andreas Fischer synthetisiert. Eine genaue Beschreibung der

Synthese findet sich in Lachenicht et al. (2009). Die Strukturformeln der Diazoxid-Derivate können den Tabellen 3-4 und 3-5 (S. 82f) entnommen werden.

2.8.1.3 Benzofuran-, Benzothiophen- und Benzothiazol-Derivate

Auch alle Benzofuran-, Benzothiophen- und Benzothiazol-Derivate wurden durch das Institut für Organische Chemie und Makromolekulare Chemie I synthetisiert und uns aufgereinigt zur Verfügung gestellt. Eine genaue Beschreibung der Synthese findet sich in Fischer et al. (2010).

Die Strukturformeln der Benzofuran-Derivate befinden sich in Tabelle 3-6 (S. 92), die der Benzothiophen-Derivate in Tabelle 3-8 (S. 112) und die der Benzothiazol-Derivate in Tabelle 3-10 (S.117).

Material	Herkunft
α-ΜΕΜ	Gibco (Paisley, UK)
$DiBAC_4(3)$	Molecular Probes (Eugene, USA)
DyeB = FLIPR membrane potential dye R7260	Molecular Devices (München, GER)
Fetales Kälberserum (FBS 18G)	Biochrom AG (Berlin, GER)
G418 (Active Geneticin)	Gibco (Paisley, UK)
Glucose	Merck (Darmstadt, GER)
Hepes	Sigma (St. Louis, USA)
L-Glutamin	LC-Laboratories (Woburn, USA)
MEM	Gibco (Paisley, UK)
PBS	SIGMA (Deisenhofen, GER)
Poly-L-Lysin	Sigma (St. Louis, USA)
Szintillatorflüssigkeit (Ultima Gold)	Packard Bioscience/PerkinElmer (USA)
Trypsin	Gibco (Paisley, UK)
Zellkulturschalen, 12-well-strips, 96-well-Platten	Greiner Bio-One (Solingen, GER)
Zeocin Selection Reagent	InvivoGen (San Diego, USA)

2.8.2 Sonstige Materialien

Alle anderen Chemikalien wurden aus handelsüblichen Quellen bezogen.

2.8.3 Zur Messung, Auswertung und Darstellung verwendete Software

- Die chemischen Parameter S+logP und Molekulargewicht (g/mol) wurden mit MedChem Designer 1.0 (Simulations Plus Inc., Lancaster, CA, USA) ermittelt
- MLP12 (Inst. für Lasermedizin, Düsseldorf, GER)
- SAS 6.04 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)
- Excel 97 (Microsoft Corporation, Redmond, USA)
- LibreOffice 3.4 (The Document Foundation)
- Corel Draw 9 (Corel Corporation, Ottawa, CAN)
- MDL ISIS/Draw 2.5 (MDL Information Systems Inc.)

3 Resultate

3.1 Standard-K_{ATP}-Kanalöffner

3.1.1 Physikochemische Eigenschaften

Tab. 3-1: Molekulargewicht und Lipophilie (S+logP) untersuchter Standard-KATP-Kanalöffner

Substa	anz (mit Strukturformel)	Molekulargewicht (g/mol) S+logP
KC399	O ₂ N CN CH ₂ F CH ₂ F	317.4 2.9
Bimakalim		278.3 2.5
P 1075		231.3 1.7
NNC414		291.8 2.7
Diazoxid		230.67 1.3

3.1.2 Membranpotentialmessung mittels Fluoreszenz

Zur Kontrolle des Fluoreszenzverfahrens insgesamt, der Funktion der verwendeten Zellen als auch zum Normieren der einzelnen Versuche wurden bekannte K_{ATP} -Kanalöffner (KCO) eingesetzt, welche selbst nicht Forschungsschwerpunkt der vorliegenden Arbeit sind. Dabei handelt es sich um die Benzopyrane KC399 und Bimakalim, das Cyanoguanidin P1075, das Thieno-Thiadiazin NNC414 sowie das Benzothiadiazin Diazoxid. Für sie wurde jeweils eine Dosiswirkungskurve nach der in Kap 2.3 beschriebenen Methode der Membranpotentialmessung mittels Fluoreszenz erstellt. Dabei wurden die Effekte der Substanzen auf einen maximal hyperpolarisierenden Stimulus normiert; die pEC₅₀ stellt die Konzentration einer Substanz dar, welche einen halbmaximalen Effekt erzielt und ermöglicht den Vergleich der relativen Wirkstärke verschiedener Substanzen (vgl. Kap. 2.3). Die Messdaten der Standard-Substanzen sind in Tabelle 3-2 (Diazoxid in Tabelle 3-4) gelistet; die Abb. 3.1.1 bis 3.1.5 zeigen Originalexperimente sowie mittels nicht-linearer Regression ermittelte Dosiswirkungskurven.

Der K_{ATP}-Kanalöffner KC399 wurde in der vorliegenden Arbeit als sog. Maximalstimulus zur Normierung von Einzelversuchen an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen auf einen gemeinsamen maximalen hyperpolarisierenden Effekt in einer Konzentration von 3 μ M verwendet. Für *KC399* wurde eine pEC₅₀ von 9.23 ± 0.01 (-log M) an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen ermittelt (Abb. 3.1.1). Vereinzelt wurde als Maximalstimulus auch *Bimakalim* in einer Konzentration von 4 μ M eingesetzt, welches in der Fluoreszenzmessung an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen eine pEC₅₀ von 7.81 ± 0.04 (-log M) erreichte (Abb. 3.1.2). Zusätzlich wurde *P1075* zum Vergleich mit Daten aus Radioligandbindungsversuchen mit [³H]-P 1075, sowie Referenzliteratur charakterisiert (Abb. 3.1.3); es erreicht einen pEC₅₀-Wert von 8.02 ± 0.02 (-log M).

Für Versuche an CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen wurde als hyperpolarisierender Maximalstimulus das Thieno-Thiadiazin *NNC414* mit einer gemessenen pEC₅₀ von 6.54 \pm 0.02 (-log M) in einer Konzentration von 30 μ M eingesetzt (vgl. Abb. 3.1.4).

Das Benzo-Thiadiazin *Diazoxid* stellt die Stammsubstanz der in dieser Arbeit untersuchten Diazoxid-Derivate dar. Es zeigt sich an beiden Rezeptorsystemen ähnlich niederaffin mit einer gemessenen pEC50 von 5.14 ± 0.02 (-log M) an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen bzw. 4.72 ± 0.02 (-log M) an CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen (vgl. Tabelle 3-4, Abb. 3.1.5).



Hyperpolarisierende (agonistische) Membranpotentialwirkungen des Benzopyrans KC399

KC399 wurde standardisiert als agonistischer Maximalstimulus zur Normierung der Versuche an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen in einer Konzentration von 3 µM eingesetzt.

a) oben

Originalexperiment an HEK293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen, welche mit 5 µM DiBAC₄(3) markiert wurden. Der Wirkstoff wurde mit steigenden Konzentrationen von 0.1 nM bis 160 nM bei ca. 3 min injiziert. Ein Kanal blieb unbehandelt (control), ein anderer Kanal erhielt einen Maximalstimulus (4 µM Bimakalim). Es wurden Gleichgewichtswirkungen bei ca. 32 min bestimmt und prozentual auf die darauf folgende maximale Hyperpolarisation durch 4 μM Bimakalim normiert.

b) unten

Dosiswirkungskurve für die Hyperpolarisation. Die nicht-lineare Regressionsanalyse der normierten Daten (Gl. 17) von n=7 Experimenten (d.h. n=7 12-well-strips mit jeweils neun separat untersuchten Konzentrationen) an **HEK293-**(**SUR2B/Kir6.1)-Zellen** mit KC399 ergab einen pEC₅₀-Wert von 9.23 \pm 0.01 (-log M) und eine Steilheit p von 1.37 \pm 0.05.

Hyperpolarisierende (agonistische) Membranpotentialwirkungen des Benzopyrans Bimakalim

Bimakalim wurde als agonistischer Maximalstimulus zur Normierung der Versuche an HEK 293 (SUR2B/-Kir6.1)-Zellen in einer Konzentration von 4 µM eingesetzt.

a) oben

Originalexperiment HEK293an (SUR2B/Kir6.1)-Zellen, welche mit 5 µM DiBAC₄(3) markiert wurden. Der Wirkstoff wurde mit steigenden Konzentrationen von 1 nM bis ca. 4 µM bei ca. 5 min injiziert. Ein Kanal blieb unbehandelt (control), ein anderer Kanal erhielt einen Maximalstimulus (4 µM Bimakalim). Es wurden Gleichgewichtswirkungen bei ca. 54 min bestimmt und prozentual auf die darauf folgende maximale Hyperpolarisation durch 4 µM Bimakalim normiert.

b) unten

Dosiswirkungskurve für die Hyperpolarisation. Die nicht-lineare Regressionsanalyse der normierten Daten (Gl. 17) von n=9 Experimenten an **HEK293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen** mit Bimakalim ergab einen pEC₅₀-Wert von 7.81 \pm 0.04 (-log M) und eine Steilheit p von 1.12 \pm 0.10.





Hyperpolarisierende (agonistische) Membranpotentialwirkungen des Cyanoguanidins P 1075.

P1075 wurde vereinzelt als agonistischer Maximalstimulus zur Normierung der Versuche an HEK 293 (SUR2B/Kir6.1)-Zellen in einer Konzentration von 10 µM eingesetzt. Seine tritierte Form [³H]-P 1075 ist der einzige Radioligand der für den SUB2B verfügbar ist.

a) oben

Original experiment an **HEK293**-(**SUR2B/Kir6.1)-Zellen**, welche mit 5 μ M DiBAC₄(3) markiert wurden. Der Wirkstoff wurde mit steigenden Konzentrationen von 1 nM bis 10 μ M bei ca. 3 min injiziert. Ein Kanal blieb unbehandelt (control). Es wurden Gleichgewichtswirkungen bei ca. 30 min bestimmt und prozentual auf die darauf folgende maximale Hyperpolarisation durch 10 μ M P1075 normiert.

b) unten

Dosiswirkungskurve für die Hyperpolarisation. Die nicht-lineare Regressionsanalyse der normierten Daten (Gl. 17) von n=6 Experimenten an **HEK293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen** mit P 1075 ergab einen pEC₅₀-Wert von 8.02 \pm 0.02 (-log M) und eine Steilheit p von 1.15 \pm 0.08.

Hyperpolarisierende (agonistische) Membranpotentialwirkungen des Thieno-Thiadiazin-Derivats NNC414

NNC414 wurde standardisiert als agonistischer Maximalstimulus zur Normierung der Versuche an CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen in einer Konzentration von 30 μM eingesetzt.

a) oben

Original experiment an CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen, welche mit 5 μ M DiBAC₄(3) markiert wurden. Der Wirkstoff wurde mit steigenden Konzentrationen von 64 nM bis 30 μ M bei ca. 3 min injiziert. Ein Kanal blieb unbehandelt (control), ein anderer Kanal erhielt einen Maximalstimulus (30 μ M NNC414). Es wurden Gleichgewichtswirkungen bei ca. 48 min bestimmt und prozentual auf die darauf folgende maximale Hyperpolarisation durch normiert.

b) unten

Dosiswirkungskurve für die Hyperpolarisation. Die nicht-lineare Regressionsanalyse der normierten Daten (Gl. 17) von n=6 Experimenten an **CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen** mit NNC414 ergab einen pEC₅₀-Wert von 6.54 \pm 0.02 (-log M) und eine Steilheit p von 1.69 \pm 1.31.





Hyperpolarisierende (agonistische) Membranpotentialwirkungen des Benzothiadiazins Diazoxid.

Diazoxid stellt die Muttersubstanz der in dieser Arbeit beschriebenen Diazoxid-Derivate dar. Es wurde als Vorstimulus zur Überprüfung von neu synthetisierten Substanzen auf repolarisierende (antagonistische) Effekte in einer Konzentration von 50 µM (SUR1) bzw. 25 µM (SUR2B) eingesetzt.

a) oben

Originalexperiment an **HEK293-**(SUR2B/Kir6.1)-Zellen, welche mit 5 µM DiBAC₄(3) markiert wurden. Der Wirkstoff wurde mit steigenden Konzentrationen von 0.8 µM bis 200 µM bei ca. 2 min injiziert. Ein Kanal unbehandelt (control), blieb ein anderer Kanal erhielt einen Maximalstimulus (3 µM KC399). Es wurden Gleichgewichtswirkungen bei ca. 35 min bestimmt und prozentual auf die darauf folgende maximale Hyperpolarisation durch 3 µM KC399 normiert.

b) Mitte

Originalexperiment CHOan (SUR1/Kir6.2)-Zellen, welche mit 5 µM DiBAC₄(3) markiert wurden. Der Wirkstoff wurde mit steigenden Konzentrationen von 1.6 µM bis 200 µM bei ca. 2 min injiziert. Ein Kanal blieb unbehandelt (control), ein Kanal erhielt anderer einen Maximalstimulus (30 µM NNC414). Es wurden Gleichgewichtswirkungen bei ca. 41 min bestimmt und prozentual auf die darauf folgende maximale Hyperpolarisation durch 30 µM NNC414 normiert.

c) unten

Dosiswirkungskurven für die Hyperpolarisation. Die nicht-lineare Regressionsanalyse der normierten Daten (Gl. 17) von n=6 Experimenten an **HEK293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen** mit Diazoxid ergab einen pEC₅₀-Wert von 5.14 \pm 0.02 (-log M) und eine Steilheit p von 1.31 \pm 0.08.

Die Auswertung von n=8 Experimenten an CHO-(SUR1-/Kir6.2)-Zellen ergab einen pEC_{50} -Wert von 4.72 ± 0.02 (-log M) und eine Steilheit p von 1.80 ± 0.10.

	[³ H]-P 1075	DiBAC	C ₄ (3)-
		Membranpote	ntialmessung
	Α	В	С
	HEK293-	HEK293-	CHO-
	(SUR2B/Kir6.1)	(SUR2B/Kir 6.1)	(SUR1/Kir6.2)
			-iog ivi)
		p(Hill s	slope)
12(200	(n)	(n	l)
KC399 4bb 3 1 S H	8.99 ± 0.04	9.23 ± 0.01	nd
	(4)	(7)	<i>n.u.</i>
Bimakalir	7.65 ± 0.03	7.81 ± 0.04	
Abb. 3.1.2	1.00 - 0.05	1.12 ± 0.10	n.d.
N NO	(4)	(9)	
P 1075	8.31 ± 0.02	8.02 ± 0.02	
ADD. 3.1.3	(4)	1.15 ± 0.08	n.d.
	(4)	(0)	
NNC414			6.54 ± 0.02
Abb. 3.1.4	n.d.	n.d.	1.68 ± 1.31
N_N_			(6)
S S			
0´`0			
Diazoxid	4.97 ± 0.02	5.14 ± 0.02	4.72 ± 0.02
Abb. 3.1.5	(4)	1.31 ± 0.08	1.80 ± 0.10
	(4)	(0)	(8)
CI S.			
	1		

Tab. 3-2: Vergleich von pEC50-Werten der Membranpotential-Tests der Standard-KATP-Kanalöffner mitihren Dissoziationskonstanten aus der Kompetitionsbindung mit [3 H]-P 1075

3.1.3 Kompetitionsbindung

Die Kompetitionsbindungsstudien wurden mit Radioliganden [³H]-P 1075 ausschließlich an (intakten) HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen durchgeführt. Hierbei konkurriert die zu untersuchende Substanz als Ligand mit [³H]-P 1075 um die gleiche Rezeptorbindungsstelle. Je höher die Konzentration und die Affinität der zu untersuchenden Substanz, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass der Ligand an freie Rezeptoren bindet und dadurch gleichzeitig die Wahrscheinlichkeit der Bindung durch den Radioliganden sinkt. Für ansteigende Ligand-Konzentrationen wird die für den Rezeptor spezifische Bindung (B_s) des Radioliganden gemessen, mittels nicht-linearer Regressionsanalyse anhand Gl. 4 ausgewertet und als Dosiswirkungskurve dargestellt. Die Ligand-Konzentration, welche 50% des [³H]-P 1075 vom Rezeptor "verdrängt", wird als pK_D-Wert in (-log M) angegeben und korreliert mit der Affinität des Liganden zur Rezeptorbindungsstelle.

In Abb. 3.1.6 (oben) sind die Kompetitionsbindungskurven für die Kaliumkanalöffner (KCO) KC399, Bimakalim und Diazoxid, welche sich deutlich in ihrer Affinität zum K_{ATP} -Kanal unterscheiden, dargestellt (Messdaten in Tabelle 3-2). Das Benzopyran KC399 ist mit einem pK_D -Wert von 8.99 ± 0.04 (-log M) der affinste untersuchte K_{ATP} -Kanalöffner. Es ist am SUR2B/Kir6.1- K_{ATP} -Kanaltyp – wie auch P1075 und Bimakalim mit pK_D-Werten von 8.31 ± 0.02 bzw. 7.65 ± 0.03 (-log M) – deutlich affiner als Diazoxid mit einem pK_D-Wert von 4.97 ± 0.02 (-log M). Mindestens eine dieser Substanzen wurde jeweils als Standardsubstanz zur Kontrolle und Normierung in beinahe allen Fluoreszenzmethoden eingesetzt.

Für den Sufonylharnstoff Glibenclamid wurde ein pK_D-Wert von 6.33 ± 0.03 (-log M) ermittelt (Abb. 3.1.6 unten); er ist der einzige untersuchte K_{ATP}-Kanalblocker (=Antagonist) in der vorliegenden Arbeit.



Abb. 3.1.6 *Kompetitionsbindung von Standardsubstanzen mit* [³H]-P 1075 an HEK 293 SUR2B/Kir6.1-Zellen. Adhärente, in 96-well-Platten kultivierte Zellen werden mit dem Radioliganden (ca. 1.5 nM [³H]-P 1075) und steigenden Konzentrationen der kompetierenden Liganden versehen (Lösungswechsel), deren geeignete Mischung vorher in Eppendorf-Cups hergestellt wurde. Die unspezifische Bindung wird mit 10 μM P1075 bestimmt. Dargestellt wird die prozentual normierte spezifische Bindung (B_s). Die Daten wurden mittels nicht-linearer Regressionsanalyse anhand GI. 4 ausgewertet.

a) oben:				b) un	ten:		
-		$pK_D \pm ASD$ (-log	g M)	-		$pK_D \pm ASD$ (-log M)
0	KC399	8.99 ± 0.04	n = 4	0	Glibenclamid	6.33 ± 0.03	n = 4
Δ	P 1075	8.31 ± 0.03	n = 4				
	Bimakalim	7.65 ± 0.03	n = 4				
	Diazoxid	4.97 ± 0.02	n = 4				

3.2 Diazoxid-Derivate

3.2.1 Physikochemische Eigenschaften

 Tab. 3-3:
 Molekulargewicht und Lipophilie (S+LogP) der untersuchten Diazoxid-Derivate

	R2	HNN	3'R1			R1 (R2=H, R3=Cl)
R	3	o s	N O	MW (g/mol)	AF 30	\bigtriangleup
	R1	R2	R3	S+LOgP	AF55	\square
Diazoxid	CH ₃		Cl	230.7 1.63	A F 53	
DAD1				275.1	AT 33	T
	CH ₃		Br	1.75	AF51	\square
DAD2	CH ₃	NO ₂	Cl	275.7 2.0	AF49	\sim
DAD3	CH ₃	NH ₂	Cl	245.7 1.2	AF39	\sim
DAD4	CH ₃		Phenyl	272.3 2.7	AF38	\sim
DAD7 H				274.3 2.9	DAD13	
DAD8	\bigcirc			258.3 2.64	AF45	
DAD9	\bigcirc			264.4 2.5	AF42	
DAD10	s.			264.3 2.3	AF41	Ŭ
DAD11				330.5 <i>3.4</i>	AF54	 >>>
DAD12	$\left \begin{array}{c} \\ \end{array} \right $			236.3 2.0	AF57	$\mathbf{n}_{\mathbf{n}}$

MW (g/mol) S+LogP

> 256.7 2.1

270.7

2.63

284.8

3.2

284.8

3.0

298.8

3.5

298.8

3.5

312.8 *4.0*

364.9

4.1

298.8

3.2

292.7

3.5

306.8

3.2

270.7 *3.1*

270.7

3.0

3.2.2 Membranpotentialmessung mittels Fluoreszenz

Ausgehend von der Muttersubstanz Diazoxid wurden Substitutionen in Hinblick auf eine höhere Wirkung und Selektivität für den SUR2B/Kir6.1-K_{ATP}-Kanal synthetisiert und getestet. Dabei wurde in einer ersten Phase mit möglichst einfachen Synthesewegen nach einer geeigneten Stelle im Diazoxid-Molekül für Modifikationen gesucht (Tabelle 3-4, S. 82). Anschließend wurden in einer zweiten Synthesephase Reste in Position 3' des Diazoxid-Moleküls systematisch variiert (Abb. 3-5, S. 83).

Die neu synthetisierten Diazoxid-Derivate wurden auf ihre agonistische Wirkung sowohl am HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)- als auch CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellsystem untersucht. Die Effekte der Substanzen wurden auf einen maximal hyperpolarisierenden Stimulus normiert; der pEC₅₀-Wert stellt die Konzentration einer Substanz dar, welche einen halbmaximalen Effekt erzielt und ermöglicht den Vergleich der relativen Wirkstärke verschiedener Substanzen. Die Selektivität für einen der beiden untersuchten K_{ATP}-Kanaltypen wird jeweils als Differenz zwischen der an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen und der an CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen gemessenen pEC₅₀ in (-log M) angegeben; je höher die Wirkung an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen im Vergleich zu CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen, desto größer der für die Selektivität angegebene Wert.



<u>Modifikationen in Position 7'</u>: Die Messergebnisse der nachfolgenden Derivate, welche aus der ersten Synthesephase hervorgingen, befinden sich in Tabelle 3-4. Ein erster Ansatz stellte die Substitution des Diazoxid in Position 7' dar. Während der Austausch Chlor (Diazoxid) durch Brom

(DAD1) in dieser Position eine nur geringfügig höhere relative Wirkstärke an beiden untersuchten Rezeptorsystemen im Vergleich mit Diazoxid selbst erbrachte (Abb. 3.2.2), zeigte DAD4, mit einem Phenylring in Position 7', eine deutliche Absenkung der relativen Wirkstärke (Abb. 3.2.3). Dieser Unterschied spiegelt sich auch in den Originalabbildungen wieder: In Abb. 3.2.2a und b (DAD1) erreichen die höchsten eingesetzten Konzentrationen von 50 μ M (dicke hellblaue Kurve) bzw. 100 μ M (dünn rosa) (-log M) die volle Fluoreszenzintensität im Sinne einer hyperpolarisierenden Wirkung der Maximalstimuli (jeweils dick rosa), welche der Maximalwirkung der Standardsubstanzen KC399 bzw. NNC414 entsprechen. In Abb. 3.2.2c sind für DAD1 die mittels nicht-linearer Regressionsanalyse erstellten Dosiswirkungskurven der relativen Wirkungen in Abhängigkeit von der Konzentration beider Zelltypen dargestellt. Dabei entsprechen die pEC₅₀-Werte Schnittpunkten einer gedachten horizontalen Linie bei 50% mit den beiden Dosiswirkungskurven; je größer die Differenz – also grafisch der Abstand – beider pEC₅₀-Punkte, desto selektiver die Substanz. Für die Substanz DAD4 in Abb. 3.2.3a wurden aufgrund der relativ kleinen Wirkstärke keine Originalversuche demonstriert und nur die beiden teilextrapolierten Dosiswirkungskurven angegeben. Da bei Konzentrationen größer als 100 μ M toxische Nebeneffekte eintreten, konnten keine vollständige Dosiswirkungskurven gemessen werden. In diesen Fällen wurde zur ungefähren Abschätzung der Selektivität unter der Annahme einer 100%-igen Wirkung im millimolaren Bereich eine Dosiswirkungskurve extrapoliert (siehe gestrichelte Linien in Abb. 3.2.3a). Der hiermit ermittelte pEC₅₀-Wert stellt den kleinsten anzunehmenden extrapolierten pEC₅₀-Wert dar, woraus sich eine Aussage über die untere Grenze der Selektivität treffen lässt. Die Selektivität der Derivate DAD1 und DAD4 für SUR2B/Kir6.1 weicht kaum von der des Diazoxids selbst ab.



<u>Modifikationen in Position 5'</u>: Eine weitere Modifikation des Diazoxid-Moleküls wurde in Position 5' vorgenommen; jedoch zeigten die Substitutionen mit einer Nitrogruppe (DAD2) oder einer Amidgruppe (DAD3) in dieser Position an beiden Zelllinien selbst in hohen Konzentrationen nur

Schwellenwirkungen, welche extrapolierte pEC_{50} -Werte größer als 4.0 (-log M) bei minimaler Selektivität (Abb. 3.2.3b und c) ergaben.



<u>Modifikationen in Position 3'</u>: Die Substitution mit lipophilen Resten an Position 3' erwies sich dagegen in Hinblick auf Selektivität als vielversprechend, auch wenn die Derivate zur Vereinfachung der Synthese ohne Chlor in Position 7' synthetisiert wurden, wodurch die gemessenen pEC₅₀-Werte,

die des Diazoxids nicht erreichten. So wurde für DAD9, mit einem Cyclohexyl-Rest in Position 3' eine pEC₅₀ von 4.51 ± 0.03 (-log M) an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen gemessen, welche sich beinahe um den Faktor 10 von der deutlich verminderten pEC₅₀ von 3.56 ± 0.12 (-log M) an CHO-(SUR1/Kir6.2; Abb. 3.2.4) unterscheidet.

Die Idee von lipophilen Resten in Position 3' fortsetzend wurde ein Diazoxid-Derivat mit einem Adamantyl-Rest in dieser Position synthetisiert. Diese Substanz (DAD11) zeigte an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen mit einer gemessenen pEC₅₀ von 4.95 ± 0.04 (-log M) beinahe die gleiche agonistische Wirkung wie Diazoxid selbst. Im Vergleich mit dem extrapolierten pEC₅₀-Wert von 3.57 ± 1.36 (-log M) an CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen, zeigt diese Substanz eine hohe Selektivität mit um den Faktor 25 höheren Effekten an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen (Abb. 3.2.5). Adamantan selbst stellt ein hochsymmetrisches Cycloalkan dar, welches formal aus 4 Cyclohexanmolekülen in Sesselkonformation besteht. Durch den Adamantyl-Rest ist DAD11 nur schwer zu lösen, so dass keine Konzentrationen größer als 50 µM untersucht werden konnten.

Weitere Substitutionen in Position 3' mit einem Phenyl- (DAD8), Thiophen- (DAD10) oder Isobutenylrest (DAD12) erwiesen sich als weniger agonistisch wirksam an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen (pEC₅₀ < 4.5; -log M); wobei durch einen Verlust der Wirksamkeit an CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen die Selektivität um mehr als Faktor zehn zugunsten des SUR2B-K_{ATP}-Kanals erhalten blieb.

Resultate

Dagegen zeigte das mit einem Salicyl-Rest substituierte DAD7 eine ähnliche geringe relative Wirkstärke ($pEC_{50} < 4.1$; -log M) an beiden untersuchten Rezeptorsystemen und damit einen Verlust an Selektivität (Abb. 3.2.6 und 3.2.7).

Modifikation von 7'-chloro-Derivaten in Position 3': Aufgrund der hohen Selektivität und relativ



hohen Wirksamkeit der Substanzen DAD9 (3'-Hexyl) und DAD11 (3'-Adamantyl) wurden in einer zweiten Synthesephase Diazoxid-Derivate synthetisiert, welche zum einen das Chloratom in Position 7' besitzen als auch unterschiedliche überwiegend cyclische Reste in Posi-

tion 3' aufweisen (Abb. 3.2.1). Dabei unterscheiden sich die Derivate teilweise in einer zusätzlichen Methyl-Gruppe zwischen dem Molekül-Grundgerüst und der eigentlichen cyclischen Substitution in

Position 3', welche nachfolgend als "spacer" bezeichnet wird. Nachfolgend werden zuerst die cyclischen Reste in zunehmender Größe, danach nicht-cyclische Reste in Position 3' beschrieben; zugehörige Daten können der Tabelle 3-5 entnommen werden.

Die kleinste Ringstruktur in Position 3' stellt der Cyclopropyl-Rest der Substanz AF56 (Abb. 3.2.8) dar. Mit einer an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen gemessenen pEC₅₀ von 6.04 (-log M) zeigt AF56 eine fast zehnfach höhere agonistische Wirkstärke als Diazoxid selbst. Auch an CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen ist die agonistische Wirkung mit einer pEC₅₀ von 5.47 (-log M) erhöht; jedoch ergibt sich durch die höhere Wirksamkeit an beiden K_{ATP}-Kanaltypen insgesamt eine im Vergleich mit anderen Diazoxid-Derivaten relativ geringe Selektivität für den SUR2B/Kir6.1-Kanaltyp von 0.57 (-log M).

Die Substanz AF55 (Abb. 3.2.9) mit einem Cyclobutyl-Rest ohne "spacer" erreicht mit einer pEC₅₀ von 6.22 (-log M) an





HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen die höchste agonistische Wirkung der untersuchten Diazoxid-Derivate. Gleichzeitig ist die Selektivität zugunsten des SUR2B/Kir6.1-K_{ATP}-Kanals durch eine im Vergleich zu AF56 geringere pEC₅₀ von 5.14 (-log M) an CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen auf 1.08 (log M) erhöht. Der zusätzliche "spacer" des Cyclopentyl-Derivats AF53 (Abb. 3.2.10) verringert im Vergleich zu AF55 die pEC₅₀ vor allem an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1) auf 5.84 (-log M) um
mehr als den Faktor 2; an CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen unterscheiden sich die relativen Wirkstärken (pEC₅₀ \approx 5.1; -log M) kaum.

Für das Cyclopentyl-Derivat AF51 ohne "spacer" (Abb. 3.2.11) wurde ein pEC₅₀-Wert von 6.09 (-log M) an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen bzw. 5.39 (-log M) an CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen gemessen. Für das Cyclopentyl-Derivat mit "spacer" (AF49, Abb. 3.2.12) wurde an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen mit einer pEC₅₀ von 5.66 (-log M) nur ein moderater Verlust relativer Wirkstärke gemessen. Dagegen ist der starke Abfall der relativen Wirkstärke am SUR1-K_{ATP}-Kanal-Typ um den Faktor zehn auf einen pEC₅₀-Wert von 4.43 (-log M) hervorzuheben. Hierdurch kommt es im Vergleich zur Substanz AF51 zu einem sprunghaften Anstieg der Selektivität auf 1.23 (-log M) zugunsten des SUR2B-Typs.

Die beiden Cyclohexyl-Derivate AF39 und AF38 (Abb. 3.2.13 bzw. 3.2.14) zeigen an beiden untersuchten Rezeptorsystemen eine ähnliche relative Wirkstärke wie AF49. Dabei erreicht das mit "spacer" synthetisierte AF38, einen leicht höheren pEC₅₀-Wert von 5.83 (-log M) an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen sowie eine Selektivität von 1.51 (-log M) zugunsten des SUR2B-Typs. Die höchste ermittelte Selektivität von 2.64 (-log M) erreicht das mit einem Adamantyl-Rest in Position 3' substituierte DAD13 (Abb. 3.2.15). Die hohe Selektivität setzt sich aus der im Vergleich zu AF38 höheren pEC₅₀ von 6.09 (-log M) an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen, sowie dem Verlust relativer Wirkstärke an CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen mit einem extrapolierten pEC₅₀-Wert von 3.26 (-log M) zusammen.

In Position 3' wurden weiterhin auch aromatische Substitutionen in Form eines Thiophen-(AF45) und zwei Cylcophenyl-Derivaten AF42 und AF41 vorgenommen. Für das Thiophen-Derivat AF45 (Abb. 3.2.16) wurde an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen eine pEC₅₀ von 5.13 (-log M) gemessen; der pEC₅₀-Wert an CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen betrug 4.30 (-log M). Im Vergleich zum Cyclopentyl AF51 ohne "spacer" sind die gemessenen relativen Wirkstärken des Derivats AF45 um etwa den Faktor zehn geringer.

Das Derivat AF42 (Abb. 3.2.17), dessen Cyclophenyl-Rest direkt am Diazoxid-Derivat ansetzt, zeigte mit dem Thiophenderivat AF45 vergleichbare relative Wirkstärken. Dagegen konnte für das Cyclophenyl-Derivat mit "spacer" (AF41, Abb. 3.2.18) an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen in DiBAC₄(3)-Membranpotentialtests eine pEC₅₀ von 5.55 (-log M) gemessen werden; die relative Wirkstärke an CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen ist an allen planaren Substitutionen in Position 3' vergleichbar (pEC₅₀ \approx 4.3 (-log M)). Eine Nachmessung mit dem Membranpotentialmarker DyeB an HEK293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen in Anhang A (Kap. A2.3.1) ergab einen geringgradig niedrigeren pEC₅₀-Wert von 5.21 ± 0.03 (-log M) und eine geringere spezifsche K_{ATP}-Kanal-Wirkung an

CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen, welche zu einer geringen Unterschätzung der Selektivität von AF41 führt.

Neben den bisher beschriebenen cyclischen Substitutionen in Position 3' wurden auch zwei nicht zyklische Butyl-Reste untersucht. Die zweithöchste extrapolierte Selektivität für den SUR2B/Kir6.1-Kanaltyp erzielte mit 1.86 (-log M) mit einem Isobutenyl-Substituent die Substanz AF57 (vgl. Abb. 3.2.20); ein erheblich kleinerer Substituent im Vergleich zum Adamantyl-Rest des DAD13, welches eine Selektivität von 2.64 (-log M) erreichte. Auch AF57 zeigte an CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen kaum messbare agonistische Effekte, bei einer gleichzeitig gemessenen pEC₅₀ von 5.41 (-log M) an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen. Im Vergleich zu AF57 erreicht die Substanz AF54 (Abb. 3.2.19) mit einem einfachen Butenyl-Rest in Position 3' (vgl.) an CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen eine höhere pEC₅₀ von 4.67 (-log M), bei beinahe identischer pEC₅₀ an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen; daraus resultiert eine um etwa Faktor 10 geringere Selektivität.



Hyperpolarisierende (agonistische) Membranpotentialwirkungen des Diazoxid-Derivats DAD1 (Br-Diazoxid)

a) oben

Originalexperiment an HEK293-(SUR2B /Kir6.1)-Zellen, welche mit 5 μ M DiBAC₄(3) markiert wurden. Der Wirkstoff wurde mit steigenden Konzentrationen von 400 nM bis 50 µM bei ca. 3 min injiziert. Ein Kanal blieb unbehandelt (control), ein anderer Kanal erhielt einen Maximalstimulus (3 µM KC399). Es wurden Gleichgewichtswirkungen bei ca. 40 min bestimmt und prozentual auf die darauf folgende maximale Hyperpolarisation durch 3 µM KC399 normiert.

b) Mitte

Original experiment an CHO-(SUR1/ Kir6.2)-Zellen, welche mit 5 μ M DiBAC₄(3) markiert wurden. Der Wirkstoff wurde mit steigenden Konzentrationen von 400 nM bis 100 μ M bei ca. 2 min injiziert. Ein Kanal blieb unbehandelt (control), ein anderer Kanal erhielt einen Maximalstimulus (30 μ M NNC414). Es wurden Gleichgewichtswirkungen bei ca. 65 min bestimmt und prozentual auf die darauf folgende maximale Hyperpolarisation durch 30 μ M NNC414 normiert.

c) unten

Dosiswirkungskurven für die Hyperpolarisation. Die nicht-lineare Regressionsanalyse der normierten Daten (Gl. 17) von n=6 Experimenten an **HEK293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen** mit DAD1 ergab einen pEC₅₀-Wert von 5.29 \pm 0.02 (-log M) und eine Steilheit p von 1.35 \pm 0.07.

Die Auswertung von n=10 Experimenten an CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen ergab einen pEC₅₀-Wert von 4.88 \pm 0.01 (-log M) und eine Steilheit p von 1.71 \pm 0.07.

Dosiswirkungskurven für hyperpolarisierende (agonistische) Membranpotentialwirkungen der Diazoxid-Derivate DAD2, DAD3 und DAD4

Zur Abschätzung der Selektivität unter Annahme einer 100%-igen Wirkung bei supramillimolaren Konzentrationen wurden mittels nichtlinearer Regressionsanalyse der normierten Daten (Gl. 17) extrapolierte Dosiswirkungskurven erstellt.

a) oben: DAD4

Die Auswertung von n=6 Experimenten an **HEK293-(SUR2B/Kir6.1)**-**Zellen** mit DAD4 ergab eine Dosiswirkungskurve mit einem pEC50-Wert von 4.35 ± 0.02 (-log M) und einer Steilheit p von 1.37 ± 0.07 . Die Auswertung von n=6 Experimenten an **CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen** ergab eine extrapolierte Dosiswirkungskurve mit einem pEC50-Wert von 3.79 ± 0.04 (-log M) und eine Steilheit p von 1.82 ± 0.25 .

b) Mitte: DAD2

Die Auswertung von n=6 Experimenten an CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen ergab einen theoretischen pEC_{50} -Wert von 3.58 ± 0.16 (-log M) und eine Steilheit p von 0.81 ± 0.22.

c) unten : DAD3

Die Auswertung von n=6 Experimenten an **HEK293-(SUR2B/Kir6.1)**-**Zellen** mit DAD3 ergab einen theoretischen pEC₅₀-Wert von 3.70 ± 0.05 (-log M) und eine Steilheit p von 1.28 ± 0.15 .

Die Auswertung von n=6 Experimenten an CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen ergab einen theoretischen pEC_{50} -Wert von 3.36 ± 0.14 (-log M) und eine Steilheit p von 1.31 ± 0.27.





Hyperpolarisierende (agonistische) Membranpotentialwirkungen des Diazoxid-Derivats DAD9

a) oben

Originalexperiment an **HEK293-**(SUR2B/Kir6.1)-Zellen, welche mit 5 µM DiBAC₄(3) markiert wurden. Der Wirkstoff wurde mit steigenden Konzentrationen von 400 nM bis 100 µM bei ca. 7 min injiziert. Ein Kanal blieb unbehandelt (control), ein anderer Kanal erhielt einen Maximalstimulus (3 µM KC399). Es wurden Gleichgewichtswirkungen bei ca. 46 min bestimmt und prozentual auf die darauf folgende maximale Hyperpolarisation durch 3 µM KC399 normiert.

b) Mitte

Originalexperiment CHOan (SUR1/Kir6.2)-Zellen, welche mit 5 µM DiBAC₄(3) markiert wurden. Der Wirkstoff wurde mit steigenden Konzentrationen von 200 nM bis 100 µM bei ca. 5 min injiziert. Ein Kanal unbehandelt (control), blieb ein anderer Kanal erhielt einen Maximalstimulus (30 µM NNC414). Es wurden Gleichgewichtswirkungen bei ca. 33 min bestimmt und prozentual auf die darauf folgende maximale Hyperpolarisation durch 30 µM NNC414 normiert.

c) unten

Dosiswirkungskurven für die Hyperpolarisation. Die nicht-lineare Regressionsanalyse der normierten Daten (Gl. 17) von n=6 Experimenten an **HEK293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen** mit DAD9 ergab einen pEC₅₀-Wert von 4.51 ± 0.03 (-log M) und eine Steilheit p von 1.13 ± 0.07 .

Die Auswertung von n=6 Experimenten an CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen eine extrapolierte ergab Dosiswirkungskurve mit einem pEC₅₀-Wert theoretischen von 3.56 ± 0.13 (-log M) und einer Steilheit p von 0.95 ± 0.22.

Hyperpolarisierende (agonistische) Membranpotentialwirkungen des Diazoxid-Derivats DAD11

a) oben

luorescence Originalexperiment an **HEK293-**(SUR2B/Kir6.1)-Zellen, welche mit 5 µM DiBAC4(3) markiert wurden. Der Wirkstoff wurde mit steigenden Konzentrationen von 100 nM bis 50 µM bei ca. 5 min injiziert. Ein Kanal blieb unbehandelt (control), ein anderer Kanal erhielt einen Maximalstimulus (3 µM wurden KC399). Es Gleichgewichtswirkungen bei ca. 53 min bestimmt und prozentual auf darauf folgende die maximale Hyperpolarisation durch 3 µM KC399 normiert.

b) Mitte Originalexperiment an **CHO-(SUR1/-% Kir6.2)-Zellen**, welche mit 5 μM DiBAC₄(3) markiert wurden. Nach Versuchspuffer ohne Wirkstoff bei ca. 4 min wurde eine Einzelkonzentration Ξ von 50 µM DAD11 bei ca. 37 min injiziert. Ein Kanal blieb unbehandelt (control), ein anderer Kanal erhielt einen Maximalstimulus (30 μM H NNC414). Es wurden Gleich- ö gewichtswirkungen bei ca. 75 min Z bestimmt und prozentual auf die darauf folgende maximale Hyperpolarisation durch 30 µM NNC414 normiert.

c) unten

Dosiswirkungskurven für die Hyperpolarisation. Die nicht-lineare Regressionsanalyse der normierten Daten (Gl. 17) von n=9 Experimenten HEK293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen an mit DAD11 ergab eine Dosis-wirkungskurve mit einem pEC₅₀-Wert von 4.95 ± 0.04 (-log M) und einer Steilheit p von 1.38 ± 0.13. Die Auswertung von n=6 Experimenten an CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen ergab für die höchste untersuchte Konzentration von 50 µM eine agonistische Wirkung von 3.57 ± 1.36 %.





Dosiswirkungskurven für hyperpolarisierende (agonistische) Membranpotentialwirkungen der Diazoxid-Derivate DAD7 und DAD8

a) oben: DAD7

Die nicht-lineare Regressionsanalyse der normierten Daten (Gl. 17) von n=6 Experimenten an **HEK293-**(**SUR2B/Kir6.1)-Zellen** mit DAD7 ergab eine Dosiswirkungskurve mit einem pEC₅₀-Wert von 4.06 ± 0.03 (-log M) und einer Steilheit p von 1.29 ± 0.11 .

Die Auswertung von n=8 Experimenten an CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen ergab einen pEC₅₀-Wert von 3.78 ± 0.03 (-log M) und eine Steilheit p von 1.32 ± 0.13 .

b) unten: DAD8

Die nicht-lineare Regressionsanalyse der normierten Daten (Gl. 17) von n=6 Experimenten an **HEK293-**(**SUR2B/Kir6.1)-Zellen** mit DAD8 ergab eine Dosiswirkungskurve mit einem pEC₅₀-Wert von 4.00 ± 0.02 (-log M) und einer Steilheit p von 1.28 ± 0.08 .

Die Auswertung von n=6 Experimenten an CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen ergab für die höchste untersuchte Konzentration von 100 μ M eine agonistische Wirkung von 1.67 ± 0.68 %.

Dosiswirkungskurven für hyperpolarisierende (agonistische) Membranpotentialwirkungen der Diazoxid-Derivate DAD10 und DAD12

a) oben: DAD10

Die nicht-lineare Regressionsanalyse der normierten Daten (Gl. 17) von n=6 Experimenten an **HEK293-**(SUR2B/Kir6.1)-Zellen mit DAD10 ergab eine Dosiswirkungskurve mit einem pEC₅₀-Wert von 4.04 ± 0.03 (-log M) und einer Steilheit p von 1.31 ± 0.11 .

Die Auswertung von n=6 Experimenten an CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen ergab für eine Konzentration von 100 μ M eine agonistische Wirkung von 6.78 ± 1.12 %.

b) unten: DAD12

Dosiswirkungskurven für die Hyperpolarisation. Die nicht-lineare Regressionsanalyse der normierten Daten (Gl. 17) von n=6 Experimenten an **HEK293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen** mit DAD12 ergab eine Dosiswirkungskurve mit einem pEC₅₀-Wert von 4.26 \pm 0.02 (-log M) und einer Steilheit p von 1.06 \pm 0.05.

Die Auswertung von n=6 Experimenten an CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen ergab für die höchste untersuchte Konzentration von 100 μ M eine agonistische Wirkung von 10.7 ± 1.36 %.





Hyperpolarisierende (agonistische) Membranpotentialwirkungen des Diazoxid-Derivats AF56

a) oben

Originalexperiment an HEK293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen, welche mit 5 µM DiBAC₄(3) markiert wurden. Der Wirkstoff wurde mit steigenden Konzentrationen von 100 nM bis 25 µM bei ca. 2 min injiziert. Ein Kanal blieb unbehandelt (control), ein anderer Kanal erhielt einen Maximalstimulus (3 µM KC399). Es wurden Gleichgewichtswirkungen bei ca. 35 min bestimmt und prozentual auf die darauf folgende maximale Hyperpolarisation durch 3 µM KC399 normiert.

b) Mitte

Original experiment an CHO-(SUR1/-Kir6.2)-Zellen, welche mit 5 µM DiBAC₄(3) markiert wurden. Der Wirkstoff wurde mit steigenden Konzentrationen von 400 nM bis 50 µM bei ca. 4 min injiziert. Ein Kanal blieb unbehandelt (control), ein anderer Kanal erhielt einen Maximalstimulus (30 µM NNC414). Es wurden Gleichgewichtswirkungen 60 min bestimmt und bei ca. prozentual auf die darauf folgende maximale Hyperpolarisation durch 30 µM NNC414 normiert.

c) unten

Dosiswirkungskurven für die Hyperpolarisation. Die nicht-lineare Regressionsanalyse der normierten Daten (Gl. 17) von n=6 Experimenten an HEK293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen mit AF56 ergab eine Dosiswirkungskurve mit einem pEC50-Wert von 6.04 ± 0.03 (-log M) und einer Steilheit p von 1.18 ± 0.09 . Die Auswertung von n=6 Experi-CHO-(SUR1/Kir6.2)menten an Zellen ergab einen pEC₅₀-Wert von 5.47 ± 0.02 und (-log M) eine Steilheit p 1.86 ± 0.14.

Kap. 3.2

Hyperpolarisierende (agonistische) Membranpotentialwirkungen des Diazoxid-Derivats AF55

a) oben

Originalexperiment an HEK293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen, welche mit 5 µM DiBAC₄(3) markiert wurden. Der Wirkstoff wurde mit steigenden Konzentrationen von 200 nM bis 50 M bei ca. 3 min injiziert. Ein Kanal blieb unbehandelt (control), ein anderer Kanal erhielt einen Maximalstimulus (3 µM KC399). Es wurden Gleichgewichtswirkungen bei ca. 40 min bestimmt und prozentual auf die darauf folgende maximale Hyperpolarisation durch 3 µM KC399 normiert.

b) Mitte

Original experiment an CHO-(SUR1/-Kir6.2)-Zellen, welche mit 5 µM DiBAC₄(3) markiert wurden. Der Wirkstoff wurde mit steigenden Konzentrationen von 200 nM bis 50 µM bei ca. 3 min injiziert. Ein Kanal blieb unbehandelt (control), ein anderer Kanal erhielt einen Maximalstimulus (30 µM NNC414). Es wurden Gleichgewichtswirkungen 40 min bestimmt und bei ca. prozentual auf die darauf folgende maximale Hyperpolarisation durch 30 µM NNC414 normiert.

c) unten

Dosiswirkungskurven für die Hyperpolarisation. Die nicht-lineare Regressionsanalyse der normierten Daten (Gl. 17) von n=6 Experimenten an HEK293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen mit AF55 ergab eine Dosiswirkungskurve mit einem pEC50-Wert von 6.22 ± 0.02 (-log M) und einer Steilheit p von 1.37 ± 0.08 . Die Auswertung von n=6 Experimenten an CHO-(SUR1/-Kir6.2)-Zellen ergab eine Dosiswirkungskurve mit einem pEC₅₀-Wert von 5.14 ± 0.02 (-log M) und eine Steilheit p 1.39 ± 0.09 .





Hyperpolarisierende (agonistische) Membranpotentialwirkungen des Diazoxid-Derivats AF53

a) oben

Originalexperiment an HEK293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen, welche mit 5 µM DiBAC₄(3) markiert wurden. Der Wirkstoff wurde mit steigenden Konzentrationen von 200 nM bis 25 µM bei ca. 3 min injiziert. Ein Kanal blieb unbehandelt (control), ein anderer Kanal erhielt einen Maximalstimulus (3 µM KC399). Es wurden Gleichgewichtswirkungen bei ca. 45 min bestimmt und prozentual auf die darauf folgende maximale Hyperpolarisation durch 3 µM KC399 normiert.

b) Mitte

Originalexperiment an CHO-(SUR1/-Kir6.2)-Zellen, welche mit 5 μ M DiBAC₄(3) markiert wurden. Der Wirkstoff wurde mit steigenden Konzentrationen von 200 nM bis 50 μ M bei ca. 2 min injiziert. Ein Kanal blieb unbehandelt (control), ein anderer Kanal erhielt einen Maximalstimulus (30 μ M NNC414). Es wurden Gleichgewichtswirkungen bei ca. 45 min bestimmt und prozentual auf die darauf folgende maximale Hyperpolarisation durch 30 μ M NNC414 normiert.

c) unten

Dosiswirkungskurven für die Hyperpolarisation. Die nicht-lineare Regressionsanalyse der normierten Daten (Gl. 17) von n=7 Experimenten an **HEK293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen** mit AF53 ergab einen pEC₅₀-Wert von 5.84 \pm 0.02 (-log M) und eine Steilheit p von 1.29 \pm 0.06.

Die Auswertung von n=6 Experimenten an CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen ergab einen pEC₅₀-Wert von 5.09 ± 0.04 (-log M) und eine Steilheit p von 1.29 ± 0.14 .

AF51 C

3.5 -

3.1

1.9

Abb. 3.2.11

Hyperpolarisierende (agonistische) Membranpotentialwirkungen des **Diazoxid-Derivats AF51**

a) oben

Originalexperiment an HEK293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen, welche mit 5 µM DiBAC₄(3) markiert wurden. Der vurkston wurde mit steigenden Kon-zentrationen von 100 nM bis 50 µM bei ca. 5 min injiziert. Ein Kanal blieb unbehandelt (control), ein anderer Kanal erhielt einen Maximalstimulus (3 µM KC399). Es wurden Gleich-gewichtswirkungen bei ca. 50 min Wirkstoff wurde mit steigenden Kongewichtswirkungen bei ca. 50 min bestimmt und prozentual auf die darauf folgende maximale Hyperpolarisation durch 3 µM KC399 normiert.

b) Mitte

Original experiment an CHO-(SUR1/-**Kir6.2)-Zellen**, welche mit $5 \mu M$ DiBAC₄(3) markiert wurden. Der Wirkstoff wurde mit steigenden Konzentrationen von 100 nM bis 50 µM bei ca. 5 min injiziert. Ein Kanal blieb unbehandelt (control), ein anderer Normalized Kanal erhielt einen Maximalstimulus (30 µM NNC414). Es wurden Gleichgewichtswirkungen bei ca. 75 min bestimmt und prozentual auf die darauf folgende maximale Hyperpolarisation durch 30 µM NNC414 normiert.

c) unten

Dosiswirkungskurven für die Hyperpolarisation. Die nicht-lineare Regressionsanalyse der normierten Daten (Gl. 17) von n=6 Experimenten an HEK293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen mit AF51 ergab einen pEC₅₀-Wert von 6.09 ± 0.02 (-log M) und eine Steilheit p von 1.42 ± 0.07 . Die Auswertung von n=6 Experimenten CHO-(SUR1/Kir6.2)-

an Zellen ergab eine Dosiswirkungskurve mit einem pEC50-Wert von 5.39 ± 0.02 (-log M) und eine Steilheit p von 1.11 ± 0.06.





AF51 [µM]

control

0.1

0.4

0.8

1.6

3.2 6.3 12.5 25.0

50.0 $3\,\mu M$ KC399

80

AF51

[µM]

0.1

0.4

0.8

1.6 3.2

6.3

12.5

25.0

50.0

30 µM NNC414

control

[min]

30 μM NNC414

3 µM KC399

60

¢

C



Hyperpolarisierende (agonistische) Membranpotentialwirkungen des Diazoxid-Derivats AF49

a) oben

Originalexperiment an **HEK293-**(SUR2B/Kir6.1)-Zellen, welche mit 5 µM DiBAC₄(3) markiert wurden. Der Wirkstoff wurde mit steigenden Konzentrationen von 100 nM bis 50 µM bei ca. 3 min injiziert. Ein Kanal blieb unbehandelt (control), ein anderer Kanal erhielt einen Maximalstimulus (3 µM KC399). Es wurden Gleichgewichtswirkungen bei ca. 45 min bestimmt und prozentual auf die darauf folgende maximale Hyperpolarisation durch 3 µM KC399 normiert.

b) Mitte

Original experiment an CHO-(SUR1/-Kir6.2)-Zellen, welche mit 5 µM DiBAC₄(3) markiert wurden. Der Wirkstoff wurde mit steigenden Konzentrationen von 100 nM bis 50 µM bei ca. 4 min injiziert. Ein Kanal blieb unbehandelt (control), ein anderer Kanal erhielt einen Maximalstimulus (30 µM NNC414). Es wurden Gleichgewichtswirkungen 40 min bestimmt und bei ca. prozentual auf die darauf folgende maximale Hyperpolarisation durch 30 µM NNC414 normiert.

c) unten

Dosiswirkungskurven für die Hyperpolarisation. Die nicht-lineare Regressionsanalyse der normierten Daten (Gl. 17) von n=6 Experimenten HEK293-(SUR2B/Kir6.1Zellen an mit AF49 ergab einen pEC₅₀-Wert von 5.66 ± 0.03 (-log M) und eine Steilheit p von 1.36 ± 0.12 . Die Auswertung von n=10 Experimenten an CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen ergab einen pEC₅₀-Wert von 4.43 ± 0.02 (-log M) und eine Steilheit p von 0.89 ± 0.03 .

Hyperpolarisierende (agonistische) Membranpotentialwirkungen des Diazoxid-Derivats AF39

a) oben

Fluorescence Originalexperiment an HEK293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen, welche mit 5 µM DiBAC₄(3) markiert wurden. zed Der Wirkstoff wurde mit steigenden Konzentrationen von 200 nM bis : 25 µM bei ca. 5 min injiziert. Ein Kanal blieb unbehandelt (control), ein anderer Kanal erhielt einen Maxi- Z malstimulus (3 µM KC399). Es wurden Gleichgewichtswirkungen bei ca. 70 min bestimmt und prozentual auf die darauf folgende maximale Hyperpolarisation durch 3 µM KC399 normiert.

b) Mitte

escence. Originalexperiment CHOan (SUR1/Kir6.2)-Zellen, welche mit 5 μ M DiBAC₄(3) markiert wurden. Der Fluor Wirkstoff wurde mit steigenden Konzentrationen von $3.2 \ \mu M$ bis 50 µM bei ca. 2 min injiziert. Ein anderer Kanal erhielt einen Maximalstimulus (30 μ M NNC414). Es wurden Gleichgewichtswirkungen bei ca. 50 min bestimmt und prozentual Z auf die darauf folgende maximale Hyperpolarisation durch 30 uM NNC414 normiert.

c) unten

Dosiswirkungskurven für die Hyperpolarisation. Die nicht-lineare Regressionsanalyse der normierten Daten (Gl. 17) von n=7 Experimenten an HEK293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen mit AF39 ergab einen pEC₅₀-Wert von 5.65 ± 0.02 (-log M) und eine Steilheit p von 1.35 ± 0.07 . Die Auswertung von n=10 Experi-CHO-(SUR1/Kir6.2)menten an Zellen ergab einen pEC₅₀-Wert von 4.31 ± 0.06 (-log M) und eine Steilheit p von 0.93 ± 0.13 .





Hyperpolarisierende (agonistische) Membranpotentialwirkungen des Diazoxid-Derivats AF38

a) oben

Originalexperiment an HEK293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen, welche mit 5 µM DiBAC₄(3) markiert wurden. Der Wirkstoff wurde mit steigenden Konzentrationen von 200 nM bis 25 µM bei ca. 4 min injiziert. Ein Kanal blieb unbehandelt (control), ein anderer Kanal erhielt einen Maximalstimulus (3 µM KC399). Es wurden Gleichgewichtswirkungen bei ca. 70 min bestimmt und prozentual auf die darauf folgende maximale Hyperpolarisation durch 3 µM KC399 normiert.

b) Mitte

Original experiment an CHO-(SUR1/-Kir6.2)-Zellen, welche mit 5 µM DiBAC₄(3) markiert wurden. Der Wirkstoff wurde mit steigenden Konzentrationen von 3.2 µM bis 50 µM bei ca. 2 min injiziert. Ein Kanal unbehandelt (control), blieb ein anderer Kanal erhielt einen Maximalstimulus (30 µM NNC414). Es wurden Gleichgewichtswirkungen bei ca. 40 min bestimmt und prozentual auf die darauf folgende maximale Hyperpolarisation durch 30 μM NNC414 normiert.

c) unten

Dosiswirkungskurven für die Hyperpolarisation. Die nicht-lineare Regressionsanalyse der normierten Daten (Gl. 17) von n=6 Experimenten an **HEK293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen** mit AF38 ergab einen pEC₅₀-Wert von 5.83 \pm 0.03 (-log M) und eine Steilheit p von 1.17 \pm 0.07. Die Auswertung von n=12 Experimenten an **CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen** ergab einen pEC₅₀-Wert von 4.32 \pm 0.08 (-log M) und eine

Steilheit p von 1.09 ± 0.25 .

Hyperpolarisierende (agonistische) Membranpotentialwirkungen des Diazoxid-Derivats DAD13

a) oben

Originalexperiment an HEK293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen, welche mit 5 µM DiBAC₄(3) markiert wurden. Der Wirkstoff wurde mit steigenden Konzentrationen von 100 nM bis 3.2 µM bei ca. 4 min injiziert. Ein Kanal blieb unbehandelt (control), ein anderer Kanal erhielt einen Maximalstimulus (3 µM KC399). Es wurden Gleichgewichtswirkungen bei ca. 50 min bestimmt und prozentual auf die darauf folgende maximale Hyperpolarisation durch 3 µM KC399 normiert.

b) Mitte

Original experiment an CHO-(SUR1/-Kir6.2)-Zellen, welche mit $5 \mu M$ DiBAC₄(3) markiert wurden. Der Wirkstoff wurde mit steigenden Konzentrationen von 100 nM bis 6.3 µM bei ca. 4 min injiziert. Ein Kanal blieb unbehandelt (control), ein anderer Kanal erhielt einen Maximalstimulus (30 µM NNC414). Es wurden minimale Wirkungen bei ca. 45 min bestimmt und prozentual auf die darauf folgende maximale Hyperpolarisation durch 30 µM NNC414 normiert.

c) unten

Dosiswirkungskurven für die Hyperpolarisation. Die nicht-lineare Regressionsanalyse der normierten Daten (Gl. 17) von n=6 Experimenten an HEK293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen mit DAD13 ergab einen pEC₅₀-Wert von 5.90 \pm 0.05 (-log M) und eine Steilheit p von 1.00 ± 0.09. Zur Abschätzung der Selektivität unter Annahme einer 100%-igen Wirkung in supramillimolaren Konzentrationen wurde mit n=7 Experi-CHO-(SUR1/Kir6.2)menten an Zellen ein theoretischer pEC₅₀-Wert von 3.26 ± 2.07 (-log M) und ein Steilheit p von 1.05 ± 1.63 extrapoliert.





Hyperpolarisierende (agonistische) Membranpotentialwirkungen des Diazoxid-Derivats AF45

a) oben

Originalexperiment an **HEK293-**(SUR2B/Kir6.1)-Zellen, welche mit 5 µM DiBAC₄(3) markiert wurden. Der Wirkstoff wurde mit steigenden Konzentrationen von 400 nM bis 25 µM bei ca. 5 min injiziert. Ein Kanal blieb unbehandelt (control), ein anderer Kanal erhielt einen Maximalstimulus (3 µM KC399). Es wurden Gleichgewichtswirkungen bei ca. 45 min bestimmt und prozentual auf die darauf folgende maximale Hyperpolarisation durch 3 µM KC399 normiert.

b) Mitte

Original experiment an CHO-(SUR1/-Kir6.2)-Zellen, welche mit 5 µM DiBAC₄(3) markiert wurden. Der Wirkstoff wurde mit steigenden Konzentrationen von 3.2 µM bis 50 µM bei ca. 6 min injiziert. Ein Kanal blieb unbehandelt (control), ein anderer Kanal erhielt einen Maximalstimulus (30 µM NNC414). Es wurden Gleichgewichtswirkungen bei ca. 40 min bestimmt und prozentual auf die darauf folgende maximale Hyperpolarisation durch 30 µM NNC414 normiert.

c) unten

Dosiswirkungskurven für die Hyperpolarisation. Die nicht-lineare Regressionsanalyse der normierten Daten (Gl. 17) von n=6 Experimenten an **HEK293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen** mit AF45 ergab einen pEC₅₀-Wert von 5.13 \pm 0.02 (-log M) und eine Steilheit p von 1.36 \pm 0.08.

Die Auswertung von n=6 Experimenten an CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen ergab einen pEC₅₀-Wert von 4.30 ± 0.02 (-log M) und eine Steilheit p von 1.80 ± 0.18 .

Hyperpolarisierende (agonistische) Membranpotentialwirkungen des Diazoxid-Derivats AF42

a) oben

Originalexperiment an HEK293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen, welche mit 5 µM DiBAC₄(3) markiert wurden. Der Wirkstoff wurde mit steigenden Konzentrationen von 400 nM bis 25 µM bei ca. 4 min injiziert. Ein Kanal blieb unbehandelt (control), ein anderer Kanal erhielt einen Maximalstimulus (3 µM KC399). Es wurden Gleichgewichtswirkungen bei ca. 60 min bestimmt und prozentual auf die darauf folgende maximale Hyperpolarisation durch 3 µM KC399 normiert.

b) Mitte

Original experiment an CHO-(SUR1/-Kir6.2)-Zellen, welche mit 5 µM DiBAC₄(3) markiert wurden. Der Wirkstoff wurde mit steigenden Konzentrationen von 3.2 µM bis 50 µM bei ca. 3 min injiziert. Ein Kanal blieb unbehandelt (control), ein anderer Kanal erhielt einen Maximalstimulus (30 µM NNC414). Es wurden Gleichgewichtswirkungen 50 min bestimmt und bei ca. prozentual auf die darauf folgende maximale Hyperpolarisation durch 30 µM NNC414 normiert.

c) unten

Dosiswirkungskurven für die Hyperpolarisation. Die nicht-lineare Regressionsanalyse der normierten Daten (Gl. 17) von n=6 Experimenten an **HEK293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen** mit AF42 ergab einen pEC₅₀-Wert von 4.98 \pm 0.03 (-log M) und eine Steilheit p von 1.35 \pm 0.11. Die Auswertung von n=6 Experimenten an **CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zel-Ien** ergab einen pEC50-Wert von 4.34 \pm 0.03 (-log M) und eine Steilheit p von 1.72 \pm 0.25.





Hyperpolarisierende (agonistische) Membranpotentialwirkungen des Diazoxid-Derivats AF41

a) oben

Originalexperiment an **HEK293-**(SUR2B/Kir6.1)-Zellen, welche mit 5 μ M DiBAC₄(3) markiert wurden. Der Wirkstoff wurde mit steigenden Konzentrationen von 0.2 µM bis 25 µM bei ca. 3 min injiziert. Ein Kanal blieb unbehandelt (control), ein anderer Kanal erhielt einen Maximalstimulus (3 µM KC399). Es wurden Gleichgewichtswirkungen bei ca. 40 min bestimmt und prozentual auf die darauf folgende maximale Hyperpolarisation durch 3 µM KC399 normiert.

b) Mitte

Originalexperiment CHOan (SUR1/-Kir6.2)-Zellen, welche mit 5 µM DiBAC₄(3) markiert wurden. Der Wirkstoff wurde mit steigenden Konzentrationen von 3.2 µM bis 50 µM bei ca. 3 min injiziert. Ein Kanal blieb unbehandelt (control), ein anderer Kanal erhielt einen Maximalstimulus (30 µM NNC414). Es wurden Gleichgewichtswirkungen bei ca. 55 min bestimmt und prozentual auf die darauf folgende maximale Hyperpolarisation durch 30 µM NNC414 normiert.

c) unten

Dosiswirkungskurven für die Hyperpolarisation. Die nicht-lineare Regressionsanalyse der normierten Daten (Gl. 17) von n=6 Experimenten an HEK293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen mit AF41 ergab eine Dosiswirkungskurve mit einem pEC50-Wert von 5.55 ± 0.03 (-log M) und einer Steilheit p von 1.25 ± 0.09. Die Auswertung von n=10 Experi-CHO-(SUR1/Kir6.2)menten an Zellen ergab einen pEC₅₀-Wert von 4.31 ± 0.01 und (-log M) eine Steilheit p von 1.76 ± 0.08.

Hyperpolarisierende (agonistische) Membranpotentialwirkungen des Diazoxid-Derivats AF54

a) oben

Originalexperiment an **HEK293-**(SUR2B/Kir6.1)-Zellen, welche mit 5 µM DiBAC₄(3) markiert wurden. Der Wirkstoff wurde mit steigenden Konzentrationen von 100 nM bis 25 µM bei ca. 3 min injiziert. Ein Kanal blieb unbehandelt (control), ein Kanal erhielt anderer einen Maximalstimulus (3 µM KC399). Es wurden Gleichgewichtswirkungen bei ca. 70 min bestimmt und prozentual auf die darauf folgende maximale Hyperpolarisation durch 3 µM KC399 normiert.

b) Mitte

Original experiment an CHO-(SUR1/-Kir6.2)-Zellen, welche mit 5 µM DiBAC₄(3) markiert wurden. Der Wirkstoff wurde mit steigenden Konzentrationen von 0.8 µM bis 50 µM bei ca. 5 min injiziert. Ein Kanal blieb unbehandelt (control), ein anderer Kanal erhielt einen Maximalstimulus (30 µM NNC414). Es wurden Gleichgewichtswirkungen bei ca. 60 min bestimmt und prozentual auf die darauf folgende maximale Hyperpolarisation durch 30 uM NNC414 normiert.

c) unten

Dosiswirkungskurven für die Hyperpolarisation. Die nicht-lineare Regressionsanalyse der normierten Daten (Gl. 17) von n=6 Experimenten an HEK293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen mit AF54 ergab einen pEC50-Wert von 5.46 ± 0.02 (-log M) und eine Steilheit p von 1.37 ± 0.08 . Die Auswertung von n=6 Experimenten an CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen ergab einen pEC₅₀-Wert von 4.67 ± 0.02 (-log M) und eine Steilheit p von 1.87 ± 0.10 .





Hyperpolarisierende (agonistische) Membranpotentialwirkungen des Diazoxid-Derivats AF57

a) oben

Originalexperiment an **HEK293-**(SUR2B/Kir6.1)-Zellen, welche mit 5 µM DiBAC₄(3) markiert wurden. Der Wirkstoff wurde mit steigenden Konzentrationen von 0.1 µM bis 25 µM bei ca. 3 min injiziert. Ein Kanal blieb unbehandelt (control), ein anderer Kanal erhielt einen Maximalstimulus (3 µM KC399). Es wurden Gleichgewichtswirkungen bei ca. 70 min bestimmt und prozentual auf die darauf folgende maximale Hyperpolarisation durch 3 µM KC399 normiert.

b) Mitte

Original experiment an CHO-(SUR1/-Kir6.2)-Zellen, welche mit 5 µM DiBAC₄(3) markiert wurden. Der Wirkstoff wurde mit steigenden Konzentrationen von 16 μ M bis 50 μ M bei ca. 3 min injiziert. Ein Kanal blieb unbehandelt (control), ein anderer Kanal erhielt einen Maximalstimulus (30 µM NNC414). Es wurden vernachlässigbar kleine Wirkungen erreicht, welche bei ca. 50 min bestimmt und prozentual auf die darauf folgende maximale Hyperpolarisation durch 30 µM NNC414 normiert.

c) unten

Dosiswirkungskurven für die Hyperpolarisation. Die nicht-lineare Regressionsanalyse der normierten Daten (Gl. 17) von n=7 Experimenten an HEK293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen mit AF57 ergab einen pEC50-Wert von 5.41 ± 0.02 (-log M) und eine Steilheit p von 1.25 ± 0.07 . Zur Abschätzung der Selektivität unter Annahme einer 100%-igen Wirkung in supramillimolaren Konzentrationen wurde aus n=8 Experimenten an CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen ein theoretischer pEC₅₀-Wert von 3.55 ± 0.07 (-log M) und eine Steilheit p von 1.24 ± 0.19 extrapoliert.

R2 H		[³ H]-P 1075	DiBAC ₄ (3)-Membranpotentialmessung				
	5' N	<u> </u>	.R1	A	В	Ć	Ď
_	Ĩ	Ĭ		HEK293-	HEK293-	CHO-	
71		_N		(SUR2B/Kir6.1)	(SUR2B/Kir 6.1)	$\frac{(SUR1/Kir6.2)}{\log M}$	
NJ	0	0		pr _D (-log ivi)	p∈∪ ₅₀ (-10g IVI) slope)	$\Delta (B-C)$
	R1	R2	R3	(n)	μ(<i>r</i> , , , , , , , , , , , , , , , , , , ,	ו)	(109 M)
Diazoxid				4.97 ± 0.02	5.14 ± 0.02	4.72 ± 0.02	0.42 ± 0.03
Abb 315	CH ₃		Cl		1.31 ± 0.08	1.80 ± 0.10	
100. 5.1.0				(4)	(6)	(8)	
DAD1				5.01 ± 0.03	5.29 ± 0.02	4.88 ± 0.01	0.40 ± 0.02
Abb. 3.2.2	CH ₃		Br		1.35 ± 0.07	1.71 ± 0.07	
				(4)	(6)	(10)	
DAD2				3.55 ± 0.05	3.82 ± 0.05 ^a	3.58 ± 0.16 ^a	0.23 ± 0.17
Abb 323	CH ₃	NO ₂	Cl		1.00 ± 0.00	0.81 ± 0.22	
100. 5.2.5				(4)	(10)	(6)	
DAD3				3.69 ± 0.03	3.70 ± 0.05 ^a	3.36 ± 0.14 ^a	0.34 ± 0.15
Abb. 3.2.3	CH_3	NH ₂	Cl		1.28 ± 0.15	1.31 ± 0.27	
				(4)	(6)	(6)	
DAD4			Phe-	4.50 ± 0.03	4.35 ± 0.02	3.79 ± 0.04 ^a	0.56 ± 0.04
Abb. 3.2.3	CH_3		nvl		1.37 ± 0.07	1.82 ± 0.25	
			пуг	(4)	(6)	(6)	
DAD7	HO			4.01 ± 0.02	4.06 ± 0.03	$3.78 \pm 0.03^{\text{a}}$	0.27 ± 0.04
Abb. 3.2.6					1.29 ± 0.11	1.32 ± 0.13	
	~			(4)	(6)		4. 1.0
DAD8				4.18 ± 0.02	4.00 ± 0.02	$1.6 / \pm 0.68 \%$	$\Delta > 1.0$
Abb. 3.2.6					1.28 ± 0.08	Effekt mit 100 µM	
				(4)	(6)	(0)	0.05 + 0.12
DADY	\frown			4.81 ± 0.03	4.51 ± 0.03	3.56 ± 0.13 "	0.95 ± 0.13
Abb. 3.3.5				(4)	(6)	(6)	
	~			(-)	$\frac{(0)}{4.04 \pm 0.03}$	$6.78 \pm 1.12\%$	$\Lambda > 1.0$
DADIO				5.75 ± 0.05	1.04 ± 0.05	0.78 ± 1.12 /0 Effekt mit 100 µM	$\Delta \ge 1.0$
Abb. 3.2.7	s_/			(4)	(6)	2)) en nu 100 più	
DAD11	<hr/>			5.19 ± 0.03	495 ± 0.04	$3.57 \pm 1.36\%$	$\Lambda > 1.4$
				0.00	1.38 ± 0.13	Effekt mit 50 μM	1.1
ADD. 3.2.3	M			(4)	(9)		
DAD12				4.50 ± 0.02	4.26 ± 0.02	10.7 ± 1.36 %	$\Delta > 0.8$
Abb. 3.2.7					1.06 ± 0.05	Effekt mit 100 μM	
				(4)	(6)		

Tab. 3-4: Vergleich von pEC₅₀-Werten der Membranpotential-Tests der Diazoxid-Derivate mit ihren Dissoziationskonstanten aus der Kompetitionsbindung mit [³H]-P 1075 (Teil1)

^a zur Abschätzung der Selektivität extrapolierter pEC₅₀-Wert unter der Annahme einer 100%-igen Wirkung in supramillimolaren Konzentrationen

		[³ H]-P 1075	DiBAC ₄ (3)-Membranpotentia	ialmessung		
		Α	В	С	D		
		HEK293-	HEK293-	СНО-			
	N N	(SUR2B/Kir6.1)	(SUR2B/Kir 6.1)	(SUR1/Kir6.2)			
CI +	/ ³ %	pK _D (-log M)	pEC ₅₀	(-log M)	Δ (B-C)		
		<i>4</i>	p(Hill	slope)	(-log M)		
	R1	(n)	(<u>n)</u>			
AF56		5.65 ± 0.02	6.04 ± 0.03	5.47 ± 0.02	0.57 ± 0.04		
Abb. 3.2.8	\triangle	(4)	1.18 ± 0.09	1.86 ± 0.14			
		(4)	(6)	(6)	1.00.0.02		
AF55	\square	6.02 ± 0.02	6.22 ± 0.02	5.14 ± 0.02	1.08 ± 0.03		
ADD. 3.2.9		(4)	1.37 ± 0.08	1.39 ± 0.09			
4 7 7 7 0		(4)	(6)				
AF53	\searrow	5.86 ± 0.02	5.84 ± 0.02	5.09 ± 0.04	0.75 ± 0.04		
ADD. 3.2.10		(4)	1.29 ± 0.00	1.29 ± 0.14			
		(4)	(/)	(6)			
AF51	\square	6.23 ± 0.03	6.09 ± 0.02	5.39 ± 0.02	0.70 ± 0.03		
ADD 3.2.11	\bigtriangledown	(\mathbf{A})	1.42 ± 0.07	1.11 ± 0.00			
		(4)			1.00 + 0.04		
AF49	\rightarrow	5.97 ± 0.03	5.66 ± 0.03	4.43 ± 0.02	1.23 ± 0.04		
ADD 3.2.12	$\langle \rangle$	(\mathbf{A})	1.30 ± 0.12	0.89 ± 0.03			
4 520	~	(4)	(6)		1.24 + 0.06		
AF39	\frown	5.85 ± 0.02	5.65 ± 0.02	4.31 ± 0.06	1.34 ± 0.06		
Abb 3.2.13			1.35 ± 0.07	0.93 ± 0.13			
	~	(4)	(7)	(10)			
AF38	\searrow	5.94 ± 0.03	5.83 ± 0.03	4.32 ± 0.08	1.51 ± 0.09		
ADD 3.2.14			$1.1/\pm 0.0/$	1.09 ± 0.25			
	~	(4)	(6)	(12)	2 (1) 2 07		
DAD13	\rightarrow	6.09 ± 0.03	5.90 ± 0.05	(3.26 ± 2.07)	2.64 ± 2.07		
ADD 3.2.13	\mathcal{H}		1.00 ± 0.09	(1.05 ± 1.03)			
		(4)	(6)	(7)			
AF45		5.41 ± 0.02	5.13 ± 0.02	4.30 ± 0.02	0.83 ± 0.03		
Abb 3.2.16	s	(4)	1.36 ± 0.08	1.80 ± 0.18			
		(4)	(6)		0.64 - 0.04		
AF42		5.17 ± 0.03	4.98 ± 0.03	4.34 ± 0.03	0.64 ± 0.04		
ADD 3.2.17		(\mathbf{A})	1.35 ± 0.11	1.72 ± 0.25			
4.5.41		(4)	(6)		1.24 + 0.02		
AF41	\searrow	5.57 ± 0.03	$5.55 \pm 0.03^{\circ}$	$4.31 \pm 0.01^{\circ}$	1.24 ± 0.03		
AUU 5.2.10		(\mathbf{A})	1.25 ± 0.09	1.70 ± 0.08			
	~	(4)		(10)	0.70 + 0.02		
AF 54	\sim	5.32 ± 0.02	5.46 ± 0.02	$4.6 / \pm 0.02$	0.79 ± 0.03		
AUU 5.2.19	~ ~	(A)	$1.3 / \pm 0.08$	$1.0/\pm 0.10$			
				(0)	1.0(+ 0.07		
AF57 Abb 3 2 20	\searrow	$5.6 / \pm 0.02$	5.41 ± 0.02	(5.55 ± 0.07)	1.86 ± 0.07		
AUU 5.2.20		(A)	1.23 ± 0.07	(1.24 ± 0.19)			
		(4)	(7)	(8)			

Tab.	3-5:	Vergleich	von	pEC₅₀-Werten	der	Membran	potential-Tests	der	Diazoxid-Derivate	mit	ihren
Disso	ziatio	nskonstant	en au	is der Kompetitic	onsbi	ndung mit	^{[3} H]-P 1075 (Te	eil2)			

Die Werte in Klammern sind approximiert, da sie jenseits des untersuchten Konzentrationsbereichs liegen. Ergänzende Kontrollversuche an HEK293- und CHO-Wildtyp-Zellen mit DyeB befinden sich in Anhang A2.3.1. ^a Hinweis auf einen ausgeprägten unspezifischen Effekt (vgl. Anhang A2.3.1; Tab. A-5, A-6, A-7 und Abb. A6 und A7)

3.2.3 Kompetitionsbindung

Zur Bestimmung der Affinität der Diazoxid-Derivate wurden Kompetitionsbindungsversuche mit dem Radioliganden [³H]-P 1075 an adhärent wachsenden HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen durchgeführt. Die Messung ermöglicht durch die Bestimmung der Dissoziationskonstante pK_D eine Aussage über die Affinität einer Substanz zum SUR2B-Kir6.1-K_{ATP}-Kanal. Die einzelnen pK_D -Werte der Diazoxid-Derivate können den Tabellen 3-4 und 3-5 entnommen werden, während die Abbildungen 3.2.21 bis 3.2.25 die spezifische Bindung (B_s) in Abhängigkeit von der eingesetzten Substanzkonzentration als normsteile Kompetitionskurven darstellen.

Zur Orientierung über die Möglichkeiten zur Modifikation des Diazoxid-Moleküls wurde zunächst eine erste Synthesephase durchgeführt, deren Messwerte Tabelle 3-4 entnommen werden können.

Dabei wurde für die Muttersubstanz Diazoxid selbst an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen ein pK_D -Wert von 4.97 (-log M) gemessen. Eine nur geringfügig veränderte Affinität wurde für das in Position 7' bromierte Derivat DAD1 mit einem pK_D -Wert von 5.01 (-log M) ermittelt (Abb. 3.2.21 oben). Dagegen zeigte sich für die in Position 5' substituierten Substanzen DAD2 und DAD3 im Vergleich zu Diazoxid ein deutlicher Affinitätsverlust mit extrapolierten pK_D -Werten kleiner 4.0 (-log M; Abb. 3.2.21 unten). Auch für die Substanzen DAD4 und DAD7 mit einem Phenyl in Position 7' bzw. einem Salicyl-Rest in Position 3' wurden mit pK_D -Werten von 4.50 (-log M) bzw. 4.01 (-log M) schwächere Affinitäten gemessen als für Diazoxid selbst (Abb. 3.2.22).

Eine zweite Synthesephase (Tab. 3-5) wurde aufgrund der Ergebnisse der Derivate DAD8, DAD9, DAD10, DAD11 sowie DAD12 mit einer Substitution in Position 3' durchgeführt: sie zeichneten sich in der Fluoreszenzmessung durch eine hohe Selektivität für den SUR2B-Kir6.1-K_{ATP}-Kanal aus; auch wenn die Affinität aufgrund eines fehlenden Chlors in Position 7' deutlich schwächer als die von Diazoxid selbst ist. Sie werden in den Abbildungen 3.2.23 bis 3.2.25 jeweils zusammen mit den entsprechend chlorierten Derivaten dargestellt und zeigen jeweils eine etwa Faktor 10 geringere Affinität. Die Derivate werden nachfolgend geordnet nach aufsteigender Größe ihres Restes in Position 3' beschrieben.

Bereits die Substitution der Substanz AF56 mit einem Cyclopropyl in Position 3' verbesserte die Affinität des Diazoxids bereits deutlich auf einen pK_D -Wert von 5.65 (-log M). Für die Substanzen AF55 und AF53, mit einem Cyclobutyl-Rest in Position 3', wurden leicht höhere pK_D -Werte gemessen (Abb. 3.2.23 oben). Hierbei zeigte sich die Variante ohne zusätzliches Brücken-C-Atom ("spacer") (AF55) mit einem pK_D -Wert von 6.02 (-log M) geringfügig affiner im Vergleich zu AF53 mit einem pK_D -Wert von 5.86 (-log M).

Das Cyclopentyl-Derivat ohne "spacer" AF51, zeigte mit einem pK_D-Wert von 6.23 (-log M) die höchste Affinität aller Diazoxid-Derivate; für die Substanz ohne "spacer" (AF49) wurde ein kleinerer pK_D-Wert von 5.97 (-log M) ermittelt (Abb. 3.2.23 unten). Bisher nahm vom Cyclopropyl über das Cyclobutyl hin zum Cyclopentyl die Affinität mit der Größe des cyclischen Substituenten zu; ein zusätzlicher "spacer" verringerte die Affinität. Bereits mit einer etwas größeren Ringstruktur wie dem Cyclohexyl-Rest der Substanzen AF38 und AF39 zeigt sich jedoch, dass die Affinitäten mit pK_D-Werten von 5.94 bzw. 5.85 (-log M) geringer sind als die der Substanzen mit Cyclopentylrest; AF38 mit einem zusätzlichem "spacer" ist geringfügig affiner als die AF39 ohne "spacer". Für die Substanz DAD13 mit einem Adamantyl-Rest wurde ein pK_D-Wert von 6.09 (-log M) ermittelt.

Die Substitution mit planaren Cyclophenyl-Resten der Substanzen AF41 und AF42 in Position 3' führt im Vergleich zu den Cyclohexyl-Derivaten zu einer geringeren Affinität. Für die Substanz ohne "spacer" (AF42) wurde hierbei ein pK_D-Wert von 5.17 (-log M) gemessen, welcher nur geringfügig eine bessere Affinität gegenüber Diazoxid selbst darstellt.

Die Substanz AF45 mit einem ebenfalls planaren Thiophen-Rest in Position 3' erreichte einen pK_{D} -Wert von 5.41 (-log M). Im Vergleich der Diazoxid-Derivate AF54 und AF57 mit 3'-Butenylbzw. Isobutenyl-Rest erreichte AF57 mit einem pK_{D} -Wert von 5.67 (-log M) eine beinahe doppelt so hohe Affinität wie AF54.



Abb. 3.2.21: Kompetitionsbindung von Diazoxid-Derivaten mit [³H]-P 1075 an HEK 293 SUR2B/Kir6.1-Zellen (n=4). Adhärente, in 96-well-Platten kultivierte Zellen werden mit dem Radioliganden und steigenden Konzentrationen der kompetierenden Liganden versehen (Lösungswechsel), deren geeignete Mischung vorher in Eppendorf-Cups hergestellt wurde. Die unspezifische Bindung wird mit 1 μ M P1075 bestimmt. Dargestellt wird die prozentual normierte spezifische Bindung (B_s). Die Daten werden mittels nicht-linearer Regressionsanalyse anhand Gl. 4 Ausgewertet.

a) oben:					
	$pK_D \pm ASD$ (-log	; М)		$pK_D \pm ASD$ (-log	M)
Δ DAD1	5.06 ± 0.02	n = 4	O DAD3	3.64 ± 0.02	n = 4
Diazoxid	4.71 ± 0.02	n = 4	Δ DAD2	3.55 ± 0.05	n = 4



Abb. 3.2.22: Kompetitionsbindung von Diazoxid-Derivaten mit [³H]-P 1075 an HEK 293 SUR2B/Kir6.1-Zellen (n=4). Adhärente, in 96-well-Platten kultivierte Zellen werden mit dem Radioliganden und steigenden Konzentrationen der kompetierenden Liganden versehen (Lösungswechsel), deren geeignete Mischung vorher in Eppendorf-Cups hergestellt wurde. Die unspezifische Bindung wird mit 1 μ M P1075 bestimmt. Dargestellt wird die prozentual normierte spezifische Bindung (B_s). Die Daten werden mittels nicht-linearer Regressionsanalyse anhand Gl. 4 ausgewertet.

		pK _D ± ASD (-log M)	
0	DAD4	4.50 ± 0.03	n = 4
Δ	DAD7	4.01 ± 0.02	n = 4



Abb. 3.2.23: Kompetitionsbindung von Diazoxid-Derivaten mit [${}^{3}H$]-P 1075 an HEK 293 SUR2B/Kir6.1-Zellen (n=4). Adhärente, in 96-well-Platten kultivierte Zellen werden mit dem Radioliganden und steigenden Konzentrationen der kompetierenden Liganden versehen (Lösungswechsel), deren geeignete Mischung vorher in Eppendorf-Cups hergestellt wurde. Die unspezifische Bindung wird mit 1 µM P1075 bestimmt. Dargestellt wird die prozentual normierte spezifische Bindung (B_s). Die Daten werden mittels nicht-linearer Regressionsanalyse anhand Gl. 4 ausgewertet.

a) oben:		-		b) unten:		
		$pK_D \pm ASD$ (-log N	1)		pK _D ± ASD (-log l	M)
0	AF55	6.02 ± 0.02	n = 4	O AF51	6.23 ± 0.03	n = 4
\triangle	AF53	5.86 ± 0.02	n = 4	△ AF49	5.97 ± 0.03	n = 4
	AF56	5.65 ± 0.02	n = 4			



Abb. 3.2.24: Kompetitionsbindung von Diazoxid-Derivaten mit [3H]-P 1075 an HEK 293 SUR2B/Kir6.1-Zellen (n=4). Adhärente, in 96-well-Platten kultivierte Zellen werden mit dem Radioliganden und steigenden Konzentrationen der kompetierenden Liganden versehen (Lösungswechsel), deren geeignete Mischung vorher in Eppendorf-Cups hergestellt wurde. Die unspezifische Bindung wird mit 1 µM P1075 bestimmt. Dargestellt wird die prozentual normierte spezifische Bindung (B_s). Die Daten werden mittels nicht-linearer Regressionsanalyse anhand Gl. 4 ausgewertet.

a) oben:			b) unten:				
		$pK_D \pm ASD$ (-log M)				$pK_D \pm ASD$ (-log M)	
0	AF38	5.94 ± 0.03	n = 4	0	AF41	5.57 ± 0.03	n =4
\triangle	AF39	5.85 ± 0.02	n = 4	\triangle	AF42	5.17 ± 0.03	n=4
	DAD9	4.81 ± 0.03	n = 4		DAD8	4.18 ± 0.02	n=4

a) oben:



Abb. 3.2.25: Kompetitionsbindung von Diazoxid-Derivaten mit [³H]-P 1075 an HEK 293 SUR2B/Kir6.1-Zellen (n=4). Adhärente, in 96-well-Platten kultivierte Zellen werden mit dem Radioliganden und steigenden Konzentrationen der kompetierenden Liganden versehen (Lösungswechsel), deren geeignete Mischung vorher in Eppendorf-Cups hergestellt wurde. Die unspezifische Bindung wird mit 1 μ M P1075 bestimmt.Dargestellt wird die prozentual normierte spezifische Bindung (B_S). Die Daten werden mittels nicht-linearer Regressionsanalyse anhand GI. 4 ausgewertet.

b) unten:

		$pK_D \pm ASD$ (-log M)				$pK_D \pm ASD (-log M)$	
0	DAD11	5.19 ± 0.03	n = 4	0	AF57	5.67 ± 0.02	n = 4
\triangle	DAD13	6.09 ± 0.03	n = 4	Δ	AF54	5.32 ± 0.02	n = 4
					DAD12	4.18 ± 0.02	n = 4

3.3 Benzofuran-Derivate

3.3.1 Physikochemische Eigenschaften

Tab. 3-6: Molekulargewicht und Lipophilie ((S+logP) der Benzofuran-Derivate	е
	Malalalargawight (g/mal)	

				Molekulargewicht (g/mol)
	R1	R2	R3	S+logP
DSL154	1			190.3
	—si—			4.2
DSL141	, S			191.3
	│ —<			2.4
DSL186	, S			205.3
	N			2.7
DSL189	,S			233.3
	→(N	/		3.5
DSL190	S			233.3
	-≪ [™] +			3.4
DSL238	,, ^S			233.3
	N-			3.5
DSL184	S			270.2
	N		Br	3.3
DSL187	=			270.2
	́		Br	3.3
DSL181	^S			207.3
	N	CH₂OH		2.5
DSL217	// ^S			221.3
	~	CH₂OH		2.9
DSL177		S. N		205.3
	CH₃	7		2.0
AF84	~//	s		303.4
	$\langle $			3.5
DSL262	s			233.3
	N	CH₃	СFз	3.4



3.3.2 Membranpotentialmessung mittels Fluoreszenz

Mit den Benzofuran-Derivaten wird eine neue Substanzklasse als K_{ATP} -Kanalöffner untersucht. Dafür wurden Benzofuran-Derivate an drei chemisch zugänglichen Positionen des Benzofuran-Moleküls substituiert. Analog zu den Diazoxid-Derivaten wurden die Benzofuran-Derivate hinsichtlich ihrer relativen Wirkstärke an CHO-



Abb. 3.3.1: Benzofuran-Grundgerüst

(SUR1/Kir6.2)-Zellen sowie HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen untersucht. Die Darstellungen von Beispielexperimenten und Dosiswirkungskurven befinden sich in den Abb. 3.3.2 bis 3.3.13; tabellarisch aufbereitete Daten finden sich in Tabelle 3-8. Kontrolluntersuchungen zum Ausschluss für den K_{ATP}-Kanal unspezifischer Effekte wurden in Anhang A (Kap. A2.3.2) dokumentiert.

Ein SiH₃-Substitution in Position 2' des Benzofuran-Moleküls (DSL154, vgl. Abb. 3.3.2) erwies sich an beiden untersuchten Zellsystemen mit einer extrapolierten relativen Wirkstärke im submillimolaren Bereich als kaum wirksam. Dagegen zeigten 2'-Substitutionen, welche auf einem Thioamid aufbauten als wirksamer: hierbei konnte mit zunehmender Größe der Kohlenwasserstoffkette eine moderate Zunahme der Wirksamkeit an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen von 4.58 \pm 0.02 (-log M) mit DSL141 (Methyl-Thioamid) über 4.65 \pm 0.02 (-log M) mit DSL186 (Ethyl-Thioamid) auf 4.81 \pm 0.03 (-log M) mit DSL189 (Butyl-Thioamid) festgestellt werden. Ein Derivat mit einem 2'-Tert-Butyl-Thioamid-Rest (DSL190) ergab eine mit DSL189 vergleichbare relative Wirksamkeit von 4.72 \pm 0.04 (-log M) an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen. Die Ergänzung der Thioamid-Gruppe am Stickstoffatom um einen Phenylring (DSL238) führte dagegen zu einem deutlichen Wirkverlust.

Die bisher erwähnten Substanzen zeigten jeweils eine deutliche Selektivität zu Gunsten des (SUR2B/Kir6.1)-K_{ATP}-Kanals auch aufgrund der geringen agonistischen Wirkung an CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen von jeweils weniger als 10 % für eine Konzentration von 25 μ M; eine Ausnahme stellten die Substanzen DSL186 und DSL190 mit einer agonistischen Wirkung zwischen 15 und 20 % dar.

Die Substanzen DSL141 und DSL186 wurden durch weitere Substitutionen in Position 3' und/oder 5' des Benzofuran-Moleküls modifiziert. Das Substituieren der Substanzen DSL141 oder DSL186 in Position 5' mit einem zusätzlichen Brom-Atom führt zu den Substanzen DSL184 bzw. DSL187. Beide zeigen mit einer in DiBAC₄(3)-Membranpotentialtests ermittelten pEC₅₀ von 4.92 \pm 0.04 bzw. 4.93 \pm 0.04 (-log M) eine vermeintlich geringfügig höhere Wirksamkeit als ihre Ausgangssubstanz; Nachuntersuchungen in Anhang A (Kap. 2.3.2) mit dem Membranpotentialmarker DyeB schätzten die pEC₅₀-Werte unter Berücksichtung unspezifischer Effekte jedoch deutlich geringer (< 4.2 -log M). Für CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen zeigten das bromierte DSL184 bzw. DSL187 in der Konzentration von 25 μ M keine für den K_{ATP}-Kanal spezifische Wirkung (Anhang A, Kap. A2.3.2).

Auch die Substanzen DSL181 und DSL217 entsprechen den Substanzen DSL141 bzw. DSL186 jedoch mit einer zusätzlichen CH₂OH-Gruppe in Position 3^c des Benzofuran-Moleküls; für sie wurde an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen eine geringfügige Verminderung der relativen Wirkstärke gemessen. An CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen führte diese zusätzliche Substitution zu keiner Verbesserung der schwachen Wirksamkeit.

Die Substanz DSL177 stellt sich mit einer Thioamid-Gruppe mit Methyl-Rest am Amid in Position 3' sowie einer Methylgruppe in Position 2' dar. Für DSL177 wurde ein pEC₅₀ von 4.33 ± 0.03 (-log M) an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen gemessen.

Das einzige dreifach substituierte Benzofuran-Derivat DSL262 erreicht an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen eine pEC₅₀ von 4.74 ± 0.03 (-log M), sowie an CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen in einer Konzentration von 30 μ M einen agonistischen Effekt von 29.3 \pm 3.2 %.

Mit Wirkungen im einstelligen Prozentbereich an beiden untersuchten Kanaltypen stellte sich das Benzofuran-Derivat AF84 dar (nicht demonstriert).

Abschließend sei zur Interpretation der Daten erneut auf die im Anhang A (Kap. A2.3.2) dokumentierten Fluoreszenzeffekte an HEK293- und CHO-Wildtyp-Zellen verwiesen. Neben den bereits erwähnten Substanzen DSL184 und DSL187 zeigten auch die Substanzen DSL217 und DSL262 in einer Konzentration von 25 μ M in geringerem Ausmaß unspezifische Effekte (> 10 %), deren Bedeutung für die Bewertung der vorliegenden Substanzen jedoch vernachlässigt werden kann.



Abb. 3.3.2

Hyperpolarisierende (agonistische) Membranpotentialwirkungen des Benzofuran-Derivats DSL154

a) oben

Originalexperiment an HEK293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen, welche mit 5 µM DiBAC4(3) markiert wurden. Der Wirkstoff wurde mit steigenden Konzentrationen von 3.2 µM bis 50 µM bei ca. 7 min injiziert. Ein Kanal blieb unbehandelt (control), ein anderer Kanal erhielt einen Maximalstimulus (3 µM KC399). Es wurden Gleichgewichtswirkungen bei ca. 88 min bestimmt und prozentual auf die darauf folgende maximale Hyper-3 µM polarisation durch KC399 normiert.

b) Mitte

Originalexperiment CHOan (SUR1/Kir6.2)-Zellen, welche mit $5 \mu M$ DiBAC₄(3) markiert wurden. Der Wirkstoff wurde mit steigenden Konzentrationen von 3.2 µM bis 50 µM bei ca. 5 min injiziert. Ein Kanal blieb unbehandelt (control), ein anderer Kanal erhielt einen Maximalstimulus (30 µM NNC414). Es wurden nur vernachlässigbar kleine Wirkungen erreicht, welche prozentual bei ca. 67 min bestimmt und prozentual auf die darauf folgende maximale Hyperpolarisation durch 30 µM NNC414 normiert wurden. c) unten

) Extrapolierte Dosiswirkungskurven für die Hyperpolarisation.

Zur Abschätzung der Selektivität unter Annahme einer 100%-igen Wirkung bei supramillimolaren Konzentrationen wurde mittels nichtlinearer Regressionsanalyse der normierten Daten (Gl. 17) für HEK293(SUR2B/Kir6.1)-Zellen

(n=7) eine extrapolierte Dosiswirkungskurve mit einem pEC₅₀-Wert von 3.80 ± 0.01 (-log M) und einer Steilheit p von 1.08 ± 0.16 , bzw. für **CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen** (n=6) ein pEC₅₀-Wert von 2.90 ± 2.48 (log M) und eine Steilheit p von 1.28 ± 2.48 geschätzt.

Für eine Konzentration von 25 µM HEK293-**DSL154** wurde an (SUR2B/Kir6.1)-Zellen (n=7) bzw. CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen (n=6) Wirkung eine agonistische von 13.0 ± 2.5 % 3.7 ± 1.2 % bzw. ermittelt.

Kap. 3.3

Abb. 3.3.3

Hyperpolarisierende (agonistische) Membranpotentialwirkungen des Benzofuran-Derivats DSL141

a) oben

Originalexperiment an HEK293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen, welche mit 5 µM DiBAC₄(3) markiert wurden. Der Wirkstoff wurde mit steigenden Konzentrationen von 3.2 µM bis 50 µM bei ca. 4 min injiziert. Ein Kanal blieb unbehandelt (control), ein anderer Kanal erhielt einen Maximalstimulus (3 µM KC399). Es wurden Gleichgewichtswirkungen bei ca. 45 min bestimmt und prozentual auf die darauf folgende maximale Hyperpolarisation durch 3 µM KC399 normiert.

b) Mitte

Original experiment an CHO-(SUR1/-Kir6.2)-Zellen, welche mit 5 µM DiBAC₄(3) markiert wurden. Der Wirkstoff wurde mit steigenden Konzentrationen von $3.2 \ \mu M$ bis 50 μM bei ca. 5 min injiziert. Ein Kanal blieb unbehandelt (control), ein anderer Kanal erhielt einen Maximalstimulus (30 µM NNC414). Es wurden nur vernachlässigbar kleine Wirkungen erreicht, welche 70 min bestimmt und bei ca. prozentual auf die darauf folgende maximale Hyperpolarisation durch 30 µM NNC414 normiert wurden.

c) unten

Dosiswirkungskurven für die Hyperpolarisation. Die nicht-lineare Regressionsanalyse der normierten Daten (Gl. 17) von n=11 Experimenten an HEK293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen mit DSL141 ergab eine Dosiswirkungskurve mit einem pEC₅₀-Wert von 4.57 ± 0.02 (-log M) und einer Steilheit p von 1.16 ± 0.06. Zur ungefähren Abschätzung der Selektivität unter Annahme einer 100%-igen Wirkung bei supramillimolaren Konzentrationen, wurden n=6 Experimente CHOan (SUR1/Kir6.2)-Zellen ausgewertet eine extrapolierte Dosiswirkungskurve auf einen pEC₅₀-Wert von 3.86 ± 0.08 (-log M) und eine Steilheit p von 1.50 ± 0.08 geschätzt.




Hyperpolarisierende (agonistische) Membranpotentialwirkungen des Benzofuran-Derivats DSL186

a) oben

Originalexperiment an **HEK293-**(SUR2B/Kir6.1)-Zellen, welche mit 5 µM DiBAC₄(3) markiert wurden. Der Wirkstoff wurde mit steigenden Konzentrationen von 400 nM bis 50 µM bei ca. 3 min injiziert. Ein Kanal blieb unbehandelt (control), ein anderer Kanal erhielt einen Maximalstimulus (3 µM KC399). Es wurden Gleichgewichtswirkungen bei ca. 33 min bestimmt und prozentual auf die darauf folgende maximale Hyperpolarisation durch 3 µM KC399 normiert.

b) Mitte

Original experiment an CHO-(SUR1/-Kir6.2)-Zellen, welche mit 5 µM DiBAC₄(3) markiert wurden. Der Wirkstoff wurde mit steigenden Konzentrationen von 3.2 µM bis 50 µM bei ca. 5 min injiziert. Ein Kanal blieb unbehandelt (control), ein Kanal anderer erhielt einen Maximalstimulus (30 µM NNC414). Es wurden Gleichgewichtswirkungen bei ca. 56 min bestimmt und prozentual auf die darauf folgende maximale Hyperpolarisation durch 30 µM NNC414 normiert.

c) unten

Dosiswirkungskurven für die Hyperpolarisation. Die nicht-lineare Regressionsanalyse der normierten Daten (Gl. 17) von n=6 Experimenten an **HEK293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen** mit DSL186 ergab eine Dosiswirkungskurve mit einem pEC₅₀-Wert von 4.65 ± 0.02 (-log M) und einer Steilheit p von 1.04 ± 0.08 .

Die Auswertung von n=6 Experimenten an CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen ergab für eine Konzentration von 25 μ M eine agonistische Wirkung von 19.8 ± 1.8 %.

Eine extrapolierte Dosiswirkungskurve wurde unter der Annahme einer 100%-igen Wirkung bei supramillimolaren Konzentrationen auf einen pEC₅₀-Wert von 4.03 ± 0.05 (-log M) und eine Steilheit p von 1.03 ± 0.12 geschätzt.

Hyperpolarisierende (agonistische) Membranpotentialwirkungen des Benzofuran-Derivats DSL189

a) oben

Originalexperiment an HEK293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen, welche mit 5 µM DiBAC₄(3) markiert wurden. Der Wirkstoff wurde mit steigenden Konzentrationen von 400 nM bis 12.5 µM bei ca. 5 min injiziert. Ein Kanal blieb unbehandelt (control), ein anderer Kanal erhielt einen Maximalstimulus (3 µM KC399). Es wurden Gleichgewichtswirkungen bei ca. 53 min bestimmt und prozentual auf die darauf folgende maximale Hyperpolarisation durch 3 µM KC399 normiert.

b) Mitte

Original experiment an CHO-(SUR1-/Kir6.2)-Zellen, welche mit 5 µM DiBAC₄(3) markiert wurden. Der Wirkstoff wurde mit steigenden Konzentrationen von 1.6 μ M bis 25 μ M bei ca. 2 min injiziert. Ein Kanal blieb unbehandelt (control), ein anderer Kanal erhielt einen Maximalstimulus (30 µM NNC414). Es wurden nur vernachlässigbar kleine Wirkungen erreicht, welche 40 min bestimmt und bei ca. prozentual auf die darauf folgende maximale Hyperpolarisation durch 30 µM NNC414 normiert wurden.

c) unten

Dosiswirkungskurven für die Hyperpolarisation. Die nicht-lineare Regressionsanalyse der normierten Daten (Gl. 17) von n=9 Experimenten an HEK293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen mit DSL189 ergab eine Dosiswirkungskurve mit einem pEC₅₀-Wert von 4.81 ± 0.03 (-log M) und einer Steilheit p von 1.04 ± 0.08 . Die Auswertung von n=6 Experi-CHO-(SUR1/Kir6.2)menten an Zellen ergab für eine Konzentration von 25 µM eine agonistische Wirkung von 9.1 ± 2.9 %. Zur ungefähren Abschätzung der Selektivität unter Annahme einer 100%-igen der Wirkung bei supramillimolaren Konzentrationen, wurde eine extrapolierte Dosiswirkungskurve auf einen pEC₅₀-Wert von 3.63 ± 0.21 (-log M) und eine Steilheit p von 0.98 ± 0.21 geschätzt.





Hyperpolarisierende (agonistische) Membranpotentialwirkungen des Benzofuran-Derivats DSL190

a) oben

Originalexperiment an **HEK293-**(SUR2B/Kir6.1)-Zellen, welche mit 5 µM DiBAC₄(3) markiert wurden. Der Wirkstoff wurde mit steigenden Konzentrationen von 400 nM bis 12.5 µM bei ca. 3 min injiziert. Ein Kanal blieb unbehandelt (control), ein anderer Kanal erhielt einen Maximalstimulus (3 µM KC399). Es wurden Gleichgewichtswirkungen bei ca. 57 min bestimmt und prozentual auf die darauf folgende maximale Hyperpolarisation durch 3 µM KC399 normiert.

b) Mitte

Original experiment an CHO-(SUR1/-Kir6.2)-Zellen, welche mit 5 µM DiBAC₄(3) markiert wurden. Der Wirkstoff wurde mit steigenden Konzentrationen von 1.6 μ M bis 25 μ M bei ca. 2 min injiziert. Ein Kanal blieb unbehandelt (control), ein anderer Kanal erhielt einen Maximalstimulus (30 µM NNC414). Es wurden Gleichgewichtswirkungen bei ca. 41 min bestimmt und prozentual auf die darauf folgende maximale Hyperpolarisation durch 30 µM NNC414 normiert.

0 c) unten

Dosiswirkungskurven für die Hyperpolarisation. Die nicht-lineare Regressionsanalyse der normierten Daten (Gl. 17) von n=9 Experimenten an **HEK293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen** mit DSL190 ergab eine Dosiswirkungskurve mit einem pEC₅₀-Wert von 4.72 \pm 0.04 (log M) und einer Steilheit p von 1.49 \pm 0.16.

Die Auswertung von n=6 Experi-CHO-(SUR1/Kir6.2)menten an Zellen ergab für eine Konzentration von 25 µM eine agonistische Wirkung von 15.2 ± 3.2 %. Zur ungefähren Abschätzung der Selektivität unter Annahme einer 100%-igen der Wirkung bei supramillimolaren Konzentrationen, wurde eine Dosiswirkungskurve auf einen pEC₅₀-Wert von 3.51 ± 0.51 (log M) und eine Steilheit p von 0.74 ± 0.51 geschätzt.

Hyperpolarisierende (agonistische) Membranpotentialwirkungen des Benzofuran-Derivats DSL238

a) oben

Originalexperiment an **HEK293**-(**SUR2B/Kir6.1)-Zellen**, welche mit 0.125 mg/ml DyeB markiert wurden. Der Wirkstoff wurde mit steigenden Konzentrationen von 3.2 μM bis 50 μM bei ca. 3 min injiziert. Ein Kanal blieb unbehandelt (control), ein anderer Kanal erhielt einen Maximalstimulus (3 μM KC399). Es wurden Gleichgewichtswirkungen bei ca. 10 min bestimmt und prozentual auf die darauf folgende maximale Hyperpolarisation durch 3 μM KC399 normiert.

b) Mitte

Original experiment an CHO-(SUR1/-Kir6.2)-Zellen, welche mit 0.125 mg/ml DyeB markiert wurden. Der Wirkstoff wurde mit steigenden Konzentrationen von 800 nM bis 50 µM bei ca. 3 min injiziert. Ein Kanal blieb unbehandelt (control), ein anderer Kanal erhielt einen 🚡 Maximalstimulus (30 µM NNC414). Es wurden Gleichgewichtswirkungen 😇 0.70 -14 min bestimmt und bei ca. prozentual auf die darauf folgende maximale Hyperpolarisation durch 30 µM NNC414 normiert.

c) unten

Dosiswirkungskurven für die Hyperpolarisation. Zur Abschätzung der Selektivität unter Annahme einer 100%-igen Wirkung bei supramillimolaren Konzentrationen wurde mittels nicht-linearer Regressionsanalyse der normierten Daten (Gl. 17) für HEK293(SUR2B/Kir6.1)-Zellen (n=6) eine extrapolierte Dosiswirkungskurve mit einem pEC₅₀-Wert von 3.14 ± 0.79 (-log M) und einer Steilheit p von 0.98 ± 0.65, bzw. für CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen (n=6) ein pEC₅₀-Wert von 3.12 ± 2.12 (log M) und eine Steilheit p von 1.23 ± 1.77 geschätzt.

Für eine Konzentration von $25 \,\mu$ M DSL154 wurde an HEK293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen (n=6) bzw. CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen (n=6) eine agonistische Wirkung von $6.1 \pm 3.4 \,\%$ bzw. $2.1 \pm 0.4 \,\%$ ermittelt.





Hyperpolarisierende (agonistische) Membranpotentialwirkungen des Benzofuran-Derivats DSL184

a) oben

Originalexperiment an **HEK293-**(SUR2B/Kir6.1)-Zellen, welche mit 5 µM DiBAC₄(3) markiert wurden. Der Wirkstoff wurde mit steigenden Konzentrationen von 100 nM bis 50 µM bei ca. 2 min injiziert. Ein Kanal blieb unbehandelt (control), ein anderer Kanal erhielt einen Maximalstimulus (3 µM KC399). Es wurden Gleichgewichtswirkungen bei ca. 54 min bestimmt und prozentual auf die darauf folgende maximale Hyperpolarisation durch 3 µM KC399 normiert.

b) Mitte

Originalexperiment CHOan (SUR1/Kir6.2)-Zellen, welche mit $5 \mu M$ DiBAC₄(3) markiert wurden. Der Wirkstoff wurde mit steigenden Konzentrationen von $3.2 \ \mu M$ bis 50 μM bei ca. 3 min injiziert. Ein Kanal blieb unbehandelt (control), ein anderer Kanal erhielt einen Maximalstimulus (30 µM NNC414). Es wurden Gleichgewichtswirkungen 109 min bestimmt und bei ca. prozentual auf die darauf folgende maximale Hyperpolarisation durch 30 µM NNC414 normiert.

c) unten

Dosiswirkungskurven für die Hyperpolarisation. Die nicht-lineare Regressionsanalyse der normierten Daten (Gl. 17) von n=6 Experimenten HEK293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen an mit DSL184 ergab unter Annahme einer 100%-igen Wirkung für supramillimolare Konzentrationen eine Dosiswirkungskurve mit einem pEC₅₀-Wert von 4.92 ± 0.04 (log M) und einer Steilheit p von 0.98 ± 0.10. Die Auswertung von n=6 Experi-CHO-(SUR1/Kir6.2)menten an Zellen ergab für eine Konzentration von 25 µM eine agonistische Wirkung von 25.8 ± 2.1 %. Zur ungefähren Abschätzung der Selektivität unter der Annahme einer 100%-igen Wirkung bei supramillimolaren Konzentrationen, wurde eine extrapolierte Dosiswirkungskurve auf einen pEC₅₀-Wert von 3.89 ± 0.20 (-log M) und eine Steilheit p von 0.70 ± 0.20 geschätzt.

Kap. 3.3

Hyperpolarisierende (agonistische) Membranpotentialwirkungen des Benzofuran-Derivats DSL187

a) oben

Originalexperiment an HEK293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen, welche mit 5 µM DiBAC₄(3) markiert wurden. Der Wirkstoff wurde mit steigenden Konzentrationen von 200 nM bis 25 µM bei ca. 3 min injiziert. Ein Kanal blieb unbehandelt (control), ein anderer Kanal erhielt einen Maximalstimulus (3 µM KC399). Es wurden Gleichgewichtswirkungen bei ca. 67 min bestimmt und prozentual auf die darauf folgende maximale Hyperpolarisation durch 3 µM KC399 normiert.

b) Mitte

Originalexperiment CHOan (SUR1/Kir6.2)-Zellen, welche mit 5 μ M DiBAC₄(3) markiert wurden. Der Wirkstoff wurde mit steigenden Konzentrationen von $3.2 \ \mu M$ bis $25 \ \mu M$ bei ca. 3 min injiziert. Ein Kanal blieb unbehandelt (control), ein anderer Kanal erhielt einen Maximalstimulus (30 µM NNC414). Es wurden Gleichgewichtswirkungen bei ca. 109 min bestimmt und prozentual auf die darauf folgende maximale Hyperpolarisation durch 30 µM NNC414 normiert.

c) unten

Dosiswirkungskurven für die Hyperpolarisation unter Annahme einer 100%-igen Wirkung bei supramillimolaren Konzentrationen. Die nicht-Regressionsanalyse lineare der normierten Daten (Gl. 17) von n=7 Experimenten an HEK293-(SUR2B/-Kir6.1)-Zellen mit DSL187 ergab eine Dosiswirkungskurve mit einem pEC₅₀-Wert von 4.94 ± 0.04 (-og M) und einer Steilheit p von 0.81 ± 0.07 . Die Auswertung von n=6 Experi-CHO-(SUR1/Kir6.2)menten an Zellen ergab eine Dosiswirkungskurve mit einem pEC50-Wert von 4.60 ± 0.06 (-log M) und einer Steilheit p von 0.96 ± 0.12 .





Hyperpolarisierende (agonistische) Membranpotentialwirkungen des Benzofuran-Derivats DSL181

a) oben

Originalexperiment an **HEK293-**(SUR2B/Kir6.1)-Zellen, welche mit 5 µM DiBAC₄(3) markiert wurden. Der Wirkstoff wurde mit steigenden Konzentrationen von 200 nM bis 50 µM bei ca. 3 min injiziert. Ein Kanal blieb unbehandelt (control), ein anderer Kanal erhielt einen Maximalstimulus (3 µM KC399). Es wurden Gleichgewichtswirkungen bei ca. 34 min bestimmt und prozentual auf die darauf folgende maximale Hyperpolarisation durch 3 µM KC399 normiert.

b) Mitte

Original experiment an CHO-(SUR1/-Kir6.2)-Zellen, welche mit 5 µM DiBAC₄(3) markiert wurden. Der Wirkstoff wurde mit steigenden Konzentrationen von 200 nM bis 50 µM bei ca. 3 min injiziert. Ein Kanal blieb unbehandelt (control), ein anderer Kanal erhielt einen Maximalstimulus (30 µM NNC414). Es wurden nur vernachlässigbar kleine Wirkungen erreicht, welche prozentual bei ca. 58 min bestimmt und prozentual auf die darauf folgende maximale Hyperpolarisation durch 30 µM NNC414 normiert wurden.

c) unten

Dosiswirkungskurven für die Hyperpolarisation unter Annahme einer 100%-igen Wirkung bei supramillimolaren Konzentrationen. (-log M) und einer Steilheit p von 1.13 ± 0.15 , sowie für eine Konzentration von 25 µM eine agonistische Wirkung von 25.1 ± 2.5 %. Die Auswertung von n=7 Experimenten an CHO-(SUR1/-Kir6.2)-Zellen ergab für eine Konzentration von 25 µM eine agonistische Wirkung von 11.3 ± 1.6 %. Eine extrapolierte Dosiswirkungskurve wurde auf einen pEC₅₀-Wert von 3.46 ± 0.16 (-log M) und eine Steilheit p von 0.83 ± 0.16 geschätzt.

Hyperpolarisierende (agonistische) Membranpotentialwirkungen des Benzofuran-Derivats DSL217

a) oben

Originalexperiment an HEK293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen, welche mit 5 µM DiBAC₄(3) markiert wurden. Der Wirkstoff wurde mit steigenden Konzentrationen von 200 nM bis 50 µM bei ca. 3 min injiziert. Ein Kanal blieb unbehandelt (control), ein anderer Kanal erhielt einen Maxi-(3 µM KC399). malstimulus Es wurden Gleichgewichtswirkungen bei ca. 32 min bestimmt und prozentual auf die darauf folgende maximale Hyperpolarisation durch 3 µM KC399 normiert.

b) Mitte

Original experiment an CHO-(SUR1/-Kir6.2)-Zellen, welche mit 5 µM DiBAC₄(3) markiert wurden. Der Wirkstoff wurde mit steigenden Konzentrationen von $3.2 \mu M$ bis 50 μM bei ca. 7 min injiziert. Ein Kanal blieb unbehandelt (control), ein anderer Kanal erhielt einen Maximalstimulus (30 µM NNC414). Es wurden Gleichgewichtswirkungen bei ca. 57 min bestimmt und prozentual auf die darauf folgende maximale Hyperpolarisation durch 30 µM NNC414 normiert.

c) unten

Dosiswirkungskurven für die Hyperpolarisation unter Annahme einer . 100%-igen Wirkung bei supramillimolaren Konzentrationen.. Die nicht-Regressionsanalyse lineare der normierten Daten (Gl. 17) von n=6 Experimenten an HEK293-(SUR2B/-Kir6.1)-Zellen mit DSL217 ergab eine Dosiswirkungskurve mit einem pEC₅₀-Wert von 4.55 ± 0.05 (-log M) und einer Steilheit p von 0.94 ± 0.11 . Die Auswertung von n=7 Experi-CHO-(SUR1/Kir6.2)menten an Zellen ergab für eine Konzentration von 25 µM eine agonistische Wirkung von 20.5 ± 3.3 %. Eine extrapolierte Dosiswirkungs-kurve wurde zur Abschätzung der Selektivität auf einen pEC₅₀-Wert von 4.03 ± 0.08 (-log M) und eine Steilheit p von 1.01 ± 0.21 geschätzt.





Hyperpolarisierende (agonistische) Membranpotentialwirkungen des Benzofuran-Derivats DSL177

a) oben

Originalexperiment an **HEK293-**(SUR2B/Kir6.1)-Zellen, welche mit 5 µM DiBAC₄(3) markiert wurden. Der Wirkstoff wurde mit steigenden Konzentrationen von 3.2 µM bis 50 µM bei ca. 8 min injiziert. Ein Kanal blieb unbehandelt (control), ein anderer Kanal erhielt einen Maximalstimulus (3 µM KC399). Es wurden Gleichgewichtswirkungen bei ca. 88 min bestimmt und prozentual auf die darauf folgende maximale Hyperdurch 3 µM polarisation KC399 normiert.

Originalexperiment CHOan (SUR1/Kir6.2)-Zellen, welche mit $5 \mu M$ DiBAC₄(3) markiert wurden. Der Wirkstoff wurde mit steigenden Konzentrationen von 3.2 µM bis 50 µM bei ca. 3 min injiziert. Ein Kanal unbehandelt blieb (control), ein anderer Kanal erhielt einen Maximalstimulus (30 µM NNC414). Es wurden nur vernachlässigbar kleine Wirkungen erreicht, welche prozentual bei ca. 39 min bestimmt und prozentual auf die darauf folgende maximale Hyperpolarisation durch 30 µM NNC414 normiert wurden.

c) unten

Dosiswirkungskurven für die Hyperpolarisation unter Annahme einer 100%-igen Wirkung bei supramillimolaren Konzentrationen. Die nicht-Regressionsanalyse lineare der normierten Daten (Gl. 17) von n=9 Experimenten an HEK293-(SUR2B/-Kir6.1)-Zellen mit DSL177 ergab eine Dosiswirkungskurve mit einem pEC₅₀-Wert von 4.33 ± 0.03 (-log M) und einer Steilheit p von 1.24 ± 0.11 . Die Auswertung von n=6 Experimenten an CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen ergab für eine Konzentration von 25 µM eine agonistische Wirkung von 2.0 ± 1.2 %.

Hyperpolarisierende (agonistische) Membranpotentialwirkungen des Benzofuran-Derivats DSL262

a) oben

Originalexperiment an **HEK293-**(SUR2B/Kir6.1)-Zellen, welche mit 5 µM DiBAC₄(3) markiert wurden. Der Wirkstoff wurde mit steigenden Konzentrationen von $3.2 \,\mu$ M bis 50 μ M bei ca. 4 min injiziert. Ein Kanal blieb unbehandelt (control), ein anderer Kanal erhielt einen Z Maximalstimulus (3 µM KC399). Es wurden Gleichgewichtswirkungen bei ca. 56 min bestimmt und prozentual auf die darauf folgende maximale Hyperpolarisation durch 3 µM KC399 normiert.

b) Mitte

Original experiment an CHO-(SUR1/-Kir6.2)-Zellen, welche mit 5 μ M DiBAC₄(3) markiert wurden. Der Wirkstoff wurde mit steigenden Konzentrationen von 3.2 μ M bis 50 μ M bei ca. 3 min injiziert. Ein Kanal blieb unbehandelt (control), ein anderer Kanal erhielt einen Maximalstimulus (30 μ M NNC414). Es wurden Gleichgewichtswirkungen bei ca. 62 min bestimmt und prozentual auf die darauf folgende maximale Hyperpolarisation durch 30 μ M NNC414 normiert wurden.

c) unten

Dosiswirkungskurven für die Hyperpolarisation unter Annahme einer 100%-igen Wirkung bei supramillimolaren Konzentrationen. Die nicht-Regressionsanalyse lineare der normierten Daten (Gl. 17) von n=9 Experimenten an HEK293-(SUR2B/- E%Kir6.1)-Zellen mit DSL262 ergab eine Dosiswirkungskurve mit einem pEC₅₀-Wert von 4.74 ± 0.03 (-log M) und einer Steilheit p von 1.89 ± 0.18 . Die Auswertung von n=6 Experi-CHO-(SUR1/Kir6.2)menten an Zellen ergab für eine Konzentration von 25 µM eine agonistische Wirkung von 29.3 ± 3.2 %. Eine extrapolierte Dosiswirkungskurve wurde zur Abschätzung der Selektivität auf einen pEC₅₀-Wert von 4.62 ± 0.02 (-log M) und eine Steilheit p von 1.16 ± 0.05 geschätzt.



	E !	2, R2		[³ H]-P 1075	DiBAC ₄ (3)- Membr	anpotentialmessung
	R3 3	2'	R1	HEK293- (SUR2B/ Kir6.1)	HEK293- (SUR2B/ Kir 6.1)	CHO- (SUR1/Kir6.2)
				$pK_{D}(-\log M)$	pEC ₅₀ (-log M) p(Hill slope)	agonistischer Effekt mit 4.6 (-log M)
	R1	R2	R3	(n)	(n)	(n)
DSL154 Abb. 3.3.2				< 2.8 ± 0.3	13.0 ± 2.5 %	3.7 ± 1.2 %
				(4)	(9)	(6)
DSL141	s			3.82 ± 0.04	4.58 ± 0.02	7.6 ± 1.0 %
Abb. 3.3.3	N			(4)	1.16 ± 0.06 (11)	(6)
DSI 186	, c			(4)	(11)	$10.8 \pm 1.8\%$
				4.25 ± 0.05	0.90 ± 0.02	17.0 ± 1.0 70
A00. 3.3.4				(4)	(6)	(6)
DSL189	"S			4.39 ± 0.03	4.81 ± 0.03^{a}	9.1 ± 2.9 % ^a
Abb. 3.3.5	→ <n< td=""><td>,</td><td></td><td></td><td>1.04 ± 0.08</td><td></td></n<>	,			1.04 ± 0.08	
				(4)	(9)	(6)
DSL190	<^S			4.38 ± 0.02	4.72 ± 0.04 ª 1.49 ± 0.16	15.2 ± 3.2 % ^a
Abb. 3.3.6				(4)	(9)	(6)
DSL238	, S			< 3.6 ± 0.09	6.1 ± 3.4 %	2.1 ± 0.4 %
Abb 2 2 7		>			DyeB	DyeB
AUU. 5.5.7				(4)	(6)	(6)
DSL184	s		_	4.34 ± 0.03	$(4.92 \pm 0.04)^{a}$	$25.8 \pm 2.1 \%^{a}$
Abb. 3.3.8	Ň		Br	(4)	(0.98 ± 0.10)	(ϵ)
DSL187	.s			(4) 4 44 + 0 02	(0) (4.94 + 0.04) ^a	$46.3 + 3.7 \%^{a}$
DSLIG			Br	-1.11 ± 0.02	(0.81 ± 0.07)	$+0.5 \pm 5.7 70$
Abb. 3.3.9				(4)	(7)	(6)
DSL181	^S			3.90 ± 0.05	25.1 ± 2.5 %	$11.3 \pm 1.6 \%$ ^a
Abb. 3.3.10	N	CH ₂ OH		(4)	(6)	(7)
DSL217	S			4.08 ± 0.02	4.55 ± 0.05^{a}	$20.5 \pm 3.3 \%^{a}$
Abb 2 2 11		CH ₂ OH			0.94 ± 0.11	
A00. 5.5.11				(4)	(6)	(6)
DSL177		SN		3.95 ± 0.04	4.33 ± 0.03	2.0 ± 1.2 %
Abb. 3.3.12	CH ₃	7			1.24 ± 0.11	
A F8/	//			(4)	(9)	(6)
4 11'07		^{\$} ≻ ^N \		5.00 ± 0.04	$0.3 \pm 1.3 / 0$	\neg , $\gamma - 1$, $\gamma = 1$
keine Abb.				(4)	(6)	(4)
DSL262	" ^S			3.99 ± 0.05	4.74 ± 0.03 ^a	29.3 ± 3.2 % a
Abb.3.3.13	, ─≺ ^N	CH ₃	CF₃		1.89 ± 0.18	
				(4)	(9)	(6)

Tab. 3-7: Vergleich von pEC₅₀-Werten der Membranpotential-Tests der Benzofuran-Derivate mit ihren Dissoziationskonstanten aus der Kompetitionsbindung mit [³H]-P 1075

Ergänzende Kontrollversuche (auch für HEK293- und CHO-Wildtyp-Zellen) mit dem Membranpotentialmarker DyeB befinden sich in AnhangA (Kap. A 2.3.2).

" Hinweis auf unspezifische Effekte für eine Konzentration von 25 μ M > 10 % (vgl. Anhang A Kap. A 2.3.2)

3.3.3 Kompetitionsbindung

Die Daten der Kompetitionsbindung von Benzofuran-Derivaten mit [³H]-P 1075 an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen werden in Tabelle 3-7 angegeben, während sich die graphische Darstellung der spezifischen Bindung in den Abb. 3.3.14 bis 3.3.16 befindet. Nachfolgend werden die Substanzen gruppiert nach ihrer Substitution in Position 2' am Benzofuran-Grundmolekül beschrieben.

Das Benzofuran-Derivat DSL141 wurde mit einer Thioamid-Gruppe in Position 2' synthetisiert, welche am Stickstoffatom zusätzlich eine Methylgruppe trägt. Seine Affinität wurde auf einen pK_{D} -Wert von 3.82 (-log M) extrapoliert. Mit einem zusätzlichem Brom-Atom in Position 5' wurde für die Substanz DSL184 eine im Vergleich zu DSL141 höhere Affinität mit einem pK_{D} -Wert von 4.34 (-log M) ermittelt.

Statt einer Methylgruppe am Stickstoffatom in Position 2' tragen die Substanzen DSL186, DSL187 und DSL262 jeweils eine Ethylgruppe. Auch hier zeigt die in Position 5' bromierte Substanz DSL187 mit einem pK_D-Wert von 4.44 (-log M) eine moderat höhere Affinität als das unbromierte Analogon DSL186 mit 4.23 (-log M). Das einzige dreifach substituierte Benzofuran-Derivat DSL262 entspricht der Substanz DSL187 mit einer zusätzlichen Methylgruppe in Position 3', welche sich auf die Affinität negativ auswirkt; der pK_D-Wert von DSL262 wurde auf 3.99 (-log M) extrapoliert.

Wird die Kohlenstoffkette am Stickstoffatom in Position 2' des Derivats DSL186 um ein weiteres Kohlenstoffatom zu einem n-butyl (DSL189) oder t-butyl (DSL190), steigt erneut die Affinität auf einen pK_D Wert von 4.39 bzw. 4.38 (-log M). Ein Phenylring am Stickstoffatom in Position 2' führt hingegen zu einem Affinitätsverlust auf einen extrapolierten pK_D -Wert von 3.60 (-log M).

Die Substanzen DSL181 und DSL217 entsprechen den Substanzen DSL141 und DSL186 mit einer zusätzlichen OH-Gruppe in Position 3', welche jedoch zu keiner bedeutenden Änderungen der Affinität führt.

Für das Derivat DSL177 wurde die Thioamid-Gruppe statt in Position 2' in Position 3' synthetisiert. Für DSL177 wurde ein pK_{D} -Wert von 3.95 (-log M) bestimmt.

DSL154 wurde mit einer Silicium-Gruppe in Position 2' synthetisiert und zeichnet sich durch eine sehr geringe Affinität mit einem extrapolierten pK_D -Wert von 2.74 (-log M) an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen aus.





Abb. 3.3.14: Kompetitionsbindung von Benzofuran-Derivaten mit [³H]-P 1075 an HEK 293 SUR2B/Kir6.1-Zellen (n=4). Adhärente, in 96-well-Platten kultivierte Zellen werden mit dem Radioliganden und steigenden Konzentrationen der kompetierenden Liganden versehen (Lösungswechsel), deren geeignete Mischung vorher in Eppendorf-Cups hergestellt wurde. Die unspezifische Bindung wird mit 1 μM P1075 bestimmt. Dargestellt wird die prozentual normierte spezifische Bindung (B_S). Die Daten werden mittels nicht-linearer Regressionsanalyse anhand GI. 4 ausgewertet.

a) oben:		b) unten:					
		$pK_D \pm ASD$ (-log M)				$pK_D \pm ASD$ (-log M)	
0	DSL184	4.34 ± 0.03	n = 4	0	DSL187	4.44 ± 0.23	n = 4
Δ	DSL141	3.82 ± 0.04	n = 4	\triangle	DSL186	4.23 ± 0.03	n = 4
					DSL262	3.99 ± 0.05	n = 4



Abb. 3.3.15: Kompetitionsbindung von Benzofuran-Derivaten mit [³H]-P 1075 an HEK 293 SUR2B/Kir6.1-Zellen (n=4). Adhärente, in 96-well-Platten kultivierte Zellen werden mit dem Radioliganden und steigenden Konzentrationen der kompetierenden Liganden versehen (Lösungswechsel), deren geeignete Mischung vorher in Eppendorf-Cups hergestellt wurde. Die unspezifische Bindung wird mit 1 μ M P1075 bestimmt. Dargestellt wird die prozentual normierte spezifische Bindung (B_s). Die Daten werden mittels nicht-linearer Regressionsanalyse anhand GI. 4 ausgewertet.

a) oben:				b) unten:		
-		$pK_D \pm ASD$ (-log	; М)		$pK_D \pm ASD$ (-log	M)
0	DSL189	4.39 ± 0.03	n = 4	O DSL217	4.08 ± 0.02	n = 4
Δ	DSL190	4.38 ± 0.02	n = 4	△ DSL181	3.90 ± 0.05	n = 4
	DSL238	3.60 ± 0.09	n = 4			



Abb. 3.3.16: Kompetitionsbindung von Benzofuran-Derivaten mit [³H]-P 1075 an HEK 293 SUR2B/Kir6.1-Zellen (n=4). Adhärente, in 96-well-Platten kultivierte Zellen werden mit dem Radioliganden und steigenden Konzentrationen der kompetierenden Liganden versehen (Lösungswechsel), deren geeignete Mischung vorher in Eppendorf-Cups hergestellt wurde. Die unspezifische Bindung wird mit 1 μ M P1075 bestimmt. Dargestellt wird die prozentual normierte spezifische Bindung (B_S). Die Daten werden mittels nicht-linearer Regressionsanalyse anhand GI. 4 ausgewertet.

		$pK_D \pm ASD$ (-log M)		
0	DSL177	3.95 ± 0.04	n =	= 4
Δ	DSL154	2.74 ± 0.32	n =	= 4

3.4 Benzothiophen-Derivate

3.4.1 Physikochemische Eigenschaften

Tab. 3-8: Molekulargewicht und Lipophilie (S+logP) der Benzothiophen-Derivate

		Molekulargewicht (g/mol)
		S+ $logP$
DSL176 Abb. 3.4.1	S N-	207.3 2.5
DSL180 Abb. 3.4.2	S S N	207.3 2.8

3.4.2 Membranpotentialmessung mittels Fluoreszenz

Die Substanz DSL176 wurde in der Position 2^{\cdot}, die Substanz DSL180 in der Position 3^{\cdot} mit einer Thioamid-Gruppe substituiert. An HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen zeigten DSL176 und DSL180 mit einer pEC₅₀ von 4.81 und 4.80 (-log M) eine sehr ähnliche relative Wirkstärke. An CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen zeigte DSL180 mit einer pEC₅₀ von 4.62 (-log M) eine etwa doppelt so starke agonistische Wirkung als DSL176 mit einer pEC₅₀ von 4.32 (-log M). Dadurch ließ sich für die in Position 2' substituierte Substanz DSL176 eine höhere Selektivität für den SUR2B/Kir6.1-Isotyp ermitteln, welche auf einer schwächeren agonistischen Wirkung an CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen beruht. (vgl. Tabelle 3-8 sowie Abb. 3.4.1 und 3.4.2)



Abb. 3.4.1

Hyperpolarisierende (agonistische) Membranpotentialwirkungen des Benzothiophen-Derivats DSL176

a) oben

Originalexperiment an HEK293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen, welche mit 5 µM DiBAC₄(3) markiert wurden. Der Wirkstoff wurde mit steigenden Konzentrationen von 3.2 µM bis 50 µM bei ca. 5 min injiziert. Ein Kanal blieb unbehandelt (control), ein anderer Kanal erhielt einen Maximalstimulus (3 µM KC399). Es wurden Gleichgewichtswirkungen bei ca. 45 min bestimmt und prozentual auf die darauf folgende maximale Hyperpolarisation durch 3 µM KC399 normiert.

b) Mitte

Original experiment an CHO-(SUR1/-Kir6.2)-Zellen, welche mit 5 µM DiBAC₄(3) markiert wurden. Der Wirkstoff wurde mit steigenden Konzentrationen von 3.2 µM bis 50 µM bei ca. 3 min injiziert. Ein Kanal unbehandelt (control), blieb ein Kanal anderer erhielt einen Maximalstimulus (30 µM NNC414). Es wurden Gleichgewichtswirkungen bei ca. 35 min bestimmt und prozentual auf die darauf folgende maximale Hyperpolarisation durch 30 µM NNC414 normiert wurden.

c) unten

Dosiswirkungskurven für die Hyperpolarisation unter Annahme einer 100%-igen Wirkung bei supramillimolaren Konzentrationen. Die nicht-Regressionsanalyse lineare der normierten Daten (Gl. 17) von n=9 Experimenten an HEK293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen mit DSL176 ergab eine Dosiswirkungskurve mit einem pEC₅₀-Wert von 4.81 \pm 0.03 (log mol/l) und einer Steilheit p von 1.28 ± 0.10 .

Abb. 3.4.2

Hyperpolarisierende (agonistische) Membranpotentialwirkungen des Benzothiophen-Derivats DSL180

a) oben

Originalexperiment an **HEK293-**(SUR2B/Kir6.1)-Zellen, welche mit 5 µM DiBAC₄(3) markiert wurden. Der Wirkstoff wurde mit steigenden Konzentrationen von 100 nM bis 50 µM bei ca. 2 min injiziert. Ein Kanal blieb unbehandelt (control), ein anderer Kanal erhielt einen Maximalstimulus (3 µM KC399). Es wurden Gleichgewichtswirkungen bei ca. 35 min bestimmt und prozentual auf die darauf folgende maximale Hyperpolarisation durch 3 µM KC399 normiert.

b) Mitte

Original experiment an CHO-(SUR1/-Kir6.2)-Zellen, welche mit 5 µM $DiBAC_4(3)$ markiert wurden. Der Wirkstoff wurde mit steigenden Konzentrationen von 3.2 µM bis 50 µM bei ca. 4 min injiziert. Ein Kanal blieb unbehandelt (control), ein anderer Kanal erhielt einen Maximalstimulus (30 µM NNC414). Es wurden Gleichgewichtswirkungen bei ca. 55 min bestimmt und prozentual auf die darauf folgende maximale Hyperpolarisation durch 30 µM NNC414 normiert wurden.

c) unten

Dosiswirkungskurven für die Hyperpolarisation. Die nicht-lineare Regressionsanalyse der normierten Daten (Gl. 17) von n=9 Experimenten HEK293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen an **DSL180** mit ergab eine Dosiswirkungskurve mit einem pEC₅₀-Wert von 4.80 ± 0.03 (-log mol/I) und einer Steilheit p von 1.05 ± 0.06.

Die Auswertung von n=6 Experimenten an CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen ergab eine Dosiswirkungskurve mit einem pEC_{50} -Wert von 4.62 \pm 0.02 (-log mol/I) und einer Steilheit p von 1.16 \pm 0.05.



	[³ H]-P 1075	DiBAC4(3)-N	nessung	
	A	ВС		
	HEK293- (SUR2B/Kir6.1)	HEK293- (SUR2B/Kir 6.1)	CHO- (SUR1/Kir6.2)	
	$pK_D(-\log M)$	pEC ₅₀ (-1 p(Hill s	og M) lope)	Δ (B-C) (-log M)
	(n)	(n))	
DSL176 SN-	4.18 ± 0.03	$\begin{array}{c} 4.81 \pm 0.03^{\rm a} \\ 1.28 \pm 0.10 \end{array}$	$\begin{array}{c} 4.32 \pm 0.03^{a} \\ 1.34 \pm 0.14 \end{array}$	0.50 ± 0.04
↓ ↓ ↓ ↓ ↓	(4)	(9)	(6)	
DSL180	4.64 ± 0.03	$4.80\pm0.03^{\rm a}$	$4.62\pm0.02^{\text{a}}$	$0.18 \ \pm 0.04$
Abb. 3.4.2 SN	(4)	1.05 ± 0.06 (6)	$\begin{array}{cc} 1.16 & \pm 0.05 \\ (6) \end{array}$	

Tab. 3-9: Vergleich von pEC₅₀-Werten der Membranpotential-Tests der Benzothiophen-Derivate mit ihren Dissoziationskonstanten aus der Kompetitionsbindung mit [³H]-P 1075

Ergänzende Kontrollversuche (auch für HEK293- und CHO-Wildtyp-Zellen) mit dem Membranpotentialmarker DyeB befinden sich in Anhang A (Kap. A 2.3.4).

" Hinweis auf unspezifische Effekte für eine Konzentration von 25 μ M > 10 % (vgl. Anhang A Kap. A 2.3.4)

3.4.3 Kompetitionsbindung

In der Kompetitionsbindung mit dem Radioliganden [³H]-P 1075 an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen wurde für das Benzothiophen-Derivat DSL 180 mit einer Thioamid-Gruppe in Position 2' ein pK_D -Wert von 4.64 ± 0.03 (-log M) ermittelt. Eine Thioamid-Gruppe in Position 2' (DSL176) führte zu einem geringeren pK_D -Wert von 4.18 ± 0.03 (-log M).



Abb. 3.4.3: Kompetitionsbindung der Benzothiophen-Derivate DSL180 und DSL176 mit [³H]-P 1075 an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen (n=4). Adhärente, in 96-well-Platten kultivierte Zellen werden mit dem Radioliganden und steigenden Konzentrationen der kompetierenden Liganden versehen (Lösungswechsel), deren geeignete Mischung vorher in Eppendorf-Cups hergestellt wurde. Die unspezifische Bindung wird mit 1 μ M P1075 bestimmt. Dargestellt wird die prozentual normierte spezifische Bindung (B_s). Die Daten werden mittels nicht-linearer Regressionsanalyse anhand GI. 4 ausgewertet.

		$pK_D \pm ASD$ (-log M)	
0	DSL180	4.64 ± 0.03	n = 4
Δ	DSL176	4.18 ± 0.03	n = 4

3.5 Benzothiazol-Derivate

3.5.1 Physikochemische Eigenschaften der Benzothiazol-Derivate

Tab. 3-10: Molekulargewicht und Lipophilie (S+logP) der Benzothiazol-Derivate

	R2 5' N 2' R	1	Molekulargewicht (g/mol) S+logP
	R1	R2	
DSL203	,S		208.3
			2.6
DSL202	,S		222.3
	N		3.0
DSL208	S		270.4
	N-		3.9
AF33	,S		290.3
	—≪ _N	CF_3	3.9
AF35	,S		338.4
	N	CF_3	4.8
AF20	s		236.4
			2.2
AF22	s 🦳		417.6
			3.2
AF48	s		250.4
			2.5
AF75	s		264.4
			2.9
AF78	s, 🗡		278.4
			3.3
AF130	• ×		262.4
			2.74

R1

Abb. 3.5.1: Strukturformel

Benzothiazol-Grund-

R2、5'

der struktur

3.5.2 Membranpotentialmessung mittels Fluoreszenz

Die Benzothiazol-Derivate wurden systematisch mit unterschiedlichen Substituenten in Position 2' synthetisiert, welche, wie bereits die Substituenten der Benzofuran- und Benzothiophen-Derivate, eine Thioamid-Gruppe beinhalten. Für die Substanzen AF33 und AF35 wurde zusätzlich die Position 5' mit einem CF₃-Rest versehen.

Für die Derivate DSL202, DSL203, DSL208, AF33, AF35, AF20 und AF22 sei auf die im Anhang A (Kap. A2.3.4) dokumentierten Untersuchungen mit dem alternativen Membranpotentialmarker DyeB hingewiesen, in denen an CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen nur geringe spezifische K_{ATP}-Kanalwirkungen gefunden wurden. Zur Charakterisierung der Substanzen am (SUR2B/Kir6.1)- K_{ATP} -Kanaltyp sei hier auf die Radioligandbindungsversuche (Kap. 3.5.3) verwiesen, in denen sich jedoch keine der oben genannten Substanzen als ausreichend affin darstellte, um ihre Wirkung mittels Fluoreszenzmarker näher zu beschreiben.

Die Substanzen AF48, AF75 und AF78 wurden in Position 2' des Benzothiazol-Moleküls mit einem Brücken-C-Atom sowie daran anschließender Methyl- oder Ethyl- sowie einer Thioamid-Gruppe substituiert. Sie zeigen eine hohe Selektivität für den SUR2B/Kir6.1-Isotyp des KATP-Kanals. Dabei erreichte unter den untersuchten Benzothiazolen AF78 mit einem pEC₅₀-Wert von 5.41 ± 0.03 (-log M; DiBAC₄(3)) sowohl die höchste agonistische Wirkung an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen, als auch mit einer extrapolierten pEC₅₀ von 3.30 (-log M) die geringste relative Wirkstärke an CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen (Abb. 3.5.4). Daraus resultiert eine Selektivität von ca. Faktor 100 zugunsten der HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen. Die Substanzen AF48 und AF78 zeigen an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen eine annähernd gleiche relative Wirkstärke mit einem pEC₅₀-Wert von 5.07 ± 0.02 bzw. 5.08 ± 0.03 (-log M; DiBAC₄(3)), während eine Konzentration von 25 µM an CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen agonistische Effekte von nur 5.4 bzw. 6.3 % bewirkt (Abb. 3.5.2 bzw. 3.5.3). Unspezifische Effekte (z.B. Quenching-Effekte) konnten für die Substanzen AF48, AF75 und AF78 in der DiBAC₄(3)-Messung ausgeschlossen werden, da zum einen in Anhang A (Kap. A2.3.4) dokumentierte Nachuntersuchungen mit dem alternativen Membranpotentialmaker DyeB (auch an untransfizierten Wildtypzelllen) dies bestätigen und zum anderen eine Wiederholung der Versuche mit DyeB die mit DiBAC₄(3) gemessenen Werte wiederfand (Tab. 3-11).

Zugleich zeigten die Substanzen an CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen in einer Konzentration von 25 μM Substanz agonistische Effekte von jeweils weniger als 10 %.

Als Nachweis, dass die Thioamid-Gruppe entscheidend für die relative Wirkstärke an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen ist, wurde die Substanz AF78 modifiziert und die Thioamid-Gruppe durch eine Carboxy-Gruppe ersetzt (AF130). Die Fluoreszenzmessung mit DyeB ergab für die Substanz AF130 mit einem extrapolierten pEC₅₀-Wert von ca. 3.97 ± 0.02 (-log M) eine ca. 30-fach geringere relative Wirkstärke als für AF78 (Abb. 3.5.5).

Hyperpolarisierende (agonistische) Membranpotentialwirkungen des Benzothiazol-Derivats AF48

a) oben

Originalexperiment an HEK293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen, welche mit 5 µM DiBAC₄(3) markiert wurden. Der Wirkstoff wurde mit steigenden Konzentrationen von 200 nM bis 50 µM bei ca. 2 min injiziert. Ein Kanal blieb unbehandelt (control), ein anderer Kanal erhielt einen Maximalstimulus (3 µM KC399). Es wurden Gleichgewichtswirkungen bei ca. 45 min bestimmt und prozentual auf die darauf folgende maximale Hyperpolarisation durch 3 µM KC399 normiert.

b) Mitte

Original experiment an CHO-(SUR1/-Kir6.2)-Zellen, welche mit 5 µM DiBAC₄(3) markiert wurden. Der Wirkstoff wurde mit steigenden Konzentrationen von 12.5 µM bis 50 µM bei ca. 2 min injiziert. Ein Kanal blieb unbehandelt (control), ein anderer Kanal erhielt einen Maximalstimulus (30 µM NNC414). Es wurden Gleichgewichtswirkungen bei ca. 30 min bestimmt und prozentual auf die darauf folgende maximale Hyperpolarisation durch 30 μM NNC414 normiert.

c) unten

Dosiswirkungskurven für die Hyperpolarisation. Die nicht-lineare Regressionsanalyse der normierten Daten (Gl. 17) von n=6 Experimenten an **HEK293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen** mit AF48 ergab eine Dosiswirkungskurve mit einem pEC₅₀-Wert von 4.93 \pm 0.02 (-log M) und einer Steilheit p von 1.36 \pm 0.07.

Die Auswertung von n=12 Experimenten an CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen ergab für eine Konzentration von 25 μ M eine agonistische Wirkung von 5.4 \pm 0.6 %. Für eine extrapolierte normsteile Dosiswirkungskurve wurde ein pEC₅₀-Wert von 3.45 \pm 0.09 (-log M) geschätzt.





Hyperpolarisierende (agonistische) Membranpotentialwirkungen des Benzothiazol-Derivats AF75

a) oben

Originalexperiment an HEK293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen, welche mit 5 µM DiBAC₄(3) markiert wurden. Der Wirkstoff wurde mit steigenden Konzentrationen von 200 nM bis 50 µM bei ca. 3 min injiziert. Ein Kanal blieb unbehandelt (control), ein anderer Kanal erhielt einen Maximalstimulus (3 µM KC399). Es wurden Gleichgewichtswirkungen bei ca. 65 min bestimmt und prozentual auf die darauf folgende maximale Hyperdurch 3 µM polarisation KC399 normiert.

b) Mitte

Originalexperiment CHOan (SUR1/Kir6.2)-Zellen, welche mit 5 μ M DiBAC₄(3) markiert wurden. Der Wirkstoff wurde mit Konzentrationen von 12.5 µM und 25 µM bei ca. 2 min injiziert. Ein Kanal blieb unbehandelt (control), ein anderer Kanal erhielt einen Maximalstimulus (30 μM NNC414). Es wurden Gleichgewichtswirkungen bei ca. 30 min bestimmt und prozentual auf die darauf folgende maximale Hyperpolarisation durch 30 µM NNC414 normiert.

c) unten

Dosiswirkungskurven für die Hyperpolarisation. Die nicht-lineare Regressionsanalyse der normierten Daten (Gl. 17) von n=11 Experimenten an **HEK293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen** mit AF75 ergab eine Dosiswirkungskurve mit einem pEC₅₀-Wert von 5.14 \pm 0.03 (-log M) und einer Steilheit p von 1.47 \pm 0.14.

Die Auswertung von n=12 Experimenten an CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen ergab für eine Konzentration von 25 μ M eine agonistische Wirkung von 6.3 ± 1.1 %.

Eine extrapolierte, normsteile Dosiswirkungskurve ergab einen pEC_{50} -Wert von 3.69 ± 0.03 (-log M).

Hyperpolarisierende (agonistische) Membranpotentialwirkungen des Benzothiazol-Derivats AF78

a) oben

Originalexperiment an HEK293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen, welche mit 5 µM DiBAC₄(3) markiert wurden. Der Wirkstoff wurde mit steigenden Konormalized zentrationen von 200 nM bis 50 µM bei ca. 2 min injiziert. Ein Kanal blieb unbehandelt (control), ein anderer Kanal erhielt einen Maximalstimulus (3 μ M KC399). Es wurden Gleich- Z gewichtswirkungen bei ca. 45 min bestimmt und prozentual auf die darauf folgende maximale Hyperpolarisation durch 3 µM KC399 normiert.

b) Mitte

Originalexperiment an CHOluorescence (SUR1/Kir6.2)-Zellen, welche mit 5 μ M DiBAC₄(3) markiert wurden. Der Wirkstoff wurde mit einer Konzentration von 25 µM bei ca. 2 min injiziert. Ein Kanal blieb unbehandelt Ŀ (control), ein anderer Kanal erhielt (30 einen Maximalstimulus μM NNC414). Es wurden Gleichormali gewichtswirkungen bei ca. 30 min bestimmt und prozentual auf die darauf folgende maximale Hyperpolarisation durch 30 µM NNC414 normiert.

c) unten

Dosiswirkungskurven für die Hyperpolarisation. Die nicht-lineare Regressionsanalyse der normierten Daten (Gl. 17) von n=7 Experimenten an HEK293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen mit AF78 ergab eine Dosiswirkungskurve mit einem pEC₅₀-Wert von 5.45 ± 0.01 (-log M) und einer Steilheit p von 1.39 ± 0.10 . Die Auswertung von n=12 Experimenten an CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen ergab für eine Konzentration von 25 µM eine agonistische Wirkung von 2.5 ± 1.5 %. Zur ungefähren Abschätzung der Selektivität wurde

für eine extrapolierte, normsteile Dosiswirkungskurve ein pEC₅₀-Wert von 3.30 ± 0.02 (-log M) geschätzt.





Vergleich der hyperpolarisierenden (agonistischen) Membranpotentialwirkungen des Benzothiazol-Derivate AF78 und AF130

a) oben

Originalexperiment an HEK293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen, welche mit 0.125 mg/ml DyeB markiert wurden. Die Wirkstoffe wurde mit einer Konzentration von jeweils 25 µM bei ca. 3 min injiziert. Ein Kanal blieb unbehandelt (control), ein anderer Kanal erhielt einen Maximalstimulus (3 µM KC399). Es wurden Gleichgewichtswirkungen bei ca. 22 min bestimmt und prozentual auf die darauf folgende maximale Hyperpolarisation durch 3 µM KC399 normiert.

b) Mitte

Originalexperiment CHOan (SUR1/Kir6.2)-Zellen, welche mit 0.125 mg/ml DyeB markiert wurden. Der Wirkstoff wurde mit einer Konzentration von 25 µM bei ca. 4 min injiziert. Ein Kanal blieb unbehandelt (control), ein anderer Kanal erhielt einen Maximalstimulus (30 µM NNC414). Es wurden Gleichgewichtswirkungen bei ca. 33 min bestimmt und prozentual auf die darauf folgende maximale Hyperpolarisation durch 30 µM NNC414 normiert.

c) unten

Dosiswirkungskurven für die Hyperpolarisation an **HEK293-(SUR2B/-Kir6.1)-Zellen.**

Die nicht-lineare Regressionsanalyse der normierten Daten (Gl. 17) von n=7 Experimenten mit AF78 ergab eine Dosiswirkungskurve mit einem pEC₅₀-Wert von 5.45 \pm 0.01 (-log M) und einer Steilheit p von 1.39 ± 0.10 . Zur Abschätzung der Selektivität der Substanz und unter Annahme einer 100%-igen Wirkung bei supramillimolaren Konzentrationen wurde für n=8 Experimente mit AF130 eine einem Dosiswirkungskurve mit pEC₅₀-Wert von 3.97 ± 0.02 (-log M) und einer Steilheit p von 1.36 ± 0.07 geschätzt.

R2.	5' 🔿 🗤		[³ H]-P 1075	075 DiBAC ₄ (3)-Membranpotentialmessung		
	\bigvee N $2'$		Α	В	С	
		·R1	HEK293-	HEK293-	CHO-	
	S ≤		(SUR2B/ Kir6.1)	(SUR2B/ Kir 6.1)	(SUR1/Kir6.2)	
			$pK_D(-\log M)$	$pEC_{50}(-\log M)$	agonistischer Effekt mit	$\Delta B-C$
	R1	R2	(17)	p(Hill slope)	$25 \mu \text{N}$	(- IOg IM)
DGI 202		102	(n)	(n)		nd
DSL203	S		4.22 ± 0.06	n.a.	$1/.0 \pm 5.2\%$	n.a.
	N—		(4)		(6)	
DSL202	,S		4.12 ± 0.03	n.d.	36.6 ± 1.7 %	n.d.
	—<<					
			(4)		(9)	
DSL208	s		$< 3.3 \pm 0.20$	n.d.	20.3 ± 4.6 %	n.d.
					DyeB	
			(4)		(7)	
AF33	s		4.12 ± 0.04	n.d.	$18.1 \pm 5.6 \%$ °	n.d.
		CF_3				
			(4)		(11)	
AF35	s		4.08 ± 0.05	n.d.	$27.3 \pm 3.1 \% ^{bc}$	n.d.
	`N<<	CF_3			DyeB	
			(4)		(11)	
AF20	s, /		4.31 ± 0.03	n.d.	$17.1 \pm 2.4 \%$	n.d.
	∕─₽					
4 5 2 2			(4)	1	(11)	1
AF22	s F		$< 3.4 \pm 0.20$	n.d.	0.7 ± 3.5 % ⁶⁰⁰	n.d.
	A N					
			(4)	5.07.0.02	(3)	4 . 1 4
AF48	N N		4.83 ± 0.03	5.07 ± 0.02	$5.4 \pm 0.6\%$	$\Delta > 1.4$
ADD. 3.3.2	$ \rightarrow $		(4)	1.29 ± 0.00	$pEC_{50} < 3.50$ "	
	,		(4)	$-\frac{(0)}{493+002^{b}}$	(12)	
				4.95 ± 0.02 1 36 + 0.07		
AF75	s		5.03 ± 0.03	5.08 ± 0.03	6 3 ± 1 1 %	Λ>1 3
Abb. 3.5.4	Ŋ Ŋ N		2.02 - 0.05	1.31 ± 0.08	$pEC_{50} < 3.70^{a}$	<u> </u>
			(4)	(16)	(12)	
				$5.14 \pm 0.03^{\text{b}}$		
				1.47 ± 0.14 (11)		
AF78			5.38 ± 0.03	5.41 ± 0.03	2.5 ± 1.5 %	$\Delta > 2.0$
Abb. 3.5.5	s N			1.20 ± 0.09	pEC ₅₀ < 3.30 ^a	
	$ \rightarrow $		(4)	(12)	(12)	
				5.45± 0.03 ^в		
				1.39±0.06(7)		
AF130	• ×		4.30 ± 0.02	3.97 ± 0.02		
Abb. 3.5.5	≫_N			1.36±0.07	n.d.	
	$ \rightarrow "$		(4)	DyeB(8)		
	•					

Tab. 3-11: Vergleich von pEC₅₀-Werten der Membranpotential-Tests der Benzothiazol-Derivate mit ihren Dissoziationskonstanten aus der Kompetitionsbindung mit [³H]-P 1075

Ergänzende Kontrollversuche (auch für HEK293- und CHO-Wildtyp-Zellen) mit DyeB befinden sich in Anhang A2.3.5. ^{a)} Zur Abschätzung der Selektivität extrapolierte pEC₅₀-Werte einer normsteilen Dosiswirkungskurve (-log M) ^{b)}DyeB-Membranpotentialmessung ^{c)} Hinweis auf unspezifische Effekte für eine Konzentration von 25 μ M > 10 % (vgl. Anhang A, Kap. A 2.3.5) ^{d)} Tabelle A-7 (Anhang A) entnommen

3.5.3 Kompetitionsbindung

Die Ergebnisse der Kompetitionsbindung der Benzothiazol-Derivate mit [³H]-P 1075 an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen werden in Tabelle 3-11 aufgeführt. Die zugehörigen Kompetitionsbindungskurven sind in den Abb. 3.5.6 bis 3.5.8 dargestellt.

Im Einzelnen wurden die Substanzen DSL203, DSL202 und DSL208 in Position 2' des Benzothiazolmoleküls mit einer Thioamid-Gruppe mit Methyl-, Ethyl bzw. Phenylrest substituiert. DSL203 und DSL202 zeigen geringe Affinitäten mit einem pK_D-Wert von 4.22 bzw. 4.12 (-log M); für DSL208, mit einem Phenylring am Stickstoffatom der Thioamid-Gruppe, wurde ein pK_D-Wert von ca. 3.3 (-log M) extrapoliert. Für AF33 und AF35, beide entsprechen den Substanzen DSL202 bzw. DSL208 mit einem zusätzlichem CF₃ in Position 5', wurden pK_D-Werte von 4.12 bzw. 4.08 (-log M) bestimmt. Die Substitution der untersuchten Derivate mit direkt am Grundmolekül ansetzender Thioamid-Gruppe stellt sich zusammenfassend niederaffin (pK_D < 4.3; -log M) dar.

Eine weitere Methylgruppe zwischen Benzothiazol-Molekül und Thioamid-Gruppe – im Sinne eines Brücken-C-Atoms – wurde mit den Substanzen AF20 und AF22 synthetisiert. Auch hier wurde ein Ethyl(AF20)- bzw. ein Phenylring(AF22) an dem Amid der Thioamid-Gruppe positioniert. Während AF20 mit einem Ethylrest am Stickstoffatom der Thioamid-Gruppe einen pK_D-Wert von 4.31 (-log M) erreicht, zeigte sich für die Substitution mit einem Phenylring (AF22) nur eine geringe Affinität mit einem extrapolierten pK_D-Wert von ca. 3.4 (-log M).

Interessant ist eine geringe zusätzliche Modifikation der Substanz AF20 durch Einfügen eines zusätzlichen Methylrestes am Brücken-C-Atom. Diese Substanz (AF48) ist mit einem pK_D-Wert von 4.83 ± 0.03 (-log M) um ca. Faktor drei affiner als AF20 selbst (Abb. 3.5.7). Ersetzt man diese Methylgruppe durch eine längerer Ethylgruppe (AF75) zeigt sich dies in einer geringfügig höheren Affinität mit einem pK_D-Wert von 5.03 ± 0.03 (-log M). Ersetzt man stattdessen das endständige Methyl der Thioamid-Gruppe von AF48 durch eine tert-Butyl-Gruppe (AF78) führt dies zu einer weiteren Affinitätserhöhung um ca. Faktor 3 (Abb. 3.5.7) mit einem pK_D-Wert von ca. 5.38 ± 0.03 (-log M). AF78 stellt somit das Benzothiazol mit der höchsten Affinität zum (SUR2B/Kir6.1)-K_{ATP}-Kanaltyp dar.

AF130 unterscheidet sich durch den Austausch der Thioamid-Gruppe von AF78 durch eine Carboxyamid-Gruppe. Die Affinität von AF130 ist mit einem pK_D-Wert von ca. 4.3 (-log M) an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen im Vergleich zu AF78 um ca. Faktor zehn geringer.





Abb. 3.5.7: Kompetitionsbindung von Thiazol-Derivaten mit [³H]-P 1075 an HEK 293 SUR2B/Kir6.1-Zellen (n=4). Adhärente, in 96-well-Platten kultivierte Zellen werden mit dem Radioliganden und steigenden Konzentrationen der kompetierenden Liganden versehen (Lösungswechsel), deren geeignete Mischung vorher in Eppendorf-Cups hergestellt wurde. Die unspezifische Bindung wird mit 1 μ M P1075 bestimmt. Dargestellt wird die prozentual normierte spezifische Bindung (B_S). Die Daten werden mittels nicht-linearer Regressionsanalyse anhand GI. 4 ausgewertet.

a) oben:			b) unt	ten:		
	рК _D ± ASD (-log M)		рК _D ± <i>ASD (-log M)</i>		
O AF	20 4.31 ± 0.03	n = 4	0	AF78	5.39 ± 0.03	n=4
Δ AF:	22 3.36 ± 0.21	n = 4	\triangle	AF75	5.03 ± 0.03	n=4
				AF48	4.83 ± 0.15	n=4



Kompetitionsbindung von Thiazol-Derivaten mit einem tert-Butyl-Thioamid-Rest (AF78) bzw. Abb. 3.5.8: einem tert-Butyl-Amid (AF130) mit [3H]-P 1075 an HEK 293 SUR2B/Kir6.1-Zellen (n=4). Adharente, in 96well-Platten kultivierte Zellen werden mit dem Radioliganden und steigenden Konzentrationen der kompetierenden Liganden versehen (Lösungswechsel), deren geeignete Mischung vorher in Eppendorf-Cups hergestellt wurde. Die unspezifische Bindung wird mit 1 µM P1075 bestimmt. Dargestellt wird die prozentual normierte spezifische Bindung (Bs). Die Daten werden mittels nicht-linearer Regressionsanalyse anhand GI. 4 ausgewertet.

		рК _D ± <i>ASD (-log М)</i>	
0	AF78	5.39 ± 0.03	n=4
Δ	AF130	4.30 ± 0.02	n=4

3.6 Agonistisch nicht wirksame Testsubstanzen zeigen keine antagonistische Wirkung an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)- und CHO-(SUR1/Kir6.2)- Zellen

 K_{ATP} -Kanalliganden, die nicht agonistisch aktiv sind, können als Antagonisten wirken, wie in unserer Arbeitsgruppe mehrfach nachgewiesen. Als Test für den Nachweis eines potentiellen Antagonisten wurden die HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)- bzw. CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen mit einer Diazoxid-Konzentration von 25 μ M vorstimuliert. Diese Konzentration induziert mehr als 50 % der max. hyperpolarisierenden Wirkung, wobei die Konzentration zugleich so gering ist, dass ein Cheng-Prussof-Effekt größeren Ausmaßes (EC₅₀ des Diazoxid >> K_D des potentiellen Blockes) vermieden wurde. In einem zweiten Schritt wurde mit den zu untersuchenden Substanzen versucht den im Sinne eines Kaliumkanalöffners hyperpolarisierenden Effekt des Diazoxids zu antagonisieren. Als Kontrollsubstanz diente der K_{ATP}-Kanalblocker Glibenclamid in einer Konzentration von 10 μ M an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1) bzw. 1 μ M an CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen.

Antagonistische Effekte am K_{ATP}-Kanal konnten an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)- oder CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen mit keiner einzigen der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Benzothiadiazin-, Benzofuran-, Benzothiophen- oder Benzothiazol-Derivate in jeweils n = 2 Versuchen nachgewiesen werden.

3.7 Die Wirkungen agonistisch wirksamer untersuchter Substanzen am K_{ATP}-Kanal werden durch Glibenclamid antagonisiert.

Die Spezifität der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Substanzen für den K_{ATP}-Kanal wurde nicht nur durch Radioligandbindungsverfahren ([³H]-P 1075) nachgewiesen, sondern auch durch Versuche mit dem Sulfonylharnstoff Glibenclamid mittels Membranpotentialmessung (DiBAC₄(3)). Glibenclamid ist ein K_{ATP}-Kanalblocker. Aufgrund der höheren Affinität am (SUR1/Kir6.2)-K_{ATP}-Kanaltyp wurde Glibenclamid hier in einer Konzentration von 1 μ M verwendet, wogegen am HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Modell 10 μ M eingesetzt wurden.

Alle agonistischen Effekte der in dieser Arbeit untersuchten Benzothiadiazin-, Benzofuran-, Benzothiophen- oder Benzothiazol-Derivate an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)- und CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen konnten mit Glibenclamid in je n = 2 Versuchen vollständig antagonisiert werden. Auch die Kontrolluntersuchungen in Anhang A zur Quantifizierung von unspezifischen Effekten demonstrieren die Blockadewirkung durch Glibenclamid und ermöglichen eine Interpretation unter Berücksichtigung von unspezifischen Effekten der untersuchten Testsubstanzen.

3.8 Dissoziationskinetiken mit [³H]-P 1075

3.8.1 Diazoxid-Derivate beschleunigen die [³H]-P 1075-Dissoziation

Beschleunigen K_{ATP} -Kanal-Liganden die Dissoziation von [³H]-P 1075, so handelt es sich nicht um eine Konkurrenz (Kompetition) mit [³H]-P 1075, sondern um eine allosterische Wirkung, wie sie von Bray and Quast (1992) am SUR2B- K_{ATP} -Kanaltyp gezeigt werden konnte. Bislang konnte eine solche allosterische Bindung durch Diazoxid nicht nachgewiesen werden, vermutlich weil die Affinität von Diazoxid nicht ausreicht und der Konzentrationsbereich zwischen K_D und toxischer Wirkung zu klein ist. Mit den neu synthetisierten Diazoxid-Derivaten mit bis zu 20-fach höherer Affinität ergab sich die Möglichkeit Experimente zur (möglicherweise) beschleunigten Dissoziation anzulegen.

Adhärent wachsende HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen wurden zu diesem Zweck mit 1 nM [³H]-P 1075 für 45 Minuten inkubiert. Mit Zugabe der zu untersuchenden Substanz im Rückstopp-Verfahren (unterschiedliche Startzeit, gemeinsamer Stopp) startet die eigentliche Messung der [³H]-P 1075-Dissoziation (Abb. 3.8.1bis 3.8.10); die entsprechenden Daten finden sich in Tab. 3-12. Als Maß für die Geschwindigkeit der Dissoziation des Radioliganden vom Rezeptor wird die Halb-wertszeit ($t_{1/2}$) in Minuten angegeben, in welcher die spezifische Bindung des Radioliganden um die Hälfte (bezogen auf das Maximum der Dissoziation) abfällt (mit $k_{off} = \ln 2 / t_{1/2}$; vgl. Gl. 8). Zusätzlich wird für die eingesetzten Konzentrationen jeweils die analytische Einheit c_A angegeben; sie drückt aus, welchem Vielfachen des K_D-Wertes diese Konzentration entspricht ($c_A = [A]/K_D$; vgl. Gl. 3).

In der Regel wurden die Versuche parallel mit vier K_{ATP}-Kanalliganden durchgeführt von denen jeweils einer P1075 (10 μ M) war. Der k_{off}-Wert (bzw. t_{1/2}-Wert) von P1075 diente als Kontrollwert eines rein kompetitiven Antagonisten: in n = 60 Einzelversuchen betrug die durchschnittliche Halbwertszeit der Dissoziation des Radioliganden [³H]-P 1075 von seiner Bindungsstelle 13.8 ± 0.5 min (entspricht einem k_{off}-Wert von ca. 0.0508 ± 0.0051 min⁻¹).

In Abb. 3.8.1 (oben) ist dargestellt, dass die Kaliumkanalöffner KC399 und Bimakalim (jeweils $c_A > 100$) mit einer Halbwertszeit von 13.3 min bzw. 14.65 min die Dissoziation von [³H]-P 1075, verglichen mit der P1075-Kontrolle (12.31 min), nicht beschleunigen. In Gegenwart des Sulfonylharnstoffs Glibenclamid konnte dagegen für die höchste eingesetzte Glibenclamid-Konzentration von 30 μ M eine Beschleunigung auf einen $t_{1/2}$ -Wert von 3 min ermittelt werden; jedoch beschleunigt auch eine kleinere Konzentration von 1 μ M die Dissoziation bereits auf eine $t_{1/2}$ von 6.6 min

(Abb. 3.8.1 unten). Auffällig ist dabei der Zusammenhang, dass die Halbwertszeit mit zunehmender eingesetzter Substanzkonzentration abnimmt.

Für 500 μ M Diazoxid wurde eine mäßige Beschleunigung der Dissoziationskinetik auf eine Halbwertszeit von 7.57 \pm 0.44 min im Vergleich zu 12.79 min für 10 μ M P1075 gemessen (Abb. 3.8.3 oben); dies steht in starkem Kontrast zu der fehlenden Beschleunigung durch andere Kaliumkanalöffner wie Bimakalim oder KC399. Vor dem Hintergrund, dass für die hohe Konzentration von 500 μ M Diazoxid toxische Nebeneffekte nicht auszuschließen sind, ist das Ergebnis für Diazoxid jedoch zweifelhaft.

Dagegen wurde für potente 7'-chloro-3'-Alkyl-Diazoxid-Derivate eine deutlich beschleunigte [³H]-P 1075-Dissoziation gemessen. So wurde für AF56, mit einem Cyclopropyl-Rest in Position 3, für eine Konzentration von 200 μ M eine Halbwertszeit t_{1/2} von 3.83 min gemessen (Abb. 3.8.4 unten). Kleinere Konzentrationen von AF56 führten dabei, analog zu Glibenclamid, zu einer schwächeren Beschleunigung der Dissoziation.

In der Konzentration von 200 μ M erreichten die Cyclobutyl-Derivate AF53 und AF55 eine Dissoziationsgeschwindigkeit mit einer Halbwertszeit t_{1/2} von 0.54 min bzw. 1.03 min (Abb. 3.8.6). Die Derivate AF51 und AF49, beides Substanzen mit einem Cyclopentyl-Rest, zeigten in einer Konzentration von 200 μ M Halbwertszeiten von 2.09 bzw. 1.67 min (Abb. 3.8.5). Auch für die Derivate AF38 und AF39 mit einem Cyclohexyl-Rest in Position 3' wurde in dieser Konzentration eine deutlich schnellere Halbwertszeit t_{1/2} von 2.23 bzw. 2.86 min gemessen als für die P1075 Kontrolle (Abb. 3.8.6).

Der Nachweis einer beschleunigten Dissoziation ist dabei abhängig von der eingesetzten Konzentration der zu untersuchenden Substanz. Am Beispiel der Substanz AF38 in Abb. 3.8.6 wird deutlich, dass eine Beschleunigung mit 200 μ M, welche dem 174-fachen des K_D-Wertes entspricht, sicher nachweisbar ist. Dagegen zeigt sich für eine Konzentration von 2 μ M AF38, welche dem 1.74-fachem des K_D-Wertes entspricht, keine Beschleunigung der Dissoziation.

Für die Substanzen AF38, AF39 sowie AF49 sind keine Daten im Rahmen des HTS-Verfahrens aufgrund von Löslichkeitsproblemen entstanden. AF57 wurde erst zu einem späteren Zeitpunkt in die Experimente aufgenommen und zeigte als einziges untersuchtes Diazoxid-Derivat mit nicht zyklischem Alkylrest im HTS-Verfahren eine deutliche Beschleunigung der [³H]-P 1075-Dissoziation auf eine Halbwertszeit von 2.31 min⁻¹ (200 μM).

Zusammenfassend beschleunigt Glibenclamid die Dissoziationsbindung des [³H]-P 1075, während die Kaliumkanalöffner KC399 und Bimakalim die Dissoziation nicht beschleunigen. Für Diazoxid konnte eine mäßige Beschleunigung und für dessen Derivate eine deutliche Beschleunigung der Dissoziation von [³H]-P 1075 durch Diazoxid-Derivate nachgewiesen werden.



Abb. 3.8.1: Dissoziationskinetik von [3H]-P 1075 mit den Benzopyranen KC399 und Bimakalim an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen. Vor Beginn der eigentlichen Dissoziationskinetik wurden adhäsiv in 96-well-Platten wachsende Zellen mit 1 nM [3H]-P 1075 (100 μ I) präinkubiert und somit eine Assoziationsbindung ausgelöst (nicht gezeigt). Nach Erreichen des Equilibrium nach ca. 45 min wurde die Dissoziation durch Injektion (mit sukzessivem Mischen) eines kleinen Volumens (11 μ I) der angegebenen Endkonzentrationen der zu untersuchenden Substanzen (= Methode A) im Rückstopp-Verfahren gestartet; d.h. die Dissoziation wurde zu verschiedenen Zeitpunkten gestartet und die Reaktion zu einem einheitlichen Zeitpunkt durch mehrfachen Lösungswechsel gestoppt. Als Kontrolle des Versuchs wurden 10 μ M P1075 eingesetzt (gestrichelt). Die Daten wurden mittels nichtlinearer Regressionsanalyse anhand GI. 7 ausgewertet, auf die min. spezifische Bindung der jeweiligen Konzentration normiert und in der obigen Abbildung als spezifische Bindung Bs über die Zeit dargestellt (n=4).

Dieses Experiment zeigt, dass KC399 und Bimakalim auch in hohen Konzentrationen (>> 100x K_D) die Dissoziationskinetik nicht über die Geschwindigkeit von P1075 selbst beschleunigen.


Abb. 3.8.2: Dissoziationskinetik von [³H]-P 1075 mit dem Sulfonylharnstoff Glibenclamid an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen.

oben: Die Versuchsdurchführung und Darstellung erfolgte analog zu Abb. 3.8.1 (Methode A, n=4).

unten: Im Unterschied zu der oberen Abbildung (nach Methode A) erfolgte zum Start der Dissoziation ein Austausch der Radioligand-Lösung durch einfachen Lösungstausch mit den angegebenen Konzentrationen der Testsubstanz (Methode B, "HTS-Verfahren"; vgl. Kap. 2.4.2; n=4).

In der oberen Abbildung wird eine beschleunigte Dissoziation von [3 H]-P 1075 bereits durch eine Glibenclamid-Konzentration von 1 μ M gezeigt. Mit zunehmender Konzentration wird eine Zunahme der Dissoziation beobachtet.



Abb. 3.8.3: *Dissoziationskinetik von* [³*H*]-*P* 1075 *mit Diazoxid an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen (n=4).* Die Durchführung und Darstellung des obigen Versuchs erfolgte analog zu Abb. 3.8.1 (Methode A).



Abb. 3.8.4: Dissoziationskinetik von [³H]-P 1075 mit dem Diazoxid-Derivat AF56 an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen.

Oben: Die Durchführung und Darstellung des Versuchs erfolgte analog zu Abb. 3.8.1 (Methode A, n=4). **Unten**: Die Durchführung und Darstellung des Versuchs erfolgte analog zu Abb. 3.8.2 u. (Methode B, n=4).



Abb. 3.8.5: Dissoziationskinetik von [³H]-P 1075 mit dem Diazoxid-Derivat AF53 an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen.

Oben: Die Durchführung und Darstellung des Versuchs erfolgte analog zu Abb. 3.8.1 (Methode A, n=4).

Unten: Die Durchführung und Darstellung des Versuchs erfolgte analog zu Abb. 3.8.2 u. (Methode B, n=4).





Oben: Die Durchführung und Darstellung des Versuchs erfolgte analog zu Abb. 3.8.1 (Methode A, n=4). **Unten**: Die Durchführung und Darstellung des Versuchs erfolgte analog zu Abb. 3.8.2 u. (Methode B, n=4).



Abb. 3.8.7: Dissoziationskinetik von [³H]-P 1075 des Diazoxid-Derivats AF49 an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen. Die Durchführung und Darstellung des Versuchs erfolgte analog zu Abb. 3.8.1 (Methode A, n=4).



Abb. 3.8.8: Dissoziationskinetik von [³H]-P 1075 mit den Diazoxid-Derivat AF51 an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen.

Oben: Die Durchführung und Darstellung des Versuchs erfolgte analog zu Abb. 3.8.1 (Methode A, n=4). **Unten**: Die Durchführung und Darstellung des Versuchs erfolgte analog zu Abb. 3.8.2 u. (Methode B, n=4).



Abb. 3.8.9: Dissoziationskinetik von [³H]-P 1075 mit den Diazoxid-Derivaten AF38 (oben) und AF39 (unten) an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen. Die Durchführung und Darstellung des Versuchs erfolgte analog zu Abb. 3.8.1 (Methode A, n=4).



Abb. 3.8.10: Dissoziationskinetik von [3 H]-P 1075 mit dem Diazoxid-Derivat AF57 an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen. Die Durchführung und Darstellung des Versuchs erfolgte analog zu Abb. 3.8.2 u. (Methode B, n=4). Zum direkten Vergleich ist eine repräsentative P1075-Kontrolle (10µM) in der Abb. 3.8.9 (oben) eingezeichnet.

o ±ASD og M)	Konz. µM	¢A	k _{off} ± ASD min ⁻¹	$t_{1/2} \pm ASD$ min	n	Methode ^a	
KCO							
± 0.02	10	2041.7	0.0508 ± 0.0051	13.83 ± 1.49	60	А	
0 ± 0.04	1	977.2	0.0520 ± 0.0021	13.33 ± 0.56	4	А	
5 ± 0.04	10	446.7	0.0473 ± 0.0018	14.65 ± 0.58	4	А	
Sulfonvlharnstoffe							
0.03 ± 0.03	1	2.1	0.0935 ± 0.0105	7.41 ± 0.94	4	A	
	3	6.4	0.1502 ± 0.0106	4.61 ± 0.35	4	A	
	10	21.3	0.3132 ± 0.0169	2.21 ± 0.13	4	А	
	25	53.3	0.5527 ± 0.0771	1.25 ± 0.20	4	В	
	30	64.0	0.5328 ± 0.0365	1.30 ± 0.10	4	А	
	50	106.7	0.9238 ± 0.1220	0.75 ± 0.11	4	В	
	75	160.0	1.5187 ± 0.1392	0.46 ± 0.05	4	В	
	100	213.3	1.6294 ± 0.2656	0.43 ± 0.08	4	В	
	$\pm ASD$ $\log M$) KCO ± 0.02 ± 0.04 ± 0.04 ± 0.03	\pm ASD Konz. $\log M$) μM kCO 10 \pm 0.02 10 \pm 0.04 1 \pm 0.03 1 \pm 0.03 1 \pm 0.03 1 50 75 100 100	\pm ASD Konz. c_A $og M$) μM μM \star CO 10 2041.7 \pm 0.02 10 2041.7 \pm 0.04 1 977.2 \pm 0.04 10 446.7 \pm 0.03 1 2.1 \pm 0.03 1 2.1 \pm 0.03 1 2.1 5 53.3 30 30 64.0 50 50 106.7 75 75 160.0 100 100 213.3 213.3	\pm ASD og M)Konz. μ MCA CAkorr \pm ASD min ⁻¹ μ M μ Mmin ⁻¹ κ CO102041.70.0508 \pm 0.0051 \pm 0.02102041.70.0508 \pm 0.0051 \pm 0.041977.20.0520 \pm 0.0021 \pm 0.0410446.70.0473 \pm 0.0018 \pm 0.0312.10.0935 \pm 0.0105 \pm 0.0312.130.3132 \pm 0.0105 \pm 0.03121.30.3132 \pm 0.01692553.30.5527 \pm 0.07713064.00.5328 \pm 0.036550106.70.9238 \pm 0.122075160.01.5187 \pm 0.1392100213.31.6294 \pm 0.2656	\pm ASD og M)Konz. μ MCA CA $k_{off} \pm ASD$ min ⁻¹ $t_{1/2} \pm ASD$ min μ M μ M min^{-1} min κ CO102041.7 0.0508 ± 0.0051 13.83 ± 1.49 \pm 0.02102041.7 0.0508 ± 0.0051 13.83 ± 1.49 \pm 0.041977.2 0.0520 ± 0.0021 13.33 ± 0.56 \pm 0.0410446.7 0.0473 ± 0.0018 14.65 ± 0.58 \pm 0.0312.1 0.0935 ± 0.0105 7.41 ± 0.94 \pm 0.0312.13 0.3132 ± 0.0106 4.61 ± 0.35 \pm 0.0312.13 0.3132 ± 0.0169 2.21 ± 0.13 \pm 0.0312.13 0.3132 ± 0.0169 2.21 ± 0.13 \pm 0.0364.0 0.5328 ± 0.0365 1.30 ± 0.10 50 106.7 0.9238 ± 0.1220 0.75 ± 0.11 75 160.0 1.5187 ± 0.1392 0.46 ± 0.05 100 213.3 1.6294 ± 0.2656 0.43 ± 0.08	$\pm ASD$ og M)Konz. μ Mc_A minkorr $\pm ASD$ min ⁻¹ t_{1/2} $\pm ASD$ minnog M) μ M μ Mmin ⁻¹ minninKCO102041.70.0508 ± 0.0051 13.83 ± 1.49 60 ± 0.02 102041.70.0520 ± 0.0021 13.33 ± 0.56 4 ± 0.04 1977.20.0520 ± 0.0021 13.33 ± 0.56 4 ± 0.04 10446.70.0473 ± 0.0018 14.65 ± 0.58 4 ± 0.03 12.10.0935 ± 0.0105 7.41 ± 0.94 4 ± 0.03 12.10.0935 ± 0.0105 7.41 ± 0.94 4 ± 0.03 12.10.0935 ± 0.0105 7.41 ± 0.94 4 ± 0.03 12.10.0935 ± 0.0105 7.41 ± 0.94 4 ± 0.03 12.10.0935 ± 0.0105 7.41 ± 0.94 4 ± 0.03 12.10.0935 ± 0.0105 7.41 ± 0.94 4 ± 0.03 12.10.0935 ± 0.0105 7.41 ± 0.94 4 ± 0.03 12.10.0935 ± 0.0105 7.41 ± 0.94 4 ± 0.03 12.10.0935 ± 0.0105 7.41 ± 0.94 4 ± 0.03 12.10.0935 ± 0.0105 7.41 ± 0.94 4 ± 0.03 12.10.0935 ± 0.0105 7.41 ± 0.94 4 ± 0.03 12.10.0935 ± 0.0105 7.41 ± 0.94 4 ± 0.03 102.130.3132 ± 0.0105 1.30 ± 0.1	

Tab. 3-12: Kinetische Daten für die durch Standard-K_{ATP}-Kanalliganden induzierte [³H]-P 1075-Dissoziation an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen

^a Methode A: Die Dissoziation von [³H]-P 1075 wurde durch Zugabe eines kleinen Volumens (11 μl) der Testsubstanz in die [³H]-P 1075-haltige Lösung (100 μl) bei sukzessiver Vermischung induziert. Methode B: Die Dissoziation wurde durch Austausch der radioaktiven Lösung gegen eine Lösung mit der Endkonzentration der Testsubstanz induziert (vgl. Kap. 2.4.2).

Tab. 3-13: Kinetische Daten f ídie durch Diazoxid-Derivate induzierte [³H]-P 1075-Dissoziation an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen (Teil 1)

Substanzname	pK _D ± ASD	Konz.	¢A	$k_{off} \pm ASD$	$t_{1/2} \pm ASD$	n	Methode ^a			
н	(-log M)	μM		min ⁻¹	min					
Diazoxid-Derivate (1)										
Diazoxid	4.73 ± 0.04	20	1.1	0.0653 ± 0.0128	10.61 ± 2.59	4	А			
(vgl. Abb. 3.8.3)		200	10.7	0.0728 ± 0.0050	9.52 ± 0.70	4	А			
		500	26.9	0.0916 ± 0.0056	7.57 ± 0.49	4	А			
AF56	5.65 ± 0.04	5	2.2	0.0550 ± 0.0037	12.60 ± 0.91	4	А			
(vgl. Abb. 3.8.3 un	ten)	50	22.3	0.0538 ± 0.0029 12.88 ± 0.73		4	А			
	\bigtriangleup	50	22.3	0.0828 ± 0.0076	8.37 ± 0.85	4	В			
		100	44.6	0.1275 ± 0.0063	5.44 ± 0.28	4	В			
		150	66.8	0.1948 ± 0.0082	3.56 ± 0.16	4	В			
		200	89.1	$0.2283 \pm 0.0089 \qquad 3.04 \pm 0.12$		4	В			
		200	89.1	0.1812 ± 0.0068	3.83 ± 0.15	4	А			
AF53	5.86 ± 0.04	2	1.5	0.0816 ± 0.0070	8.49 ± 0.80	4	А			
(vgl. Abb. 3.8.5)	\searrow	20	14.5	0.1735 ± 0.0093	4.00 ± 0.23	4	А			
		50	36.3	0.1827 ± 0.0089	3.79 ± 0.19	4	В			
		100	72.6	0.3465 ± 0.0151	2.00 ± 0.09	4	В			
		150	108.9	0.5605 ± 0.0282	1.24 ± 0.07	4	В			
		200	145.2	0.6042 ± 0.0000	1.15 ± 0.00	4	В			
		200	145.2	1.2784 ± 0.0570	0.54 ± 0.03	4	А			
AF55	6.02 ± 0.04	2	2.1	0.0466 ± 0.0037	14.87 ± 1.28	4	А			
(vgl. Abb. 3.8.6)	\square	20	21.0	0.0824 ± 0.0041	8.41 ± 0.44	4	А			
		50	52.5	0.1200 ± 0.0039	5.78 ± 0.19	4	В			
		100	105.0	0.2047 ± 0.0075	3.39 ± 0.13	4	В			
		150	157.4	0.2826 ± 0.0114	2.45 ± 0.10	4	В			
		200	209.9	0.3388 ± 0.0152	2.05 ± 0.10	4	В			
		200	209.9	0.6738 ± 0.0377	1.03 ± 0.06	4	A			
AF49	5.93 ± 0.04	2	1.7	0.0604 ± 0.0055	11.48 ± 1.15	4	A			
(vgl Abb. 3.8.7)	$\overline{}$	50	42.6	0.1404 ± 0.0071	4.94 ± 0.26	4	A			
		200	170.2	0.3310 ± 0.0188	2.09 ± 0.13	4	А			

Resultate

Substanzname	$pK_{D} \pm ASD$	Konz.	cA	$k_{off} \pm ASD$	$t_{1/2} \pm ASD$	n	Methode ^a
CI OF S	3' R N 0 ite (2)					<u> </u>	<u> </u>
AF51	6.23 ± 0.04	2	3.4	0.0650 ± 0.0045	10.66 ± 0.79	4	А
(vgl. Abb. 3.8.8)	\bigcap	20	33.9	0.0818 ± 0.0041	8.47 ± 0.45	4	А
	\bigtriangledown	50	84.7	0.1605 ± 0.0061	4.32 ± 0.17	4	В
		100	169.4	0.2836 ± 0.0160	2.44 ± 0.15	4	В
		150	254.2	0.4021 ± 0.0202	1.72 ± 0.09	4	В
		200	338.9	0.4163 ± 0.0233	1.67 ± 0.10	4	А
		200	338.9	0.4545 ± 0.0254	1.53 ± 0.09	4	В
AF38	5.94 ± 0.04	2	1.7	0.0512 ± 0.0046	13.54 ± 1.34	4	А
(vgl. Abb. 3.8.9 oben)		20	17.3	0.1400 ± 0.0046	4.95 ± 0.17	4	А
		200	172.6	0.3063 ± 0.0163	2.26 ± 0.13	4	А
AF39	5.85 ± 0.04	2	1.4	0.0619 ± 0.0056	11.20 ± 1.11	4	А
(vgl. Abb. 3.8.9 ur	nten)	20	14.1	0.0860 ± 0.0044	8.06 ± 0.43	4	А
		200	140.6	0.2430 ± 0.0150	2.85 ± 0.19	4	А
AF57	5.67 ± 0.02	50	23.4	0.1172 ± 0.0059	5.91 ± 0.31	4	В
(vgl. Abb. 3.8.10 unten)		100	46.8	0.2056 ± 0.0122	3.37 ± 0.21	4	В
	\mathbf{r}	150	70.2	0.2565 ± 0.0114	2.70 ± 0.13	4	В
		200	93.5	0.2999 ± 0.0152	2.31 ± 0.12	4	В

Tab. 3-14: Kinetische Daten für die durch Diazoxid-Derivate induzierte [³H]-P 1075-Dissoziation an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen (Teil 2)

 ^a Methode A: Die Dissoziation von [³H]-P 1075 wurde durch Zugabe eines kleinen Volumens (11 μl) der Testsubstanz in die [³H]-P 1075-haltige Lösung (100 μl) bei sukzessiver Vermischung induziert. Methode B: Die Dissoziation wurde durch Austausch der radioakt. Lösung gegen eine Lösung mit der Endkonzentration der Testsubstanz induziert (vgl. Kap. 2.4.2).

3.8.2 Abschätzung der Diffusionsgeschwindigkeit mittels Fluoreszenzmessung

Da die Bindungsstelle des K_{ATP}-Kanals auf der cytoplasmatischen Seite der Zellmembran liegt (Stephan et al., 2006) und die Dissoziationsbindung an intakten Zellen erfolgte, muss ein Ligand zunächst die Zellmembran passieren, bevor er die Bindungsstelle erreicht. Um die Dauer dieses Vorgangs zeitlich einzuordnen, wurde eine Membranpotentialmessung mit dem Fluoreszenzliganden DyeB unter den in Kap. 2.5 beschriebenen experimentellen Bedingungen durchgeführt; DiBAC₄(3) kommt als Fluoreszenzligand aufgrund seiner langsamen Verteilungskinetik nicht in Frage. Diese Messung dient lediglich als Abschätzung eines oberen Zeitlimits, da die gemessene Zeit neben der eigentlichen Diffusion und Bindung auch die gesamte Transduktion bis zur Änderung des Membranpotentials und die darauf folgender Umverteilung des Fluoreszenzliganden erfasst.

Die Diazoxid-Derivate wurden Konzentrationen von jeweils 2 μ M, 20 μ M bzw. 50 μ M untersucht. Im [³H]-P 1075-Dissoziationsversuch wurden zwar auch Konzentrationen von 200 μ M Ligand eingesetzt, welche jedoch im Fluoreszenzversuch zur Vermeidung potentiell toxischer Effekte durch eine Konzentration von 50 μ M ersetzt wurde. P1075 wurde in einer Konzentration von 10 μ M untersucht (entspricht der Konzentration der Kontrolle in der Dissoziationsbindung).

Mit einer 12-fach-Pipette wurde eine zeitgleiche Injektion der zu untersuchenden Substanzen in den jeweiligen Konzentrationen gewährleistet und nach Einstellung des Gleichgewichts ein Maximalstimulus von 3 μ M KC399 zur Kontrolle gegeben. Darauf wurde die Zeit von der Injektion bis zur vollständigen Einstellung eines neuen Verteilungsgleichgewichts des DyeB aufgrund einer Änderung des Membranpotentials der Zelle gemessen. Die Geschwindigkeit dieses Vorgangs wird durch die Halbwertszeit t_{1/2} angegeben. Ein Beispielversuch für die Substanz AF53 wird in Abb. 3.8.11 demonstriert. Bis der halbmaximale Effekt von 2 μ M bzw. 20 μ M AF53 eintritt, dauert es ca. 35.0 bzw. 8.1 Sekunden.

Für eine Konzentration von 10 μ M P1075, welches in den Dissoziationskinetik-Versuchen als Kontrolle eines kompetitiven Mechanismus eingesetzt wird, wurde auf diese Weise eine durchschnittliche Halbwertszeit t_{1/2} von 10.7 ± 1.3 Sekunden ermittelt. Tabelle 3-15 kann entnommen werden, dass die Diazoxid-Derivate in den höchsten Konzentrationen ähnliche Werte erreichen. Je kleiner die eingesetzte Konzentrationen, desto längere Halbwertszeiten wurden gemessen.



Abb. 3.8.11: Fluoreszenzmessung mit DyeB zur Bestimmung der Geschwindigkeit der Wirkkinetik von AF53 an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen. Adhäsiv wachsende Zellen wurden mit 0.125 mg/ml DyeB bis zum erreichen eines Verteilungsgleichgewichts inkubiert. Nach Normierung der Kanäle wurde mit einer 12-fach Pipette zeitgleich das Diazoxid-Derivat AF53 in steigenden Konzentrationen von 0.5 µM bis 50 µM injiziert. Nach ca. 3 Minuten wurde ein Gleichgewicht in allen Kanälen erreicht. Zur Charakterisierung, wie schnell dieser Vorgang für die verschiedenen Konzentrationen ablief, wurde die Halbwertszeit $t_{1/2}$ zwischen Injektion und Einstellung des Gleichgewichts bestimmt. Zur Kontrolle des Versuchs wurde zusätzlich ein maximal agonistischer Stimulus von 3 µM KC399 bei 12 min injiziert und durch Vergleich mit zuvor ermittelten Dosiswirkungskurven die Wirkung der einzelnen Konzentrationen verifiziert.

0 ^{//} 0	[A] μM	t _{1/2} [s]	n
P1075 (control)	5	10.7 ± 1.3	8
AF38	2	103.5 ± 5.8	3
	20	43.3 ± 5.2	3
	50	27.2 ± 6.2	4
AF39	2	44.0 ± 6.7	7
	20	25.5 ± 5.2	6
	50	18.3 ± 2.2	8
AF49	2	37.0 ± 4.3	5
	20	18.4 ± 2.9	7
	50	15.9 2.0	6
AF51	2	27.8 ± 4.1	6
	20	15.6 ± 1.5	6
	50	9.0 ± 1.2	6
AF53	2	21.2 ± 3.9	6
	20	14.6 ± 2.4	8
	50	10.3 ± 0.9	8
AF55	2	27.6 ± 5.9	6
	20	12.6 ± 2.0	7
	50	9.0 ± 1.1	6

Tab. 3-15: Abschätzung der Diffusionszeit mittels DyeB-Fluoreszenzmessung

3.8.3 Bestimmung der allosterischen Potenz

Die Dissoziationsgeschwindigkeit (k_{off}) des Radioliganden ([³H]-P1075) nimmt mit steigender Konzentration der Testsubstanzen (Diazoxid-Derivate) zu (s. Abb. 3.8.2 bis 3.8.10), was die allosterische Interaktion von Cyanoguanidinen ([3H]-P1075) und Diazoxid-Derivaten belegt. Die Zunahme ist klein für Konzentrationen im Bereich der Gleichgewichtsdissoziationskonstante $(\sim K_{\rm D})$ und wird erst deutlich für große Konzentrationen > 20 K_D. Zur Klärung der Frage, ob dieser allosterische Effekt von der unterschiedlichen chem. Struktur der Derivate abhängt, soll ein Maß für die allosterische Potenz einer Substanz definiert werden. Hierfür bietet sich ein Plot der konf-Werte in Abhängigkeit von der Ligand-Konzentration an. Der funktionale Zusammenhang ergibt sich durch Annahme eines ternary complex GRL* von Rezeptor (KATP-Kanal), Radioligand L*, und allosterischem Ligand G (Abb. 2.4.1) sowie der Lösung einfacher Differentialgleichungen als Hyperbel (Gl. 15). Diese Hyperbel strebt für große Konzentrationen des allosterischen Liganden dem Limes k_{off L*IG} (Dissoziationsgeschwindigkeit des allosterisch induzierten Prozesses) zu. Ein halbmaximaler Wert wird bei der Dissoziationskonstanten KG' angenommen, der Bindung von G an den Komplex [R L*] beschreibt. Für kleine Konzentrationen strebt die Hyperbel dem Limes $k_{off.L*}$ (Dissoziationsgeschwindigkeit in einer kompetitiven Situation) zu; er wurde im Rahmen der nichtlinearen Regression als Konstante auf den koff-Wert von [3H]-P 1075 in Gegenwart von 10 µM P1075 gesetzt: 0.0508 min⁻¹ (n=60, Tab. 3-12). Der Plot der k_{off}-Werte findet sich in Abb. 3.8.12. Für keines der untersuchten Diazoxid-Derivate läßt sich ein eindeutig hyperboles Verhalten feststellen, da offensichtlich alle untersuchten Konzentrationen kleiner als die Dissoziationskonstante K_G⁴ sind. Infolgedessen kann der Fit der Daten mittels nicht-linearer Regressionsanalyse nach Gl. 15 keine unabhängig bestimmten Werte für K_G ' und $k_{off,L^*|G}$ ergeben. Aus diesem Grunde wurde für die Randbedingung $[G] \ll K_G$ eine Approximation an ein lineares Modell abgeleitet, die eine Gerade mit der Steigung $\{k_{off,L^*|G} - k_{off,A}\} / K_G$ ergibt. Die k_{off} -Funktion von Glibenclamid ist wesentlich steiler als die aller Diazoxid-Derivate (Abb. 3.8.12); dementsprechend ist die allosterische Potenz (19300 \pm 300 min⁻¹ M⁻¹) wesentlich höher als die aller untersuchten Diazoxid-Derivate (Tabellen 3-12 bis 3-14). Innerhalb der Gruppe der Diazoxid-Derivate gibt es bemerkenswerte Unterschiede: so ist die allosterische Potenz des zyklischen Butyl-Derivats AF53 mit 3030 ± 80 min⁻¹ M⁻¹ wesentlich höher als die des gleichaffinen zyklischen Propyl-Derivats AF56 mit 530 ± 10 min⁻¹ M⁻¹. Die geringste allosterische Potenz hat die Muttersubstanz Diazoxid mit einer allosterischen Potenz von nur $120 \pm 10 \text{ min}^{-1} \text{ M}^{-1}$.

∧ N 3' R		HEK293-(SUR2B/Kir6.1)							
CI OF OR	pK_{D}^{a} (-log M) (n)	$\frac{k_{\text{off},L^* G}}{(min^{-l})}$ (n)	pK _G ' ^b (-log M) (n)	Approx. allosterische Potenz ^c (min ⁻¹ M ⁻¹)					
Diazoxid	4.97 ± 0.02			120 ± 10					
	(4)			(4)					
AF56	5.65 ± 0.02			647 ± 24					
	(4)			(4)					
AF55	6.02 ± 0.02	(3.5 ± 3.9)	(2.7 ± 0.5)	1483 ± 28					
	(4)	(4)	(4)	(4)					
AF53	5.86 ± 0.02	(2.5 ± 1.0)	(3.2 ± 0.2)	3028 ± 86					
	(4)	(4)	(4)	(4)					
AF51	6.23 ± 0.03	(1.4 ± 0.3)	(3.3 ± 0.1)	2067 ± 44					
	(4)	(4)	(4)	(4)					
AF49	5.97 ± 0.03			1424 ± 49					
\square	(4)			(4)					
AF39	5.85 ± 0.02			969 ± 37					
	(4)			(4)					
AF38	5.94 ± 0.03			1469 ± 59					
	(4)			(4)					
AF57	5.67 ± 0.02	(2.1 ± 2.0)	(2.9 ± 0.5)	13071 ± 32					
Ĭ	(4)	(4)	(4)	(4)					
Glibenclamid		(7.1 ± 4.0)	(3.5 ± 0.3)	19348 ± 300					
		(4)	(4)	(4)					

^a pK_D-Werte aus Tab. 3-2, 3-4 und 3-5 für einen direkten Vergleich übernommen.

^b Die Parameter $k_{off,L^*|G}$ und pK_G' beziehen sich auf die Gleichung 15; in der nicht-linearen Regressionsanalyse zeigten sie sich statistisch stark voneinander abhängig und mit großen Fehlern behaftet.

$$k_{diss} = \frac{k_{off.L^*} + k_{off.L^*|G} \cdot [G] / K_{G'}}{1 + [G] / K_{G'}}$$
(entspricht Gl. 15; S. 33)

^c Steigung einer Regressionsgeraden, welche anhand von Gl. 16 geschätzt wurde. Sie entspricht dem Term:

$$\frac{k_{\text{off.L*}|G} - k_{\text{off.A}}}{K_{G}'} \qquad (aus \ Gl. \ 16; \ S. \ 35)$$



Abb. 3.8.12: Die Zunahme der k_{off} -Werte der Einzelversuche (s. Tab. 3-16) wurde in Abhängigkeit von der verwendeten Konzentration untersucht und mit einer nicht-linearen Regression anhand von Gl. 15 analysiert (durchgezogene Linie). Weder die Glibenclamid-Funktion noch die der verschiedenen Diazoxid-Derivate sättigt sich im untersuchten Konzentrationsbereich. Es wurden allerdings deutliche quantitative Unterschiede der *allosterischen Potenz* der Wirkstoffe gefunden. Die lineare Funktion der *approximativen allosterischen Potenz* nach Gl. 16 ist exemplarisch für Glibenclamid und AF53 eingezeichnet (gepunktet). Zum Vergleich wurde der konstante k_{off} -Wert des kompetitiven Liganden P1075 eingezeichnet (rot).

4.1 Evaluation der Messmethodik

4.1.1 Fluoreszenzmessverfahren des Membranpotentials im Vergleich

Die Arbeitsgruppe um Gopalakrishnan etablierte bereits auf dem Membranpotential-Fluoreszenzmarker DiBAC₄(3) basierende Versuchsanordnungen zur Charakterisierung von KATP-Kanal-Liganden (Gopalakrishnan et al., 1999). Dabei wurde hier ein FLIPR-System (Fluorescent Imaging Plate Reader, Molecular Devices) eingesetzt, welches die Fluoreszenz einer gesamten 96-well-Platte anregen und detektieren kann (Schroeder und Neagle, 1996). Die gemessene Fluoreszenzintensität des dabei eingesetzten Fluoreszenzmarkers DiBAC₄(3) zeigt einen linearen Zusammenhang mit dem Membranpotential (Epps et al., 1994). Weiterhin konnten Gopalakrishnan et al. (1999) zeigen, dass die mit DiBAC₄(3) ermittelten EC_{50} -Werte denen aus Relaxationsexperimenten an Muskelstreifen der Harnblase entsprechen und dass ein kaliumarmer Puffer (KCl = 2 mM) bei maximaler Stimulation der KATP-Kanäle eine höhere Membranpotentialänderung als die Standardkonzentration von 5 mM erzielt. Daher wurde auch in der vorliegenden Arbeit ein kaliumarmer Puffer (Miller et al., 1999) eingesetzt. Ein weitere Technik der Membranpotentialbestimmung mit DiBAC₄(3) wurde mit einem motorisierten Fluoreszenz-Mikroskop beschrieben (Lebrun et al., 2000; Nielsen et al., 2006); hierbei werden die einzelnen Kanäle einer 96-well-Platte sukzessiv angesteuert und ausgelesen, wodurch keine vollkinetische Messung im eigentlichen Sinne möglich ist.

Jedoch besitzt DiBAC₄(3) einige Nachteile, vor allem seine langsame Verteilungskinetik und Quencheffekte in Kombination mit einigen Testsubstanzen (Whiteaker et al., 2001; Yamada et al., 2001). Als alternativen Membranpotentialmarker setzen daher sowohl die Arbeitsgruppe um Gopalakrishnan, wie auch unsere Arbeitsgruppe, das sog. "FLIPR membrane potential dye" (FMP), in der vorliegenden Arbeit "DyeB" genannt, ein. Auch für DyeB ist ein linearer Zusammenhang zwischen Fluoreszenzintensität, Änderung des Membranpotentials, sowie Relaxation an Muskelstreifen der Harnblase gezeigt; gleichzeitig bietet es den Vorteil einer sehr schnellen Verteilungskinetik, welche die Messung schneller Membranpotentialänderungen ermöglicht (Whiteaker et al., 2001; Baxter et al., 2002; Wolff et al., 2003).

Zusammenfassend erscheint die Messung von Membranpotentialänderungen mittels Fluoreszenz als etablierte Alternative zur herkömmlichen Patch-Clamp-Technik. Zwar ist eine detaillierte biophysikalische Beschreibung der Ionenkanalfunktion nicht möglich, aber gerade für die gezielte Charakterisierung einer Vielzahl von potentiellen K_{ATP} -Kanal-Liganden erscheint die verwendete Diskussion

Technik mit hohem Probendurchsatz, hoher Zuverlässigkeit, gut reproduzierbaren EC_{50} -Werten sowie leichter Handhabung als überlegen.

Die eingesetzten Fluoreszenzmessmaschinen (Eigenentwicklung, Lemoine und Rood, 2006) bieten im Vergleich zum FLIPR-System nicht nur stabilere Messspuren mit Schwankungen << 1 %, sondern auch die Möglichkeit einer direkten Interaktion dank einer optimierten Injektionstechnik (Dunkelinjektion bei laufender Messung) sowie eine hohe Datenrate von derzeit ca. 3 Hz für jeden einzelnen Kanal zur Erfassung schneller Kinetiken. Die simultane Messung von "nur" 12 Kanälen in einer Maschine stellt im Vergleich mit dem FLIPR-System (96 Kanäle) keinen quantitativen Nachteil hinsichtlich des Probendurchsatzes dar, da stets mehrere Messmaschinen simultan eingesetzt werden.

4.1.2 Messergebnisse der Affinität und relativen Wirkstärke im Vergleich mit Literaturangaben

Zur Evaluierung des Messverfahrens werden in Tabelle 4-1 eigene Messergebnisse für Standard-Substanzen Literaturangaben für den (SUR2B/Kir6.2)-K_{ATP}-Kanal gegenübergestellt; Messergebnisse an der Aorta der Ratte von Jaspert (2001) stammen ebenfalls aus unserer Arbeitsgruppe.

Hinsichtlich der Bestimmung der Affinität der untersuchten Standardsubstanzen gleichen die pK_D-Werte der [³H]-P 1075-Kompetitionsbindungsversuchen von Schwanstecher et al. (1998) und Russ et al. (2003) annähernd den eigenen Messergebnissen. Da die Radioligandbindung nur die Bindung des [³H]-P 1075 an den Rezeptor und nicht den gesamten Signaltransduktionsweg erfasst, erscheint dieses Verfahren als robust und die erhobenen Daten valide. Die Bewertung der relativen Wirkstärken erweist sich als schwieriger: Während die an Aortenringen von Jaspert (2001) mittels Relaxationsexperimenten erhobenen pEC₅₀-Messwerte für P1075, Bimakalim und Diazoxid im Vergleich zu den eigenen Membranpotentialmessungen mit Fluoreszenzmethoden nur leicht niedriger ausfallen, weichen die mittels Patch-Clamp-Technik (inside-out-Konfiguration) erhobenen Messwerte (Schwanstecher et al., 1998; Russ et al., 2003) um ca. Faktor acht ab. Zum einen könnte dies auf der jeweils verwendeten Messtechnik beruhen. So fanden bereits Shieh et al. (2001) an KATP-Kanälen der Harnblase des Schweines (SUR1/SUR2B), dass durch Messung von Membranpotential oder Relaxation erhobene pEC₅₀-Werte um Faktor 6 niedriger ausfielen, als die mittels patch clamp Messung ermittelten Werte für die Kanalleitfähigkeit. Dies wird darauf zurückgeführt, dass nur wenige KATP-Kanäle geöffnet sein müssen, um das Membranpotential zu ändern (Bonev und Nelson, 1993; Nelson und Quayle, 1995; Quayle et al., 1997). Die Messmethoden unterscheiden sich weiterhin in der Verwendung von inside-out-Patches (Schwanstecher et al., 1998; Russ et al., 2003) gegen intakte Zellen in Form von RASMC (Jaspert, 2001) oder HEK 293(SUR2B/Kir6.1)-Zellen. Speier et al. (2005) konnte zeigen, dass an Pankreas-Gewebescheiben der Maus – also intakten Zellen im Gewebsverbund – die ATP-Sensitivität im Vergleich zu Membran-fragmenten der *inside-out*-Konfiguration (Patch-Clamp) für ATP sinkt und die EC_{50} vom mikromolaren in den millimolaren Bereich verschoben wird.

Auch an mit α -Toxin perforierten Zellen konnte dieser Unterschied zu nicht perforierten Zellen für den SUR1 gemessen werden (Tarasov et al., 2006). Durch diesen Effekt sind unter physiologischen Bedingungen in intakten Zellen mehr K_{ATP}-Kanäle geöffnet (Speier et al., 2005; Proks und Ashcroft, 2009), so dass bereits bei kleineren Konzentrationen eines K_{ATP}-Kanalöffners ein Maximaleffekt denkbar ist. Als Ursache für diesen Effekt wird ein Zusammenhang mit der ATPase-Tätigkeit des SUR selbst vermutet (Tarasov et al., 2006).

	vorliegende Arbeit		Jaspert (2001)		Schwanstecher et al. (1998)		Russ et al. (2003)	
	HEK293		RASMC		HEK293	HEK293	HEK293	HEK293
	(SUR2B/Kir6.1)		(SUR2B/Kir6.1)		(SUR2B)	(SUR2B/	(SUR2B)	(SUR2B/
	[³ H]_	Mombran	[³ H]_	Rolay_	[³ H]_	RIFO.2)	[³ H]_	NIFO.2)
	[11]- D 1075	withing an-	[11]- D 1075	Ation	[11]- D 1075		[11] ⁻	Clamp
	P 10/5	potential	P 10/5	ation	P 10/5	Clamp	P 10/5	Clamp
	pK_D	<i>pEC</i> 50	pK_D	pEC50	pK_D	<i>pEC</i> 50	pK_D	pEC50
P1075	8.31	8.02	8.31	7.96	7.92	7.35	8.36	7.17
	± 0.02	± 0.02	± 0.09	± 0.03	± 0.06	± 0.11	± 0.10	± 0.20
Bimakalim	7.65	7.81	7.79	7.67				
	± 0.03	± 0.04	± 0.08	± 0.06				
Diazoxid	4.97	5.14	4.83 ^a	4.76	4.89	4.24	5.11	
	± 0.02	± 0.02	± 0.11	± 0.06	± 0.06	± 0.09	± 0.12	
KC399	8.99	9.23						
	± 0.04	± 0.02						
Levcromakalim			7.07	7.00	6.44	5.51	6.94	
			± 0.13	± 0.03	± 0.03	± 0.24	± 0.02	
(-)-Pinacidil			7.32	6.65	6.89 ^{a)}	6.17 ^{b)}	7.64	
			± 0.07	± 0.09	± 0.03	± 0.11	± 0.40	
Minoxidil	7.13		7.60	6.51			7.32	
	± 0.04		± 0.16	± 0.09			± 0.10	
Rilmakalim			7.81	8.45			7.68	
			± 0.11	± 0.06			± 0.07	
Aprikalim			6.46	6.64			6.49	
			± 0.11	± 0.04			± 0.16	
Nicorandil			4.24	6.86			5.04	
			± 0.17	± 0.05			± 0.12	

Tab. 4-1: Vergleich von Wirksamkeit und Bindungsaffinität von Standard-KATP-Kanalliganden

Die pK_D -Werte (-log M) wurden bei allen Quellen durch Kompetitionsbindungexperimenten mit [³H]-P 1075 bestimmt; beachte unterschiedlich exprimierte K_{ATP} -Kanäle. Die pEC_{50} -Werte (-log M) wurden mittels DiBAC₄(3)-Membranpotentialmessung (vorliegende Arbeit), Relaxationsexperimenten (Jaspert 2001) oder Patch-Clamp-Technik (currentclamp; Schwanstecher et al., 1998; Russ et al., 2003; beachte: unterschiedlicher Kaliumkanal-Subtyp) gemessen.

4.1.3 Vergleich von Affinität und relativer Wirkstärke

Generell muss zwischen der Bindung des Liganden an den inaktiven Rezeptor selbst und allen anderen darauf folgenden transduktiven Ereignissen und Wechselwirkungen unterschieden werden (Colquhoun (1998). Während die Bindungsaffinität durch die Gleichgewichtsdissoziationskonstante (pK_D) beschrieben wird, kann die halbmaximale Änderung des Membranpotentials (pEC_{50}) lediglich als Charakterisierung eines mit den verwendeten Methoden erfassbaren Endpunktes einer Signal-Transduktionskaskade dienen. Die Transduktion zwischen Bindung und Wirkung selbst wird von vielen Faktoren beeinflusst (vgl. Einleitungskapitel) und ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Dennoch erfolgte neben einem Vergleich mit Literaturangaben auch ein Vergleich der an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen erhobenen pEC_{50} und pK_D -Werte selbst. Eine Korrelation beider Werte ergab für die Diazoxid-Derivate einen linearen Zusammenhang zwischen pK_D und pEC_{50} ($R^2 = 0.94$); dabei schwanken die pEC_{50} -Werte mit ± 0.3 Log-Einheiten um die jeweiligen pK_D -Werte (Abb. 4.1.1).



Abb. 4.1.1: Die an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen erhobenen pK_{D} - und pEC_{50} -Werte der Diazoxid-Derviate zeigen in einer linearen Regression mit einem Bestimmtheitsmaß von 0.94 einen starken Zusammenhang; dabei besitzt die Regressionsgerade eine Steigung von annähernd 1 (0.95).

In Hinblick auf die Evaluation der Messung des Membranpotentials mittels Fluoreszenz bedeutet dies für die verwendeten Zellen einen konstanten Zusammenhang zwischen beiden Werten, der somit auch die pEC_{50} -Werte bzw. pK_D untereinander vergleichbar macht.

Obwohl auf Grundlage der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auch auf ein konventionelles Rezeptormodell geschlossen werden könnte, finden sich in der Literatur Hinweise, dass genau dies nicht der Fall ist: Die Arbeitsgruppe um M. Schwanstecher leitete aus ihren Messergebnissen ein rezeptortheoretisches Modell ab, welches das Vorliegen des Sulfonylharnstoffrezeptors als Heterooktamer mit 4 interagierenden SUR-Untereinheiten berücksichtigt: nach dem sog. *four-sites*-Modell muss ein K_{ATP}-Kanalöffner alle vier Bindungsstellen der 4 SUR-Untereinheiten besetzen (Schwanstecher et al., 1998), um den Kanal zu aktivieren. Für das *four-sites*-Modell ergibt sich nach Gl. 22 eine entsprechende Rechtsverschiebung der pEC₅₀-Werte von 0.7231 Log-Einheiten im Vergleich zum K_D-Wert der Radioligandbindung. Dieses Modell ist mit den Daten von Schwanstecher et al. (1998) für P1075, Diazoxid, Levchromakalim und (-)-Pinacidil gut belegt: die pEC₅₀-Werte sind durchschnittlich 0.6 bis 0.9 Log-Einheiten geringer als die pK_D-Werte (für P1075 s.a. Russ et al., 2003). Weitere Unterstützung für das *four-sites*-Modell ergibt sich aus einer Studie von Babenko (2008), der durch einen sukzessiven Austausch von SUR1 durch eine mutierte, den Kir6.2 aktivierende SUR1-Variante einen exponentiellen Zusammenhang zwischen der Anzahl aktivierender



Abb. 4.1.2: Vergleich der Rezeptorbindungskurve (fett) für Diazoxid mit seiner Membranpotential-Wirkung (strich-punktiert) an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen und der theoretischen K_{ATP} -Kanal-Aktivierungskurve (punktiert), die sich aus der Interaktion aller 4 SUR-Untereinheiten mit einer Verschiebung um 0.72 Log-Einheiten (orange dargestellt) ergibt.

SUR1-Varianten und Kanalaktivität gefunden hat; erst bei vollständigem Austausch aller vier SUR1-Einheiten durch die Mutation erfolgt eine volle Aktivierung des Kanals.

Für das *four-sites*-Modell spricht zusätzlich die Überlegung, dass K_{ATP} -Kanalblocker am K_{ATP} -Kanal an nur eine Bindungsstelle zum Schließen des Kanals binden müssen (Dörschner, Brekardin, Uhde, Schwanstecher und Schwanstecher, 1999), so dass im Umkehrschluss gefolgert werden könnte, dass ein K_{ATP} -Kanalöffner an alle vier Bindungsstellen binden müsste, um eine Öffnung des Kanals zu bewirken. Entgegen dieser Befunde postulierten Gross, Toman, Uhde, Schwanstecher C und Schwanstecher M (1999) ein one-site-Modell für K_{ATP} -Kanalöffner, aus dem eine entgegengesetzte Linksverschiebung der pEC₅₀-Werte um 0.7231 Log-Einheiten im Vergleich zum pK_D-Wert folgt; in der Literatur konnte dieses Modell nur für K_{ATP} -Kanalblocker (Dörschner, Brekardin, Uhde, Schwanstecher M, 1999), jedoch nicht für Agonisten bestätigt werden.

Die pEC₅₀- und pK_D-Werte für die Standard-Agonisten der vorliegenden Arbeit (Tab. 4-1), die mit einer gewissen Schwankungsbreite übereinstimmen, scheinen auf den ersten Blick weder für ein *four-sites*-Modell von vier interagierenden SUR-Untereinheiten noch für ein *one-site*-Modell zu sprechen. Zieht man allerdings in Betracht, dass die Membranpotential-Wirkungen an einem artefiziellen Zellsystem - HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen – bestimmt wurden, deren Kanaldichte mehrere Größenordnungen über einer native K_{ATP} -Kanaldichte liegt, so muss davon ausgegangen werden, dass sich das artefizielle Zellsystem wie ein *spare-receptor*-System verhält (EC₅₀ << K_D), welches halbmaximale Wirkungen bei wesentlich weniger als einer 50%tigen Rezeptorbesetzung erlaubt. Anders gesagt, es ist davon auszugehen, dass es durch die *spare-receptors* zu einer deutlichen Linksverschiebung der Dosiswirkungskurve kommt, die die Rechtsverschiebung durch das *four-sites*-Modell ganz oder teilweise kompensiert. Unterstützend kommt hinzu, dass eine Arbeit aus unserem Labor an intakten Aorten der Ratte (Jaspert, 2001), die ebenfalls über den Sur2B/Kir6.1-K_{ATP}-Kanal verfügen, durchschnittlich 2-fach (0.3 log-Einheiten) geringere pEC₅₀-Werte für die Standardagonisten aufwiesen, wie es von einem System, welches über keine oder wenige *spare receptors* verfügt, angenommen werden kann.

Ein Vergleich von Affinität und funktioneller Aktivität ist für CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen nicht durchführbar. Bisher existiert kein Radioligand, welcher die klassische KCO-Bindungsstelle besetzt, sondern nur der antagonistische Radioligand [³H]-Glibenclamid mit einer völlig anderen ATP-Abhängigkeit, so dass hier keine pK_D-Werte für Agonisten bestimmt werden können. Da es sich auch bei den CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen wahrscheinlich auch um ein überexprimiertes Rezeptorsystem handelt, darf vermutet werden, dass an diesem Zellmodell ebenfalls *spare-receptor*-Effekte existieren.

4.2 Diazoxid-Derivate

4.2.1 Fehlende Substituierung mit Chlor in Position 7' führt zu Abfall der relativen Wirkstärke

Zur Orientierung am Molekül erfolgte für diese Arbeit zunächst eine Synthese von Diazoxid-Derivaten ohne Chloratom in Position 7' des Benzo-Thiadiazin-Moleküls. Diese Derivate zeigten im Vergleich zu ihren chlorierten Analoga eine um etwa Faktor zehn geringere relative Wirkstärke respektive Affinität (vgl. Tab. 3-4, 3-5, S. 82f).

Schon von Peat et al. (2002) wurde berichtet, dass in Position 7'



Abb. 4.2.1: Diazoxid-Strukturformel

chlorierte Derivate eine zehnfach höhere relative Wirkstärke in Patch-Clamp-Versuchen an (SUR1/Kir6.2)-transfizierten Oozyten zeigen als unchlorierte; eine Aminogruppe in Position 7' führte dagegen zu einem weiteren Wirksamkeitsverlust um ca. Faktor zehn. Zu einem ähnlichen Ergebnis kommen auch de Tullio et al. (2006), welche bei Messungen der Hemmung der Insulinsekretion an β-Zellen des Pankreas (SUR1/Kir6.2) eine 5 bis 10-fach erhöhte Wirkstärke von Derivaten mit 7'-Chlor-Substituenten beschreiben. Beide folgern aus ihren Ergebnissen, dass eine hohe Elektronegativität in Position 7' sich vorteilhaft auf die relative Wirkstärke der Derivate auswirkt. Zugleich könnte das Halogen Chlor auch einen indirekten Einfluss auf das Stickstoffatom in Position 4' des Thiadiazin-Rings haben, welches so bei einem pH von 7.2 überwiegend protoniert vorliegt. Somit würden Halogene in Position 7' die Wasserstoffbrückenbildung am 4'-Stickstoffatom begünstigen (Lebrun et al., 2000; Peat et al., 2002). Neben Position 7' wären auch andere Positionen des Chlor-Substituenten am Benzol-Ring des Diazoxids denkbar. Pirotte et al. (2010) kamen für die (SUR1/Kir6.2)-KATP-Kanalvariante zu dem Schluss, dass die relative Wirkstärke in der Reihenfolge 5' < 8' < 7' < 6'-Chlor ansteigt. Die um Faktor zehn geringere gemessene relative Wirkstärke an unchlorierten Diazoxid-Derivaten steht damit sehr gut im Einklang mit der vorhandenen Literatur.

Pirotte et al. (2011) zeigte für 3'-Isopropyl-Diazoxid-Derivate, dass eine 7'-Substituierung mit Chlor Varianten mit Fluor oder Brom geringfügig überlegen sei. Für das untersuchte Diazoxid-Derivat DAD1 mit einem 7'-Bromatom kann dies für die untersuchten Zellsysteme, im Vergleich zu Diazoxid selbst, nicht bestätigt werden, da sowohl relative Wirkstärke als auch Affinität mit denen der Muttersubstanz Diazoxid übereinstimmen.

4.2.2 Substituenten in Position 3'

4.2.2.1 Einfluss der Ringgröße von nicht-aromatischen Cycloalkyl-Substituenten

Bereits de Tullio et al. (1996) modifizierten das Diazoxid-Molekül durch einen Cyclopentyl-Rest in Position 3' (entspricht der Substanz AF51; Abb. 4.2.2) und konnten in Relaxationsexperimenten an der Aorta von Ratten eine um ca. Faktor 10 gesteigerterte Wirkung zugunsten des SUR2B-KATP-Kanals nachweisen; eine systematische Untersuchung von 3'-Cycloalkyl-Resten fehlte jedoch bislang. Im Rahmen dieser Arbeit wurden am Diazoxid-Molekül verschiedene nicht-aromatische 3'-Cycloalkyl-Substitutio- einem 3'-Cyclopentyl-Rest





nen mit unterschiedlicher Ringgröße vom Cyclopropyl(AF56)- bis zum Adamantyl-Substituenten (DAD13) vorgenommen (Tab. 3-5, S. 83). Dabei wurden an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen für diese Derivate jeweils 6 bis 10-fach erhöhte relative Wirkstärken respektive Affinitäten im Vergleich zur Ausgangssubstanz Diazoxid gemessen. Ein Zusammenhang zwischen relativer Wirkstärke an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen und Ringgröße des 3'-Cycloalkyl-Restes wurde hier nicht eindeutig sichtbar.

Dagegen konnte an CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen ein deutlicher Verlust der relativen Wirkstärke um beinahe Faktor zehn gemessen werden, sobald der nicht-aromatische 3'-Cycloalkyl-Rest aus mehr als fünf Kohlenstoffatomen besteht (vgl. AF51 mit AF49 in Tab. 3-5). Für das ausgeprägt lipophile Adamantyl-Derivat DAD13 wurde die EC₅₀ sogar in den millimolaren Bereich extrapoliert. Für Substituenten mit weniger als 5 Kohlenstoffatomen wie z.B. das 3'-Cyclopropyl-Derivat AF56 konnte an CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen hingegen eine Zunahme der relativen Wirkstärke im Vergleich zu Diazoxid um bis zu Faktor fünf auf einen pEC₅₀-Wert von 5.47 (-log M) erzielt werden. Auch für die 3'-Cyclobutyl-Derivate AF55 und AF53 sowie das 3'-Cyclopentyl-Derivat AF51 wurden für den (SUR1/Kir6.2)-KATP-Kanaltyp höhere Wirksamkeiten mit pEC₅₀-Werten zwischen ca. 5.1 und 5.4 (-log M) ermittelt.

Der Effekt des Wirkverlustes an CHO-Zellen mit Zunahme der Größe des 3'-Alkyl-Substituenten wird auch durch einen Vergleich von Wirksamkeiten von 3'-Alkylamino-Diazoxid-Derivaten bestätigt (de Tullio et al., 2005; Sharma et al., 2008). Danach besitzt der 3'-Substituent mit zunehmender Lipophilie nur für SUR1/Kir6.2 einen negativen Einfluss auf die pEC₅₀; am SUR2B/Kir6.1 konnte kein Einfluss nachgewiesen werden. Da die Zunahme der Ringgröße dieser Substituenten mit einer Zunahme der Lipophilie einhergeht (Tab. 3-3), kann dieser Zusammenhang für die in der vorliegenden Arbeit untersuchten 3'-Alkyl-Diazoxid-Derivate bestätigt werden.

4.2.2.2 Aromatische Substituenten

Im Vergleich von aromatischen mit nicht aromatischen 3'-Substituenten ähnlicher Ringgröße zeigt der aromatische 3'-Thiophenring-Substituent (AF45) verglichen mit dem Cyclopentyl-Substituenten (AF51) einen Abfall der relativen Wirkstärke um ca. Faktor zehn an beiden Zellystemen (s. Tab. 3-5). Auch die planaren 3'-Phenyl-Substituenten AF41 und AF42 zeigten an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen im Vergleich mit den 3'-Cyclohexyl-Derivaten AF38 und AF39 eine geringere Affinität und relative Wirkstärke. Dabei ist die Affinität der Phenyl-substituierten Derivats AF42 ca. 2.5-fach geringer als die des Methyl-Phenyl-substituierten Derivats AF41 (mit Brücken-C-Atom, welches die freie Drehung des planaren Phenyl-Rings gegenüber der aromatischen Grundstruktur erlaubt), mit einer potentiell besseren Anpassung des Wirkstoffs AF41 an die Rezeptorstruktur des SUR2B. Die Bestimmung der relativen Wirkstärke beider Liganden mittels Fluoreszenz-Verfahren ergab ein etwas kritisches Verhalten von AF41, da das Brücken-C-Atom kondensierte Doppelbindungen zwischen Substituent (Phenyl) und Grundstruktur (Benzo-Thiadiazin) erlaubt, die möglicherweise in die Fluoreszenz-Lichtmessung eingreifen (s. Anhang A). Eindeutig konnten jedoch beide Substanzen als Agonisten für den SUR2B-Typ K_{ATP}-Kanal charakterisiert werden (s. Tab. 3-5, sowie in Anhang A: Abb. A6, A7 und Tab. A-5 bis A-7).

Hinsichtlich ihrer relativen Wirkstärke an CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen wurde sowohl für die aromatischen Phenyl- und Thiophen-Substituenten (AF42, AF41, AF45) als auch für die Cyclohexyl-Substituenten (AF39, AF38) ein ähnlich geringer pEC₅₀-Wert von jeweils ca. 4.3 (-log M) ermittelt. Diese geringe relative Wirkstärke könnte für diese Substanzen – neben ihrem aromatischen Charakter – mit Phenyl- oder Cyclohexyl-Substituenten auch allein aufgrund ihrer Größe (vgl. Kap. 4.2.2.1) erklärt werden (der Thiophen-Ring des Derivats AF45 ist geringfügig weiter als der Cyclopentyl-Ring des Derivats AF51).

Zusammenfassend bieten die untersuchten aromatischen Substituenten an beiden Zellsystemen weder hinsichtlich ihrer Selektivität noch ihrer relativen Wirkstärke keine Vorteile gegenüber Cycloalkyl-Substituenten ähnlicher Ringgröße.

4.2.2.3 Einfluss eines zusätzlichen Brücken-C-Atoms in Position 3'

Die Cycloalkyl-Derivate lassen sich weiterhin nach einer zusätzlichen Methylgruppe (Brücken-C-Atom) zwischen Thiadiazin-Ring und eigentlichem Cycloalkyl-Substituenten gruppieren. Die Motivation zur Synthese von Diazoxid-Derivaten mit diesem zusätzlichen Brücken-C-Atom in Position 3' stellt zum einen eine Serie von potenten 3'-Cycloalkylamino-Thienothiadiazin-Derivaten der Arbeitsgruppe um Bodo Hansen (Nielsen et al., 2002) dar, welche eine agonistische Wirkung am SUR1-Typ, jedoch eine antagonistische Wirkung am SUR2B-Typ des K_{ATP}-Kanals bewirkten

Diskussion

(funktionelle Selektivität). Unter den neu synthetisierten 3'-Methyl-Cycloalkyl-Benzothiadiazin-Derivaten der vorliegenden Arbeit befand sich jedoch kein einziger K_{ATP} -Kanal-Antagonist (vgl. Abb. 4.2.2.6). Eine weitere Motivation stellte die Grundidee dar, dass Substituenten mit Brücken-C-Atom eine höhere räumliche Flexibilität bzw. Rotationsfreiheit besitzen und sich den Erfordernissen der Bindungsstelle besser anpassen könnten.



Abb. 4.2.3: Strukturformeln der Diazoxid-Derivate AF42 und AF41. Das Derivat AF41 wurde im Vergleich zu AF42 mit einem zusätzlichem Brücken-C-Atom zwischen dem Benzothiadiazin-Ring und 3'-Pentyl-Rest synthetisiert.

Diese Argumentation stützen die Ergebnisse der 3'-Phenyl-Derivate AF42 und AF41 (Abb. 4.2.3): die Variante mit Brückenatom (AF41) zeigt eine ~ 2.5-fach höhere Affinität an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen (Tab. 3-5). Auch für die Cyclohexyl-Derivate AF39 und AF38 zeigt sich ein solcher Zusammenhang, wobei die Variante mit Brückenatom (AF38) nur geringfügige Vorteile hinsichtlich der relativen Wirkstärke bietet. Ein Erklärungsansatz ist, dass die räumliche Flexibilität der Substanzen AF39 und AF42 durch den direkt am Diazoxid-Molekül ansetzenden Substituenten eingeschränkt ist; für den planaren Phenyl-Substituenten des AF42 scheint dieser Effekt dabei stärker ausgeprägt zu sein. Analog zum Phenyl-Substituenten (AF42), könnte dieser Effekt auch für die geringe Wirkstärke des Thiophen-Derivats AF45 verantwortlich sein. Einen ent-gegengesetzten Effekt zeigen Derivate mit kleineren 3'-Substituenten wie Cyclobutyl- und Cyclopentyl-Resten (AF55/AF53 bzw. AF51/AF49). An ihnen führte das zusätzliche Brücken-C-Atom zu einer mehr als halbierten relativen Wirkstärke an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen. Da für diese Derivate ohne Brückenatom gleichzeitig auch die höchsten relativen Wirkstärken aller untersuchten Diazoxid-Derivate gemessen wurde, scheinen sie ohne zusätzliches Brücken-C-Atom verschlechtert wird.

Interessanterweise wurden an CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen keine wesentlichen Unterschiede zwischen der Variante mit oder ohne Brücken-C-Atom gemessen. Einzige Ausnahme stellen dabei die Cyclopentyl-Derivate AF49 vs. AF51 dar. Hier kommt es durch ein zusätzliches Brücken-C-Atom (AF49) zu einem beinahe 10-fachem Absinken der relativen Wirkstärke an CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen. Da AF49 die Substanz mit dem kleinsten cyclischen Substituenten in Position 3' mit mehr als 5 Kohlenstoffatomen ist, kann dieser Wirkverlust der Größe des Substituenten zugerechnet werden (Kap. 4.2.2.1).

4.2.2.4 3'-Butenyl- und Isobutenyl-Derivate

Neben den cyclischen Substitutionen wurden auch zwei Butenyl-Derivate untersucht. Dabei stellte sich das 3'-Butenyl-Diazoxidderivat AF54 im Vergleich zu Diazoxid mit ähnlicher relativer Wirkstärke an SUR1/Kir6.2, sowie doppelter relativer Wirkstärke an SUR2B/Kir6.1 dar, woraus sich eine Selektivität von 0.8 (-log M) ergab.

Überraschend wurde dagegen für das 3'-Isobutenyl-Derivat AF57 (Tab. 3-5, S.83) trotz seiner kleinen Größe an CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen eine extrapolierte pEC₅₀ von nur 3.6 (-log M) ermittelt, während es an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen die doppelte relative Wirkstärke (pEC₅₀ 5.41; -log M) von Diazoxid erreichte. Daraus resultiert für AF57 mit einer Selektivität von ca. 1.8 Log-Einheiten zugunsten des SUR2B/Kir6.1-K_{ATP}-Kanals die zweithöchste Selektivität nach dem Adamantyl-Derivat (DAD13).

Dabei ist die hohe Selektivität von verzweigtkettigen 3'-Substituenten, deren Gruppe AF57 entspricht, bereits für SUR1 (und nicht SUR2) bekannt (de Tullio et al., 2006).





So stellen sich die Substanzen BPDZ 73 und NNC 55-0118 (Abb. 4.2.4), beides Derivate mit einem 3'-Isopropylamino-Substituenten, mit etwa 1.8 Log-Einheiten als sehr SUR1/Kir6.2-selektiv dar (de Tullio et al., 2005; Nielsen et al., 2006; Lebrun et al., 2008; Pirotte et al., 2010). Zusätzlich ist für die Substanz NNC55-0118 eine inhibierende Wirkung an SUR2B bekannt, so dass hier eine funktionelle Selektivität zugunsten des SUR1 besteht (Dabrowski et al., 2003). Diese Umkehr der Selektivität zugunsten des SUR1/Kir6.2-K_{ATP}-Kanals im Vergleich zu der in dieser Arbeit untersuchten Substanz AF57 ist vor allem auf das Stickstoffatom des 3'-Substituenten zurückzuführen (de Tullio et al., 2006).

Die in der vorliegenden Arbeit an AF57 erhobenen Daten widersprechen kürzlich veröffentlichten Ergebnissen von Pirotte et al. (2011) zur Wirksamkeit seiner Substanz 15c (identisch zur Substanz AF57 der vorliegenden Arbeit): in Relaxationsstudien an Aortenringen der Ratte wurde für AF57 dort ein pEC₅₀-Wert von 5.23 ± 0.13 (-log M) angegeben; dies entspricht etwa den in dieser Arbeit erhobenen Daten zum Derivat AF57 an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen. Überraschend ist, dass die Wirksamkeit der Substanz 15c in Untersuchungen zur Insulinfreisetzung aus Inselzellen des Pankreas von Ratten (entspricht dem SUR1/Kir6.2-K_{ATP}-Kanal-Typ) auf einen ähnlichen pEC₅₀-wert bestimmt wurde, und damit ähnlich dem Diazoxid selbst unselektiv ist; dagegen zeigte AF57 an CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen in der vorliegenden Arbeit einen deutlichen Wirkverlust und eine daraus resultierende hohe Selektivität zugunsten des SUR2-Typs.

Da die Messungen der vorliegenden Arbeit an beiden Zellsystemen (SUR1 vs. SUR2B) teilweise zeitgleich mit dem gleichen Puffer- und pipettierten Verdünnungsreihen durchgeführt wurden, erscheint eine Fehlmessung in der vorliegenden Arbeit wenig wahrscheinlich. Es bleibt anzumerken, dass sich die eingesetzten Methoden und gemessenen Zielgrößen zwischen der vorliegenden Arbeit und Pirotte et al. (2011) grundlegend unterscheiden und Pirotte et al. (2011) nur einen aus Einzelwerten extrapolierten pEC₅₀-Wert angibt. Letztendlich bleibt der Unterschied zwischen Pirotte et al. (2011) und der vorliegenden Arbeit unverstanden.

4.2.2.5 Vergleich von 3'-Alkyl- mit 3'-Alkylamino-Substituenten

Die 3'-Substituenten der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Diazoxid-Derivate besitzen in der α -Position (entspricht dem ersten Atom des Substituenten in 3') ein Kohlenstoffatom und werden als 3'-Alkyl-Derivate bezeichnet. Sie werden nachfolgend mit Derivaten verglichen, welche in dieser Position ein Stickstoffatom besitzen und als 3'-Alkylamino-Derivate bezeichnet werden (vgl. Abb. 4.2.5). Diese unterscheiden sich generell von den untersuchten 3'-Alkyl-Substituenten: Das Stickstoffatom bildet zusammen mit den beiden Stickstoffatomen des Thiadiazin-Rings eine

Guanidin-Struktur (rot markiert in Abb. 4.2.5 unten), in welcher die Elektronen zwischen den drei Stickstoffatomen delokalisiert vorliegen. Durch diese mesomeriestabilisierte Gruppe ist die Rotation um die Bindung zwischen 3'-Stickstoffatom und dem Thiadiazin-Ring eingeschränkt; das erste Kohlenstoffatom nach dem Stickstoffatom in Position 3' liegt dadurch mit den drei Stickstoffatomen in einer Ebene.

Dagegen ist eine Rotation für 3'-Methyl-Alkyl-Substituenten um die Bindung zwischen Thiadiazin-Ring und erstem Kohlenstoffatom des Substituenten möglich (grün markiert in Abb. 4.2.5 oben), wodurch 3'-Alkyl-Derivate mehr mögliche Konformationen einnehmen können (Pirotte et al., 2011). Ein weiterer sterischer Unterschied ergibt sich aus den unterschiedlichen Bindungswinkeln des 3'-Stickstoffatoms der 3'-Alkylamino-Derivate (119.1°) und des 3'-Kohlenstoffatoms



Abb. 4.2.5: 3'-Alkyl-Thiadiazine wie z. B. AF53 (oben) besitzen eine zusätzliche Torsionsmöglichkeit (grün) mit 3'-Alkylaminoim Vergleich Thiadiazine wie Substanz Nr. 31 (unten; de Tullio et al.,2006) Das Stickstoffatom des Substituenten von Substanz Nr. 31 kann mit den beiden Stickstoffatomen des Thiadiazin-Rings eine Guanidinstruktur (rot) ausbilden.

der 3'-Alkyl-Derivate (113.4°). Zusätzlich soll das Stickstoffatom der 3'-Alkylamino-Reste die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen begünstigen.

Durch die Arbeitsgruppe um Pirotte wurden zahlreiche Substanzen mit 3'-Alkylamino-Substituenten synthetisiert und analysiert (Pirotte et al., 1993, 2000, 2010; Lebrun et al., 2000, 2008; de Tullio et al., 2003, 2005, 2006). De Tullio et al. (2006) entwickelten auf dieser Datengrundlage, sowohl für den Pankreastyp des K_{ATP}-Kanals (SUR1) als auch für die Aortenmuskulatur (SUR2B) ein pharmakologisches Modell der 3'-Alkylamino-Derivate. Danach sei für den SUR1-K_{ATP}-Kanaltyp das 3'-Stickstoffatom günstig in Hinblick auf höhere relative Wirkstärke und Selektivität; insbesondere in Kombination mit kurzen verzweigtkettigen oder kleinen zyklischen 3'-Substituenten. Im Gegensatz dazu erreichen die 3'-Alkyl-Derivate der vorliegenden Arbeit mit kleinen zyklischen Resten (Cyclopropyl, Cyclobutyl, Cyclopentyl) zwar eine teilweise höhere relative Wirkstärke (pEC₅₀) an CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen als Diazoxid selbst – jedoch ohne Zuwachs der Selektivität im Vergleich zum (SUR2B/Kir6.1)-Typ. Einen deutlicheren Unterschied zwischen 3'-Alkyl- und 3'-Alkylamino-Derivaten am SUR1-K_{ATP}-Kanaltyp zeigt das einzige untersuchte verzweigtkettige 3'-Isobutyl-Derivat AF57: es weist eine ausgeprägte Selektivität zugunsten des SUR2B durch einen Wirkverlust an SUR1 auf, während für das 3'-Isopropylamino-Derivat (BPDZ 73; Abb. 4.2.4 Mitte) eine entgegengesetzte SUR1-Selektivität bekannt ist (Lebrun et al., 2008).

Die Ergebnisse der untersuchten 3'-Alkyl-Diazoxid-Derivate widersprechen auch in Hinblick auf den SUR2B-K_{ATP}-Kanaltyp den Vorhersagen für 3'-Alkylamino-Derivate (de Tullio et al., 2006). Danach würden kleine cyclische Substituenten einen Wirkverlust bewirken; für Diazoxid-Derivate mit Cyclopropyl-, Cyclobutyl- oder Cyclopropyl-Rest wurde dagegen die ca. 8-fache relative Wirkstärke (pEC₅₀) im Vergleich zu Diazoxid an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen gemessen. Einzig die Vorhersage, dass Derivate mit einem kleinen verzweigtkettigen Rest vorteilhaft seien, stimmt mit der hohen Selektivität von AF57 für SUR2B überein. Zusammenfassend entsprechen die beiden für 3'-Alkylamino-Derivate entworfenen pharmakologischen Modelle nicht den Ergebnissen der 3'-Alky-Diazoxid-Derivaten der vorliegenden Arbeit.

Sharma et al. (2008) erweiterten die Analyse von de Tullios et. al. (2006) für die 3'-Alkylamino-Benzothiadiazine auf andere chemische Eigenschaften und entwickelten ein QSAR-Modell um pEC₅₀-Werte hervorzusagen. Danach ist die relative Wirkstärke einer Substanz am SUR1-K_{ATP}-Kanaltyp umso geringer, desto größer der ClogP-Gruppenverteilungskoeffizienz (als Ausdruck gesteigerter Lipophilie) des 3'-Substituenten ist; für den SUR2B-K_{ATP}-Kanaltyp hat diese Eigenschaft dagegen kaum Bedeutung. Diese Vorhersage stimmt mit den eigenen Ergebnissen an CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen mit Diazoxid-Derivaten für 3'-Cycloalkyl-Substituenten überein (vgl. Kap. 4.2.2.1).

4.2.2.6 Vergleich der Diazoxid-Derivate mit Thiadiazin-Derivaten anderer Molekülgrundstrukturen

Vergleich mit Pyrido-Thiadiazin-Derivaten. Die Ausgangssubstanz Diazoxid und die in dieser Arbeit untersuchten Diazoxid-Derivate basieren auf einem Benzo-Thiadiazin-Heterozyklus (Abb. 4.2.6 links). Wird der Benzol-Ring des Cyclopentyl-Diazoxid-Derivats AF51 (Abb. 4.2.2) durch einen Pyridin-Ring getauscht, ergibt sich sowohl für SUR1 als auch SUR2B ein deutlicher Wirkverlust; in Kombination mit einem 3'-Alkylamino-Substituenten (vgl. Kap. 4.2.2.5) zeigten Pyrido-Thiadiazin-Derivate (Abb. 4.2.6, Mitte) jedoch eine ausgeprägtere SUR1-Selektivität als entsprechende Benzo-Thiadiazin-Derivate (de Tullio et al., 1996).



Abb. 4.2.6: Übersicht diverser Thiadiazin-Grundstrukturen mit 3'-Alkyl- oder 3'-Alkylamino-Substitutionen

Vergleich mit Thieno-Thiadiazin-Derivaten. J.B. Hansen und Mitarbeiter (Nielsen et al., 2004, 2006) synthetisierten eine Reihe von Thieno-Thiadiazin-Derivaten, die in 3'-Position durch verschieden Alkylamino-, bzw. Cyclo-Alkylamino-Gruppen substituiert waren, mit dem Ziel, hochselektive SUR1-Typ selektive K_{ATP}-Kanal-Agonisten zu gewinnen. Für die in Abb. 4.2.7 dargestellen



(7-chloro-3-alkylamino-4H-thieno-thiadiazin-1,1Diazoxid-Derivate)

Abb. 4.2.7: Thiadiazine mit ähnlicher Substitution in Position 3'. Während an 3'-Cycloalkyl-Benzo-Thiadiazinen (oben) die Substitution mit Cycloalkyl-Resten am SUR2B/Kir6.2-K_{ATP}-Kanaltyp zu vollen Agonisten führt, wurde für die gleiche Substitution an 3'-Cycloalkylamino-Thieno-Thiadiazinen eine antagonistische Wirkung nachgewiesen (unten).

3'-Cycloalkylamino-Derivate C50 (Cyclobutyl), C51 (Cyclopentyl) und C52 (Cyclohexyl) wurde von den Erstbeschreibern eine geringe Affinität für den SUR2B-K_{ATP}-Kanaltyp der Gefäßmuskelzellen angenommen, und somit eine hohe Selektivität zugunsten der SUR1-K_{ATP}-Kanäle der ß-Zelle der Pankreas. Überraschenderweise wurde in unserem Labor jedoch festgestellt, dass es sich bei den vermeintlichen niederaffinen Substanzen in Wirklichkeit um Antagonisten handelt, die durchaus submikromolare Affinitäten für SUR2B-Typ K_{ATP}-Kanäle besitzen, ohne jedoch die Kanäle aktivieren zu können (Lemoine et al., 2007, 2009; Teschner, 2011). Auf Basis dieses interessanten Befundes wurden auch in dieser Arbeit Benzo-Thiadiazine mit entsprechenden Cycloalkyl-Resten substituiert (AF53, AF49, AF38; s. Abb. 4.2.7), wobei die Aminogruppe der Thieno-Thiadiazine in Position 3' durch eine Methylgruppe bei den Benzo-Thiadiazinen ersetzt wurde, um auf diese Weise K_{ATP}-Kanal-Antagonisten zu erzeugen. Diese Hypothese wurde allerdings experimentell widerlegt: alle Benzo-Thiadiazin-Derivate wirken ohne Ausnahme als K_{ATP}-Kanal-Agonisten (Kap. 3.2.2 und 3.6). Dabei kann zum einen der 3'-Alkylamino-Rest mit der sich daraus ergebenden Guanidinstruktur (vgl. Kap. 4.2.2.5) als auch die veränderte Grundstruktur des Thieno-Thiadiazins den entscheidenen Unterschied ausmachen kann.

4.2.2.7 Selektivität

Diazoxid unterscheidet sich u.a. von den klassischen K_{ATP} -Kanalöffnern (Benzopyrane, Cyanoguanidine etc.) dadurch, dass es unselektiv sowohl am SUR1- als auch am SUR2x-Typ wirkt. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Modifikation des Diazoxid-Moleküls zu Gunsten einer höheren Selektivität für den SUR2B- K_{ATP} -Kanal-Typ. Da für den SUR1- K_{ATP} -Kanaltyp noch kein Agonist-Radioligand existiert, welcher die Bestimmung von K_D -Werten für SUR1-Agonisten erlaubt, wurde die Selektivität durch eine funktionelle Methode, der Messung der K_{ATP} -Kanal induzierten Hyperpolarisation des Membranpotentials, erhoben.

In Abb. 4.2.8 wurden die gemessenen pEC₅₀-Werte an beiden untersuchten Rezeptorsystemen für die Diazoxid-Derivate gegeneinander aufgetragen (Tab. 3-3, 3-4; S. 57f). Derivate mit gleicher pEC₅₀ an beiden Rezeptorsystemen, und damit ohne Selektivität, würden auf der Winkelhalbierenden (schwarz gestrichelt) liegen; je größer der orthogonale Abstand eines pEC₅₀-Punktwertes von der Winkelhalbierenden, desto höher die Selektivität. Diazoxid (rot) stellt sich wie erwartet als relativ unselektiv dar.

Im Vergleich zu Diazoxid zeigen dessen Derivate der ersten zur Orientierung dienenden Synthesephase ohne 7'-Chloratom (orange) an beiden Rezeptorsystemen eine generell geringere Wirkstärke. Dabei ist die Selektivität zugunsten der HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen jedoch nur für DAD7 geringer als für Diazoxid selbst; sämtliche anderen Diazoxid-Derivate zeigten eine höhere



Abb. 4.2.8: Selektivitätsplot der Diazoxid-Derivate

Aufgetragen wurde die relative Wirkstärke (pEC₅₀) der Messungen des Membranpotentials an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen gegen die an CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen; Messwerte können Tab. 3-4 und 3-5 entnommen werden. Die schwarze gestrichelte Linie beschreibt eine Linie von Punkten ohne Selektivität für ein Rezeptorsystem. Als roter Punkt ist die Ausgangssubstanz Diazoxid eingetragen. Werte die links der rot gestrichelten Linie liegen besitzen eine höhere Selektivität für den SUR2B-Kir6.1-K_{ATP}-Kanaltyp als Diazoxid selbst. In orange sind Substanzen der ersten Synthesephase ohne Chlor in Position 7' dargestellt. Substanzen der zweiten Synthesephase mit einem Chlor in Position 7' werden in gelb und mit ihrem 3'-Substituenten dargestellt. (pEC₅₀-Werte < 4.0 (-log M) stellen (zur Abschätzung der Selektivität) extrapolierte Werte dar)

Selektivität. Für die 3'-Cycloalkyl-Derivate DAD8, DAD9, DAD10 sowie DAD11, wurden dabei die größten Selektivitätswerte ermittelt. Als einziges unchloriertes Diazoxid-Derivat erreicht das Adamantyl-Derivat DAD11 an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen das Wirkniveau von Diazoxid selbst.

In der zweiten Synthesephase (gelb) von Diazoxid-Derivaten mit 7'-Chloratom wurden unterschiedliche, v.a. cyclische Substituenten in Position 3' synthetisiert (gelb). Für diese 3'-Cycloalkyl-Derivate ist in Abb. 4.2.8 erkennbar, dass die relative Wirkstärke an CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen mit zunehmender Größe des 3'-Substituenten um bis zu Faktor 100 abnimmt. Dagegen bleibt die relative Wirkstärke an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen relativ stabil zwischen ca. 5.0 und 6.0 (- log M). Dadurch wird die Selektivität zugunsten von SUR2B/Kir6.1 maßgeblich durch den Wirkverlust an SUR1/Kir6.2 bestimmt; je größer bzw. lipophiler der Substituent in Position 3', desto größer die Selektivität. Die aromatischen Substanzen AF45 und AF42 – beide ohne Brückenatom – fallen durch ihre ähnlich geringe Wirkstärke an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen und somit auch relativ geringe Selektivität auf. Im Vergleich dazu ist die Affinität des Methyl-Phenyl-Derivats (AF41) ca. 2.5-fach höher ebenso wie die relative Wirkstärke (s. dazu auch Anhang A), ohne jedoch Affinität und Wirkstärke der 3'-Cycloalkyl-Derivaten mit bis zu sechs C-Atomen zu erreichen (vgl. Kap. 4.2.2.3). Die höchste Selektivität wurde für das Adamantyl-Derivat DAD13 mit 11 Kohlenstoffatomen und damit dem größten substituerten Rest in Position 3' ermittelt. Gleichzeitig ist die zweithöchste ermittelte Selektivität am 3'-Isobutenyl-Diazoxid-Derivat AF57 mit einem relativ kleinen Substituenten unerwartet; dabei vertritt AF57 jedoch mit einem verzweigtkettigem Substituenten ten eine andere Gruppe von Substituenten (Kap. 4.2.2.4).

4.2.3 Nachweis negativer Allosterie zwischen der Diazoxid- und der klassischen KCO-Bindungstelle

4.2.3.1 Das Cyanoguanidin P1075 und die Benzopyrane Bimakalim und KC399 binden kompetitiv an der gleichen Bindungsstelle wie [³H]-P 1075

In Kap. 3.8 wurden die Ergebnisse der Dissoziationskinetiken von [³H]-P 1075 in Gegenwart des Sulfonylharnstoffs Glibenclamid, des Cyanoguandins P1075, der Benzopyrane KC399 und Bimakalim sowie des Benzothiadiazins Diazoxid und seinen Derivaten an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen gezeigt. Einen ähnlichen Versuchsaufbau setzten auch Bray und Quast (1992), Dickinson et al. (1997), Löffler-Walz und Quast (1998) und Hambrock et al. (1998) ein, um eine Beschleunigung der Dissoziation von [³H]-P 1075 durch Glibenclamid zu demonstrieren.

Bei alleiniger Gabe von [³H]-P 1075 stellt sich nach dem Massenwirkungsgesetz ein Gleichgewicht zwischen freiem und an Rezeptor gebundenem [³H]-P 1075 ein (vgl. Abb. 4.2.9a). Nachdem sich das Gleichgewicht eingestellt hat, wird dem System ein weiterer Ligand A (z. B. unmarkiertes P1075) in einer Konzentration, die einem Vielfachem seines K_D-Wertes entspricht, hinzugefügt. In diesem *kompetitiven* Modell, in dem zwei Liganden um die gleiche Bindungsstelle konkurrieren, stellt die Dissoziation des Radioliganden den eigentlichen geschwindigkeitslimitierenden Prozess dar. Denn trotz seiner hohen Konzentration kann Ligand A erst an an die Rezeptorbindungsstelle binden, wenn der Radioligand [³H]-P 1075 von der Bindungsstelle dissoziiert ist; die Dissoziationsrate des Radioliganden wird trotz des Konzentrationsüberschusses von Ligand A nicht beschleunigt. Da der kompetitive Ligand A aufgrund seiner hohen eingesetzten Konzentration eine höhere Wahrscheinlichkeit besitzt eine frei gewordene Rezeptorbindungsstelle zu besetzen, verlagert sich die Rezeptorbesetzung durch [³H]-P 1075 zunehmend hin zu einer Besetzung durch den unmarkierten Liganden.

In den durchgeführten Versuchen wurden zur Kontrolle einer kompetitiven Bindung jeweils 10 μ M unmarkiertes P1075 eingesetzt. Da für P1075 ein pK_D-Wert von ca. 5 nM (s. Tab. 3-2) bestimmt wurde, entsprechen 10 μ M mehr als dem Tausendfachen des K_D-Wertes. Gleichzeitig kann von P1075 sicher ausgegangen werden, dass es mit seiner radioaktiv markierten Variante [³H]-P1075 um die gleiche Bindungsstelle konkurriert. In Gegenwart von 10 μ M des kompetitiven Liganden P1075 bestimmten Bray und Quast (1992) eine Halbwertszeit der [³H]-P1075-Dissoziation von 18.9 min an Muskelstreifen einer Rattenaorta (SUR2B), Dickinson et al. (1997) 16 min an Zellmembranen des Skelettmuskels eines Hasen (SUR2A), Löffler-Walz und Quast (1998) 5.3 min an Zellmembranen von Rattenherzen und Hambrock et al. (1998) 11.55 min an Zellmembranen von SUR2B exprimierenden Zellen. Die eigenen Ergebnisse an intakten HEK 293-




Abb. 4.2.9:

a) Dissoziation des Radioliganden (L*) von der Rezeptorbindungsstelle (R) in Gegenwart hoher Konzentrationen kompetitiver Liganden (A). Erst nach erfolgter Dissoziation des Radioliganden (L*) kann ein um die gleiche Rezeptorbindungsstelle konkurrierender (kompetitiver) Ligand (A) binden. Eine hohe Konzentration des kompetitiven Liganden ([A] >> K_A) bedeutet, dass der Ligand A eine deutlich höhere Wahrscheinlichkeit als der Radioligand (L*) besitzt an einer freien Rezeptorbindungsstelle zu binden; er "inhibiert" die Bindung des Radioliganden an freie Rezeptorbindungsstellen, beschleunigt die eigentliche Dissoziation des Radioliganden (L*) jedoch nicht.

b) Auslösung der Dissoziation des Radioliganden (L*) von der Rezeptorbindungsstelle (R) in Gegenwart allosterischer Liganden (G). Letztere können am Rezeptor an einer anderen Bindungsstelle binden, so dass beide Liganden gleichzeitig am Rezeptor gebunden vorliegen (2;3). Die Bindung des allosterischen Liganden (G) begünstigt jedoch eine Konformation, welche eine niedrigere Affinität der Rezeptorbindungsstelle des Radioliganden bedeutet (3); hierdurch kommt es zu einer schnellen Dissoziation des Radioliganden vom Rezeptor (4). (SUR2B/Kir6.1)-Zellen liegen mit n=60 Versuchen an intakten HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen relativ konstant bei 13.83 ± 1.49 min (Tab. 3-12).

Die für die Benzopyrane KC399 und Bimakalim gemessenen Halbwertszeiten für die [³H]-P 1075-Dissoziation entsprechen denen des Pinacidil-Derivats P1075. Dies spricht für eine Kompetition von Benzopyranen und Cyanoguanidinen um die gleiche Bindungsstelle und ist in Einklang mit der Annahme, dass es eine Bindungsstelle für alle KCO gibt (Uhde et al., 1999).

4.2.3.2 Glibenclamid bindet an eine andere Bindungsstelle als [³H]-P 1075 und wirkt negativ allosterisch auf dessen Bindungsstelle

Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen KCO beschleunigt Glibenclamid die [³H]-P 1075-Dissoziation deutlich (vgl. Abb. 3.8.2), sodass ein nicht-kompetitiver Prozess angenommen werden muss. Dabei beschleunigt Glibenclamid selbst in kleinen Konzentrationen von 1 μ M die [³H]-P 1075-Dissoziation (von einer Halbwertszeit t_{1/2} von 14 min auf 7.5 min), während hohe Konzentrationen der potenten Benzopyrane KC399 und Bimakalim die Dissoziation nicht beschleunigten. Die Zunahme der Beschleunigung der Dissoziation von [³H]-P 1075 mit steigender Konzentration des Glibenclamids wird in Kap. 4.2.3.5 ausführlich diskutiert.

Für Glibenclamid wurde bereits mehrfach eine beschleunigte Dissoziation von [³H]-P 1075 gemessen und im Sinne zweier unterschiedlicher Bindungsstellen für KCO und Sulfonylharnstoffe (Glibenclamid) gedeutet (Bray and Quast, 1992; Dickinson et al., 1997; Hambrock et al., 1998).

Der zugrundeliegende Prozess lässt sich anhand des in Abb. 4.2.9b gezeigten Modells der *allosterischen* Bindung beschreiben: Nachdem sich ein Gleichgewicht zwischen freiem und an der Rezeptorbindungsstelle gebundenem [³H]-P 1075 eingestellt hat wird zum Start der Dissoziationsbindung ein allosterischer Ligand G (Glibenclamid) diesem System hinzugefügt und bindet an einer anderen Bindungsstelle, als der für [³H]-P 1075. Glibenclamid kann sofort an diese andere Bindungsstelle binden, ohne dass [³H]-P 1075 zuvor von seiner Bindungsstelle hätte dissoziieren müssen. Der *ternary complex* bestehend aus den beiden Liganden und dem Rezeptor isomerisiert statistisch überwiegend in eine Konformation, welche die Bindungseigenschaften der [³H]-P 1075-Bindungsstelle negativ im Sinne einer verringerten Affinität für [³H]-P 1075 verändert, sodass [³H]-P 1075 schneller vom Rezeptor dissoziiert: der *ternary complex* zerfällt. Diese negative Beeinflussung einer Bindungsstelle durch eine ferne Bindungsstelle wird auch als negative Allosterie bezeichnet.

4.2.3.3 Diazoxid-Derivate binden an eine andere Bindungsstelle als [³H]-P 1075 und wirken negativ allosterisch auf dessen Bindungsstelle

Das überraschende Ergebnis einer Beschleunigung der [³H]-P 1075-Dissoziation durch Diazoxid und seine Derivate wird in dieser Arbeit erstmals gezeigt. Dabei erreichen alle untersuchten Derivate in der jeweils höchsten Konzentration (substanzabhängig entsprechend dem 89 bis 339-fachem des K_D-Wertes) Halbwertszeiten unter 4 min im Vergleich zu durchschnittlich 13.7 min der kompetitiven P1075-Kontrolle. Diese Beschleunigung belegt die Existenz einer separaten Bindungsstelle für Diazoxid und seiner Derivate, sowie der negativ allosterischen Wirkung dieser Bindungsstelle auf die Bindungsstelle von P1075.

Während die kleinsten Konzentrationen von 2 μ M nur eine mäßige Beschleunigung bewirken, zeigt sich bei der zehnfachen Konzentration von 20 μ M eine deutliche Beschleunigung auf Halbwertszeiten zwischen ca. 4.0 und 8.4 Minuten. Für Diazoxid selbst konnten in den vorliegenden Versuchen ebenfalls Hinweise auf eine mäßige Beschleunigung der [³H]-P 1075-Dissoziation gefunden werden. Die Ergebnisse von Diazoxid fallen jedoch aufgrund seiner niedrigen Affinität weit weniger eindeutig aus als die seiner Derivate. So erreicht Diazoxid in einer Konzentration von 500 μ M zwar eine Beschleunigung der Dissoziation auf ca. 7.6 Minuten, jedoch können in dieser sehr hohen Konzentration toxische Effekte nicht ausgeschlossen werden. Erst durch die Entwicklung von Diazoxid-Derivaten mit erhöhter Affinität für SUR2B ist dieser Nachweis eindeutig gelungen und stellt eine Kernaussage der vorliegenden Arbeit dar.

Auf Grundlage dieser Ergebnisse lassen sich zu Diazoxid und seinen Derivaten zwei Aussagen treffen: zum einen binden sie an eine andere Bindungsstelle als [³H]-P 1075; zum anderen beschleunigen sie die Dissoziation von [³H]-P 1075 vom Rezeptor nicht kompetitiv im Sinne einer negativ allosterischen Wirkung.

4.2.3.4 Die Diffusion der KCO durch die Zellmembran intakter Zellen ist kein geschwindigkeitslimitierender Faktor

Für KCO des Benzopyran-Typs zeigten Stephan et al. (2006), dass deren Bindungsstelle am SUR2B nur von der cytoplasmatischen Seite der Zellmembran zugänglich ist und Versuchssubstanzen zunächst durch die Membran diffundieren müssen (Stephan et al., 2006). Da dies für Diazoxid-Derivate ebenso angenommen wird, könnten die Versuchsergebnisse auch so gedeutet werden, dass P1075 als Kontrolle deutlich langsamer in die Zelle gelangt als Diazoxid-Derivate. Dies konnte durch eine grobe Abschätzung der Diffusionsgeschwindigkeit mittels Bestimmung der Halbwertszeit von DyeB-Fluoreszenzkinetiken in Kap. 3.8.2 widerlegt werden. So wurde für P 1075 in der eingesetzten Konzentration von 10 μM eine durchschnittliche Halbwertszeit von 11.2 Sekunden bis Diskussion

zum Erreichen des Wirkmaximums gemessen. Auch die Diazoxid-Derivate erreichen in den höchsten eingesetzten Konzentrationen ähnliche Werte zwischen 9.0 und 27.2 Sekunden (vgl. Tab. 3-14). Dies bedeutet, dass sowohl P 1075 als auch die Diazoxid-Derivate innerhalb von Sekunden am Rezeptor binden, so dass dieser Vorgang im Vergleich zu der mehrere Minuten dauernden Dissoziation des [³H]-P 1075 eine untergeordnete Rolle spielt und mit der Interpretation der Daten im Sinne einer Beschleunigung der [³H]-P 1075 durch Diazoxid-Derivate im Einklang ist.

4.2.3.5 Allosterische Potenz

Die untersuchten allosterischen Testsubstanzen bewirken, je nach eingesetzter Konzentration, eine deutliche Beschleunigung der [³H]-P 1075-Dissoziation. Diese Beschleunigung der Dissoziation ist auch mit dem potentesten Diazoxid-Derivat (AF53, Abb. 3.8.5, S. 136) geringer als die Beschleunigung durch Glibenclamid (Abb. 3.8.2, S. 133). Auch gibt es zwischen den verschiedenen Diazoxid-Derivaten deutliche Unterschiede (Tab. 3-13 und 3-12).

Um diesen Unterschied der *allosterischen Potenz* quantifizieren zu können, wurden die k_{off} -Werte von [³H]-P 1075 in Abhängigkeit der Ligand-Konzentration dargestellt (Kap. 3.8.3, Abb. 3.8.12, S. 150). Aus der Annahme eines *Ternary-Modells* (Abb. 2.4.1, S. 32) – in dem 2 Liganden gleichzeitig an einem Rezeptor binden können (sog. *ternary complex*) – wurde für die Abhängigkeit der k_{off} -Werte von der Ligand-Konzentration ein funktioneller Zusammenhang in Form von Gl. 15 abgeleitet (Kap. 2.4.4, S. 31ff; Kap. 3.8.3, S. 148ff). Danach setzt sich die gemessene (effektive) Dissoziationsgeschwindigkeit von [³H]-P 1075 (k_{off}) aus zwei Prozessen zusammen:

- der ungezwungenen [³H]-P 1075-Dissoziation (k_{off.L*}) allein durch Absenkung der freien [³H]-P 1075-Konzentration nach dem Massenwirkungsgesetz (äquivalent zu der experimentell leichter durchführbaren Dissoziation durch Überschwemmung mit dem nicht-markierten Liganden P1075) und
- (2) der durch einen negativ allosterisch wirkenden Liganden G induzierten Dissoziation von
 [³H]-P 1075 (k_{off,L*|G}) aus einem *ternary complex*.

Da der erste Dissoziationsprozess ($k_{off,L*}$) nicht konzentrationsabhängig und damit konstant ist, stellt er den kleinst möglichen k_{off} -Wert dar. Für steigende Konzentrationen des negativ allosterisch wirkenden Liganden strebt die Dissoziationsgeschwindigkeit von [³H]-P 1075 in Form einer Hyperbel (im Plot nach Gl. 15; Abb. 3.8.12) dem Limes $k_{off,L*|G}$ (max. Dissoziationsgeschwindigkeit des allosterisch induzierten Prozesses) zu. Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_G' beschreibt die Bindung des allosterischen Liganden G an einen bereits von [³H]-P 1075 besetzten Rezeptor [R-L*] und stellt die Ligandkonzentration bei halbmaximaler, allosterisch-induzierter Dissoziation ($\frac{1}{2}$ $k_{off,L*|G}$) dar (Abb. 2.4.2, S. 34). Aus dem Plot der k_{off} -Werte in Abb. 3.8.12 ist ersichtlich, dass kein allosterischer Ligand, weder die Diazoxid-Derivate noch Glibenclamid, ein eindeutig hyperboles Verhalten zeigt und nur der annähernd lineare Beginn einer Hyperbel nach Gl. 15 experimentell erfasst wurde. Die Dissoziationskonstate K_G' muss somit auf ein Vielfaches der untersuchten maximalen Konzentration von 200 μ M für Diazoxid-Derivate bzw. 100 μ M für Glibenclamid geschätzt werden; auch für $k_{off,L*|G}$ muss aus dem gleichen Grund ein Vielfaches der experimentell ermittelten maximalen k_{off} -Werte angenommen werden. Eine Untersuchung in einem so hohen Konzentrationsbereich (> 200 μ M) war experimentell aufgrund von unspezifischen Effekten nicht möglich. Die fehlende Sättigung der hyperbolen Funktionen hat zur Folge, dass eine nicht-lineare Regressionsanalyse anhand von Gl. 15 keine unabhängigige Schätzung der Parameter $k_{off,L*|G}$ und p K_G' erlaubt.

Um dieser Schwierigkeit zu entgehen und da alle untersuchten Konzentrationen deutlich kleiner als K_G ' sind, wurde für die Randbedingung $[G] \ll K_G$ ' aus Gl. 15 eine Approximation an ein lineares Modell mit der Steigung { $k_{off,L*|G} - k_{off,A}$ } / K_G ' abgeleitet (Gl. 16, S. 35); dies entspricht der Anfangssteilheit der Hyperbel in der Einheit min⁻¹ M⁻¹ und wird in der vorliegenden Arbeit auch als *approximative allosterische Potenz* bezeichnet. Sie ermöglicht den Vergleich der konzentrationsabhängigen Zunahme der Dissoziationsgeschwindigkeit von [³H]-P 1075 zwischen verschiedenen Substanzen anhand eines einzigen Parameters in einem für die experimentellen Untersuchungen relevanten Konzentrationsbereichs. Je höher dieser Wert, desto mehr vermag die untersuchte Substanz durch einen bestimmten Konzentrationszuwachs die Dissoziation von [³H]-P 1075 zu beschleunigen; eine approximative allosterische Potenz von 0 min⁻¹ M⁻¹ entspricht einem kompetitiven Liganden.

Auf den eingangs erwähnten Vergleich zwischen Glibenclamid und AF53 übertragen lässt sich nun die Aussage treffen, dass die approximative allosterische Potenz von Glibenclamid mit ca. 19350 min⁻¹ M⁻¹ ein Vielfaches der approximativen allosterischen Potenz von AF53 mit ca. 3000 min⁻¹ M⁻¹ (höchster Wert unter den Diazoxid-Derivaten) beträgt. Dies bedeutet, dass mit kleinen Konzentrationsunterschieden die allosterische Wirkung des Glibenclamids auf die P1075-Bindungsstelle deutlich mehr ändert als für AF53 sowie alle anderen Diazoxid-Derivate (Tab. 3-16).

Kleinere Unterschiede existieren innerhalb der Gruppe der Diazoxid-Derivate: hier steigt die approximative allosterische Potenz in der Reihenfolge der Derivate AF56, AF39, AF57, AF49, AF38, AF55, AF51, AF53 von 500 auf 3000 min⁻¹ M⁻¹. Bemerkenswert ist, dass die ermittelte approximative allosterische Potenz weder vom K_D-Wert der Substanz, noch von der Anzahl der C-Atome, der Lipophilie oder Brücken-C-Atome des 3'-Substituenten abhängig zu sein scheint. So wurde sowohl für AF53 als auch für AF56 (3'-Cyclopropyl-Rest) ein pK_D-Wert von ca. 5.65 (-log M) an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen ermittelt, während sich die allosterische Potenz von ca. 3000 min⁻¹ M⁻¹ für AF53 von der des AF56 mit ca. 500 min⁻¹ um den Faktor 6 deutlich unterscheidet. Eine mögliche Erklärung wären veränderte Bindungseigenschaften der Diazoxid-Bindungsstelle, sobald die P1075-Bindungsstelle besetzt ist; dies würde auch sehr hohe pK_G' -Werte mit mehr als Faktor tausend Unterschied zum pK_D des Diazoxid-Derivates erklären.

Die approximative allosterische Wirkstärke der Muttersubstanz Diazoxid wurde mit 120 min⁻¹ M⁻¹ um ca. Faktor 30 geringer geschätzt als für sein potentestes Derivat AF53. Dies erklärt zum einen, warum ein eindeutiger Nachweis einer allosterischen Wirkung von Diazoxid auf die P1075-Bindungsstelle schwierig ist und bislang in der Forschungsgeschichte der K_{ATP}-Kanäle nicht gelungen ist. Zum anderen zeigt der Vergleich, dass im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht nur die Entwicklungsziele höhere Affinität und höhere Selektivität verfolgt wurden, sondern eben auch eine Steigerung der allosterischen Potenz zum Nachweis einer unabhängigen Bindungsstelle für Diazoxid.

4.2.3.6 Negativ allosterische Wirkung der Bindungsstelle von [³H]-P 1075 auf die Bindungsstelle der Diazoxid-Derivate

In der vorliegenden Arbeit wurde der Nachweis erbracht, dass Diazoxid-Derivate sowohl an einer anderen Bindungsstelle als [³H]-P 1075 binden, als auch dass diese Diazoxid-Bindungsstelle negativ allosterisch auf die [³H]-P 1075-Bindungsstelle wirkt. Dies wirft die Frage auf, ob umgekehrt auch eine allosterische Wirkung seitens der Bindungsstelle von [³H]-P 1075 auf die Diazoxid-Bindungsstelle existiert.

Generell würde eine allosterische Wirkung die Bindungseigenschaften der Diazoxid-Bindungsstelle beeinflussen und so z. B. die Dissoziationsratenkonstante k_{off} des Diazoxids beschleunigen. Da kein Radioligand für die Diazoxid-Bindungsstelle zur Verfügung steht ist ein direkter Nachweis, wie er für die allosterische Wirkung auf die P1075-Bindungsstelle mit einem entsprechenden Radioliganden ([³H]-P 1075) im Rahmen dieser Arbeit mittels Dissoziationskinetiken durchgeführt wurde, nicht möglich. Die veränderten Bindungseigenschaften würden jedoch auch die Dissoziationsgleichgewichtskonstante des Diazoxids in Gegenwart von P1075 verändern, welche in der Nomenklatur des *ternary-Modells* in Abb. 2.4.1 (S. 32) dem Parameter K_G' entspricht. Dieser wurde für den Aspekt der allosterischen Potenz der Diazoxid-Derivate bereits näher untersucht, konnte jedoch aufgrund des untersuchten Konzentrationsbereiches (<< K_G') und der daraus resultierenden starken Abhängigkeit der Parameter pK_G' und $k_{off:L*|G}$ in der nicht-linearen Regressionsanalyse nur auf ein Vielfaches von 200 µM geschätzt werden (Kap. 4.2.3.5).

Auch wenn eine exakte Bestimmung von K_G' nicht möglich erscheint, so kann die Information, dass der K_G' -Wert deutlich größer als 200 μ M ($\approx 100x K_D$) für die Diazoxid-Derivate ist – unter der Voraussetzung der Gültigkeit des *ternary-Modells* – als indirekter Hinweis auf eine negativ allosterische Wirkung des P1075 auf die Diazoxid-Bindungsstelle gedeutet werden; eine negativ allosterische Wechselwirkung zwischen beiden Bindungsstellen ist somit wahrscheinlich. Dass die P1075-Bindungsstelle einen negativ allosterischen Einfluss auf die Glibenclamid-Bindungsstelle besitzt zeigten bereits Schwanstecher et al. (1992) in Kompetitionsbindungs-Experimenten mit dem Radioliganden [³H]-Glibenclamid an HIT-Zellen (SUR1): sie wiesen eine "Reduktion" von Glibendclamid-Bindungsstellen in Gegenwart von hohen Pinacidil-Konzentrationen nach. Zusammenfassend kann sowohl für Glibenclamid als auch für die neu synthetisierten Diazoxid-Derivate eine negativ allosterische Wechselwirkung mit der Bindungsstelle für klassische KCO (z.B. P1075) angenommen werden.

4.2.3.7 Neubewertung der Ergebnisse der [³H]-P 1075-Kompetitionsbindung von Diazoxid-Derivaten unter Kenntnis einer dritten Bindungsstelle für Diazoxid-Derivate

Kompetitionsbindungsstudien beruhen auf der Annahme, dass ein Radioligand L* und ein kompetitiver Ligand A um die gleiche Bindungsstelle konkurrieren (Kap. 2.3.1). Da Diazoxid-Derivate und [³H]-P 1075 unterschiedliche Bindungsstellen besetzen, ist diese Methodik zur Bestimmung der Affinität der Diazoxid-Derivate – auf den ersten Blick – nicht aussagekräftig. Dennoch entspricht die Größenordnung der durch Radioligandbindung ermittelten pK_D-Werte den durch Membranpotentialmessung (mittels Fluoreszenz) ermittelten pEC₅₀-Werten (Tab. 3-4 und 3-5).

In einer kompetitiven Situation würde der Unterschied zwischen IC₅₀- und K_D-Wert maximal den Cheng-Prusoff-Faktor $(1 + [L^*]/K_{L^*})$ (Cheng und Prusoff, 1973) in Gl. 5 betragen. Dieser beträgt für die eingesetzte Endkonzentration von 8.7 (-log M) des Radioliganden [³H]-P 1075 und dem für P1075 bestimmten pK_D-Wert von ca. 8.3 (-log M; Tab. 3-2) einen sehr kleinen Unterschied zwischen pIC₅₀ und pK_D von ca. 0.15 (-log M).

In Gegenwart der negativ allosterisch wirkenden Diazoxid-Derivate ändern sich die Eigenschaften der Bindungsstelle des Radioliganden [³H]-P 1075; ein Prozess welcher im Rahmen der vorliegenden Arbeit als Zunahme der k_{off} -Werte des [³H]-P 1075 erfasst wurde. Die konzentrationsabhängige Zunahme der k_{off} -Werte geht mit einer Zunahme der Dissoziationsgleichgewichtskonstanten K_{L*} ($K_{L*} = k_{off} / k_{on}$; Gl. 1) einher, woraus eine Abnahme des Cheng-Prusoff-Faktors folgt. Der geringe Cheng-Prusof-Faktor von 0.15 (-log M) stellt damit zugleich ein oberes Limit der mit steigender Konzentration der Diazoxid-Derivate steigenden Fehlkorrektur durch den Cheng-Prusoff-Faktor dar. An dieser Stelle sei zudem darauf hingewiesen, dass selbst potente Diazoxid-Derivate in der Konzentrationen der ermittelten K_D -Werte die [³H]-P 1075-Dissoziation nur sehr gering bis nicht nachweisbar beschleunigen (Abb. 3.8.12, S. 150).

4.2.3.8 Einordnung der Diazoxid-Bindungsstelle in ein funktionelles Modell mit drei Bindungsstellen für synthetische Liganden an einer SUR-Einheit

Die vorliegende Arbeit zeigt deutlich, dass Diazoxid und seine Derivate an einer anderen Bindungsstelle als andere K_{ATP}-Kanalöffner (KCO) binden. Geht man von einer eigenen Bindungsstelle für Diazoxid aus, lässt sich diese auch von der Bindungsstelle für Sulfonylharnstoffe abgrenzen: In Saturationsbindungs-Experimenten mit dem Radioliganden [³H]-Glibenclamid an HIT-Zellen (SUR1) beschrieben Niki und Ashcroft (1991) eine nicht-kompetitive Wirkung von Diazoxid auf die Bindung des Radioliganden [³H]-Glibenclamid im Sinne einer Reduktion der Bindungsstellen für [³H]-Glibenclamid in Gegenwart des niederaffinen Diazoxid; bei Annahme einer separaten Bindungsstelle für Diazoxid und seiner Derivate ist auch hier ein allosterischer Wirkmechanismus zu vermuten.



e negative / (+) positive / (?) unbekannte allosterische Beeinflussung (bislang nicht nachgewiesen)

Abb. 4.2.10: Drei-Bindungsstellenmodell des SURx ausgehend von separaten Bindungsstellen für Glibenclamid (Sulfonylharnstoff; magenta), [³H]-P 1075 (vaskuläre K_{ATP} -Kanalöffner; Benzopyrane, Cyanoguanidine; gelb) sowie Diazoxid und seine Derivate (blau).

A) Darstellung von nachgewiesenen negativ allosterischen Interaktionen zwischen den drei Bindungsstellen. Quellen (mit Angabe des untersuchten SURx/Kir6.y-Kanals in Klammern): a) Niki und Ashcroft (1991) an HIT T15-Zellen (SUR1/Kir6.2); b) Schwanstecher et al. (1992); c) Bray and Quast (1992) an Rattenaortenzellen (SUR2B/Kir6.1), Dickinson et al. (1997) an der Skelettmuskulatur von Hasen (SUR2A/Kir6.2), Hambrock et al. (1998) an HEK 293-(SUR2B)-Zellen, vorliegende Arbeit (Kap. 4.2.3.2) an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen; d) vorliegende Arbeit (Kap. 4.2.3.3); e) Hinweise in der vorliegenden Arbeit (Kap. 4.2.3.6).

B) Darstellung des positiven und negativen allosterischen Einflusses von MgATP oder MgADP auf die verschiedenen Bindungsstellen am SUR. Quellen (SURx/Kir6.y Zusammensetzung jeweils in Klammern): f) Niki und Ashcroft (1991) an HIT T15-Zellen (SUR1/Kir6.2), D'hahan et al. (1999b) an *Xenopus* oocyte (SUR2A/Kir6.2 und SUR1/Kir6.2); g) Schwanstecher et al. (1992) an HIT T15-Zellen (SUR1/Kir6.2), Dickinson et al. (1997), Russ et al. (2003) an HEK 293-(SUR2B/Kir6.2)-Zellen; h) Schwanstecher et al. (1991) an HIT-Zellen (SUR1/Kir6.2); Löffler-Walz et al. (2002) an HEK 293-(SUR2B)-Zellen.

Unter Berücksichtigung der in Kap. 1.6.1 genannten Quellen müssen am SURx mindestens drei Bindungsstellen für synthetische Liganden funktionell unterschieden werden: eine für Sulfonylharnstoffe, eine für klassische KCO und eine für Diazoxid. Obwohl alle drei Bindungsstellen funktionell voneinander abgegrenzt werden können, fehlen zwei Aussagen über das allosterische Wechselspiel, denn der Einfluss der Glibenclamid-Bindungsstelle, sowie der Bindungstelle der klassischen KCO auf die Diazoxid-Bindungsstelle, ist bislang nicht bekannt. Ein Hinweis darauf, dass die Bindungstelle der klassischen KCO auch negativ allosterisch auf die Diazoxid-Bindungsstelle wirkt, kann indirekt durch die veränderten Bindungseigenschaften für Diazoxid-Derivate aus dem Ternary-Modell abgeleitet werden (vgl. Kap. 4.2.3.6). Da Diazoxid niederaffin ist und bis dato kein Radioligand für dessen Bindungsstelle existiert, ist eine Aussage über die Beeinflussung der Diazoxid-Bindung durch diese beiden Bindungsstellen schwierig. Zusammenfassend lässt sich die Aussage treffen, dass für die Wirkung der klassischen KCO (z.B. Pinacidil, Cromakalim), Diazoxid und der Sulfonylharnstoffe unterschiedliche Regionen am SUR von Bedeutung sind. Während die Diskussion um potentielle Bindungsstellen für klassische KCO und Sulfonylharnstoffe bereits einzelne Aminosäuren betrifft, lässt sich für Diazoxid nur eine vage Aussage treffen. So soll eine Region auf TMD1, wahrscheinlich Helices 8-11 (Babenko et al., 2000; Dabrowski et al., 2002), entscheidend für dessen Wirkung ist. Dabei kommen drei verschiedene Möglichkeiten für die Bedeutung dieser Region für die Diazoxid-Wirkung in Frage: Erstens könnte es sich um eine Diazoxid-Bindungsstelle handeln, zweitens könnte es eine für die Transduktion des Effekts der Diazoxid-Bindung wichtige Region darstellen und letztendlich wäre auch eine Modulation der Nukleotidbindungseigenschaften durch diese Region denkbar, welche somit indirekt Einfluss auf die Diazoxid-Wirkung nimmt. Die vorgestellten Arbeiten (Kap. 1.6) vermögen nicht zwischen diesen Möglichkeiten zu unterscheiden. Auch die Punktmutationen in TMD17 müssen vor dem Hintergrund betrachtet werden, dass sie zwar entscheidend für die Wirkung der klassischen KCO sind, jedoch nicht ausschließen, dass KCO auch in anderen Regionen zusätzlich binden könnten (z.B. in den Helices 13-14 wie von Uhde et al. (1999) beschrieben). Die vorliegende Arbeit stützt die Hypothese einer dritten Bindungsstelle für Diazoxid und seiner Derivate und zeigt gleichzeitig, dass diese die Bindungsstelle der klassischen KCO negativ allosterisch beeinflusst.

Klar abzugrenzen ist der Wirkmechanismus dieser Bindungsstellen für synthetische Liganden von den Bindungsstellen der physiologischen Nukleotide NBF1 und NBF2, zu deren Verständnis diese Arbeit nicht beitragen kann. Dennoch sei an dieser Stelle auf die Komplexität hingewiesen, die sich durch die Einbindung der K_{ATP}-Kanäle in den Stoffwechsel der Zelle ergibt. So weisen die Nukleotide MgATP und MgADP ebenfalls eine negativ allosterische Wechselwirkung mit der Bindungsstelle für Sulfonylharnstoffe (Schwanstecher et al., 1991; Löffler-Walz et al., 2002) auf und

Diskussion

verstärken sowohl die Wirkung von Diazoxid (Niki and Ashcroft, 1991) als auch der klassischen Kaliumkanalöffnern (Schwanstecher et al., 1992; Dickinson et al., 1997; Russ et al., 2003) positiv (vgl. Abb. 4.2.8 B); dabei wird auch ein von Nukleotiden unabhängiger Wirkmechanismus postuliert (Russ et al., 2003). Gleichzeitig wird angenommen, dass Diazoxid und MgADP über einen gemeinsamen Signalweg wirken (Masia and Nichols, 2008). Darüber hinaus wird auch zwischen NBF1 und NBF2 eine allosterische Wechselwirkung angenommen (Karger et al., 2008).

Vor diesem Hintergrund erscheint der SURx im Licht eines Netzwerkes aus Bindungsstellen, welche sich gegenseitig beeinflussen können.

4.3 Benzofuran-, Benzothiophen- und Benzothiazolderivate

Benzanelierte, heterozyklische, sechsgliedrige Ringe (Sechsringe) wie die Benzopyrane Cromakalim, Bimakalim, KC399 u.a. (Salamon et al., 2002; Uhrig et al., 2002) sind wohletablierte K_{ATP} -Kanal-Öffner mit hoher Affinität bis in den subnanomolaren Bereich (z.B. KC399, Abb. 4.3.1b; Tamura et al., 1994) sowie hoher Selektivität für den SUR2-K_{ATP}-Kanaltyp (im Vergleich zu SUR1-Kanälen der β-Zelle des Pankreas). Hierbei ist der Benzopyran-Ring kein Alleinstellungsmerkmal wie durch die Arbeiten von Cecchetti et al. (2003), die den 6-gliedrigen Pyran-Ring durch einen Thiazin-Ring (Abb. 4.3.1a) ersetzten, bewiesen werden konnte: geeignete substituierte Benzothiazin-Derivate können ebenfalls subnanomolare Affinitäten besitzen, wie im eigenen Labor nachgewiesen werden konnte (Carosati et al., 2005).



Abb. 4.3.1: a) Strukturformeln der Grundstruktur benzanylierter, heterozyklischer Sechsringe (etablierte K_{ATP} -Kanalöffner); b) der hochaffine K_{ATP} -Kanalöffner KC399 weist als Grundstruktur ein Benzopyran-Ring auf und umfasst einen Thioamid-Rest in Position 3'

Basierend auf diesen Arbeiten war es naheliegend, auch benzanelierte, heterozyklische Fünfringe zu synthetisieren und auf ihre Eignung als K_{ATP} -Kanal-Öffner zu untersuchen. Daher wurden in Analogie zu den oben beschriebenen Sechsringen heterozyklische Fünfringe designed (und durch das Chem. / Synthetische Partnerlabor von Herrn Prof. Braun synthetisiert), die ein Sauerstoffatom (Furan), ein Schwefelatom (Thiophen) oder ein Schwefelatom und ein Stickstoffatom (Thiazol) enthalten (Abb. 4.3.2; Messdaten in Tab. 3-7, 3-9 und 3-11).

Die Mehrzahl ihrer Derivate umfassen eine Thioamid-Gruppe als Rest, wie sie als Motiv bereits vom hochaffinen Benzopyran KC399 (Abb. 4.3.1b) oder Aprikalim bekannt ist.



Abb. 4.3.2: Strukturformeln der Grundstruktur benzanelierter, heterozyklischer Fünfringe (Gegenstand dieser Arbeit)

4.3.1 Vergleich von Benzofuran- und Benzothiophenderivaten mit 2'- oder 3'-Carbothioamid-Substitution

Um zu klären, welche chemisch zugängliche Position für eine Substitution mit einer Thioamid-Gruppe am Benzofuran- oder Benzothiophen-Molekül vorteilhaft ist, wurden Derivate mit einer Thioamidgruppe in Position 2'

(DSL141 bzw. DSL180) oder Position 3' (DSL177 bzw. DSL176) synthetisiert und hinsichtlich Affinität und relativer Wirkstärke an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen verglichen (Tab. 3-7,S. 107 bzw. Tab. 3-9, S. 115). An den beiden Benzothiophenen konnte eine Steigerung der Affinität um Faktor vier für die Thioamid-Substitution in Position 2' (DSL180) im Vergleich mit einer Substitution in Position 3' (DSL176) gezeigt werden. Für das Benzofuran-Derivat DSL141 mit einer Thioamid-Gruppe in Position 2' ergibt sich ein nur geringfügiger Vorteil hinsichtlich Affinität und relativer Wirkstärke an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen. Dieser kann dabei nicht allein auf die Position der Thioamid-Gruppe zurückgeführt werden, da die Substanz DSL177 in Position 2' zusätzlich eine Methylgruppe aufweist.

Insgesamt zeichnet sich die Tendenz ab, dass die Substitution einer Thioamidgruppe in Position 2' im Vergleich zu Position 3' bei der Synthese weiterer Benzofuran- bzw. Benzothiophen-Derivate zu bevorzugen ist. Das Benzopyran KC399 wurde dagegen in Position 3' mit einer Thioamid-Gruppe synthetisiert und zeigte mit einer pK_D -Wert von 9.45 (-log M) eine sehr hohe Affinität.

4.3.2 Einfluss des Substituenten am Stickstoffatom der 2'-Carbothiamid-Gruppe an Benzofuranen

In einer ersten Serie von Benzofuran-Derivaten wurde systematisch der Einfluss des aliphatischen Restes am Stickstoffatom der 2'-Carbothiamid-Gruppe getestet (Tab. 3-7, S. 112). Dabei zeigte sich mit zunehmender Größe des Substituenten vom Methyl- über Ethyl- hin zum n-Butyl-



oder Tertbutyl-Substituenten eine moderate Zunahme der Affinität, sowie der relativen Wirkstärke an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen. Ähnlich den bereits besprochenen Diazoxid-Derivaten erscheint auch hier die Idee zunehmender Affinität durch zunehmende Lipophilie des Substituenten in dieser Position naheliegend (vgl. Kap. 4.2.2.1). Andererseits führt eine Phenylgruppe (DSL238) in dieser Position zu einem deutlichen Affinitäts- und Wirkverlust.

4.3.3 Einfluss eletronegativer Gruppen in Position 5' des Benzofurans

Weiterhin wurden Benzofuran-Derivate mit einem zusätzlichem Brom-Atom oder einer Trifluoromethyl-Gruppe in Position 5' synthetisiert (Tab. 3-7, S. 107).

Dabei führten die bromierten Derivate DSL184 und DSL187 im Vergleich mit ihren unbromierten Analoga DSL141 und DSL186 nur zu einer moderaten Erhöhung der Affinität. Bei der Messung des Membranpotentials mit DiBAC₄(3) kam es offensichtlich zu einer Überschätzung der relativen Wirkstärke dieser niederaffinen Liganden, wie durch Nachuntersuchung mit dem moderneren Membranpotential-Marker DyeB (s. Anhang A, Kap. 2.3.2) gezeigt werden konnte, die jetzt die Ergebnisse der Radioligandbindungsstudie unterstützen. Das chemisch sehr aufwendig dreifach substituierte Benzofuran-Derivat DSL262 mit einer Trifluoromethyl-Gruppe in Position 5' zeigte enttäuschenderweise im Vergleich mit DSL141 (ohne diese Gruppe) keine Verbesserung von Affinität und relativer Wirkstärke. Dabei ist eine Verbesserung der relativen Wirkstärke durch elektronegative Gruppen in Position 5' bereits für Benzopyrane und Benzothiazine beschrieben.

4.3.4 Vergleich von Benzothiophen- mit Benzofuran-Derivaten

Aufgrund der gleichen Substitution eignen sich das Benzofuran-Derivat DSL141 und das Benzothiophen-Derivat DSL180 für eine direkte Gegenüberstellung beider

Heterozyklen (Tab. 3-7, S. 107 bzw. Tab. 3-9, S. 115). Dabei zeigt das Benzothiophen DSL180 eine um 0.82 Log-Einheiten höhere Affinität an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen als sein Benzofuran-Analogon DSL141. Auf diesem Ergebnis basiert die Hypothese, dass der durch das Schwefelatom "vergrößerte" Fünfring des Benzothiophens die Erfordernisse des Rezeptors besser erfüllt. Dies war eine Motivation zur Synthese von Benzothiazol-Derivaten. Im Vergleich zu Benzothiophen-Derivaten besitzen Benzothiazole mit einem zusätzlichen Stickstoffatom im Thiazolring eine zusätzliche Möglichkeit mit hydrophilen Bindungsstellen zu interagieren.





4.3.5 Vergleich von Benzofuran- und Benzothiazol-Derivaten

In einer ersten Synthesereihe wurden die Benzothiazol-Derivate DSL203, DSL202, DSL208 (Tab. 3-11, S. 124) mit gleicher 2'-Substitution wie die Benzofuran-

Derivate DSL141, DSL186, DSL238 (Tab. 3-7, S. 107) hinsichtlich ihrer Affinität an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen untersucht.

Keines der Benzothiazol-Derivate zeigte eine herausragende Zunahme der Affinität an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen im Vergleich zu den entsprechenden Benzofuran-Derivaten; vielmehr ähnelten sich die Affinitäten dieser Benzofuran- und Benzothiazol-

Derivate gleicher Substitution. Auch eine weitere Modifikation der Benzothiazol-Derivate DSL202 und DSL208 mit einem zusätzlichen elektronegativen 5'-Trimethylfluor-Rest, AF33 und AF35, konnten die Affinität nicht verbessern.

4.3.6 Benzothiazol-Derivate mit einem Brücken-C-Atom

DSL202

In einer zweiten Synthesereihe wurden Benzothiazole mit einem Brücken-C-Atom zwischen dem heterozyklischen Ring und der Thioamid-Gruppe in Position 2' synthetisiert. Die Grundidee des Brückenatoms ist, analog zum Brückenatom der Diazoxid-Derivate, eine höhere Flexibilität des Substituenten zu Gunsten einer höheren Affinität an SUR2B zu schaffen, sowie die hydrophile Gruppe im Molekül über die Distanz einer -CH₂-Gruppe zu vergrößern.



AF20

eine zusätzliche Methyl-Gruppe synthetisiert zeigte das daraus resultierende Derivat AF48 mit



AF33



Abb. 4.3.3: Pharmakophor des Benzothiazol-Derivats AF78. Gezeigt werden drei Eigenschaften von AF78, welches die höchste Affinität und Selektivität unter den untersuchten Benzothiazolen an SUR2B erzielte. (Quelle: Fischer et al., 2010)

einem pK_D-Wert von 4.83 (-log M) eine deutlich höhere Affinität. Mit einer zusätzlichen Ethylstatt Methylgruppe wurde für das Derivat AF75 eine nur geringfügig höhere Affinität mit einem pK_D-Wert von 5.03 (-log M) gemessen. Dagegen zeigt die Modifikation von AF48 durch Substitution lipophilen tert-butyl-Substituenten (AF78) eine weitere Steigerung der Affinität um eine halbe Log-Einheit. Damit erreicht das Benzothiazol AF78 die höchste Affinität aller untersuchten Benzofuran-, Benzothiophen- und Benzothiazol-Derivate. Gleichzeitig wurde für AF78 an CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen eine sehr geringe relative Wirkstärke im submillimolaren Bereich geschätzt, so dass für AF78 eine hohe Selektivität von mehr als zwei Log-Einheiten angenommen werden kann.

Ausgehend von den verschiedenen Substitutionen stellt Abb. 4.3.3 ein Modell dar, in dem die drei Eigenschaften von AF78 dargestellt sind, die mutmaßlich günstig für eine Bindung am SUR2B-Rezeptor erscheinen (Fischer et al., 2010). Hierzu zählt zum einen die Möglichkeit Wasserstoffbrücken durch die beiden Stickstoffatome des Moleküls auszubilden. Zum anderen besitzt AF78 durch seine Schwefelatome eine geladene Region mit hoher Elektronendichte. Als weiteres Merkmal fällt ein lipophiler, verzweigtkettiger Rest am Stickstoffatom der Thioamidgruppe auf; verzweigtkettige, lipophile Reste sind bereits von Seiten der Diazoxid-Derivate bekannt (Kap. 4.2.2.1).

4.3.7 Die Thioamidgruppe ist bedeutend für eine agonistische Wirkung am SUR2B-K_{ATP}-Kanal

Neben den neu synthetisierten Benzothiazolen findet sich eine Thioamid-Gruppe auch bei anderen KCO wie KC399 oder Aprikalim wieder. Um die Bedeutung der Thioamidgruppe für die agonistische Wirkung der Benzo-



thiazol-Derivate, insbesondere AF78, zu überprüfen wurde ein AF78-Analogon synthetisiert, in welchem die Thioamid-Gruppe durch eine Carboxyamid-Gruppe ersetzt wurde: AF130.

In der [³H]-P 1075-Kompetitionsbindung erzielte AF130 mit 4.30 ± 0.02 (-log M) einen um ca. Faktor 10 geringeren pK_D-Wert als AF78 (Abb. 3.8.5). Dies spiegelt sich auch in einem Abfall des pEC₅₀-Wertes um beinahe Faktor 30 von 5.45 (-log M) (AF78) auf 3.97 (-log M) (AF130) wieder. Abb. 3.5.5 demonstriert in einem direkten Vergleich der agonistischen Wirkung von 25 µM AF78 mit 25 µM AF130 den deutlichen Wirkverlust von AF130 mit einer Carboxyamid-Gruppe.

Dieses Ergebnis untermauert die Bedeutung der Thioamid-Gruppe für die Affinität und relative Wirkstärke für den (SUR2B/Kir6.1)-Kanal.

4.3.8 Eine Untersuchung der Racemate von Benzothiazolen ist nicht möglich

Die Benzothiazole AF20, AF48, AF75 und AF78 liegen als Enantiomer-Mischung vor und wurden als solche auch untersucht. Die Fragestellung nach Unterschieden in der Wirkung der einzelnen Enantiomere erweist sich als schwierig, da es unter physiologischen Bedingungen zu einer leichten Isomerisierung kommt (Fischer et al., 2010).

5 Zusammenfassung

ATP-sensitive Kaliumkanäle (K_{ATP}-Kanäle) koppeln die Erregbarkeit – insbesondere durch das cytosolische Nukleotid-Verhältnis [ATP]/[ADP] – an den metabolischen Zustand der Zelle. Als integrale Membranproteine mit tetradimerem Aufbau (SURx/Kir6.y)₄ bestehen sie aus jeweils vier porenbildenden, einwärtsgleichrichtenden K⁺Kanal-Untereinheiten (Kir6.y) sowie vier diese regulierende Sulfonylharnstoffrezeptor-Untereinheiten (SURx). Die Komposition aus verschiedenen Untereinheiten definiert eine gewisse Organselektivität: so exprimiert die β-Zelle des Pankreas v. a. den (SUR1/Kir6.2)-K_{ATP}-Kanaltyp, die Herzmuskelzelle den (SUR2A/Kir6.2)-Typ und die glatten Muskelzellen der Gefäße den (SUR2B/Kir6.1)-Typ. K_{ATP}-Kanäle spielen physiologisch u. a. eine entscheidene Rolle in der Regulation der Glukosehomöostase (Insulinsekretion der β-Zelle), des Muskeltonus der glatten Gefäßmuskulatur sowie bei zytoprotektiven Effekten (z. B. der ischämischen Präkonditionierung des Herzmuskels). Die SUR-Untereinheiten sind besonders interessant, weil sie eine pharmakologische Regulation der Kanalaktivität ermöglichen.

Eine Fülle verschiedener Wirkstoff-Klassen (z.B. Benzopyrane, Cyanoguanidine, Thioformamide, u. a.) interagiert mit den SUR2-Typ K_{ATP} -Kanälen; darunter auch die Thieno-Thiadiazine-Dioxide, die interessante Charakteristika – wie den Übergang vom Agonisten zum Antagonisten nur durch das Fehlen einer einzigen Methylgruppe mit submicromolarer Wirksamkeit – aufweisen. Wir stellten nun die Frage, ob auch Benzo-Thiadiazin-Dioxide (i.e. Derivate der niederaffinen Muttersubstanz Diazoxid) geeignete, SUR2-selektive K_{ATP} -Kanal-Öffner mit micromolarer Affinität darstellen, mit denen sich ein Agonist/Antagonist-Switch oder mit denen sich allosterische Wechselwirkungen mit anderen Substanzklassen am SUR2B-Rezeptor nachweisen lassen.

I) In Zusammenarbeit mit der lokalen Organischen Chemie (Prof. Dr. M. Braun) wurden optimierte Diazoxid-Derivate dargestellt, die in 3-Position mit aliphatischen und aromatischen Ringen unterschiedlicher Größe substituiert und in verschiedenen Testsystemen unseres Labors untersucht wurden. Neben der klassischen Radioligandbindung mit dem Cyanoguanidin [³H]-P1075 wurden neuere Verfahren eingesetzt, die die vollkinetische Messung der Membranpotentialveränderung durch die Diazoxid-Derivate mittels Fluoreszenz (Marker: DiBAC₄(3) u. DyeB) in eigenentwickelten 12-kanaligen Fluoreszenzdetektoren und damit u.a. die Unterscheidung von Agonisten und Antagonisten ermöglicht. Beide Testmethoden wurden an zellulären Testmodellen eingesetzt (HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)- u. CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen), die es u.a. ermöglichen, die Selektivität für SUR2B- und SUR1-K_{ATP}-Kanäle zu bestimmen. Mit den schrittweise optimierten Testsubstanzen konnte die Wirksamkeit und Affinität der Muttersubstanz Diazoxid bis zu 20-fach gesteigert werden, wobei die höchsten Werte (pK_D < 6.3, -log mol/l) mit 4-, 5- und 6-gliedrigen Ringen (mit und ohne Brücken-C-Atom (CH₂-Gruppe) erzielt wurden, welche auch hohe Selektivitäten (~100-fach) zugunsten der SUR2B-Kanäle aufwiesen.

Mit diesen affinitätsgesteigerten Diazoxid-Derivaten konnte die bisher ungeklärte Frage, ob chemisch-verschiedene Agonist-Klassen kompetitiv oder allosterisch am SUR2 interagieren – d.h. ob eine einheitliche oder unterschiedliche Bindungsstellen existieren – experimentell untersucht werden. Zur Klärung der Frage wurden Radioligandbindungsexperimente mit [³H]-P1075 in Dissoziationstechnik durchgeführt, wobei die Dissoziation des voräquilibrierten Radioliganden mit verschiedenen Liganden induziert werden kann: Induziert man die Dissoziation von [³H]-P1075 mit nicht-markiertem P1075 oder mit hochaffininen Benzopyran-Liganden (KC399, Bimakalim), so benötigt die Dissoziation von [³H]-P1075 $t_{1/2} \sim 13 \text{ min } (k_{off} \sim 0.05 \text{ min}^{-1})$, was einer kompetitiven Interaktion von Benzopyranen und Cyanoguanidinen an einer einheitlichen Bindungsstelle entspricht. Wird die Dissoziation dagegen mit hohen Konzentrationen der Diazoxid-Derivate (> 30 K_D) induziert, so beschleunigt sich die [³H]-P1075-Dissoziation dramatisch ($t_{1/2} \sim 3 \text{ min}$), was eine allosterische Interaktion bzw. die Existenz zweier verschiedener Bindungsstellen für Diazoxid-Derivate und [³H]-P1075 beweist. Für das quantitative Verständnis des Phänomens beschleunigter Dissoziationen wurde ein mathematisches Modell abgeleitet, welches auch die Bestimmung der *allosterischen Potenz* einer Substanz erlaubt.

II) Parallel zur Optimierung der Diazoxid-Struktur wurden Arbeiten mit der lokalen Organischen Chemie (Prof. Dr. M. Braun) durchgeführt, die zum Ziel hatten, den hocherfolgreichen benzanelierten, heterozyklischen 6-Ringen (z.B. Benzopyrane mit subnanomolaren Affinitäten) 5-Ringe (i.e. Benzofuran-, Benzothiophen-, und Benzothiazol-Derivate) an die Seite zu stellen mit dem Ziel, die Subtyp-Erkennung der Substanzen zu verbessern. Als Hauptsubstitution wurde die Thioamid-Gruppe ausgewählt, die bei Benzopyranen eine subnanomolare Affinität (KC399) ermöglicht hatte. Die schrittweise Optimierung (Synthese – Testung – Modifikation der Synthese, etc.) der Substanzen sowie deren Testung in Radioligandbindungs- und Membranpotential-Experimenten ergab, dass alle heterozyklischen 5-Ringe K_{ATP} -Kanal-Liganden sind und in der Regel als K_{ATP} -Kanal-Agonisten wirken. Allerdings muss zur Erzielung mikromolarer Affinitäten die Thioamidgruppe mit einer Methyl-Gruppe vom heterozyklischen 5-Ring *gespaced* und weiter variiert werden, wie mit Benzothiazol-Derivaten nachgewiesen wurde. Einschränkend muss konstatiert werden, dass es nicht gelang, in den Bereich nanomolarer Affinitäten vorzustoßen.

6 Literatur- und Quellenverzeichnis

- Abdallah Y, Wolf C, Meuter K, Piper HM, Reusch HP, Ladilov Y (2010) Preconditioning with diazoxide prevents reoxygenation-induced rigor-type hypercontracture. J Mol Cell Cardiol 48:270–276.
- Ackermann S, Hiller S, Osswald H, Lösle M, Grenz A, Hambrock A (2009) 17beta-Estradiol modulates apoptosis in pancreatic beta-cells by specific involvement of the sulfonylurea receptor (SUR) isoform SUR1. J Biol Chem 284:4905–4913.
- Aguilar-Bryan L, Clement JP, Gonzalez G, Kunjilwar K, Babenko A, Bryan J (1998) Toward understanding the assembly and structure of KATP channels. Physiol Rev 78:227–245.
- Aittoniemi J, Fotinou C, Craig TJ, de Wet H, Proks P, Ashcroft FM (2009) SUR1: a unique ATPbinding cassette protein that functions as an ion channel regulator. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences 364:257 –267.
- Alemzadeh R, Fledelius C, Bodvarsdottir T, Sturis J (2004) Attenuation of hyperinsulinemia by NN414, a SUR1/Kir6.2 selective K-adenosine triphosphate channel opener, improves glucose tolerance and lipid profile in obese Zucker rats. Metab Clin Exp 53:441–447.
- Alemzadeh R, Jacobs W, Pitukcheewanont P (1996) Antiobesity effect of diazoxide in obese Zucker rats. Metab Clin Exp 45:334–341.
- Ashcroft FM, Harrison DE, Ashcroft SJ (1984) Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic beta-cells. Nature 312:446–448.
- Ashcroft FM, Rorsman P (1989) Electrophysiology of the pancreatic beta-cell. Prog Biophys Mol Biol 54:87–143.
- Ashfield R, Gribble FM, Ashcroft SJ, Ashcroft FM (1999) Identification of the high-affinity tolbutamide site on the SUR1 subunit of the K(ATP) channel. Diabetes 48:1341–1347.
- Ashford ML, Sturgess NC, Trout NJ, Gardner NJ, Hales CN (1988) Adenosine-5'-triphosphatesensitive ion channels in neonatal rat cultured central neurones. Pflugers Arch 412:297–304.
- Babenko AP (2005) KATP channels "vingt ans après": ATG to PDB to Mechanism. Journal of Molecular and Cellular Cardiology 39:79–98.
- Babenko AP (2008) A novel ABCC8 (SUR1)-dependent mechanism of metabolism-excitation uncoupling. J Biol Chem 283:8778–8782.
- Babenko AP, Bryan J (2003) Sur domains that associate with and gate KATP pores define a novel gatekeeper. J Biol Chem 278:41577–41580.
- Babenko AP, Gonzalez G, Bryan J (1999) The tolbutamide site of SUR1 and a mechanism for its functional coupling to K(ATP) channel closure. FEBS Lett 459:367–376.

- Babenko AP, Gonzalez G, Bryan J (2000) Pharmaco-topology of Sulfonylurea Receptors. Journal of Biological Chemistry 275:717–720.
- Baukrowitz T, Fakler B (2000) KATP channels gated by intracellular nucleotides and phospholipids. Eur J Biochem 267:5842–5848.
- Baxter DF, Kirk M, Garcia AF, Raimondi A, Holmqvist MH, Flint KK, Bojanic D, Distefano PS, Curtis R, Xie Y (2002) A novel membrane potential-sensitive fluorescent dye improves cellbased assays for ion channels. J Biomol Screen 7:79–85.
- Bichet D, Haass FA, 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, Terzic A (2000) ATPase activity of the sulfonylurea receptor: a catalytic function for the KATP channel complex. FASEB J 14:1943–1952.
- Billman GE (2008) The cardiac sarcolemmal ATP-sensitive potassium channel as a novel target for anti-arrhythmic therapy. Pharmacol Ther 120:54–70.
- Bonev AD, Nelson MT (1993) ATP-sensitive potassium channels in smooth muscle cells from guinea pig urinary bladder. Am J Physiol 264:C1190–1200.
- Bray KM, Quast U (1992) A specific binding site for K+ channel openers in rat aorta. J Biol Chem 267:11689 –11692.
- Bryan J, Vila-Carriles WH, Zhao G, Babenko AP, Aguilar-Bryan L (2004) Toward Linking Structure With Function in ATP-Sensitive K+ Channels. Diabetes 53:S104–S112.
- Carosati E, Lemoine H, Spogli R, Grittner D, Mannhold R, Tabarrini O, Sabatini S, Cecchetti V (2005) Binding studies and GRIND/ALMOND-based 3D QSAR analysis of benzothiazine type KATP-channel openers. Bioorganic & Medicinal Chemistry 13:5581–5591.
- Carrasco AJ, Dzeja PP, Alekseev AE, Pucar D, Zingman LV, Abraham MR, Hodgson D, Bienengraeber M, Puceat M, Janssen E, Wieringa B, Terzic A (2001) Adenylate kinase phosphotransfer communicates cellular energetic signals to ATP-sensitive potassium channels. Proc Natl Acad Sci USA 98:7623–7628.
- Cecchetti V, Calderone V, Tabarrini O, Sabatini S, Filipponi E, Testai L, Spogli R, Martinotti E, Fravolini A (2003) Highly potent 1,4-benzothiazine derivatives as K(ATP)-channel openers. J Med Chem 46:3670–3679.
- Chan KW, Wheeler A, Csanády L (2008) Sulfonylurea receptors type 1 and 2A randomly assemble to form heteromeric KATP channels of mixed subunit composition. J Gen Physiol 131:43–58.
- Cheng WWL, Tong A, Flagg TP, Nichols CG (2008) Random assembly of SUR subunits in K(ATP) channel complexes. Channels (Austin) 2:34–38.
- Clement JP, Kunjilwar K, Gonzalez G, Schwanstecher M, Panten U, Aguilar-Bryan L, Bryan J (1997) Association and Stoichiometry of KATP Channel Subunits. Neuron 18:827–838.

- Coghlan MJ, Carroll WA, Gopalakrishnan M (2001) Recent Developments in the Biology and Medicinal Chemistry of Potassium Channel Modulators: Update from a Decade of Progress. Journal of Medicinal Chemistry 44:1627–1653.
- Cogolludo AL, Pérez-Vizcaíno F, Fajardo S, Ibarra M, Tamargo J (1999) Effects of nicorandil as compared to mixtures of sodium nitroprusside and levcromakalim in isolated rat aorta. Br J Pharmacol 126:1025–1033.
- Colquhoun D (1998) Binding, gating, affinity and efficacy: The interpretation of structure-activity relationships for agonists and of the effects of mutating receptors. Br J Pharmacol 125:923–947.
- Conti LR, Radeke CM, Shyng SL, Vandenberg CA (2001) Transmembrane topology of the sulfonylurea receptor SUR1. J Biol Chem 276:41270–41278.
- Crawford RM, Budas GR, Jovanović S, Ranki HJ, Wilson TJ, Davies AM, Jovanović 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, Jovanovic A (2002b) Creatine kinase is physically associated with the cardiac ATP-sensitive K+ channel in vivo. FASEB J 16:102– 104.
- Cui Y, Tinker A, Clapp LH (2003) Different molecular sites of action for the KATP channel inhibitors, PNU-99963 and PNU-37883A. Br J Pharmacol 139:122–128.
- D'hahan N, Jacquet H, Moreau C, Catty P, Vivaudou M (1999a) A Transmembrane Domain of the Sulfonylurea Receptor Mediates Activation of ATP-Sensitive K+ Channels by K+Channel Openers. Molecular Pharmacology 56:308–315.
- D'hahan N, Moreau C, Prost A-L, Jacquet H, Alekseev AE, Terzic A, Vivaudou M (1999b) Pharmacological plasticity of cardiac ATP-sensitive potassium channels toward diazoxide revealed by ADP. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96:12162–12167.
- Dabrowski M, Ashcroft FM, Ashfield R, Lebrun P, Pirotte B, Egebjerg J, Bondo Hansen J, Wahl P (2002) The Novel Diazoxide Analog 3-Isopropylamino-7-Methoxy-4H-1,2,4-Benzothiadiazine 1,1-Dioxide Is a Selective Kir6.2/SUR1 Channel Opener. Diabetes 51:1896–1906.
- Dabrowski M, Larsen T, Ashcroft FM, Bondo Hansen J, Wahl P (2003) Potent and selective activation of the pancreatic beta-cell type K ATP channel by two novel diazoxide analogues. Diabetologia 46:1375–1382.
- de Tullio P, Becker B, Boverie S, Dabrowski M, Wahl P, Antoine M-H, Somers F, Sebille S, Ouedraogo R, Hansen JB, Lebrun P, Pirotte B (2003) Toward tissue-selective pancreatic Bcells KATP channel openers belonging to 3-alkylamino-7-halo-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides. J Med Chem 46:3342–3353.
- de Tullio P, Boverie S, Becker B, Antoine M-H, Nguyen Q-A, Francotte P, Counerotte S, Sebille S, Pirotte B, Lebrun P (2005) 3-Alkylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxides as ATP-Sensitive Potassium Channel Openers: Effect of 6,7-Disubstitution on Potency and Tissue Selectivity. Journal of Medicinal Chemistry 48:4990–5000.

- de Tullio P, Dupont L, Francotte P, Counerotte S, Lebrun P, Pirotte B (2006) Three-Dimensional Quantitative Structure–Activity Relationships of ATP-Sensitive Potassium (KATP) Channel Openers Belonging to the 3-Alkylamino-4H-1,2,4-benzo- and 3-Alkylamino-4H-1,2,4pyridothiadiazine 1,1-Dioxide Families. Journal of Medicinal Chemistry 49:6779–6788.
- de Tullio P, Pirotte B, Lebrun P, Fontaine J, Dupont L, Antoine M-H, Ouedraogo R, Khelili S, Maggetto C, Masereel B, Diouf O, Podona T, Delarge J (1996) 3- and 4-Substituted 4H-Pyrido[4,3-e]-1,2,4-thiadiazine 1,1-Dioxides as Potassium Channel Openers: Synthesis, Pharmacological Evaluation, and Structure–Activity Relationships. Journal of Medicinal Chemistry 39:937–948.
- De Vos A, Heimberg H, Quartier E, Huypens P, Bouwens L, Pipeleers D, Schuit F (1995) Human and rat beta cells differ in glucose transporter but not in glucokinase gene expression. J Clin Invest 96:2489–2495.
- Dickinson KE, Bryson CC, Cohen RB, Rogers L, Green DW, Atwal KS (1997) Nucleotide regulation and characteristics of potassium channel opener binding to skeletal muscle membranes. Mol Pharmacol 52:473–481.
- Dörschner H, Brekardin E, Uhde I, Schwanstecher C, Schwanstecher M (1999) Stoichiometry of Sulfonylurea-Induced ATP-Sensitive Potassium Channel Closure. Molecular Pharmacology 55:1060–1066.
- Doupnik CA, Davidson N, Lester HA (1995) The inward rectifier potassium channel family. Curr Opin Neurobiol 5:268–277.
- Dupuis JP, Revilloud J, Moreau CJ, Vivaudou M (2008) Three C-terminal residues from the sulphonylurea receptor contribute to the functional coupling between the K(ATP) channel subunits SUR2A and Kir6.2. J Physiol (Lond) 586:3075–3085.
- Ehle B, Lemoine H, Kaumann AJ (1985) Improved evaluation of binding of ligands to membranes containing several receptor-subtypes. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 331:52–59.
- Epps DE, Wolfe ML, Groppi V (1994) Characterization of the steady-state and dynamic fluorescence properties of the potential-sensitive dye bis-(1,3-dibutylbarbituric acid)trimethine oxonol (Dibac4(3)) in model systems and cells. Chemistry and Physics of Lipids 69:137–150.
- Fischer A, Schmidt C, Lachenicht S, Grittner D, Winkler M, Wrobel T, Rood A, Lemoine H, Frank W, Braun M (2010) Synthesis of benzofuran, benzothiophene, and benzothiazole-based thioamides and their evaluation as K(ATP) channel openers. ChemMedChem 5:1749–1759.
- Flagg TP, Kurata HT, Masia R, Caputa G, Magnuson MA, Lefer DJ, Coetzee WA, Nichols CG (2008) Differential structure of atrial and ventricular KATP: atrial KATP channels require SUR1. Circ Res 103:1458–1465.
- Flanagan SE, Clauin S, Bellanné-Chantelot C, de Lonlay P, Harries LW, Gloyn AL, 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.

- Geisen K, Hitzel V, Okomonopoulos R, Pünter J, Weyer R, Summ HD (1985) Inhibition of 3Hglibenclamide binding to sulfonylurea receptors by oral antidiabetics. Arzneimittelforschung 35:707–712.
- Gopalakrishnan M, Whiteaker KL, Molinari EJ, Davis-Taber R, Scott VE, Shieh CC, Buckner SA, Milicic I, Cain JC, Postl S, Sullivan JP, Brioni JD (1999) Characterization of the ATPsensitive potassium channels (KATP) expressed in guinea pig bladder smooth muscle cells. J Pharmacol Exp Ther 289:551–558.
- Göpel SO, Kanno T, Barg S, Weng XG, Gromada J, Rorsman P (2000) Regulation of glucagon release in mouse -cells by KATP channels and inactivation of TTX-sensitive Na+ channels. J Physiol (Lond) 528:509–520.
- Gribble FM, Williams L, Simpson AK, Reimann F (2003) A novel glucose-sensing mechanism contributing to glucagon-like peptide-1 secretion from the GLUTag cell line. Diabetes 52:1147–1154.
- Griesemer D, Zawar C, Neumcke B (2002) Cell-type specific depression of neuronal excitability in rat hippocampus by activation of ATP-sensitive potassium channels. Eur Biophys J 31:467–477.
- Gross I, Toman A, Uhde I, Schwanstecher C, Schwanstecher M (1999) Stoichiometry of Potassium Channel Opener Action. Molecular Pharmacology 56:1370–1373.
- Grover GJ, Garlid KD (2000) ATP-Sensitive potassium channels: a review of their cardioprotective pharmacology. J Mol Cell Cardiol 32:677–695.
- Hambrock A, de Oliveira Franz CB, Hiller S, Grenz A, Ackermann S, Schulze DU, Drews G, Osswald H (2007) Resveratrol binds to the sulfonylurea receptor (SUR) and induces apoptosis in a SUR subtype-specific manner. J Biol Chem 282:3347–3356.
- Hambrock A, de Oliveira Franz CB, Hiller S, Osswald H (2006) Glibenclamide-induced apoptosis is specifically enhanced by expression of the sulfonylurea receptor isoform SUR1 but not by expression of SUR2B or the mutant SUR1(M1289T). J Pharmacol Exp Ther 316:1031–1037.
- Hambrock A, Kayar T, Stumpp D, 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, Kurachi Y, Quast U (1998) Mg2+ and ATP dependence of KATP channel modulator binding to the recombinant sulphonylurea receptor, SUR2B. Br J Pharmacol 125:577–583.
- Hambrock A, Preisig-Muller R, Russ U, Piehl A, Hanley PJ, Ray J, Daut J, Quast U, Derst C (2002) Four novel splice variants of sulfonylurea receptor 1. Am J Physiol Cell Physiol 283:C587– 598.
- Higgins CF (2001) ABC transporters: physiology, structure and mechanism--an overview. Res Microbiol 152:205–210.

- Inagaki N, Gonoi T, Clement JP, Namba N, Inazawa J, Gonzalez G, Aguilar-Bryan L, Seino S, Bryan J (1995) Reconstitution of IKATP: an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. Science 270:1166–1170.
- Inagaki N, Gonoi T, Clement JP, Wang CZ, Aguilar-Bryan L, Bryan J, Seino S (1996) A family of sulfonylurea receptors determines the pharmacological properties of ATP-sensitive K+ channels. Neuron 16:1011–1017.
- Inagaki N, Gonoi T, Seino S (1997) Subunit stoichiometry of the pancreatic beta-cell ATP-sensitive K+ channel. FEBS Lett 409:232–236.
- Isomoto S, Kondo C, Yamada M, Matsumoto S, Higashiguchi O, Horio Y, Matsuzawa Y, Kurachi Y (1996) A Novel Sulfonylurea Receptor Forms with BIR (Kir6.2) a Smooth Muscle Type ATP-sensitive K+ Channel. Journal of Biological Chemistry 271:24321–24324.
- Jahangir A, Terzic A (2005) K(ATP) channel therapeutics at the bedside. J Mol Cell Cardiol 39:99– 112.
- Jahangir A, Terzic A, Shen WK (2001) Potassium channel openers: therapeutic potential in cardiology and medicine. Expert Opin Pharmacother 2:1995–2010.
- Jaspert (2001) Wirkung und Selektivität von Kaliumkanalöffnern bei der Relaxation der glatten Muskulatur verschiedener Gefäßgebiete im Vergleich zur Atemmuskulatur.
- Karger AB, Park S, Reyes S, Bienengraeber M, Dyer RB, Terzic A, Alekseev AE (2008) Role for SUR2A ED domain in allosteric coupling within the K(ATP) channel complex. J Gen Physiol 131:185–196.
- Khan SA, Higdon NR, Hester JB, Meisheri KD (1997) Pharmacological characterization of novel cyanoguanidines as vascular KATP channel blockers. J Pharmacol Exp Ther 283:1207–1213.
- Koh SD, Bradley KK, Rae MG, Keef KD, Horowitz B, Sanders KM (1998) Basal activation of ATP-sensitive potassium channels in murine colonic smooth muscle cell. Biophys J 75:1793–1800.
- Koster JC, Sha Q, Nichols CG (1999) Sulfonylurea and K(+)-channel opener sensitivity of K(ATP) channels. Functional coupling of Kir6.2 and SUR1 subunits. J Gen Physiol 114:203–213.
- Kubo Y, Adelman JP, Clapham DE, Jan LY, Karschin A, Kurachi Y, Lazdunski M, Nichols CG, Seino S, Vandenberg CA (2005) International Union of Pharmacology. LIV. Nomenclature and molecular relationships of inwardly rectifying potassium channels. Pharmacol Rev 57:509–526.
- Kühner P, Prager R, Stephan D, Russ U, Winkler M, Ortiz D, Bryan J, Quast U (2011) Importance of the Kir6.2 N-terminus for the interaction of glibenclamide and repaglinide with the pancreatic K(ATP) channel. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 385:299–311.
- Kwan EP, Gaisano HY (2009) Rescuing the subprime meltdown in insulin exocytosis in diabetes. Ann N Y Acad Sci 1152:154–164.

- Lachenicht S, Fischer A, Schmidt C, Winkler M, Rood A, Lemoine H, Braun M (2009) Synthesis of modified 4H-1,2,4-benzothiadiazine-1,1-dioxides and determination of their affinity and selectivity for different types of K(ATP) channels. ChemMedChem 4:1850–1858.
- Landry DW, Oliver JA (1992) The ATP-sensitive K+ channel mediates hypotension in endotoxemia and hypoxic lactic acidosis in dog. J Clin Invest 89:2071–2074.
- Lange U, Löffler-Walz C, Englert HC, Hambrock A, Russ U, Quast U (2002) The stereoenantiomers of a pinacidil analog open or close cloned ATP-sensitive K+ channels. J Biol Chem 277:40196–40205.
- Larsson O, Ammälä C, Bokvist K, Fredholm B, Rorsman P (1993) Stimulation of the KATP channel by ADP and diazoxide requires nucleotide hydrolysis in mouse pancreatic betacells. The Journal of Physiology 463:349–365.
- Lebrun P, Arkhammar P, Antoine MH, Nguyen QA, Hansen JB, Pirotte B (2000) A potent diazoxide analogue activating ATP-sensitive K+ channels and inhibiting insulin release. Diabetologia 43:723–732.
- Lebrun P, Becker B, Morel N, Ghisdal P, Antoine M-H, de Tullio P, Pirotte B (2008) KATP channel openers: Tissue selectivity of original 3-alkylaminopyrido- and 3-alkylaminobenzothiadiazine 1,1-dioxides. Biochemical Pharmacology 75:468–475.
- Lemoine H, Rood HA (2006) International Patent Application WO/2006/056168.
- Lemoine H, Teschner C, Kästner L, Küper J, Grittner D, Rood A (2007) Demethylation of 6-chloro-3-alkylamino-4h-thieno[3,2-e]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxide Derivatives Results in the Transition of an Agonistic to Antagonistic Behaviour of Compounds in SUR2B but not in SUR1-type KATP Channels. Naunyn-Schmied Arch Pharmacol 375:45.
- Lemoine H, Teschner C, Kästner L, Küper J, Grittner D, Rood A (2009) The position of a methylgroup in 6-chloro-3-alkylamino-4H-thieno[3,2-e]-1,2,4- thiadiazine 1,1-dioxide derivatives determines agonism or antagonism of compounds in calf tracheal KATP-channels. Naunyn-Schmied Arch Pharmacol 379:34.
- Light PE, Bladen C, Winkfein RJ, Walsh MP, French RJ (2000) Molecular basis of protein kinase C-induced activation of ATP-sensitive potassium channels. Proc Natl Acad Sci USA 97:9058–9063.
- Light PE, Manning Fox JE, Riedel MJ, 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.
- Liss B, Bruns R, 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, Roeper J (2001) A role for neuronal KATP channels in metabolic control of the seizure gate. Trends in Pharmacological Sciences 22:599–601.
- Löffler-Walz C, Hambrock A, Quast U (2002) Interaction of KATP Channel Modulators with Sulfonylurea Receptor SUR2B: Implication for Tetramer Formation and Allosteric Coupling of Subunits. Molecular Pharmacology 61:407–414.

- Löffler-Walz C, Quast U (1998) Binding of K(ATP) channel modulators in rat cardiac membranes. Br J Pharmacol 123:1395–1402.
- Maedler K, Carr RD, Bosco D, Zuellig RA, Berney T, Donath MY (2005) Sulfonylurea induced beta-cell apoptosis in cultured human islets. J Clin Endocrinol Metab 90:501–506.
- Markworth E, Schwanstecher C, Schwanstecher M (2000) ATP4- mediates closure of pancreatic beta-cell ATP-sensitive potassium channels by interaction with 1 of 4 identical sites. Diabetes 49:1413–1418.
- Masia R, Nichols CG (2008) Functional clustering of mutations in the dimer interface of the nucleotide binding folds of the sulfonylurea receptor. J Biol Chem 283:30322–30329.
- Matsuo M, Dabrowski M, Ueda K, 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, Ueda K (2005) KATP channel interaction with adenine nucleotides. J Mol Cell Cardiol 38:907–916.
- Matsuo M, Tanabe K, Kioka N, Amachi T, 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, Kurachi Y (2000) C-terminal tails of sulfonylurea receptors control ADPinduced activation and diazoxide modulation of ATP-sensitive K(+) channels. Circ Res 87:873–880.
- Mikhailov MV, Campbell JD, de Wet H, Shimomura K, Zadek B, Collins RF, Sansom MS, Ford RC, Ashcroft FM (2005) 3-D structural and functional characterization of the purified KATP channel complex Kir6.2-SUR1. EMBO J 24:4166–4175.
- Miller TR, Taber RD, Molinari EJ, Whiteaker KL, Monteggia LM, Scott VE, Brioni JD, Sullivan JP, Gopalakrishnan M (1999) Pharmacological and molecular characterization of ATP-sensitive K+ channels in the TE671 human medulloblastoma cell line. Eur J Pharmacol 370:179–185.
- Misaki N, Mao X, Lin Y-F, Suga S, Li G-H, Liu Q, Chang Y, Wang H, Wakui M, Wu J (2007) Iptakalim, a vascular ATP-sensitive potassium (KATP) channel opener, closes rat pancreatic beta-cell KATP channels and increases insulin release. J Pharmacol Exp Ther 322:871–878.
- Moreau C, Gally F, Jacquet-Bouix H, 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, Vivaudou M (2000) The molecular basis of the specificity of action of KATP channel openers. EMBO J 19:6644–6651.
- Moreau C, Prost A-L, Dérand R, Vivaudou M (2005b) SUR, ABC proteins targeted by KATP channel openers. Journal of Molecular and Cellular Cardiology 38:951–963.

- Neagoe I, Schwappach B (2005) Pas de deux in groups of four--the biogenesis of KATP channels. J Mol Cell Cardiol 38:887–894.
- Nelson MT, Quayle JM (1995) Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. Am J Physiol 268:C799–822.
- Nichols CG (2006) KATP channels as molecular sensors of cellular metabolism. Nature 440:470–476.
- Nichols CG, Lopatin AN (1997) Inward rectifier potassium channels. Annu Rev Physiol 59:171– 191.
- Nielsen FE, Bodvarsdottir TB, Worsaae A, MacKay P, Stidsen CE, Boonen HCM, Pridal L, Arkhammar POG, Wahl P, Ynddal L, Junager F, Dragsted N, Tagmose TM, Mogensen JP, Koch A, Treppendahl SP, Hansen JB (2002) 6-Chloro-3-alkylamino-4H-thieno[3,2-e]-1,2,4thiadiazine 1,1-Dioxide Derivatives Potently and Selectively Activate ATP Sensitive Potassium Channels of Pancreatic β-Cells. Journal of Medicinal Chemistry 45:4171–4187.
- Nielsen FE, Ebdrup S, Jensen AF, Ynddal L, Bodvarsdottir TB, Stidsen C, Worsaae A, Boonen HCM, Arkhammar POG, Fremming T, Wahl P, Kornø HT, Hansen JB (2006) New 3-Alkylamino-4H-thieno-1,2,4-thiadiazine 1,1-Dioxide Derivatives Activate ATP-Sensitive Potassium Channels of Pancreatic Beta Cells. Journal of Medicinal Chemistry 49:4127– 4139.
- Nielsen FE, Jacobsen P, Worsaae A, Arkhammar POG, Wahl P, Bondo Hansen J (2004) 2-(4-Methoxyphenoxy)-5-nitro-N-(4-sulfamoylphenyl)benzamide activates Kir6.2/SUR1 K(ATP) channels. Bioorg Med Chem Lett 14:5727–5730.
- Niki I, Ashcroft SJ (1991) Possible involvement of protein phosphorylation in the regulation of the sulphonylurea receptor of a pancreatic beta-cell line, HIT T15. Biochim Biophys Acta 1133:95–101.
- Noma A (1983) ATP-regulated K+ channels in cardiac muscle. Nature 305:147–148.
- Ortqvist E, Björk E, Wallensteen M, Ludvigsson J, Aman J, Johansson C, Forsander G, Lindgren F, Berglund L, Bengtsson M, Berne C, Persson B, Karlsson FA (2004) Temporary preservation of beta-cell function by diazoxide treatment in childhood type 1 diabetes. Diabetes Care 27:2191–2197.
- Pan Z, Huang J, Cui W, Long C, Zhang Y, Wang H (2010) Targeting hypertension with a new adenosine triphosphate-sensitive potassium channel opener iptakalim. J Cardiovasc Pharmacol 56:215–228.
- Park WS, Ko EA, Han J, Kim N, Earm YE (2005) Endothelin-1 acts via protein kinase C to block KATP channels in rabbit coronary and pulmonary arterial smooth muscle cells. J Cardiovasc Pharmacol 45:99–108.

- Peat AJ, Townsend C, Worley JF, Allen SH, Garrido D, Mertz RJ, Pfohl JL, Terry CM, Truax JF, Veasey RL, Thomson SA (2002) Synthesis and evaluation of 7-substituted-3cyclobutylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine-1,1-dioxide derivatives as K(ATP) channel agonists. Bioorg Med Chem Lett 12:2977–2980.
- Pirotte B, Antoine MH, de Tullio P, Hermann M, Herchuelz A, Delarge J, Lebrun P (1994) A pyridothiadiazine (BPDZ 44) as a new and potent activator of ATP-sensitive K+ channels. Biochem Pharmacol 47:1381–1386.
- Pirotte B, de Tullio P, Antoine M-H, Sebille S, Florence X, Lebrun P (2005) New insights into the development of ATP-sensitive potassium channel openers. Expert Opin Ther Patents 15:497–504.
- Pirotte B, de Tullio P, Boverie S, Michaux C, Lebrun P (2011) Impact of the nature of the substituent at the 3-position of 4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides on their opening activity toward ATP-sensitive potassium channels. J Med Chem 54:3188–3199.
- Pirotte B, de Tullio P, Lebrun P, Antoine MH, Fontaine J, Masereel B, Schynts M, Dupont L, Herchuelz A, Delarge J (1993) 3-(Alkylamino)-4H-pyrido[4,3-e]-1,2,4-thiadiazine 1,1dioxides as powerful inhibitors of insulin release from rat pancreatic B-cells: a new class of potassium channel openers? J Med Chem 36:3211–3213.
- Pirotte B, de Tullio P, Nguyen Q-A, Somers F, Fraikin P, Florence X, Wahl P, Hansen JB, Lebrun P (2010) Chloro-Substituted 3-Alkylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-Dioxides as ATP-Sensitive Potassium Channel Activators: Impact of the Position of the Chlorine Atom on the Aromatic Ring on Activity and Tissue Selectivity. Journal of Medicinal Chemistry 53:147– 154.
- Pirotte B, Ouedraogo R, de Tullio P, Khelili S, Somers F, Boverie S, Dupont L, Fontaine J, Damas J, Lebrun P (2000) 3-Alkylamino-4H-pyrido[2,3-e]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxides structurally related to diazoxide and pinacidil as potassium channel openers acting on vascular smooth muscle cells: design, synthesis, and pharmacological evaluation. J Med Chem 43:1456–1466.
- Ploug KB, Baun M, Hay-Schmidt A, Olesen J, Jansen-Olesen I (2010) Presence and vascular pharmacology of KATP channel subtypes in rat central and peripheral tissues. Eur J Pharmacol 637:109–117.
- Proks P, Ashcroft FM (2009) Modeling KATP channel gating and its regulation. Progress in Biophysics and Molecular Biology 99:7–19.
- Pu J-L, Ye B, Kroboth SL, McNally EM, Makielski JC, Shi N-Q (2008) Cardiac sulfonylurea receptor short form-based channels confer a glibenclamide-insensitive KATP activity. J Mol Cell Cardiol 44:188–200.
- Quast U, Bray KM, Andres H, Manley PW, Baumlin Y, Dosogne J (1993) Binding of the K+ channel opener [3H]P1075 in rat isolated aorta: relationship to functional effects of openers and blockers. Molecular Pharmacology 43:474–481.
- Quayle JM, Bonev AD, Brayden JE, Nelson MT (1994) Calcitonin gene-related peptide activated ATP-sensitive K+ currents in rabbit arterial smooth muscle via protein kinase A. J Physiol (Lond) 475:9–13.

- Quayle JM, Nelson MT, Standen NB (1997) ATP-sensitive and inwardly rectifying potassium channels in smooth muscle. Physiol Rev 77:1165–1232.
- Quinn KV, Cui Y, Giblin JP, Clapp LH, 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.
- Reimann F, Gribble FM, Ashcroft FM (2000) Differential response of K(ATP) channels containing SUR2A or SUR2B subunits to nucleotides and pinacidil. Mol Pharmacol 58:1318–1325.
- Rendell M (2004) The role of sulphonylureas in the management of type 2 diabetes mellitus. Drugs 64:1339–1358.
- Repunte VP, Nakamura H, Fujita A, Horio Y, Findlay I, Pott L, Kurachi Y (1999) Extracellular links in Kir subunits control the unitary conductance of SUR/Kir6.0 ion channels. EMBO J 18:3317–3324.
- Ribalet B, John SA, Xie L-H, Weiss JN (2005) Regulation of the ATP-sensitive K channel Kir6.2 by ATP and PIP2. Journal of Molecular and Cellular Cardiology 39:71–77.
- Russ U, Lange U, Löffler-Walz C, Hambrock A, Quast U (2003) Binding and effect of KATP channel openers in the absence of Mg2+. Br J Pharmacol 139:368–380.
- Rustenbeck I, Krautheim A, Jörns A, Steinfelder HJ (2004) Beta-cell toxicity of ATP-sensitive K+ channel-blocking insulin secretagogues. Biochem Pharmacol 67:1733–1741.
- Sakura H, Trapp S, Liss B, Ashcroft FM (1999) Altered functional properties of KATP channel conferred by a novel splice variant of SUR1. J Physiol (Lond) 521 Pt 2:337–350.
- Salamon E, Mannhold R, Weber H, Lemoine H, Frank W (2002) 6-Sulfonylchromenes as highly potent K(ATP)-channel openers. J Med Chem 45:1086–1097.
- Schönlau J (2005) Cyclische und acyclische Phenolether als neuartige organselektive KATP-Kanalöffner: Synthese und pharmakologische Charakterisierung. (Dissertation) Available at: http://docserv.uni-duesseldorf.de/servlets/DocumentServlet?id=3283 [Accessed December 15, 2010].
- Schroeder KS, Neagle BD (1996) FLIPR: A New Instrument for Accurate, High Throughput Optical Screening. Journal of Biomolecular Screening 1:75–80.
- Schwanstecher C, Dickel C, Panten U (1994) Interaction of tolbutamide and cytosolic nucleotides in controlling the ATP-sensitive K+ channel in mouse beta-cells. Br J Pharmacol 111:302– 310.
- Schwanstecher M, Brandt C, Behrends S, Schaupp U, Panten U (1992) Effect of MgATP on pinacidil-induced displacement of glibenclamide from the sulphonylurea receptor in a pancreatic beta-cell line and rat cerebral cortex. Br J Pharmacol 106:295–301.
- Schwanstecher M, Löser S, Rietze I, Panten U (1991) Phosphate and thiophosphate group donating adenine and guanine nucleotides inhibit glibenclamide binding to membranes from pancreatic islets. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 343:83–89.

- Schwanstecher M, Sieverding C, Dorschner H, Gross I, Aguilar-Bryan L, Schwanstecher C, Bryan J (1998) Potassium channel openers require ATP to bind to and act through sulfonylurea receptors. EMBO J 17:5529–5535.
- Seino S, Miki T (2003) Physiological and pathophysiological roles of ATP-sensitive K+ channels. Progress in Biophysics and Molecular Biology 81:133–176.
- Sharma BK, Sharma SK, Singh P, Sharma S (2008) Quantitative structure-activity relationship study of ATP-sensitive potassium channel openers: derivatives of 3-alkylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide. J Enzyme Inhib Med Chem 23:1–6.
- Shi N-Q, Ye B, Makielski JC (2005) Function and distribution of the SUR isoforms and splice variants. Journal of Molecular and Cellular Cardiology 39:51–60.
- Shi W, Cui N, Shi Y, Zhang X, Yang Y, 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:R191–199.
- Shi Y, Chen X, Wu Z, Shi W, Yang Y, Cui N, Jiang C, Harrison RW (2008a) cAMP-dependent protein kinase phosphorylation produces interdomain movement in SUR2B leading to activation of the vascular KATP channel. J Biol Chem 283:7523–7530.
- Shi Y, Cui N, Shi W, Jiang C (2008b) A short motif in Kir6.1 consisting of four phosphorylation repeats underlies the vascular KATP 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, Jiang C (2007b) PKA phosphorylation of SUR2B subunit underscores vascular KATP channel activation by betaadrenergic receptors. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 293:R1205–1214.
- Shieh C-C, Feng J, Buckner SA, Brioni JD, Coghlan MJ, Sullivan JP, Gopalakrishnan M (2001) Functional Implication of Spare ATP-Sensitive K+Channels in Bladder Smooth Muscle Cells. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 296:669 –675.
- Shyng S, Ferrigni T, Nichols CG (1997) Regulation of KATP channel activity by diazoxide and MgADP. Distinct functions of the two nucleotide binding folds of the sulfonylurea receptor. J Gen Physiol 110:643–654.
- Shyng S, Nichols CG (1997) Octameric stoichiometry of the KATP channel complex. J Gen Physiol 110:655–664.
- Shyng SL, Nichols CG (1998) Membrane phospholipid control of nucleotide sensitivity of KATP channels. Science 282:1138–1141.
- Speier S, Yang S-B, Sroka K, Rose T, Rupnik M (2005) KATP-channels in beta-cells in tissue slices are directly modulated by millimolar ATP. Molecular and Cellular Endocrinology 230:51–58.
- Spruce AE, Standen NB, Stanfield PR (1985) Voltage-dependent ATP-sensitive potassium channels of skeletal muscle membrane. Nature 316:736–738.
- Stephan D, Salamon E, Weber H, Russ U, Lemoine H, Quast U (2006) KATP channel openers of the benzopyran type reach their binding site via the cytosol. Br J Pharmacol 149:199–205.

- Sturgess N, Cook D, Ashford MJ, Hales CN (1985) The Sulphonylurea Receptor May Be An ATPsensitive Potassium Channel. The Lancet 326:474–475.
- Tamura K, Suzuki Y, Yoshida S, Nabata H (1994) Action of KC-399, a newly synthesized potassium channel opener, on mechanical activity and 86Rb efflux in rat aorta. J Cardiovasc Pharmacol 23:220–226.
- Tarasov AI, Girard CAJ, Ashcroft FM (2006) ATP Sensitivity of the ATP-Sensitive K+ Channel in Intact and Permeabilized Pancreatic β-Cells. Diabetes 55:2446–2454.
- Teramoto N (2006a) Physiological roles of ATP-sensitive K+ channels in smooth muscle. J Physiol (Lond) 572:617–624.
- Teramoto N (2006b) Pharmacological Profile of U-37883A, a Channel Blocker of Smooth Muscle-Type ATP-Sensitive K Channels. Cardiovasc Drug Rev 24:25–32.
- Teramoto N, Tomoda T, Yunoki T, Ito Y (2006) Different glibenclamide-sensitivity of ATP-sensitive K+ currents using different patch-clamp recording methods. Eur J Pharmacol 531:34–40.
- Teramoto N, Zhu H-L, Shibata A, Aishima M, Walsh EJ, Nagao M, Cole WC (2009) ATP-sensitive K+ channels in pig urethral smooth muscle cells are heteromultimers of Kir6.1 and Kir6.2. Am J Physiol Renal Physiol 296:F107–117.
- Teschner C (2011) Die Demethylierung von KATP-Liganden des Thieno-Thiadiazin-Typs resultiert in einem Agonist/Antagonist-Übergang bei aortalen (SUR2B-Typ), nicht aber bei SUR1-Typ KATP-Kanälen.
- Thorneloe KS, Maruyama Y, Malcolm AT, Light PE, Walsh MP, Cole WC (2002) Protein kinase C modulation of recombinant ATP-sensitive K(+) channels composed of Kir6.1 and/or Kir6.2 expressed with SUR2B. J Physiol (Lond) 541:65–80.
- Trube G, Rorsman P, Ohno-Shosaku T (1986) Opposite effects of tolbutamide and diazoxide on the ATP-dependent K+ channel in mouse pancreatic beta-cells. Pflugers Arch 407:493–499.
- Tucker SJ, Gribble FM, Zhao C, Trapp S, Ashcroft FM (1997) Truncation of Kir6.2 produces ATPsensitive K+ channels in the absence of the sulphonylurea receptor. Nature 387:179–183.
- Ueda K, Komine J, Matsuo M, Seino S, 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, Schwanstecher M (1999) Identification of the Potassium Channel Opener Site on Sulfonylurea Receptors. Journal of Biological Chemistry 274:28079 –28082.
- Uhrig U, Höltje H-D, Mannhold R, Weber H, Lemoine H (2002) Molecular modeling and QSAR studies on KATP channel openers of the benzopyran type. Journal of Molecular Graphics and Modelling 21:37–45.
- Vila-Carriles WH, Zhao G, Bryan J (2007) Defining a binding pocket for sulfonylureas in ATPsensitive potassium channels. FASEB J 21:18–25.

- Wang H, Long C-L, Zhang Y-L (2005) A new ATP-sensitive potassium channel opener reduces blood pressure and reverses cardiovascular remodeling in experimental hypertension. J Pharmacol Exp Ther 312:1326–1333.
- Wang X, Wu J, Li L, Chen F, Wang R, Jiang C (2003) Hypercapnic acidosis activates KATP channels in vascular smooth muscles. Circ Res 92:1225–1232.
- Wheeler A, Wang C, Yang K, Fang K, Davis K, Styer AM, Mirshahi U, Moreau C, Revilloud J, Vivaudou M, Liu S, Mirshahi T, Chan KW (2008) Coassembly of Different Sulfonylurea Receptor Subtypes Extends the Phenotypic Diversity of ATP-sensitive Potassium (KATP) Channels. Molecular Pharmacology 74:1333–1344.
- Whiteaker KL, Gopalakrishnan SM, Groebe D, Shieh CC, Warrior U, Burns DJ, Coghlan MJ, Scott VE, Gopalakrishnan M (2001) Validation of FLIPR membrane potential dye for high throughput screening of potassium channel modulators. J Biomol Screen 6:305–312.
- Winkler M, Stephan D, Bieger S, Kühner P, Wolff F, 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.
- Wolff C, Fuks B, Chatelain P (2003) Comparative Study of Membrane Potential-Sensitive Fluorescent Probes and their Use in Ion Channel Screening Assays. Journal of Biomolecular Screening 8:533 –543.
- Wu J, Xu H, Yang Z, Wang Y, Mao J, Jiang C (2002) Protons activate homomeric Kir6.2 channels by selective suppression of the long and intermediate closures. J Membr Biol 190:105–116.
- Yamada A, Gaja N, Ohya S, Muraki K, Narita H, Ohwada T, Imaizumi Y (2001) Usefulness and Limitation of DiBAC4(3), a Voltage-Sensitive Fluorescent Dye, for the Measurement of Membrane Potentials Regulated by Recombinant Large Conductance Ca2+-Activated K+ Channels in HEK293 Cells. Jpn J Pharmacol 86:342–350.
- Yamada M, Isomoto S, Matsumoto S, Kondo C, Shindo T, Horio Y, Kurachi Y (1997) Sulphonylurea receptor 2B and Kir6.1 form a sulphonylurea-sensitive but ATP-insensitive K+ channel. J Physiol (Lond) 499 (Pt 3):715–720.
- Yung-Chi C, Prusoff WH (1973) Relationship between the inhibition constant (KI) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I50) of an enzymatic reaction. Biochemical Pharmacology 22:3099–3108.
- Zerangue N, Schwappach B, Jan YN, Jan LY (1999) A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane K(ATP) channels. Neuron 22:537–548.
- Zhang C, Miki T, Shibasaki T, Yokokura M, Saraya A, Seino S (2006) Identification and characterization of a novel member of the ATP-sensitive K+ channel subunit family, Kir6.3, in zebrafish. Physiol Genomics 24:290–297.
- Zhang H, Flagg TP, Nichols CG (2010) Cardiac sarcolemmal KATP channels: Latest twists in a questing tale! Journal of Molecular and Cellular Cardiology 48:71–75.
- Zingman LV, Alekseev AE, Bienengraeber M, Hodgson D, Karger AB, Dzeja PP, Terzic A (2001) Signaling in channel/enzyme multimers: ATPase transitions in SUR module gate ATPsensitive K+ conductance. Neuron 31:233–245.

Anhang

A Kontrollversuche zur Membranpotentialmessung mit dem Fluoreszenzmarker DyeB

A 1 Einleitung und Motivation

Das Fundament der Arbeit wurde 2006 (DFG-Antrag) bestehend aus einem chemischen und einem medizinisch/physiologischen Teil gelegt, mit der Zielrichtung, a) weitere Substanzklassen zu finden, die b) agonistisch oder antagonistisch und c) möglicherweise über verschiedene Bindgungsstellen an der rezeptiven SUR-Untereinheit des K_{ATP}-Kanals binden und wirken. Solche Neusyntheseansätze führen bekanntermaßen zu einer Fülle von Substanzen mit sehr unterschiedlicher Affinität, insbesondere auch solchen, die nur eine geringe Affinität für die Zielstruktur aufweisen.

Als Screeningverfahren konnte das etablierte Verfahren der Radioligandbindung nur einen Teil ([³H]-P1075-Bindung am SUR2B-Subtyp des Kanals) abdecken, da für den SUR1-Subtyp nur der Antagonist-Ligand [³H]-Glibenclamid verfügbar ist, welcher es aufgrund seiner hohen allosterischen Potenz nur sehr eingeschränkt erlaubt, Agonistwirkungen zu messen. Als alternatives Verfahwurde die in unserer Arbeitsgruppe seit Jahren erforschte Fluoreszenz-Technik ren weiterentwickelt, die zuerst nur für den klassischen Membranpotentialmarker DiBAC₄(3) (hiermit wurde die Mehrzahl der Experimente im Hauptteil der vorliegenden Arbeit durchgeführt) verfügbar war. Zwei bis drei Jahre nach Erstpublikation der Daten (Lachenicht et al., 2009; Fischer et al., 2010) mit der Beschreibung neuer Wirkmoleküle für den KATP-Kanal bot sich aufgrund der mittlerweile als Routineverfahren etablierten Fluoreszenz-Lichtmessung mit dem Membranpotentialmarker DyeB (DisBAC₁(3); R7260, *Molecular Probes*) die Möglichkeit, nicht nur die viel, sondern auch die wenig versprechenden neuen Substanzen (wie mit der DiBAC₄(3)-Fluoreszenz gescreent) nochmals mit dem überlegenen Verfahren der DyeB-Fluoreszenz zu vermessen. Dieses ist allgemein weniger sensibel für Störungen der Fluoreszenz-Lichtmessung und geeignet als Bestätigungstest der durchgeführten DiBAC₄(3)-Versuche.

Als einer der Hauptsubstitute der Derivate der vorliegenden Arbeit wurde die Thioamid-Gruppe gewählt, die der japanischen Entwicklungssubstanz KC399 zu einer überlegenen Affinität mit K_D-

Werten < 1 nM (Kap. 3.1.3) verholfen hatte. Verbunden mit der Wahl der chemischen Grundkörper (Benzo-Thiadiazin, -Furan, -Thiophen, -Thiazol) und der Thioamid-Gruppe war eine gewisse Wahrscheinlichkeit gegeben, farbige Substanzen zu erhalten, die bei niedriger Affinität die Fluoreszenz-Lichtmessungen stören können. Da allerdings niederaffine Substanzen als Entwicklungssubstanzen nur von eingeschränkter Bedeutung sind – sie fallen durch das Screening-Raster und es wird versucht die chemische Synthese in Richtung höherer Affinität zu lenken – erschien das Risiko (Störung der Fluoreszenz-Lichtmessung durch niederaffine Substanzen) beherrschbar.

Ziel der durchgeführten Membranpotentialmessungen mittels Fluoreszenz in der vorliegenden Arbeit ist die Erfassung der spezifischen Wirkung von Testsubstanzen am K_{ATP}-Kanal, welche zu einer Änderung des Membranpotential führt. Davon abzugrenzen sind potentielle unspezifische Effekte durch andere Zellstrukturen oder durch die zu untersuchende Substanz selbst herbeigeführte Störungen des Messaufbaus z.B. durch Fluoreszenzlöschung, sog. "*Quenching*".

Um diese unspezifischen Effekte zu erfassen, wurden zusätzlich zu den in Kapitel 3 dargestellten eigentlichen Untersuchungen auch an den Wildtyp-Zelllinien der CHO-(SUR1/Kir6.2)- und HEK293-(SUR2B/Kir6.2)-Zellen (nachfolgend "CHO-WT" bzw. "HEK293-WT genannt) Fluoreszenzversuche unter folgenden Kernaspekten durchgeführt:

- Ausschluss relevanter, spezifischer K_{ATP}-Kanalwirkungen an den Wildtyp-Zelllinien zur isolierten Betrachtung subtypspezifischer K_{ATP}-Kanalwirkungen in transfizierten Zellen.
- Erfassung unmaskierter Störeffekte durch Bindung an unspezifische Zellstrukturen (d.h. nicht Sulfonylharnstoffrezeptoren) und/oder die Störung des Messprinzips durch *Quenching*-Effekte der eingesetzten Testsubstanzen.

A 2 Ergebnisse und Diskussion

A 2.1 Ausschluss spezifischer K_{ATP}-Kanalwirkungen an Wildtyp-Zelllinien

Um eine mögliche Störung des Messaufbaus durch eine endogene Expression von K_{ATP} -Kanälen in transfizierten CHO-(SUR1/Kir6.2)- und HEK293-(SUR2B/Kir6.2)-Zellen zu erfassen, wurden Versuche mit hochaffinen und hochselektiven K_{ATP} -Kanalliganden an den Wildtyp-Zelllinien durchgeführt.

Die Versuchsdurchführung erfolgte mit 0.125 mg/ml DyeB analog zu dem in Kapitel 2.5.4 beschriebenen Messverfahren zur Membranpotentialmessung mittels Fluoreszenz. Zusätzlich wur-

den parallel zu den Wildtyp-Zelllinien auch transfizierte Zellen in separaten 12-well-strips gesiedelt und zeitgleich untersucht, um die Wirkung der verwendeten Testsubstanzen und deren erfolgreiche Lösung im physiologischen Puffer zu bestätigen. Für HEK293-(SUR2B/Kir6.2)-Zellen und deren Wildtyp-Zelllinie wurden die K_{ATP}-Kanalagonisten Bimakalim und P1075 in einer maximaleffektiven Konzentration von 5 μ M bzw. 10 μ M eingesetzt. Für CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen und deren Wildtyp-Zelllinie wurde NNC414 in einer maximaleffektiven Konzentration von 30 μ M (vgl. Kap. 3.1.2) verwendet.

Abb. A1a demonstriert die (fehlende) Wirkung der beiden potenten K_{ATP} -Kanalagonisten Bimakalim und P1075 an HEK293-WT-Zellen: die gemessene Fluoreszenzänderung an HEK293-Wildtypzellen, lässt sich – absolut betrachtet – in die Größenordnung von Schwankungen der Kontrolle einordnen. Für das Benzothiadiazin Diazoxid wurden geringe Effekte an HEK293-WT-Zellen gefunden.

Um diese geringen Effekte zu quantifizieren und deren Einfluss auf durchgeführte Messungen abzuschätzen, wurden die Effekte an Wildtypzellen (unter Berücksichtigung von kanalspezifischem Basalwert sowie Ausgangsfluoreszenz (Labelhöhe) der jeweiligen Messung) in Relation auf eine durchschnittliche Fluoreszenzänderung durch einen maximal hyperpolarisierenden Stimulus von 2 μ M Bimakalim bezogen. Mit diesem Verfahren wurde der durch Diazoxid hervorgerufene Effekt an HEK293-Wildtypzellen auf ca. 2 % (n=12) eines maximal hyperpolarisienden Effektes an HEK293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen geschätzt; die Effekte von Bimakalim und P1075 auf < 1 %.

Testsubstanz	[µM]	Wildtyp E% ± SD		SUR2B/Kir6.1 E% ± SD			
Bimakalim	5	0.8 ± 3.4	(60)	96.6 ± 9.8 (4)			
P1075	10	-0.3 ± 1.9	(4)	98.7 ± 1.7 (3)			
Diazoxid	200	1.9 ± 4.8	(12)	93.9 ± 2.8 (2)			

Tab. A-1: Fluoreszenzeffekte (E%) an HEK293-Wildtyp-Zellen und HEK293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen

positive E%-Werte bedeuten einen Effekt im Sinne einer Hyperpolarisation; neg. i. S. einer Depolarisation

Zusätzlich wurde für Bimakalim in Abb. A2 exemplarisch demonstriert, wie die sukkzessive Steigerung der Konzentration von Bimakalim (von 1 nM bis 4 μ M) zu einer entsprechenden Wirkung an HEK293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen führt, während keine Änderung der Fluoreszenzintensität an HEK293-WT-Zellen zu beobachten ist.

Die gleiche methodische Vorgehensweise mit vergleichenden Fluoreszenzmessungen an CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen und deren Wildtyp-Zelllinie ergab für 50 µM NNC414 etwa 3% Effekt; für 200 μ M Diazoxid wurden ca. -7 % (d.h. 7 % Effekt im Sinne einer Zunahme der Fluoreszenzintensität, welche aufgrund des agonistischen Charakters von Diazoxid am SUR1 als unspezifisch für den K_{ATP}-Kanal gewertet werden kann). Für CHO ist ein Beispielexperiment in Abb. A3 demonstriert; Messergebnisse finden sich in Tab. A-2.

Testsubstanz	[µM]	Wildtyp E% ± SD	SUR1/Kir6.2 E% ± SD
NNC414	50	3.0 ± 4.1 (36)	99.2 ± 1.6 (47)
Diazoxid	200	-7.0 ± 4.0 (14)	92.5 ± 1.7 (2)

Tab. A-2: Fluoreszenzeffekte (E%) an CHO-Wildtyp-Zellen und CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen

positive E%-Werte bedeuten einen Effekt im Sinne einer Hyperpolarisation; neg. i. S. einer Depolarisation


Abb. A1: Vergleich der Änderung der Fluoreszenzintensität durch Standard-Agonisten an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen mit der an untransfizierten Wildtyp-Zellen und der an blockierten K_{ATP}-Kanälen. Es wurden die hochaffinen K_{ATP}-Kanal-Öffner Bimakalim, P1075 und KC399, sowie die niederaffine Muttersubstanz der Benzo-Thiadiazine, Diazoxid, für diesen Test ausgesucht. Die mit Standardverfahren kultivierten Zellen wurden mit 0.125 mg/ml des Membranpotentialmarkers DyeB (DisBac₁(3); membrane potential dye R7260, Molecular Probes) ca. 90 – 120 min bis zum Erreichen des Labelgleichgewichtes markiert. Danach wurden die einzelnen Kanäle (12 Stück) eines Fluoreszenz-Detektors für DyeB abgeglichen und die in DyeB/Pufferlösung vorverdünnten Liganden injiziert (mit "Agonist" markierter Zeitpunkt). Nach ca. 20 min erfolgt als maximal hyperpolarisiender Stimulus eine weitere Injektion von 20 μM Bimakalim. Weiterhin wurde ein Teil der Kanäle der HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen 30 Minuten vor der ersten Injektion mit 10 μM Glibenclamid effektiv blockiert, so dass keine Agonistwirkung mehr erwartet werden konnte.

Mit den hochaffinen K_{ATP}-Kanal-Öffnern Bimakalim, P1075 und KC399 beobachtet man weder am Wildtyp (a) noch an den geblockten K_{ATP}-Kanälen (b, oben) eine Wirkung, während an nicht-blockierten K_{ATP}-Kanälen (b, unten) eine maximale Hyperpolarisation gemessen wird. Mit der niederaffinen Substanz Diazoxid, die in der hohen Konzentration von 200 μ M eingesetzt wurde, beobachtete man eine kleine, nicht-K_{ATP}-spezifische Wirkung an blockierten K_{ATP}-Kanälen (b, oben).



Abb. A2: Vergleich der Wirkung von Bimakalim an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen mit der an untransfizierten Wildtyp-Zellen im Membranpotential-Test mit DyeB.

Bimakalim übt seine Wirkung mit hoher Affinität (EC₅₀ ~ 16 nM) an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen (b) aus. An Wildtyp-Zellen ist kaum eine Wirkung bis 4 μ M zu beobachten. Zur Normierung der Effekte an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen auf einen agonistischen, hyperpolarisierenden Maximalstimulus wurden in dieser Untersuchungsreihe jeweils 2 μ M Bimakalim verwendet, welche eine maximale Hyperpolarisation und zugleich keine relevante Änderung der Fluoreszenzintensität an Wildtyp-Zellen auslöst.



Abb. A3: Vergleich der Änderung der Fluoreszenzintensität durch etablierte Standard-Agonisten an CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen mit der an untransfizierten Wildtyp-Zellen

Als K_{ATP}-Kanal-Öffner wurden das Thieno-Thiadiazin NNC414 sowie das Benzothiadiazin Diazoxid in jeweils maximal wirksamer Konzentration gewählt.

Für NNC414 wurde an CHO-Wildtypzellen (a) keine relevante Fluoreszenz-Änderung gemessen. Das niederaffine Diazoxid bewirkte in der hohen Konzentration von 200 µM an CHO-Wildtypzellen eine leicht höhere Fluoreszenzintensität, welche im Verhältnis zu der in (b) dargestellten Wirkung an CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen gering erscheint.

A 2.2 Demaskierung unspezifischer K_{ATP}-Kanalwirkungen an HEK293-(SUR2B/Kir6.1)- bzw. CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen durch Glibenclamid

Um eine Korrektur der Gesamtwirkung um die nicht K_{ATP} -Kanal-mediierte Wirkung zu ermöglichen, wurden in einem zweiten Schritt die K_{ATP} -Kanäle an transfizierten Zellen durch eine hohe Konzentration des für den Sulfonylharnstoffrezeptor spezifischen Sulfonylharnstoffs Glibenclamid blockiert. Dieses Vorgehen ermöglicht die zeitgleiche Erfassung von Fluoreszenzsignalen an HEK293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen unter drei Bedingungen:

- Vorinkubation der Zellen eines Messkanals mit Glibenclamid 30 Minuten vor Beginn der eigentlichen Messung der Fluoreszenzeffekte durch die zu untersuchende Testsubstanz. Die eingesetzte Glibenclamid-Konzentration zur Blockade spezifischer Effekte am K_{ATP}-Kanal beträgt 10 μM an HEK293-(SUR2B/Kir6.1)- und 1 μM an CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen.
- Vergleichskanal ohne Glibenclamid-Vorinkubation zur Erfassung eines potentiellen Mischeffekts der zu untersuchenden Testsubstanz (bestehend aus unspezischer und spezifischer Wirkung).
- Maximalhyperpolarisiernder Effekt durch einen etablierten K_{ATP}-Kanalagonisten. Hierfür wurden 2 μM Bimakalim für Untersuchungen an HEK293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen bzw.
 μM NNC414 für Untersuchungen an CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen eingesetzt.

Durch die Verwendung einer einheitlichen Zelllinie (nämlich der transfizierten) für beide Messungen – d.h. der Kontrollmessung in Gegenwart von Glibenclamid (F_{ns} , nicht-spezifische Fluoreszenz) und der Effekt-Messung in Abwesenheit von Glibenclamid ($F_{tot} = F_s + F_{ns}$) – ergibt sich die Möglichkeit, die K_{ATP}-Kanal-spezifische Fluoreszenz ($F_s = F_{tot} - F_{ns}$) zu ermitteln. Zugleich werden potentielle Schwierigkeiten bei der Verrechnung von Fluoreszenzwerten von Wildtyp-Zellen versus transfizierten Zellen – wie unterschiedliche Zelldichten, fehlende Normierung des Signals an Wildtyp-Zellen über K_{ATP}-Kanal-Stimuli – ausgeschlossen.

Abb. A-1 (b, oben) zeigt ein Originalexperiment, welches die bereits am Wildtyp gefundenen Ergebnisse für die K_{ATP}-Kanalagonisten P1075, Bimakalim und Diazoxid an HEK293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen in Gegenwart von Glibenclamid bestätigt (vgl. Tab. A-1 und A-3).

		Α	В	Δ: (B – A)	
	[µM]	SUR2B/Kir6.1 E% ± SD (n) Vorbehandlung mit 10 μM Glibenclamid	SUR2B/Kir6.1 E% ± SD (n)	SUR2B/Kir6.1 E% ± SD (n)	
Bimakalim	2	-0.7 ± 2.6 (4)	95.4 ± 1.0 (4)	97.3 ± 8.1 (4)	
P1075	20	1.2 ± 3.9 (3)	98.9 ± 0.7 (3)	97.7 ± 5.4 (3)	
KC399	1	6.4 ± 6.1 (2)	97.6 \pm 0.3 (2)	91.2 ± 6.5 (2)	
Diazoxid	200	8.2 ± 0.7 (2)	93.9 ± 2.8 (2)	85.7 ± 2.1 (2)	

Tab. A-3: Fluoreszenzeffekte (E%) an HEK293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen für Standard-KATP-Kanalagonisten

positive E%-Werte bedeuten einen Effekt im Sinne einer Hyperpolarisation; neg. i. S. einer Depolarisation

Auch die Fluoreszenzeffekte von NNC414 und Diazoxid an CHO-(SUR1/Kir6.2) unter der Blockade der K_{ATP}-Kanäle mit 1µM Glibenclamid ähneln den gefundenen Wildtypeffekten (vgl. Tab. A-2 und A-4). Diazoxid zeigt in diesem Versuchsaufbau jedoch in einer Konzentration von 200 µM mit durchschnittlich 6.2 % (n=3) eine leicht hyperpolarisierende Wirkung, die für die Konzentration von 25 µM (entspricht etwa der EC₅₀) bereits auf < 2 % fallen.

		Α	В	Δ: (B - A)	
	[µM]	SUR1/Kir6.2 E% \pm SD (n) Vorbehandlung mit I μ M Glibenclamid	SUR1/Kir6.2 E % ± SD (n)	SUR1/Kir6.2 E % ± SD (n)	
NNC414	30	4.6 ± 4.8 (3)	95.4 ± 1.0 (3)	90.8 ± 5.4 (3)	
Diazoxid	25ª	1.9 ± 1.9 (3)	58.4 ± 7.9 (3)	56.5 ± 8.2 (3)	
Diazoxid	200	6.2 ± 1.4 (3)	92.5 ± 1.7 (3)	86.3 ± 2.2 (3)	

Tab. A-4: Fluoreszenzeffekte (E%) an CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen für NNC414 und Diazoxid

positive E%-Werte bedeuten einen Effekt im Sinne einer Hyperpolarisation; neg. i. S. einer Depolarisation ^a entspricht ca. der EC₅₀

Da selbst für potente K_{ATP}-Kanalagonisten in hoher Konzentration an beiden Wildtyp-Zelllinien keine bis nur geringe (\leq 3 %) Fluoreszenzänderungen (im direkten Vergleich zu den in der vorliegenden Arbeit vewendeten transfizierten Zellen) gemessen wurden, kann ein Störeinfluss durch endogen exprimierte K_{ATP}-Kanäle oder andere mit dem Sulfonylharnstoffrezeptor interagierende und bereits in den Wildtyp-Zelllinien vorhandene (endogene) Strukturen als äußerst gering bewertet werden. Auch die Beeinflussung der Messung der Wirkung an einem bestimmten K_{KATP}-Kanal-Subtyp (hier SUR1/Kir6.2 bzw. SUR2B/Kir6.1), durch die gleichzeitige endogene Expression eines anderen Subtyps, ist mit dem verwendeten Verfahren für beide verwendeten transfizierten Zellsysteme sehr unwahrscheinlich.

A 2.3 Untersuchung unspezifischer Effekte von K_{ATP}-Kanal-Agonisten an Wildtyp-Zelllinien

Die systematische Untersuchung auf unspezifische Störeffekte durch neu synthetisierte K_{ATP} -Kanalliganden erfolgte zunächst durch zwei "Screening"-Versuche: hierzu zählten wie im vorangehenden Kapiteln sowohl vergleichende Versuche mit transfizierten HEK293-(SUR2B/Kir6.1)- bzw. CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen und deren Wildtyp-Zelllinien (Kap. A2.1), als auch Versuche zur Demaskierung unspezifischer Effekte durch die Blockade von K_{ATP}-Kanälen mit Glibenclamid an transfizierten Zellen (Kap. A2.2) jeweils für eine Konzentration von 25 μ M durchgeführt. Die Ergebnisse dieser beider Versuchstypen finden sich in den Tabellen A-5 bis A-14 gelistet. Für Substanzen mit einem relevanten unspezifischen Effekt wurde zur Bewertung dieses Effekts eine zusätzliche Dosiswirkungskurve erstellt.

A 2.3.1 Benzothiadiazin-Derivate

Stellvertretend für diese Substanzgruppe wurden insbesondere die Diazoxid-Derivate AF51 und AF41 in mehreren Konzentrationen untersucht. Abb. A4a demonstriert für AF51 in einer Konzentration von 25 μM an HEK293-WT-Zellen einen geringen unspezifischen Fluoreszenzeffekt von ca. 8 %, welcher durch die Blockade der K_{ATP}-Kanäle in Gegenwart von 10 μM Glibenclamid mit ca. 8.8 % Effekt an HEK293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen bestätigt wird; kleinere Konzentrationen von ca. 6.4 μM AF51 weisen bereits keinen unspezifischen Störeffekt mehr auf (Abb. A4b). Auch an CHO-Wildtyp- bzw. CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen war nur ein kleiner unspezifischer Effekt für eine Konzentration von 25 μM AF51 nachweisbar (Abb. A5).

Wie für AF51 konnten für beinahe alle Benzothiadiazine in der Konzentration von 25 µM nur geringe Effekte an HEK293- und CHO-Wildtyp-Zellen von vereinzelt bis zu 12 % gefunden werden. Das Diazoxid-Derivat AF41, substituiert mit einem Methyl-Phenylrest in Position 3', stellt eine Besonderheit dar: Abb. A6 demonstriert den unspezifischen Effekt von AF41 an HEK293-WT-Zellen, welcher mit etwa 32.3 % an HEK293-WT, 37.2 % an HEK293-(SUR2B/Kir6.1), 19.9 % an CHO-WT und 29.8 % an CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen jeweils zu den höchsten gemessenen unspezifischen Störeffekten (einhergehend mit einer Abnahme der Fluoreszenzintensität) aller untersuchten Substanzen zählt. Das strukturähnliche Derivat AF42 (ohne Brücken-C-Atom zwischen Thiadiazin-Ring und Phenyl-Rest) zeigte interessanterweise weder an HEK293-WT noch an CHO-WT-Zellen einen ausgeprägten unspezifischen Effekt. Die Messergebnisse aller untersuchter Benzothiadiazine sind in den Tabellen A-5 und A-6 dokumentiert.

Um die Auswirkung der unspezifischen Wirkungen auf bisher erhobene Ergebnisse näher zu bewerten, wurden für AF51 und AF42 zusätzlich neue Dosiswirkungskurven an HEK293(SUR2B/Kir6.1)-Zellen erstellt. Abb. A4b demonstriert das Vorgehen, die spezifische Wirkung unterschiedlicher Konzentrationen von AF51 jeweils in einem Messkanal mit Glibenclamid zu blockieren, während in einem Nachbar-Messkanal eines 12-well-strips der Mischeffekt aus spezifischer und unspezifischer Wirkung erfasst wird. Aus der für jede Konzentration erfassten Differenz beider Messergebnisse – im Sinne einer Abschätzung der mindestens vorhandenen spezifischen Wirkung – wurden Dosiswirkungskurven erstellt. Für AF51 wurde in dieser Untersuchungsreihe ein im Vergleich zur Vorevidenz höherer pEC₅₀-Wert erzielt, welcher in einer Nachmessung mit DyeB an HEK293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen (ohne Glibenclamidblockade) bis auf die zweite Nachkommastelle bestätigt wurde (Abb. A7; Tab. A-7). Durch die Nachmessung konnte zugleich gezeigt werden, dass geringe unspezifische Effekte (hier ca. 8 %) keinen Einfluss auf die Schätzung des pEC₅₀-Wertes haben, wenn dieser in einem Konzentrationsbereich liegt, welcher keine unspezifischen Effekte aufweist.

Umgekehrt wäre für AF41 als Extrembeispiel mit einem unspezifischem Effekt von ca. 30 % in einer Konzentration von 25 μ M eine drastische Veränderung des pEC₅₀-Wertes zu erwarten (Abb. A6). So führt die Einrechnung eines unspezifischen Effekts zu einer Änderung des pEC₅₀-Wertes um 0.3-Logeinheiten auf ca. 5.2 (-log M) (Abb. A7; Tab. A-7). Dieser Abfall der relativen Wirkstärke führt jedoch zu keiner Neubewertung der Substanz im Rahmen der vorliegenden Arbeit, da sie zum einen weiterhin durch eine moderat höhere relative Wirkstärke im Vergleich zu Diazoxid und hoher Selektivität (wahrscheinlich sogar unterschätzt hoher Selektivität aufgrund eines überschätzt hohen pEC₅₀-Wertes von AF41 an CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen) charakterisiert ist.

Zum anderen sei für die korrekte Interpretation der ermittelten pEC₅₀-Daten an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass es sich bei dem unter Glibenclamid-Blockade ermittelten unspezifischen Effekts nicht zwingend um einen additiven Effekt handeln muss, d.h. dass die Summe aus spezifischem und unspezifischem Effekt nicht den ohne Blockade ermittelten Effekt darstellt; vielmehr könnte es sich um überlagernde Effekte handeln, so dass die durchgeführte Differenzbildung den spezifischen Effekt am K_{ATP}-Kanal möglicherweise unterschätzt. So zeigt beispielsweise Abb. A6b für AF41 an HEK293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen eine Sättigung des Maximaleffektes von 12.5 und 25 μ M auf dem gleichen Signalniveau wie eine maximaleffektive Hyperpolarisation von 2 μ M Bimakalim, ohne dass hier erkennbar ist, dass sich beide Kurven um die zusätzliche unspezifischen Effekten als zu hoch bewertet wurde, so kann der in diesem Kapitel bestimmte pEC₅₀-Wert durch Annahme eines additiven Modells bei der Berechnung von pEC₅₀-Werten als zu gering bewertet werden; der "wahre" Wert ist wahrscheinlich zwischen beiden Schätzungen einzuordnen.



Abb. A4: Vergleich der Änderung der Fluoreszenzintensität des Diazoxid-Derivates AF51 an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen mit der an untransfizierten Wildtyp-Zellen und der an blockierten K_{ATP} -Kanälen im Membranpotential-Test mit DyeB.

Die hohe Konzentration von 25 μ M übt eine nicht-K_{ATP}-spezifische Wirkung aus (vgl. Wildtyp-Zellen mit den blockierten HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen). Diese Konzentration liegt allerdings wesentlich über der EC₅₀ von ca. 0.4 μ M, beeinflusst also die Abschätzung der Wirkung von AF51 nicht.



Abb. A5: Vergleich der Wirkung des Diazoxid-Derivates AF51 an CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen mit der an untransfizierten Wildtyp-Zellen und der an blockierten K_{ATP}-Kanälen im Membranpotential-Test mit DyeB.

AF51 übt in einer Konzentration von 25 µM einen submaximalen hyperpolarisatorischen Effekt aus. In Gegenwart einer Rezeptor-sättigenden Konzentration von Glibenclamid erscheint ein geringgradiger Störeffekt des Fluoreszenz-Lichtmessung in hyperpolarisatorischer Richtung. An Wildtyp-Zellen induziert die gleiche Konzentration einen geringgradigen Effekt in depolarisierender Richtung.





10 min

Abb. A6: Vergleich der Wirkung des Diazoxid-Derivates AF41 an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen mit der an untransfizierten Wildtyp-Zellen und der an blockierten K_{ATP}-Kanälen im Membranpotential-Test mit DyeB.

Steigende Konzentrationen > 1 µM üben sowohl an untransfizierten Wildtyp-Zellen als auch an blockierten K_{ATP}-Kanälen eine nicht-K_{ATP}-spezifische Wirkung aus. Benutzt man die <u>Differenz</u> der Membranpotential-Wirkung in Gegenwart und Abwesenheit von Glibenclamid zur Berechnung einer Dosiswirkungskurve, so ergibt sich eine pEC₅₀ von 5.21 ± 0.06 (n=4), vergleichbar mit dem mittels DiBAC₄(3) bestimmten pEC₅₀-Wert (5.55 ± 0.06; Tab.3-5). Allerdings hat das angewendete Differenz-Verfahren seine Limitationen: Die Wirkung hoher Konzentrationen (z.B. 25 µM, rosa), die mit hohen Störeffekten (i.e. nicht-K_{ATP}-spezifischer Wirkungen) behaftet sind, ergeben nach Korrektur eine geringere Membranpotential-Differenzwirkung als die mit einer kleineren Konzentration von 12.5 µM (hellblau) bestimmte Wirkung. Zugleich zeigen die Konzentrationen von 12.5 µM eine Sättigung auf Höhe der maximal-agonistischen Wirkung von Bimakalim ohne eine zusätzliche additive Wirkung durch den unter Glibenclamidblockade erhobenen unspezifischen Effekt.

Auffällig ist, dass die nicht- K_{ATP} -spezifische Wirkung von AF41 (substituiert mit Methyl-Phenyl) wesentlich größer war als die nicht- K_{ATP} -spezifische Wirkung (kaum nachzuweisen) von AF42 (substituiert mit Phenyl): Offenbar spielen die kondensierten Doppelbindungen, die den mit Methyl angekoppelten Phenylring mit dem aromatischen System der Grundsubstanz verbindet (i.e. AF41), die entscheidende Rolle für den rel. hohen Störeinfluss der Substanz (AF41) auf das Fluoreszenz-Lichtverfahren.

	Α		В		С		Δ: (C-B))
	Wildtyp E% ± SD (n)	SUR2B/Kir6 E% ± SD (n) Vorbehandlung 10 μM Glibencla	.1) mit umid	SUR2B/Kin E% ± SD (∙6.1 n)	SUR2B/Ki n E% ± SD (r 6.1 (n)
AF56	5.3 ± 0.6	(4)	4.6 ± 4.8	(3)	95.4 ± 1.0	(3)	90.8 ± 5.4	(3)
AF55	10.7 ± 3.9	(6)	19.2 ± 4.9	(5)	$98.9\ \pm 0.7$	(5)	79.7 ± 5.4	(5)
AF53	11.9 ± 1.7	(6)	17.5 ± 3.8	(5)	$97.2 \ \pm 0.8$	(5)	79.7 ± 3.6	(5)
AF51	8.1 ± 3.5	(16)	8.8 ± 4.5	(3)	97.8 ± 1.2	(3)	89.0 ± 4.1	(3)
AF49	7.6 ± 2.3	(8)	14.5 ± 4.3	(6)	95.2 ± 1.6	(6)	80.7 ± 4.5	(6)
AF39	-0.8 ± 1.8	(6)	-1.0 ± 1.2	(3)	70.7 ± 8.4	(3)	71.7 ± 7.9	(3)
AF38	6.6 ± 1.9	(4)	9.0 ± 4.8	(4)	72.5 ± 6.4	(4)	63.5 ± 2.5	(4)
AF45	9.9 ± 3.0	(10)	20.4 ± 1.5	(3)	$90.9 \hspace{0.1in} \pm 2.9$	(3)	70.5 ± 3.1	(3)
AF42	-0.1 ± 6.8	(4)						
AF41	32.3 ± 1.1	(6)	37.2 ± 1.3	(5)	94.6 ± 0.5	(5)	57.4 ± 1.8	(5)
AF54	5.3 ± 2.6	(6)	9.7 ± 2.0	(6)	93.2 ± 1.0	(6)	83.5 ± 1.8	(6)
AF57	8.8 ± 4.6	(8)	14.8 ± 3.1	(6)	93.2 ± 0.7	(6)	78.3 ± 2.9	(6)

Tab. A-5: Fluoreszenzeffekte (E%) von 25 μ M der Benzothiadiazin-Derivate an HEK293-Wildtyp- und HEK293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen

positive E%-Werte bedeuten einen Effekt im Sinne einer Hyperpolarisation; neg. i. S. einer Depolarisation

Tab. A-6: Fluoreszenzeffekte (E%) von 25 µM der Benzothiadiazin-Derivate an CHO-Wildtyp- und CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen

	A		В		С		Δ: (C-B)	
	$Wildtyp E\% \pm SD(n)$		SUR1/Kir6 E% ± SD (1 Vorbehandlung I μM Glibencl	5 .2 n) g mit lamid	SUR1/Kir6 . E% ± SD (n	.2	SUR1/Kir6 E% ± SD (r	.2 1)
AF56	2.2 ± 2.1	(4)	4.5 ± 3.5	(3)	80.0 ± 8.1	(3)	75.5 ± 10.6	(3)
AF55	5.4 ± 5.5	(8)	6.0 ± 3.6	(5)	58.7 ± 8.1	(5)	52.7 ± 5.0	(5)
AF53	3.6 ± 4.1	(6)	7.9 ± 5.0	(4)	64.0 ± 9.6	(4)	56.1 ± 8.6	(4)
AF51	-4.9 ± 6.0	(9)	5.9 ± 3.3	(5)	86.4 ± 3.5	(5)	80.5 ± 3.0	(5)
AF49	-11.6 ± 5.5	(4)	4.7 ± 5.8	(7)	7.7 ± 8.0	(7)	3.0 ± 2.7	(7)
AF39	-2.0 ± 6.8	(13)	-0.5 ± 4.0	(11)	-1.5 ± 6.8	(11)	-1.0 ± 6.7	(11)
AF38	-1.4 ± 0.7	(2)	6.1 ± 5.3	(7)	-4.8 ± 6.1	(7)	-11.0 ± 5.3	(7)
AF45	-5.4 ± 9.2	(10)	10.2 ± 3.9	(6)	25.0 ± 8.5	(6)	14.8 ± 9.3	(6)
AF42	-8.2 ± 5.8	(12)	-1.0 ± 3.8	(8)	18.6 ± 9.8	(8)	19.6 ± 7.3	(8)
AF41	19.9 ± 8.2	(7)	29.8 ± 4.4	(6)	35.0 ± 9.9	(6)	5.1 ± 6.8	(6)
AF54	-3.3 ± 7.3	(14)	$0.8\ \pm 3.6$	(6)	76.4 ± 1.3	(6)	75.7 ± 3.1	(6)
AF57	-11.5 ± 2.6	(7)	6.8 ± 4.0	(4)	-3.0 ± 7.6	(4)	-9.8 ± 4.1	(4)

positive E%-Werte bedeuten einen Effekt im Sinne einer Hyperpolarisation; neg. i. S. einer Depolarisation



Abb. A7: Dosiswirkungskurven für die Hyperpolarisation: Evaluation des Glibenclamid-Differenzverfahrens

a) Die nicht-lineare Regressionsanalyse normierter Fluoreszenzeffekte von AF51 abzüglich eines unter Blockadewirkung von 10 μ M Glibenclamid ermittelten Effekts (F_s = F_{tot} - F_{ns}) von n=3 Experimenten (d.h. n=3 je abgebildeter Konzentration) an HEK293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen nach Gl. 17 ergab für eine normsteile Dosiswirkungskurve einen pEC₅₀-Wert von 6.51 ± 0.04 (-log M).

b) Die nicht-lineare Regressionsanalyse normierter Fluoreszenzeffekte von AF51 *ohne* Berücksichtigung unspezifischer Effekte (F_{tot}) ergab einen pEC₅₀-Wert von 6.51 ± 0.05 (-log M).

c) Die nicht-lineare Regressionsanalyse normierter Fluoreszenzeffekte von AF41 abzüglich eines unter Blockadewirkung von 10 μ M Glibenclamid ermittelten Effektes ($F_s = F_{tot} - F_{ns}$) von n=3 Experimenten (d.h. n=3 je abgebildeter Konzentration) an HEK293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen nach Gl. 17 ergab für eine normsteile Dosiswirkungskurve einen pEC₅₀-Wert von 5.21 ± 0.03 (-log M).

	DyeB- Membranpotentia	almessung ^a	DiBAC ₄ (3)-Membranpotent	ialmessung
			Daten wurden Tab. 3-5 (Spalte	B) entnommen
	pEC ₅₀ (-log M)	(n)	pEC ₅₀ (-log M)	(n)
	p (Hill slope) = 1		p (Hill slope)	
AF51	6.51 ± 0.04	(3)	6.09 ± 0.02 ^b	(6)
			1.42 ± 0.07	
AF41	5.21 ± 0.03	(4)	5.55 ± 0.03	(6)
			1.25 ± 0.09	

Tab. A-7: Vergleich der pEC $_{50}$ -Werte von DyeB- und DiBAC₄(3)-Membranpotential-Tests der Benzothiadiazin-Derivate AF51 und AF41

^a Auswertung einer normsteilen Dosiswirkungskurve mittels nicht-linearer Regressionsanalyse nach Gl. 17 auf der Datengrundlage K_{ATP} -Kanal-spezifischer mit dem Glibenclamid-Differenzverfahren erhobener Fluoreszenzeffekte ($F_s = F_{tot} - F_{ns}$).

^b Aufgrund der Differenz von 0.4 Log-Einheiten zur Vorevidenz wurde eine Nachmessung der Dosiswirkungskurve an gleichen Zellen und gleicher Substanz (ohne Berücksichtigung unspezifischer Effekte) durchgeführt und für eine normsteile Dosiswirkungskurve ein pEC₅₀-Wert von 6.51 ± 0.05 (-log M) (n=3) geschätzt.

A 2.3.2 Benzofuran-Derivate

Im Vergleich zu den Benzothiadiazinen stellen die Benzofurane mit ihrer geringen relativen Wirkstärke eine deutlich kritischere Substanzgruppe dar. Die Mehrzahl der untersuchten Benzofurane (DSL141, DSL186, DSL238, DSL184, DSL187, DSL181 und DSL217) zeigen einen niedrigen unspezifischen Effekt (< 10%) in der Fluoreszenzmessung an HEK293- und CHO-WT. Die ausgeprägtesten unspezifischen Effekte im Sinne einer Abnahme der Fluoreszenzintensität zeigen die beiden bromierten Benzofurane DSL184 bzw. DSL187 mit ca. 20 bis 30 % sowie das Benzofuran DSL262 (mit einer Trifluoromethyl-Gruppe in Position 5') mit ca. 20-25 % Störwirkung.



10 min

Abb. A8: Vergleich der Änderung der Fluoreszenzintensität des Benzofurans DSL190 an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen mit der an untransfizierten Wildtyp-Zellen und der an blockierten K_{ATP}-Kanälen im Membranpotential-Test mit DyeB.

Die Applikation des Benzofurans DSL190 führt übereinstimmend an a) HEK293-Wildtyp- und an b) HEK293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen mit blockierten K_{ATP}-Kanälen zu einer unspezifischen Zunahme der Fluoreszenzintensität. Trotz dieses Störeffekts ergab die mit dem Differenzverfahren (in Gegenwart und Abwesenheit von Glibenclamid) ermittelte (partielle) Dosiswirkungskurve für Effekte < 25 μ M eine pEC₅₀ von 4.64 \pm 0.05 (-log M), die vergleichbar mit dem mit DiBAC₄(3) bestimmten pEC₅₀-Wert (4.72 \pm 0.04 -log M; Tab. 3-7) ist.

Eine deutliche Zunahme (von bis zu ca. 35 %) der Fluoreszenzintensität wurde für das Benzofuran DSL190 an allen untersuchten Zelllinien beobachtet. Für diesen unspezifischen Effekt zeigt Abb. A8 eine Besonderheit im Vergleich zu anderen gefundenen unspezifischen Effekten (mit Abnahme der Fluoreszenzintensität): die Fluoreszenzintensität des durch Bimakalim oder NNC414 maximal-hyperpolarisierenden Stimulus ist stets um den gleichen absoluten Betrag des unspezifischen Effekts nach oben verschoben. Auch für DSL189 konnte dieser Effekt an CHO-WT-Zellen gefunden werden, jedoch an CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen nur deutlich abgeschwächt. An HEK293-WT-Zellen fand sich dieser Effekt nicht (Abb. A9), während er an HEK293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen vereinzelt erneut auftrat. Um eine Bewertung der gefundenen unspezifischen Wirkungen vorzuneh-

men, wurden analog zu Kap. A3.1.1 auch für ausgewählte Benzofuran-Derivate normsteile, extrapolierte Dosiswirkungskurven an HEK293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen erstellt, in denen der unter Blockadewirkung von 10 μ M Glibenclamid gemessene Fluoreszenzeffekt berücksichtigt wird (Abb. A10, Tab. A-10). Sowohl für die Benzofuran-Derivate DSL141, DSL186, DSL177 als auch für die Derivate DSL189 und DSL 190 konnten die in Tabelle 3-7 mittels DiBAC₄(3)-Membranpotentialmessung ermittelten pEC₅₀-Werte annähernd bestätigt werden. Für die Derivate DSL184 und DSL187, beide mit einem Bromatom in Position 5' substituiert, wurde ein deutlich um eine Logeinheit geringerer pEC₅₀-Wert gefunden.



Abb. A9: Vergleich der Änderung der Fluoreszenzintensität des Benzofurans DSL189 an HEK293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen mit der an untransfizierten Wildtyp-Zellen und der an blockierten K_{ATP}-Kanälen im Membranpotential-Test mit DyeB.

Übereinstimmend an Wildtyp- und an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen mit blockierten K_{ATP}-Kanälen übt das Benzofuran DSL189 nur einen geringen Störeinfluss auf die Fluoreszenzmessung aus. Die mit dem Differenz-Verfahren (in Gegenwart und Abwesenheit von Glibenclamid) ermittelte (partielle) Dosiswirkungskurve für Effekte < 25 μ M ergab eine pEC₅₀ von 4.65 ± 0.12, die vergleichbar ist mit dem mit DiBAC₄(3) bestimmten pEC₅₀-Wert (4.8 ± 0.03; Tab.3-7).

Auffällig war, dass das Derivat DSL190 (Substitution mit tert-Butyl anstelle von n-Butyl in DSL189) die Fluoreszenz-Lichtmessung stärker stört, indem es offensichtlich selbst zur Fluoreszenz beiträgt (s. Tab. A-9).

	Α		В		С		Δ: (C-B)	
	Wildtyp $E\% \pm SD(n)$		SUR2B/Kir6 E% ± SD (n Vorbehandlung 10 μM Glibencl	5.1) mit amid	SUR2B/Kir6.1 E% ± SD (n)		SUR2B/Kir6 E% ± SD (n	5.1 1)
DSL141	7.7 ± 4,6	(4)	6.7 ± 3.6	(5)	55.7 ± 7.1	(5)	49.0 ± 6.2	(5)
DSL186	7.3 ± 2,3 (11)	8.3 ± 3.6	(6)	45.4 ± 7.4	(6)	37.1 ± 6.8	(6)
DSL189	-1.9 ± 4.5	(9)	-13.4 ± 6.4	(3)	56.6 ± 13.8	(3)	69.9 ± 19.2	(3)
DSL190	$-24.3 \pm 5,0$	(5)	-30.9 ± 9.0	(4)	64.4 ± 11.5	(4)	95.4 ± 19.4	(4)
DSL184	20.8 ± 4,8	(7)	18.2 ± 5.8	(4)	42.7 ± 9.3	(4)	24.6 ± 8.8	(4)
DSL187	19.2 ± 4.8	(7)	$30.5\ \pm7.6$	(3)	51.8 ± 6.9	(3)	21.5 ± 2.2	(3)
DSL181	-5.8 ± 1.8	(4)	-6.4 ± 2.3	(5)	3.4 ± 4.2	(5)	9.8 ± 5.7	(5)
DSL217	5.8 ± 3,2	(8)	13.1 ± 5.2	(7)	29.9 ± 4.5	(7)	16.7 ± 3.4	(7)
DSL177	$0.3 \pm 1,6$	(4)	5.0 ± 2.9	(8)	35.5 ± 10.1	(8)	30.6 ± 7.7	(8)
DSL262	14.9 ± 4.6	(8)	18.3 ± 3.0	(3)	49.6 ± 3.9	(3)	31.3 ± 4.1	(3)

Tab. A-8: Fluoreszenzeffekte (E%) von 25 μ M der Benzofuran-Derivate an HEK293-Wildtyp- und HEK293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen

positive E%-Werte bedeuten einen Effekt im Sinne einer Hyperpolarisation; neg. i. S. einer Depolarisation

Tab. A-9: Fluoreszenzeffekte (E%) von	25 µM der Benzofuran	-Derivate an CHO-Wild	typ- und CHO-
(SUR1/Kir6.2)-Zellen			

	Α		В		С		Δ: (C-B)	
	Wildtyp E% ± SD (n)		SUR1/Kir6. E% ± SD (n Vorbehandlung 1 μM Glibencla	2) mit amid	SUR1/Kir6.2 E% E ± SD (n)	SUR1/Kir6. E% ± SD (n	2
DSL141	-2.3 ± 7.1	(4)	6.7 ± 7.5	(8)	-0.3 ± 9.7	(8)	-7.0 ±13.4	(8)
DSL186	-3.3 ± 5.3	(17)	$6.8\ \pm 0.6$	(3)	8.7 ± 7.5	(3)	1.9 ± 7.5	(3)
DSL189	-29.9 ± 5.6	(8)	-5.8 ± 4.2	(4)	4.5 ± 7.8	(4)	10.3 ± 6.8	(4)
DSL190	-35.6 ± 8.0	(8)	-13.3 ± 5.2	(4)	13.8 ± 8.8	(4)	27.1 ± 11.2	(4)
DSL238	3.4 ± 2.7	(4)	-		2.1 ± 1.0^{a}	(6)	-	
DSL184	8.3 ± 4.1	(8)	$28.5~\pm 6.4$	(7)	17.5 ± 10.4	(7)	-11.0 ± 13.9	(7)
DSL187	4.7 ± 4.2	(8)	$26.9~\pm7.4$	(5)	23.0 ± 7.2	(5)	-3.9 ± 6.8	(5)
DSL181	-11.7 ± 6.0	(12)	-4.7 ± 5.8	(3)	2.5 ± 11.3	(3)	7.2 ± 5.4	(3)
DSL217	2.3 ± 4.2	(9)	11.5 ± 3.3	(4)	10.7 ± 5.0	(4)	-0.8 ± 2.9	(4)
DSL177	0.5 ± 8.3	(4)	9.0 ± 7.0	(6)	-8.7 ± 11.3	(6)	-17.7 ± 17.6	(6)
DSL262	5.0 ± 3.8	(10)	25.4 ± 6.3	(4)	14.2 ± 13.0	(4)	-11.2 ± 10.8	(4)

positive E%-Werte bedeuten einen Effekt im Sinne einer Hyperpolarisation; neg. i. S. einer Depolarisation ^a Tab. 3-7 entnommen



Abb. A10: Dosiswirkungskurven von Benzofuran-Derivaten für die Hyperpolarisation unter Berücksichtigung unspezifischer Effekte.an HEK293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen.

Die Ergebnisse der nicht-linearen Regressionsanalyse normierter Fluoreszenzeffekte von Benzofuranderivaten abzüglich eines unter Blockadewirkung von 10 μ M Glibenclamid ermittelten Effekts (F_s = F_{tot} - F_{ns}) an HEK293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen nach GI. 17 unter der Annahme einer normsteilen Dosiswirkungskurve können Tab. A-10 entnommen werden.

	DyeB-Membranpotentia	lmessung ^a	DiBAC ₄ (3)-Membranpotentialmessung		
			Daten wurden Tab. 3-7 (Spalte B) entnommen	
	pEC ₅₀ (-log M)	(n)	pEC ₅₀ (-log M)	(n)	
	p (Hill slope) = 1		p (Hill slope)		
DSL141	4.49 ± 0.10	(4)	4.58 ± 0.02	(6)	
			1.16 ± 0.06		
DSL186	4.44 ± 0.07	(4)	4.65 ± 0.02	(6)	
			0.90 ± 0.04		
DSL189	4.65 ± 0.06	(6)	4.81 ± 0.03	(6)	
			1.04 ± 0.08		
DSL190	4.64 ± 0.05	(5)	4.72 ± 0.04	(6)	
			1.49 ± 0.16		
DSL184	3.93 ± 0.07	(4)	4.92 ± 0.04	(6)	
			$0.98 \hspace{0.1 cm} \pm 0.10$		
DSL187	4.12 ± 0.07	(4)	4.94 ± 0.04	(6)	
			0.81 ± 0.07		
DSL217	4.04 ± 0.10	(4)	4.55 ± 0.05	(6)	
			0.94 ± 0.11		
DSL177	4.36 ± 0.04	(4)	4.33 ± 0.03	(6)	
			1.24 ± 0.11		

Tab. A-10: Vergleich der pEC $_{50}$ -Werte von DyeB- und DiBAC₄(3)-Membranpotential-Tests ausgewählter Benzofuran-Derivate

^a Auswertung einer normsteilen Dosiswirkungskurve mittels nicht-linearer Regressionsanalyse nach Gl. 17 auf der Datengrundlage K_{ATP}-Kanal-spezifischer mit dem Glibenclamid-Differenzverfahren erhobener Fluoreszenzeffekte ($F_s = F_{tot} - F_{ns}$).

A 2.3.3 Benzothiophen-Derivate

Insbesondere an HEK293-WT-Zellen wurden sowohl für DSL176 als auch DSL180 unspezifische Effekte > 10 % gefunden (Abb. A11; Tab. A-11); an CHO-WT dagegen nur etwa 5% (Tab. A-12). Dennoch bestätigten normsteile, extrapolierte Dosiswirkungskurven die pEC₅₀-Wertlage beider Substanzen an beiden transfizierten Zelllinien, auch wenn der pEC₅₀-Wert von DSL176 um 0.2 Logeinheiten niedriger geschätzt wurde (Abb A12; Tab. A-13).



Abb. A11: Vergleich der Wirkung des Benzothiophen-Derivats DSL180 an HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen mit der an untransfizierten Wildtyp-Zellen und der an blockierten K_{ATP} -Kanälen im Membranpotential-Test mit DyeB.

Höhere Konzentrationen von DSL180 (12.5 und 25 μ M) stören die Fluoreszenz-Lichtmessung sowohl in Wildtyp- als auch in HEK 293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen mit blockierten K_{ATP}-Kanälen. Benutzt man die *Differenz* der Membranpotential-Wirkung in Gegenwart und Abwesenheit von Glibenclamid zur Berechnung einer partiellen Dosiswirkungskurve, so ergibt sich eine pEC₅₀ von 4.77 ± 0.06 (n=4), die nicht unterscheidbar ist von dem mit DiBAC₄(3) bestimmten pEC₅₀-Wert (4.80 ± 0.03; Tab.3-5).



Abb. A12: Dosiswirkungskurven der Benzothiophen-Derivate DSL176 und DSL180 für die Hyperpolarisation unter Berücksichtigung unspezifischer Effekte an HEK293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen durch Blockade der K_{ATP}-Kanäle mit 10 μ M Glibenclamid (F_s = F_{tot} - F_{ns}).

Tab. A-11: Fluoreszenzeffekte (E%) von 25 μ M der Benzothiophen-Derivate an HEK293-Wildtyp- und HEK293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen

	Α	В	С	Δ: (C-B)
	Wildtyp $E\% \pm SD(n)$	SUR2B/Kir6.1 E% ± SD (n) Vorbehandlung mit 10 μM Glibenclamid	SUR2B/Kir6.1 E% ± SD (n)	SUR2B/Kir6.1 E% ± SD (n)
DSL176	10.3 ± 2.8 (10)	7.6 ± 6.0 (5)	60.5 ± 1.5 (5)	52.9 ± 6.9 (5)
DSL180	16.4 ± 2.7 (12)	20.5 ± 3.0 (6)	68.9 ± 2.4 (6)	48.3 ± 3.8 (6)

positive E%-Werte bedeuten einen Effekt im Sinne einer Hyperpolarisation; neg. i. S. einer Depolarisation

Tab. A-12: Fluoreszenzeffekte (E%) von 25 μ M der Benzothiophen-Derivaten an CHO-Wildtyp- und CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen

	Α	В	С	∆: (C-B)
	Wildtyp $E\% \pm SD(n)$	SUR1/Kir6.2 E% ± SD (n) Vorbehandlung mit 1 μM Glibenclamid	SUR1/Kir6.2 E% E ± SD (n)	SUR1/Kir6.2 E% ± SD (n)
DSL176	5.0 ± 3.8 (10)	16.4 ± 3.3 (5)	15.7 ± 3.4 (5)	0.7 ± 2.1 (5)
DSL180	6.3 ± 5.0 (12)	28.2 ± 6.2 (6)	35.7 ± 5.2 (6)	7.5 ± 4.6 (6)

positive E%-Werte bedeuten einen Effekt im Sinne einer Hyperpolarisation; neg. i. S. einer Depolarisation

	DyeB-Membranpotentia	lmessung ^a	DiBAC ₄ (3)-Membranpoter Daten wurden Tab. 3-9 (Spalte	ntialmessung e B) entnommen
	$pEC_{50} (-log M)$ p (Hill slope) = 1	(n)	pEC ₅₀ (-log M) p (Hill slope)	(n)
DSL176	4.59 ± 0.04	(5)	$\begin{array}{rr} 4.81 & \pm \ 0.03 \\ 1.28 & \pm \ 0.10 \end{array}$	(9)
DSL180	4.77 ± 0.07	(5)	$\begin{array}{rrr} 4.80 & \pm 0.03 \\ 1.05 & \pm 0.06 \end{array}$	(6)

Tab. A-13: Vergleich der pEC_{50} -Werte von DyeB- und $DiBAC_4(3)$ -Membranpotential-Tests ausgewählter Benzothiophen-Derivate

^a Auswertung einer normsteilen Dosiswirkungskurve mittels nicht-linearer Regressionsanalyse nach Gl. 17 auf der Datengrundlage K_{ATP} -Kanal-spezifischer mit dem Glibenclamid-Differenzverfahren erhobener Fluoreszenzeffekte ($F_s = F_{tot} - F_{ns}$).

A 2.3.4 Benzothiazol-Derivate

Für Benzothiazol-Derivate wurden bereits in ersten Versuchen mit DiBAC₄(3) ausgeprägte Störungen gefunden, welche dazu führten, dass zunächst eine Kompetitionsbindung mit dem Radioliganden [³H]-P 1075 an HEK293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen durchgeführt wurde. Diese klassifizierte die Substanzen DSL203, DSL202, DSL208, AF33, AF35, AF20 und AF22 für den SUR2B/Kir6.1-K_{ATP}-Kanal als niederaffin (pEC₅₀ < 4.3 -log M). Für Messungen an CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen wurden Membranpotentialmessungen mit DyeB jeweils für die Substanzkonzentration von 25 μ M durchgeführt und nur geringe Effekte CHO-(SUR1/Kir6.2) gefunden, welche zum größten Teil unspezifischen Ursprungs sind (Tab. A-12). DSL203, DSL202, DSL208, AF33, AF35, AF20 und AF22 können somit als niederaffin sowohl an HEK293-(SUR2B/6.1)- als auch CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen charakterisiert werden.

Für die Thiazol-Derivate AF48, AF75 und AF78 konnten keine ausgeprägten unspezifischen Effekte an CHO-Wildtyp-Zellen festgestellt werden (Tab. A-12).

	Α	В	С	∆: (C-B)
	Wildtyp	SUR1/Kir6.2	SUR1/Kir6.2	SUR1/Kir6.2
	$E\% \pm SD(n)$	$E\% \pm SD(n)$	$E\% \pm SD(n)$	$E\% \pm SD(n)$
		Vorbehandlung mit		
		1 µM Glibenclamid		
DSL203	4.1 ± 2.5 (4)	13.0 ± 5.0 (6)	16.9 ± 5.1 (6)	4.0 ± 6.7 (6)
DSL202	-1.2 ± 3.1 (4)	4.2 ± 3.5 (6)	18.1 ± 3.9 (6)	13.9 ± 5.2 (6)
DSL208	32.9 ± 8.3 (3)	33.2 ± 7.2 (7)	30.1 ± 9.0 (7)	-3.1 ± 5.9 (7)
AF33	-21.3 ± 2.5 (4)	-6.5 ± 8.0 (5)	-26.7 ± 9.0 (5)	-20.1 ± 5.3 (5)
AF35	-26.8 ± 5.0 (4)	-21.6 ± 5.5 (6)	-33.1 ± 4.0 (6)	-11.6 ± 4.8 (6)
AF20	3.7 ± 3.2 (6)	9.0 ± 8.9 (4)	23.0 ± 10.3 (4)	14.0 ± 2.6 (4)
AF22	-7.4 ± 1.0 (2)	-7.9 ± 4.0 (3)	-7.1 ± 2.8 (3)	0.7 ± 3.5 (3)
AF48	-6.8 ± 1.7 (4)	-	5.4 ± 2.1 ^a (12)	-
AF75	2.4 ± 2.0 (5)	3.0 ± 3.5 (3)	-4.4 ± 20.5 (3)	-7.45 ± 22.1 (3)
AF78	-11.4 ± 8.2 (3)	-	$2.5 \pm 5.2.^{a}$ (12)	-

Tab. A-14: Fluoreszenzeffekte (E%) von 25 μ M der Benzothiazol-Derivate an CHO-Wildtyp- und CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen

positive E%-Werte bedeuten einen Effekt im Sinne einer Hyperpolarisation; neg. i. S. einer Depolarisation ^a Tab. 3-11 entnommen

A 4 Zusammenfassung der Kontrollversuche

Die in diesem Anhang dokumentierte Nachuntersuchung der Fluoreszenz-Wirkung der neuen K_{ATP}-Kanal-Liganden an transfizierten und nicht transfizierten Zellen machte sich die Tatsache zu Nutze, dass zwischenzeitlich in unserem Labor eine größere Zahl von DyeB-fähigen Fluoreszenz-Messmaschinen entwickelt worden war, die die überlegene Membranpotential-Messung von DyeB nutzt.

An den korrespondierenden Wildtyp-Zellen der in der vorliegenden Arbeit verwendeten HEK293-(SUR2B/Kir6.1)- bzw. CHO-(SUR1/Kir6.2)-Zellen konnten selbst potente K_{ATP}-Kanalöffner (Bimakalim, P1075, NNC414) in maximaleffektiver Konzentration keine relevante Änderung (< 1% für 2 µM Bimakalim bzw. 20 µM P1075; \leq 3% für 20 µM NNC414) der Fluoreszenzintesität und somit auch keine relevante Änderung des Membranpotentials bewirken. Eine relevante Störung der Messung von Membranpotentialänderungen durch eine endogene Expression von K_{ATP}-Kanälen – auch hinsichtlich einer isolierten Betrachtung für Wirkeffekte an einem spezifschen K_{ATP}-Kanalsubtyp – kann somit ausgeschlossen werden.

Die überwiegende Mehrzahl der neu synthetisierten K_{ATP} -Kanalagonisten zeigte sowohl an Wildtyp-Zelllinien, als auch an mit Glibenclamid blockierten K_{ATP} -Kanälen der transfizierten Zellen, keine bis nur gering ausgeprägte unspezifische Effekte. Für Substanzen mit relevantem Störeffekt (und zumeist niedriger Affinität) wurden zur besseren Beurteilung Dosiswirkungskurven erstellt, in denen der unspezifische Effekt an transfizierten Zellen (unter Blockadewirkung von 10 μ M Glibenclamid) berücksichtigt wurde. Die bereits mit DiBAC₄(3) ermittelten pEC₅₀-Werte konnten selbst für Substanzen mit relativ ausgeprägtem unspezifischem Effekt annähernd bestätigt werden (AF41, DSL190). Allein für zwei Substanzen, die bromierten Benzofuran-Derivate DSL184 und DSL187 musste die Schätzung der pEC₅₀-Werte um eine Log-Einheit nach unten korrigiert werden; ein Ergebnis, welches bereits im Vorfeld erwartet und entsprechend annotiert wurde.

Zusammenfassend konnten in den durchgeführten Nachuntersuchungen keine unspezifischen Effekte gefunden werden, welche eine Neuinterpretation der bereits mit DiBAC₄(3)-Membranpotentialmessung erhobenen Daten, in Hinblick auf die Charakterisierung der Wirkung der in der vorliegenden Arbeit neu synthetisierten Substanzen an CHO-(SUR1/Kir6.2)- bzw. HEK293-(SUR2B/Kir6.1)-Zellen, erforderlich gemacht hätten.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Horst Lemoine möchte ich für die Möglichkeit zur Bearbeitung der Themenstellung sowie die hervorragende, engagierte Betreuung bei der Durchführung der Arbeit ganz herzlich danken. Darüber hinaus gilt ihm mein Dank für die unermüdliche Hilfs- und Diskussionsbereitschaft auf fachlicher wie menschlicher Ebene.

Prof. Dr. Manfred Braun (Institut für Organische Chemie und Makromolekulare Chemie I), Dr. Stefan Lachenicht und Dipl. Chem. Andreas Fischer danke ich für die sehr gute Zusammenarbeit, die Synthese der Testsubstanzen der vorliegenden Arbeit, sowie fachliche Diskussionen.

Mein besonderer Dank gilt Dagmar Grittner für die hervorragende Einarbeitung in die praktische Labortätigkeit, die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung unzähliger Radioligandbindungsexperimente der vorliegenden Arbeit.

Herrn Dipl. Ing. Achim Rood möchte ich für die freundliche technische Unterstützung und Entwicklung der 12-Kanal-Fluoreszenzmessgeräte danken.

Herrn Christopher Oldenhage gilt mein Dank für die Unterstützung bei der Auswertung der Experimente und die freundschaftliche Motivation.

Herrn Karsten Rauhaus danke ich für die kompetente Hilfe in allen Belangen der EDV und statistischen Auswertung sowie die ständige Bereitschaft zur konstruktiven Diskussion.

Außerdem danke ich Stephanie Brauckmann, Martin Kleine, Friederike Oberle, Edina Pajevic, Christoph Teschner, Irina Wechsler und Thomas Wrobel für die hervorragende Zusammenarbeit, beste Arbeitsatmosphäre und (teils) fachliche Diskussionen.

Ich danke allen Kollegen und Freunden, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Ort, Datum

Claas Schmidt