FUNKTION UND REGULATION VON ANIONENTRANSPORTSYSTEMEN IM SARCOPLASMATISCHEN RETICULUM

INAUGURALDISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER NATURWISSENSCHAFTEN

VORGELEGT AM FACHBEREICH

CHEMISCHE UND PHARMAZEUTISCHE WISSENSCHAFTEN

DER

JOHANN WOLFGANG GOETHE UNIVERSITÄT

VON

ACHIM SCHUSTER

aus Mönchengladbach

FRANKFURT AM MAIN 2001

DF1

Vom Fachbereich 14 "Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften" der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan:	Prof. Dr. J. Engels
Gutachter:	Prof. Dr. Dr. H. Fasold Prof. Dr. B. Ludwig
Datum der Disputation:	26. April 2001
Prüfer:	Prof. Dr. Dr. H. Fasold Prof. Dr. B. Ludwig Prof. Dr. Th. Dingermann Prof. Dr. D. Steinhilber

Die Zeit wird kommen, wenn eifriges Forschen über lange Zeiträume hinweg Dinge ans Licht bringt, die jetzt noch verborgen liegen. Das Leben eines Menschen, auch wenn er es ganz dem Himmel widmete, reichte nicht aus, ein so weites Feld zu ergründen... Und so wird sich die Kenntnis davon nur über Generationen hinweg entfalten. Es wird aber auch eine Zeit kommen, wenn unsere Nachfahren staunen, daß wir Dinge, die ihnen so einfach erscheinen, nicht wussten... Viele Entdeckungen aber sind künftigen Jahrhunderten vorbehalten, wenn wir längst vergessen sind. Unser Universum wäre betrüblich unbedeutend, hätte es nicht jeder Generation neue Probleme zu bieten... Die Natur gibt ihre Geheimnisse nicht ein für allemal preis.

(Seneca)

1	EINLEITUNG	1
11	BIOLOCISCHE MEMDANEN UND MEMDANTDANSDODT	1
1.1	DIOLOGISCHE MIEMBRANEN UND MEMBRANI KANSPORI	1
1.1.1	CARRIER Ionenizanäle	1
1.1.2	IONENNANALE Komdartimentiedung der eukarvontiggnen Zeille	1
1.2	DAG SADCODIAGMATISCHE DETICHULM (SD)	3
1.2.1	DAS SARCOPLASMATISCHE RETICULUM (SR)	5
1.3	AUFBAU UND FUNKTION DES SKELETIMUSKELS	0
1.3.1	DIE ERREGUNGS-KONTRAKTIONS-KOPPLUNG (EKK)	/
1.4	RYANODIN-REZEPTOR UND CALCIUM RELEASE	ð
1.4.1	R-TYPCA -RELEASE-KANAL	8
1.4.2	L-TYP CA ⁻⁺ -RELEASE-KANAL	10
1.4.3	ELEKTROOSMOTISCHE NEUTRALITAT DER ERREGUNGS-KONTRAKTIONS-KOPPLUNG	10
1.5	WEITERE IONENKANALE DES SARCOPLASMATISCHEN RETICULUMS	10
1.5.1	KATIONENKANÄLE	10
1.5.2	ANIONENKANÄLE	11
1.5.2.	1 'Big Chloride Channel' (BCl)	11
1.5.2.2	2 'Small Chloride Channel' (SCl)	12
1.5.2.	3 'Voltage Dependent Anion Channel' (VDAC)	12
1.5.2.4	4 Weitere Anionenkanäle der SR-Membran	13
1.5.2.	5 Lokalisation und Häufigkeit der Anionenkanäle der SR-Membran	13
1.6	ZIELSETZUNG	14
2	ERGEBNISSE	15
2.2	ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON SR-VESIKELN	15
2.2.1	ISOLIERUNG DER SR-VESIKEL	15
2.2.2	ANALYSE DER PROTEINZUSAMMENSETZUNG NACH GELELEKTROPHORETISCHER	
	Auftrennung	16
2.2.3	PRÄPARATIONSANALYSE ANHAND DER HYDROLYSEAKTIVITÄT DER CA ²⁺ -ATPASE	16
2.2.4	PRÄPARATIONSANALYSE ANHAND DES ATP-STIMULIERTEN CALCIUMTRANSPORTS	17
2.2.5	AUFTRENNUNG DER VESIKELPRÄPARATION IN HSR UND LSR	18

2.3 CHARAKTERISIERUNG, MODIFIKATION UND OPTIMIERUNG DER ANIONENKANALMESSUNGEN MIT DER FILTERASSAYMETHODE 19

2.3.1 ANIONENKANALMESSU	NGEN	19
2.3.1.1 Vesikelfluxmessunger	n mit der Filterassay-Methode	19
2.3.1.2 Einzelkanalmessunger	n mit der PLB-Technik	20
2.3.2 DURCHFÜHRUNG DES F	ILTERASSAYS	20
2.3.3 AUSWERTUNG DER KIN	ETISCHEN PARAMETER DES FILTERASSAYS	21
2.3.4 BELADUNG DER VESIKI	EL DURCH VORINKUBATION	24
2.3.4.1 Variation der SR-Prot	ein-Konzentration	25
2.3.5 BELADUNG DER VESIKI	EL DURCH EXTRUSION	25
2.3.6 Optimierung des Filt	ERASSAYS	26
2.3.6.1 Standardapplikation		27
2.3.6.2 Einsatz der Step-Pipet	te	27
2.3.7 ANPASSUNG DER VERS	UCHSBEDINGUNGEN DER VESIKELFLUXEXPERIMENTE AN DIE	
PLB-BEDINGUNGEN		28
2.4 SULFAT-EFFLUXEXPE	RIMENTE	29
2.4.1 DER EINFLUSS VERSCH	IEDENER KATIONEN AUF DEN [³⁵ S]SULFATFLUX	29
2.4.1.1 Calcium		29
2.4.1.2 Magnesium		30
2.4.1.3 Cholinchlorid		31
2.4.2 UNTERSUCHUNG DIVER	SER HEMMSTOFFE AUF IHRE WIRKUNG AUF DEN	
[³⁵ S]Sulfat-Efflux		32
2.4.2.1 Ca ²⁺ -ATPase und Ani	onentransport	32
2.4.2.2 Einfluss von PPAPS,	PPANS und PPAC auf den [³⁵ S]Sulfat-Efflux	35
2.4.2.3 Wirkung der Polyanio	nen Polyaspartat und Polydextransulfat	37
2.4.2.4 Picrotoxin und Strych	nin	37
2.4.3 RYANODINREZEPTOR U	ND ANIONENTRANSPORT	37
2.4.3.1 Ryanodin		38
2.4.3.2 Suramin		39
2.4.3.3 Rutheniumrot		41
2.4.3.4 Coffein		42
2.4.3.5 Atractylosid		43
2.4.4 UNTERSUCHUNG DER W	VIRKUNG VON NUKLEOTIDEN AUF DEN [³⁵ S]SULFAT-FLUX	44
2.4.4.1 Einfluss von ATP auf	den [³⁵ S]Sulfat-Efflux	44
2.4.4.1.1 Einfluss der Vorinl	kubation mit ATP auf den Hemmeffekt	45
2.4.4.1.2 ATP-Hemmung un	ter Einfluss von Cholinchlorid	45

2.4.4.2	2 Einfluss von GTP auf den [³⁵ S]-Sulfat-Efflux	46
2.4.4.	3 Uridintriphosphat (UTP) und Cytosintriphosphat (CTP)	47
2.4.4.4	4 Das Nukleotidanalogon AMP-PNP	47
2.4.4.:	5 Diadenosinpolyphosphate	48
2.4.4.	6 Polyphosphate	49
2.5	METABOLISIERUNG VON NUKLEOTIDEN DURCH SR-PROTEINE	51
2.5.1	METABOLISIERUNG VON ATP	51
2.5.2	VERGLEICH DER METABOLISIERUNG VON ATP UND GTP	53
2.6	Sulfat-Influxexperimente	55
2.6.1	WIRKUNG VERSCHIEDENER LIGANDEN AUF DEN [35 S]-Sulfat-Influx	56
2.6.2	EINFLUSS VON NUKLEOTIDEN AUF DEN [³⁵ S]-SULFAT-INFLUX	58
2.7	NUKLEOTID-EINTRANSPORT	60
2.7.1	EINTRANSPORT VON ATP	60
2.7.1.	1 Hemmung des [³² P]ATP-Eintransports durch Atractylosid	62
2.7.1.2	2 Einfluss weiterer Parameter auf den [³² P]ATP-Eintransport	63
2.7.1.	3 Einfluss verschiedener Kationen und Anionen auf den [³² P]ATP-Eintransport	63
2.7.1.	3.1 Einfluss verschiedener Hemmstoffe auf den [³² P]ATP-Eintransport	64
2.7.1.	3.2 Einfluss von Nukleotiden und Nukleotidderivaten auf den	
	[³² P]ATP-Eintransport	65
2.7.2	VERGLEICH VON [³² P]ATP- UND [³² P]GTP-EINTRANSPORT	67
2.7.3	VERGLEICH VON [³² P]ATP- UND [³ H]AMP-PNP-EINTRANSPORT	69
2.8	JODID- UND PYROPHOSPHAT-EFFLUX	71
2.9	EINZELKANALMESSUNGEN MIT DER PLANARMEMBRAN-TECHNIK	72
2.9.1	FUSION DER SR-VESIKEL MIT DER PLANAREN MEMBRAN	73
2.9.2	Einfluss diverser Liganden auf die Anionenkanal-Aktivität im	
	PLB-EXPERIMENT	75
3	DISKUSSION	79
3.1	DIE ANIONENKANÄLE DES SR UND IHRE BETEILIGUNG AM VESIKELFLUX	79
3.2	SULFATFLUX UND ANIONENTRANSPORTER	82
3.2.1	EINFLUSS DES PH-WERTES	82
3.2.2	HEMMEFFEKTE	83
3.2.3	STIMULATIONSEFFEKTE	84
3.2.4	LIGANDENEFFEKTE AUF DEN ANIONENTRANSPORT	86

3.3	Funktion, Eintransport und Metabolisierung von Nukleotiden im SR	86
3.3.1	METABOLISIERUNG DER NUKLEOTIDE IM SR	89
3.3.2	EINTRANSPORT VON NUKLEOTIDEN	90
3.4	BETRACHTUNG DER PHYSIOLOGISCHEN FUNKTION DER ANIONENKANÄLE	93
4	ZUSAMMENFASSUNG	96

5	EXPERIMENTELLER TEIL	<u>98</u>
5.1	PRÄPARATION DER SR-VESIKEL	98
5.2	AUFTRENNUNG DER SR-VESIKEL IN HSR UND LSR	100
5.3	AUFREINIGUNG UND REKONSTITUTION DER CA ²⁺ -ATPASE	100
5.3.1	SOLUBILISIERUNG DER SR-PROTEINE	100
5.3.2 AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHISCHE AUFREINIGUNG DER CA ²⁺ -ATPASE MIT		
	Red 120 Typ 3000-Cl	101
5.4	REKONSTITUTION AUFGEREINIGTER CA²⁺-ATPASE	102
5.4.1	VORREINIGUNG DES ASOLEKTINS	102
5.4.2	HERSTELLUNG DER LIPOSOMEN MITTELS DER EXTRUSION DES LIPIDS DURCH	
	POLYCARBONATMEMBRANEN	102
5.4.3	REKONSTITUTION	103
5.4.4	VORBEREITUNG UND REGENERIERUNG DER BIOBEADS (BIORAD)	103
5.5	BESTIMMUNG DES PROTEINGEHALTS	104
5.5.1	PROTEINBESTIMMUNG NACH DER BIURET-METHODE	104
5.5.2	PROTEINBESTIMMUNG NACH POPOV	104
5.6	Messung der ATP-Hydrolyse	105
5.6.1	PHOSPHATBESTIMMUNG IM PHOSPHOANALYZER	105
5.7	Messung der Calciumaufnahme von SR-Vesikeln und	
	REKONSTITUIERTEN VESIKELN	106
5.8	[³⁵ S]-Sulfat-Effluxmessungen aus präinkubierten SR Vesikeln	107
5.8.1.	1 Variation der Proteinmenge	108
5.8.1.	2 Befüllung durch Extrusion	108
5.8.2	$[^{35}S]$ -Sulfat-Fluxmessung mit proteinfreien Asolektinvesikeln	109

5.8.3 [³⁵S]-SULFAT-FLUXMESSUNG MIT REKONSTITUIERTEN VESIKELN 109

5.8.4	Synthese von Pyridoxalphosphat-6-azophenyl-4'-nitro-2'-sulfonsäre	
	(PPANS)	109
5.8.5	Messung des $[^{35}S]$ -Sulfat-Effluxes unter dem Einfluss diverser	
	HEMMSTOFFE UND IONEN	109
5.9	MESSUNG DES [³⁵ S]-SULFAT-INFLUXES IN SR VESIKEL	110
5.10	MESSUNG DES [³² P]-NUKLEOTIDEINTRANSPORTS IN SR VESIKEL	110
5.11	MESSUNG DES [³ H]AMP-PNP-EINTRANSPORTS IN SR VESIKEL	110
5.12	Einzelkanalmessungen mit der Planarmembran-Technik	111
5.12.1	HERSTELLUNG DER PLANAREN MEMBRAN	111
5.12.2	FUSION DER SR-VESIKEL MIT DER PLANAREN MEMBRAN	111
5.12.2	.1 Vorbehandlung der SR-Vesikel	112
5.12.2	.2 Harnstoffzugabe	112
5.12.3	DETEKTION DES SIGNALS	112
5.12.4	VERMESSUNG DER WIRKUNG DIVERSER LIGANDEN	112
5.13	Metabolisierungsexperimente	113
5.14	CHEMIKALIEN UND GERÄTE	114
<u>6</u>	LITERATURVERZEICHNIS	115
7	DANKSAGUNG	127
8	LEBENSLAUF	128

Abkürzungsverzeichnis

А	Ampère	IP_3	D-myo-inositol-1,4,5-trisphosphat
A23187	Calciumionophor "Calcimycin"	IP_4	D-myo-inositol-1,3,4,5-
AAT	ADP/ATP-Translokator		tetrakisphosphat
ADP	Adenosin-5`-diphosphat	Κ	Kelvin
AMP-PCP	Adenosin 5'-(β , γ -methylen)-	kDa	Kilodalton
	triphosphonat	K _D	Dissoziationskonstante
AMP-PNP	Adenosin 5'-(β . γ -imido)-triphosphat	LSR	Light SR, leichtes SR
Ap3A	5'5''-Diadenosintriphosphat	Μ	molar, Mol/Liter
Ap4A	5'5''-Diadenosintetraphosphat	MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
Ap5A	5'5''-Diadenosinpentaphosphat	MW	Molekulargewicht
APS	Ammoniumperoxodisulfat	nF	Nanofarad
AS	Ameisensäure	pS	Picosiemens
ATP	Adenosin-5´-triphosphat	PDS	Polydextransulfat
ATR	Atractylosid	PKA	Proteinkinase A
BCl	Big Chloride Channel, 'großer'	PKC	Proteinkinase C
	Chloridkanal	PLB	Planar Lipid Bilayer, planare Lipid-
$C_{12}E_{0}$	Polyoxyethylenglykol-nona-		Doppelschicht
- 12)	dodecvlether	PM	Planarmembran
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat	PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembane	PPAC	Pyridoxalphosphat-6-azochinolin
	Conductance Factor	PPANS	Pyridoxalphosphat-6-azophenyl-
CKII	Casein-Kinase II		4'nitro-2'-sulfonat
cpm	counts per minute. Impulse pro	PPAPS	Pyridoxalphosphat-6-azophenyl-2'-
1	Minute		sulfonat
ct	cis/trans	PPi	Pyrophosphat
DHPR	Dihydropyridinrezentor	rpm	Umdrehungen pro minute
DIDS	4 4 Diisothiocyanostilben-2 2`-	RR	Rutehniumrot
DIDS	disulfonsäure	RyR	Ryanodinrezeptor
	uisuitonsaute	S	Siemens
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	S_{50}	halbmaximale Stimulations-
EGTA	Ethylenglykol-bis-(β-		konzentration
	aminoethylether)-tetraessigsäure	SB9	Suraminderivat 9
E _{max}	maximaler Eintransport	SCl	Small Chloride Channel, kleiner
F	Farad		Chloridkanal
g	Erdbeschleunigung	SDS	Natriumdodecylsulfat
g	Gramm	SR	Sarcoplasmatisches Reticulum
GABA	Gamma-Aminobuttersäure	TCA	Trichloressigsäure
GP-53	Glykoprotein mit 53 kDa	TEA	Triethanolamin
GTP	Guanosin-5'-triphosphat	TEMED	N,N,N`,N`-
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-		Tetramethylethylendiamin
	piperazinyl)-ethansulfonsäure	TMP	Trimetaphosphat
HIV	menschlicher Immundefizienz-Virus	TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
HSR	Heavy SR, schweres SR	V	Volt
Hz	Hertz	VDAC	Voltage Dependent Anion Channel
I ₅₀	halbmaximale Inhibitions-		
	konzentration		

1 Einleitung

1.1 Biologische Membranen und Membrantransport

Biologische Membranen sind aufgrund ihres hydrophoben Inneren für die meisten polaren Moleküle und damit auch Ionen weitgehend undurchlässig (Evans & Skalak 1979). Dies verhindert zum einen den freien Stoffaustausch des Cytoplasmas bzw. der intrazellulären Kompartimente mit dem umgebenden Medium und somit den Verlust für die Zelle wertvoller wasserlöslicher Bestandteile, setzt zum anderen aber die Entwicklung aufwendiger Transportmechanismen zur kontrollierten Überwindung der Membranbarriere und Aufrechterhaltung der erwünschten Metaboliten- und Ionenverhältnisse voraus. Deshalb enthalten sämtliche biologischen Membranen Transportproteine, die reguliert und spezifisch den Durchtritt polarer Substanzen steuern.

Bei den Transportproteinen unterscheidet man Carrier und Kanäle (Hille 1992), die in ihrem Aufbau, ihrer Funktion und den physiologischen Parametern wie molekularer Selektivität, Sättigungskonzentration, Temperaturabhängigkeit des Transports, der stöchiometrischen Kopplung sowie der Anzahl der transportierten Moleküle differieren.

1.1.1 Carrier

Carrier sind membrandurchspannende Proteine, die ihre "Fracht" befördern, indem sie eine Konformationsänderung vollziehen, bei der ihre Molekül-Bindungsstelle erst auf der einen und dann auf der anderen Seite der Membran exponiert wird. Dies kann entweder mit oder auch, angetrieben durch ATP-Hydrolyse oder Gegentransport, gegen den elektrochemischen Gradienten erfolgen. Beispiele für Carrier sind die Na-K-Pumpe, die Ca²⁺-ATPase des SR, der Na⁺-Ca²⁺-Austauscher, der Cl⁻-HCO₃-Austauscher, der Glucosetransporter, sowie weitere Natrium-gekoppelte Cotransport- und Antiportsysteme. In ihrer hohen Spezifität sowie ihrer Wechselzahl von maximal 10³ Molekülen pro Sekunde ähneln sie den metabolischen Enzymen (Hille 1992).

1.1.2 Ionenkanäle

Ionenkanäle sind regulierte wässrige Poren in der Membran, die die Basis für die zelluläre Erregbarkeit und elektrische Signalübertragung in Nerven, Muskeln und Synapsen bilden (Hille *et al.* 1999). Ihre Funktionen umfassen dabei die Homöostase, die Etablierung und

Aufrechterhaltung des Membranpotentials, das konzertierte Formen elektrischer Signale, den Transport von Ionen über sekretorische und resorptive Epithelien, die Kontrolle des Zellvolumens und, für die Funktion des Muskels von zentraler Bedeutung, die Steuerung des Flusses von Ca²⁺ als sekundärem Botenstoff aus Speicherkompartimenten oder dem Extrazellularraum in das Cytosol (Okada 1997; Szewczyk 1998).

Das Hauptmerkmal von Ionenkanälen ist der passive Transport, d. h. die Ionen folgen immer dem Gradienten der elektrochemischen Aktivität, da sich Poren nicht energetisch koppeln lassen (Hoffmann 1986). Der Aufbau der notwendigen Gradienten und Potentiale muss durch aktive Pumpen und Carrier bewerkstelligt werden.

Das Wissen über die physiologische Funktion der Ionenkanäle stammt im Wesentlichen aus Fluxexperimenten und elektrobiologischen Einzelkanalmessungen mit der *Planar Lipid Bilayer* (PLB)-Technik (Hille 1992; Miller 1986), die Aufschluss über die Selektivität, Transportkinetik, Regulation und Pharmakologie geben können. Die Ermittlung der grundlegenden Funktion und der Topologie des Durchtrittskanals beruht jedoch auf der Forschung an kleinen kanalbildenden Modellproteinen wie Gramicidin und Valinomycin (Hladky 1999; Shoshan *et al.* 1981; Wallace 2000).

Im Inneren der Pore, die meist eine α -helikale, selten auch β -Faltblatt Struktur aufweist, befinden sich Wassermoleküle, an denen das Ion durch die Pore wandert (Fahlke *et al.* 1997). Da hier für den Durchtritt im Gegensatz zu Carriern keine Konformationsänderung notwendig ist, erzielen Kanäle eine Transportrate von bis zu 10^6 Ionen pro Sekunde. Trotz dieser Leistungsfähigkeit weisen die Kanalproteine eine hohe Selektivität für eine bestimmte Ionenart auf (Lester & Dougherty 1998). In Abhängigkeit der Ladungsdichte, die durch Radius und Ladung des Ions bestimmt wird, lagert sich eine charakteristische Zahl von Wassermolekülen in z.T. mehreren Schichten um das Ion an. Der daraus resultierende hydratisierte Radius bedingt die Bindung des Ions an die Substratbindungsstelle des Proteins, wodurch der Transportvorgang eingeleitet wird (Fahlke et al. 1997).

Da Ionen geladene Teilchen sind, spielen bei der Betrachtung von Flux-Vorgängen die elektrischen Eigenschaften der beteiligten Komponenten eine wichtige Rolle (Hille 1992). Durch die Separierung und unabhängige Wanderung von Ladungsträgern treten an der Membran elektrische Phänomene wie Spannung und Strom auf, deren Beziehung durch das Ohmsche Gesetz $[U = I \cdot R]$ beschrieben wird.

Der Nettostrom (I), also die Wanderung der Ionen, ist abhängig von der Potentialdifferenz (Spannung U in Volt V) und dem elektrischen Widerstand (R) des Mediums. Der Kehrwert des Widerstandes wird als Leitfähigkeit bezeichnet, deren Betrag bei elektrophysiologischen Einzelkanalmessungen zur Charakterisierung der Ionenkanäle dient (Miller 1986).

Ein weiteres wichtiges Strukturelement von Ionenkanälen ist die Möglichkeit der Regulation des Durchtrittskanals, was als *Gating* (von engl. *Gate* = Tor) bezeichnet wird. Der Zustand des *Gates* entscheidet, ob unter bestimmten Bedingungen der Kanal offen oder geschlossen ist, also die Pore zugänglich oder unzugänglich ist. Der Regulationsreiz kann entweder mechanischer Art (Dehnungsreiz), spannungsabhängig (*voltage gated*) oder von Signal-molekülen gesteuert (*ligand gated*) sein. Als physiologische Liganden können Ionen, Neuro-transmitter, Nukleotide oder bestimmte Signal-Proteine (G-Proteine) fungieren.

Die Wirkung von Ionenkanal-Hemmstoffen und -Aktivatoren kann entweder auf die Modifikation des *Gating*-Prozesses oder die Blockade des Durchtrittskanals (*Open Channel Block*) zurückzuführen sein.

1.2 Kompartimentierung der eukaryontischen Zelle

Alle Eucyten weisen ihrer Komplexität und Funktion entsprechend Kompartimentierungen auf. Als Kompartimente bezeichnet man Membransysteme, die es ermöglichen, innerhalb der Zelle abgegrenzte Funktionsbereiche unterschiedlicher Ionenzusammensetzung, pH-Werte oder Proteinkomposition bereitzustellen, die jedem physiologischen Vorgang optimale Milieueigenschaften bieten. Beispiele für diese Kompartimente sind der Zellkern, das endoplasmatische Reticulum (ER), der Golgi-Apparat oder die Lysosomen.

In den meisten Zellen höherer Organismen weist das ER zelltyp- und gewebeabhängig spezialisierte Bereiche auf, die sich gemäß ihrer Funktion in Topologie, Proteinzusammensetzung, Größe und Komplexität unterscheiden.

1.2.1 Das Sarcoplasmatische Reticulum (SR)

Muskelzellen verfügen über ein spezielles Kompartiment, das zur Speicherung von Ca²⁺ sowie seiner schnellen Freisetzung in das Myoplasma und dem Rücktransport in das SR-Lumen während des Exzitations-Kontraktions-Cyclus dient. Aufgrund seines Vorkommens in den Sarcomeren und der morphologischen Verwandtschaft zum Endoplasmatischen Reticulum (ER), die bereits bei seiner Entdeckung und ersten Charakterisierung im Jahre 1953 durch Porter und Bennett (Bennett & Porter 1953) postuliert und später auch durch zahlreiche Untersuchungen bestätigt wurde (Martonosi *et al.* 1980; Meissner & Fleischer 1971), bezeichnet man es als sarcoplasmatisches Reticulum (SR).

Das SR stellt eine hochspezialisierte Sonderform des ER dar, welches neben der ER-typischen ubiquitären Grundkomposition eine Reihe von einzig hier vorkommenden Proteinen aufweist. Zu diesen SR-typischen Proteinen gehören die Ca²⁺-ATPase, der Ca²⁺-Release-Kanal oder auch Ryanodin-Rezeptor (RyR) und Calsequestrin sowie HCP (Histidine-rich Ca²⁺-binding protein), Calmodulin und das Glycoprotein GP53 (Campbell & MacLennan 1981; Campbell & MacLennan 1983; Leberer *et al.* 1990; Michalak *et al.* 1980; Tuana & MacLennan 1988). Letzere sind Ca²⁺-bindende Proteine, die die Konzentration von freiem luminalem Ca²⁺ auf einem niedrigen Niveau halten und somit die Speicherkapazität des SR-Lumens um ein Vielfaches steigern.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Muskelfasern und -fibrillen und die biochemische Charakterisierung von SR-Vesikel-Präparationen haben ergeben, dass das SR zwei morphologisch und funktionell unterscheidbare Bereiche aufweist (Meissner 1975) (Louis *et al.* 1980). Die longitudinalen Tubuli sind Ca²⁺-ATPase-reich und umspannen die Myofibrille netzartig über die gesamte Länge des Sarcomers. An ihren Enden befinden sich die terminalen Zisternen, die in ihren junktionalen Bereichen mit den transversalen Tubuli (Einstülpungen der Plasmamembran) über einen schmalen Spalt in engem Kontakt stehen. Dieser Spalt wird von den in elektronenmikroskopischen Aufnahmen erkennbaren Fuß-Strukturen (*feet structures*) durchspannt, die als hochgeordnete tetramere Komplexe des RyR mit assoziierten Proteinen identifiziert wurden (Ahern *et al.* 1994; Chu *et al.* 1987; Chu *et al.* 1986; Saito *et al.* 1984).

SR-Vesikelpräparationen lassen sich durch Dichtegradienten-Zentrifugation in die Ca²⁺-ATPase-reichen und RyR-freien longitudinalen Tubuli und die Ca²⁺ATPase-armen und RyRreichen terminalen Tubuli auftrennen, die man aufgrund des unterschiedlichen Protein-Lipid-Verhältnisses als leichtes SR (*Light*-SR, LSR) bzw. schweres (*Heavy*-SR, HSR) bezeichnet (Campbell *et al.* 1980; Louis et al. 1980; Meissner 1975).



Abb. 1.1 SR-Struktur der terminalen Zisternen mit Feet-Structures des RyR und Ca-ATPase (Franzini-Armstrong & Peachey 1981; Kleinig & Sitte 1992; Saito et al. 1984)
 A: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines quergestreiften Fischmuskels mit SR-Membransystem. Der Pfeilkopf weist auf den transversalen Tubulus, die Pfeile auf die beiden terminalen Zisternen.

B: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines SR-Vesikles mit Membranen der terminalen und longitudinalen Tubuli. Die Pfeilköpfe weisen auf die *Feet-Structures*, der Pfeil auf ein Ca^{2+} -ATPase-Molekül

C: Schematische Darstellung dreier Muskelfasern und der Triadenstruktur der terminalen Zisterne.

PM: Plasmamembran, M: Mitochondrium, T: Transversaler Tubulus, SR: Terminale SR Zisterne, Z: Z-Scheibe.

1.3 <u>Aufbau und Funktion des Skelettmuskels</u>

Der willkürlich bewegbare Vertebratenmuskel besteht aus langen Muskelfasern, die jeweils eine einzige, während der Muskelentwicklung durch die Verschmelzung mehrerer Vorläuferzellen entstandene vielkernige Zelle darstellen. Sie kann sich über die gesamte Länge des Muskels erstrecken und lagert sich in streng parallelen Muskelfaser-Bündeln (Durchmesser 20-100 μ m) zusammen, auf deren Anordnung die bereits unter dem Lichtmikroskop erkennbare, typische Querstreifung der Muskulatur beruht. Die Muskelfasern selbst wiederum bestehen aus jeweils etwa 1000 Myofibrillen deren Durchmesser 1 bis 2 μ m beträgt. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen, dass die Fibrillen selbst eine Bandenstruktur besitzen, die durch alternierend angeordnete Bereiche unterschiedlicher Elektronendichte hervorgerufen wird.

Die kleinste Wiederholungseinheit der Myofibrille ist das Sarcomer. Es ist in mehrere Banden, Scheiben und Zonen unterteilt und weist alle zur Kontraktion des Muskels nötigen Strukturelemente auf. Die Anordnung dunkler und heller Bereiche wird durch den unterschiedlichen Überlappungsgrad dicker und dünner Filamente hervorgerufen, wobei die dicken, an der M-Scheibe befestigten Myosinfilamente mit den an die Z-Scheibe gebundenen, dünnen Aktinfilamenten wechselwirken und durch ihr Ineinandergleiten die Verkürzung der Myofibrille und damit die konzertierte Muskelkontraktion bewirken.



Abb. 1.2 Schematische Darstellung einer quergestreiften Muskelfaser (Voet & Voet 1992)

Wie ein "Netzstrumpf" umgeben die Zisternen des sarcoplasmatischen Reticulums im gleichen Maßstab hochgeordnet die Sarcomere jeder Fibrille. Die longitudinalen Tubuli sind jeweils auf Höhe der Z-Scheiben lokalisiert, die terminalen Zisternen des junktionalen SR sowie die transversalen Tubuli des Sarcolemmas befinden sich auf Höhe der hellen I-Bande, wo sie die Triaden-Struktur bilden (Mitchell *et al.* 1983).

1.3.1 Die Erregungs-Kontraktions-Kopplung (EKK)

Die Umwandlung eines depolarisierenden Nervenimpulses in die durch Erhöhung der cytoplasmatischen Ca²⁺-Konzentration eingeleitete Kontraktion der Myofibrillen wird als Erregungs-Kontraktions-Kopplung bezeichnet (Hobai & Levi 1999).

Während sowohl der Vorgang der Depolarisation des Sarcolemmas durch den motoneuronalen Nervenimpuls (Gundersen 1998; Moritani 1990) als auch der Zusammenhang zwischen freiem Ca^{2+} und Kontraktion der Sarcomere (Berchtold *et al.* 2000; Billeter & Hoppeler 1994; Gordon *et al.* 2000) schon lange bekannt sind, konnte erst kürzlich geklärt werden, wie die Depolarisation der Membran der transversalen Tubuli die Freisetzung des Ca^{2+} aus dem Lumen des SR bewirkt (Csernoch 1999; Ikemoto & el-Hayek 1998).

Ausstülpungen des Sarcolemmas, die in Form der transversalen Tubuli tief in die Myofibrillen-Bündel hineinragen, bilden mit den terminalen Zisternen des junktionalen SR die Triadenstruktur, durch die der Nervenimpuls an die Membran des SR weitergeleitet wird.

Durch Öffnen von Ca²⁺-Release-Kanälen (Meissner *et al.* 1988) wird innerhalb von 50 Millisekunden die myoplasmatische Calciumkonzentration von 0.1 μ M auf 5-10 μ M erhöht. Dies entspricht einer Freisetzung von etwa 60% des im SR-Lumen gespeicherten Ca²⁺ mit einer Rate von 5-10 nMol Ca²⁺/mg/sec. Die Ca²⁺-Bindung an regulatorische Untereinheiten von Troponin C (TnC) verändert die sterischen Verhältnisse an den dünnen Filamenten (Aktin und Troponin) und beeinflusst die Aktin-Myosin-Wechselwirkung (Gordon et al. 2000; Payne & Rudnick 1989). Hiermit wird das Ablaufen des Muskel-Kontraktions-Cyclus eingleitet, bei dem durch das Knüpfen und Lösen von Bindungen zwischen Myosinköpfen und Aktinfilamenten unter ATP-Hydrolyse die Filamente gegeneinander verschoben werden (Payne&Rudnick 1989).

Solange die Depolarisation der Membran durch aufeinanderfolgende Nervenimpulse andauert, bleibt der RyR aktiviert. Parallel zur Ca²⁺-Freisetzung beginnt die Ca²⁺-ATPase, das Hauptprotein des SR, aktiv und höchst effizient den Rücktransport des Calciums gegen den Gradienten in das SR-Lumen (Inui *et al.* 1990).

1.4 <u>Ryanodin-Rezeptor und Calcium Release</u>

1.4.1 R-Typ Ca²⁺-Release-Kanal

Die Freisetzung des luminalen Ca²⁺ (*Calcium-Release*) erfolgt durch Öffnen des Ca²⁺-Release-Kanals (R-Typ Ca²⁺-Kanal). Er wird auch als Ryanodin-Rezeptor (RyR) bezeichnet, da dieses Alkaloid mit hoher Affinität bindet und ein komplexes Wirkungsschema aufweist. (Hasselbach & Migala 1992; Valdivia & Coronado 1989).

Der homotetramere Rezeptorkomplex besteht im Skelettmuskel aus Untereinheiten von je 595 kDa und ist mit einem resultierenden Molekulargewicht von über $2x10^6$ so groß, dass er in elektronenmikroskopischen Aufnahmen als *feet-structure* zu erkennen ist (Saito *et al.* 1988). Der RyR-Komplex des Herzmuskels (RyR2) besteht aus vier Monomeren von nur 400 kDa. Die Sequenzhomologie beider Kanäle beträgt 66%. Sie ähneln sich in Bezug auf die Wirkung von Ryanodin, Ca²⁺ und Mg²⁺, weisen jedoch Unterschiede in Funktion und Regulation auf (Fruen *et al.* 1994; Lamb 2000; Meissner et al. 1988; Meszaros *et al.* 1993; Meszaros *et al.* 1997; Shoshan-Barmatz & Ashley 1998; Townsend & Rosenberg 1995).

Der RyR verfügt über eine große Zahl unterschiedlicher Bindungsstellen für Nukleotide und regulatorische Proteine wie Calmodulin, Phospholamban und Sarcalumenin, reagiert jedoch auch sensibel auf Ionen wie Ca²⁺, Mg²⁺, Ba²⁺, H⁺, HPO₄²⁻ und Cl⁻ (Campbell & Shamoo 1980; Chen & MacLennan 1994; Coonan & Lamb 1998; Fruen *et al.* 1996; Fruen et al. 1994; Hadad *et al.* 1999; Hasselbach & Migala 1992; Klinger *et al.* 1999; Laver *et al.* 1995; Palade 1987; Patel *et al.* 1996; Shoshan-Barmatz 1987; Sukhareva *et al.* 1994; Wyskovsky 1994). Überdies weist er diverse PKA (Proteinkinase A)- und Calmodulin-abhängige Phosphory-lierungsstellen auf (Ahern et al. 1994; Lokuta *et al.* 1995).

Mit Hilfe von Bindungsstudien, Vesikel-Flux-Experimenten, elektrophysiologischen Einzelkanalmessungen und der direkten Beobachtung isolierter Muskelfasern (Stienen 2000) konnten diverse Inhibitoren und Aktivatoren identifiziert werden, deren Wirkungen die Auslösung des Ca²⁺-Release, die dauerhafte Öffnung der Pore, die Verringerung der Offenwahrscheinlichkeit (P_o), die Blockade des Transportkanals oder eine Veränderung der regulatorischen Sensibilität des Kanal-Komplexes umfassen.

 Ca^{2+} , Coffein und Cl^{-} sind in der Lage, die Ca^{2+} -Freisetzung auszulösen. Ca^{2+} wirkt dabei in Konzentrationen von 0.5-10 μ M über mehrere Bindungsstellen hoher Affinität aktivierend (Campbell & Shamoo 1980; Coonan & Lamb 1998; Fruen et al. 1996; Hasselbach & Migala

1992; Hasselbach & Migala 1992; Laver et al. 1995; Patel et al. 1996; Sukhareva et al. 1994; Wyskovsky 1994). Im submillimolaren und millimolaren Bereich jedoch hemmt Ca^{2+} den RyR, was die Existenz einer zweiten niedrigaffinen Bindungsstelle impliziert. Die hemmende Wirkung von millimolarem Mg²⁺ und Ba²⁺ kann entweder auf eine (kompetitive) Bindung an die hochaffin-aktivierende oder die niedrigaffin-hemmende Ca^{2+} -Bindungsstelle zurückgeführt werden. Die Wirkung der Kationen lässt sich durch Phosphorylierung oder Bindung von PalmitoylCoA aufheben (Connelly *et al.* 1994; Hain *et al.* 1995; Wyskovsky 1994).

Ryanodin führt in Konzentrationen von 10-50 nM zur Aktivierung und dauerhaften Öffnung des Kanals, Konzentrationen von 10-300 µM wirken jedoch hemmend.

Anionenkanalhemmstoffe wie 4,4⁻-Diisothiocyano-2,2⁻-stilbendisulfonische Säure DIDS (50-500 μ M) und 4,4'-Dibenzamidostilben-2, 2'-disulfonische Säure DBDS halten den Kanal nach einer Aktivierung im geöffnetem Zustand (Oba *et al.* 1996; Sitsapesan 1999; Valdivia & Coronado 1989; Zahradnikova & Zahradnik 1993).

Ca²⁺-freies Calmodulin aktiviert den Kanal über eine der 24 Calmodulinbindungsstellen, die auch den Wirkort von Suramin darstellen (Chen & MacLennan 1994; Klinger et al. 1999; Sitsapesan 1999). Bindet freies Ca²⁺ an Calmodulin, führt dies zur Hemmung.

ATP sowie andere Nukleotide und Nukleotidanaloga aktivieren den RyR ebenso wie cyclische ADP-Ribose (cADPR) und Inositol 1,4,5 Triphosphat (IP3) (Fruen *et al.* 1994; Meszaros et al. 1993; Shoshan-Barmatz 1987).

Atractylosid, Rutheniumrot, Tetracain, Neomycin und NO gelten als potente Hemmstoffe des RyR (Chen & MacLennan 1994; Eu *et al.* 2000; Palade 1987; Valdivia & Coronado 1989; Wyskovsky 1994; Xu *et al.* 1999; Yamaguchi *et al.* 1999).

1.4.2 L-Typ Ca²⁺-Release-Kanal

Sowohl im Skelett- als auch am Herzmuskel ist eine direkte Wirkung des depolarisierenden Nervenimpulses auf den Calcium-Release-Kanal ausgeschlossen (Coronado *et al.* 1994; Fabiato 1983; Martonosi 1984; Mitchell et al. 1983; Schneider *et al.* 1981).

Als Spannungssensor wurde ein zweiter Calcium-Kanal, der Dihydropyridinrezeptor (DHPR oder auch L-Typ-Ca²⁺-Kanal) entdeckt, der sich im transversalen Tubulus des Sarcolemmas befindet und häufig direkt mit dem RyR des junktionalen SR assoziiert ist (Flucher *et al.* 1994; Lamb 2000; Sham *et al.* 1995; Valdivia & Coronado 1989).

Am Herzmuskel führt die spannungsabhängige Aktivierung des DHPR zum Einstrom einer geringen Menge Ca^{2+} , die dann den Ca^{2+} -induzierten Ca^{2+} -Release (CICR) durch den RyR2 bewirkt (Dirksen & Beam 1999; Franzini-Armstrong *et al.* 1998).

Im Skelettmuskel hingegen geht der Ca²⁺-Freisetzung durch den RyR kein Ca²⁺-Transfer über den DHPR voraus (Fasolato *et al.* 1994; Ikemoto & el-Hayek 1998; Xu et al. 1999). Die Signaltransmission beruht hier auf einer mechanischen Kopplung von DHPR und RyR (Ashley 1989). Sie bewirkt durch die Öffnung individueller RyR die Entstehung von Ca²⁺-Sparks und Ca²⁺-Quarks (Folge lokal erhöhter Calciumpermeabilität), die letztlich zum CICR führen (Niggli 1999).

1.4.3 Elektroosmotische Neutralität der Erregungs-Kontraktions-Kopplung

Unter physiologischen Bedingungen sind weder der schnelle Ca²⁺-Ausstrom über den Ca²⁺-Release Kanal noch der aktive Rücktransport durch die Ca²⁺-ATPase elektrogen, d.h. das Potential der SR-Membran verweilt bei etwa 0 mV.

Untersuchungen an rekonstituierten Vesikeln ergaben jedoch, dass beide Vorgänge den Aufbau eines Membranpotentials von bis zu 60 mV bewirken können (Chu *et al.* 1983; Hartung *et al.* 1987; Kasai & Miyamoto 1976; Kometani & Kasai 1980; Martonosi 1984; Morimoto & Kasai 1986; Yu *et al.* 1993; Zimniak & Racker 1978). In vivo muss somit eine Ladungskompensation erfolgen, die entweder durch die Wanderung von Kationen entgegen oder Anionen mit dem transportierten Ca²⁺ über die SR-Membran vermittelt wird (Chu *et al.* 1983; Meissner & McKinley 1976).

1.5 Weitere Ionenkanäle des Sarcoplasmatischen Reticulums

Das SR weist kanalvermittelte Permeabilitäten für Na⁺, K⁺, Ca²⁺, H⁺, HPO₄²⁻ und Cl⁻ auf, aber auch organische Polyanionen wie Nukleotide und andere Metabolite können die Membran überwinden (Ariki & Boyer 1980; Dulhunty *et al.* 1996; Kasai & Nunogaki 1988; MacLennan *et al.* 1980; Meissner & McKinley 1976; Meissner & Young 1980; Salama & Scarpa 1985; Shoshan-Barmatz *et al.* 1996; Young *et al.* 1981).

1.5.1 Kationenkanäle

Der Transport einwertiger Kationen ist etwa 50mal weniger effektiv als der einwertiger Anionen, wodurch der ladungskompensierende Einfluss von Cl^- gegenüber dem von K^+ favorisiert wird (Allard & Rougier 1994; Kometani & Kasai 1978; Kometani & Kasai 1980;

Meneton *et al.* 1999; Moutin & Dupont 1988; Szewczyk 1998). Überdies befinden sich die vergleichsweise langsamen K⁺-Kanäle fast ausschließlich in der Membran des longitudinalen Systems und werden durch physiologische Ca²⁺- und Mg²⁺-Konzentrationen gehemmt (Ide *et al.* 1991; Soler *et al.* 1994).

Protonen können die Membranbarriere ebenfalls leicht überwinden (Nunogaki & Kasai 1986). Da der luminale pH-Shift während der Ca²⁺-Freisetzung jedoch nur -0.2 Einheiten beträgt und sich innerhalb von 100 ms bildet, jedoch erst nach einigen Minuten wieder ausgeglichen wird, kommt auch dieses nur bedingt (5-10% der Gesamt-Ladungskompensation) (Kamp *et al.* 1998; Levy *et al.* 1990) in Frage.

1.5.2 Anionenkanäle

Im Vergleich zu den gut charakterisierten Kationentransportsystemen des SR, allen voran Ca²⁺-Release-Kanäle und Ca²⁺-ATPase, ist das Wissen über den Anionentransport bis heute lückenhaft, obwohl ein Zusammenhang mit der Regulation des Ca²⁺-Release und der Ladungskompensation bestätigt ist (Ahern & Laver 1998; Allard & Rougier 1994; Berman 1999; Salama & Scarpa 1985).

Die Anionen-Permeabilität des SR ist für Chloridionen besonders hoch, aber auch SCN⁻, Γ , NO₃⁻, Br⁻, SO₄²⁻, F⁻ und organische Metabolite wie Nukleotide und Oxalat können die Kanäle passieren (Kawano *et al.* 1999).

Ausgehend von ersten Untersuchungen am Anionentransport des SR, die auf der passiven Anreicherung präzipitierender Anionen mit dem aktiv akkumulierten Ca²⁺ in SR Vesikel beruhen (Beil *et al.* 1977; Kometani & Kasai 1980), konnten mit Hilfe von Einzelkanalmessungen mit der *Planar Lipid Bilayer* (PLB)-Technik drei unterschiedliche Anionenkanäle identifiziert werden, die sich in Bezug auf Leitfähigkeit, *Gating*-Kinetik, Spannungsabhängigkeit, aber auch Hemmstoff-Sensitivität unterscheiden (Campbell & MacLennan 1980; Kourie *et al.* 1996a; Kourie *et al.* 1996b).

1.5.2.1 'Big Chloride Channel' (BCl)

Der BCl ähnelt in seinen Eigenschaften dem von Tanifuji und Rousseau (Rousseau *et al.* 1988; Tanifuji *et al.* 1987) beschriebenen Cl⁻-Kanal. Er ist ausgeprägt Cl⁻-selektiv und kann seitenspezifisch durch SO_4^{2-} (30 mM cis) inhibiert werden. Seine maximale Cl⁻-Leitfähigkeit beträgt 250 pS bei einer hohen Offenwahrscheinlichkeit (P_o). In einem Potentialbereich von

-60 mV bis +100 mV reagiert er in Bezug auf *Gating* und Leitfähigkeit spannungsunabhängig. Das Stilbenderivat DIDS hemmt den BCl bei 8 μ M vollständig (Blair & Schlesinger 1990; Kasai & Taguchi 1981; Kourie et al. 1996b).

1.5.2.2 'Small Chloride Channel' (SCI)

Der SCl, auch als Ca²⁺-aktivierter Chlorid-Kanal bezeichnet, unterscheidet sich grundlegend von den bekannten Anionenkanälen in SR-, T-Tubulus- und Plasmalemmamembran, weist jedoch Ähnlichkeiten mit den von Smith (Smith *et al.* 1986), Ide (Ide *et al.* 1991) und Sukhareva (Sukhareva et al. 1994) beschriebenen Kanälen auf. Aufgrund seiner komplexen Spannungs- und Ligandenabhängigkeit ist er den klassischen Ionenfluxmessungen nur bedingt zugänglich und kann selbst bei Einzelkanalmessungen nicht ohne weiteres detektiert werden. Der SCl entwickelt seine Aktivität nur bei negativen Membran-Potentialen und muss durch einen positiven Prä-Puls initiiert werden. Die maximale Leitfähigkeit wurde sowohl für Cl⁻ als auch SO₄²⁻ mit 75-105 pS bestimmt, was den SCl als Kanal niedriger Spezifität in Bezug auf verschiedene Anionen ausweist (Kourie et al. 1996b). Der Kanal ist weitaus weniger sensitiv für DIDS als der BCl, da er auch oberhalb einer DIDS-Konzentration von 80 μ M nicht vollständig blockiert werden kann.

Für die Funktion ist cytoplasmatisches Ca^{2+} notwendig, das nicht durch andere zweiwertige Kationen wie etwa Mg²⁺ ersetzt werden kann (Kourie et al. 1996a; Kourie et al. 1996b). Letzteres bewirkt sogar eine Hemmung des Kanals (Ahern & Laver 1998).

Weiter lässt sich der SCl durch ATP, aber auch AMP-PNP in einen gehemmten Zustand überführen (Ahern & Laver 1998).

1.5.2.3 'Voltage Dependent Anion Channel' (VDAC)

Der Voltage Dependent Anion Channel (VDAC) der äusseren Mitochondrienmembran konnte immunologisch sowohl im SR als auch in anderen extramitochondrialen Membranen nachgewiesen werden und ist bislang am ausführlichsten charakterisiert (Junankar *et al.* 1995; Jurgens *et al.* 1995; Lewis *et al.* 1994; Puchelle *et al.* 1993; Reymann *et al.* 1998; Shafir *et al.* 1998; Steinacker *et al.* 2000; Thinnes 1992; Thinnes & Reymann 1997; Yu & Forte 1996). Im Mitochondrium bildet er die Durchtrittspore für viele Ionen und Metaboliten von bis zu 4 kDa (Rostovtseva & Bezrukov 1998). Es ist möglich, dass im SR einige nur schwer zuzuordnende Anioneneffekte auf seine Wirkung zurückzuführen sind, da seine Eigenschaften stark von der Zusammensetzung der Membran abhängen (Thinnes 1992). Als einziger Anionenkanal des SR konnte der VDAC affinitätschromatographisch aufgereinigt und teilweise sequenziert werden (Flebbe 2000). Es wird diskutiert, ob das nur 31 kDa große Protein in Ionenkanal-Komplexen als universelle Durchtrittspore fungiert (Reymann et al. 1998; Thinnes & Reymann 1997).

Im Bereich eines Membranpotentials von $\pm 20 \text{ mV}$ weist der Kanal eine hohe Leitfähigkeit (700 pS) ohne besondere Ionenspezifität auf. Ausserhalb dieses Potentialbereiches oder nach Bindung diverser Liganden sinkt seine Offenwahrscheinlichkeit (P_o) und der Kanal geht in einen deutlich weniger leitfähigen, kationenselektiven Zustand über (Mirzabekov *et al.* 1993; Schein *et al.* 1976).

Die Wirkung bekannter Anionenkanal-Hemmstoffe wie DIDS ist nicht gänzlich geklärt (Florke *et al.* 1994; Shoshan-Barmatz et al. 1996; Thinnes & Reymann 1997). Sie scheinen nach der Bindung nur die Spannungsabhängigkeit des VDAC zu modifizieren, führen aber nicht zu einer echten Hemmung. Polyanionen wie Polyaspartat und Polydextransulfat haben eine ähnliche Wirkung (Colombini *et al.* 1996). Die einzig bekannten echten Kanalblocker sind DCCD (N',N'-Dicyclohexylcarbodiimid), bongkrekische Säure und Königs-Polyanion, ein Polymer aus Methacrylat, Maleat und Styrol (Shafir et al. 1998).

Eine hemmende Wirkung von ATP konnte nachgewiesen und auf eine regulatorische Nukleotid-Bindungsstelle zurückgeführt werden (Thomine *et al.* 1997).

1.5.2.4 Weitere Anionenkanäle der SR-Membran

In der Literatur werden noch weitere Kanäle unterschiedlicher Eigenschaften mit Leitfähigkeiten von 40 bis 500 pS beschrieben. Sie verhalten sich z.T. wenig selektiv und sind aufgrund ihres relativ seltenen Auftretens in PLB-Experimenten nicht näher charakterisiert worden. Möglicherweise stellen sie Verunreinigungen des SR mit Sarcolemma- und T-Tubulus-Membranen dar. Auch die Existenz besonderer Erscheinungsformen der oben beschriebenen Kanäle, die auf regulatorische Modifikationen, eine Beschädigung der Proteine oder die Veränderung der Membranumgebung zurückzuführen sind, wird diskutiert (Bathori 1998; Blatz & Magleby 1983; Lewis et al. 1994; Woll *et al.* 1987; Woll & Neumcke 1987; Woodbury & Miller 1990).

1.5.2.5 Lokalisation und Häufigkeit der Anionenkanäle der SR-Membran

Die Häufigkeit der Anionenkanäle variiert von 0.1 bis 2 Kanälen pro SR-Vesikel, wie mit Hilfe der Fusionsrate bei PLB-Experimenten gezeigt werden konnte (Rousseau 1989). Die Verteilung innerhalb von HSR und LSR ist gleichmäßig, wobei das Verhältnis von BCl zu SCl mit 2-3 : 1 angegeben wird (Kourie et al. 1996b). Vereinzelt konnten Kolokalisationen mit dem RyR beobachtet werden (Kourie 1999). Der VDAC wurde durch Bindungsstudien quantifiziert und könnte danach im SR sogar häufiger vorkommen als im Mitochondrium (Shafir et al. 1998).

1.6 Zielsetzung

Ziel der Arbeit war die weitergehende Charakterisierung der Anionentransportsysteme des SR mit Hilfe der Vesikel-Flux-Technik und die Gegenüberstellung der hier erhaltenen Daten mit den durch Einzelkanalmessungen erzielten Ergebnissen. Durch den gezielten Einsatz speziell synthetisierter Hemmstoffe sollte der Einfluss von Anioneneffekten auf den Ca²⁺-Transport überprüft und mit den vom Ca²⁺-Release bekannten Effekten verglichen werden. Ebenso sollte die Möglichkeit über die Ladungsbalance hinausgehender Funktionen der verschiedenen Anionenkanäle geprüft werden. Ein besonderes Augenmerk lag hierbei auf der zentralen Rolle von ATP, dessen Funktion als Sensor des energetischen Zustands der Zelle, Phosphatgruppendonor und Edukt diverser regulatorischer Metabolite in Zusammenhang mit dem Anionentransport betrachtet werden sollte.

2 Ergebnisse

2.2 Isolierung und Charakterisierung von SR-Vesikeln

2.2.1 Isolierung der SR-Vesikel

Die Präparation nativer Vesikel des sarcoplasmatischen Reticulums erfolgte mit einer modifizierten Methode nach de Meis und Hasselbach (Hasselbach & Makinose 1961; Meis de & Hasselbach 1971).

Die Hinterläufe eines frisch geschlachteten Kaninchens wurden zerkleinert und in einem EDTA-haltigen Kaliumphosphatpuffer aufgenommen. Durch eine erste Zentrifugation bei niedriger g-Zahl wurden zunächst Fett, Sehnen und Myofibrillen von der im Überstand befindlichen SR-Fraktion getrennt und durch eine weitere Zentrifugation bei höherer g-Zahl die Mitochondrien entfernt. Der dritte Zentrifugationsschritt führte zur Sedimentation der SR-Vesikel und ließ die Muskelproteine Actin, Tropomyosin und Troponin im Überstand zurück. Nachfolgend wurden die SR-Vesikel in einer Magnesium-ATP- und saccharosehaltigen Lösung stabilisiert und für die weitere Aufreinigung vier Ultrazentrifugationsschritten unterzogen.

Das den Puffern zugesetzte β-Mercaptoethanol schützt die Proteine und Lipide des SR vor der Oxidation durch Sauerstoff. Leupeptin verhindert als Proteaseinhibitor die Spaltung der SR-Proteine durch Cathepsin B und D, Papain, Trypsin und Plasmin. Zur Aufbewahrung wurde die SR-Fraktion in einem KCl-haltigen Triethanolaminpuffer homogenisiert, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Die Proteinbestimmung erfolgte nach einer modifizierten Biuret-Methode (Gornall *et al.* 1949). Die Proteinkonzentration lag präparationsabhängig zwischen 10 und 23 mg/ml bei einer Gesamtprotein-Ausbeute von 150 bis 430 mg.

2.2.2 Analyse der Proteinzusammensetzung nach gelelektrophoretischer Auftrennung

Die Probenentnahme des jeweiligen Sediments und Überstands während der Präparation ermöglichte eine visuelle Überprüfung der Präparation durch eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.



Abb. 2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese der Präparationsschritte Ü=Überstand, P=Pellet, SR=aufgereinigte Vesikelpräparation

Die nach dem letzten Aufreinigungsschritt entnommene Probe zeigt das typische Proteinmuster nativer SR-Vesikel. Neben der Ca²⁺-ATPase, die als Hauptbande mit einem Molekulargewicht (MW) von 110 kDa und als Dimer bei 220 kDa erscheint, sind noch der Ryanodinrezeptorkomplex (MW 2 Mda), das calciumspeichernde Calsequestrin (MW 63 kDa) und ein Glycoprotein (MW 53 kDa) als prominente Banden zu erkennen.

Nur Präparationen dieses Bandenmusters wurden weiteren Kontrollen zur Überprüfung des Vesikelzustands unterzogen. Die Grundlage bildete die Funktionsprüfung der Ca²⁺-ATPase. Sie macht mit 60 - 90% den Hauptbestandteil des SR-Proteins aus und ist in ihren Eigenschaften stark von der Qualität der Vesikelpräparation abhängig.

2.2.3 Präparationsanalyse anhand der Hydrolyseaktivität der Ca²⁺-ATPase

Der aktive Transport von Calciumionen in das Lumen der SR-Vesikel erfolgt unter ATP-Verbrauch und wird durch die Besetzung luminaler Ca²⁺-Bindungsstellen der Ca²⁺-ATPase zunehmend gehemmt (Guillan *et al.* 1988). Dieser Effekt kann zur Überprüfung der Dichtheit von SR-Vesikeln genutzt werden. Das bei der ATP-Hydrolyse freigesetzte anorganische Phosphat ist der Menge des transportierten Calciums proportional und wurde mit einer modifizierten Methode nach Fiske und Subbarow (Fiske & Subbarow 1925) bestimmt. Intakte Vesikel setzten bei einer freien Calciumionenkonzentration von 50 μ M und 1 mM ATP durchschnittlich 0.8 μ Mol Phosphat pro mg Protein und Minute frei.

Die Zugabe des Calciumionophors A23187 verhindert durch das Ausströmen von Calciumionen die luminale Hemmung, was in einer Steigerung der Hydrolyseaktivität gegenüber intakten Vesikeln um das 2-3 fache resultierte. Undichte Vesikel zeigten hier durch ihre ohnehin gesteigerte Hydrolyserate keine weitere Zunahme.



2.2.4 Präparationsanalyse anhand des ATP-stimulierten Calciumtransports

Ein weiteres Kriterium zur Überprüfung der Intaktheit von SR-Vesikeln liefert die Bestimmung des ATP-getriebenen Calciumtransports über die Messung der Anreicherung von ⁴⁵Calcium in den Vesikeln. Die maximale Calciumaufnahme in die SR-Vesikel beträgt 100-200 nMol/mg Protein, was sich jedoch durch die Zugabe des calciumpräzipitierenden Anions Oxalat (5 mM) um das 50-100fache steigern lässt (Hasselbach & Makinose 1963). Oxalat wird in Gegenwart von ATP in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 mit Calcium angereichert und fällt aufgrund des geringen Löslichkeitsproduktes von Calciumoxalat (Lp: 8.5 x 10⁻⁹ M) innerhalb der Vesikel aus (Ikemoto *et al.* 1981).

Der Calciumtransport wurde mit dem Filterassay-Verfahren nach Martonosi und Feretos gemessen (Martonosi & Feretos 1964). Intakte Vesikelpräparationen mit dichten Membranen zeigten eine Calciumtransportrate von $0.7 - 0.9 \mu$ Mol/mg Protein pro Minute bei einer maximalen Calciumakkumulation von 5 bis 10 μ Mol/mg Protein.

Im Verlauf einer Stunde nahm die akkumulierte Menge an Calcium nicht ab. Undichte Vesikel geben bereits innerhalb der ersten 20 Minuten einen Großteil des aufgenommenen Calciums wieder an das Außenmedium ab.



2.2.5 Auftrennung der Vesikelpräparation in HSR und LSR

Die weitere Auftrennung der Vesikelpräparation erfolgte durch die Zentrifugation über einen dreistufigen Saccharose-Dichtegradienten. Die Vesikelpopulation trennte sich dabei in zwei Fraktionen auf, die als *Heavy*-SR und *Light*-SR charakterisiert wurden. Das LSR stammt aus den longitudinalen SR-Zisternen. Das Hauptprotein ist hier die Ca²⁺-ATPase. Das HSR aus den terminalen Zisternen enthält zusätzlich große Mengen der Ca²⁺-Release-Kanäle.



Abb. 2.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von HSR und LSR

Die Unterschiede zwischen den beiden SR-Varianten treten nur als Intensitätsverschiebungen einzelner Banden in Erscheinung. Der Vergleich mit der Ausgangspräparation (s. Abb. 2.1) zeigt, dass in keiner der Fraktionen bestimmte Banden gänzlich fehlen. Die Bezeichnung HSR und LSR rührt von den unterschiedlichen Volumen/Protein Verhältnissen der beiden Fraktionen her.

2.3 <u>Charakterisierung, Modifikation und Optimierung der Anionenkanalmes-</u> <u>sungen mit der Filterassaymethode</u>

2.3.1 Anionenkanalmessungen

Zur Vermessung der Transporteigenschaften von Anionenkanälen stehen zwei grundsätzlich verschiedene Methoden zur Verfügung. Das *Tracer*-Flux-Assay dient dazu, den Anionenfluss durch den Gehalt eines radioaktiven Isotops innerhalb der SR-Vesikel zu bestimmen und über den zeitlichen Verlauf von Zu- oder Abnahme kinetische Parameter zu ermitteln.

Mit der Planarmembrantechnik (*Planar Lipid Bilayer* (PLB) -Technik) hingegen können die elektrischen Eigenschaften eines einzelnen Kanalproteins vermessen werden, welches durch Fusion in eine künstliche Membran eingebracht wurde. Die Messgröße ist hierbei die Leitfähigkeit für bestimmte Ionen bei einer definierten Spannung.

Durch die Gegenüberstellung der Vesikelfluxmessungen mit den aus der PLB-Literatur bekannten Daten über die Eigenschaften der Anionenkanäle des SR soll geklärt werden, inwieweit die mit beiden Methoden erzielten Ergebnisse vergleichbar sind.

2.3.1.1 Vesikelfluxmessungen mit der Filterassay-Methode

Die Filterassaymethode bietet die Möglichkeit, Anionenfluxphänomene im natürlichen Membranverband unter Beibehaltung von Lipidkomposition und Beschaffenheit der nativen SR-Vesikel zu untersuchen. Hierbei bleibt die Fähigkeit der Interaktion zwischen den verschiedenen SR-Proteinen bestehen, sodass etwaige direkte Wechselwirkungen, Kinasierungsysteme und die verschiedenen Komponenten der Signaltransduktion erhalten bleiben. Die Messung erfolgt weitgehend im Ionen-Gleichgewicht, da die Generierung und Aufrechterhaltung eines definierten Gradienten über die SR-Membran nicht möglich ist. Ebenso lässt sich keine konstante Spannung über die Membran erzeugen.

Die hohe Leistungsfähigkeit von Anionenkanälen, die sich im Falle des SR durch eine hohe Permeabilität für Chlorid äußert und die vergleichsweise geringe zeitliche Auflösung des Filterassays im Bereich von Minuten, erfordern die Applikation des nicht-physiologischen *Tracer*-Ions ³⁵SO₄²⁻, dessen Transferraten mit der zeitlichen Auflösung des Filterassays harmonieren.

Besonders problematisch ist die Heterogenität der Anionentransportsysteme des SR, da es mit dem Filterassay bislang nicht möglich ist, die Fluxphänomene den einzelnen Komponenten zuzuordnen. Die Mittelung über eine Vielzahl von Vesikeln mit unterschiedlichen Kanälen kann jedoch zu einem homogenen Abbild des Anionentransports innerhalb des SR unter verschiedensten Bedingungen führen.

2.3.1.2 Einzelkanalmessungen mit der PLB-Technik

Die Planarmembrantechnik (*Planar Lipid Bilayer* - PLB) ermöglicht die Messung an einem einzigen Kanalprotein und bietet somit einen Weg zur Unterscheidung der Anionentransportsysteme in unterschiedliche Kanalklassen. Die zeitliche Auflösung liegt je nach apparativer Ausrüstung und Auswertungsmethode im Bereich von Millisekunden, wodurch die detaillierte Betrachtung der sehr schnellen *Gating*-Vorgänge zur Ermittlung kurzer Offenund Geschlossenphasen und deren kinetischer Parameter ermöglicht wird. Ein besonderer Vorteil ist die seitenspezifische Wirkstoffzugabe und die Leitfähigkeits-Messung mit verschiedenen Ionen.

Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass die Rekonstitution der Kanäle in einen künstlichen Membranverband, der sich erheblich von der natürlichen Umgebung unterscheidet, zur Bildung von Artefakten führen kann und bei den Messungen natürliche Proteininteraktionen, wie sie erwiesenermaßen im nativen SR vorliegen, fehlen (Kourie 1999).

Voraussetzung für die Detektion des Anionflusses ist die Etablierung eines Gradienten oder das Anlegen einer Spannung, da Leitfähigkeits-Messungen im Gleichgewicht nicht möglich sind.

Gradientenbildung, Fusion der Vesikel und Fluxdetektion setzen hohe Konzentrationen von Cholinchlorid (250 mM), Ca²⁺ (1 mM) und Harnstoff (200 mM) voraus, die möglicherweise die Kanaleigenschaften beeinflussen oder sogar zur Artefaktbildung führen können.

2.3.2 Durchführung des Filterassays

Die Anionentransportmessungen wurden mit einer modifizierten Methode nach Kasai und Taguchi (Kasai & Taguchi 1981) durchgeführt. Die Vesikel wurden dazu in einem Puffer mit radioaktivem Sulfat vorinkubiert und die Messung anschließend durch die Verdünnung der Inkubationslösung in den Messpuffer ohne radioaktives Sulfat gestartet. Zwischen 0.5 und 10 Minuten wurden der Messlösung Aliquots entnommen und über einen Nitrocellulosefilter abgesaugt. Die proteinhaltigen Vesikel hafteten am Filter, der umgebende Messpuffer wurde durch Nachwaschen mit einer 0°C kalten Waschlösung entfernt. Die Bestimmung der Radioaktivität innerhalb der Vesikel erfolgte, nachdem die Proben mit Szintillationslösung versetzt wurden, im Szintillationszähler.

Ein Vergleich der Messungen in Anwesenheit und Abwesenheit von zusätzlichem, nichtradioaktivem Sulfat zeigte, dass die Ergebnisse ohne nichtradioaktives Sulfat besser reproduzierbar waren und überdies eine höhere Fluxrate erzielt werden konnte.

Da für die Messung des Fluxes entgegen den vormals durchgeführten Experimenten (Brojatsch 1987) die Einstellung des Donnan-Gleichgewichts nicht mehr erforderlich war, konnte die Messung nun zu einem beliebigen Zeitpunkt nach Inkubationsbeginn gestartet werden.

2.3.3 Auswertung der kinetischen Parameter des Filterassays

Der Verlauf der Standard-Effluxkurven folgte einer exponentiellen Funktion erster Ordnung, die durch nachstehende Gleichung beschrieben wird:

$$y = A \cdot e^{-B \cdot x} + C \tag{2.1}$$

Durch Einsetzen der entsprechenden Messparameter lässt sich die Radioaktivität innerhalb der Vesikel zu jedem beliebigen Zeitpunkt (*t*) bestimmen.

$$cpm_t = (cpm_0 - cpm_{\mathbf{x}}) e^{-kt} + cpm_{\mathbf{x}}$$
(2.2)

Da sowohl cpm_o als auch cpm_{∞} verschiedener Messungen in Abhängigkeit von Vesikelpräparation, Vesikelpopulation, Radioaktivität der Sulfatlösung, Inkubationsdauer und Hemmstoffart variieren können, wurde zur kinetischen Auswertung der Fluxexperimente der Proportionalitätsfaktor *k* (Geschwindigkeitskonstante Minute⁻¹) bestimmt. Da auch dieser Wert Schwankungen unterworfen ist, wurde zu jeder Messreihe eine Kontrollmessung durchgeführt, und anschließend die Fluxaktivität der verschiedenen Messungen miteinander in Beziehung gesetzt.

Beim Zusatz von Substanzen, die den Flux beeinflussen, konnte beobachtet werden, dass die erhaltenen Kurven in einigen Fällen nicht mehr ideal der Form einer einzigen Exponentialfunktion folgten, sondern z.T. erheblich besser als Überlagerung von zwei oder sogar drei Exponentialfunktionen beschrieben werden konnten. Dies führte zu der Annahme, dass sich der durch k_{gesamt} charakterisierte Gesamtflux aus mindestens zwei unabhängigen Fluxvorgängen unterschiedlicher Kinetik zusammensetzt, für die jeweils eigene Fluxparameter (cpm_0 ' und k') gelten.

$$cpm_t = (cpm_0 - cpm_{\mathbf{x}}) e^{-kt} + (cpm_0' - cpm_{\mathbf{x}}) e^{-k't} + (cpm_0'' - cpm_{\mathbf{x}}) e^{-k''t} + cpm_{\mathbf{x}}$$
 (2.3)

Obwohl eine indirekte Ermittlung dieser Parameter über die mathematische Anpassung der Messkurve oder die graphische Analyse der halblogarithmischen Auftragung möglich ist, lassen die erhaltenen Daten dennoch keinen Rückschluss auf die Eigenschaften der einzelnen, aus PLB-Experimenten bekannten Anionentransportwege zu, da die hierfür erforderlichen physiologischen Daten zur Unterscheidung im Fluxexperiment bislang fehlen.

In früheren Arbeiten des Instituts (Brojatsch 1987; Volz 1987) wurde versucht, das Phänomen durch das Vorhandensein einer schnellen und einer langsamen Fluxkomponente zu erklären, die aus dem Efflux aus heteromorphen Vesikeln mit mehr als einem Kanal und unterschiedlich großem Volumen resultieren sollten.

Dagegen spricht, dass eine signifikante Mehrphasigkeit erst bei der Abweichung von den Grundbedingungen auftritt und aufgrund der Heterogenität der Vesikelpopulation mehr als nur zwei Vesikelarten unterschiedlicher Größe existieren (Brojatsch 1983).

Auch Kasai (Kasai & Nunogaki 1993) widmete sich diesem Problem und maß dem Parameter k eine neue Bedeutung bei, indem er versuchte, in Anlehnung an die Einzelkanalmessungen k nicht als Zeitkonstante der Ionenpassage durch den Kanal, sondern als Komponente des komplexen *Gating*-Prozesses zu beschreiben. Die Aufspaltung von k in zwei voneinander unabhängige Parameter, die den Übergang von Geschlossen- und Offen-Phasen des Kanals kinetisch widerspiegeln, konnte experimentell jedoch nicht nachvollzogen werden.

Vielmehr muss angenommen werden, dass sich im Wert von k die Grundpermeabilität des SR in einem bestimmten Zustand ausdrückt, die durch die Funktion der bekannten Anionenkanäle (vgl. 1.7.2) bedingt wird. Die Wirkung hemmender oder stimulierender Substanzen tritt für die unterschiedlichen Anionentransportsysteme unabhängig voneinander ein und bedingt so das z.T. komplexe Wirkschema der verschiedenen Liganden.

Darüber hinaus ist bekannt, dass DIDS im Einzelkanalexperiment nur 60 - 80% der homologen Kanäle zu hemmen vermag (Kourie et al. 1996b), was die häufig beobachtete unvollständige Hemmung des Effluxes erklärt. Die Steigerung des Fluxes über das Maß der als optimal ermittelten Grundbedingungen hinaus kann auf die Aktivierung vormals ,stiller' Kanäle zurückzuführen sein, die ihre Wirkung spannungs, bzw. ligandenabhängig entfalten und so einer Initiierung bedürfen.

Der Proportionalitätsfaktor k ist die Geschwindigkeitskonstante des Effluxes nach der Formel 2.2. Liegt sein Wert oberhalb des Wertes für die Kontrollkurve, ist der Flux gesteigert, liegt er unterhalb ist der Flux gehemmt. Nach diesem Kriterium wurden die den Flux beeinflussenden Substanzen in Inhibitoren und Aktivatoren eingeteilt. Dabei muss berücksichtigt werden, dass die eingesetzten Substanzen durchaus einen der Kanäle hemmen, einen anderen aber stimulieren können, was sich in einer nur geringen k-Wert-Änderung ausdrücken würde.

Auch die Parameter cpm_0 und cpm_∞ der verschiedenen Experimente liefern weitergehende Informationen über die Ligandenwirkung. In einigen Fällen konnte beobachtet werden, dass die Zugabe bestimmter Liganden zunächst zu einem schnellen Ausfluss des *Tracers* in der Anfangsphase führte, dann jedoch in einem insgesamt gehemmten Flux mit erhöhtem cpm_∞ resultierte.

Andere Untersuchungen wiederum ergaben erhöhte k-Werte, wenn die Kurve deutlich oberhalb der Kontrollkurve begann, sich dann aber schneller als diese dem gleichen cpm_{∞}-Wert annäherte. Für dieses augenscheinliche Paradoxon konnte keine detaillierte Erklärung gefunden werden, die Vermutung drängt sich jedoch auf, dass gegenläufige Reaktionen der verschiedenen Anionenkanalklassen auf den entsprechenden Wirkstoff diese Kurvenformen bedingen.

Frühere Untersuchungen in unserem Institut legten zur Auswertung des Fluxes den cpm_o-Wert einer "vollständig" mit 300 μ M DIDS gehemmten Kurve zugrunde. Die Unterschiede, die sich von Messreihe zu Messreihe ergaben und die letztgenannten Beobachtungen der "paradoxen" Effluxkurven ließen dies jedoch nicht länger zu, sodass zur Ermittlung des *k*-Wertes die rechnergestützte mathematische Anpassung nach Formel 2.2 verwendet wurde.





B ,Paradoxe' Effluxkurven werden bei der mathematischen Auswertung der Effluxrate wie ,normale' Kurven behandelt.

2.3.4 Beladung der Vesikel durch Vorinkubation

Eine optimale und gleichmäßige Befüllung der Vesikel bildet die Voraussetzung für reproduzierbare Messungen mit der *Tracer*-Efflux-Methode. Im Vergleich zum Efflux, der ohne Hemmstoff innerhalb weniger Minuten abgeschlossen ist, ist die Befüllung vergleichsweise langsam und dauert bis zur vollständigen Einstellung des Gleichgewichts bei einer Temperatur von 20°C mindestens eine Stunde.

Die Beladung erfolgte durch die Inkubation der SR-Vesikel mit einer geringen Menge [35 S]-K₂SO₄ (~ 75-100 µM). Der Befüllungsgrad wurde anhand des cpm_o-Wertes bestimmt. Bereits nach 15 Minuten waren die Vesikel zu 89% befüllt, der Vorgang war jedoch erst nach 60 Minuten abgeschlossen. Die Effluxraten unterschieden sich nur unwesentlich, und auch die halblogarithmische Auftragung der Kurven ergab keine Mehrphasigkeit des Effluxes, wie sie die ungleiche Beladung von Vesikeln mit unterschiedlich schnellen Kanälen hervorrufen würde. Eine Unterscheidung von Vesikelklassen über die Variation der Inkubationszeit war somit nicht möglich, da das Verhältnis der Fluxparameter der verschiedenen Vesikelklassen beim Influx bestehen zu bleiben scheint, obgleich dieser im Vergleich zum Efflux um den Faktor 10 verlangsamt ist.

Inkubationsdauer	Befüllungsgrad	Effluxrate
15 Minuten	89%	$k=1.18\pm0.012$
30 Minuten	90%	$k = 1.16 \pm 0.013$
45 Minuten	94%	$k=1.18\pm0.012$
60 Minuten	99%	$k=1.19\pm0.015$
90 Minuten	100%	$k=1.19\pm0.014$
120 Minuten	100%	$k=1.18\pm0.013$

Tabelle 2.1

Befüllungsgrad der SR-Vesikel und resultierende Effluxrate in Abhängigkeit der Inkubationsdauer

2.3.4.1 Variation der SR-Protein-Konzentration

Um den Einfluss der SR-Proteinkonzentrationen während der Inkubation auf die Beladung und das Effluxverhalten zu untersuchen, wurden SR-Mengen von 80 bis 800 μ g mit einer definierten Menge ³⁵SO₄²⁻ inkubiert und anschließend vermessen. Die Analyse der *k*-Werte ergab keine Unterschiede im Effluxverhalten. Die Auftragung der aufgenommenen Radioaktivität gegen die Proteinkonzentration (Vesikelvolumen) ergab eine nicht ideal lineare Abhängigkeit beider Parameter.





2.3.5 Beladung der Vesikel durch Extrusion

Die Beladung der Vesikel mit ${}^{35}SO_4{}^{2-}$ mittels der Extrusion des Inkubationsansatzes durch eine Polycarbonatmembran der Porenweite 200 nm ersetzte den Inkubationsschritt bei gleichzeitiger Homogenisierung der Vesikelgröße. Eine Verringerung der Fluxraten-Streuung, die zunächst auf unterschiedlich große Vesikel zurückgeführt wurde, konnte nicht beobachtet werden. Als neue Fehlerquelle trat ein erhöhter Basiswert (cpm_∞) auf, der von befüllten Vesikeln ohne Anionenkanäle herrührte. Außerdem führte die bei der Arbeit an rekonstituierten Vesikeln niedriger Proteinkonzentration erfolgreich eingesetzte standardisierte Extrusion zur Wiederherstellung der Vesikelstruktur nach dem Auftauen bei der Anwendung an SR-Vesikeln zu einem erheblichen Proteinverlust, weshalb diese Methode nur zur Klärung einiger spezieller Fragestellungen zum Einsatz kam (Schuster 1995).

2.3.6 Optimierung des Filterassays

Das wichtigste Kriterium zum Erhalt reproduzierbarer Ergebnisse mit dem Filterassay besteht neben der gleichmäßigen Befüllung der Vesikel in der Kontinuität von Probenentnahme aus der Messlösung, Applikation auf den Nitrocellulosefilter und dem anschließenden Nachwasch. Diverse Untersuchungen mit unterschiedlichen Puffern und Nachwaschvolumina zeigten, dass diese im Vergleich zur Puffertemperatur und der Art und Weise der Applikation nur eine untergeordnete Rolle spielten. Der Einfluss der Kühlung des Wasch-Puffers auf 0°C und die Erzielung eines bei jeder Probe gleichartigen, laminaren Nachwaschstroms auf die Qualität der Messwerte war erheblich größer.

Für die mathematische Auswertung der Effluxkurven war der Erhalt möglichst vieler, kurz aufeinanderfolgender Messwerte bereits in der Anfangsphase des Effluxes erwünscht. Die Analyse mehrerer Kontrollexperimente ergab jedoch, dass der erste Messwert (15 Sekunden) im Gegensatz zum zweiten Messwert (30 Sekunden) technisch bedingt erheblichen Schwankungen von bis zu 25% unterworfen war, was sowohl die graphische als auch die mathematische Auswertung erschwerte und die Ergebnisse entsprechend verfälschte.



Abb. 2.7

Vergleich mehrerer ³⁵SO₄²⁻-Efflux-Kontrollkurven

Die Werte des ersten Messpunktes (15 Sekunden) der Kontroll-Kurven differieren erheblich mehr als alle folgenden, was durch den Auftrag der Standardabweichungen der Messpunkte verdeutlicht wird. Um die Genauigkeit der Ergebnisse der graphischen und mathematischen Auswertung zu erhöhen, wird der erste Messwert nach erst 30 Sekunden genommen.

Sowohl die Steilheit der Kurve in der Anfangsphase, bei der auch kleine zeitliche Abweichungen während der Probennahme fatale Auswirkungen auf die Messgenauigkeit haben können, als auch die möglicherweise unzulängliche Durchmischung von Inkubationsund Messpuffer bewirken die Limitierung der zeitlichen Auflösung des Filterassays. Auch der Versuch, durch einen alternativen Messaufbau ,schnelle' Werte mit erhöhter Genauigkeit zu erhalten, führte zu keinem eindeutigen Ergebnis.

Im Weiteren wurde deshalb zugunsten einer Verbesserung von Messpunkt-Qualität und Proben-Durchmischung auf den 15-Sekunden-Wert verzichtet und die Messung erst nach 30 Sekunden begonnen.

2.3.6.1 Standardapplikation

Bei der Standardapplikationsmethode wurden der Messlösung zu definierten Zeiten Proben entnommen und auf den Filter aufgetragen. Die Vorgänge der Spitzenaufnahme, des sorgfältigen Probenaufzugs und Probenauftrags auf den Filter sowie der anschließende Spitzenabwurf limitierten die Messpunktfrequenz auf 20-30 Sekunden, was besonders in der Anfangsphase zur Erzielung sicherer Messwerte nicht ausreichend war. Unvermeidliche Volumendifferenzen beim schnellen Probenaufzug führten überdies zu einer erheblichen Streuung der Messdaten.

2.3.6.2 Einsatz der Step-Pipette

Bei der Applikation mit der *Eppendorf-Multipette* wurde die Inkubationslösung in den Messpuffer pipettiert, kurz durchmischt und anschließend der gesamte Ansatz in eine 5 ml Multipettenspitze aufgenommen. Zu gegebenen Zeitpunkten wurde dann das Proben-Volumen auf den Filter aufgebracht und wie in 2.2.2 weiterbehandelt. Obwohl die Multipette technisch mit einer um 1-5% höheren Volumenungenauigkeit behaftet ist, ermöglichte ihr Einsatz trotzdem einen Anstieg der Messgenauigkeit. Durch die Verkürzung der Messpunkt-intervalle auf 10 bis 15 Sekunden konnte eine signifikante Verbesserung der Resultate durch mathematische Anpassung erzielt werden.
2.3.7 Anpassung der Versuchsbedingungen der Vesikelfluxexperimente an die PLB-Bedingungen

In Analogie zu den PLB-Messungen von Kourie (Kourie 1997a; Kourie et al. 1996b) wurde die Puffersubstanz MOPS durch HEPES ersetzt. Dies hatte den Vorteil, dass HEPES aufgrund seiner pK-Werte im Bereich von pH 6.4 bis 7.2 besser puffert und im Gegensatz zu MOPS keinen Einfluss auf den Ca²⁺-Transport hat (Ishihara & Welsh 1997; Stephan *et al.* 1990). Weiterhin wurde das Kaliumsulfat (4 mM) im Messpuffer gegen Kaliumchlorid (100 mM) ausgetauscht, sodass osmotische Effekte beim Wechsel vom Inkubations- in das Messmedium ausblieben und überdies Chlorid-Ionen zur eventuellen Regulation vorhanden waren. Hemmende Effekte von SO_4^{2-} , die bereits bei Konzentrationen im niedrigen millimolaren Bereich auftreten können, wurden ebenfalls eliminiert (Tanifuji et al. 1987). Die Umstellung des Puffersystems resultierte in einer um 25% erhöhten Effluxrate.



Abb. 2.8Sulfat-Effluxraten in Abhängigkeit von pH-Wert und PuffersubstanzDas pH-Optimum des Sulfat-Effluxes liegt unabhängig von der Puffersubstanz bei pH 6.5.

Das Optimum der Fluxexperimente liegt bei pH 6.5, PLB-Experimente werden jedoch bei pH 7.4 durchgeführt. Besonders sensibel auf pH-Änderungen reagiert das ,*Gate*' der Kanäle, da hier die Ladung bestimmter Proteindomänen eine entscheidende Rolle spielt. Auch die Ladungsveränderung an der Durchtrittspore oder der Ionenbindungsstelle und eine mögliche Modifikation der Spezifität können die erhöhte Fluxrate bei niedrigerem pH bedingen. Die Versuche haben gezeigt, dass der pH-Shift zwar den Betrag des Fluxes erhöht, jedoch keinen Einfluss auf die konzentrationsabhängige Wirkung von Aktivatoren und Inhibitoren hat. Zugunsten der besseren Detektierbarkeit der z.T. nur geringen Effekte wurden die Fluxexperimente weiterhin bei pH 6.5 durchgeführt und der pH des Messpuffers nur in Hinblick auf besondere Fragestellungen variiert.

2.4 Sulfat-Effluxexperimente

Zur Untersuchung der Rolle der Anionen und ihrer Kanäle im SR wurde zum einen die Wirkung sowohl bekannter als auch speziell synthetisierter Hemmstoffe und Aktivatoren charakterisiert, zum anderen sollte jedoch besonders die Frage nach den physiologischen Regulationsmechanismen im Mittelpunkt der Untersuchungen stehen. Es wurden hierfür verschiedene physiologische Substanzen und deren Derivate eingesetzt. Ein besonderes Augenmerk lag dabei auf der möglichen Wechselbeziehung von Anionentransport und den Calcium-Transportsystemen Ca²⁺-ATPase und Ca²⁺-Release-Kanal.

2.4.1 Der Einfluss verschiedener Kationen auf den [³⁵S]Sulfatflux

2.4.1.1 Calcium

Aufgrund der zentralen Rolle von Calcium in der Funktion des SR wurde seine Wirkung auf den Anionentransport untersucht. Wie in PLB-Experimenten von Kourie (Kourie et al. 1996b) gezeigt werden konnte, stimuliert Calcium den BCl Kanal und ist Voraussetzung für die Funktion des SCl.

Beim ³⁵SO₄²⁻-Effluxexperiment führte Calciumchlorid (CaCl₂) zu einer Steigerung der Effluxrate auf 150% der Kontrolle. Im Konzentrationsbereich unterhalb von 500 µM zeigte sich keine Wirkung, dann jedoch stieg die Effluxrate steil an und erreichte ihr Maximum bei 1.9 mM. Der Wendepunkt der sigmoidalen Aktivierungskurve lag bei 0.95 mM CaCl₂. Die starke Aktivierung ist möglicherweise auf eine Stimulation der den Flux bedingenden Anionenkanäle sowie die Initiation vormals stiller Kanäle wie dem SCl zurückzuführen.



Abb. 2.9 Konzentrationsabhängige Steigerung der ³⁵SO₄²⁻-Effluxrate durch CaCl₂

2.4.1.2 Magnesium

Magnesiumionen dienen bei einer Vielzahl katalytischer Prozesse als Cofaktoren und sind beim Ca^{2+} -Transport durch die Ca^{2+} -ATPase unverzichtbar.

Im ${}^{35}SO_4{}^{2-}$ -Efflux-Experiment führte die Zugabe von Magnesiumionen zu einer Stimulation. Das Maximum wurde bei 1.5 mM Mg²⁺ erreicht und führte in Abhängigkeit vom eingesetzten Magnesiumsalz zu einer Steigerung der Fluxrate auf 115% bis 158% der Kontrolle.

Die für Magnesiumchlorid ermittelte Aktivierungskurve ist in Abb. 2.10 dargestellt. Die Fluxrate wurde hier um 30% gegenüber der Kontrolle erhöht. Die konzentrationsabhängige Steigerung hatte in der Anfangsphase einen sehr steilen Verlauf und erreichte die halbmaximale Stimulation (S_{50}) bereits bei 80 μ M MgCl₂.

Die drei eingesetzten Magnesiumsalze MgCl₂, MgSO₄ und Magnesiumacetat (MgOAc) unterschieden sich in ihrer maximalen Stimulationswirkung, wobei MgSO₄ vermutlich aufgrund der hemmenden Wirkung von SO_4^{2-} im Vergleich zu MgCl₂ eine weniger starke Stimulation bewirkte. Besonders deutlich war die durch MgOAc hervorgerufene Steigerung, bei der die Fluxrate 58% über der Kontrolle lag.

Bei allen weiteren Messungen, die einer Zugabe von Magnesium-Ionen bedurften, wurde $MgCl_2$ eingesetzt und im Folgenden darauf geachtet, dass die freie Mg^{2+} -Konzentration mit mindestens 2 mM im Bereich des Maximalniveaus lag.



Abb. 2.10 Konzentrationsabhängige Steigerung der ³⁵SO₄²⁻-Effluxrate durch MgCl₂ Andere Magnesiumsalze führen ebenfalls zur Stimulation, zeigen jedoch Unterschiede im Maximalwert.

Eine ähnliche, stimulierende Wirkung konnte auch mit Zinkchlorid herbeigeführt werden. Deren Maximalwert betrug jedoch nur 118% der Kontrolle bei 1 mM ZnCl₂.

Der aktivierende Einfluss von Lithiumionen war wesentlich geringer. Selbst 3 mM LiCl erhöhten die Fluxrate nur um 8%.

2.4.1.3 Cholinchlorid

Cholinchlorid dient bei den PLB-Experimenten durch asymmetrische Zugabe zur Bildung eines Chlorid Gradienten sowie eines Potentials über die planare Membran, da das Cholinium-Ion aufgrund seiner Größe nicht membrangängig ist. Die Konzentration variiert hierbei von 50 bis 250 mM. Der Einsatz von 5 - 100 mM Cholinchlorid im Effluxexperiment führte zu einer Steigerung der Effluxrate um 58%.

Dabei muss berücksichtigt werden, dass das Cholinchlorid bei der Applikation in den Messpuffer ausschließlich auf der Außenseite der Vesikel wirksam wird und neben einer möglichen stimulierenden Wirkung der Cholin-Ionen auch osmotische sowie elektrische Effekte durch die Ausbildung eines gradientenabhängigen Potentials wahrscheinlich sind.



Abb. 2.11 Konzentrationsabhängige Steigerung der ³⁵SO₄²⁻-Effluxrate durch Cholinchlorid

2.4.2 Untersuchung diverser Hemmstoffe auf ihre Wirkung auf den [³⁵S]Sulfat-Efflux

Der Einsatz unterschiedlicher Hemmstoffe und stimulierender Substanzen gilt als klassische Methode zur Untersuchung und Charakterisierung von Ionenkanälen. Neben der Einordnung in verschiedene Anionenkanalklassen bietet eine hohe Spezifität der Substanzen auch die Möglichkeit der Affinitätsmarkierung und affinitätschromatographischen Aufreinigung der Kanalproteine.

Im Falle des SR erschwert der hohe Anteil der Ca^{2+} -ATPase am Gesamtprotein diese Methoden. Zum einen führt die im Vergleich große Proteinmenge häufig zu unspezifischen Bindungen, die eine Markierung der Kanalproteine überlagern, zum anderen sind die effektivsten Hemmstoffe des Anionentransports ebenso Hemmstoffe der Ca²⁺-ATPase (s.u.).

Ein Hauptziel der Hemmstudien war somit die Ermittlung und Synthese eines ebenso spezifischen wie effektiven Hemmstoffes der Anionenkanalsysteme, der eine verminderte Affinität zur Ca^{2+} -ATPase aufweisen und somit die Markierung und Aufreinigung der Anionenkanal-Proteine ermöglichen sollte.

2.4.2.1 Ca²⁺-ATPase und Anionentransport

Die Beobachtung, dass mit der Ca²⁺-ATPase-vermittelten Calcium-Akkumulation eine stöchiometrische Anreicherung von Anionen in den SR-Vesikeln stattfindet (Hasselbach & Makinose 1963), führte zu der Vermutung, dass die Ca²⁺-ATPase selbst als Vermittler des Anionentransportes fungiert (Volz 1987). Diese These wurde dadurch gestützt, dass sich die

 Ca^{2+} -ATPase durch die Zugabe des Stilbenderivates 4,4'-Diisothiocano-2,2'-stilbendisulfonat (DIDS) hemmen lässt. Dieses ist als äußerst wirkungsvoller Inhibitor des Bande-3-Anionentransporters der Erythrocyten mit einer halbmaximalen Hemmkonzentration (I₅₀) von 40 nM (Falke & Chan 1986) bekannt und gilt bislang ebenfalls als stärkster Hemmstoff der Anionentransportsysteme des SR (Restaktivität 5-10%, I₅₀ 4 µM) (Campbell & MacLennan 1980; MacLennan et al. 1980).



Abb. 2.12 DIDS 4,4'-Diisothiocano-2,2'stilbendisulfonat

Brojatsch (Brojatsch 1987) versuchte zu klären, ob die Hemmung der Ca²⁺-ATPase durch DIDS direkt erfolgt oder auf einen sekundären Hemmeffekt durch die Blockade der Anionenkanäle des SR zurückzuführen ist. Seine Beobachtung, dass die I₅₀ bei der Calcium-Akkumulation gegenüber dem Anionentransport um den Faktor 10 auf 43 μ M erhöht ist, zeigte, dass DIDS auf beide Systeme unterschiedlich wirkt. Die Untersuchung lieferte jedoch keinen Beweis dafür, dass keine direkte Wechselwirkung von Ca²⁺-ATPase und gehemmten Anionentransporter besteht, umso mehr als sich die Puffersysteme von Calcium-Akkumulation und ³⁵SO₄²⁻-Effluxmessungen erheblich unterschieden.

Durch Ca²⁺-Transportmessungen an rekonstituierten Vesikeln, die aufgereinigte Ca²⁺-ATPase enthielten, konnte gezeigt werden, dass DIDS auch hier die Calcium-Akkumulation hemmt (Hemling 1994; Schuster 1995).

Um nun auch einen direkten Zusammenhang von Ca^{2+} -ATPase und Anionentransport gänzlich ausschließen zu können, wurden rekonstituierte Vesikel (rVesikel) zu ³⁵SO₄²⁻-Effluxmessungen eingesetzt. Zuvor wurde die Funktion und Intaktheit der rVesikel nach der Rekonstitution durch die Messung der aktiven Calcium-Akkumulation überprüft (vgl. 2.1.3). Wie Abb. 2.13 B zeigt, tritt während der Inkubation von rVesikeln bezüglich des ³⁵SO₄²⁻ kein Ausgleich zwischen Inkubatsionsmedium und Lumen der Vesikel ein, wodurch deutlich wird, dass rVesikel keinen ³⁵SO₄²⁻ Influx aufweisen.

Um zu überprüfen, ob rVesikel für ${}^{35}SO_4{}^{2-}$ gänzlich impermeabel sind oder im Gegensatz zum ${}^{35}SO_4{}^{2-}$ -Influx einen ${}^{35}SO_4{}^{2-}$ -Efflux zulassen, wurde das Experiment mit Vesikeln wiederholt, die mit Hilfe der unter 2.2.6 beschriebenen Extrusionsmethode befüllt wurden. Auch der Efflux konnte hier nicht nachgewiesen werden.

Als Kontrolle dienten sowohl native SR Vesikel, die das typische Effluxverhalten aufweisen, als auch proteinfreie Asolektinvesikel ohne Ca²⁺-ATPase, die ebenfalls mit der Extrusionsmethode befüllt werden mussten. Auch hier wurde wie bei den rVesikeln kein ³⁵SO₄²⁻-Efflux detektiert. Die Asolektinvesikel konnten aufgrund des fehlenden Proteinanteils nicht mit der Filterassaymethode vermessen werden, da sie nicht an der Nitrocellulose haften. Nach Entnahme der Proben aus der Messlösung wurde das extravesikuläre ³⁵SO₄²⁻ über eine kleine Ionenaustauschersäule (DEAE-Sephadex 50) entfernt und die Radioaktivität innerhalb der im Durchlauf befindlichen Vesikel in Analogie zum Filterassay im Szintillationszähler bestimmt.



Abb. 2.13 Messung an rekonstituierten Vesikeln, die aufgereinigte Ca²⁺-ATPase enthalten (rVesikel)
A Aktiver Ca²⁺-Eintransport in rVesikel. Das Erreichen eines Plateaus der Akkumulation weist auf intakte Vesikel hin. Ohne ATP ist keine Akkumulation zu beobachten.

B [³⁵S]Sulfat-Effluxkurven verschiedener Vesikelarten. rVesikel weisen wie proteinfreie Asolektinvesikel keine Permeabilität für Sulfat auf.

In einer weiteren Untersuchung wurde die Wirkung von Thapsigargin auf den ${}^{35}SO_4{}^{2-}$ -Efflux überprüft. Es handelt sich hierbei um einen der stärksten Hemmstoffe der Ca²⁺-ATPase, der sowohl Calcium-Transport als auch die ATP-Hydrolyse bereits bei Konzentrationen von 0.1 nM blockiert (Kijima *et al.* 1991; Sagara & Inesi 1991). In höheren Konzentrationen (5 μ M) wurde eine hemmende Wirkung auch für den Calcium-Release-Kanal beschrieben (Zhou & Bers 2000).

Der Einsatz von Thapsigargin bei ${}^{35}SO_4{}^{2-}$ -Efflux-Messungen hatte im Gegensatz dazu keinen hemmenden, sondern einen leicht stimulierenden Effekt. Es ist damit die erste bekannte Substanz, die bei aktivem Calcium-Eintransport und ${}^{35}SO_4{}^{2-}$ -Flux gegenläufige Effekte hervorruft. Die maximale Stimulation wurde mit 11% ermittelt, die halbmaximale Stimulationskonzentration (S_{50}) beträgt 55 nM.



2.4.2.2 Einfluss von PPAPS, PPANS und PPAC auf den [³⁵S]Sulfat-Efflux

Die Suche nach einem Hemmstoff, der im Vergleich zu DIDS eine geringere Affinität zur Ca^{2+} -ATPase bei gleichzeitig erhöhter Hemmwirkung auf den Anionentransport aufweisen sollte, führte zu der Synthese diverser Substanzen mit unterschiedlichen Eigenschaften. Pyridoxalphosphat-6-azophenyl-2'-sulfonsäure (PPAPS), das bereits früher zu Hemmstudien am Anionentransport eingesetzt wurde (Brojatsch 1987; Volz 1987), wies gegenüber DIDS bei vergleichbarer maximaler Nettohemmung einen erhöhten I₅₀ Wert von 45-55 μ M auf, was auf eine verringerte Affinität rückschließen ließ. Die von Nern (Nern 1995) durchgeführten Untersuchungen ergaben, dass PPAPS ebenfalls mit hoher Affinität an die Ca²⁺-ATPase bindet und bei einer halbmaximalen Hemmkonzentration von 10 - 20 μ M sowohl den Calcium-Transport als auch die ATP-Hydrolyse durch native und rekonstituierte Vesikel hemmt.



Abb. 2.15 PPAPS Pyridoxalphosphat-6-azophenyl-2'sulfonsäure Durch die Addition einer Nitrogruppe an den Azophenylrest wurde die Substanz Pyridoxalphosphat-6-azophenyl-4'-nitro-2'-sulfonsäure (PPANS) synthetisiert. Diese Veränderung führte im Vergleich zu PPAPS zu einer stark erhöhten Affinität zu den Anionenkanälen, was sich in einer I₅₀ von nur noch 4.5-6.5 μ M PPANS äußerte. Dieser Wert ist mit dem für DIDS (I₅₀ = 4 μ M) vergleichbar. Die Restaktivität des ³⁵SO₄²⁻-Effluxes wurde mit 4-6% bestimmt, was PPANS gegenüber DIDS als den effektiveren Hemmstoff ausweist.



Abb. 2.16 PPANS Pyridoxalphosphat-6-azophenyl-4'-nitro-2'sulfonsäure

Durch die Kopplung eines Chinolin-Rests an das Pyridoxalphophat entstand die Substanz Pyridoxalphosphat-6-azochinolin (PPAC), die bei einer I_{50} von 32-37 μ M die Effluxrate ebenfalls mit höherer Affinität verminderte als PPAPS, bei einer verbleibenden Restaktivität von 18-22% jedoch weder an die Hemmwirkung von PPANS noch von PPAPS heranreichen konnte.



2.4.2.3 Wirkung der Polyanionen Polyaspartat und Polydextransulfat

Der Beobachtung, dass die Pyridoxalphosphat-Hemmstoffe durch die Einführung weiterer negativ geladener Gruppen an Effizienz gewannen, folgte der Test der Polyanionen Polyaspartat (pAsp) und Polydextransulfat (PDS).

Beide Substanzen gelten als hemmende Wirkstoffe am VDAC (Colombini et al. 1996), die mit hoher Affinität binden durch eine Modifikation der Spannungsabhängigkeit des Kanals zu einer Inhibition führen.

Die erwartete Hemmwirkung auf den ${}^{35}SO_4{}^{2-}$ -Efflux konnte jedoch mit keiner der beiden eingesetzten Substanzen hervorgerufen werden. Auch Konzentrationen von 2 mg/ml PDS waren nicht in der Lage, den Efflux um mehr als 8% zu vermindern.

Dieses Ergebnis zeigt, dass nicht allein die negativen Ladungen die Hemmwirkung bedingen, sondern die Struktur des Hemmstoffes einen großen Einfluss auf dessen Bindung und damit die Funktion ausübt.

Die geringe Hemmwirkung der Polyanionen lässt den VDAC als einen der Hauptvermittler des ³⁵SO₄²⁻-Effluxes unwahrscheinlich erscheinen.

2.4.2.4 Picrotoxin und Strychnin

Zur Detektion von Hemm-Mustern, die eine mögliche Zugehörigkeit zu bekannten Anionenkanal-Familien aufdecken sollten, wurden auch klassische, aus der Neurophysiologie bekannte Chloridkanal-Hemmstoffe auf ihre Wirkung auf den Anionentransport des SR hin überprüft.

Strychnin, ein hochwirksamer alkaloider Glycin-Rezeptor-Antagonist der motoneuronalen Synapsen (dort $I_{50} = 4 \text{ nM}$), führte beim ³⁵SO₄²⁻-Efflux auch bei einer Konzentration von 300 μ M zu keiner Hemmung.

Auch unter Verwendung von Picrotoxin, einem Antagonisten der zentralen GABA-A-Rezeptoren, konnte bei $300 \,\mu\text{M}$ keine hemmende Wirkung auf die Effluxrate beobachtet werden.

2.4.3 Ryanodinrezeptor und Anionentransport

Wie bereits unter 1.7 beschrieben, ist ein genereller Zusammenhang von Calcium- und Anionentransport wahrscheinlich. Da sowohl eine funktionelle wie auch topologische Assoziation von SR-Anionenkanälen und der Ca²⁺-ATPase ausgeschlossen scheint (Kourie 1997a) (vgl. 2.3.2.1), sollte nun überprüft werden, ob eine Kopplung von Anionenkanälen und Calcium-Release-Kanal besteht.

Hierzu wurde der Effekt unterschiedlicher Substanzen auf den ³⁵SO₄²⁻-Efflux überprüft, die laut Literatur eine inhibierende oder aktivierende Wirkung am Ryanodinrezeptor besitzen.

Die Bewertung der Substanzwirkung auf den RyR kann durch die Beobachtung dreier unterschiedlicher Effekte erfolgen. Eine Möglichkeit besteht in der Beobachtung der Veränderung von Leitfähigkeit bzw. Offenwahrscheinlichkeit im Einzelkanalexperiment. Ein weiteres Kriterium ist die Auslösung des Ca²⁺-Release aus befüllten Vesikeln. Zusätzlich kann auch das Maß der Ryanodinbindung an das Protein zur Charakterisierung herangezogen werden.

Calcium, welches den ${}^{35}SO_4{}^{2-}$ -Efflux eindeutig stimuliert (vgl. 2.2.1), übt eine ambivalente Wirkung auf den RyR aus. Geringe Konzentrationen im micromolaren Bereich aktivieren den Kanal. Wird die Ca²⁺-Konzentration jedoch auf submillimolare und millimolare Mengen erhöht, so führt dies zur Hemmung (Laver et al. 1995).

Dieser inhibierende Effekt kann auch durch andere zweiwertige Kationen wie Magnesium oder Barium ausgelöst werden, die Stimulation bei niedrigen Konzentrationen bleibt hier jedoch aus (Coonan & Lamb 1998; Palade 1987; Wyskovsky 1994).

2.4.3.1 Ryanodin

Ryanodin bindet mit extrem hoher Affinität an den Calcium-Release-Kanal, weshalb dieser auch als Ryanodinrezeptor bezeichnet wird.

Wie auch für Calcium (vgl. 2.3.3) wird für Ryanodin eine konzentrationsabhängig gegensätzliche Wirkung beschrieben. Im Konzentrationsbereich um 20 nM wird der RyR geöffnet, eine Erhöhung auf 45-85 µM jedoch hemmt den Kanal (Valdivia & Coronado 1989).

Im ${}^{35}SO_4{}^{2-}$ -Effluxexperiment zeigte sich, dass Ryanodin auch hier eine ambivalente Wirkung ausübt. Die Effluxrate stieg zunächst mit der Ryanodinkonzentration an, sank nach einem Maximum von 120% bei 5.5 μ M jedoch wieder bis zum Erreichen eines Plateaus von 105% ab. Diese Form der Abhängigkeit konnte bislang bei keiner anderen Substanz beobachtet werden.



Abb.2.19 Konzentrationsabhängigkeit der ³⁵SO₄²⁻-Effluxrate von der Ryanodin-Konzentration Ryanodin steigert die Fluxrate zunächst auf ein Maximum von 120% bei 5.5 μM. Danach sinkt die Effluxrate wieder ab und erreicht ein Endniveau von 105% des Ausgangswertes.

2.4.3.2 Suramin

In Bezug auf die ³⁵SO₄²⁻-Effluxmessungen ist der Effekt des Anionenkanal-Hemmstoffes DIDS (vgl. 2.3.2.1) auf den RyR besonders interessant. DIDS aktiviert nämlich den Calcium-Release-Kanal, indem er im Einzelkanalexperiment im Bereich von 50 bis 500 μ M sowohl die Offenwahrscheinlichkeit des RyR als auch seine Leitfähigkeit für Calcium erhöht (Kawano *et al.* 1995; Oba et al. 1996; Sitsapesan 1999; Zahradnikova & Zahradnik 1993)

Ein ähnlicher, stimulierender Effekt wird auch durch Suramin, einen symmetrischen polysulfatierten Naphthylharnstoff hervorgerufen (Klinger et al. 1999; Sitsapesan 1999), der wie auch DIDS ebenfalls die Ca^{2+} -ATPase hemmt (Emmick *et al.* 1994).



Der bekannte P2X-Purinozeptor-Antagonist Suramin zeichnet sich als Medikament überdies durch eine Vielzahl therapeutischer Einsatzgebiete aus, die neben der Behandlung und Prophylaxe von parasitären Erkrankungen auch die AIDS-Therapie durch Hemmung der Reversen Transkriptase des HIV-Virus und die Tumorbehandlung umfasst, die auf der cytostatischen Wirkung durch die Hemmung diverser Wachstumsfaktoren beruht (Voogd *et al.* 1993).

Durch den Einsatz von Suramin bei ³⁵SO₄²⁻-Vesikelfluxexperimenten konnte ein Hemmstoff des Anionentransports entdeckt werden, der die Wirkung des bislang stärksten Inhibitors DIDS sowohl in der maximalen Hemmwirkung als auch in der Affinität zu den Kanalproteinen deutlich übertraf.

Der Auftrag der Effluxrate gegen die Suramin-Konzentration (Abb. 2.21) ergab eine halbmaximale Hemmkonzentration (I₅₀) von nur 0.89-1.16 μ M. Eine nahezu vollständige Hemmung des Fluxes (<2%) wurde bereits bei 40 μ M erreicht. Eine vergleichbare Hemmung lässt sich mit DIDS erst durch Konzentrationen von 200-300 μ M erzielen.

Neben der extrem starken Hemmung geht mit der Wirkung von Suramin noch eine Veränderung in der Form der Effluxkurven einher, die bei Suramin-Konzentrationen oberhalb von 1 μ M durch einen sigmoidalen Bereich erweitert werden (nicht gezeigt). Dies impliziert einen Effekt über die einfache Hemmung des Anionentransports hinaus, der entweder auf einem komplexen Bindungsmechanismus beruht oder auf eine mögliche Involvierung von Ca²⁺-ATPase und RyR zurückzuführen ist.



Ausgehend von der Struktur des Suramins wurden verschiedene Derivate synthetisiert, die bei vergleichbarer Hemmwirkung und Affinität reaktive Gruppen aufweisen sollten, mit deren Hilfe eine Markierung durch ¹²⁵Jod ermöglicht oder die Bindung des Hemmstoff-Moleküls an

eine entsprechende Matrix zur Bildung einer Affinitätschromatographie-Säule erlaubt werden sollte.

Im Effluxexperiment zeigten die beiden Suraminderivate Thiosuramin (Ersatz des Harnstoff-Sauerstoff-Restes durch Schwefel) und SB9 zwar eine vergleichsweise starke Hemmwirkung, diese lag jedoch in beiden Fällen deutlich unterhalb der für Suramin ermittelten Werte.



Für Thiosuramin wurde die I_{50} mit 16.3 μ M bestimmt. Der Flux konnte maximal auf 14% der Kontrolle gehemmt werden.

SB9 zeigte demgegenüber eine nochmals verminderte Hemmwirkung. Die I_{50} lag bei 28 μ M, die Maximalhemmung betrug 18%.



2.4.3.3 Rutheniumrot

Der Farbstoff Rutheniumrot (RR) ist ein weiterer, sehr starker Inhibitor des RyR, der sowohl die Kanaleigenschaften als auch die Ryanodinbindung sowie den Calcium-Release bereits im

niedrigen nanomolaren Bereich beeinflusst (Chen & MacLennan 1994; Xu et al. 1999). Außerdem ist RR als Inhibitor der Calcium-Aufnahme in die Mitochondrien bekannt.

Im ${}^{35}SO_4{}^{2-}$ -Effluxexperiment konnte durch Zugabe von RR zwischen 50 nM und 100 μ M eine geringe, aber dennoch signifikante Steigerung der Effluxrate um maximal 7% beobachtet werden. Der wenig ausgeprägten Hemmwirkung stand jedoch eine extrem hohe Affinität von RR zum Anionenkanal gegenüber, die sich in einer halbmaximalen Stimulationskonzentration (S₅₀) von nur 0.8 - 1.0 μ M Rutheniumrot äußerte.



2.4.3.4 Coffein

Coffein bewirkt die Freisetzung von Calcium durch den Calcium-Release-Kanal und vermindert die Ryanodinbindung bereits im nanomolaren Bereich (Endo 1977; Hasselbach & Migala 1992; Hasselbach & Migala 1992; Meissner *et al.* 1997; Tarnopolsky 1994; Wyskovsky 1994).

Im Gegensatz dazu wurde im ³⁵SO₄²⁻-Effluxexperiment eine hemmende Wirkung von Coffein beobachtet.

Der Auftrag der relativen Fluxrate gegen die Coffein-Konzentration ergab eine ausgeprägte Zweiphasigkeit im Hemmverhalten. Einer kurzen, steilen Anfangsphase mit einer I_{50} von 4-6 μ M und einer Maximalhemmung von etwa 7% folgt eine langgezogene flache Hemmphase mit einer I_{50} von 271 μ M, in deren Verlauf sich der Flux durch Coffein um maximal 29% auf 71% der Kontrolle hemmen lässt.

Eine ähnliche Mehrphasigkeit des Coffein-Effekts ist auch für die Wirkung am RyR beschrieben worden (Wyskovsky *et al.* 1990).



2.4.3.5 Atractylosid

Atractylosid (ATR) ist einer der bekanntesten Inhibitoren des ADP/ATP Translokators (AAT) der inneren Mitochondrienmembran ($I_{50} \sim 0.5$ nM) (Vignais 1976a; Vignais *et al.* 1976b) und hemmt ebenfalls äußerst effektiv den Calcium-Release-Kanal (Fiore *et al.* 1998; Yamaguchi et al. 1999).

Auch für ATR konnte in Bezug auf den ${}^{35}SO_4{}^{2-}$ -Efflux eine inverse Wirkung festgestellt werden. Es führte hier zu einer konzentrationsabhängigen Stimulation um maximal 23%. Die halbmaximale Stimulation wurde mit 14-20 μ M bestimmt.



2.4.4 Untersuchung der Wirkung von Nukleotiden auf den [³⁵S]Sulfat-Flux

Nukleotide haben neben ihrer Funktion als ubiquitäre Energieträger auch regulatorische Aufgaben in der Zelle. Sie können dabei entweder der Phosphorylierung mit und ohne Proteinkinasen dienen oder eine über Nukleotidbindungsstellen vermittelte direkte Wirkung ausüben. Neben den Nukleotiden selbst sind häufig auch Edukte, Produkte und Analoga an verschiedenen Systemen wirksam.

Da ihre Konzentration den energetischen Zustand der Zelle wiederspiegelt, ist eine regulatorische Wirkung in besonders energieimmanenten Zellen und Organen, zu denen auch der Skelettmuskel gehört, naheliegend.

Für den Calcium-Release-Kanal ist eine von der Phosphorylierung unabhängige, allosterische Regulation durch Nukleotide bekannt. Hier führen die Adeninnukleotide ATP, ADP und AMP mit abnehmender Effizienz über mehrere verschiedene Bindungsstellen zu einer Aktivierung des Kanals (Shoshan-Barmatz 1987).

2.4.4.1 Einfluss von ATP auf den [³⁵S]Sulfat-Efflux

ATP konnte als ein wirkungsvoller Inhibitor des ${}^{35}SO_4{}^{2-}$ -Effluxes charakterisiert werden. Seine halbmaximale Hemmkonzentration wurde bei pH 6.5 mit 83 µM bestimmt. Es hemmt den Flux dabei maximal auf 80% der Kontrolle. Durch die Zugabe von Magnesiumionen (2 mM) konnte der Flux um weitere 40% bis auf 40% der Kontrolle (Magnesium 2 mM) erniedrigt werden. Die halbmaximale Hemmkonzentration (I₅₀) sank dabei auf 75 µM ATP.



Der Einfluss von ADP auf den ${}^{35}SO_4{}^{2-}$ -Efflux war weit weniger ausgeprägt als der von ATP. Bei 300 µM ADP wurde die Fluxrate nur um 15% auf 85% der Kontrolle erniedrigt. Magnesiumionen führten hier nicht zu einer Veränderung.

2.4.4.1.1 Einfluss der Vorinkubation mit ATP auf den Hemmeffekt

Aus Einzelkanalmessungen ist bekannt, dass sich die Anionenkanäle des SR auch von der Lumenseite der Vesikel her durch ATP hemmen lassen (Kourie 1997b; Kourie 1998). Da weiterhin ein Eintransport von Nukleotiden in die Vesikel vermutet wird (Shoshan-Barmatz et al. 1996), sollte in einem Experiment versucht werden, den ATP-Hemmeffekt durch Vorinkubation mit ATP über das Maß der dadurch verdoppelten ATP-Menge zu steigern. Hierzu wurden die Vesikel nach der Beladung mit ³⁵SO₄²⁻ mit der entsprechenden Menge

Hierzu wurden die Vesikel nach der Beladung mit ${}^{33}SO_4{}^2$ mit der entsprechenden Menge ATP versetzt und vor dem Start der Effluxmessung weitere 8 Minuten inkubiert.

Es zeigte sich, dass im Vergleich zur Messung ohne Vorinkubation keine Steigerung der Efflux-Hemmung zu beobachten war. Allein die Verdoppelung der ATP-Menge (Inkubation + Hemmstoff im Test) hätte jedoch eine Verstärkung des Hemmeffektes bewirken müssen.

Eine Erklärung hierfür liegt möglicherweise in der Umwandlung bzw. Metabolisierung von ATP durch die SR-Proteine während der Inkubation. Nach der Inkubation wäre ein Großteil des ATP bereits abgebaut, sodass es nicht mehr zur End-ATP-Konzentration beitragen kann. Eine nähere Betrachtung dieser Problematik erfolgt in Abschnitt 2.5.

2.4.4.1.2 ATP-Hemmung unter Einfluss von Cholinchlorid

In Anlehnung an die Einzelkanalmessungen wurde die ATP-Hemmung auch bei pH 7.4 untersucht. Während ATP unter Normalbedingungen das gleiche Hemmverhalten wie bei pH 6.5 aufwies, führte die Zugabe von Cholinchlorid (20 mM) in Abhängigkeit des pH zu gegenläufigen Effekten. Bei pH 7.4 stimulierte ATP den durch den hohen pH gehemmten Flux. Das Maximum der Stimulation lag bei 130% der Kontrolle. Die Halbmaximale Stimulationskonzentration (S_{50}) lag bei 150 μ M.

Bei pH 6.5 hatte ATP eine hemmende Wirkung, die der von ATP ohne Zusatz von Magnesium vergleichbar war. Auch die halbmaximale Hemmkonzentration war vergleichbar und betrug 89μ M ATP.



Abb. 2.28 Konzentrationsabhängige Wirkung von ATP auf den ³⁵S-Efflux unter Einfluss von 20 mM Cholinchlorid

2.4.4.2 Einfluss von GTP auf den [³⁵S]-Sulfat-Efflux

Neben ATP spielt auch GTP eine wichtige Rolle bei der Regulation verschiedener Zellfunktionen. Bei seinem Einsatz in ${}^{35}SO_4{}^2$ -Effluxexperimenten wies GTP ein ähnliches Hemmverhalten auf wie ATP. Es erwies sich dabei jedoch als weniger effektiv als das Adeninnukleotid, was sich in einer höheren I₅₀ von 120 µM GTP und einer verminderten Gesamthemmung auf maximal 82% der Kontrolle äußerte.

Wie auch im ATP-Experiment führte die Zugabe von Magnesiumionen zu einer deutlichen Verstärkung des Hemmeffektes auf 60% der Kontrolle bei gleichzeitiger Erniedrigung der I_{50} auf 100 μ M GTP.

Insgesamt konnte die Hemmwirkung von ATP nicht erreicht werden, was im Einklang mit den aus der Literatur bekannten Werten für die Einzelkanalmessungen steht (Kourie 1997a; Kourie 1997b).



Abb. 2.29 Konzentrationsabhängige Hemmung des ³⁵SO₄²⁻-Efflux durch GTP

2.4.4.3 Uridintriphosphat (UTP) und Cytosintriphosphat (CTP)

Zur Klärung der Frage, ob die Nukleotidwirkung auf Purinnukleotide beschränkt ist, wurden die Pyrimidinnukleotide UTP und CTP zu Effluxmessungen eingesetzt.

Beide Nukleotide inhibierten den Efflux unter Magnesiumeinwirkung (4 mM) effizienter, wobei sich CTP als der stärkere Hemmstoff erwies. Es verringerte die Effluxrate um 49% bei einer I₅₀ von 50 μ M CTP. Die Hemmkurve von UTP verlief flacher, was sich in einer I₅₀ von 146 μ M dokumentierte. Auch in der maximalen Hemmung war UTP gegenüber CTP weniger wirkungsvoll, da die Effluxrate nur um 43% erniedrigt werden konnte.



2.4.4.4 Das Nukleotidanalogon AMP-PNP

Um zu untersuchen, ob die Hemmung auf einer direkten Wirkung durch Bindung der Nukleotide beruhte oder an deren Hydrolyse gekoppelt war, wurden verschiedene Messungen mit dem nicht hydrolysierbaren ATP-Analogon Adenosin-5'-[β , γ -imido]-triphosphat (AMP-PNP) durchgeführt. Es zeigte sich, dass AMP-PNP anders als die zuvor eingesetzten Nukleotide ohne Magnesiumionen keine Hemmung hervorrief, sondern im Gegensatz dazu den ³⁵SO₄²⁻-Efflux sogar stimulierte. Der Konzentrationsbereich, in dem sich diese Wirkung zeigte, war überdies um den Faktor 10-100 niedriger als bei den übrigen Nukleotiden. Die maximale Stimulation des Effluxes wurde mit 18% bestimmt, wobei die halbmaximale Stimulationskonzentration S₅₀ mit 2.9 µM sehr niedrig lag.

Ein ähnlicher Effekt konnte durch die Zugabe von ADP-NH₂ (ADP-amid) erzielt werden, welches die Effluxrate ebenfalls um 18% steigerte.

Die Zugabe von Magnesiumionen kehrte das Verhalten von AMP-PNP um, sodass hier eine leichte Hemmung zu beobachten war, die sich in einer um maximal 17% verringerten Effluxrate bei einer I_{50} von 4.7 μ M äußerte.

Diese Ergebnisse weisen wiederum darauf hin, dass nicht die Nukleotide selbst, sondern Derivate, die enzymkatalytisch aus ihnen hervorgehen, die eigentliche Hemmwirkung auf den Flux ausüben. Die Zugabe von Magnesiumionen begünstigt offenbar deren Bildung, weshalb die konzentrationsabhängige Hemmung des Fluxes mit Magnesium erhöht wird. Sofern auch AMP-PNP unter Magnesium-Einfluss entsprechend umgebaut werden kann, ist die hemmende Wirkung ebenfalls auf diese Produkte zurückzuführen. Die Effektivität des Umbaus ist jedoch deutlich geringer als bei den üblichen hydrolysierbaren Nukleotiden, was sich in einer relativ geringeren Hemmwirkung äußert. Diese These wird auch durch neuere Untersuchungen am Institut gestützt, in denen gezeigt werden konnte, dass AMP-PNP unter bestimmten Bedingungen durch SR-Protein abgebaut wird (Bäumert 2000).

Als Mediator dieses Vorgangs käme die Adenylat-Cyclase in Frage, die AMP-PNP unter Abspaltung von Imidodiphosphat in cAMP umbauen kann (Rössler 1998).

cAMP selbst hatte jedoch keine hemmende Wirkung auf den ${}^{35}SO_4{}^{2}$ -Efflux.



2.4.4.5 Diadenosinpolyphosphate

Diadenosinpolyphosphate wirken in einer Vielzahl von Zellen als langlebige Signalmoleküle auf die Regulation der Ca²⁺-Konzentration ein (Luthje & Ogilvie 1988) und sind schon lange als Hemmstoffe der Adenylat-Kinase bekannt (Lienhard & Secemski 1973). In ihrer

physiologisch regulativen Funktion ähneln sie der von ATP und ADP (Jankowski *et al.* 1997; Keppens 1996; Kisselev *et al.* 1998; Luo *et al.* 1999; Martin *et al.* 1998; Ogilvie *et al.* 1996).



Im Sarcoplasmatischen Reticulum wurde eine stimulierende Wirkung von Ap3A auf den RyR nachgewiesen, die mit der des nicht hydrolysierbaren ATP-Analogons Adenosin-5'-[β , γ -methylen]-triphosphonat (AMP-PCP) vergleichbar war (Holden *et al.* 1996; Morii & Makinose 1992). Auch die Funktion der Ca²⁺-ATPase lässt sich durch Diadenosin-polyphosphate beeinflussen (Jankowski et al. 1997).

Um die Wirkung von Diadenosinpolyphosphaten auf den ${}^{35}SO_4{}^{2-}$ -Efflux zu untersuchen, wurden Ap3A, Ap4A und Ap5A in Konzentrationen von jeweils 0 bis 250 μ M im Vesikelfluxexperiment eingesetzt. Für Ap3A und Ap4A konnte im beobachteten Konzentrationsbereich keine signifikante Wirkung nachgewiesen werden.

Im Gegensatz dazu bewirkte Ap5A im Bereich von 25 bis 100 μ M eine leichte Stimulation, die mit maximal 5% über der Kontrolle jedoch am Rande der Fehlergrenze des Filterassays lag.

2.4.4.6 Polyphosphate

Der nächste Schritt war die Untersuchung, ob für die hemmende Wirkung der Nukleotide das Vorhandensein der Base Voraussetzung ist, oder ob auch Polyphosphate selbst den Anionentransport zu hemmen vermögen. Hierzu wurden die linearen Polyphosphate Tripolyphosphat und Tetrapolyphosphat, sowie das cyclische Trimetaphosphat im Fluxexperiment eingesetzt.



Die linearen Phosphate zeigten eine konzentrationsabhängige Hemmung auf den ${}^{35}SO_4{}^{2-}$ Efflux, deren Maxima durchaus mit denen der verschiedenen eingesetzten Nukleotide vergleichbar waren. Der Efflux wurde hierbei auf 62% (Tripolyphosphat) bzw. 56% (Tetrapolyphosphat) der Kontrolle vermindert. Die halbmaximalen Hemmkonzentrationen lagen jedoch um den Faktor 10-20 oberhalb der für Nukleotide beobachteten Werte. Tripolyphosphat hemmte mit 549 μ M, Tetrapolyphosphat mit 1.18 mM halbmaximal.

Im Gegensatz dazu bewirkte das cyclische Trimetaphosphat eine Steigerung der Effluxrate um 19%. Die halbmaximale Stimulationskonzentration S_{50} lag hier bei 353µM.



2.5 Metabolisierung von Nukleotiden durch SR-Proteine

2.5.1 Metabolisierung von ATP

Die Ergebnisse aus 2.3.4 wiesen darauf hin, dass ATP ebenso wie die anderen eingesetzten Nukleotide in Gegenwart von SR-Protein schnell hydrolysiert bzw. umgebaut werden. Die Wirkung von ATP scheint somit nicht allein auf ATP selbst, sondern vielmehr auf eines oder mehrere seiner Metabolite zurückzuführen zu sein.

Um die Bildung von Nukleotid-Umsetzungsprodukten im SR beobachten zu können, wurden SR-Vesikel unter SO₄²⁻-Fluxbedingungen mit radioaktiven [³²P]-Nukleotiden inkubiert. Zu definierten Zeiten wurden dem Ansatz Aliquots entnommen und die Reaktion in Analogie zu früheren ATP-Hydrolyse-Messungen in vorgelegter Trichloressigsäure (TCA) gestoppt. Zur Auftrennung der Produkte wurde eine Dünnschichtchromatographie auf PEI-Nitrocellulose-platten mit einem Laufmittel aus 2 M Ameisensäure und 0.25 bzw. 1 mM LiCl durchgeführt. Die Verteilung der radioaktiven Produkte auf den DC-Platten konnte nachfolgend mit Hilfe eines Phosphoimagers (Molecular Dynamics 445) ausgewertet werden.

Die Untersuchungen zeigten, dass ATP in Anwesenheit von SR-Protein sehr schnell hydrolysiert wird. Ein Großteil des Ausgangsnukleotids (ATP-Konzentration = 10 nM) wurde bereits nach weniger als 15 Sekunden metabolisiert. Dabei entstanden neben den ATP-Hydrolyseprodukten ADP, AMP und Phosphat (P_i) auch Nebenprodukte, die durch den Vergleich der Laufweite von Referenz-Substanzen nur teilweise identifiziert werden konnten. Die Bildung der meisten Produkte zeigte eine ausgeprägte Abhängigkeit von Magnesiumionen, deren Zugabe sowohl die Menge des gebildeten Produkts als auch die Bildungsrate beeinflussten.

Ein Beispiel für die Vielfalt der möglichen Reaktionen lieferte die in Abb. 2.35 dokumentierte Beobachtung, dass sich in Anwesenheit von Magnesiumionen beim Einsatz von γ -[³²P]ATP radioaktives ADP bildete, welches nicht ohne Zwischenschritte durch einfache Hydrolyse entstehen kann.

Auch der Zusatz von Ap5A (20 μ M), einem starken Hemmstoff der Myokinase (Adenylat-Kinase) (Lienhard & Secemski 1973), der die Reaktion *ATP* + *AMP* = 2 *ADP* verhindert, konnte die Bildung von radioaktivem ADP aus γ -[³²P]ATP nicht gänzlich unterdrücken.





Sowohl unter Einsatz von α -[³²P]ATP als auch γ -[³²P]ATP bildete sich ein als Prdukt X bezeichnetes Produkt. Zur Ermittlung der Identität von Produkt X wurde seine Laufweite mit der verschiedener Adenosinderivate (Ap3A, Ap4A, Ap5A, 3'5'ADP und cAMP) verglichen.

Eine Übereinstimmung konnte jedoch erst mit dem für diesen Vergleich mit einer modifizierten Methode nach Kozarich (Kozarich *et al.* 1973) synthetisierten ATP-Derivat Pseudo-ATP (Ψ -ATP) festgestellt werden. Ψ -ATP bewirkte im ³⁵SO₄²⁻-Efflux-Experiment eine leichte Stimulation (nicht gezeigt).



Abb. 2.36 Adenosin- $\alpha\beta\beta$ '-triphosphat Pseudo-ATP (Ψ -ATP)

2.5.2 Vergleich der Metabolisierung von ATP und GTP

Beim Einsatz von α -[³²P]GTP zum Metabolisierungsexperiment zeigte sich, dass es deutlich langsamer als α -[³²P]ATP umgesetzt wird. Eine Steigerung der Umsatz-Rate konnte jedoch auch hier durch die Zugabe von Magnesiumionen erzielt werden. Ebenso wurden Produkte erkennbar, die nicht den klassischen Hydrolyseprodukten zuzuordnen waren.

In Abb. 2.37 ist eine Gegenüberstellung der Endprodukte mehrerer Messreihen mit α - $[^{32}P]ATP$ und α - $[^{32}P]GTP$ unter diversen Bedingungen dargestellt.

Die Proben wurden mit unterschiedlichen Laufmitteln aufgetrennt. Für Abblidung 2.37 A wurde 2 M AS / 0.25 M LiCl und für 2.37 B 2 M AS / 0.25 M LiCl verwendet.

In den Spalten a und b wurden die Nukleotide ohne Inkubation mit SR-Protein aufgetragen. Hier ist erkennbar, dass bereits Verunreinigungen mit Hydrolyseprodukten, aber auch nicht definierte Substanzen vorlagen.

Durch Zugabe von Magnesiumionen nahm die Intensität der Abbauprodukte zu (d,i). Außerdem bildeten sich weitere, kurzlebige Substanzen, die bereits nach wenigen Stunden in den Proben nicht mehr nachweisbar waren (nicht gezeigt). Der zusätzliche Einsatz von CaCl₂ verstärkte die von Magnesium hervorgerufenen Effekte (g,l).

Suramin (10 μ M) führte mit α -[³²P]ATP zu einer relativen Anreicherung von ADP bei einer gleichzeitigen Verringerung von AMP und P_i (e). Die Zugabe von Magnesium hatte hier nur einen geringen Effekt (f).

Mit α -[³²P]GTP hemmte Suramin bereits die Bildung von GDP, sodass hier der Großteil des eingesetzten Nukleotides unverändert blieb (j). Die Zugabe von Magnesium erhöhte dennoch die GTP-Hydrolyse (k).



2.6 Sulfat-Influxexperimente

Neben dem Efflux von ³⁵SO₄²⁻ aus präinkubierten Vesikeln lässt sich auch der Influx in die Vesikel mit der Filterassay-Methode erfassen und kinetisch auswerten.

Die ³⁵SO₄²⁻-Influxexperimente fanden unter den gleichen Puffer-, Ionen- und pH-Bedingungen wie die Effluxexperimente statt, mit dem Unterschied, dass zur besseren Detektierbarkeit der Radioaktivität innerhalb der Vesikel die Menge an radioaktivem Sulfat um den Faktor 10 erhöht war.

Zunächst wurden die SR-Vesikel (~ 0.2 mg/ml) in den Messpuffer eingebracht und dort mehrere Minuten inkubiert. Der Start der Messung erfolgte durch die Zugabe von 20 μ Ci ³⁵SO₄²⁻ (10 μ l der ³⁵SO₄²⁻-Stammlösung). Bei einer spezifischen Aktivität von 20.000 MBq/mMol betrug die Endkonzentration im Test 5.2 - 7.3 μ M ³⁵SO₄²⁻. Nach gründlicher Durchmischung wurde der Messansatz in eine Multipettenspitze überführt und die Messung in Analogie zum Efflux-Experiment (vgl. 2.2.2) durchgeführt.

Im Gegensatz zu den exponentiellen Effluxkurven (vgl. 2.2.3) sind die Eintransportkurven hyperbolischer Natur und lassen sich mit folgender Formel mathematisch beschreiben:

$$y = \frac{P_1 \cdot t}{P_2 + t} \tag{2.4}$$

 P_1 bezeichnet den Maximalwert des Eintransports und P_2 in Analogie zum K_m-Wert der Enzymkinetik den Zeitpunkt des halbmaximalen Eintransportes.

Beide Parameter lassen sich durch mathematisch-graphische Annäherung der Messdaten bestimmen.

Aussagekräftiger als der Wert von P₂ ist der Betrag der Anfangssteigung der Eintransportkurve (a_0). Er wird aus der ersten Ableitung zum Zeitpunkt t = 0 [y'₀] berechnet und durch folgende Formel beschrieben:

$$a_0 = y'(0) = \frac{P_1}{P_2}$$
(2.5)

Der maximale Eintransport (E_{max}) in die Vesikel wurde bei den Kontrollexperimenten mit 9.25x10⁻⁷ µMol bestimmt, was bei einem Innenvolumen der SR Vesikel von 1-5 µl/mg einer Lumenkonzentration von 2-11 µM entspricht und somit den Ausgleich von Innen- und Außenkonzentration (7.3 µM) in Bezug auf ${}^{35}SO_4{}^{2-}$ bestätigt.

Die Menge an eintransportiertem ${}^{35}SO_4{}^{2-}$ bezogen auf die Proteinmenge lag für die Kontrollen bei der o.g. Konzentration im Bereich von 11-12 pMol ${}^{35}SO_4{}^{2-}/mg$ Protein und wird nach folgender Formel berechnet:





2.6.1 Wirkung verschiedener Liganden auf den [³⁵S]-Sulfat-Influx

Wie auch bei den Effluxmessungen sollte beim Influx der Einfluss verschiedener Parameter überprüft werden. Zu diesen gehört unter anderem die Variation des pH-Wertes, aber auch die Prüfung der Einflüsse von Magnesiumionen, diverser Hemmstoffe und von Nukleotiden.

Abbildung 2.39 zeigt, wie sich durch die Variation der verschiedenen Parameter der maximale Eintransport sowie die Anfangssteigung in Relation zur Kontrollmessung verändern.



Abb. 2.39Beeinflussung des maximalen Eintransports und der Anfangssteigung des
 ${}^{35}SO_4{}^2$ -Influx durch verschiedene Substanzen und Parameter

Die Erhöhung des pH-Wertes von 6.5 auf 7.4 führte zu einer erheblichen Verlangsamung des Eintransportes. Die Anfangssteigung wurde um 60% reduziert. Auf den maximalen Influx hatte der pH-Shift jedoch keinen Einfluss.

Bei der Messung des konzentrationsabhängigen Einflusses der Nukleotide erwies sich der verlangsamte Influx bei pH 7.4 (s. 2.5.2) als vorteilhaft, da die relativ geringe Gesamt-radioaktivität innerhalb der Vesikel sowie die Steilheit des Influxes in der Anfangsphase bei pH 6.5 zu unsicheren Messwerten führten.

Die Zugabe von Magnesiumionen (2 mM) konnte im Gegensatz zum Effluxexperiment (vgl. 2.3.1.2) keine Steigerung der Fluxrate hervorrufen. Zwar war der E_{max} leicht erhöht, die Transportgeschwindigkeit wurde jedoch auf 80% der Kontrolle vermindert.

Suramin, der stärkste Hemmstoff des ${}^{35}SO_4{}^{2-}$ -Effluxes, vermochte bei einer Konzentration von 10 μ M die Eintransportrate auf weniger als 18% der Kontrolle zu senken. Der maximale Eintransport nahm jedoch nur um 11% auf 89% der Kontrolle ab.

DIDS (100 μ M) verminderte den maximalen Eintransport auf 72% der Kontrolle, bei der Hemmung der Fluxrate erwies es sich somit im Vergleich zu Suramin trotz deutlich höherer Konzentration als weniger effektiv.

2.6.2 Einfluss von Nukleotiden auf den [³⁵S]-Sulfat-Influx

Ein besonderes Augenmerk lag bei den Influxexperimenten wie auch beim Efflux auf der Wirkung von Nukleotiden, hauptsächlich der von ATP.

Zur besseren Detektierbarkeit der Effekte wurden die Messungen bei pH 7.4 vorgenommen, was die Eintransportrate verminderte (vgl. 2.6.1).

Es zeigte sich, dass die Zugabe von ATP eine Steigerung des maximalen Eintransportes um 32% bewirkte, die Anfangssteigung jedoch deutlich abnahm.

Vorausgesetzt, dass der letzte Wert der Kontrollmessung einer Gleichgewichtseinstellung zwischen Innenvolumen und Testmedium entspricht, impliziert die Steigerung des Influxes über den Wert der Kontrolle hinaus einen möglicherweise aktiven Nettoeintransport.

Die stimulierende Wirkung von ATP in Hinblick auf den ${}^{35}SO_4{}^{2-}$ -Eintransport (132% der Kontrolle) konnte durch die Zugabe von Magnesiumionen (2 mM) nochmals gesteigert werden (141% der Kontrolle). Die durch ATP hervorgerufene Verminderung der Anfangssteigung ließ sich durch Magnesium kompensieren (s. Abb. 2.40).

Die konzentrationsabhängige Änderung der Anfangssteigung weist eine ausgeprägte Zweiphasigkeit auf. Zwei Drittel der Hemmwirkung werden von einer hochaffinen Komponente mit einer I_{50} von 1.3 μ M ATP herbeigeführt, für das restliche Drittel ist die niedrigaffine Komponente mit einer I_{50} von 39 μ M verantwortlich. Diese Beobachtung lässt auf die Existenz zweier ATP-Bindungsstellen unterschiedlicher Affinität schließen, die beide den ³⁵SO₄²⁻-Eintransport beeinflussen.



Abb. 2.40 Konzentrationsabhängige Wirkung von ATP auf den [³⁵S]-Sulfat-Influx bei pH 7.4 Der Einfluss von ATP auf die Anfangssteigung ist stärker als auf den maximalen Eintransport, sodass die halbmaximale Hemmkonzentration bereits bei 1.6 μ M ATP liegt. Trägt man der Zweiphasigkeit Rechnung, lassen sich eine hochaffine (1.3 μ M ATP) und eine niedrigaffine (39 μ M) Komponente unterscheiden, die für 2/3, bzw. 1/3 der Hemmwirkung verantwortlich sind.

Der steigernde Effekt, den ATP auf den maximalen Eintransport ausübt, lässt sich durch die nicht hydrolysierbaren ATP-Analoga AMP-PNP und AMP-PCP nicht hervorrufen. Im Gegenteil bewirken beide Substanzen im Vergleich zur Kontrolle eine schwache Verminderung von maximalem Eintransport und Anfangssteigung.

Die stimulierende Wirkung wird somit in diesem Fall erst durch die Hydrolyse des Nukleotids erzielt. Auf einen hydrolyseabhängigen Mechanismus weist auch die Beobachtung hin, dass sich der stimulierende Effekt von ATP durch Zugabe von Magnesium nochmals deutlich steigern lässt, während Magnesium allein nur schwach stimulierend wirkt (vgl. 2.4.1).



2.7 <u>Nukleotid-Eintransport</u>

Neben kleinen anorganischen Anionen können auch organische Anionen in das SR eintransportiert werden. Dieser Eintransport ist für Oxalat im Rahmen der passiven Coakkumulation beim aktiven Calcium-Eintransport recht gut charakterisiert (Hasselbach & Makinose 1963).

Zur Gruppe der organischen Anionen gehören auch die Nukleotide, deren Influx bislang jedoch nur indirekt für ATP verfolgt werden konnte (Shoshan-Barmatz et al. 1996). Shoshan-Barmatz schloss aus der in der Autoradiographie ersichtlichen Phosphorylierung des im Lumen des SR lokalisierten Proteins Sarcalumenin durch γ -[³²P]ATP, dass dieses in das SR eintransportiert wird. Die Hemmung dieser Phosphorylierung durch DIDS (300 μ M) wies auf die Beteiligung eines der klassischen Anionentransporter des SR als ATP-Translokator hin. Die Ermittlung kinetischer Parameter war mit dieser Methode jedoch nicht möglich.

Im kardialen SR konnte Kawano die Leitfähigkeit eines Cl-Kanals für Adeninnukleotide im Einzelkanalexperiment nachweisen (Kawano et al. 1999).

2.7.1 Eintransport von ATP

Reale Eintransportmessungen konnten erstmals in dieser Arbeit mit der Vesikelflux-Filterassay-Methode durchgeführt werden, bei der in Analogie zu den ${}^{35}SO_4{}^{2-}$ -Influx-Messungen (vgl. 2.5) der Anstieg der Radioaktivität innerhalb der Vesikel verfolgt wurde. Anders als im Phosphorylierungsexperiment von Shoshan-Barmatz wurden hier jedoch α -[${}^{32}P$]-Nukleotide eingesetzt, sodass die Messung nicht durch einen überlagerten Transport von freigesetztem [${}^{32}P$]Pi oder [${}^{32}P$]PPi verfälscht werden kann.



Die α -[³²P]ATP Influxexperimente fanden unter den gleichen Puffer-, Ionen- und pH-Bedingungen wie die ³⁵SO₄²⁻-In- und Effluxexperimente statt.

Im Unterschied zu den ³⁵SO₄²⁻-Influxmessungen, die bei konstanter Sulfatkonzentration unter Modifikation äußerer Parameter durchgeführt wurden, stand bei den Nukleotideintransportmessungen die Detektion der Konzentrationsabhängigkeit dieses Vorgangs vom transportierten Nukleotid im Vordergrund.

Hierzu wurde die ATP-Konzentration im Bereich von 5 nM bis 100 μ M variiert, was durch die Zugabe von nichtradioaktivem (,kaltem') ATP zu einer vorgegebenen Menge des [³²P]Nukleotides erreicht wurde. Die daraus resultierende Verdünnung der spezifischen Aktivität wurde später in die Auswertung einbezogen.

Im Gegensatz zu den ³⁵SO₄²⁻-Influxexperimenten wurde der Messpuffer zunächst mit 2 μ Ci [³²P]ATP versetzt. Dies entspricht bei einer spezifischen Aktivität von 15 TBq/mMol einer Endkonzentration von 5 nM [³²P]ATP im Test. Dazu kamen unterschiedliche Mengen nichtradioaktives ATP. Der Start der Messung erfolgte durch Zugabe der SR-Vesikel (~ 0.1 mg/ml) in den Messpuffer.

Nach der gründlichen Durchmischung wurde der Messansatz in eine Multipettenspitze überführt und die Messung dann in Analogie zum ${}^{35}SO_4{}^{2}$ -Efflux-Experiment (vgl. 2.2.2) durchgeführt.

Der Nukleotideintransport folgte ähnlichen kinetischen Parametern wie der ³⁵SO₄²⁻-Influx (vgl. 2.5.1). Die Menge an eintransportiertem ATP bezogen auf die Proteinmenge berechnete sich nach folgender Formel:

Mit steigender ATP-Konzentration nahm sowohl die maximal eintransportierte ATP-Menge als auch die Anfangssteigung zu. In Abb. 2.43 ist die Abhängigkeit der Parameter in Form einer Sättigungskinetik dargestellt.

Für den maximal erzielbaren ATP-Eintransport in die Vesikel wurde eine Sättigungskonzentration von 1.4-1.6 nMol/mg Protein ermittelt. Dies entspricht bei einem Innenvolumen der SR Vesikel von 1-5 μ l/mg einer Lumenkonzentration von 0.3-1.6 mM.

Bei der halbmaximalen Sättigungskonzentration von 6.9 μ M ATP betrug die eintransportierte Menge an ATP 780 pMol/mg Protein. Dies entspricht bei einem Innenvolumen von 2.5 μ l/mg SR Protein einer Lumenkonzentration von 312 μ M, was einem Nettoeintransport von ATP gleichkommt, der um den Faktor 45 über die Einstellung des Gleichgewichts hinausgeht.

 $[\]frac{Konzentration ([^{32}P]ATP + ATP) im Test (mMol / ml) \times Volumen Bezugswert (ml) \times Radioaktiv ität der Probe (cpm)}{Radioaktiv ität Bezugswert (cpm) \times Volumen Probe (ml) \times Proteinkon zentration (mg / ml)}$

Die Erhöhung des pH-Wertes auf 7.4 führte zu einer Erniedrigung des maximalen Eintransports um den Faktor 2.6 auf nurmehr 607 pMol/mg Protein bei einem Anstieg der halbmaximalen Sättigungskonzentration auf 14.5 μ M.

Das Verhältnis von maximalem Eintransport zu eingesetztem ATP betrug hier 11:1.



Abb. 2.43 Maximaler [³²P]ATP-Eintransport bei pH 6.5 und 7.4

2.7.1.1 Hemmung des [³²P]ATP-Eintransports durch Atractylosid

Atractylosid, ein Hemmstoff des mitochondrialen ADP/ATP-Translokators ($I_{50} \sim 500$ nM) (Vignais 1976a; Vignais et al. 1976b), vermochte konzentrationsabhängig den ATP-Eintransport zu hemmen. Die Messung wurde bei einer konstanten ATP-Konzentration von 5 nM [³²P]ATP durchgeführt.

Der maximale Eintransport sank bei einer Atractylosid-Konzentration von 1 mM um nahezu 50%. Die halbmaximale Hemmkonzentration wurde mit 203 µM bestimmt. Ebenso wurde auch die Anfangssteigung vermindert, die bei einer halbmaximalen Hemmkonstante von 266 µM um insgesamt 29% gegenüber der Kontrolle abnahm.



2.7.1.2 Einfluss weiterer Parameter auf den [³²P]ATP-Eintransport

In diesem Abschnitt sollte untersucht werden, inwieweit sich der [³²P]ATP Influx durch die Variation verschiedener Parameter beeinflussen lässt. In Analogie zu den ³⁵SO₄²⁻-Influxmessungen wurde hierbei die Konzentration von radioaktivem [³²P]ATP mit 5 nM im Test konstant gehalten.

Die Vesikel wurden zunächst im Messpuffer mit den entsprechenden Salzen inkubiert. Der Start der Messung erfolgte durch die Zugabe von ATP.

2.7.1.3 Einfluss verschiedener Kationen und Anionen auf den [³²P]ATP-Eintransport

In Abb. 2.45 sind der maximale Eintransport und die Anfangssteigung relativ zur Kontrollmessung dargestellt.


Abb. 2.45 [³²P]ATP-Eintransport unter dem Einfluss verschiedener Ionen

Die Zugabe von 1 mM CaCl₂ führte zu einer Verminderung des maximalen Eintransportes um 12.5% bei einer gleichzeitigen Erhöhung der Anfangssteigung um 8%.

Durch Magnesium wurden beide Parameter gegenüber der Kontrolle erniedrigt. Der maximale Eintransport sank leicht auf 97%, die Anfangssteigung jedoch reagierte stark auf die Veränderung. Ihr Wert wurde um 40% verringert.

Die Kombination der beiden Kationen bewirkte eine Erhöhung des maximalen Eintransports auf 128% der Kontrolle. Die Anfangssteigung jedoch verringerte sich um 20%.

Auch K_2SO_4 bewirkte eine Veränderung des Eintransportes. Beide Messparameter wurden erhöht, sodass der maximale Eintransport um 4%, die Anfangssteigung sogar um 20% zunahm.

2.7.1.3.1 Einfluss verschiedener Hemmstoffe auf den [³²P]ATP-Eintransport

Abb. 2.34 zeigt den Einfluss diverser Hemmstoffe auf den [³²P]ATP Influx. Durch die Zugabe von Suramin (10 μ M) ließ sich der [³²P]ATP-Eintransport nahezu völlig unterbinden. Der Maximale Eintransport (E_{max}) verringerte sich auf 14%, der Wert der Anfangssteigung sogar auf 9% der Kontrolle.

Auch DIDS (100 μ M) hemmte den Eintransport sehr effektiv. Der E_{max} sank auf 10%, die Anfangssteigung auf 30%.

Ebenso wirkte PPANS (100 μ M), das zu einer Verminderung des maximalen Eintransports auf 14.5% und der Anfangssteigung auf 16% der Kontrolle führte.

Heparin (33 μ M), der stärkste Inhibitor der im SR Lumen befindlichen Caseinkinase II, war in der Lage, den ATP-Eintransport deutlich zu hemmen. Beide Fluxparameter wurden auf etwa 60% der Kontrolle vermindert.

Dagegen war die Wirkung von Coffein (100 μ M), Strychnin (250 μ M) und Valinomycin (10 μ M) verschwindend gering. Sie veränderten die Fluxparameter nur wenig.

Die Zugabe eines monoklonalen Antikörpers gegen die N-terminale Domäne von Human-Porin aus B-Lymphocyten erbrachte keinerlei Hemmwirkung. Im Rahmen der Messgenauigkeit blieben die Fluxparameter hierbei unbeeinflusst



2.7.1.3.2 Einfluss von Nukleotiden und Nukleotidderivaten auf den [³²P]ATP-Eintransport

In Abbildung 2.35 ist der Einfluss einiger Nukleotide und Nukleotidderivate auf den [³²P]ATP Eintransport dargestellt.



Durch die Vorinkubation mit ATP bzw. ADP (jeweils 50 nM) sollte geklärt werden, ob es sich bei dem ATP-Transport-System möglicherweise um einen ADP/ATP-Antiporter handelt, wie er aus dem Mitochondrium bekannt ist (Vignais 1976a; Vignais et al. 1976b). Einen Hinweis darauf lieferte bereits der Effekt von Atractylosid (s. 2.7.1.1). Das vor der Messung in die Vesikel eintransportierte Nukleotid sollte so dem Antiport zugänglich gemacht werden, wodurch ein Erhöhung des Eintransports von [³²P]ATP erwartet wurde. Wie Abb. 2.47 zeigt, konnte diese Vermutung nicht bestätigt werden. Die Zugabe von 50 nM bzw. 100 µM der Nukleotide führte nicht zu einer Erhöhung sondern zur Erniedrigung des Eintransports.

Ebenfalls hemmend in Bezug auf E_{max} wirkten die cyclischen Nukleotidmonophosphate cAMP und cGMP, die mit 5 nM in der gleichen Konzentration eingesetzt wurden wie [³²P]ATP. Der E_{max} wurde dadurch um 10% vermindert, die Anfangssteigung jedoch jeweils um nahezu 20% erhöht. Auffällig ist die Ähnlichkeit der durch die Derivate der beiden unterschiedlichen Purinnukleotide hervorgerufenen Effekte. Hier gibt es scheinbar keinen Unterschied zwischen Adenin und Guanin.

Eine ähnliche Erhöhung der Anfangssteigung bei einem jedoch erheblich verminderten maximalen Eintransport bewirkten die Nukleotidanaloga AMP-PNP und AMP-PCP (jeweils 5 nM), die sich in der Hemmwirkung auf den maximalen Eintransports um 50% der Kontrolle glichen.

Es sei noch angemerkt, dass sich die Form der Eintransport-Kurven bei der Zugabe der Nukleotide in dem beobachteten niedrigen Konzentrationsbereich dahingehend veränderten, dass sie sich bei der mathematischen Annäherung durch zwei überlagerte Hyperbeln beschreiben ließen (nicht gezeigt).

2.7.2 Vergleich von [³²P]ATP- und [³²P]GTP-Eintransport

Die Zugabe von GTP bei den ATP-Eintransportmessungen verminderte konzentrationsabhängig den maximalen Eintransport von [³²P]ATP (nicht gezeigt). Die Wirkung von GTP entsprach dabei nicht der von ATP bei gleicher Konzentration, welches ohne Verrechnung der spezifischen Aktivität ebenfalls zu einer Verminderung der gemessenen Radioaktivität führt.

Es sollte untersucht werden, ob GTP ausschließlich den Flux hemmt oder auch selbst mit veränderter Kinetik in die SR-Vesikel eintransportiert wird.

Dazu wurden Eintransportmessungen mit α -[³²P]GTP durchgeführt. Da es die gleiche spezifische Aktivität wie α -[³²P]ATP (15 TBq/mMol) besaß, wurden die Messungen wie zuvor durchgeführt und ausgewertet (vgl. 2.7.1).

Hierbei zeigten sich im Vergleich zu α -[³²P]ATP erhebliche Unterschiede im Influxverhalten. Bei gleicher Nukleotidkonzentration (5-7 nM) überstieg der maximale GTP-Eintransport den von ATP um den Faktor 2.4. Die Betrachtung der Anfangssteigung lieferte jedoch ein umgekehrtes Ergebnis. Hier standen 15.44 pMol ATP/mg/min nur 5.86 pMol GTP/mg/min gegenüber.



Abb. 2.48 Vergleich von Eintransportkurven mit α -[³²P]ATP und α -[³²P]GTP Der maximale Eintransport von GTP ist höher als der von ATP. Die Eintransportgeschwindigkeit ist jedoch deutlich niedriger.

Ebenso deutliche Unterschiede zeigten sich in der Reaktion auf Suramin. Wie in Abb. 2.49 A zu erkennen ist, hemmte Suramin (10 μ M) den Eintransport von ATP nahezu vollständig auf weniger als 10% des maximalen Eintransports und 5% der Anfangssteigung der Kontrolle. Bei weitem weniger effektiv war die Wirkung von Suramin auf den GTP Eintransport (Abb. 2.49 B). Der E_{max} wurde hier nur um 20% vermindert, die Anfangssteigung sank um 44% ab. Heparin, der stärkste Inhibitor der im SR befindlichen Caseinkinase II (CKII), hemmte den E_{max} von ATP um etwa 50%. Der GTP-Eintransport blieb jedoch nahezu unbeeinflusst.

Die CKII zeichnet sich dadurch aus, dass sie in gleichem Maße ATP und GTP zur Kinasierung der Zielproteine nutzen kann.



Abb. 2.49 [³²P]Nukleotid-Eintransport unter dem Einfluss von Suramin und Heparin

Auch der Eintransport in die SR-Fraktionen HSR und LSR ergab Unterschiede zwischen ATP und GTP. Wie in Abb. 2.50 A ersichtlich ist, war der ATP-Eintransport bei gleicher Proteinkonzentration im HSR gegenüber der SR-Kontrolle erhöht, wogegen er im LSR erniedrigt war.

Dieses Ergebnis korreliert mit dem theoretisch geringeren Volumen/Protein-Verhältnis im HSR und dem erhöhten V/P-Verhältnis im LSR. Aus dieser Beobachtung kann nicht auf eine unterschiedliche Transporter-Konstitution der verschiedenen Fraktionen geschlossen werden.

Beim GTP-Eintransport hingegen wiesen beide SR-Fraktionen einen erniedrigten Eintransport gegenüber der SR-Kontrolle auf. Der E_{max} für LSR war hier jedoch ebenfalls höher als der für HSR.



Abb. 2.50 Vergleich des [³²P]Nukleotid-Eintransports in SR-, HSR- und LSR-Vesikel

2.7.3 Vergleich von [³²P]ATP- und [³H]AMP-PNP-Eintransport

Es sollte überprüft werden, ob der Nukleotid-Transport an eine partielle Nukleotid-Hydrolyse gekoppelt ist. Dazu wurde das nicht hydrolysierbare ATP-Analogon AMP-PNP bei ATP-Influx-Messungen eingesetzt.

Es zeigte sich, dass AMP-PNP auf den ATP-Eintransport eine ähnliche Hemmung ausübte, wie sie auch durch Verdünnung der spezifischen Aktivität des *Tracer*-Nukleotides ohne entsprechende Verrechnung zu beobachten war.

Der Auftrag der gemessenen E_{max} -Werte und der mit der ATP- bzw. AMP-PNP-Konzentration verrechneten Werte (für AMP-PNP ist eine solche Verrechnung theoretisch nicht zulässig) offenbarte deutliche Unterschiede, die sich sowohl in der Form der Kurven als auch in den Werten für E_{max} äußerten.

Die AMP-PNP-Wirkung unterschied sich somit im ATP-Influx-Experiment von der ATP-Wirkung.



Abb. 2.51 [³²P]ATP-Eintransport unter Einfluss von ATP und AMP-PNP

Um zu überprüfen, ob neben dem ATP- auch ein AMP-PNP Eintransport in die Vesikel stattfindet, wurde das ATP-Analogon ebenfalls zu Influx-Experimenten eingesetzt. Da kein [³²P] markiertes AMP-PNP zur Verfügung stand, wurde [³H]AMP-PNP verwendet, dessen spezifische Aktivität von 0.99 TBq/mMol eine Konzentration der Stammlösung (250 µl) von 37µM bedingte. Wie bei den Messungen mit den [³²P]Nukleotiden betrug die [³H]AMP-PNP-Konzentration im Test 5 nM.

Der Eintransport folgte, wie in Abb. 2.52 dargestellt, einer Sättigungskinetik. Die halbmaximale Sättigungskonzentration wurde mit 11-14 μ M bestimmt und hat damit die gleiche Größenordnung wie der Wert für ATP (vgl. 2.7.1). Die maximal eintransportierbare Menge AMP-PNP betrug nach der mathematischen Angleichung 431 pMol/mg Protein. Dieser Wert liegt jedoch um den Faktor 4 unterhalb des für ATP ermittelten maximalen Eintransports.



Bei der Zugabe von ATP in Konzentrationen von 5 nM - 25 μ M ergab sich eine konzentrationsabhängige Hemmung des maximalen Eintransports, die der von AMP-PNP ohne Verrechnung der spezifischen Aktivität stark ähnelte.

Auch beim AMP-PNP-Eintransport wurden verschiedene Messparameter modifiziert.

Durch Suramin (10 μ M) ließ sich eine nahezu vollständige Hemmung des Transports erzielen. Die Zugabe von MgCl₂ und CaCl₂ (jeweils 2 mM) erhöhte E_{max} bei der Standardmessung mit 5 nM AMP-PNP um 20%. CaCl₂ allein konnte den E_{max} sogar um den Faktor 2.2 auf 220% steigern. MgCl₂ allein jedoch verminderte den Wert auf 45% der Kontrolle. Der Mischwert beruht somit vermutlich auf der Überlagerung der gegenläufigen Effekte.

2.8 Jodid- und Pyrophosphat-Efflux

Neben den Versuchen mit [³⁵S]Sulfat wurden die Effluxexperimente auch mit [¹²⁵J]Jodid und [³²P]Pyrophosphat durchgeführt. Da die für den [³⁵S]Sulfat-Efflux optimierten Bedingungen jedoch nicht ohne weiteres auf die Nuklide übertragbar waren, konnten nur qualitative Aussagen über deren Efflux gemacht werden.

Beide Substanzen wurden durch Inkubation (2 Stunden) wie [³⁵S]Sulfat in die SR-Vesikel eintransportiert, was durch einen messbaren Efflux bewiesen werden konnte.

Sowohl der Jodid-Efflux als auch der PPi-Efflux ließen sich durch DIDS und PPANS (beide 100µ M) nahezu vollständig hemmen.

Die Messwerte waren jedoch starken Schwankungen unterworfen, sodass mit den wenigen gemessenen Kurven keine Aussagen über signifikante Änderungen der kinetischen Parameter getroffen werden konnten.

2.9 Einzelkanalmessungen mit der Planarmembran-Technik

Einige der negativen Aspekte des Filterassays, wie die Verwendung des unphysiologischen Ions SO₄²⁻ als *Tracer*-Ion, die Messung mit einer Vielzahl von Vesikeln unterschiedlicher Eigenschaften und die Unmöglichkeit, Aussagen über *Gating*-Prozesse und Leitfähigkeit einzelner Anionenkanäle zu treffen, sollten durch den Einsatz der Planarmembran-Technik als alternative Messmethode umgangen werden. Die Messungen wurden mit der von Miller und Racker (Miller & Racker 1976) entwickelten Methode, modifiziert nach Kourie (Kourie et al. 1996a) durchgeführt.

In einer speziellen Delrinküvette, deren zwei Kammern durch eine 150 µm starke Bohrung verbunden sind, wurde mit Hilfe eines Lipidgemisches in Hexan und Decan eine Membran gezogen.



Abb. 2.53 Delrinküvette für Einzelkanalmessungen

Zunächst wurde das Lipidgemisch aus Palmitoyl-Oleoyl-Phosphatidylethanolamin, Palmitoyl-Oleoyl-Phosphatidylethanolserin und Palmitoyl-Oleoyl-Phosphatidylcholin im Verhältnis 5:3:2 in Hexan auf die Bohrung der sorgfältig gereinigten Küvette aufgebracht und anschließend die beiden Kammern mit Puffer befüllt. Die cis-Seite enthielt 250, die trans-Seite 50 mM Cholinchlorid (jeweils 1 mM CaCl₂ und 10 mM Hepes pH 7.4). Durch die seitlich in die Küvette eingearbeiteten Sichtfenster ließ sich die Bohrung beleuchten und mittels eines Fernrohrs betrachten. Anschließend wurden die Elektroden in die Lösungen eingetaucht. Sie bestehen aus Silberdraht, der auf galvanischem Wege mit einer Schicht Chloridionen überzogen wurde. Mit Hilfe einer gekrümmten Pipettenspitze wurde dann das Lipdgemisch in Decan auf die andere Seite der Bohrung appliziert. Abhängig vom Volumen der Lipidlösung bildete sich nun eine Membran über das Loch aus, die zunächst wie eine Seifenblase schillerte, im Laufe eines spontanen Prozesses aber gänzlich schwarz wurde und nur noch am Rand erkennbar blieb.

Neben der optischen Veränderung der Membran (Schwärzung) verändern sich im Verlauf des "*Thinning*" auch ihre elektrischen Eigenschaften. Da die Membran aufgrund ihrer geringen Ionenleitfähigkeit Kondensatoreigenschaften aufweist, ließ sich anhand der Messung der Membrankapazität die Bildung einer schwarzen Membran verfolgen.

Es wurde eine Dreieckspannung von 50 mV/sec angelegt, aus der ein Rechteckstrom über die Membran resultierte.



Abb. 2.54 Änderung der Kondensatorkapazität bei der Bildung einer schwarzen Membran

Ein angeschlossener Verstärker wandelte den Strom in eine Spannung um (Verstärkung 10^9 V/A), die dann mit einem elektronischen Speicher-Oszilloskop und angeschlossenem Schreiber detektiert wurde. Da die Spannung zunächst ansteigt und anschließend wieder fällt, muß zur Berechnung der Membrankapazität die Amplitude des detektierten Stroms halbiert werden.

$$C = \frac{75 \, pA \cdot 1 \, s}{50 mV} = 1.5 \cdot 10^9 \, A \, s \, / V = 1.5 \, nF \tag{2.8}$$

Typischerweise befindet sich der Wert für die Membrankapazität zwischen 1 und 2 nF, was unter Berücksichtigung der Membranfläche einem Wert von $0.5 - 1 \,\mu\text{F/cm}^2$ entspricht.

2.9.1 Fusion der SR-Vesikel mit der planaren Membran

Obgleich noch nicht bis ins letzte Detail erwiesen, beruht das Einbringen von Proteinen in die planare Membran (PM) wahrscheinlich auf der spontanen, energetisch neutralen Fusion eines einzigen kompletten Vesikels mit all seinen Membran- und Proteinkomponenten (Hille 1992; Niles *et al.* 1996).

Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass, sofern das Vesikel nahe genug (~ assoziiert) ist, einzelne membranständige Proteine aus dem Vesikel in die PM übertreten. Auch die partielle Fusion eines Fragments des Vesikels, bei der das entsprechend kleinere Vesikel wieder abdiffundiert, wird diskutiert.

In beiden Fällen muss dieser Vorgang mit einer positiven Änderung der Entropie des Systems verbunden sein (Cohen *et al.* 1984).

In der Literatur ist die durchschnittliche Anionenkanaldichte mit etwa einem Kanal pro SR-Vesikel angegeben (Rousseau 1989), wodurch bei der Fusion eines einzigen Vesikels mit der PM das Signal eines einzigen Anionenkanals detektierbar werden sollte. Die optimale Proteinkonzentration für die Fusion betrug 5 - 10 μ g/ml.

Zum Start des Fusionsvorgangs wurden die Vesikel in die cis-Kammer der Küvette, die der cytoplasmatischen Seite der Vesikel entspricht, einpipettiert. Nach spätestens 30-60 Minuten fand in der Regel eine Fusion statt.

Die Detektion eines Fusionsereignisses erfolgte wiederum anhand der Veränderung der Membrankapazität.



Abb. 2.55 Änderung der Kondensatorkapazität der Membran während einer Vesikel-Fusion

Die Fusion erwies sich als ein sensibler Vorgang und konnte durch die Modifikation mehrerer Parameter beeinflusst werden. Die schrittweise Erhöhung der Proteinkonzentration resultierte häufig in einer plötzlichen, multiplen Fusion, bei der zunächst sehr hohe Leitfähigkeitswerte, verursacht durch mehrere Kanäle zu verzeichnen waren. In vielen Fällen kollabierte die PM nach wenigen Minuten.

Die Vorbehandlung der groben Vesikelpräparationen durch nochmalige Zentrifugation, Ultraschallbehandlung oder Liposofast-Passage (MacDonald *et al.* 1991) verbesserte das Fusionsverhalten, da hier der Effekt von Vesikelaggregaten und nichtvesikulären Membranfragmenten minimiert werden konnte. Eine parallel eingesetzte Methode zur Erhöhung der Fusionsrate bei niedrigen Proteinkonzentrationen war das Anlegen eines osmotischen Gradienten über die PM (Miller *et al.* 1976; Miller & Racker 1976). Dabei wurde 5 Minuten nach Zugabe der Vesikel ebenfalls auf der cis-Seite 200 mM Harnstoff zugesetzt, dessen osmotischer Effekt das thermodynamische Gleichgewicht von Vesikel und PM zur Fusion hin verschieben sollte. Sofort nach erfolgter Fusion wurde dann zum Aufheben des Gradienten auch auf der trans-Seite 200 mM Harnstoff zugesetzt.

2.9.2 Einfluss diverser Liganden auf die Anionenkanal-Aktivität im PLB-Experiment

Nach erfolgter Fusion wurde das Signal des Kanals mit dem Speicheroszilloskop detektiert und dann mit Hilfe eines Schreibers aufgezeichnet.

Nachdem der Kanal in Abhängigkeit seiner Leitfähigkeit bei der angelegten Spannung identifiziert wurde, wurde auf der cis- bzw. trans-Seite die zu vermessenden Wirkstoffe zugegeben.



Abbildung 2.56 zeigt ein Anionenkanal-Signal, das unter asymmetrischen Ionen-Bedingungen bei einer angelegten Spannung von -20 mV aufgenommen wurde. Deutlich ist der Wechsel zwischen Offen- und Geschlossen-Phasen zu erkennen. Dieser Kanal wurde anhand seiner Leitfähigkeit als BCl identifiziert.

Insgesamt wurden etwa 90 schwarze Membranen hergestellt, von denen 38 zu erfolgreichen, nicht-multiplen Fusionen führten, die ausgewertet werden konnten. Unter den gewählten Bedingungen fanden überwiegend Fusionen mit dem BCl statt. Zweimal wurde ein SCl detektiert. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass sich in den BCl-Fusionen auch SCl-Kanäle befanden, die jedoch ohne postiven Prä-Puls (vgl. 1.7.2.2) nicht aktiviert waren. Kanäle mit VDAC-Eigenschaften konnte nicht eindeutig identifiziert werden.

XX71 1 / 00	Anzahl der Experimente	Effekt		
Wirkstoff		Verschiebung nach , <i>closed</i> '	Verschiebung nach ,open'	Keine Veränderung
PPANS 50 µM trans	1	1		
PPANS 100 µM cis	3	3		
PPANS 100 µM trans	3	3		
PPANS 500 µM cis	2	2		
PPANS 500 µM trans	4	4		
DIDS 50 µM cis	1	1		
DIDS 50 µM trans	1	1		
DIDS 50 µM ct	1	1		
DIDS 100 µM ct	2	2		
ATP 250 µM cis	1			1
ATP 250 µM trans	1	1		
ATP 500 µM cis	6		1	5
ATP 500 µM trans	7	7		
ATP 1 mM ct	1	1		
ADP 500 µM ct	1			1
ADP 750 µM ct	1			1
ADP 1 mM ct	1			1
PSI-ATP 75 µM ct	3	3		
GTP 500 µM cis	5	1		4
GTP 500 µM trans	6	1	2	3
Tripolyphosphat 500 µM ct	2			2
1 mM TMP ct	3	1	2	
2 mM TMP cis	2		1	1
2 mM TMP trans	2		1	1
Tetrapolyphosphat 500 µM ct	2	1		1
Polydextransulfat 1 mg/ml ct	2			2

Tabelle 2.2 enthält die qualitativ ausgewerteten Ergebnisse der BCl-Messungen, die unter asymmetrischen Bedingungen bei einer angelegten Spannung von -20 mV erfolgten.

Tabelle 2.2Bezogen auf die Messungen an Vesikeln bedeutet cis die Zugabe auf der cytoplasmatischen,
trans hingegen auf der luminalen Seite. ct bezeichnet die beidseitige Zugabe der
entsprechenden Substanz.

Die Wirkung der Kationen Mg^{2+} (1-2 mM ct) und Ca^{2+} (5 mM ct) sowie des Anions SO_4^{2-} (2-10 mM ct) konnte mit der qualitativen Analyse nicht hinreichend charakterisiert werden. Beide führten insgesamt zu einer Erhöhung der Kanal-Aktivität, eine tendenzielle Verschiebung in den o- oder c-Zustand war jedoch nicht zu beobachten.

Wie Abbildung 2.57 zeigt, führte PPANS ab einer Konzentration von 50 μ M zu einer sofortigen (5-10 sec), nahezu vollständigen Überführung des Kanals in den c-Zustand. Dieser dauerte 2-5 Minuten, ging dann in eine 3-5 Minuten lange Phase mit ausgeglichenem o-c-Verhältnis über, nach der der Kanal seine Ausgangsaktivität wiedererlangte.



Auch DIDS überführte den Kanal ab einer Konzentration von 50 µM seitenunabhängig in den vollständig geschlossenen c-Zustand. Im Unterschied zu PPANS setzte die Wirkung jedoch erst nach einer Verzögerung von 35-75 Sekunden ein. Die Dauer der c-Phase übertraf die von PPANS um 3-6 Minuten.

In beiden Fällen konnte durch Zugabe von TMP ct eine sofortige Reaktivierung des Kanals herbeigeführt werden.



Im Gegensatz zu DIDS und PPANS führte ATP zu einer streng seitenabhängigen Modifikation der Leitfähigkeit (Abb. 2.59). Bei den vermessenen Konzentrationen von 250 µM bis 1 mM ATP zeigte die Zugabe auf der cis-Seite keinerlei hemmende Wirkung. In einem von 6 Fällen konnte bei 500 µM sogar eine Aktivierung des Kanals beobachtet werden.

Auf der trans-Seite hingegen wurde bereits ab 250 μ M eine Hemmung hervorgerufen. Die Dauer der Hemmung lag zwischen 10 und 90 Sekunden. Auch hier konnte der hemmende Effekt sofort durch Zugabe von TMP 1 mM ct aufgehoben werden.



Abb. 2.59

Für ADP konnte bei den gleichen Konzentrationen keinerlei Veränderung des Signals detektiert werden..

GTP bewirkte in 1 von 5 Experimenten bei einer Konzentration von 500 μ M cis eine Verschiebung in den c-Zustand. In den anderen Fällen zeigte es keinen Effekt.

Die trans-Zugabe ergab ein uneinheitliches Wirkschema. Im Gegensatz zu der deutlichen Hemmwirkung von ATP_{trans} änderte sich durch GTP bei 3 von 6 Experimenten nach der Zugabe nichts, zweimal konnte eine Aktivierung, nur einmal eine Hemmung beobachtete werden.

Das im Rahmen der Metabolisierungsexperimente (s. 2.5) synthetisierte und in den Vesikelfluxmessungen eingesetzte ATP-Derivat Ψ -ATP (75 μ M ct) verschob das Signal in 3 von 3 Fällen in den c-Zustand. Im Unterschied zu ATP dauerte die Wirkung länger an (bis zu 3 Minuten), die c-Phasen war jedoch von langen Phasen normaler Aktivität unterbrochen.





Trimetaphosphat (TMP) war die einzige der eingesetzten Substanzen, die eine Aktivierung des Kanals hervorrief. Nach Zugabe von 2 mM cis oder trans erschien der o-Zustand stärker besetzt. Bei drei Experimenten, die mit 1 mM ct durchgeführt wurden, konnte zweimal eine Aktivierung, einmal jedoch eine Hemmung beobachtet werden.

Polydextransulfat und Tripolyphosphat zeigten keine Wirkung. Tetrapolyphosphat (500 μM ct) konnte in einem von zwei Fällen eine Hemmung herbeiführen.

3 **Diskussion**

Ziel dieser Arbeit war die weitergehende Charakterisierung des passiven Transports organischer und anorganischer Anionen über die Membran des sarcoplasmatischen Reticulums (SR) der Skelettmuskelzellen aus Kaninchen. Die Applikation diverser Inhibitoren und Stimulatoren, sowie der Vergleich der mit verschiedenen Messmethoden erhaltenen Daten sollte dazu beitragen, die physiologische Funktion des SR mit der Wirkung der Anionenkanäle im Rahmen des Erregungs-Kontraktions-Cyclusses in Beziehung zu setzen.

3.1 Die Anionenkanäle des SR und ihre Beteiligung am Vesikelflux

Das SR des Skelettmuskels weist mit der Ca²⁺-ATPase und dem Ryanodin-Rezeptor (RyR) zwei hochkomplexe aktive und passive Transportsysteme für das physiologisch besonders bedeutsame Calcium auf. Diesen Kationentransportsystemen steht eine bemerkenswerte Anzahl von Anionenkanälen gegenüber, die sich in den Mechanismen von Aktivierung, Inhibierung und Regulation durch Spannungs- und Ionenverhältnisse sowie der Wirkung diverser Liganden unterscheiden. Die physiologische Relevanz mehrerer Anionen-Kanäle, die sich theoretisch in ihren Wirkungen aufheben, zumindest aber gegenseitig behindern können, ist bislang ungeklärt. Eine regulative Kompensation der Effekte anderer Systeme ist dabei ebenso denkbar wie der Metabolittransport in das Lumen des SR.

Besonders erschwert wird die Charakterisierung der Anionenkanäle durch ihre im Vergleich zum Gesamtprotein des SR verschwindend geringe Menge, die durch Fusionsexperimente mit 1 bis maximal 5 Kanälen pro SR-Vesikel bestimmt wurde (Kourie 1997a; Rousseau et al. 1988). Eine Aufreinigung mit dem Ziel von Sequenzierung und funktioneller Rekonstitution der verschiedenen Anionenkanäle blieb bislang erfolglos und stellt ein unbedingtes Ziel weiterer Forschung dar.

Die beiden in dieser Arbeit verwendeten Methoden zur Kanalvermessung sind das Vesikelflux-Filterassay und die Einzelkanalmessung mit Hilfe der Planarmembrantechnik.

Um die Ergebnisse beider Messmethoden miteinander vergleichen zu können, ist zunächst zu klären, welche der im Einzelkanalexperiment unterscheidbaren Kanäle zu dem im Filterassay messbaren Anionen-Flux führen.

In den letzten Jahren wurde eine große Zahl verschiedener Anionenkanäle in der SR-Membran des Skelettmuskels beschrieben. Die hier gefundenen Unterschiede in den Eigenschaften scheinen jedoch zumindest teilweise auf Differenzen in der Methodik von Präparation und Detektion zu beruhen, sodass sich die Zahl der mit hinreichender Sicherheit im SR vorkommenden Anionenkanäle auf den *"Big Chloride Channel"* (BCl), den *"Small Chloride Channel"* (SCl) und den *"Voltage Dependent Anion Channel"* (VDAC) reduziert.

Von diesen drei Kanälen ist der BCl aufgrund seiner unten beschriebenen Eigenschaften der wahrscheinlichste Vermittler des Anionenfluxes im Filterassay-Experiment.

Der BCl weist sowohl unter Einzelkanal- als auch unter Vesikelfluxverhältnissen hohe Werte für Leitfähigkeit und Offenwahrscheinlichkeit (P_o) auf. Die geringe Spannungsabhängigkeit im Bereich von \pm 40 mV hält den Kanal auch bei einem Potential von 0 mV ständig offen, wie es sowohl unter physiologischen Bedingungen im SR als auch im Vesikelfluxexperiment wahrscheinlich ist (Coonan & Lamb 1998; Stienen 2000). Offenwahrscheinlichkeit und *Gating* des BCl sind überdies weitgehend unabhängig von der Ca²⁺-Konzentration. Ebenso reagiert er im Einzelkanal-Experiment unempfindlich gegenüber einer Erniedrigung des pH-Wertes (Kourie et al. 1996a).

Laut Literatur tritt der BCl mit einem Fusionsverhältnis von 3:1 gegenüber dem SCl bei den Einzelkanalmessungen am häufigsten in Erscheinung (Dulhunty et al. 1996). Eigene Messungen führten zu einer nahezu ausschließlichen Detektion des BCl.

Die im Einzelkanalexperiment ermittelte Pharmakologie des BCl zeigt in Bezug auf die konzentrationsabhängige Wirkung klassischer Anionenkanalhemmstoffe wie DIDS Parallelen zu den mit dem Filterassay erzielten Ergebnissen. Überdies erklärt die Bevorzugung von Chlorid gegenüber anderen Anionen den deutlich verlangsamten ³⁵SO₄²⁻-Flux im Filterassay, der die Applikation dieser Methode mit ihrer beschränkten zeitlichen Auflösung überhaupt erst erlaubt.

Deutlich komplizierter in Funktion und Nachweis ist der SCl, der aufgrund seiner Abhängigkeit von der cytoplasmatischen Calcium-Konzentration auch als Calciumaktivierter-Chlorid-Kanal bezeichnet wird (Kourie et al. 1996a).

Zur Entfaltung seiner Aktivität, die er ausschließlich bei negativen Potentialen ab -20 mV entwickelt, ist ein kurzer positiver Prä-Puls von mindestens +40 mV notwendig. Er bleibt danach mehrere Sekunden aktiv und geht dann wieder in den nahezu vollständig inaktiven Zustand über (Kourie et al. 1996b).

Dieser komplexe Aktivierungsmechanismus lässt bereits an der Rolle des SCl als Hauptvermittler des Anionentransports im Vesikelflux-Experiment zweifeln. Hinzu kommt noch, dass der SCl zwar eine hohe Anionen-Selektivität aufweist, die Leitfähigkeiten für Chlorid und Sulfat aber nahezu identisch sind (Kourie et al. 1996b). Wenn ${}^{35}SO_4{}^{2-}$ aber genauso schnell transportiert wird wie Cl⁻, sollte im Vesikelfluxexperiment kein Unterschied in der Transportgeschwindigkeit von Cl⁻ und ${}^{35}SO_4{}^{2-}$ auftreten, was jedoch der Fall ist (Kometani & Kasai 1978).

Auch die im PLB-Experiment beobachtete vollständige Hemmung des SCl durch 8 µM DIDS harmoniert nicht mit den im Fluxexperiment erzielten Ergebnissen.

Es wurde gemutmaßt, dass BCl und SCl identische Proteine in unterschiedlichen Zuständen sind, die durch Phosphorylierung oder auch Interaktion mit SR-integrierten Faktoren bedingt werden (Kourie 1999). Dafür gibt es bislang jedoch keinerlei Beweis. Ein SCl-BCl-Übergang konnte ebenfalls noch nie beobachtet werden.

Der VDAC, wie er aus dem Mitochondrium bekannt ist, scheint ebenfalls keine entscheidende Rolle beim Vesikelflux zu spielen, da er nur äußerst selten und unter bestimmten Bedingungen (Hals *et al.* 1989; Lewis et al. 1994) im PLB-Experiment detektierbar ist. Der Nachweis seiner Existenz beruht bislang fast ausschließlich auf der Markierung durch DCCD sowie Antikörper gegen das mitochondriale Porin1 (Junankar et al. 1995; Shoshan-Barmatz et al. 1996). Hiernach soll der VDAC im SR sogar häufiger als im Mitochondrium vorkommen (Shafir et al. 1998), wogegen jedoch die niedrige Fusionsrate spricht (Kourie 1997a). Weiter sollte aufgrund seiner vergleichsweise niedrigen Selektivität für bestimmte Anionen im Filterassay keine Bevorzugung von Chlorid gegenüber Sulfat detektiert werden können.

Wie auch der BCl ist der VDAC über weite Potentialbereiche voll geöffnet, geht aber bei höheren positiven und negativen Potentialen in einen wenig aktiven, kationenselektiven Zustand über. Die hemmende Wirkung von DIDS auf den VDAC ist indirekt, da sie ausschließlich auf einer Veränderung der Spannungsabhängigkeit beruht, mit der ein Schließen des Kanals auch bei Potentialen nahe 0 mV einhergeht. Eine echte Hemmung ist nicht erreichbar, was wiederum gegen eine Beteiligung am ³⁵SO₄²⁻-Flux spricht.

Eine vollständige Hemmung des VDAC ist - zumindest im Mitochondrium - nur durch Königs-Polyanion und bongkrekische Säure zu erreichen. Polydextransulfat und Polyaspartat bewirken über eine Veränderung der Spannungsabhängigkeit zunächst zu einer Verminderung der Aktivität, die bis zur Hemmung führen kann (Colombini 1989; Colombini et al. 1996).

Die immunologische Detektion des VDAC in einer Vielzahl von Geweben und Kompartimenten unterschiedlichster Funktion führte zu der bislang ungesicherten Vermutung, dass der transmembranale, porenbildende Teil des VDAC verschiedenen Kanalproteinen modular als Durchtrittspore dienen könnte, womit sowohl die in Abhängigkeit von der Lokalisation erheblichen Unterschiede im Verhalten als auch der häufige immunologische Nachweis ohne gesicherte mitochondriale VDAC-Funktion erklärt werden kann (Reymann et al. 1998; Thinnes 1992; Thinnes & Reymann 1997).

Die Summe dieser physiologischen und pharmakologischen Betrachtungen weist darauf hin, dass der im Vesikelflux-Filterassay beobachtete Anionen-Transport unter den methodischen Rahmenbedingungen von pH 6.5, Calcium-Abwesenheit und ³⁵SO₄²⁻-Detektion durch den BCl und nicht durch SCl oder VDAC vermittelt wird.

3.2 <u>Sulfatflux und Anionentransporter</u>

Die in dieser Arbeit entwickelte Modifikation des Filterassays hinsichtlich Messpuffer, Inkubation und Applikation resultiert in einer gegenüber früheren Untersuchungen deutlich erhöhten Reproduzierbarkeit der Messergebnisse, die die Grundlage für die rechnergestützte Auswertung der Rohdaten bildet. Hierdurch können nun auch kleine, aber dennoch signifikante Wirkstoffeffekte ohne störende Streuung der Messwerte kinetisch erfasst werden.

Überdies verhält sich das modifizierte Messsystem gegenüber der im Rahmen unterschiedlicher Fragestellungen variierender Parameter wie SR-Protein-Menge, ³⁵SO₄²⁻-Konzentration und Inkubationszeit äußerst stabil, was sich zum einen in der nahezu linearen Abhängigkeit des Befüllungsgrades von der Proteinmenge bei der Inkubation, zum anderen in den nur minimalen Veränderungen der hierbei gemessenen Fluxraten äußert.

Diese Beobachtung zeigt, dass die Signifikanz der Messergebnisse aus verschiedenen Experimenten nicht durch präparativ und methodisch bedingte Unterschiede verringert wird, wodurch eine direkte Vergleichbarkeit der ermittelten Parameter gewährleistet werden kann.

3.2.1 Einfluss des pH-Wertes

Um eine weitgehende Vergleichbarkeit der Ergebnisse aus Vesikel-Flux- und Einzelkanalmessungen erreichen zu können, wurde das Messpuffer-System an die Bedingungen der PLB-Experimente angenähert. Ein entscheidender Unterschied bleibt dabei jedoch das pH-Optimum der jeweilige Methode. Dieses liegt für das Vesikelfluxexperiment bei pH 6.5, im Einzelkanalexperiment jedoch bei pH 7.4. Ausgehend von der Vermittlung des Fluxes durch den BCl kann die Steigerung der Fluxrate durch die Erniedrigung des pH-Wertes von der Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit (P_o) herrühren, da diese schon bei pH 7.4 mit ~ 1.0 ihr Maximum erreicht und somit nicht mehr positiv beeinflusst werden kann. Es ist jedoch denkbar, dass die Erhöhung der Fluxrate durch den pH-Shift mit einer Veränderung der Kanaleigenschaften bezüglich Anionen-Selektivität und -Leitfähigkeit einhergeht, wodurch die Passage des bei pH 7.4 nur schlecht transportierten Sulfats erleichtert wird. Diese Modifikation des Kanals tritt nur in Bezug auf Sulfat ein, weshalb sie bei der Messung mit Chlorid nicht detektierbar ist (Kourie 1999).

In diesem Zusammenhang könnten die zahlreichen *Subconductance*-Zustände (niederleitfähige Zustände, SCZ) eine Rolle spielen, die bei allen Kanälen beobachtet werden, über deren physiologische Relevanz bislang jedoch nur gemutmaßt wird.

Bei den SCZ sind die Eigenschaften der Kanäle bezüglich Chlorid-Leitfähigkeit und Pharmakologie bei unveränderter Offenwahrscheinlichkeit modifiziert. Diese kanalinterne Regulation könnte dazu dienen, auf zellulär-funktionelle Bedingungen adäquat reagieren zu können.

Ein Zusammenhang von pH-Wert und den unterschiedlichen SC-Zuständen mit der Muskelkontraktion ist denkbar. Die Arbeit des Muskels bringt eine kontinuierliche Veränderung der physiologischen Parameter mit sich, die zu einer Ermüdung des Kontraktionsapparates, begleitet von ATP-Mangel und Ansäuerung des Myoplasmas, führen kann. Hierbei könnte eine Verminderung der Cl⁻-Leitfähigkeit der Anionenkanäle des SR zugunsten von Metaboliten wie Phosphat, Pyrophosphat sowie niederenergetischen Nukleotidderivaten eintreten.

3.2.2 Hemmeffekte

In früheren Arbeiten wurden hemmende Ligandeneffekte auf eine direkte oder allosterische Interaktion mit der Durchtrittspore zurückgeführt, die einem ,Verstopfen' des Kanals gleichkommt. Neben dieser als ,*Open Channel Block'* bezeichneten Variante der Hemmstoffwirkung muss bei der Interpretation der im Vesikelflux und PLB-Experiment ermittelten Substanzwirkungen nunmehr auch eine mögliche Beeinflussung von *Gating* und Übergang in *Subconductance*-Zustände einbezogen werden.

Im Vesikelfluxexperiment kann häufig auch durch hohe Hemmstoffkonzentrationen keine vollständige Unterbindung des Anionenfluxes erreicht werden. Dies kann möglicherweise auf

den in PLB-Untersuchungen beobachteten Effekt zurückzuführen sein, dass eine funktionelle Ligandenbindung nur bei 75% der homologen Kanäle stattfindet und bei einer noch geringeren Anzahl (50%) auch eine vollständige Wirkung entfaltet (Kourie 1997a). Auch bei *"batch"-Messungen, die in Analogie zu den Vesikelflux-Messungen nach multiplen Fusionen mehrerer Kanäle mit der PLB-Technik durchgeführt wurden, bleibt der erwartete makroskopische Hemmeffekt aus.*

Diese Beobachtung könnte eine mögliche Erklärung für die unter Einwirkung von Liganden auftretende, häufig jedoch nicht quantitativ reproduzierbare Mehrphasigkeit des Effluxes bieten, welcher unter Standardbedingungen einphasig ist.

3.2.3 Stimulationseffekte

Unter Standardbedingungen scheint der Vesikelflux durch den BCl vermittelt zu werden. Die Stimulationseffekte, die durch die Zugabe der Kationen Calcium, Magnesium, Lithium, Zink oder Cholin eintreten, könnten auf einer zusätzlichen Aktivierung des SCl beruhen. Obgleich unter Standard-PLB-Bedingungen ausschließlich Calcium und ein positiver Prä-Puls zur Aktivierung des SCl führen, ist es durchaus möglich, dass Calcium unter den besonderen Bedingungen des Vesikelflux-Experiments (pH 6.5, ³⁵SO₄²⁻-Flux) durch andere Kationen ersetzt werden kann. Auch eine sehr kurzfristige, nur teilweise Öffnung des SCl kann aufgrund seiner Leistungsfähigkeit einen großen Einfluss auf die Effluxrate haben, da der Kanal Sulfat vermutlich erheblich schneller transportiert als der BCl. Hierin könnte auch die Erklärung für das Auftreten der ,paradoxen' Effluxkurven bei Zugabe bestimmter Liganden liegen.

In den in Abb. 3.1 dargestellten Szenarien werden die Effekte von Stimulation und Hemmung sowie das Auftreten paradoxer Effluxkurven mit den Eigenschaften von BCl und SCl in Bezug gebracht. Das Schema stellt die Extrema der möglichen Fluxsituationen dar, die bei Vesikeln mit BCl oder BCl und SCl auftreten können. Hierbei liegt das Postulat zugrunde, dass unter den für die Vesikelfluxmessungen geltenden Standardbedingungen der ³⁵SO₄²⁻-Flux durch den BCl vermittelt wird und der SCl inaktiv ist. Darüberhinaus wird angenommen, dass Vesikel mit zwei oder mehr BCl-Kanälen so selten sind, dass sie in Bezug auf die Veränderung des Gesamt-Fluxes vernachlässigt werden können. Vesikel, die ausschließlich den SCl beinhalten, werden durch die Inkubation mit ³⁵SO₄²⁻ nicht beladen und tragen dementsprechend nicht zum Efflux bei.



(konkav) ist nicht aktiviert oder nicht vorhanden. Der Efflux erscheint gehemmt.

Der BCl ist aktiv, der SCl ist nicht aktiviert oder nicht vorhanden. Der Efflux erscheint ,normal'.

Der BCl ist aktiv, der SCl ist aktiviert. Das Resultat ist ein insgesamt gesteigerter Efflux. Die Beobachtung einer Zweiphasigkeit ist

Der BCl ist gehemmt, der SCl aber aktiviert. Das Ergebnis ist eine ,paradoxe' Messkurve.

Abb. 3.1 Mögliche Verteilung von BCl und SCl in SR-Vesikeln und der daraus resultierende Einfluss auf den Anionenflux

Wird der BCl gehemmt, der SCl aber aktiviert, ergibt sich eine ,paradoxe' Hemmkurve, da der Teil der Vesikel, die zusätzlich den aktivierten SCI enthalten, sehr schnell das Sulfat entlassen, der Großteil der Vesikel, die nur den gehemmten BCl enthalten, jedoch keinen Efflux aufweisen.

Die nach der Bindung einiger Liganden beobachtete Mehrphasigkeit des Effluxes kann sowohl auf die Wirkung mehrerer Kanalklassen als auch auf die Beteiligung homologer Kanäle in unterschiedlichen Zustandsformen zurückzuführen sein. Unvollständige Hemmung, ungleiche Ligandenbindung, Assoziation mit cytosolischen Faktoren oder auch Phosphorylierung können hierfür die Ursachen sein.

3.2.4 Ligandeneffekte auf den Anionentransport

Hemm- und Stimulationsstudien an Ionenkanälen dienen der Charakterisierung von Kanaleigenschaften zur Einordnung in verschiedene Kanalklassen und liefern somit auch Hinweise auf den physiologischen Kontext ihrer Funktion.

Bei der Vermessung der Anionentransportsysteme im SR fällt eine besondere Wirkstoff-Beziehung zwischen den Anionenkanälen und dem Ryanodinrezeptor auf. Ausgehend von dem inversen Effekt des starken Anionenkanalhemmstoffes DIDS (Campbell & MacLennan 1980; Klinger et al. 1999; Oba et al. 1996; Sitsapesan 1999; Zahradnikova & Zahradnik 1993) auf beide Systeme wurden weitere, für ihre Wirkung am RyR bekannte hemmende und stimulierende Substanzen eingesetzt. Dabei konnte mit Suramin der bislang stärkste Hemmstoff des SR-Anionentransports entdeckt werden (I₅₀ = 0.9-1.16 μ M).

Bei diesen Untersuchungen zeigte sich, dass auch alle anderen in diesem Zusammenhang vermessenen Substanzen Atractylosid, Calcium, Coffein, Magnesium, Nukleotide, Rutheniumrot, Ryanodin und Thapsigargin eine in Bezug auf den RyR im gleichen Konzentrationsbereich umgekehrte Wirkung aufweisen (Fill & Coronado 1988; Laver et al. 1995; Obatomi & Bach 1996; Shoshan-Barmatz 1987; Wyskovsky 1994; Xu et al. 1999).

Im Falle von Coffein, dessen Stimulation des RyR auf der Wechselwirkung mit mehreren Bindungsstellen unterschiedlicher Affinität beruht (Hasselbach & Migala 1992), zeigt sogar die Hemmung des ³⁵SO₄²⁻ -Vesikelfluxes eine deutliche Zweiphasigkeit.

Diese Beobachtungen lassen den Rückschluss zu, dass Anionentransport und Calcium-Freisetzung koordiniert sind und gegenläufig reguliert werden. Eine direkte Assoziation von Anionentransportsystemen und RyR kann hierdurch jedoch nicht bewiesen werden. Aber auch die Möglichkeit, dass der RyR selbst durch Modifikation seiner Eigenschaften den Anionentransport bewerkstelligt, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

3.3 Funktion, Eintransport und Metabolisierung von Nukleotiden im SR

Die Wirkung der Nukleotide stellt sich sowohl im Vesikelflux- als auch im Einzelkanal-Experiment als äußerst komplex dar. ATP hemmt den ${}^{35}SO_4{}^{2-}$ -Flux mit einer I₅₀ von 83 µM auf 80% der Kontrollkurve. In Anwesenheit von Magnesiumionen wird der Hemmeffekt auf 40% des Ausgangswertes gesteigert. Gleichzeitig erhöht sich die Affinität, sodass die I_{50-Magnesium} nur noch 75 µM beträgt. Diese Konzentrationen können im Einzelkanalexperiment weder den SCl (Kourie 1997a) noch den BCl hemmen. Eine signifikante Verringerung der Kanalaktivität ergibt sich hier erst ab 250 µM. Darüber hinaus wird noch eine ausgeprägte Seitenabhängigkeit der Wirkung beobachtet. Der BCl kann ausschließlich von der luminalen Seite der SR-Vesikel gehemmt werden, während der SCl auf beiderseitige Zugabe reagiert, wobei die Hemmung auf der cytoplasmatischen Seite jedoch überwiegt.

Auch GTP, UTP, CTP, ADP und Mg^{2+} -AMP-PNP hemmen den Anionenflux im Vesikel- und Einzelkanalexperiment. Daher wird angenommen, dass weder die Hydrolyse des ATP noch die spezifische Phosphorylierung des Kanals oder eines luminalen bzw. cytoplasmatischen Faktors für die Entwicklung der Hemmwirkung notwendig sind (Kourie 1997b). Die stärkste Inhibierung wird dennoch mit ATP erreicht, was zeigt, dass die Hemmwirkung nicht allein auf der Anzahl der Phosphate und der sich daraus ergebenden Nukleotid-Ladung beruht, sondern ebenfalls von der Nukleotidbase abhängt. Allerdings zeigen die im Vesikelflux-Experiment eingesetzten Polyphosphate Tripolyphosphat und Tetrapolyphosphat ebenfalls eine bedeutende Hemmwirkung, deren Werte für die maximale Inhibierung durchaus mit denen der Nukleotide vergleichbar sind. Die halbmaximale Hemmkonzentration I₅₀ ist im Vergleich zu den Nukleotiden jedoch um den Faktor 5-10 erhöht. Auch für die Inositol-Polyphosphate IP₃ und IP₄ wurde eine hemmende Wirkung zumindest auf den SCl beschrieben. Diese scheint jedoch nicht in erster Linie von der Struktur, sondern ebenfalls von der Ladung abhängig zu sein (Kourie *et al.* 1997).

Allein das cyclische Trimetaphosphat (TMP) ist in der Lage, den Vesikel-Flux zu aktivieren. Ebenso wirkt Ψ -ATP, dessen Triphosphat-Rest prinzipiell ebenfalls zur Cyclisierung fähig ist. Der Stimultionseffekt durch Ψ -ATP und Trimetaphosphat im Vesikelfluxexperiment scheint auf eine Aktivierung des SCl durch das cyclische Polyphosphat zurückzuführen zu sein, da beide Substanzen im Einzelkanalexperiment zur Hemmung des BCl führen. Allerdings kann Trimetaphosphat den BCl in einigen Fällen auch stimulieren. Besonders interessant ist hierbei der Effekt, dass TMP in der Lage ist, eine durch vergleichbare Konzentrationen von ATP, PPANS oder DIDS ausgelöste Hemmung des BCl aufzuheben. Worauf dieser Effekt beruht ist bislang unklar und bedarf weiterer Forschung.

Aus den ${}^{35}SO_4{}^{2-}$ -Influxexperimenten ergibt sich, dass ATP eine Steigerung des Influxes bewirken kann. Der daraus resultierende, teilweise "Rücktransport" des Sulfats in die Vesikel könnte sich hierbei als Hemmung des Fluxes äußern. Generell unterscheidet sich die Wirkung von ATP beim ${}^{35}SO_4{}^{2-}$ -Eintransport im Vergleich zum Effluxexperiment. Die halbmaximale Stimulation des Eintransports erfolgt mit 8-12 μ M bereits bei einer deutlich geringeren Konzentration als die Hemmung des Effluxes (75-89 μ M). Im Gegensatz zur Inhibierung des Effluxes scheint eine Hydrolyse für die Stimulation des Influxes notwendig zu sein, da AMP- PNP und AMP-PCP keinen stimulierenden Effekt zeigen. Weitergehende Untersuchungen diesbezüglich stehen noch aus.

Zur Erklärung der Effluxhemmung durch die verschiedenen Nukleotide ergeben sich mehrere Möglichkeiten. Unter der Annahme, dass der BCl den Vesikelflux bedingt, muss zur Erlangung einer luminalen Hemmung zunächst ATP in die Vesikel eintransportiert werden. Dies erscheint prinzipiell möglich, da der Eintransport von ATP und anderen Nukleotiden bewiesen ist, wird jedoch durch die Beobachtung relativiert, dass die Vorinkubation der SR-Vesikel mit ATP nicht zu einer Verstärkung der Inhibierung führt.

Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass ATP den ³⁵SO₄²⁻-Efflux über den BCl in anderer Weise beeinflusst als die Chlorid-Leitfähigkeit im Einzelkanalexperiment. Hierbei könnten wiederum die unter Nukleotidwirkung auftretenden *Subconductance-*Zustände eine Rolle spielen, die eine Hemmung des Kanals auch von der cytosolischen Seite her zulassen könnten. Zuletzt besteht auch die Möglichkeit, dass nicht das Nukleotid selbst, sondern Produkte, die sich unter der Einwirkung von SR-Protein bilden, den Großteil der Hemmung bedingen.

Wie die Metabolisierungsexperimente zeigen, wird ATP wie auch GTP in Gegenwart von SR-Protein sehr schnell hydrolysiert bzw. metabolisiert. Geschwindigkeit und Effektivität dieses Vorgangs werden durch die Zugabe von Magnesiumionen erheblich gesteigert. Dies erklärt auch die erhöhte Inhibitionseffizienz der Nukleotide in Anwesenheit von Magnesiumionen.

In diesem Zusammenhang erweist sich die Wirkung von AMP-PNP als besonders komplex. In Abwesenheit von Magnesium-Ionen führt AMP-PNP mit hoher Affinität ($S_{50} = 2.9 \mu$ M) zu einer geringen Steigerung des Effluxes. In Anwesenheit von Magnesium hingegen hemmt es den Flux mit einer I₅₀ von 4.7 μ M. Auch hier spielt vermutlich die Metabolisierung eine Rolle. AMP-PNP wird, obwohl es als nicht hydrolysierbares ATP-Analogon gilt, durch verschiedene Nukleasen abgebaut und kann auch der Adenylat-Cyclase als Substrat dienen.

Es ist wahrscheinlich, dass eine Überlagerung der skizzierten Effekte zu der beobachteten Hemmung des Vesikelfluxes durch Nukleotide führt. Gleichwohl belegen die Metabolisierungsexperimente einen schnellen Umbau, sodass bei einer angenommenen direkten Hemmwirkung durch das Nukleotid zumindest die Werte für die konzentrationsabhängige Inhibierung relativiert werden müssen, da schon nach kurzer Zeit nur noch ein Bruchteil der eingesetzten Nukleotidmenge unverändert wirksam ist.

Diese Beobachtung gilt natürlich ebenso für Einzelkanalmessungen, obgleich die SR-Protein-Konzentration hier mit 5-10 µg/ml gegenüber dem Fluxexperiment um den Faktor 20 verringert ist. Dies muss besonders in Bezug auf die seitenabhängige Wirkung verschiedener metabolisierbarer Liganden bedacht werden. Da die übrigen SR-Vesikel nach erfolgter Fusion nicht aus dem cis-Puffer entfernt werden, tritt ein Ungleichgewicht bezüglich der Nukleotid-Metabolisierung im Cis- und Trans-Kompartiment auf.

3.3.1 Metabolisierung der Nukleotide im SR

Bei der Inkubation von Nukleotiden findet in Abhängigkeit von der Art des eingesetzten Nukleotides innerhalb weniger Minuten ein vollständiger Abbau statt. Die Charakterisierung und Quantifizierung der Produkte durch DC-Analyse ist teilweise schwierig und kann nur indirekt über Referenzsubstanzen erfolgen. Dennoch sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen interessant und können zur Entdeckung möglicher, nukleotidgekoppelter Regulationsmechanismen beitragen. Für die Vermittlung der Metabolisierung kommen sowohl die zahlreichen intrinsischen Proteinkinasen und ATP-verbrauchenden Prozesse als auch der Umbau in möglicherweise regulatorisch aktive Produkte in Frage. Der Umbau von ATP wie auch GTP lässt sich durch Calcium und Magnesium verstärken. Suramin, welches sich als besonders wirksamer Hemmstoff des Vesikelfluxes erwies, reduziert die Menge der Produkte oder kann deren Bildung teilweise sogar gänzlich unterbinden. Eine hemmende Wirkung von Suramin auf verschiedene Diadenosin-Polyphosphat-Hydrolasen ist bekannt (Rotllan et al. 1998; Voogd et al. 1993), sodass eine ähnliche Wirkung auf metabolisierende Enzyme von ATP und ATP-Derivaten im SR wahrscheinlich ist. Die Hemmung der Ca²⁺-ATPase durch Suramin könnte ebenfalls eine verminderte Hydrolyse zur Folge haben (Lavton & Azzi 1974).

Die Beobachtung, dass der Einsatz von γ -[³²P]ATP bei gehemmter Myokinase zur Bildung von radioaktiv markiertem ADP führt, lässt sich durch die Bildung von $\alpha\beta\beta$ '-ATP (Ψ -ATP) über ein cyclisches Adenosin-Trimetaphosphat erklären.

Mit synthetisiertem Ψ -ATP als Vergleichssubstanz kann es als eines der radioaktiven Produkte sowohl von α - als auch von γ -[³²P]ATP identifiziert werden. Ψ -ATP ist sowohl im Vesikelflux- als auch im Einzelkanalexperiment wirksam, wobei es jedoch ambivalente Wirkungen aufweist.

Diadenosinpolyphosphate, die im Metabolisierungsexperiment als wahrscheinlich auftretende Produkte eingestuft wurden, aber nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden konnten, zeigten in ihrer Wirkung auf ³⁵SO₄²⁻-In- und -Efflux, sowie im Einzelkanalexperiment und beim Nukleotideintransport nur einen äußerst geringen Effekt. Dennoch kann eine Beteiligung an der Regulation der Anionenkanäle unter physiologischen Bedingungen nicht ausgeschlossen werden.

3.3.2 Eintransport von Nukleotiden

Im Lumen des SR befinden sich eine Reihe von Proteinen (Calsequestrin, Phospholamban, HCP, Sarcalumenin), die neben ihrer Funktion als Ca²⁺-bindende Proteine in Abhängigkeit vom Phosphorylierungsgrad regulatorisch sowohl auf die Ca²⁺-ATPase als auch den RyR einwirken (Levitan 1994). Als Vermittler dieser Phosphorylierung gelten neben einer Autophosphorylierung der verschiedenen Proteine die Casein Kinase II (CKII) (Hadad et al. 1999), die cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA) oder die Calmodulin-abhängige Proteinkinase (PKC) (Campbell & MacLennan 1982; Leddy *et al.* 1993; Salvatori *et al.* 1993; Xu *et al.* 1997).

Die Phosphorylierung der luminalen Proteine macht einen Transport von Nukleotiden über die SR-Membran notwendig, da bislang keine ATP-generierenden Systeme innerhalb des SR bekannt sind.

Für eine Reihe von Anionen-Kanälen aus verschiedenen Organen und Kompartimenten konnte gezeigt werden, dass sie neben den kleinen anorganischen Ionen auch den Transport großer organischer Ionen, besonders ATP vermitteln. Zu diesen Kanälen gehört neben dem VDAC auch der PKA-aktivierte *,Cystic Fibrosis Transmembane Conductance Factor'* (CFTR), der sich unter anderem durch Suramin hemmen lässt und somit pharmakologische Parallelen zu den Anionentransportsystemen aus dem SR aufweist (Bachmann *et al.* 1999; Picciotto *et al.* 1992; Reisin *et al.* 1994). Neben dem indirekten Nachweis des ATP-Transports über die SR-Membran des Skelettmuskels (Shoshan-Barmatz et al. 1996) konnte kürzlich auch die Existenz von nukleotidpermeablen Anionenkanälen im SR des Herzmuskels im Einzelkanalexperiment nachgewiesen werden (Kawano et al. 1999). Weiterhin wird das Vorkommen des mitochondrialen ADP/ATP-Translokators (AAT) im SR diskutiert, der in direkter Assoziation mit dem RyR eine regulatorische Wirkung haben könnte (Yamaguchi et al. 1999).

Einen Beitrag zu dieser Thematik liefert die Untersuchung des Eintransports von ATP, GTP und AMP-PNP, die mit unterschiedlicher Effizienz und Geschwindigkeit in die SR-Vesikel eintransportiert werden. Besonders wichtig ist hierbei die Unterscheidung von Eintransport gegenüber der möglichen unspezifischen Bindung der Nukleotide an Membran und Proteine der SR-Vesikel.

Für einen Eintransport spricht der zeitliche Rahmen der Influx-Experimente, der mit 6-9 Minuten bis zum Erreichen des Maximums weit über der für eine Bindung zu erwartenden Zeit liegt. Die konzentrationsabhängige Sättigung des Eintransports sowie die Beeinflussung durch spezifische Hemmstoffe unterstreichen nochmals den Kanal/Carrier-vermittelten Nukleotideintransport.

Eine unspezifische Bindung von Nukleotiden tritt mit hoher Wahrscheinlichkeit ein, durch den Nachwasch sollten diese jedoch weitgehend entfernt werden. Das Maß der spezifischen Bindung durch Proteine wie die Ca²⁺-ATPase ist nur schwer zu bestimmen. Berechnungen hierzu ergaben, dass die maximal erreichte Radioaktivität der Proben nur etwa 10% dessen entspricht, was bei quantitativer Bindung allein an die Ca²⁺-ATPase zu erwarten wäre. Gleichwohl liegt der maximale Eintransport weit über der Einstellung des Konzentrations-Gleichgewichts zwischen Innenvolumen und Inkubationsmedium. Trotz des Eintransports von AMP-PNP über dieses Gleichgewicht hinaus kann nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass eine Hydrolyse der Nukleotide für den Transport notwendig ist. Die bei den ATP-Influxexperimenten beobachtete konzentrationsabhängige Hemmung durch AMP-PNP ähnelt stark der Verdünnung der spezifischen Aktivität durch nichtradioaktives ATP. Dies legt zunächst nahe, dass AMP-PNP genauso wie ATP in die Vesikel eintransportiert wird und der Hemmeffekt auf Kompetition zurückzuführen ist. Im direkten Vergleich ergeben sich jedoch deutliche Unterschiede, bei denen sich zeigt, dass AMP-PNP sowohl weniger effektiv den ATP-Eintransport ,stimuliert' als auch selbst mit geringerer Effektivität in die Vesikel eintransportiert wird.

Beim Nukleotideintransport fällt besonders das gegenüber ATP deutlich erhöhte Eintransport-Niveau von GTP auf, das in Hinblick auf das niedrigere AMP-PNP-Niveau ebenfalls nicht allein auf eine gesteigerte Bindung zurückgeführt werden kann. Durch die Existenz der Casein-Kinase im SR, die sich dadurch auszeichnet, dass sie GTP mit gleicher Effektivität wie ATP als Edukt zur Phosphorylierung verwenden kann, eröffnet sich die Möglichkeit, dass GTP hier regulatorisch wirkt. Die erhöhte Eintransport-Effektivität für GTP könnte in der im Vergleich zu ATP geringeren physiologischen Konzentration von GTP begründet sein. Letztere ist überdies nur indirekt von der Muskelaktivität abhängig, was eine ,gepufferte' Regulationsantwort auf den energetischen Zustand der Muskelzelle ermöglichen würde.

In Abhängigkeit von Nukleotidart und Magnesium- sowie Calcium-Konzentration muss jedoch auch die eventuelle Hydrolyse berücksichtigt werden, die, wie die Metabolisierungsexperimente belegen, unter allen Bedingungen für GTP niedriger ist als für ATP.

Weiter unterscheiden sich die kinetischen Parameter für alle drei Nukleotide deutlich, sodass auch dies gegen eine unspezifische Bindung spricht. Ausserdem lässt sich die NukleotidAkkumulation im SR durch die Modifikation der Pufferbedingungen sowie durch den Einsatz von Hemmstoffen inhibieren.

Durch die Erhöhung des pH-Wertes von 6.5 auf 7.4 wird der maximale Eintransport von ATP um den Faktor 2.6 verringert. Interessant ist die Beobachtung, dass Magnesium und Calcium, die einzeln zugesetzt den Eintransport vermindern, gemeinsam zu einer Erhöhung des Eintransports um mehr als 20% führen. Dies ist umso erstaunlicher, als hier Ca^{2+} -Transportbedingungen geschaffen werden, unter denen die Ca^{2+} -ATPase eine ATP-Hydrolyse bewirken sollte. Allerdings liegt die ATP-Konzentration mit 5 nM weit unterhalb des für die Funktion der Ca^{2+} -ATPase optimalen Bereichs (~ 1 mM).

Die aus den ${}^{35}SO_4{}^{2-}$ Effluxexperimenten bekannten Substanzen DIDS (100 μ M), PPANS (100 μ M) und Suramin (10 μ M) erweisen sich auch beim ATP-Transport als äußerst effektive Hemmstoffe, wenngleich eine vollständige Unterbindung des Transports nicht erreicht wird. Der verbleibende Restflux von etwa 10% könnte auf die mögliche Nukleotid-Vesikel-Bindung zurückzuführen sein.

Atractylosid, ein Hemmstoff des mitochondrialen ADP/ATP-Translokators hemmt den ATP-Eintransport, obgleich es den ${}^{35}SO_4{}^{2}$ -Efflux stimuliert. Weitergehende Untersuchungen hierzu stehen noch aus.

Antikörper gegen Human-Porin haben keinerlei hemmende Wirkung auf den Nukleotideintransport. Die von Shoshan-Barmatz (Shoshan-Barmatz et al. 1996) postulierte Beteiligung des VDAC am Nukleotidtransport, die auf der Beobachtung der unter Einsatz von Anionenkanalhemmstoffen verminderten Markierung luminaler Proteine durch γ -[³²P]ATP beruht, erscheint hierdurch zumindest zweifelhaft. Die Beteiligung von BCl, SCl oder sogar AAT erscheint aufgrund der Hemmstoffwirkung eher gegeben.

Die Unterschiede im Eintransport von ATP und GTP beschränken sich nicht nur auf die maximal eintransportierte Menge, sondern auch auf die Wirkung von Suramin und Heparin. Der GTP-Eintransport wird dabei weit weniger durch Suramin unterbunden als der ATP-Eintransport. Auch Heparin, Polyanion und stärkster Hemmstoff der Casein-Kinase II, beeinflusst den Transport von GTP weit weniger als den von ATP. Der unter Suramin-Einwirkung erzielte GTP-Restflux entspricht in etwa der Differenz zwischen maximalem ATP- und GTP-Eintransport. Möglicherweise existiert für GTP ein weiterer Transportweg, der zum einen für ATP verschlossen, zum anderen nicht durch die üblichen Anionen-kanalhemmstoffe inhibierbar ist. Außer der bislang einmaligen Erwähnung des AAT (Yamaguchi et al. 1999) sind in der Literatur keine Hinweise auf weitere, spezialisierte Nukleotidtransporter im SR bekannt. In neuesten Veröffentlichungen wurde gezeigt, dass im

Mitochondrium bemerkenswerte Unterschiede zwischen dem Transport von Adenin- und Guanin-Nukleotiden bestehen (McKee *et al.* 2000).

Die erhebliche Steigerung des ATP-Eintransports durch die cyclischen Nukleotidmonophosphate cAMP und cGMP sowie die nicht hydrolysierbaren ATP-Analoga AMP-PNP und AMP-PCP weisen auf die Beteiligung eines möglicherweise bislang unentdeckten Kanals im skelettmuskulären SR hin, der durch cAMP bzw. PKA reguliert wird. Im cardialen SR konnten solche Kanäle detektiert werden (Kawano *et al.* 1992). Auch die Interaktion von CFTR und Ca²⁺-aktivierten Chloridkanälen ist für andere Kompartimente beschrieben worden (Wei *et al.* 1999) und bietet eine Erklärungsmöglichkeit für die Stimulation durch cyclische Nukleotidmonophosphate.

3.4 Betrachtung der physiologischen Funktion der Anionenkanäle

Die Aufgabe der Anionenkanäle wurde lange ausschließlich in ihrem Beitrag zur Ladungsbalance gesehen. Die Existenz der unterschiedlichen Anionentransportwege, ihre topologische und funktionelle Nähe zu den Kationentransportsystemen sowie ihre vielfältigen Eigenschaften legen jedoch weitergehende Funktionen nahe. Überdies werden einige dieser Kanäle quantitativ durch Ionen und Liganden in physiologischen Konzentrationen gehemmt.

Ein moderater Chlorid-Fluss über die SR-Membran scheint zur Regulation der Ca²⁺-Freisetzung durch die Ca²⁺-Release Kanäle notwendig zu sein (Fink & Veigel 1996; Meissner et al. 1997). Außerdem erfüllt Chlorid auch an der Muskelfaser selbst regulatorische Aufgaben (Coonan & Lamb 1998).

Da sich die Chloridkonzentrationen in Myoplamsa und Lumen des SR aber nicht unterscheiden und sich dies auch während längerer Kontraktions-Phasen nicht ändert, gibt es neben der kurzfristigen Ladungskompensation bislang keinerlei Anhaltspunkte für eine regulatorische Funktion. Besonders die Aufgabe des ,kleinen' Anionen-Kanals (SCI) ist angesichts der ,großen' Anionenkanäle (BCl und VDAC) unklar, da sich letztere überdies durch eine höhere Offenwahrscheinlichkeit und einen weniger komplizierten *Gating-*Mechanismus auszeichnen. Im physiologischen Kontext müssen die großen Kanäle entweder aufgrund bislang unbekannter cytoplasmatischer oder regulativer Faktoren meistens geschlossen sein, oder die kleinen Kanäle dienen dem Transport von Substanzen, für die die großen Kanäle impermeabel sind. Einen Hinweis hierfür bietet die beim SCI beobachtete geringe Bevorzugung bestimmter Anionen, aufgrund dessen eine mögliche Beteiligung am Nukleotidransport postuliert wird (Ahern & Laver 1998). Die Tatsache, dass der SCI durch physiologische ATP-Konzentrationen gehemmt wird, relativiert jedoch diese Annahme selbst unter der Voraussetzung eines Block-Permeations-Mechanismusses, bei dem das zu transportierende Substrat durch die Pore ,gequetscht' wird.

Der Efflux von radioaktivem Pyrophosphat und die beobachtete Permeabilität des SR für Phosphat (Fryer *et al.* 1997) weist allerdings auf die mögliche Funktion des SCI als Vermittler des Transports von Phosphat hin, mit der eine mäßige Permeabilität für Nukleotide einhergehen könnte (Ahern & Laver 1998; Fruen et al. 1994). Da Phosphat sowohl an den Muskelfasern als auch am RyR regulatorisch wirksam ist (Balog *et al.* 2000; Duke & Steele 2000; Fruen et al. 1994; Shoshan-Barmatz 1987), liegt die Existenz eines Transportmechanismus zur Kontrolle seiner cytoplasmatischen Konzentration nahe. ATP-Verbrauch und Regeneration während der Muskelkontraktion müssen feinreguliert werden, da sowohl ATP als auch seine Produkte gegenläufige regulatorische Aufgaben erfüllen (Hochachka 1994). Möglicherweise dient das SR als Speicher für Phosphat und die niedrigenergetischen Nukleotide ADP und AMP, die bei Bedarf aus dem Gleichgewicht entfernt oder wieder eingeschleust werden können. Die Entfernung der Nukleotidprodukte aus der Umgebung der aktiven Muskelfaser ist notwendig für die Aufrechterhaltung der Kontraktionsfähigkeit im Ermüdungszustand, bei dem an der Faser im Vergleich zum Myoplasma ein relativ hohes ATP/ADP Verhältnis ,vorgetäuscht' wird (Korge 1995; Korge *et al.* 1993).

Für den Nukleotidtransport über die SR Membran, der zur Phosphorylierung der luminalen Proteine notwendig ist, können sowohl die bekannten Anionenkanäle oder auch spezielle Transporter dienen (Yamaguchi et al. 1999). Für Letztere spricht der für eine Kanalvermittlung vergleichsweise langsame Nukleotid-Eintransport, der, im Minutenbereich liegend, besser mit dem Modell eines Carriers wie dem AAT harmoniert (Klingenberg 1989, McKee, 2000 #520; Klingenberg 1993; Winkler & Neuhaus 1999).

Obwohl auch dem BCl eine Nukleotidtransport-vermittelnde Rolle zugeschrieben wird (Kourie 1997b), sprechen seine Eigenschaften eher für eine Funktion im Bereich der Ladungskompensation oder direkten Regulation von Ca²⁺-ATPase und RyR. Mit den Untersuchungen der Ligandenwirkung auf den mit hoher Wahrscheinlichkeit BCl-vermittelten ³⁵SO₄²⁻-Flux lassen sich zwei Klassen von Wirkstoffen unterscheiden. Die meisten Hemmstoffe der Ca²⁺-ATPase hemmen auch den ³⁵SO₄²⁻-Flux. Substanzen und Ionen mit Wirkung am RyR üben eine gegenteilige Wirkung auf den Anionenflux aus. Der hierdurch implizierte Zusammenhang muss durch kommende Untersuchungen weiter charakterisiert werden.

Die Hemmung der Ca²⁺-ATPase durch die Inhibierung des gegenläufigen Anionenfluxes kann durch die Untersuchungen an Vesikeln mit rekonstituierter Ca²⁺-ATPase ausgeschlossen werden. Auch die rekonstituierten Vesikel, die erwiesenermaßen keinen Anionentransport zeigen, weisen eine Ca²⁺-Akkumulation auf, die sich durch Anionenkanalhemmstoffe wie Suramin und PPANS unterbinden lässt.

Die eventuelle topologische Assoziation der Anionenkanäle mit der Ca^{2+} -ATPase oder dem RyR, wie sie im Skelettmuskel zwischen VDAC und Ca^{2+} -ATPase (Shafir et al. 1998) sowie RyR und AAT bestehen soll (Yamaguchi et al. 1999), ist Gegenstand aktueller Forschung.

4 Zusammenfassung

- Die Membran des SR besitzt mehrere unterscheidbare Transportsysteme für organische und anorganische Anionen. Diese Transportsysteme lassen sich durch Anionenfluxmessungen mit der Filterassay-Methode und durch Einzelkanalmessungen mit der Planarmembrantechnik charakterisieren.
 Der Vergleich der mit beiden Methoden ermittelten Daten ergibt, dass der ³⁵SO₄²⁻-Flux unter Standardbedingungen durch den als BCl (*Big Chloride Channel*) bezeichneten Chloridkanal bewerkstelligt wird und eine Steigerung der Effluxrate im Vesikelfluxexperiment auf die zusätzliche Aktivierung des als SCl (*Small Chloride Channel*) bezeichneten Chloridkanals zurückzuführen ist.
- 2. Neben Chlorid und Sulfat werden auch andere organische und anorganische Anionen wie Jodid, Pyrophosphat, Oxalat und Nukleotide transportiert.
- 3. Der stärkste Hemmstoff von ${}^{35}SO_4{}^{2-}$ und Nukleotid-Transport ist der Purinozeptor-Antagonist Suramin mit einer I₅₀ von 0.9-1.16 μ M.
- Eine Stimulation des ³⁵SO₄²⁻-Transports kann durch die Kationen Calcium, Magnesium und Cholin erreicht werden. Ebenso wirken Hemmstoffe des RyR wie Ryanodin und Atractylosid stimulierend bzw. aktivierend.
- 5. ³⁵SO₄²⁻-Influx und -Efflux werden durch Nukleotide unterschiedlich beeinflusst. Der Efflux wird in Abhängigkeit von Nukleotidbase, Anzahl der Phosphatreste und der Ladung gehemmt. Unter Magnesiumeinwirkung ist der Hemmeffekt verstärkt und auch das als nicht hydrolysierbar geltende ATP-Analogon AMP-PNP wirkt inhibierend. Der maximale ³⁵SO₄²⁻-Influx hingegen ist in Anwesenheit von ATP erhöht. Die ATP-Analoga AMP-PNP und AMP-PCP zeigen diesen stimulierenden Effekt nicht.
- ATP und GTP werden in Anwesenheit von SR-Protein schnell ab- und umgebaut. Dieser Umbau lässt sich durch Magnesium und verschiedene Hemmstoffe des Anionenfluxes beeinflussen.

- 7. Der Eintransport von Nukleotiden in das Lumen des SR lässt sich durch Hemmstoffe des Anionenfluxes inhibieren. Die zusätzliche Hemmbarkeit durch Atractylosid, einen Inhibitor des mitochondrialen ATP/ADP-Translokators (AAT), impliziert die Möglichkeit einer Beteiligung dieses Transportproteins am Nukleotidtransport.
- 8. Inhibitoren der Ca²⁺-ATPase hemmen auch den Anionenflux. Die Vermittlung des Anionentransports durch die Ca²⁺-ATPase selbst sowie die Hemmung des Ca²⁺-Eintransports aufgrund der Inhibition der Anionenkanäle sind ausgeschlossen. Vesikel mit rekonstituierter Ca²⁺-ATPase weisen keinen Anionentransport auf, obwohl der Ca²⁺-Eintransport durch Anionenkanalhemmstoffe wie Suramin, DIDS und PPANS inhibiert werden kann.
- 9. Beim Anionenflux eingesetzt zeigen Aktivatoren und Inhibitoren des Ca²⁺-Release-Kanals gegenläufige Effekte. Der Ca²⁺-Release-Kanal ist nicht der Vermittler des Anionentransports. Anionentransporter sind im RyR-freien longitudinalen SR ebenso häufig wie in den RyR-reichen terminalen SR-Zisternen.

5 Experimenteller Teil

5.1 Präparation der SR-Vesikel

Native SR-Vesikel werden durch eine Folge von differentiellen Zentrifugationen aus Kaninchenmuskel isoliert. Diese Methode der differentiellen Zentrifugation beruht im Wesentlichen auf dem Verfahren von Hasselbach und Makinose (Hasselbach & Makinose 1961), modifiziert nach De Meis und Hasselbach (Hasselbach & Makinose 1963; Meis de & Hasselbach 1971).

Alle Schritte werden bei 4°C mit gekühlten Pufferlösungen durchgeführt. Im Weiteren werden von allen Überständen und Sedimenten Proben für die spätere SDS-Polyacrylamid-Gelektrophorese (SDS-PAGE) entnommen.

Die Hinterlauf- und Rückenmuskulatur (etwa 500 g) eines frisch geschlachteten Kaninchens wird zunächst im Fleischwolf zerkleinert, dann in drei gleich große Portionen aufgeteilt, mit je 500 ml Puffer A eine Minute im Waring Blendor homogenisiert und schließlich bei 6870 g (15 Minuten, GSA-Rotor, 6500 rpm, 4°C) zentrifugiert.

Der Überstand wird durch Gaze gefiltert und mit 0.1N KOH auf pH 7.4 eingestellt. Daraufhin erfolgt eine zweite Zentrifugation bei 8250 g (15 Minuten, GSA-Rotor, 7800 rpm, 4°C).

Der Überstand wird wiederum durch Gaze filtriert und dann bei 45000 g (60 Minuten, SS34-Rotor, 19500 rpm, 4°C) zentrifugiert.

Das Sediment wird in 160 ml Puffer B resuspendiert und im Potter (Elvehjem) homogenisiert. Danach wird das Homogenisat bei 4340 g (15 Minuten, SS34-Rotor, 6000 rpm, 4°C) zentrifugiert.

Der Überstand wird mit dem 1.5fachen Volumen an Puffer C versetzt und 90 Minuten bei 80000 g (45Ti-Rotor, 30500 rpm, 4°C) zentrifugiert.

Das Sediment wird in 200 ml Puffer D resuspendiert und im Potter (Elvehjem) homogenisiert. Es schließt sich eine weitere Zentrifugation bei 80000 g (90 Minuten, 45Ti-Rotor, 30500 rpm, 4°C) an.

Auf die Resuspension des Sediments in 200 ml Puffer E und die anschließende Homogenisierung im Potter (Elvehjem) folgt ein letzter Zentrifugationsschritt bei 80000 g (60 Minuten, 45Ti-Rotor, 30500 rpm, 4°C).

Das Sediment wird je nach angestrebtem Verwendungszweck in 15 ml Puffer E oder E-II homogenisiert und in Eppendorf-Gefäßen zu Portionen von 10-200 µl aufgeteilt. Die isolierten SR-Vesikel werden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und sind bei -80°C mehrere Monate lagerfähig.

Pufferlösungen

Das Ansetzten der Puffer erfolgt einen Tag vor der Präparation. Der Proteaseinhibitor Leupetin wird erst am Versuchstag zugesetzt. Der pH-Wert der Puffer beträgt 7.4 und wird mit HCl bzw. KOH eingestellt.

Puffer A:	100 mM KCl	
	2 mM EDTA	
	$2.5 \text{ mM} \text{ KH}_2 \text{PO}_4$	
	$2.5 \text{ mM} \text{ K}_2 \text{HPO}_4$	
	1 mM ß-Mercapto	ethanol
	0.5 µg/ml Leupeptin	
Puffer B:	50 mM KCl	
	1 mM TEA	
	1 M Saccharose	
	1 mM ß-Mercapto	ethanol
	0.5 µg/ml Leupeptin	
Puffer C:	I M KCI	
	I mM TEA	
	160 mM Saccharose	
	3.35 mM ATP	
	3.35 mM MgCl_2	
	0.5 µg/ml Leupeptin	
Puffer D:	100 mM KCl	
	1 mM TEA	
	96 mM Saccharose	
	1 mM ß-Mercaptoe	thanol
	-	
Puffer E:	100 mM KCl	
	1 mM TEA	
Puffer M:	100 mM_KCl	
1 UIIOI IVI.	10 mM HEDES nH	6 5
	TO INVESTICATES PIL	0.5
5.2 Auftrennung der SR-Vesikel in HSR und LSR

Die Auftrennung der homogenen SR-Vesikel-Präparation in HSR (*Heavy* SR) und LSR (*Light* SR) erfolgt durch die Zentrifugation über einen dreistufigen Saccharose-Dichtegradienten.

In klaren Beckman SW-28 Zentrifugenröhrchen wird ein dreistufiger Saccharosegradient gebildet, indem jeweils 12 ml 40%, 32% und 23% Saccharoselösung in Puffer E übereinandergeschichtet werden. Auf die Gradienten werden 200 μ l SR-Suspension (~ 5 mg) aufgebracht und anschließend 90 Minuten bei 25.000 rpm im Beckman SW-28-Rotor zentrifugiert.

Die zwei definierten Banden, die sich an der oberen und unteren Grenze der mittleren Saccharoseschicht aufkonzentrieren, werden dann von oben abgesaugt und 1:5 mit Puffer E verdünnt. Die obere Bande wird aus LSR , die untere Bande aus HSR gebildet.

Die Präparationen werden dann für 30 Minuten bei 20.000 rpm im SS34-Rotor zentrifugiert und nach der Resuspension in 1 ml Puffer E/M einem Proteintest unterzogen.

Beide Präparationen werden dann wie native SR-Vesikel auf einer SDS-PAGE aufgetrennt und funktionell vermessen.

5.3 <u>Aufreinigung und Rekonstitution der Ca²⁺-ATPase</u>

5.3.1 Solubilisierung der SR-Proteine

Der Solubilisierungspuffer wird doppelt konzentriert angesetzt.

Puffer F (Solubilisierungspuffer)50 mMMOPSpH 7.01 mMCaCl21 mMMgCl22% (w/v) $C_{12}E_9$ 12% (w/v)Saccharose1 mMPMSF0.5 µg/mlLeupeptin

Die Solubilisierung wird durch Zugabe der SR-Vesikel zum Ansatz (2 mg SR-Protein/ml) gestartet und erfolgt unter leichtem Rühren auf Eis. Der Großteil der Proteine ist nach 30 Minuten solubilisiert. Nicht solubilisiertes Lipid und Protein wird im Anschluß durch

Zentrifugation bei 176000 g (75 Ti-Rotor, 50000 rpm, 60 min, 4°C) entfernt. Für die spätere Proteinbestimmung und SDS-PAGE wird das Sediment in 1 ml H₂O resuspendiert.

5.3.2 Affinitätschromatographische Aufreinigung der Ca²⁺-ATPase mit Reactive Red 120 Typ 3000-Cl

Die Aufreinigung bei Raumtemperatur (20°C) erfolgt nach einer Methode von Coll und Murphy (Coll & Murphy 1984). Hierzu wird eine Agarosesäule mit immobilisiertem Farbstoff (Reactive Red 120, Sigma-Aldrich) verwendet, der eine hohe Affinität zum Nukleotidbindungszentrum der ATPase aufweist. Das von uns verwendete Material hat eine Kapazität von 10 mg Protein/ml Säulenmaterial.

Auf die mit Puffer F voräquilibrierte Säule wird der Überstand aus 5.2.1 aufgetragen. Die Durchflussgeschwindigkeit beträgt hier 25 ml/h.

Die Säule wird dann mit 5-10 Säulenvolumen Puffer G bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 40 ml/h gespült.

Puffer G (Waschpuffer)	50 mM	MOPS	pH 7.0
	1 mM	$CaCl_2$	
	1 mM	MgCl ₂	
	1% w/v)	$C_{12}E_{9}$	
	12% (w/v)	Saccharose	•
	1 mM	PMSF	
	0.5 µg/ml	Leupeptin	
Puffer H (Elutionspuffer)	50 mM	MOPS	pH 7.0
Puffer H (Elutionspuffer)	50 mM 1 mM	MOPS CaCl ₂	pH 7.0
Puffer H (Elutionspuffer)	50 mM 1 mM 1 mM	MOPS CaCl ₂ MgCl ₂	рН 7.0
Puffer H (Elutionspuffer)	50 mM 1 mM 1 mM 1% (w/v)	$\begin{array}{l} \text{MOPS} \\ \text{CaCl}_2 \\ \text{MgCl}_2 \\ \text{C}_{12}\text{E}_9 \end{array}$	рН 7.0
Puffer H (Elutionspuffer)	50 mM 1 mM 1 mM 1% (w/v) 12% (w/v)	$\begin{array}{l} \text{MOPS} \\ \text{CaCl}_2 \\ \text{MgCl}_2 \\ \text{C}_{12}\text{E}_9 \\ \text{Saccharose} \end{array}$	рН 7.0
Puffer H (Elutionspuffer)	50 mM 1 mM 1 mM 1% (w/v) 12% (w/v) 1 mM	MOPS $CaCl_2$ $MgCl_2$ $C_{12}E_9$ Saccharose PMSF	рН 7.0
Puffer H (Elutionspuffer)	50 mM 1 mM 1 mM 1% (w/v) 12% (w/v) 1 mM 0.5 µg/ml	MOPS CaCl ₂ MgCl ₂ C ₁₂ E ₉ Saccharose PMSF Leupeptin	рН 7.0

Die Elution der Ca²⁺-ATPase erfolgt mit 5-6 Säulenvolumen Puffer H. Nach Erreichen des AMP-PNP Plateaus (Abb. 5.1) wird erneut mit Puffer G gespült. Unspezifisch gebundene Proteine werden dann mit 2 M KCl eluiert.



Abb. 5.1 Schematische Darstellung des Elutionsprofils einer Reactive Red 120 Säule. Die Chromatographie wird bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Elution erfolgt mit 400 μ M AMP-PNP. Die Durchflussgeschwindigkeit beträgt in Abhängigkeit des Elutionsschrittes 25-40 ml/h. Die Messung der Extinktion erfolgt bei 260 nm. Ein großer Teil des Proteins im KCl-Peak ist unspezifisch gebundene Ca²⁺ATPase.

5.4 <u>Rekonstitution aufgereinigter Ca²⁺-ATPase</u>

5.4.1 Vorreinigung des Asolektins

10 g Asolektin (Fluka) werden in 200 ml trockenem Aceton suspendiert und unter einer Argonatmosphäre für 48 Stunden gerührt. Die Suspension wird dann über eine G-4-Fritte filtriert und erneut mit Aceton gewaschen. Der Filterkuchen wird in 120 ml Diethylether gelöst und wieder gefiltert. Anschließend entfernt man das Lösungsmittel im Rotationsverdampfer.

Das Ergebnis wird durch Dünnschicht-Chromatographie auf einer PEI-Celluloseplatte überprüft. Als Laufmittel dient ein Gemisch aus Chloroform, Methanol und Wasser im Verhältnis 65:25:4. Die Entwicklung erfolgt in einer Jod-Kammer.

5.4.2 Herstellung der Liposomen mittels der Extrusion des Lipids durch Polycarbonatmembranen

```
Puffer I: 100 mM KCl
10 mM MOPS pH 7.0
```

300 mg Asolektin werden in 3 ml Puffer I aufgeschlämmt. Durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen in flüssigem Stickstoff entstehen aus den freien Lipiden Liposomen, die jedoch häufig mehrschalig sind und eine heterogene Größenverteilung aufweisen. Beim mehrmaligen Pressen der Suspension durch eine Polycarbonatmembran von 400 nm Porenweite entstehen einschalige Asolektinvesikel definierter Größe. Hierzu wird der Extrusionsapparat Liposofast der Firma Avestin verwendet. Anschließend wird die Lipidlösung mit Puffer I auf 60 mg /ml verdünnt.

5.4.3 Rekonstitution

Die besten Rekonstitutionsergebnisse werden mit einem Lipid-Protein-Verhältnis von 20:1 bis 30:1 erzielt. Der Proteingehalt des Eluats wird anhand des Elutionsprofils abgeschätzt und eine entsprechende Menge der Vesikelsuspension aus 5.4.2 zugegeben. Das Volumen richtet sich nach der Menge des Eluats aus 5.3.2. Es variiert deshalb von 0.8 bis 2.4 ml. Der Ansatz wird bei Zimmertemperatur gerührt und nach 5 Minuten auf 200 mM KCl eingestellt. Nach weiteren 25 - 30Minuten beginnt die Detergensentfernung durch die Zugabe detergensbindender Polystyrolkügelchen (BioBeads, Fa. BioRad). In einem ersten Schritt werden 320 mg BioBeads pro ml Lösung zugegeben und eine Stunde lang gerührt. Über eine Glasfritte werden die BioBeads von der Lösung getrennt. Nach Spülen mit 1-2 ml Puffer I werden dem Durchlauf weitere 640 mg Beads/ml zugegeben und der Ansatz weitere 2 h gerührt. Die Beads werden erneut entfernt und gespült. Die Proteoliposomen-Lösung wird dann in 5 ml-Portionen bei -80°C eingefroren.

Nach dem Auftauen werden die Proben bei 78000 g (90 Minuten, 70Ti-Rotor, 33000 rpm, 4°C) zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Sediment in 1 ml Puffer I homogenisiert. Anschließend erfolgt die Bestimmung des Proteingehalts nach Popov (vgl. 5.4.2). Die Vesikelsuspension wird dann auf 1 mg/ml verdünnt, in 250 μ l-Portionen aufgeteilt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

5.4.4 Vorbereitung und Regenerierung der BioBeads (BioRad)

Die Vorbereitung der BioBeads erfolgt verändert nach Holloway (Holloway 1973).

25 g trockene BioBeads werden dreimal mit je 500 ml Methanol und dreimal mit je 500 ml Wasser für jeweils 10 Minuten gerührt und anschließend abfiltriert. Danach werden die feuchten Beads in eine Säule mit Glasfritte gefüllt und langsam mit 5 1 0.05 prozentiger Natriumazidlösung gespült (dieser Schritt entfällt bei sofortiger Verwendung der BioBeads).

Vor der Verwendung werden die BioBeads in einer D-2-Glasfritte nach Abtrennen der Natriumazidlösung mit dem dreifachen Volumen an Wasser und danach mit drei Volumina Puffer G gewaschen. Die so vorbereiteten BioBeads werden in leicht feuchtem Zustand zur Detergensentfernung eingesetzt.

Gebrauchte BioBeads werden zum Regenerieren mit Methanol gespült, bis das Filtrat klar ist. Sie werden in getrocknetem Zustand aufbewahrt und bei Bedarf wie frische Beads vorbereitet.

5.5 <u>Bestimmung des Proteingehalts</u>

5.5.1 Proteinbestimmung nach der Biuret-Methode

Die Durchführung erfolgt modifiziert nach Gornall (Gornall et al. 1949). 100 μ l Probe werden mit 5 ml Biuret-Reagenz versetzt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird die Probe mit H₂O auf 10 ml aufgefüllt und die Extinktion bei 546 nm gegen eine Blindprobe gemessen. Die Proben sollten 0.5 bis 4 mg Protein enthalten. Als Blindprobe dient anstelle der Proteinlösung der entsprechende Puffer.

Die Bestimmung des Proteingehaltes der Proben erfolgt mit Hilfe einer Rinderserumalbumin (BSA)-Standardeichkurve. Alternativ kann bei Verwendung von 2 cm Küvetten zur Berechnung der Proteinkonzentration folgende Formel verwendet werden, die aus mehreren Eichkurven empirisch ermittelt wurde:

Proteingehalt $[mg/ml] = E_{546} \times 17 \times Verdünnungsfaktor$

9 g K-Na-Tartrat in 400 ml NaOH gelöst
3 g CuSO ₄ x 5 H ₂ O
5 g KJ
ad 1 Liter mit 0.2 N NaOH

5.5.2 Proteinbestimmung nach Popov

Die Proteinbestimmung nach Popov (Popov *et al.* 1975) zeichnet sich durch eine hohe Empfindlichkeit bei gleichzeitig sehr geringer Beeinflussung durch Detergentien, Lipide und hohe Salzkonzentrationen aus.

Proben von 5 - 200 µl werden in 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen mit 10 µl 10% iger $C_{12}E_9$ -Lösung versetzt, gut durchmischt und 10 Minuten inkubiert. Nach Zugabe von 600 µl Färbelösung werden die Proben 20 Minuten geschüttelt. Der entstehende Protein-Farbstoff-Komplex wird durch Zentrifugation (Tischzentrifuge, 13000 rpm, 10 Minuten) sedimentiert, in 1.5 ml Waschlösung resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wird insgesamt dreimal wiederholt. Danach wird das Sediment in 1.5 ml 0.1 N NaOH aufgenommen. Nach zwanzigminütigem Schütteln wird die Extinktion bei 615 nm gegen Wasser als Blindwert gemessen. Als Proteinstandard dienen SR-Vesikel bekannter Proteinkonzentration.

Färbelösung:	541 mg Amidoschwarz 10 B
	37.5 ml Methanol
	4.91 ml Eisessig
Waschlösung:	Methanol / Eisessig (9:1)

Der Farbstoff wird vor Zugabe der Essigsäure in Methanol gelöst. Die Färbelösung wird über Nacht gerührt und vor Gebrauch filtriert. Gekühlt ist sie mehrere Wochen haltbar. Die Waschlösung wird direkt vor der Verwendung angesetzt.

5.6 Messung der ATP-Hydrolyse

Die Messung der ATP-Hydrolyseaktiviät erfolgt modifiziert nach Meissner (Meissner et al. 1973).

Für die Testansätze wird der folgende Puffer verwendet.

100 mM	TEA/HCl pH 7.4
100 mM	KCl
5 mM	MgCl ₂
0.15 mM	CaCl ₂
0.1 mM	EGTA
	100 mM 100 mM 5 mM 0.15 mM 0.1 mM

Die Proteinkonzentration im Test beträgt 0.05 mg/ml. Die Proteinzugabe erfolgt 5 Minuten vor dem Start der Messung durch Zugabe von ATP in einer Endkonzentration von 1 mM.

Nach 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5 und 4 Minuten werden 50 μ l Proben entnommen. Die Reaktion wird durch je 500 μ l 4°C kaltes 0.2% iges (w/v) SDS gestoppt, das in Eppendorf-Reaktionsgefäßen vorgelegt wurde.

Da sich bei dichten SR-Vesikeln Ca^{2+} im Inneren anreichert und dadurch die Hydrolyserate von innen hemmt, kann sie durch Zugabe des Ca^{2+} -Ionophors A23187 um den Faktor 2 gesteigert werden. A23187 wird in einer Konzentration von 10 μ M eingesetzt.

Der bei der Fällung in kaltem SDS entstehende Niederschlag wird durch eine einminütige Zentrifugation bei 13000 rpm in der Eppendorf-Zentrifuge abgetrennt.

Der Phosphatgehalt des Überstandes wird halbautomatisch im Phosphoanalyzer (s.u.) bestimmt. Als Standards dienen Lösungen von 10 μ M und 20 μ M anorganischem Phosphat in 0.2% (w/v) SDS.

5.6.1 Phosphatbestimmung im Phosphoanalyzer

Die Phosphatbestimmung erfolgt nach einer Methode von Fiske und Subbarow (Fiske & Subbarow 1925).

Sie beruht auf der Bildung eines blauen Phosphomolybdatkomplexes, dessen Konzentration durch Messung der Extinktion bei 660 nm gegen einen Standard bestimmt wird. Die Phosphatbestimmung erfolgt halbautomatisch in einem Gerät der Firma Bran+Luebbe.

Durch die Darstellung des freien Phosphatgehalts gegen die Zeit, kann die Hydrolysegeschwindigkeit von ATP pro Minute bestimmt werden

Lösungen für den Phosphoanalyzer:

Ammoniummolybdat-Lösung:	8 g Ammoniummolybdat ((NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ x 4 H ₂ O) ad 200 ml mit H ₂ O
Antimon-Kalium-Tartrat-Lösung :	2.3 g Antimon-Kalium-Tartrat (K(SbO)C_4H_4O_6 x 0.5 H_2O) ad 80 ml mit H_2O
Molybdatlösung :	50 ml Ammoniummolybdat-Lösung 155 ml 5 N Schwefelsäure 0.6 ml Antimon-Kalium-Tartrat-Lösung 2 g SDS ad 1000 ml mit H ₂ O
Reduktionslösung:	8 g Ascorbinsäure 45 ml Aceton 1 g SDS ad 1000 ml mit H ₂ O

5.7 <u>Messung der Calciumaufnahme von SR-Vesikeln und rekonstituierten</u> Vesikeln

Die Messung der Calciumaufnahme in SR- bzw. rekonstituierte Vesikel erfolgt mit einer Filterassaymethode nach Martonosi und Feretos (Martonosi & Feretos 1964).

Radioaktives ⁴⁵Calcium wird aktiv in die Vesikel eintransportiert und die Zunahme der Radioaktivität im Inneren der Vesikel mit der Zeit verfolgt.

Grundpuffer	100 mM	TEA pH 7.4	
	100 mM	KCl	
	5 mM	MgCl ₂	
	300 mM	Saccharose	
2.5 ml Testansatz	1.25 ml	Grundpuffer 2x	
	0.825 ml	H_2O	
	350 µl	CaCl ₂ -Stammlösung	⇒ 1.05 mM
	25 µl	EGTA 100 mM	$\Rightarrow 1 \text{ mM}$
	25 µl	Protein 1 mg/ml	⇒ 0.01 mg/ml
	25 µl	ATP 100 mM	⇒ 1 mM

Die Vesikel werden vor Messbeginn 5 Minuten im Testansatz inkubiert. Die Messung wird durch Zugabe von 1 mM ATP gestartet.

Zu individuellen Zeiten werden dem Ansatz 200 μ l Proben entnommen und durch Nitrocellulosefilter (Typ Millipore HA, Porengröße 0.45 μ m) gesaugt. Durch das Absaugen der Flüssigkeit wird der Transport gestoppt. Nachwaschen mit 5 ml 0°C kalter Waschlösung entfernt an den Filter adsorbiertes freies Calcium. Die Filter werden in geeigneten Kunststoffröhrchen mit 5 ml wässriger Szintillationsflüssigkeit (Rotiscint 2200) versetzt und die Radioaktivität der Proben im Szintillationszähler bestimmt.

Zur Bestimmung eines Bezugswertes werden 50 μ l Testlösung ohne Absaugen auf einen trockenen Filter gegeben und die Radioaktivität wie beschrieben gemessen. Die Radioaktivität eines Filters ohne Vesikel dient als Nullwert.

Die Menge an aufgenommenem Calcium wird nach folgender Formel berechnet:

c [mM CaCl₂] x (ml Bezugswert) x (pm Probe - cpm Nullwert) (cpm Bezugswert) x (ml Probe) x (mg/ml Protein)

Durch graphische Darstellung der pro mg Protein eintransportierten Calciummenge gegen die Zeit kann über die Steigung im linearen Anfangsbereich die Transportgeschwindigkeit bestimmt werden.

Da der Anstieg des freien Calcium im Inneren der nativen SR-Vesikel zu eine Hemmung des Eintransports führt, wird zur Präzipitation im Inneren der Vesikel Oxalat zugesetzt, das stöchiometrisch mit dem Calcium einwandert. Die Endkonzentration im Test beträgt 50 mM.

Um die Dosierung der Radioaktivität im Ansatz zu erleichtern, wird eine Calciumchloridstammlösung verwendet, die etwa 2 μ Ci ⁴⁵Ca²⁺ enthält. Durch das im Testansatz befindliche EGTA wird die freie Ca²⁺-Konzentration konstant auf einem Wert von 65 μ M gehalten. Die spezifische Aktivität der ⁴⁵CaCl₂-Lösung beträgt chargenabhängig 0.9 - 1.7 mCi/mMol.

⁴⁵ Ca-Stammlösung:	5-20 µl	⁴⁵ CaCl ₂ (ca. 10 mCi/ml)
(ca. $2 \mu Ci/ml$)	750 µl	50 mM CaCl ₂
	4.245 ml	H ₂ O
Waschlösung	100 mM	KCl
	1.05 mM	CaCl ₂
	1 mM	EGTA

5.8 [³⁵S]-Sulfat-Effluxmessungen aus präinkubierten SR Vesikeln

Die Anionentransportmessungen erfolgen nach einer modifizierten Methode von Kasai und Taguchi (Kasai & Taguchi 1981).

Die SR-Vesikel werden aufgetaut und zur Befüllung in einem Volumen bis 500 μ l direkt mit der ³⁵SO₄²⁻ Stammlösung versetzt. Die Vorinkubation dauert üblicherweise 1 - 1.5 h, die Zeit kann aber zur Untersuchung verschiedener Fragestellungen variiert werden.

Zu 38 μ l SR-Vesikelsuspension einer Konzentration von 15 mg/ml (Endkonzentration im Test: 0.1 mg/ml) werden 1.5 μ l ³⁵Sulfat-Stammlösung (3 μ Ci) zupipettiert, was bei einer spezifischen Aktivität von ~20.000 MBq/mMol einer Konzentration von 75-100 μ M im Inkubationsmedium entspricht.

Der Efflux wird durch die Verdünnung des Inkubationsmediums in ein hundertfaches Volumen des Messpuffers M gestartet

Nach 15 Sekunden Rühren wird der gesamte Ansatz in eine 5 ml fassende Multipettenspitze überführt, aus der zu den Zeiten 30 sec, 45 sec, 1 Min, 1.25 Min, 1.5, 1.75, 2, 2.5, 3, 5, 7 Minuten das Probenvolumen von 450 μ l auf einen Millipore-Nitrocellulosefilter (Typ HA, Porengröße 0.45 μ m) aufgebracht wird. Der umgebende Puffer wird sofort über eine Fritte abgesaugt. Der Nachwasch erfolgt mit 5 ml eiskaltem Puffer M.

Der Filter wird anschließend in ein geeignetes Kunststoffröhrchen überführt (Canberra Packard), mit 5 ml Szintillationsflüssigkeit (Rotiszint 2200) versetzt und dann im Szintillationszähler (Beckmann LS 6500) vermessen.

Zur Bestimmung der Gesamtradioaktivität des Testmediums wird eine unfiltrierte Probe von 50 µl vermessen.

5.8.1.1 Variation der Proteinmenge

Die Standardproteinkonzentration im Test beträgt 100 μ g/ml. Alternativ werden 16, 32, 64, 96, 128 und 160 μ g/ml eingesetzt. Inkubation und Effluxmessungen werden wie in Abschnitt 5.8 durchgeführt.

5.8.1.2 Befüllung durch Extrusion

38 μ l SR-Vesikel werden 1:10 mit Puffer M verdünnt und mit 3 μ l der ³⁵SO₄²⁻-Stammlösung versetzt. Anschließend werden sie im Extrusionsapparat Liposofast der Firma Avestin (MacDonald et al. 1991) mehrfach durch eine Polycarbonatmembran der Porenweite 200 nm gepresst und dabei mit dem Inkubationsmedium befüllt.

5.8.2 [³⁵S]-Sulfat-Fluxmessung mit proteinfreien Asolektinvesikeln

350 μ l Asolektinvesikel (100 mg/ml) aus 5.4.2 werden durch Inkubation (1.5 h mit 2 μ Ci $^{35}SO_4^{2^-}$) oder durch Extrusion befüllt, wobei der Verdünnungsschritt aus 5.8.1 entfällt. Nach der anschließenden Verdünnung in den Messpuffer (3 ml) werden zu Zeiten von 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3 und 6 Minuten Aliquots von 500 μ l entnommen und auf eine mit Puffer M äquilibrierte DEAE-Sephadex A-50 Säule (Volumen 2 ml) aufgetragen und anschließend 2 mal mit 200 μ l eiskaltem Puffer M nachgespült. Der Durchlauf wird aufgefangen, mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt und im Szintillationszähler vermessen.

5.8.3 [³⁵S]-Sulfat-Fluxmessung mit rekonstituierten Vesikeln

100 μ l rekonstituierte Vesikel (1 mg/ml) aus 5.4.3 werden durch Inkubation (1.5 h mit 2 μ Ci ³⁵SO₄²⁻) oder analog zu 5.8.1.2 mittels Extrusion befüllt und danach wie native SR-Vesikel vermessen.

5.8.4 Synthese von Pyridoxalphosphat-6-azophenyl-4'-nitro-2'-sulfonsäre (PPANS)

2.18 g 4 -Nitroanilin-2-sulfonsäure (10 mMol) werden mit 700 mg NaNO₂ in 200 ml 2 N HCl bei 0-5°C diazotiert.

Die Lösung des Diazoniumsalzes wird unter Kontrolle des pH-Wertes (9-10) langsam zu einer Lösung von 2.7 g Pyridoxalphosphat (5-10% im Überschuss) in NaOH eingetropft, wobei die Kopplung zur Diazoverbindung eintritt.

PPANS wird mit Aceton gefällt, abgesaugt und anschließend lyophilisiert.

Ausbeute: 3.35 g (60% der eingesetzten Menge).

5.8.5 Messung des [³⁵S]-Sulfat-Effluxes unter dem Einfluss diverser Hemmstoffe und Ionen

Von allen wasserlöslichen Substanzen werden Stammlösungen in Puffer M hergestellt. Der pH-Wert der Lösungen muss gegebenenfalls mit HCl oder KOH nachgestellt werden. Vor dem Start der Messung wird zum Erreichen der Testkonzentration eine entsprechende Menge der Stammlösung in den Messpuffer verdünnt.

Von den nicht-wasserlöslichen Substanzen wird die Stammlösung in einem geeigneten Lösungsmittel hergestellt, dessen Einfluss auf den Sulfatflux ebenfalls untersucht werden muss. Gegebenfalls wird der Kontrollmessung eine entsprechende Menge des Lösungsmittels beigefügt. Picrotoxin und Ryanodin und Thapsigargin werden in Ethanol gelöst, Valinomycin in Aceton.

5.9 Messung des [³⁵S]-Sulfat-Influxes in SR Vesikel

38 µl SR-Vesikelsuspension einer Konzentration von 15 mg/ml (Endkonzentration im Test: 0.1 mg/ml) werden in 5 ml des Puffers M eingebracht. Der Start der Messung erfolgt durch Zugabe von 5 - 10 µl der ³⁵Sulfat-Stammlösung, was einer Radioaktivität von 20 µCi entspricht.

Nach 15 Sekunden Rühren wir der gesamte Ansatz in eine 5 ml fassende Multipettenspitze überführt, aus der zu den Zeiten 0.5, 1, 2, 4, 6, 8 und 10 Minuten das Probenvolumen von 600 μ l auf einen Millipore-Nitrocellulosefilter (Typ HA, Porengröße 0.45 μ m) aufgebracht wird. Der umgebende Puffer wird sofort über eine Fritte abgesaugt. Der Nachwasch erfolgt mit 5 ml eiskaltem Puffer M.

Anschließend wird die Radioaktivität wie in 5.8 vermessen.

Die Zugabe von Ionen und Wirkstoffen zum Testansatz erfolgt wie in Abschnitt 5.8.5 beschrieben.

5.10 Messung des [³²P]-Nukleotideintransports in SR Vesikel

 $0.2 \ \mu l$ der [³²P]Nukleotid-Stammlösung (0.5 μ Ci) werden in 5 ml des Messpuffers M eingebracht. Bei einer spezifischen Aktivität von 15 TBq/mMol beträgt die Endkonzentration an radioaktivem Nukleotid 5 nM. Der Start der Messung erfolgt durch Zugabe von 38 μ l SR einer Konzentration von 15 mg/ml was einer Endkonzentration im Test von 0.1 mg/ml entspricht.

Nach 15 Sekunden Rühren wir der gesamte Ansatz in eine 5 ml fassende Multipettenspitze überführt, aus der zu den Zeiten 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 3, 5 und 7 Minuten das Probenvolumen von 600 μ l auf einen Millipore-Nitrocellulosefilter (Typ HA, Porengröße 0.45 μ m) aufgebracht wird. Der umgebende Puffer wird sofort über eine Fritte abgesaugt. Der Nachwasch erfolgt mit 5 ml eiskaltem Puffer M.

Anschließend wird die Radioaktivität analog 5.8 vermessen.

Die Zugabe verschiedener Ionen und Wirkstoffe zum Testansatz erfolgt wie in Abschnitt 5.8.5 beschrieben.

5.11 Messung des [³H]AMP-PNP-Eintransports in SR Vesikel

1.2 μ l der [³H]AMP-PNP-Stammlösung (3 μ Ci) werden in 5 ml des Messpuffers M eingebracht. Bei einer spezifischen Aktivität von 999 MBq/mMol beträgt die Endkonzentration an ³H-AMP-PNP 5 nM. Der Start der Messung erfolgt durch Zugabe von

 38μ l SR einer Konzentration von 15 mg/ml was einer Endkonzentration im Test von 0.1 mg/ml entspricht.

Nach 15 Sekunden Rühren wir der gesamte Ansatz in eine 5 ml fassende Multipettenspitze überführt, aus der zu den Zeiten 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 3, 5 und 7 Minuten das Probenvolumen von 600 μ l auf einen Millipore-Nitrocellulosefilter (Typ HA, Porengröße 0.45 μ m) aufgebracht wird. Der umgebende Puffer wird sofort über eine Fritte abgesaugt. Der Nachwasch erfolgt mit 5 ml eiskaltem Puffer M.

Anschließend wird die Radioaktivität analog 5.8 vermessen.

Die Zugabe verschiedener Ionen und Wirkstoffe zum Testansatz erfolgt wie in Abschnitt 5.8.5 beschrieben.

5.12 Einzelkanalmessungen mit der Planarmembran-Technik

5.12.1 Herstellung der planaren Membran

Ein Lipidgemisch aus Palmitoyl-Oleoyl-Phosphatidylethanolamin, Palmitoyl-Oleoyl-Phosphatidylethanolserin und Palmitoyl-Oleoyl-Phosphatidylcholin (Avanti Polar Lipids) im Verhältnis 5:3:2 in Hexan wird auf die 150 µm breite Bohrung einer 1 ml Delrin-Küvette aufgebracht.

Anschließend werden die Kammern mit Puffer befüllt und die Silber-Elektroden eingebracht, die zuvor auf galvanischem Wege mit einer Schicht Chloridionen überzogen wurden.

Messpuffer cis: 250 mM Cholinchlorid, 1 mM CaCl₂, 10 mM HEPES pH 7.4
Messpufer trans: 50 mM Cholinchlorid, 1 mM CaCl₂, 10 mM HEPES pH 7.4

Unter Betrachtung der mit einer Kaltlichtlampe (Schott KL 1500) beleuchteten Bohrung durch die Sichtfenster mittels eines Fernrohrs wird dann das gleiche Lipdgemisch in Decan auf die andere Seite der Bohrung appliziert.

Die spontane Bildung der Membran-Doppelschicht wird sowohl optisch (Schwärzung) als auch elektrisch über einen Spannungsgeber, einen Verstärker (Keithley 427 Current Amplifier) und ein elektronisches Speicheroszilloskop (Digital Storage Scope HM 208) verfolgt.

5.12.2 Fusion der SR-Vesikel mit der planaren Membran

Zum Start der Fusion von Vesikel und Membran werden 5 - 10 µg/ml SR-Vesikel in die cis-Lösung der Küvette einpipettiert und der Ansatz langsam gerührt.

5.12.2.1 Vorbehandlung der SR-Vesikel

Die SR-Vesikel werden durch Ultraschall (Branson Sonifier, Stufe 2, 30 Sekunden), Extrusion (Avestin-Liposfast 400 nm-Membran) oder Zentrifugation (Tischzentrifuge, 10 Minuten bei 8.000 rpm) zur Erzielung besserer Fusionsergebnisse vorbehandelt.

5.12.2.2 Harnstoffzugabe

5 Minuten nach Beginn des Fusionsvorgangs wird durch Zugabe von 200 mM Harnstoff auf der cis-Seite ein osmotischer Gradient angelegt, der die Fusionswahrscheinlichkeit erhöht. Nach erfolgter Fusion wird dieser durch Zugabe von 200 mM Harnstoff auch auf der trans-Seite aufgehoben.

5.12.3 Detektion des Signals

Nach 30 - 60 Minuten erfolgt in der Regel eine Fusion, die sich in einer erhöhten Leitfähigkeit für Chlorid äußert.

Das Signal wird bei abgeschaltetem Rührer detektiert. Mit Hilfe des Spannungsgebers kann die Spannung in Betrag und Vorzeichen variiert werden. Anhand der Leitfähigkeit wird der Kanal zunächst identifiziert und dann das Signal mit Hilfe eines Schreibers (Gould Recorder 2200 S) aufgezeichnet.

5.12.4 Vermessung der Wirkung diverser Liganden

Von den zu vermessenden Wirkstoffen und Ionen wird eine Stammlösung im cis-Puffer hergestellt. Zum Erreichen der Testkonzentration wird die entsprechende Menge der Stammlösung je nach Fragestellung auf der cis-Seite, der trans-Seite oder beiden Seiten zupipettiert. Zur Durchmischung wird kurz (5-10 Sekunden) gerührt und anschließend das Signal detektiert.

5.13 Metabolisierungsexperimente

1.5 μ l SR-Vesikelsuspension einer Konzentration von 15 mg/ml (Endkonzentration im Test: 0.1 mg/ml) werden in 250 ml des Puffers M eingebracht. Der Start des Metebolisierungsexperiments erfolgt durch Zugabe von 1 μ l der 1:100 verdünnten [³²P]Nukleotid-Stammlösung (0.025 μ Ci). Bei einer spezifischen Aktivität von 15 TBq/mMol beträgt die Endkonzentration an radioaktivem Nukleotid im Test 5 nM.

Dem kräftig geschüttelten Ansatz werden nach 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5 und 2 Minuten, bzw. 1, 2, 3, 5 und 10 Minuten je 30 µl Proben entnommen, die zum Stoppen der Reaktion sofort in 10 µl vorgelegte 20% Trichloressigsäure einpipettiert werden. Anschließend wird das gefällte SR-Protein durch Zentrifugation in der Eppendorf-Zentrifuge sedimentiert und der Überstand zur weiteren Verwendung abgenommen.

Zur Auftrennung der Produkte wird eine Dünnschichtchromatographie auf PEI-Nitrocelluloseplatten durchgeführt. Zur Auftrennung von Produkten mit niedrigen sowie hohen RF-Werten, werden alle Proben mit zwei unterschiedlichen Laufmitteln aufgetrennt.

Laufmittel A	2 M Ameisensäure, 0.25 M LiCl
Laufmittel B	2 M Ameisensäure, 1 M LiCl

Um eine Quantifizierung der Produkte zu ermöglichen, erfolgt der Probenauftrag von $0.5 \mu l$ auf die Platten mittels einer Pipette. Nach Beendigung der Chromatographie werden die Platten getrocknet und in dünne Folien eingeschweisst.

Die Verteilung der radioaktiven Produkte auf den DC-Platten wird dann mit Hilfe des Phosphoimagers (Molecular Dynamics 445) ermittelt.

Als Vergleichssubstanzen dienen verschiedene Nukleotidderivate, deren Positionen unter einer UV-Lampe bestimmt und direkt auf der PEI-Platte markiert werden.

Die Zugabe von Ionen und Wirkstoffen zum Testansatz erfolgt wie in 5.8.5 beschrieben.

5.14 Chemikalien und Geräte

Chemikalien

 α -[³²P]ATP, γ -[³²P]ATP, α -[³²P]GTP, γ -[³²P]GTP ³²P]Pyrophosphat, ¹²⁵J]KJ [³H]AMP-PNP ³⁵S]K₂SO₄, ⁴⁵CaCl₂ BioBeads SM-2, BioRad Proteintest ATP, AMP, Trypsin, Trypsininhibitor Suramin Thapsigargin Asolektin Acrylamid, N,N'-Methylenbisacrylamid Glycerin, MOPS, Tris, Saccharose Szintillationsflüssigkeit Rotiszint 2200 Amidoschwarz und APS A23187, Leupeptin, PMSF AMP-PNP, AMP-PCP, cAMP, cGMP, Ap3A, Ap4A, Ap5A Tripolyphosphat, Tetrapolyphosphat, Trimetaphosphat Atractylosid, Picrotoxin, Strychnin, DIDS, Valinomycin Cibacron Blau 3G-A, Reactive Red 120 SDS, $C_{12}E_9$ Cholinchlorid Lipide zur Herstellung der planaren Membran

Amersham Pharmacia Biotech

ICN NEN Life Science Products BioRad Roche/Boehringer Mannheim Bayer biomol Fluka Chemika-BioChemika Roth, Karlsruhe

Serva, Heidelberg Sigma Chemie GmbH

Avanti Polar Lipids

Alle anderen Chemikalien wurden von der Firma Merck in Darmstadt bezogen

Geräte

Extrusionsapparatur und Membranen Photometer Ultrazentrifuge Szintillationszähler Gelelektrophorese-Apparatur Phosphat-Autoanalyzer Ultraschall-Gerät Tischzentrifuge Nitrocellulosefilter PEI-(Polyethylenimin)-Cellulose-Platten **Optische Einheit** Flachbettschreiber Fraktionssammler Vakuum-Trockenzentrifuge pH-Meter Kühl-Zentrifuge Phosphoimager Phosphoscreens Verstärker Elektronisches Speicheroszilloskop Schreiber

Avestin Liposofast Beckman Model DU-640 Beckman Typ L5-65 Beckman Typ LS 6500 BioRad Mini Protean II Bran+Luebbe AutoAnalyzer II **Branson Sonifier B-12** Heraeus Biofuge A Millipore Typ HA-0.45 µm Merck Dramstadt Pharmacia Uvicord SII Pharmacia REC 101 Pharmacia Super Frac Savant SpeedVac Plus SC 110a Schott CG 820 Sorvall RC-2B und 5B Molecular Dynamics 445SI Kodak S230 Keithley 427 Current Amplifier Digital Storage Scope HM 208 Gould Recorder 2200 S

6 Literaturverzeichnis

Ahern, G. P., Junankar, P. R. & Dulhunty, A. F. (1994) "Single channel activity of the ryanodine receptor calcium release channel is modulated by FK-506" *FEBS Lett* **352**, 369-74

Ahern, G. P. & Laver, D. R. (1998) "ATP inhibition and rectification of a Ca2+-activated anion channel in sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle" *Biophys J* 74, 2335-51

Allard, B. & Rougier, O. (1994) "The effects of chloride ions in excitation-contraction coupling and sarcoplasmic reticulum calcium release in twitch muscle fibre" *J Muscle Res Cell Motil* 15, 563-71

Ariki, M. & Boyer, P. D. (1980) "Characterization of medium inorganic phosphate-water exchange catalyzed by sarcoplasmic reticulum vesicles" *Biochemistry* 19, 2001-4

Ashley, R. H. (1989) "Activation and conductance properties of ryanodine-sensitive calcium channels from brain microsomal membranes incorporated into planar lipid bilayers" *J Membr Biol* 111, 179-89

Bachmann, A., Russ, U. & Quast, U. (1999) "Potent inhibition of the CFTR chloride channel by suramin" *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 360, 473-6

Balog, E. M., Fruen, B. R., Kane, P. K. & Louis, C. F. (2000) "Mechanisms of P(i) regulation of the skeletal muscle SR Ca(2+) release channel [In Process Citation]" *Am J Physiol Cell Physiol* **278**, C601-11

Bathori, G., Szabo, I., Schmehl, I., Tombola, F., Messina, A., De Pinto, V., Zoratti, M. (1998) "Novel Aspects of electrophysiology of mitochondrial porin" *Biochem Biophys Res Commun* 4, 258-263

Bäumert, H. (2000) persönliche Mitteilung, Institut für Biochemie, Frankfurt am Main

Beil, F. U., von Chak, D., Hasselbach, W. & Weber, H. H. (1977) "Competition between oxalate and phosphate during active calcium accumulation by sarcoplasmic vesicles" *Z Naturforsch* [*C*] **32**, 281-7

Bennett, H. S. & Porter, K. R. (1953) "An electron microscope study of sectioned breast muscle of the domestic fowl" *Am. J. Anat.* 195, 61-73

Berchtold, M. W., Brinkmeier, H. & Muntener, M. (2000) "Calcium ion in skeletal muscle: its crucial role for muscle function, plasticity, and disease" *Physiol Rev* 80, 1215-65

Berman, M. C. (1999) "Regulation of Ca2+ transport by sarcoplasmic reticulum Ca2+-ATPase at limiting [Ca2+]" *Biochim Biophys Acta* **1418**, 48-60

Billeter, R. & Hoppeler, H. (1994) "[Basis of muscle contraction (published erratum appears in Schweiz Z Med Traumatol 1994;(3):43)]" *Schweiz Z Med Traumatol*, 6-20

Blair, H. C. & Schlesinger, P. H. (1990) "Purification of a stilbene sensitive chloride channel and reconstitution of chloride conductivity into phospholipid vesicles" *Biochem Biophys Res Commun* 171, 920-5

Blatz, A. L. & Magleby, K. L. (1983) "Single voltage-dependent chloride-selective channels of large conductance in cultured rat muscle" *Biophys J* 43, 237-41

Brojatsch, J. (1983) "Untersuchungen am Anionentransportsystem des Sarcoplasmatischen Reticulums" *Diplomarbeit*, Institut für Biochemie, Frankfurt am Main

Brojatsch, J. (1987) "Ionen- und Inhibitoreffekte auf die Anionenpermeabilität des sarcoplasmatischen Reticulums" *Dissertation*, Institut für Biochemie, Frankfurt am Main

Campbell, K. P., Franzini-Armstrong, C. & Shamoo, A. E. (1980) "Further characterization of light and heavy sarcoplasmic reticulum vesicles. Identification of the 'sarcoplasmic reticulum feet' associated with heavy sarcoplasmic reticulum vesicles" *Biochim Biophys Acta* 602, 97-116

Campbell, K. P. & MacLennan, D. H. (1980) "DIDS inhibition of sarcoplasmic reticulum anion efflux and calcium transport" *Ann N Y Acad Sci* 358, 328-31

Campbell, K. P. & MacLennan, D. H. (1981) "Purification and characterization of the 53,000-dalton glycoprotein from the sarcoplasmic reticulum" *J Biol Chem* **256**, 4626-32

Campbell, K. P. & MacLennan, D. H. (1982) "A calmodulin-dependent protein kinase system from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. Phosphorylation of a 60,000-dalton protein" *J Biol Chem* 257, 1238-46

Campbell, K. P. & MacLennan, D. H. (1983) "Labeling of high affinity ATP binding sites on the 53,000- and 160,000-dalton glycoproteins of the sarcoplasmic reticulum with the photoaffinity probe 8-N3-[alpha-32P]ATP" *J Biol Chem* **258**, 1391-4

Campbell, K. P. & Shamoo, A. E. (1980) "Chloride-induced release of actively loaded calcium from light and heavy sarcoplasmic reticulum vesicles" *J Membr Biol* 54, 73-80

Chen, S. R. & MacLennan, D. H. (1994) "Identification of calmodulin-, Ca(2+)-, and ruthenium red-binding domains in the Ca2+ release channel (ryanodine receptor) of rabbit skeletal muscle sarcoplasmic reticulum" *J Biol Chem* **269**, 22698-704

Chu, A., Bick, R. J., Tate, C. A., Van Winkle, W. B. & Entman, M. L. (1983) "Anion effects on in vitro sarcoplasmic reticulum function. Co-transport of anions with calcium" *J Biol Chem* 258, 10543-50

Chu, A., Saito, A. & Fleischer, S. (1987) "Preparation and characterization of longitudinal tubules of sarcoplasmic reticulum from fast skeletal muscle" *Arch Biochem Biophys* **258**, 13-23

Chu, A., Tate, C. A., Bick, R. J., Van Winkle, W. B. & Entman, M. L. (1983) "Anion effects on in vitro sarcoplasmic reticulum function. The relationship between anions and calcium flux" *J Biol Chem* 258, 1656-64

Chu, A., Volpe, P., Costello, B. & Fleischer, S. (1986) "Functional characterization of junctional terminal cisternae from mammalian fast skeletal muscle sarcoplasmic reticulum" *Biochemistry* 25, 8315-24

Cohen, F. S., Akabas, M. H., Zimmerberg, J. & Finkelstein, A. (1984) "Parameters affecting the fusion of unilamellar phospholipid vesicles with planar bilayer membranes" *J Cell Biol* 98, 1054-62

Coll, R. J. & Murphy, A. J. (1984) "Purification of the CaATPase of sarcoplasmic reticulum by affinity chromatography" *J Biol Chem* 259, 14249-54

Colombini, M. (1989) "Voltage gating in the mitochondrial channel, VDAC" J Membr Biol 111, 103-11

Colombini, M., Blachly-Dyson, E. & Forte, M. (1996) "VDAC, a channel in the outer mitochondrial membrane" *Ion Channels* **4**, 169-202

Connelly, T., Ahern, C., Sukhareva, M. & Coronado, R. (1994) "Removal of Mg2+ inhibition of cardiac ryanodine receptor by palmitoyl coenzyme A" *FEBS Lett* **352**, 285-90

Coonan, J. R. & Lamb, G. D. (1998) "Effect of chloride on Ca2+ release from the sarcoplasmic reticulum of mechanically skinned skeletal muscle fibres" *Pflugers Arch* **435**, 720-30

Coronado, R., Morrissette, J., Sukhareva, M. & Vaughan, D. M. (1994) "Structure and function of ryanodine receptors" *Am J Physiol* 266, C1485-504

Csernoch, L. (1999) "Regulation of the ryanodine receptor calcium release channel of the sarcoplasmic reticulum in skeletal muscle" *Acta Physiol Hung* **86**, 77-97

Dirksen, R. T. & Beam, K. G. (1999) "Role of calcium permeation in dihydropyridine receptor function. Insights into channel gating and excitation-contraction coupling" *J Gen Physiol* **114**, 393-403

Duke, A. M. & Steele, D. S. (2000) "Characteristics of phosphate-induced Ca(2+) efflux from the SR in mechanically skinned rat skeletal muscle fibers" *Am J Physiol Cell Physiol* **278**, C126-35

Dulhunty, A. F., Junankar, P. R., Eager, K. R., Ahern, G. P. & Laver, D. R. (1996) "Ion channels in the sarcoplasmic reticulum of striated muscle" *Acta Physiol Scand* 156, 375-85

Emmick, J. T., Kwon, S., Bidasee, K. R., Besch, K. T. & Besch, H. R., Jr. (1994) "Dual effect of suramin on calcium fluxes across sarcoplasmic reticulum vesicle membranes" *J Pharmacol Exp Ther* 269, 717-24

Endo, M. (1977) "Calcium release from the sarcoplasmic reticulum" Physiol Rev 57, 71-108

Eu, J. P., Sun, J., Xu, L., Stamler, J. S. & Meissner, G. (2000) "The skeletal muscle calcium release channel: coupled O2 sensor and NO signaling functions" *Cell* **102**, 499-509

Evans, E. A. & Skalak, R. (1979) "Mechanics and thermodynamics of biomembranes: part 1" *CRC Crit Rev Bioeng* 3, 181-330

Fabiato, A. (1983) "Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum" *Am J Physiol* **245**, C1-14

Fahlke, C., Durr, C. & George, A. L., Jr. (1997) "Mechanism of ion permeation in skeletal muscle chloride channels" *J Gen Physiol* 110, 551-64

Falke, J. J. & Chan, S. I. (1986) "Molecular mechanisms of band 3 inhibitors. 1. Transport site inhibitors" *Biochemistry* 25, 7888-94

Fasolato, C., Innocenti, B. & Pozzan, T. (1994) "Receptor-activated Ca2+ influx: how many mechanisms for how many channels? [see comments]" *Trends Pharmacol Sci* **15**, 77-83

Fill, M. & Coronado, R. (1988) "Ryanodine receptor channel of sarcoplasmic reticulum" *Trends Neurosci* 11, 453-7

Fink, R. H. & Veigel, C. (1996) "Calcium uptake and release modulated by counter-ion conductances in the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle" *Acta Physiol Scand* 156, 387-96

Fiore, C., Trezeguet, V., Le Saux, A., Roux, P., Schwimmer, C., Dianoux, A. C., Noel, F., Lauquin, G. J., Brandolin, G. & Vignais, P. V. (1998) "The mitochondrial ADP/ATP carrier: structural, physiological and pathological aspects" *Biochimie* 80, 137-50

Fiske, C. & SubbaRow, Y. P. (1925) J.Biol.Chem 66, 375-385

Flebbe, S. (2000) persönliche Mitteilung, Institut für Biochemie, Frankfurt am Main

Florke, H., Thinnes, F. P., Winkelbach, H., Stadtmuller, U., Paetzold, G., Morys-Wortmann, C., Hesse, D., Sternbach, H., Zimmermann, B., Kaufmann-Kolle, P. & et al. (1994) "Channel active mammalian porin, purified from crude membrane fractions of human B lymphocytes and bovine skeletal muscle, reversibly binds adenosine triphosphate (ATP)" *Biol Chem Hoppe Seyler* **375**, 513-20

Flucher, B. E., Andrews, S. B. & Daniels, M. P. (1994) "Molecular organization of transverse tubule/sarcoplasmic reticulum junctions during development of excitation-contraction coupling in skeletal muscle" *Mol Biol Cell* 5, 1105-18

Franzini-Armstrong, C. & Peachey, L. D. (1981) "Striated muscle-contractile and control mechanisms" *J Cell Biol* 91, 166s-186s

Franzini-Armstrong, C., Protasi, F. & Ramesh, V. (1998) "Comparative ultrastructure of Ca2+ release units in skeletal and cardiac muscle" *Ann N Y Acad Sci* 853, 20-30

Fruen, B. R., Kane, P. K., Mickelson, J. R. & Louis, C. F. (1996) "Chloride-dependent sarcoplasmic reticulum Ca2+ release correlates with increased Ca2+ activation of ryanodine receptors" *Biophys J* 71, 2522-30

Fruen, B. R., Mickelson, J. R., Shomer, N. H., Roghair, T. J. & Louis, C. F. (1994) "Regulation of the sarcoplasmic reticulum ryanodine receptor by inorganic phosphate" *J Biol Chem* 269, 192-8

Fruen, B. R., Mickelson, J. R., Shomer, N. H., Velez, P. & Louis, C. F. (1994) "Cyclic ADP-ribose does not affect cardiac or skeletal muscle ryanodine receptors" *FEBS Lett* 352, 123-6

Fryer, M. W., West, J. M. & Stephenson, D. G. (1997) "Phosphate transport into the sarcoplasmic reticulum of skinned fibres from rat skeletal muscle" *J Muscle Res Cell Motil* 18, 161-7

Gordon, A. M., Homsher, E. & Regnier, M. (2000) "Regulation of contraction in striated muscle" *Physiol Rev* 80, 853-924

Gornall, A. G., Bardawill, C. J. & David, M. M. (1949) J.Biol.Chem 117, 151-756

Guillan, F., Champbeil, P. & McIntosh, D. (1988). Modulation by free ATP of Sarcoplasmic reticulum ATPase Dephosphorylation. In *The Ion Pumps: Structure Function and Regulation*, pp. 183-188. Edited by W. D. Stein. New York: Alan R. Liss

Gundersen, K. (1998) "Determination of muscle contractile properties: the importance of the nerve" *Acta Physiol Scand* 162, 333-41

Hadad, N., Meyer, H. E., Varsanyi, M., Fleischer, S. & Shoshan-Barmatz, V. (1999) "Cardiac sarcalumenin: phosphorylation, comparison with the skeletal muscle sarcalumenin and modulation of ryanodine receptor" *J Membr Biol* 170, 39-49

Hain, J., Onoue, H., Mayrleitner, M., Fleischer, S. & Schindler, H. (1995) "Phosphorylation modulates the function of the calcium release channel of sarcoplasmic reticulum from cardiac muscle" *J Biol Chem* 270, 2074-81

Hals, G. D., Stein, P. G. & Palade, P. T. (1989) "Single channel characteristics of a high conductance anion channel in "sarcoballs"" *J Gen Physiol* 93, 385-410

Hartung, K., Grell, E., Hasselbach, W. & Bamberg, E. (1987) "Electrical pump currents generated by the Ca2+-ATPase of sarcoplasmic reticulum vesicles adsorbed on black lipid membranes" *Biochim Biophys Acta* 900, 209-20

Hasselbach, W. & Makinose, M. (1961) "Die Calciumpumpe der "Erschlaffungsgrana" des Muskels und ihre Abhängigkeit von der ATP-spaltung" *Biochem. Z.* 333, 518-528

Hasselbach, W. & Makinose, M. (1963) "Über den Mechanismus des Calciumtransportes durch die Membranen des Sarcoplasmatischen Reticulums" *Biochem.Z.* 339, 94

Hasselbach, W. & Migala, A. (1992) "How many ryanodine binding sites are involved in caffeine induced calcium release from sarcoplasmic reticulum terminal cysternae vesicles?" *Z Naturforsch* [*C*] 47, 136-47

Hasselbach, W. & Migala, A. (1992) "Modulation by monovalent anions of calcium and caffeine induced calcium release from heavy sarcoplasmic reticulum vesicles" *Z Naturforsch* [*C*] 47, 440-8

Hemling, U. (1994) "Affinitätschromatographische Aufreinigung und Rekonstitution der Ca²⁺-ATPase des sarcoplasmatischen Reticulums" *Dissertation*, Institut für Biochemie, Frankfurt am Main

Hille, B. (1992) Ionic Channels of Excitable Membranes, 2nd edition edn. Sunderland, MA: Sinaure Assiciates

Hille, B., Armstrong, C. M. & MacKinnon, R. (1999) "Ion channels: from idea to reality" Nat Med 5, 1105-9

Hladky, S. B. (1999) "Can we use rate constants and state models to describe ion transport through gramicidin channels?" *Novartis Found Symp* 225, 93-107; discussion 107-12

Hobai, I. A. & Levi, A. J. (1999) "Coming full circle: membrane potential, sarcolemmal calcium influx and excitation-contraction coupling in heart muscle" *Cardiovasc Res* 44, 477-87

Hochachka, P. W. (1994) "Solving the common problem: matching ATP synthesis to ATP demand during exercise" *Adv Vet Sci Comp Med* 38A, 41-56

Hoffmann, E. K. (1986) "Anion transport systems in the plasma membrane of vertebrate cells" *Biochim Biophys Acta* 864, 1-31

Holden, C. P., Padua, R. A. & Geiger, J. D. (1996) "Regulation of ryanodine receptor calcium release channels by diadenosine polyphosphates" *J Neurochem* 67, 574-80

Holloway, P. W. (1973) "A simple procedure for removal of Triton X-100 from protein samples" *Anal Biochem* 53, 304-8

Ide, T., Morita, T., Kawasaki, T., Taguchi, T. & Kasai, M. (1991) "Purification of a K(+)-channel protein of sarcoplasmic reticulum by assaying the channel activity in the planar lipid bilayer system" *Biochim Biophys Acta* 1067, 213-20

Ide, T., Sakamoto, H., Morita, T., Taguchi, T. & Kasai, M. (1991) "Purification of a Cl-(-)channel protein of sarcoplasmic reticulum by assaying the channel activity in the planar lipid bilayer system" *Biochem Biophys Res Commun* 176, 38-44

Ikemoto, N. & el-Hayek, R. (1998) "Signal transmission and transduction in excitation-contraction coupling" *Adv Exp Med Biol* **453**, 199-207

Ikemoto, N., Miyao, A. & Kurobe, Y. (1981) "Further evidence for an oligomeric calcium pump by sarcoplasmic reticulum" *J Biol Chem* **256**, 10809-14

Inui, M., Kimura, Y., Sasaki, T. & Tada, M. (1990) "Molecular mechanism of calcium uptake and release by cardiac sarcoplasmic reticulum" *Jpn Circ J* 54, 1185-91

Ishihara, H. & Welsh, M. J. (1997) "Block by MOPS reveals a conformation change in the CFTR pore produced by ATP hydrolysis" *Am J Physiol* 273, C1278-89

Jankowski, J., Schluter, H., Tepel, M., Spieker, C. & Zidek, W. (1997) "Effect of diadenosine polyphosphates on Ca2+ ATPase activity [see comments]" *J Mol Med* **75**, 674-7

Junankar, P. R., Dulhunty, A. F., Curtis, S. M., Pace, S. M. & Thinnes, F. P. (1995) "Porin-type 1 proteins in sarcoplasmic reticulum and plasmalemma of striated muscle fibres" *J Muscle Res Cell Motil* 16, 595-610

Jurgens, L., Kleineke, J., Brdiczka, D., Thinnes, F. P. & Hilschmann, N. (1995) "Localization of type-1 porin channel (VDAC) in the sarcoplasmatic reticulum" *Biol Chem Hoppe Seyler* **376**, 685-9

Kamp, F., Donoso, P. & Hidalgo, C. (1998) "Changes in luminal pH caused by calcium release in sarcoplasmic reticulum vesicles" *Biophys J* 74, 290-6

Kasai, M. & Miyamoto, H. (1976) "Depolarization-induced calcium release from sarcoplasmic reticulum fragments. I. Release of calcium taken up upon using ATP" *J Biochem (Tokyo)* 79, 1053-66

Kasai, M. & Nunogaki, K. (1988) "Permeability of sarcoplasmic reticulum" Methods Enzymol 157, 437-68

Kasai, M. & Nunogaki, K. (1993) "Channel opening process is responsible for the slow component in the flux measurement of membrane vesicles" *J Theor Biol* 161, 461-80

Kasai, M. & Taguchi, T. (1981) "Inhibition of anion permeability of sarcoplasmic reticulum vesicles by stilbene derivatives and the identification of an inhibitor-binding protein" *Biochim Biophys Acta* 643, 213-9

Kawano, S., Hirayama, Y. & Hiraoka, M. (1995) "Activation mechanism of Ca(2+)-sensitive transient outward current in rabbit ventricular myocytes" *J Physiol (Lond)* **486**, 593-604

Kawano, S., Kuruma, A., Hirayama, Y. & Hiraoka, M. (1999) "Anion permeability and conduction of adenine nucleotides through a chloride channel in cardiac sarcoplasmic reticulum" *J Biol Chem* 274, 2085-92

Kawano, S., Nakamura, F., Tanaka, T. & Hiraoka, M. (1992) "Cardiac sarcoplasmic reticulum chloride channels regulated by protein kinase A" *Circ Res* **71**, 585-9

Keppens, S. (1996) "Effects of diadenosine triphosphate and diadenosine tetraphosphate on rat liver cells. Differences and similarities with ADP and ATP" *Biochem Pharmacol* **52**, 441-5

Kijima, Y., Ogunbunmi, E. & Fleischer, S. (1991) "Drug action of thapsigargin on the Ca2+ pump protein of sarcoplasmic reticulum" *J Biol Chem* 266, 22912-8

Kisselev, L. L., Justesen, J., Wolfson, A. D. & Frolova, L. Y. (1998) "Diadenosine oligophosphates (Ap(n)A), a novel class of signalling molecules?" *FEBS Lett* **427**, 157-63

Kleinig, H. & Sitte, P. (1992) Zellbiologie, 3 edn. Stuttgart: G. Fischer Verlag

Klingenberg, M. (1989) "Molecular aspects of the adenine nucleotide carrier from mitochondria" *Arch Biochem Biophys* 270, 1-14

Klingenberg, M. (1993) "Dialectics in carrier research: the ADP/ATP carrier and the uncoupling protein" *J Bioenerg Biomembr* 25, 447-57

Klinger, M., Freissmuth, M., Nickel, P., Stabler-Schwarzbart, M., Kassack, M., Suko, J. & Hohenegger, M. (1999) "Suramin and suramin analogs activate skeletal muscle ryanodine receptor via a calmodulin binding site" *Mol Pharmacol* 55, 462-72

Kometani, T. & Kasai, M. (1978) "Ionic permeability of sarcoplasmic reticulum vesicles measured by light scattering method" *J Membr Biol* 41, 295-308

Kometani, T. & Kasai, M. (1980) "Ion movement accompanied by calcium uptake of sarcoplasmic reticulum vesicles studied through the osmotic volume change by the light scattering method" *J Membr Biol* 56, 159-68

Korge, P. (1995) "Factors limiting adenosine triphosphatase function during high intensity exercise. Thermodynamic and regulatory considerations" *Sports Med* 20, 215-25

Korge, P., Byrd, S. K. & Campbell, K. B. (1993) "Functional coupling between sarcoplasmic-reticulum-bound creatine kinase and Ca(2+)-ATPase" *Eur J Biochem* 213, 973-80

Kourie, J. I. (1997a) "Chloride channels in the sarcoplasmic reticulum of muscle" *Prog Biophys Mol Biol* 68, 263-300

Kourie, J. I. (1997b) "ATP-sensitive voltage- and calcium-dependent chloride channels in sarcoplasmic reticulum vesicles from rabbit skeletal muscle" *J Membr Biol* 157, 39-51

Kourie, J. I. (1998) "Effects of ATP-sensitive potassium channel regulators on chloride channels in the sarcoplasmic reticulum vesicles from rabbit skeletal muscle" *J Membr Biol* 164, 47-58

Kourie, J. I. (1999) "pH-modulation of chloride channels from the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle" *J Membr Biol* 167, 73-83

Kourie, J. I., Foster, P. S. & Dulhunty, A. F. (1997) "Inositol polyphosphates modify the kinetics of a small chloride channel in skeletal muscle sarcoplasmic reticulum" *J Membr Biol* 157, 147-58

Kourie, J. I., Laver, D. R., Ahern, G. P. & Dulhunty, A. F. (1996a) "A calcium-activated chloride channel in sarcoplasmic reticulum vesicles from rabbit skeletal muscle" *Am J Physiol* 270, C1675-86

Kourie, J. I., Laver, D. R., Junankar, P. R., Gage, P. W. & Dulhunty, A. F. (1996b) "Characteristics of two types of chloride channel in sarcoplasmic reticulum vesicles from rabbit skeletal muscle" *Biophys J* 70, 202-21

Kozarich, J. W., Chinault, A. C. & Hecht, S. M. (1973) "Ribonucleoside phosphates via phosphorimidazolidate intermediates. Synthesis of pseudoadenosine 5'-triphosphate" *Biochemistry* **12**, 4458-63

Lamb, G. D. (2000) "Excitation-contraction coupling in skeletal muscle: comparisons with cardiac muscle" *Clin Exp Pharmacol Physiol* 27, 216-24

Laver, D. R., Roden, L. D., Ahern, G. P., Eager, K. R., Junankar, P. R. & Dulhunty, A. F. (1995) "Cytoplasmic Ca2+ inhibits the ryanodine receptor from cardiac muscle" *J Membr Biol* 147, 7-22

Layton, D. & Azzi, A. (1974) "Suramin: a potent inhibitor of the calcium transport in sarcoplasmic reticulum" *Biochem Biophys Res Commun* 59, 322-5

Leberer, E., Timms, B. G., Campbell, K. P. & MacLennan, D. H. (1990) "Purification, calcium binding properties, and ultrastructural localization of the 53,000- and 160,000 (sarcalumenin)-dalton glycoproteins of the sarcoplasmic reticulum" *J Biol Chem* 265, 10118-24

Leddy, J. J., Murphy, B. J., Qu, Y., Doucet, J. P., Pratt, C. & Tuana, B. S. (1993) "A 60 kDa polypeptide of skeletal-muscle sarcoplasmic reticulum is a calmodulin-dependent protein kinase that associates with and phosphorylates several membrane proteins" *Biochem J* 295, 849-56

Lester, H. A. & Dougherty, D. A. (1998) "New views of multi-ion channels" J Gen Physiol 111, 181-3

Levitan, I. B. (1994) "Modulation of ion channels by protein phosphorylation and dephosphorylation" *Annu Rev Physiol* 56, 193-212

Levy, D., Seigneuret, M., Bluzat, A. & Rigaud, J. L. (1990) "Evidence for proton countertransport by the sarcoplasmic reticulum Ca2(+)-ATPase during calcium transport in reconstituted proteoliposomes with low ionic permeability" *J Biol Chem* 265, 19524-34

Lewis, T. M., Roberts, M. L. & Bretag, A. H. (1994) "Immunolabelling for VDAC, the mitochondrial voltagedependent anion channel, on sarcoplasmic reticulum from amphibian skeletal muscle" *Neurosci Lett* 181, 83-6

Lienhard, G. E. & Secemski, II (1973) "P 1 ,P 5 -Di(adenosine-5')pentaphosphate, a potent multisubstrate inhibitor of adenylate kinase" *J Biol Chem* 248, 1121-3

Lokuta, A. J., Rogers, T. B., Lederer, W. J. & Valdivia, H. H. (1995) "Modulation of cardiac ryanodine receptors of swine and rabbit by a phosphorylation-dephosphorylation mechanism" *J Physiol (Lond)* 487, 609-22

Louis, C. F., Nash-Adler, P. A., Fudyma, G., Shigekawa, M., Akowitz, A. & Katz, A. M. (1980) "A comparison of vesicles derived from terminal cisternae and longitudinal tubules of sarcoplasmic reticulum isolated from rabbit skeletal muscle" *Eur J Biochem* **111**, 1-9

Luo, J., Jankowski, J., Knobloch, M., Van der Giet, M., Gardanis, K., Russ, T., Vahlensieck, U., Neumann, J., Schmitz, W., Tepel, M., Deng, M. C., Zidek, W. & Schluter, H. (1999) "Identification and characterization of diadenosine 5',5"'-P1,P2 -diphosphate and diadenosine 5',5"'-P1,P3-triphosphate in human myocardial tissue" *Faseb J* 13, 695-705

Luthje, J. & Ogilvie, A. (1988) "Catabolism of Ap4A and Ap3A in whole blood. The dinucleotides are longlived signal molecules in the blood ending up as intracellular ATP in the erythrocytes" *Eur J Biochem* **173**, 241-5

MacDonald, R. C., MacDonald, R. I., Menco, B. P., Takeshita, K., Subbarao, N. K. & Hu, L. R. (1991) "Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles" *Biochim Biophys Acta* 1061, 297-303

MacLennan, D. H., Reithmeier, R. A., Shoshan, V., Campbell, K. P., LeBel, D., Herrmann, T. R. & Shamoo, A. E. (1980) "Ion pathways in proteins of the sarcoplasmic reticulum" *Ann N Y Acad Sci* 358, 138-48

Martin, F., Pintor, J., Rovira, J. M., Ripoll, C., Miras-Portugal, M. T. & Soria, B. (1998) "Intracellular diadenosine polyphosphates: a novel second messenger in stimulus-secretion coupling" *Faseb J* 12, 1499-506

Martonosi, A. & Feretos, R. (1964) J. Biol. Chem. 239, 648-658

Martonosi, A., Roufa, D., Ha, D. B. & Boland, R. (1980) "The biosynthesis of sarcoplasmic reticulum" *Fed Proc* 39, 2415-21

Martonosi, A. N. (1984) "Mechanisms of Ca2+ release from sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle" *Physiol Rev* 64, 1240-320

McKee, E. E., Bentley, A. T., Smith, R. M., Jr., Kraas, J. R. & Ciaccio, C. E. (2000) "Guanine nucleotide transport by atractyloside-sensitive and -insensitive carriers in isolated heart mitochondria [In Process Citation]" *Am J Physiol Cell Physiol* 279, C1870-9

Meis de, L. & Hasselbach, W. (1971) J.Biol.Chem 246, 4759-4763

Meissner, G. (1975) "Isolation and characterization of two types of sarcoplasmic reticulum vesicles" *Biochim Biophys Acta* 389, 51-68

Meissner, G., Conner, G. E. & Fleischer, S. (1973) "Isolation of sarcoplasmic reticulum by zonal centrifugation and purification of Ca 2+ -pump and Ca 2+ -binding proteins" *Biochim Biophys Acta* 298, 246-69

Meissner, G. & Fleischer, S. (1971) "Characterization of sarcoplasmic reticulum from skeletal muscle" *Biochim Biophys Acta* 241, 356-78

Meissner, G. & McKinley, D. (1976) "Permeability of sarcoplasmic reticulum membrane. The effect of changed ionic environments on Ca2+ release" *J Membr Biol* **30**, 79-98

Meissner, G., Rios, E., Tripathy, A. & Pasek, D. A. (1997) "Regulation of skeletal muscle Ca2+ release channel (ryanodine receptor) by Ca2+ and monovalent cations and anions" *J Biol Chem* 272, 1628-38

Meissner, G., Rousseau, E., Lai, F. A., Liu, Q. Y. & Anderson, K. A. (1988) "Biochemical characterization of the Ca2+ release channel of skeletal and cardiac sarcoplasmic reticulum" *Mol Cell Biochem* 82, 59-65

Meissner, G. & Young, R. C. (1980) "Proton permeability of sarcoplasmic reticulum vesicles" *J Biol Chem* 255, 6814-9

Meneton, P., Lesage, F. & Barhanin, J. (1999) "Potassium ATPases, channels, and transporters: an overview" *Semin Nephrol* 19, 438-57

Meszaros, L. G., Bak, J. & Chu, A. (1993) "Cyclic ADP-ribose as an endogenous regulator of the non-skeletal type ryanodine receptor Ca2+ channel" *Nature* 364, 76-9

Meszaros, L. G., Wrenn, R. W. & Varadi, G. (1997) "Sarcoplasmic reticulum-associated and protein kinase C-regulated ADP-ribosyl cyclase in cardiac muscle" *Biochem Biophys Res Commun* 234, 252-6

Michalak, M., Campbell, K. P. & MacLennan, D. H. (1980) "Localization of the high affinity calcium binding protein and an intrinsic glycoprotein in sarcoplasmic reticulum membranes" *J Biol Chem* 255, 1317-26

Miller, C. (1986) Ion Channel Reconstitution. New York: Plenum Press

Miller, C., Arvan, P., Telford, J. N. & Racker, E. (1976) "Ca++-induced fusion of proteoliposomes: dependence on transmembrane osmotic gradient" *J Membr Biol* **30**, 271-82

Miller, C. & Racker, E. (1976) "Ca++-induced fusion of fragmented sarcoplasmic reticulum with artificial planar bilayers" *J Membr Biol* 30, 283-300

Mirzabekov, T., Ballarin, C., Nicolini, M., Zatta, P. & Sorgato, M. C. (1993) "Reconstitution of the native mitochondrial outer membrane in planar bilayers. Comparison with the outer membrane in a patch pipette and effect of aluminum compounds" *J Membr Biol* 133, 129-43

Mitchell, R. D., Volpe, P., Palade, P. & Fleischer, S. (1983) "Biochemical characterization, integrity, and sidedness of purified skeletal muscle triads" *J Biol Chem* 258, 9867-77

Morii, H. & Makinose, M. (1992) "Adenosine(5')hexaphospho(5')adenosine stimulation of a Ca(2+)-induced Ca(2+)-release channel from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum" *Eur J Biochem* **205**, 979-84

Morimoto, T. & Kasai, M. (1986) "Reconstitution of sarcoplasmic reticulum Ca2+-ATPase vesicles lacking ion channels and demonstration of electrogenicity of Ca2+-pump" *J Biochem (Tokyo)* 99, 1071-80

Moritani, T. (1990) "Neuromuscular regulation and metabolism during exercise" *Ann Physiol Anthropol* **9**, 225-33

Moutin, M. J. & Dupont, Y. (1988) "Rapid filtration studies of Ca2+-induced Ca2+ release from skeletal sarcoplasmic reticulum. Role of monovalent ions" *J Biol Chem* 263, 4228-35

Nern, A. (1995) "Vergleichende Inhibitionsstudien nativer und rekonstituierter Ca2+-ATPase aus dem sarcoplasmatischen Reticulum" *Diplomarbeit*, Institut für Biochemie, Frankfurt am Main

Niggli, E. (1999) "Localized intracellular calcium signaling in muscle: calcium sparks and calcium quarks" *Annu Rev Physiol* 61, 311-35

Niles, W. D., Silvius, J. R. & Cohen, F. S. (1996) "Resonance energy transfer imaging of phospholipid vesicle interaction with a planar phospholipid membrane: undulations and attachment sites in the region of calcium-mediated membrane-membrane adhesion" *J Gen Physiol* 107, 329-51

Nunogaki, K. & Kasai, M. (1986) "Determination of the rate of rapid pH equilibration across isolated sarcoplasmic reticulum membranes" *Biochem Biophys Res Commun* 140, 934-40

Oba, T., Koshita, M. & Van Helden, D. F. (1996) "Modulation of frog skeletal muscle Ca2+ release channel gating by anion channel blockers" *Am J Physiol* **271**, C819-24

Obatomi, D. K. & Bach, P. H. (1996) "Inhibition of mitochondrial respiration and oxygen uptake in isolated rat renal tubular fragments by atractyloside" *Toxicol Lett* **89**, 155-61

Ogilvie, A., Blasius, R., Schulze-Lohoff, E. & Sterzel, R. B. (1996) "Adenine dinucleotides: a novel class of signalling molecules" *J Auton Pharmacol* 16, 325-8

Okada, Y. (1997) "Volume expansion-sensing outward-rectifier Cl- channel: fresh start to the molecular identity and volume sensor" Am J Physiol 273, C755-89

Palade, P. (1987) "Drug-induced Ca2+ release from isolated sarcoplasmic reticulum. I. Use of pyrophosphate to study caffeine-induced Ca2+ release" *J Biol Chem* **262**, 6135-41

Patel, J. R., Sukhareva, M., Coronado, R. & Moss, R. (1996) "Chloride-induced Ca2+ release from the sarcoplasmic reticulum of chemically skinned rabbit psoas fibers and isolated vesicles of terminal cisternae" *J Membr Biol* **154**, 81-9

Payne, M. R. & Rudnick, S. E. (1989) "Regulation of vertebrate striated muscle contraction [see comments]" *Trends Biochem Sci* 14, 357-60

Picciotto, M. R., Cohn, J. A., Bertuzzi, G., Greengard, P. & Nairn, A. C. (1992) "Phosphorylation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator" *J Biol Chem* 267, 12742-52

Popov, N., Schmitt, M., Schulzeck, S. & Matthies, H. (1975) "Reliable micromethod for determination of the protein content in tissue homogenates" *Acta Biol Med Ger* 34, 1441-6

Puchelle, E., Jacquot, J., Fuchey, C., Burlet, H., Klossek, J. M., Gilain, L., Triglia, J. M., Thinnes, F. P. & Hilschmann, N. (1993) "Studies on human porin. IX. Immunolocalization of porin and CFTR channels in human surface respiratory epithelium" *Biol Chem Hoppe Seyler* **374**, 297-304

Reisin, I. L., Prat, A. G., Abraham, E. H., Amara, J. F., Gregory, R. J., Ausiello, D. A. & Cantiello, H. F. (1994) "The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is a dual ATP and chloride channel" *J Biol Chem* 269, 20584-91

Reymann, S., Haase, W., Krick, W., Burckhardt, G. & Thinnes, F. P. (1998) "Endosomes: another extramitochondrial location of type-1 porin/voltage-dependent anion-selective channels" *Pflugers Arch* **436**, 478-80

Rössler, C. (1998) "Charakterisierung der Nukleotidbindungsstellen der Ca2+-ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums - Modell der funktionellen Einheit" *Dissertation*, Institut für Biochemie, Frankfurt am Main

Rostovtseva, T. K. & Bezrukov, S. M. (1998) "ATP transport through a single mitochondrial channel, VDAC, studied by current fluctuation analysis" *Biophys J* 74, 2365-73

Rotllan, P., Rodriguez-Ferrer, C. R., Asensio, A. C. & Oaknin, S. (1998) "Potent inhibition of specific diadenosine polyphosphate hydrolases by suramin" *FEBS Lett* **429**, 143-6

Rousseau, E. (1989) "Single chloride-selective channel from cardiac sarcoplasmic reticulum studied in planar lipid bilayers" *J Membr Biol* 110, 39-47

Rousseau, E., Roberson, M. & Meissner, G. (1988) "Properties of single chloride selective channel from sarcoplasmic reticulum" *Eur Biophys J* 16, 143-51

Sagara, Y. & Inesi, G. (1991) "Inhibition of the sarcoplasmic reticulum Ca2+ transport ATPase by thapsigargin at subnanomolar concentrations" *J Biol Chem* 266, 13503-6

Saito, A., Inui, M., Radermacher, M., Frank, J. & Fleischer, S. (1988) "Ultrastructure of the calcium release channel of sarcoplasmic reticulum" *J Cell Biol* 107, 211-9

Saito, A., Seiler, S., Chu, A. & Fleischer, S. (1984) "Preparation and morphology of sarcoplasmic reticulum terminal cisternae from rabbit skeletal muscle" *J Cell Biol* 99, 875-85

Salama, G. & Scarpa, A. (1985) "Magnesium permeability of sarcoplasmic reticulum. Mg2+ is not countertransported during ATP-dependent Ca2+ uptake by sarcoplasmic reticulum" *J Biol Chem* 260, 11697-705

Salvatori, S., Furlan, S., Millikin, B., Sabbadini, R., Betto, R., Margreth, A. & Salviati, G. (1993) "Localization of protein kinase C in skeletal muscle T-tubule membranes" *Biochem Biophys Res Commun* 196, 1073-80

Schein, S. J., Colombini, M. & Finkelstein, A. (1976) "Reconstitution in planar lipid bilayers of a voltagedependent anion-selective channel obtained from paramecium mitochondria" *J Membr Biol* 30, 99-120

Schneider, A. S., Cline, H. T., Rosenheck, K. & Sonenberg, M. (1981) "Stimulus-secretion coupling in isolated adrenal chromaffin cells: calcium channel activation and possible role of cytoskeletal elements" *J Neurochem* 37, 567-75

Schuster, A. (1995) "Rekonstitution aufgereinigter Ca²⁺-ATPase in künstliche Asolektinvesikel" *Diplomarbeit*, Institut für Biochemie, Frankfurt am Main

Shafir, I., Feng, W. & Shoshan-Barmatz, V. (1998) "Dicyclohexylcarbodiimide interaction with the voltagedependent anion channel from sarcoplasmic reticulum" *Eur J Biochem* 253, 627-36

Sham, J. S., Cleemann, L. & Morad, M. (1995) "Functional coupling of Ca2+ channels and ryanodine receptors in cardiac myocytes" *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 121-5

Shoshan, V., MacLennan, D. H. & Wood, D. S. (1981) "A proton gradient controls a calcium-release channel in sarcoplasmic reticulum" *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 4828-32

Shoshan-Barmatz, V. (1987) "Stimulation of Ca2+ efflux from sarcoplasmic reticulum by preincubation with ATP and inorganic phosphate" *Biochem J* 247, 497-504

Shoshan-Barmatz, V. & Ashley, R. H. (1998) "The structure, function, and cellular regulation of ryanodinesensitive Ca2+ release channels" *Int Rev Cytol* 183, 185-270

Shoshan-Barmatz, V., Hadad, N., Feng, W., Shafir, I., Orr, I., Varsanyi, M. & Heilmeyer, L. M. (1996) "VDAC/porin is present in sarcoplasmic reticulum from skeletal muscle" *FEBS Lett* **386**, 205-10

Shoshan-Barmatz, V., Orr, I., Weil, S., Meyer, H., Varsanyi, M. & Heilmeyer, L. M. (1996) "The identification of the phosphorylated 150/160-kDa proteins of sarcoplasmic reticulum, their kinase and their association with the ryanodine receptor" *Biochim Biophys Acta* **1283**, 89-100

Sitsapesan, R. (1999) "Similarities in the effects of DIDS, DBDS and suramin on cardiac ryanodine receptor function" *J Membr Biol* 168, 159-68

Smith, J. S., Coronado, R. & Meissner, G. (1986) "Single-channel calcium and barium currents of large and small conductance from sarcoplasmic reticulum" *Biophys J* 50, 921-8

Soler, F., Sanchez-Migallon, P., Gomez-Fernandez, J. C. & Fernandez-Belda, F. (1994) "Interdependence of H+ and K+ fluxes during the Ca(2+)-pumping activity of sarcoplasmic reticulum vesicles" *J Bioenerg Biomembr* **26**, 127-36

Steinacker, P., Awni, L. A., Becker, S., Cole, T., Reymann, S., Hesse, D., Kratzin, H. D., Morris-Wortmann, C., Schwarzer, C., Thinnes, F. P. & Hilschmann, N. (2000) "The plasma membrane of Xenopus laevis oocytes contains voltage-dependent anion-selective porin channels [In Process Citation]" *Int J Biochem Cell Biol* 32, 225-34

Stephan, S., Migala, A. & Hasselbach, W. (1990) "Blockage of a pump-related calcium-efflux pathway in light sarcoplasmic reticulum vesicles by Mops" *Eur J Biochem* 193, 535-9

Stienen, G. J. (2000) "Chronicle of skinned muscle fibres" J Physiol 527, 1

Sukhareva, M., Morrissette, J. & Coronado, R. (1994) "Mechanism of chloride-dependent release of Ca2+ in the sarcoplasmic reticulum of rabbit skeletal muscle" *Biophys J* 67, 751-65

Szewczyk, A. (1998) "The intracellular potassium and chloride channels: properties, pharmacology and function (review)" *Mol Membr Biol* 15, 49-58

Tanifuji, M., Sokabe, M. & Kasai, M. (1987) "An anion channel of sarcoplasmic reticulum incorporated into planar lipid bilayers: single-channel behavior and conductance properties" *J Membr Biol* 99, 103-11

Tarnopolsky, M. A. (1994) "Caffeine and endurance performance" Sports Med 18, 109-25

Thinnes, F. P. (1992) "Evidence for extra-mitochondrial localization of the VDAC/porin channel in eucaryotic cells" *J Bioenerg Biomembr* 24, 71-5

Thinnes, F. P. & Reymann, S. (1997) "New findings concerning vertebrate porin" *Naturwissenschaften* 84, 480-98

Thomine, S., Guern, J. & Barbier-Brygoo, H. (1997) "Voltage-dependent anion channel of Arabidopsis hypocotyls: nucleotide regulation and pharmacological properties" *J Membr Biol* 159, 71-82

Townsend, C. & Rosenberg, R. L. (1995) "Characterization of a chloride channel reconstituted from cardiac sarcoplasmic reticulum" *J Membr Biol* 147, 121-36

Tuana, B. S. & MacLennan, D. H. (1988) "Isolation of the calmodulin-dependent protein kinase system from rabbit skeletal muscle sarcoplasmic reticulum" *FEBS Lett* 235, 219-23

Valdivia, H. H. & Coronado, R. (1989) "Inhibition of dihydropyridine-sensitive calcium channels by the plant alkaloid ryanodine" *FEBS Lett* 244, 333-7

Vignais, P. V. (1976a) "Molecular and physiological aspects of adenine nucleotide transport in mitochondria" *Biochim Biophys Acta* 456, 1-38

Vignais, P. V., Douce, R., Lauquin, G. J. & Vignais, P. M. (1976b) "Binding of radioactively labeled carboxyatractyloside, atractyloside and bongkrekic acid to the ADP translocator of potato mitochondria" *Biochim Biophys Acta* 440, 688-96

Voet, D. & Voet, J. (1992) Biochemie. Weinheim: VCH

Volz, C. (1987) "Inhibitionsstudien am Anionentransport des sarcoplasmatischen Reticulums" *Diplomarbeit*, Institut für Biochemie, Frankfurt am Main

Voogd, T. E., Vansterkenburg, E. L., Wilting, J. & Janssen, L. H. (1993) "Recent research on the biological activity of suramin" *Pharmacol Rev* 45, 177-203

Wallace, B. A. (2000) "Common structural features in gramicidin and other ion channels" Bioessays 22, 227-34

Wei, L., Vankeerberghen, A., Cuppens, H., Eggermont, J., Cassiman, J. J., Droogmans, G. & Nilius, B. (1999) "Interaction between calcium-activated chloride channels and the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator" *Pflugers Arch* **438**, 635-41

Winkler, H. H. & Neuhaus, H. E. (1999) "Non-mitochondrial ATP transport" Trends Biochem Sci 24, 64-8

Woll, K. H., Leibowitz, M. D., Neumcke, B. & Hille, B. (1987) "A high-conductance anion channel in adult amphibian skeletal muscle" *Pflugers Arch* **410**, 632-40

Woll, K. H. & Neumcke, B. (1987) "Conductance properties and voltage dependence of an anion channel in amphibian skeletal muscle" *Pflugers Arch* 410, 641-7

Woodbury, D. J. & Miller, C. (1990) "Nystatin-induced liposome fusion. A versatile approach to ion channel reconstitution into planar bilayers" *Biophys J* 58, 833-9

Wyskovsky, W. (1994) "Caffeine-induced calcium oscillations in heavy-sarcoplasmic-reticulum vesicles from rabbit skeletal muscle" *Eur J Biochem* **221**, 317-25

Wyskovsky, W., Hohenegger, M., Plank, B., Hellmann, G., Klein, S. & Suko, J. (1990) "Activation and inhibition of the calcium-release channel of isolated skeletal muscle heavy sarcoplasmic reticulum. Models of the calcium-release channel" *Eur J Biochem* **194**, 549-59

Xu, A., Hawkins, C. & Narayanan, N. (1997) "Ontogeny of sarcoplasmic reticulum protein phosphorylation by Ca2+--calmodulin-dependent protein kinase" *J Mol Cell Cardiol* 29, 405-18

Xu, L., Tripathy, A., Pasek, D. A. & Meissner, G. (1999) "Ruthenium red modifies the cardiac and skeletal muscle Ca(2+) release channels (ryanodine receptors) by multiple mechanisms" *J Biol Chem* 274, 32680-91

Yamaguchi, N., Kagari, T. & Kasai, M. (1999) "Inhibition of the ryanodine receptor calcium channel in the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle by an ADP/ATP translocase inhibitor, atractyloside" *Biochem Biophys Res Commun* 258, 247-51

Young, R. C., Allen, R. & Meissner, G. (1981) "Permeability of reconstituted sarcoplasmic reticulum vesicles. Reconstitution of the K+, Na+ channel" *Biochim Biophys Acta* 640, 409-18

Yu, W. H. & Forte, M. (1996) "Is there VDAC in cell compartments other than the mitochondria?" *J Bioenerg Biomembr* 28, 93-100

Yu, X., Carroll, S., Rigaud, J. L. & Inesi, G. (1993) "H+ countertransport and electrogenicity of the sarcoplasmic reticulum Ca2+ pump in reconstituted proteoliposomes" *Biophys J* 64, 1232-42

Zahradnikova, A. & Zahradnik, I. (1993) "Modification of cardiac Ca2+ release channel gating by DIDS" *Pflugers Arch* 425, 555-7

Zhou, Z. & Bers, D. M. (2000) "Ca2+ influx via the L-type Ca2+ channel during tail current and above current reversal potential in ferret ventricular myocytes" *J Physiol (Lond)* **523**, 57-66

Zimniak, P. & Racker, E. (1978) "Electrogenicity of Ca2+ transport catalyzed by the Ca2+-ATPase from sarcoplasmic reticulum" *J Biol Chem* 253, 4631-7

7 Danksagung

Herzlichen Dank allen Kollegen und Freunden, die mich in den vergangenen Jahren begleitet, ermutigt und unterstützt haben und die dazu beitrugen, dass ich während dieser schönen Zeit sehr viel mehr als "nur" naturwissenschaftliches Arbeiten gelernt habe.

Herrn Professor Dr. Dr. H. Fasold danke ich für die Stellung des Themas und die sicherlich nicht selbstverständliche Förderung meiner Arbeit auch unter den teilweise schwierigen äußeren Bedingungen.

Herrn Dr. H. G. Bäumert gilt mein besonderer Dank für seine wertvollen Anregungen sowie seine inzwischen sprichwörtliche Diskussionsbereitschaft, von der ich mich in vielen Stunden überzeugen konnte.

Herrn Professor Dr. E. Bamberg vom MPI für Biophysik in Frankfurt am Main danke ich für die Ermöglichung der Planarmembranmessungen an seinem Institut, die ich unter der freundlichen und äußerst kompetenten Anleitung von Herrn Dr. K. Hartung und seinen Mitarbeitern durchführen konnte.

Gudrun Illig und Gerhard Spatz-Kümbel danke ich für ihre Hilfestellung bei technischen Problemen sowie der chemischen Synthese bei stets angenehmem Arbeitsklima.

Auch meinen Weggefährten im Wettstreit um Gelapparturen und akademische Weihen am Institut für Biochemie sei gedankt: Annette, Conny, Christa, Eva, Frank, Harald, Heidi, Iris, Jan, Jörg, Joschi, Markus, Marlies, Michael, Petra, Roger, Sabine, Sigrun, Silke, Susann, Sven, Thomas, Thorsten und Uwe.

Frau Dr. Cornelia Rössler, Frau Silke Flebbe (bald Dr.) und Frau Dr. Monika Schlapp danke ich herzlich für die Durchsicht des Manuskripts.

Schließlich möchte ich mich bei meinen Eltern für ihre moralische und finanzielle Unterstützung während meines Studiums und der Promotion bedanken.

8 <u>Lebenslauf</u>

Angaben zur Person

Name	Achim Schuster
Geburtstag	27.04.1971
Geburtsort	Mönchengladbach
Familienstand	ledig

Schulbildung

1977-1981	Philipp-Keim-Schule in Hofheim-Diedenbergen
1981-1987	Elisabethenschule in Hofheim/Ts. (Realschulabschluss)
1987-1990	Gymnasiale Oberstufe in den Brühlwiesen in Hofheim/Ts.
	(Abitur)

<u>Universität</u>

10/90	Beginn des Studiums der Biologie an der Johann Wolfgang Goethe Universität in Frankfurt am Main
03/92	Immatrikulation zum Zweitstudium Philosophie
10/92	Diplomvorprüfung der Biologie in den Fächern Botanik, Zoologie, Chemie und Physik
11/92	Zwischenprüfung in den Fächern Biochemie und biophysikalische Chemie
12/94	Antrag auf Zulassung zur Abschlussprüfung Biochemie in den Fächern Biochemie (Prof. Dr. Dr. H. Fasold), Biophysikalische Chemie (Prof. Dr. H. Rüterjans) und Pharmakologie (Prof. Dr. G. Lambrecht)
02/95	Diplomprüfungen
03/95	Beginn der Diplomarbeit im Institut für Biochemie unter dem Titel: "Rekonstitution aufgereinigter Ca ²⁺ -ATPase in künstliche Asolektinvesikel"
10/95	Abschluss des Studiums der Biochemie mit Erlangung des Akademischen Grades ,Diplom-Biochemiker'
02/96	Aufnahme der Promotion unter dem Arbeitstitel: "Regulation von Anionentransportsystemen im Sarcoplasmatischen Reticulum"