

**I. Medizinische Klinik und Poliklinik
der Technischen Universität München
Deutsches Herzzentrum München
des Freistaates Bayern
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. A. Schömig)**

**Biophysikalische Merkmale des murinen Ryanodinrezeptor-
Calciumkanals**

Danielle Sabina Wendling

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier
Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. E. Alt
2. Univ.-Prof. Dr. A. R. Ludwig
3. Univ.-Prof. Dr. A. Konnerth

**Die Dissertation wurde am 16.07.2004 bei der Technischen
Universität München eingereicht und durch die Fakultät für
Medizin am 14.09.2005 angenommen.**

Widmung

*Diese Doktorarbeit ist meiner Mama gewidmet,
die mich immer motiviert, aufmuntert und unterstützt.*

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	S. 1
1.1.	Das intrazelluläre Calcium	S. 2
1.2.	Die Calciumkanäle in der Membran des ER/SR	S. 2
1.3.	Die Merkmale des RyR	S. 4
1.3.1.	Die biophysikalischen Merkmale des RyR	S. 5
1.3.2.	Die Isoformen des Ryanodinrezeptor-Calciumkanals	S. 5
1.3.3.	Die Struktur des RyR und seine Anordnung im Muskel	S. 6
1.3.4.	Die Funktion des RyR in Herz- und Skelettmuskel	S. 10
1.3.5.	Die Regulation der RyR-Aktivität	S. 11
1.3.5.1.	Die Modulation durch Ryanodin	S. 11
1.3.5.2.	Die Modulation durch Ionen	S. 12
	a) Calciumionen	S. 12
	b) Magnesiumionen	S. 13
	c) Wasserstoffprotonen (pH)	S. 14
1.3.5.3.	Die Modulation des RyR durch verschiedene Substanzen	S. 14
1.3.5.4.	Die Modulation durch Phosphorylierung/Dephosphorylierung des RyR	S. 15
1.3.5.5.	Die Modulation durch Interaktionen mit assoziierten Proteinen	S. 16
1.3.5.5.1.	Zytosolische modulatorische Proteine	S. 16
	a) Calmodulin	S. 16
	b) FK-506-BP	S. 17
1.3.5.5.2.	Intraluminale modulatorische Proteine (Calsequestrin und Calreticulin)	S. 18
1.3.6.	Pathologische Veränderungen des RyR Typ 2	S. 18
1.3.6.1.	Maligne Hyperthermie und Central Core Disease	S. 18
1.3.6.2.	Kardiale Krankheiten	S. 19
1.3.6.2.1.	Herzinsuffizienz	S. 19
1.3.6.2.2.	Arrhythmien	S. 21
1.3.6.2.3.	Ischämie	S. 21
1.4.	Die Bilayer Methode	S. 22
1.5.	Das Reagenz MTSEA ⁺ (2-Aminoethyl-Methanethiosulfonat)	S. 23
1.6.	Die Zielsetzung der Doktorarbeit	S. 25
1.6.1.	Die Entwicklung von SR-Vesikeln aus Herzen gesunder Mäuse	S. 25
1.6.2.	Die Versuche mit der Bilayermethode	S. 26
1.6.2.1.	Die Technik der Bilayermethode	S. 26
1.6.2.2.	Die biophysikalischen Eigenschaften des RyR Typ 2	S. 26
2.	Methoden und Materialien	S. 28
2.1.	Die Gewinnung von Ryanodinrezeptor-Calcium-Kanälen aus Herzen gesunder Mäuse	S. 28
2.2.	Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Präparate	S. 29
2.3.	Der Nachweis des Ryanodinrezeptors mittels Westernblot	S. 29
2.3.1.	Die Vorbehandlung der Proteine	S. 29

2.3.2.	Die Elektrophorese	S. 30
2.3.3.	Der Transfer	S. 30
2.3.4.	Die Detektion der Proteine	S. 31
2.4.	Die Bilayer Technik	S. 32
2.4.1.	Die Grundausstattung	S. 33
2.4.2.	Das „Cup and Chamber“-System	S. 33
2.4.3.	Die Lipide	S. 35
2.4.4.	Die Codierung	S. 35
2.4.5.	Das Bilayer	S. 36
2.4.6.	Die Salzlösungen im Cis- und Trans-Kompartiment	S. 37
	a) Barium als Ladungsträger	S. 37
	b) Cäsium als Ladungsträger	S. 37
2.4.7.	Fusion der Vesikel mit dem Bilayer	S. 38
2.4.8.	Die Verstärker und Filter	S. 40
2.4.9.	Die Auswertung mit pclamp 6.05 (Axon Instruments)	S. 40
3.	Ergebnisse	S. 41
3.1.	Der Nachweis des Ryanodinrezeptors Typ 2 mittels Westernblotting	S. 41
3.2.	Die Leitfähigkeit des kardialen Ryanodinrezeptor-Calciumkanals	S. 42
	a) Die Erhebung der Strom-Spannungskurve mit Barium als Ladungsträger	S. 43
	b) Die Erhebung der Strom-Spannungskurve mit Cäsium als Ladungsträger	S. 50
3.3.	Die glockenförmige Calciumkurve des Ryanodinrezeptors Typ 2	S. 59
	a) Die Calciumabhängigkeit des Ryanodinrezeptors Typ 2 mit Barium als Ladungsträger	S. 59
	b) Die Calciumabhängigkeit des RyR Typ 2 mit Cäsium als Ladungsträger	S. 61
3.4.	Die Wirkung von MTSEA ⁺ auf den Ryanodinrezeptor Typ 2	S. 62
	a) Untersuchung der Wirkung von MTSEA ⁺ auf den Ryanodinrezeptor Typ 2 mit Barium als Ladungsträger	S. 63
	b) Untersuchung der Wirkung von MTSEA ⁺ auf den Ryanodinrezeptor Typ 2 mit Cäsium als Ladungsträger	S. 66
4.	Diskussion	S. 70
4.1.	Die Präparation von Vesikeln mit dem murinen Ryanodinrezeptor Typ 2	S. 71
4.2.	Die Strom-Spannungskurve des murinen Ryanodinrezeptors Typ 2	S. 72
4.3.	Die Calciumabhängigkeit des murinen Ryanodinrezeptors Typ 2	S. 74
4.4.	Die Bilayerversuche mit der MTSEA ⁺ -Lösung	S. 75
4.5.	Ausblick auf weiterführende Forschung	S. 81
5.	Zusammenfassung	S. 82
6.		
7.	Literaturverzeichnis	S. 84
8.		
7.	Danksagung	S. 96
8.	Verzeichnis häufig verwendeter Abkürzungen	S. 97

1. Einleitung

Calcium ist einer der ältesten intrazellulären Botenstoffe und spielt eine zentrale Rolle bei verschiedenen Prozessen, wie z.B. bei der Muskelkontraktion, der Regulierung der Sekretion und der Fertilisation, aber auch bei anderen grundlegenden Vorgängen, beispielsweise beim Zellwachstum und bei der Nekrose (Xu et al., 2001). Dieser Botenmechanismus basiert auf der Fähigkeit der Zelle, im Ruhezustand niedrige Calciumkonzentrationen im Zellinneren zu erhalten, auf eine Stimulation hin aber rapide kurzfristige Anstiege zu ermöglichen (Sorrentino et al., 2000).

Für die Bereitstellung von Calcium in der Zelle sind Calciumkanäle und -pumpen verantwortlich, die sowohl in der Plasmamembran als auch in der Membran von einigen Organellen lokalisiert sind.

Unter ihnen nimmt der Ryanodinrezeptor-Calciumkanal (RyR) eine zentrale Stellung ein. Er ist vor allem in Skelett- und Herzmuskelzellen zu finden, wo er den Calciumeinstrom reguliert, der für die Muskelkontraktion verantwortlich ist. In Herzmuskelzellen jedoch spielt er nicht nur bei der Kontraktion eine entscheidende Rolle, sondern auch die Herzfrequenz wird von ihm moduliert (Yang et al., 2002).

Und in vielen anderen Geweben hat er ebenfalls seine Funktion, denn er ist in die Signaltransduktion eingebunden, die z.B. in den Beta-Zellen der Bauchspeicheldrüse zur Insulinsekretion oder in den T-Zellen zu deren Aktivierung führt (Guse, 2000). Auch im Nervensystem ist der Ryanodinrezeptor von Bedeutung, denn hier beeinflusst er u.a. die Ausbildung des Gedächtnisses und der Gehirnentwicklung (Koulen et al., 2001 b).

In dieser Doktorarbeit wurde der Ryanodinrezeptor-Calciumkanal von Herzmuskelzellen gesunder Mäuse untersucht.

Dabei wurde zunächst ein murines Präparat des Kanals für Bilayeruntersuchungen entwickelt, da dies in der Literatur noch nicht beschrieben ist. Dann wurden mit diesem kardialen RyR-Präparat anhand der Bilayermethode Versuche durchgeführt, die die biophysikalischen Eigenschaften des murinen RyR Typ 2 aufzeigten.

Zuletzt konnten Experimente mit dem reaktiven Reagenz MTSEA⁺ getätigt werden, um Aussagen über die Struktur der Pore des Proteins, auch im Vergleich mit dem RyR Typ 1 und mit den RyR anderer Säugetiere, machen zu können.

1.1. Das intrazelluläre Calcium

Die Calciumkonzentration in der Zelle schwankt zwischen 100 nM (Ganong et al., 1997) in Ruhe und 10µM (Thews et al., 1997) z.B. während einer Muskelkontraktion, während sie innerhalb des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) ca. 2,5 mM beträgt (Striggow et al., 1996). Dabei stammt das Calcium sowohl aus dem Extrazellulärraum als auch aus intrazellulären Speichern, und zwar vor allem aus dem endo- bzw. sarkoplasmatischen Retikulum, und auch aus den Mitochondrien. Die Speicherkapazität des SR für Calcium wird hierbei durch calciumbindende Proteine, wie z. B. Calsequestrin, erhöht. Die intrazelluläre Calciumkonzentration wird aufrecht erhalten, indem sich die Zelle verschiedener Kanal- und Carrierproteine bedient. Nach einem vorübergehenden Anstieg des intrazellulären Calciumlevels durch die Depolarisation während einer Muskelkontraktion oder durch andere Vorgänge sorgen der Calcium-Natrium-Austauscher in der Zellmembran und die Calcium-ATP-ase in der Membran des endo-/sarkoplasmatischen Retikulums (ER/SR) für eine Erniedrigung der Calciumkonzentration auf das Ausgangsniveau. Um dagegen die Calciumkonzentration in der Zelle zu erhöhen, werden der Dihydropyridinrezeptor (DHPR)-Calciumkanal der Plasmamembran bzw. der Ryanodinrezeptor-Calciumkanal und der Inositoltriphosphat (IP₃)-Rezeptor-Calciumkanal in der Membran des ER/SR geöffnet (Shoshan-Barmatz et al., 1998). Der DHPR-Calciumkanal wird auch als L-Typ-Calciumkanal bezeichnet; seine Öffnung wird durch die Depolarisation der Plasmamembran induziert, und der Einstrom der Calciumionen in die Zelle geschieht entlang eines elektrochemischen Gradienten (Williams, 1997).

Ein weiterer Faktor, der die Calciumkonzentrationen in der Zelle konstant hält, sind puffernde zytoplasmatische Proteine (Shoshan-Barmatz et al., 1998).

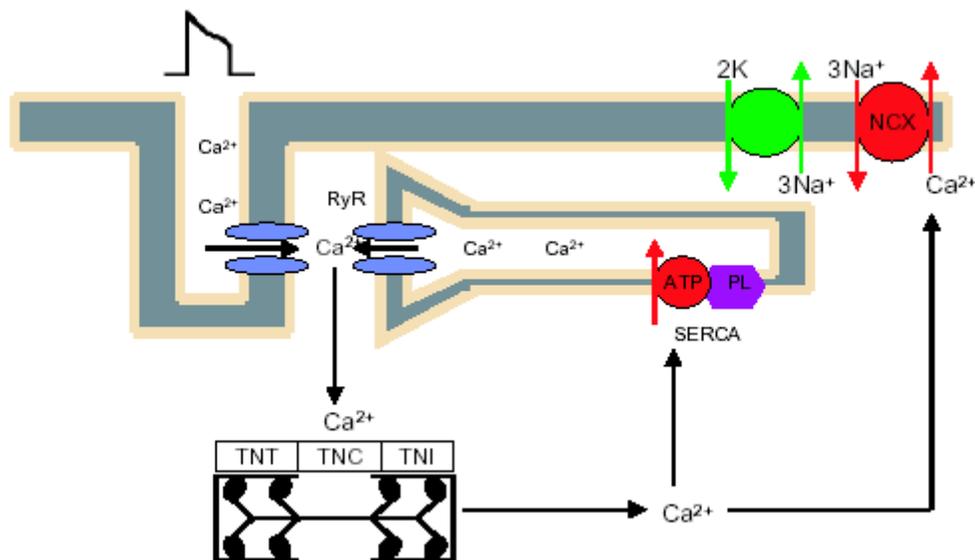
1.2. Die Calciumkanäle in der Membran des ER/SR

Der Inositol-1,4,5- Triphosphat- (IP₃-) und der Ryanodinrezeptor- (RyR-)Calciumkanal sind beide intrazellulär an der Membran des endoplasmatischen / sarkoplasmatischen Retikulums (ER/SR) lokalisiert und verantwortlich für die Freisetzung von Calcium aus dem sarkoplasmatischen bzw. endoplasmatischen Retikulum, das als intrazellulärer Calciumspeicher

fungiert (Marks, 2000).

Diese Kanäle kommen beide in den meisten Zelltypen vor, allerdings in unterschiedlicher Gewichtung. Ein Unterschied zwischen dem IP_3 - und dem Ryanodinrezeptor - Calciumkanal besteht möglicherweise darin, dass IP_3 -Rezeptoren rapide und massive Anstiege des Calciumspiegels in der Zelle bewirken, während RyR eher für "gewöhnliche Bedingungen" zuständig sind (Ehrlich, 1994).

Die Ca^{2+} -ATPase des SR/ER (SERCA) ist auch, wie die oben genannten Calciumkanäle, ein transmembranäres Protein des ER/SR, aber es pumpt die Calciumionen in die entgegengesetzte Richtung wie der IP_3 - und der Ryanodinrezeptor-Calciumkanal, nämlich wieder in den ER/SR-Speicher zurück, wodurch ein tausendfacher Konzentrationsgradient zwischen dem ER/SR und dem Zytoplasma aufgebaut wird. Da dieser Vorgang die Hydrolyse von ATP erfordert, ist der Calcium-Reuptake auch ungefähr tausendfach langsamer als der Calciumeinstrom aus dem SR in die Zelle (Stokes, 2000).



Darstellung 1.

In dieser Darstellung nach Hasenfuss et al., 2002, ist das Zusammenspiel der verschiedenen Calciumkanäle zu sehen. RyR Ryanodinrezeptor-Calciumkanal, TNT Troponin T, TNC Troponin C, TNI Troponin I, NCX Natrium-Calcium-Austauscher, SERCA sarcoplasmatische Calcium-ATPase, PL Phospholamban, das als Regulator der SERCA fungiert.

1.3. Die Merkmale des RyR

Der RyR besteht aus vier gleichen Untereinheiten von jeweils 560 kDa bzw. ca. 5000 Aminosäuren, so dass ein kompletter Calciumkanal ein Molekulargewicht von 2240 kDa besitzt (Xu et al., 1998). Dabei ist zu erwähnen, dass er damit zehnmal größer ist als der spannungsabhängige DHPR-Calciumkanal.

Seine Leitfähigkeit für Calcium beträgt ca. 100 pS und ist hiermit um ein Zehnfaches größer als die des spannungsabhängigen Calciumkanals (Marks, 2000).

Ein weiteres Merkmal, abgesehen von seiner außergewöhnlichen Größe und Leitfähigkeit, sind seine hohe Leitfähigkeit speziell für Kationen (Williams, 1992) und seine geringe Selektivität gegenüber den unterschiedlichen Kationen (Williams 1992; Williams, 2002), während seine Permeabilität für Anionen unmessbar gering ist (Lindsay et al., 1991).

Die RyR weisen eine von der Calciumkonzentration abhängige Aktivität auf, die sich in Form einer glockenförmigen Kurve darstellt, wenn man die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals in Abhängigkeit von der zytosolischen Calciumkonzentration graphisch aufzeigt (Bezprozvanny et al., 1991). Denn der Kanal besitzt eine Bindungsstelle mit großer Calciumaffinität zur Aktivierung und eine Bindungsstelle mit geringer Calciumaffinität zur Inhibierung des Calciumkanals. Dabei wird der RyR Typ 2 durch geringere Calciumkonzentrationen aktiviert als der RyR Typ 1, während zur Inhibierung des kardialen RyR höhere Calciumkonzentrationen benötigt werden (Xu et al., 1998).

Aber auch der Calciumgehalt des SR spielt eine wichtige Rolle, da die Offenwahrscheinlichkeit des RyR abnimmt, wenn die luminal Calciumkonzentration abnimmt (Gyorke et al., 1998; Xu et al., 1998).

Der RyR kann durch bestimmte Substanzen in seiner Aktivität beeinflusst werden, wobei z.B. Calcium (in mikromolarer Konzentration), Adenin-Nukleotide, Koffein, Halothan, Ryanodin (in nanomolarer Konzentration), Sulfhydryl-Reagenzien und zyklische Adenosindiphosphoribose (cADPR) aktivitätssteigernd wirken, während Mg^{2+} , Calcium (in millimolarer Konzentration), Ryanodin (in mikromolarer Konzentration) und Ruthenium Rot einen hemmenden Effekt besitzen (Sorrentino, 1995).

1.3.1. Die biophysikalischen Merkmale des RyR

Mittels der Bilayer-Technik konnte die Einzelkanal-Leitfähigkeit der RyR im Herz- und Skelettmuskel für Calcium festgestellt werden. Sie beträgt für den RyR vom Skelettmuskeltyp 120 pS und 100 pS für die kardiale Isoform (Bezprozvanny et al., 1991). Damit weist er eine sehr hohe Leitfähigkeit auf, die in einigen monovalenten Salzlösungen bis zu ein nS beträgt. Zusätzlich ist er nur gering selektiv gegenüber Kationen, allerdings kaum permeabel für Anionen (Shoshan-Barmatz et al., 1998). Außerdem wurde die Anzahl der freien Calciumionen, die pro Kanalöffnung durch den RyR einströmen, auf 2000 berechnet (Striggow et al. 1996).

1.3.2. Die Isoformen des Ryanodinrezeptor-Calciumkanals

Ryanodinrezeptoren traten vermutlich vor 700 Millionen Jahren mit der Evolution von multizellulären Organismen auf, während die verwandten IP₃-Rezeptoren, bei denen es sich ebenfalls um Calciumkanäle des SR/ER handelt, schon vorher bestanden. Dabei gibt es eine eindeutige Homologie zwischen den RyR und den IP₃-Rezeptoren, und zwar v.a. in der Region, die die Poren der Kanäle kodieren. RyR sind sowohl in Pflanzen als auch in Amphibien (Shoshan-Barmatz et al., 1998), wie z.B. Fröschen (Tijskens et al., 2003), in Fischen (Koulen et al., 2001 a), Vögeln und Insekten zu finden (Shoshan-Barmatz et al., 1998).

Bei den Vertebraten gibt es drei Isomere des Ryanodinrezeptor-Calciumkanals, den RyR Typ 1, 2 und 3. Dabei finden sich im Skelettmuskel vor allem der Typ 1, im Herzmuskel der Typ 2 und im Gehirn und Zwerchfell der Typ 3. Im Speziellen sind Typ 1 und Typ 3 im Skelettmuskel koexprimiert, während alle drei Subtypen im Herzmuskel identifiziert werden konnten und der RyR Typ 2 und 3 im glatten Muskel zu finden sind (Sutko et al., 1996). Allerdings besteht auch die These, dass im Herzmuskel der RyR Typ 2 der einzige Calciumkanal des SR ist (Uehara et al., 2002).

Die drei Isoformen sind auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert, der RyR Typ 1 auf Chromosom 19, Typ 2 auf Chromosom 1 und Typ 3 auf Chromosom 15. Dabei besteht eine

66%ige Homologie zwischen Typ 1 und 2.

Die Domäne des Proteins, die die Pore bildet, ist der entscheidende Teil des Calciumkanals und daher ist seine genetische Anlage zwischen den Isoformen auch sehr ähnlich.

Jedoch vor allem drei Unterregionen (subregions) des RyR Typ 1 und Typ 2 zeigen eine deutlich geringere Homologie und sind daher als hauptverantwortlich anzusehen für die funktionellen Unterschiede zwischen den beiden Isoformen (Sharma et al., 1998).

Die Bedeutung der verschiedenen Isoformen des RyR wurde durch die Züchtung und Untersuchung von Knockout-Mäusen veranschaulicht.

Knockout-Mäuse für das RyR-Typ-1-Gen versterben bei der Geburt, da keine Kontraktion der Skelettmuskulatur möglich ist (Takeshima et al., 1994), so dass es zur Atemlähmung kommt. Knockout-Mäuse für den RyR Typ 2 versterben am zehnten Tag nach der Geburt aufgrund von morphologischen Abnormalitäten im Laufe der Herzentwicklung (Takeshima et al., 1998), und zwar nachdem das Herz beginnt zu schlagen (Takeshima, 2002), während die Knockout-Mäuse für den RyR Typ 3 lebensfähig sind (Takeshima et al., 1996).

Die Isoformen Typ 1 und 2 treten in einem frühen Stadium der Entwicklung auf und sind entscheidend für die Ausbildung von Myofibrillen und anderen intrazellulären Komponenten, während der RyR Typ 3 erst kurz vor der Geburt erscheint, wobei sein Gehalt bis zwei Wochen nach der Geburt ansteigt, um dann wieder abzufallen (Sorrentino et al., 1999). Damit ist auch zu erklären, dass das Fehlen von RyR Typ 3 vergleichsweise weniger folgenschwer ist.

1.3.3. Die Struktur des RyR und seine Anordnung im Muskel

RyR-Proteine wurden erstmals aus dem SR von Skelett- und Herzmuskulatur aufgereinigt, und zwar als große Homotetramere (Shoshan-Barmatz et al., 1998), die aus Untereinheiten von jeweils ca. 565 kDa bestehen (Ogawa et al., 2000).

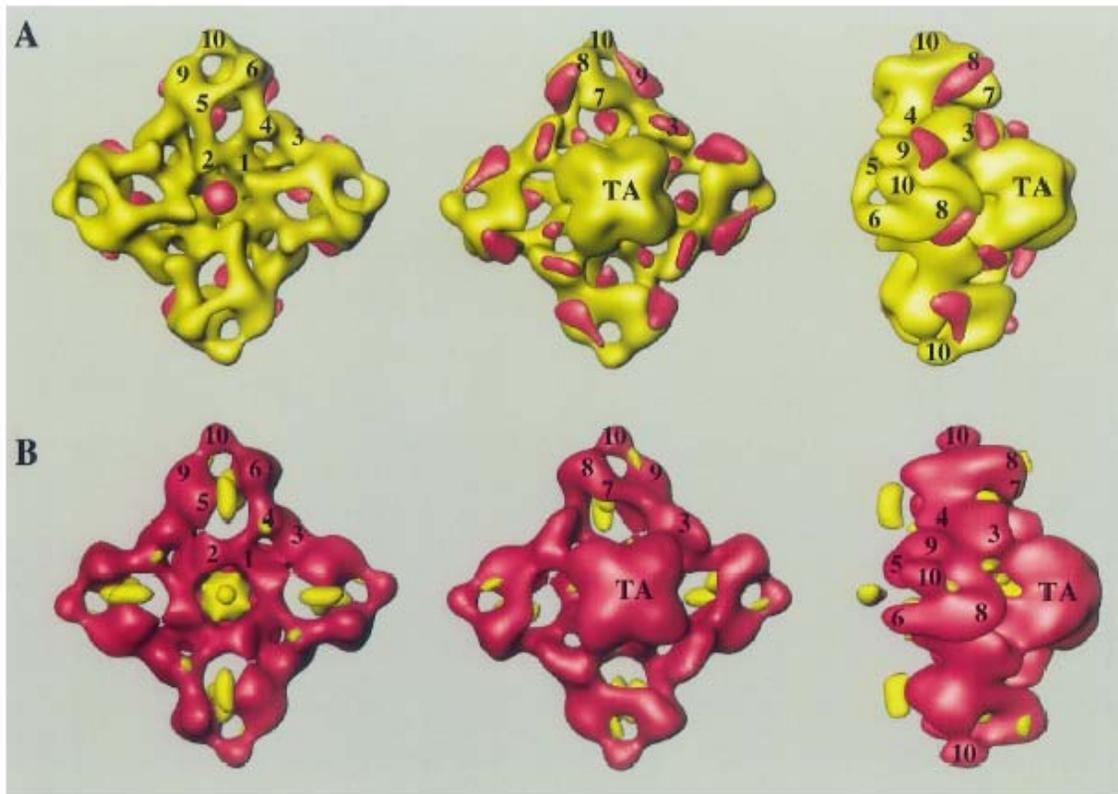
Die besonders hydrophoben Regionen des RyR befinden sich in einer Domäne, die aus ca. 1000 Aminosäuren besteht und in der Nähe des C-terminalen Endes lokalisiert ist. Diese Domäne hat vermutlich vier bis zwölf Transmembransegmente in jeder Untereinheit (Shoshan-Barmatz et al., 1998) und ist bei den verschiedenen Subtypen konserviert (Sutko et al., 1996), wobei dieser C-terminale Anteil von 20% der RyR-Typ 1-Sequenz gebildet wird und für die Funktion als

Ionenkanal ausreicht (Samso et al., 1998).

Der hydrophile (Shoshan-Barmatz et al., 1998) NH₂-terminale Anteil des Proteins bildet den zytoplasmatischen vierblättrig geformten Körper des RyR (Sutko et al., 1996) und ist für die funktionellen Unterschiede zwischen den Isoformen verantwortlich, denn die meisten Regionen mit regulatorischen Aktivitäten sind in diesem Bereich des Moleküls lokalisiert.

Der zytoplasmatische Teil besitzt eine lockere Struktur und eine Quaderform mit den Maßen 28nm x 28nm x 12nm. Dieser Bereich des Kanals ist für die "Verbindungsfüße" verantwortlich, die man in elektronenmikroskopischen Bildern sehen kann (s.u.). Er setzt sich aus globulären Teilen zusammen, die untereinander durch Segmente verbunden sind, wobei die kleinste dieser Fraktionen selbst die Größe eines kleinen globulären Proteins, wie z.B. einer Ribonuklease, besitzt. Die Lücken zwischen den globulären Domänen bilden eine Reihe von Hohlräumen, so dass ca. 50% des Volumens von Flüssigkeit ausgefüllt ist. Dieser zytoplasmatische Anteil macht mehr als 80% der Masse des Ryanodinrezeptors aus (Wagenknecht et al., 2002).

Der transmembranäre Anteil hat eine kompaktere Struktur, wobei er 7 nm aus dem Zentrum des Quaders herausragt. Er wird von vier Säulen gebildet, die an ihren Seiten miteinander fusionieren und in der Mitte eine zentrale Pore bilden, die möglicherweise die Passage für die Calciumionen gewährleistet (Samso et al., 1998). Dabei macht der transmembranäre Teil nur 10-15% der gesamten Proteinmasse aus (Shoshan-Barmatz et al., 1998).



Darstellung 2.

Unterschiede zwischen dem Ryanodinrezeptor Typ 1 und 2. In (A) ist der RyR Typ 1 in Gelb gezeigt, wobei höhere Dichtegrade des RyR Typ 2 in rot dargestellt sind. In (B) ist der RyR Typ 2 aufgeführt und die Stellen des RyR Typ 1 mit höherer Dichte sind gelb markiert. TA bezeichnet den transmembranären Abschnitt des Proteins. Die Ziffern 7-10 kennzeichnen die sog. Clamps (aus: Sharma et al., 1998, S. 18433, Fig.5).

In der offenen Konformation bildet der Ryanodinrezeptor eine Pore mit einem Durchmesser von ca. 1,8 nm, wobei außerdem der transmembranäre und der zytoplasmatische Anteil um 4° gegeneinander rotiert sind im Vergleich zur geschlossenen Konformation. Zusätzlich verändert sich allerdings auch die Stellung von bestimmten Strukturen an den Ecken des zytoplasmatischen Abschnitts, die daher als “clamps” bezeichnet werden (Samso et al., 1998).

Allerdings gibt es neben der Meinung, dass der RyR eine Pore für den Einstrom der Calciumionen besitzt, auch die Ansicht, dass pro RyR vier Poren die Membran des SR durchqueren, wobei diese Hypothese auf der Beobachtung beruht, dass Subconductance-Zustände eintreten, die jeweils 25%, 50% und 75% der maximalen Leitfähigkeit betragen, wenn ein bestimmtes mit dem Kanal assoziiertes Protein, nämlich das FK-bindende Protein (FKBP), entfernt wird (Marks, 2000). Außerdem sind in Rekonstruktionen vier radiäre Kanäle zu

erkennen, die von der zentralen gemeinsamen Pore im Inneren des Moleküls ausgehend an dessen zytoplasmatischer Oberfläche bis in die vier Ecken des Tetramers reichen. Die Pore im Zentrum überquert die SR/ER-Membran und zeigt ins Lumen des Calciumspeichers.

Elektronenmikroskopisch konnte die genaue Lokalisation der RyR am SR festgestellt werden.

Die grundlegende Struktur des Skelettmuskels ist das Sarkomer, das aus zwei Komponenten besteht, den Myofibrillen und den membranösen Kompartimenten. Dabei werden bei den Kompartimenten die transversen Tubuli (T-Tubuli) und das sarkoplasmatische Retikulum (SR) unterschieden. Diese treten beim Skelettmuskel in Form von Triaden zusammen, indem zwei SR-Zisternen an gegenüberliegenden Seiten des T-Tubulus lokalisiert sind. Die Lücke zwischen den SR-Zisternen und den T-Tubuli beträgt ca. 15nm, wobei sich dort die RyRen befinden, die elektronenmikroskopisch als dichte Strukturen imponieren und als Fußregion bezeichnet werden (Sorrentino, 1995).

Dabei spielen die RyR und die DHPR sowohl im Skelettmuskel als auch im Herzmuskel eine zentrale Rolle bei der Vermittlung von Muskeleerregung und Muskelkontraktion, also beim sog. excitation-contraction-coupling bzw. bei der elektromechanischen Kopplung. Denn die RyR geben die von der Plasmamembran bzw. den T-Tubuli empfangenen Signale an das SR weiter und leiten das Calcium aus dem SR ins Zytoplasma der Muskelzellen. Die DHPR sind transmembranäre Spannungssensoren in der Plasmamembran bzw. den T-Tubuli (Sharma et al., 1998) und jeweils vier von ihnen sind wie in den Ecken eines Quadrats angeordnet, und zwar so, dass sie mit den vier Untereinheiten der Fußregionen des RyR korrespondieren. Dabei führt eine Depolarisation der Plasmamembran zur Konformationsänderung des DHPR, die dadurch dem RyR das Signal zur Kanalöffnung gibt.

Während im Skelettmuskel die Triaden die Grundlage für die elektromechanische Kopplung darstellen (Sutko et al., 1996), sind es im Herzmuskel die Dyaden (Samsó et al., 1998).

Diese Verbindungsstellen in den Herzmuskelzellen enthalten zwar auch Fußregionen, aber die DHPR sind nicht in Tetraden, sondern zufällig angeordnet. Außerdem ist die Interaktion zwischen DHPR und kardialen RyR abhängig von extrazellulärem Calcium und vom Calciumeinstrom durch den DHPR, und es besteht die Möglichkeit, dass der RyR des Herzmuskels auch unabhängig von DHPR aktiviert wird.

Im Allgemeinen ist der Gehalt an Fußregionen pro Triade bzw. Dyade um so höher, je schneller der Muskel sich kontrahieren kann (Franzini-Armstrong et al., 1998).

Die Unterschiede zwischen dem RyR Typ 1 und Typ 2 beschränken sich jedoch nicht auf die

Anordnung der Kanäle, sondern betreffen unter anderem auch die Struktur der Calciumkanäle selbst. Denn beide Isoformen sind zwar viereckig mit einer Kantenlänge von ca. 280-290 Å, aber v.a. die Ecken und das Zentrum sind verschieden konzipiert (Sharma et al., 1998).

1.3.4. Die Funktion des RyR in Herz- und Skelettmuskel

Die Aktivierung des RyR Typ 1, der vor allem im Skelettmuskel zu finden ist, geschieht durch direkte mechanische Kopplung. Denn die Depolarisation der T-Tubuli-Membran führt zur Verschiebung von geladenen Proteindomänen innerhalb der DHPR, so dass reziproke Verlagerungen von geladenen Regionen des RyR in der Membran des SR auftreten, die in der Öffnung des RyR und dem Ausstrom von Calcium in das Zytoplasma resultieren (Shoshan-Barmatz et al., 1998), so dass man auch von allosterischer Kopplung sprechen kann (Mackrill, 1999).

Eine Aktivierung des kardialen RyR dagegen kann die Depolarisierung allein nicht bewirken (Sorrentino, 1995), denn es müssen Ca^{2+} -Ionen durch den aktivierten DHPR-Kanal einströmen und an die high-affinity-Bindungsstelle des RyR Typ 2 binden, wodurch es zur Öffnung des Kanals kommt. Man spricht daher auch vom „calcium-induced calcium release“, das zur Amplifizierung von Calciumsignalen führt (Wang et al., 2001). Denn für die Muskelkontraktion reicht nicht die Menge an Calciumionen aus, die durch den DHPR einströmt, sondern dafür wird die Calciumfreisetzung aus dem SR benötigt (Sorrentino, 1995).

Der Abstand zwischen dem kardialen RyR des SR und dem DHPR der Plasmamembran (auch spannungsabhängiger L-Typ-Calciumkanal genannt) beträgt, wie oben erwähnt, ca. 12 nm. Dabei wurde in Untersuchungen festgestellt, dass die Kopplung zwischen diesen beiden Kanälen stochastisch ist. Denn die Öffnung eines einzelnen DHPR mit dem folgenden Kalziueinstrom in die Zelle, der als „sparklet“ bezeichnet wird, aktiviert die RyR, die daraufhin einen „spark“ generieren (Wang et al., 2001).

Der Terminus „calcium spark“ wurde von Lederer et al. eingeführt und beschreibt einen spontanen lokalen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration, der den Calciumeinstrom durch „release units“ repräsentiert, die aus Calciumkanälen des SR bestehen (Williams, 1997).

Die Öffnung des RyR Typ 2 erhöht die zytosolische Calciumkonzentration von 100 nM auf $1\mu\text{M}$

und aktiviert dadurch calciumsensitive kontraktile Proteine (Troponin C), so dass es zur Muskelkontraktion kommt. Für die Relaxation benötigt der Herzmuskel dann die Entfernung des Calciums v.a. durch die Calciumpumpe des SR, die SERCA2a.

Bei der physiologischen und pathophysiologischen Regulation der Calcium-Homöostase spielen Veränderungen des RyR eine entscheidende Rolle. Im gesunden Herz ist der RyR Typ 2 kaum phosphoryliert. Bei physiologischer Stimulation allerdings (fight-or-flight response) kommt es zum Anstieg zirkulierender Katecholamine und dadurch zur Phosphorylierung von ein oder zwei Untereinheiten des RyR durch die Phosphokinase A. Dies führt zu einer Erhöhung der Sensitivität des RyRs für die Aktivierung durch Calciumionen, so dass eine bestimmte Menge an Calciumionen, die durch den DHPR in die Zelle einströmt, einen größeren Einstrom von Calciumionen aus dem SR verursacht als im unphosphorylierten Zustand. Gleichzeitig dissoziieren die FKBP (s. Punkt 1.3.5.6.1.b) von den phosphorylierten Untereinheiten des Calciumkanals.

Bei der Herzinsuffizienz (s. Punkt 1.3.6.2.1.) jedoch resultiert der dauerhaft erhöhte Spiegel der Katecholamine in einer Hyperphosphorylierung der RyR Typ 2, denn es kommt zur Phosphorylierung von drei bis vier Untereinheiten des Calciumkanals, die eine Hypersensibilisierung zur Folge hat.

IP₃-Kanäle sind auch SR-membranständige Calciumkanäle, die mit den RyR verwandt sind. Im Herzmuskel kommen sie allerdings 50-fach seltener vor als die RyR Typ 2 und erfüllen andere Aufgaben. Sie sind für die Regulation der Permeabilität der Organellenmembran einschließlich der Zellkernmembran, für die Verstärkung von elektrischen Signalen (Purkinjefasern haben den höchsten Gehalt an IP₃-Rezeptoren) und für die Kontrolle des lokalisierten Calciumbotenmechanismus im Zusammenhang mit dem Zellwachstum verantwortlich (Marks, 2000).

1.3.5. Die Regulation der RyR-Aktivität

1.3.5.1. Die Modulation durch Ryanodin

Der Name Ryanodinrezeptor-Calciumkanal kommt daher, dass Ryanodin spezifisch an den

Rezeptor bindet und so die Aufreinigung dieses Calciumkanals ermöglichte (Ehrlich et al., 1994). Ryanodin ist ein neutrales Alkaloid, das aus den Wurzeln und dem Stamm des südamerikanischen Strauchs *Ryania speciosa* isoliert wurde. Die Wirkungen in Vertebraten bestanden beim Skelettmuskel im Induzieren langsamer irreversibler Kontrakturen, beim Herzmuskel dagegen in einer Reduktion der Kontraktionskraft (Shoshan-Barmatz et al., 1998). Ryanodin bindet nur an den offenen RyR-Calciumkanal (Michalak et al., 1988). Dabei wurden, wie auch für die Calcium-Bindungsstellen, Bindungsstellen mit großer (K_D 2 - 200 nM) und geringer (K_D 30 nM - 4 μ M) Affinität identifiziert, wobei es nur eine Bindungsstelle mit großer Affinität pro Homotetramer gibt. Dementsprechend führen Konzentrationen im nanomolaren Bereich zu einer Aktivierung des RyR, indem die Bindung von Ryanodin an die high-affinity-Bindungsstelle den Kanal in einen "subconductance"-Zustand befördert, der durch eine 40%ige Leitfähigkeit des normal geöffneten Kanals und sehr langen Öffnungszeiten der Pore charakterisiert ist. Außerdem kommt es zu einer starken Steigerung der Offenwahrscheinlichkeit (Tanna et al., 2001). Hohe Konzentrationen von Ryanodin (> 100 μ M) dagegen binden an die low-affinity-Bindungsstelle und stabilisieren dadurch die geschlossene Konformation des Calciumkanals (Shoshan-Barmatz et al., 1998). Ein Charakteristikum sowohl des Subconductance-Zustandes als auch des geschlossenen Zustandes des RyR, der durch Ryanodin verursacht wurde, ist das fehlende Ansprechen auf andere Liganden, wie z.B. Calcium, ATP oder Magnesium (Xu et al., 1998).

Da sowohl die Leitfähigkeit als auch die Offenwahrscheinlichkeit durch Ryanodin verändert werden, befinden sich sowohl die high- als auch die low-affinity-Bindungsstelle wahrscheinlich in unmittelbarer Nähe oder innerhalb der transmembranären Region des RyR (Shoshan-Barmatz et al., 1998). Mit unterschiedlichen Untersuchungsmethoden wurde die high-affinity-Bindungsstelle dementsprechend im C-terminalen Ende des Proteins lokalisiert (Sutko et al., 1996).

1.3.5.2. Die Modulation durch Ionen

a) Calciumionen

Calciumionen können sowohl aktivierend als auch inhibierend auf die Einzelkanalaktivität des

RyR wirken (Ashley et al., 1990). Dies ist auf die Existenz jeweils einer high-affinity- und einer low-affinity-Bindungsstelle für Calcium in jeder Untereinheit des RyR zurückzuführen. Die Werte von $K_{0,5}$ betragen ca. $1\mu\text{M}$ bzw. 1mM (Shoshan-Barmatz et al., 1998). In diesem Zusammenhang spricht man von der “glockenförmigen Calciumkurve”, da die Offenwahrscheinlichkeit des RyR bei einem pCa zwischen 8 und 3 zuerst ansteigt und dann wieder abfällt (Bezprozvanny et al., 1991).

Daraus ist ersichtlich, dass der Effekt der Calciumionen von ihrer Konzentration abhängig ist. Dabei ist der Kanal bei hohen Calciumaktivitäten geschlossen, so dass als möglicher Mechanismus für die spontane Kanalschließung die Inaktivierung durch einen Anstieg der Calciumionen gilt, und zwar sowohl beim kardialen als auch beim Skelettmuskeltyp (Shoshan-Barmatz et al., 1998). Allerdings besteht einer der entscheidenden Unterschiede zwischen dem RyR Typ1 und Typ2 darin, dass der kardiale RyR eine höhere Empfindlichkeit gegenüber niedrigen Calciumkonzentrationen aufweist, während es einer höheren Konzentration an Magnesiumionen oder Rutheniumrot zu seiner Inhibierung bedarf als dies beim Skelettmuskel der Fall ist (Sorrentino, 1993).

Entscheidend für den Aktivierungsmechanismus durch Calciumionen ist die lokale Calciumkonzentration am RyR, die durch Öffnung des DHPR entsteht, und weniger der Calciumspiegel, der in der gesamten Zelle vorherrscht (Williams, 1997).

Doch auch das Calcium im Lumen des SR hat einen Einfluss auf die Aktivität des RyR; denn eine Erhöhung der luminalen Calciumkonzentration erhöht die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals und die Sensitivität für aktivierende zytosolische Calciumkonzentrationen. Zudem wird die Hemmung durch hohe Calciumaktivitäten auf der zytoplasmatischen Seite des RyR aufgehoben, so dass man davon ausgehen kann, dass es einen Sensor für luminalen Calciumkonzentrationen gibt (Gyorke et al., 1998).

b) Magnesiumionen

Die inhibierende Wirkung von Magnesium lässt sich entweder als kompetitiver Antagonismus der Magnesiumionen mit den Calciumionen an der Bindungsstelle mit großer Affinität für die Calciumionen (Ehrlich et al., 1994) oder durch die Bindung der Magnesiumionen an die Bindungsstelle mit geringer Affinität mit folgender Inhibierung der RyR-Aktivität erklären.

Jedenfalls formt Magnesium auch einen Komplex mit ATP, der dann als allosterischer Modulator wirkt (Shoshan-Barmatz et al., 1998).

Die Hemmung erfolgt durch die Reduktion der Offenwahrscheinlichkeit (Williams, 1997), wobei diese Wirkung des Magnesium an der unphosphorylierten Form greift (Shoshan et al., 1998).

c) Die Modulation durch Wasserstoffprotonen (pH)

Die Offenwahrscheinlichkeit des RyR ist vom pH-Wert abhängig, und zwar ist sie bei einem pH von 7,4 sehr hoch und fällt bei einem pH von 6,5 fast auf den Wert Null ab .

Die aktivierende Wirkung durch einen raschen Abfall der Wasserstoffprotonenkonzentration ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass eine positiv geladene Aminogruppe deprotoniert wird, die am Kanal-Gating beteiligt ist (Shoshan et al., 1998).

1.3.5.3. Die Modulation des RyR durch verschiedene Substanzen

Es gibt eine Reihe von Modulatoren des RyR, die nicht nur im Labor vorkommen, sondern ubiquitär z.B. in täglich verwandten Genussmitteln oder Medikamenten enthalten sind. Einige von ihnen seien hier genannt.

Methylxanthine, die in Kaffee und Tee enthalten sind, verursachen einen Calciumstrom aus dem SR in die Zelle durch Sensitivierung von RyR, wobei sie allerdings erst in relativ hoher Konzentration wirken (Xu et al., 1998). Diese Liganden reagieren mit dem zytosolischen Teil des Kanalproteins und können in der Anwesenheit von Calciumionen eine Offenwahrscheinlichkeit von 1,0 herbeiführen (Williams, 1997).

Calciumionen aktivieren unter anderem die zytosolische Phospholipase A2, die aus den Phospholipiden des SR/ER und der Zellkernmembran Arachidonsäure freisetzt, die die Vorstufe der Eikosanoide bildet. Dabei hat sich herausgestellt, dass der RyR zwar durch Leukotrien B4 aktiviert wird, nicht aber durch Arachidonsäure. Die Physiologische Bedeutung dieser Modulationsmechanismen ist wohl in einer negativen bzw. positiven Feedback-Regulierung zur Erhaltung der Calciumhomöostase der Zelle zu sehen (Striggow et al., 1997). Interessanterweise

ist bekannt, dass im ischämischen Herzmuskel die Arachidonsäure und andere Fettsäuren akkumulieren und seine Funktion beeinträchtigen (Uehara et al., 1996).

Auch Heparin, ein häufig verwendeter Gerinnungshemmer, aktiviert den RyR. Der Mechanismus beruht vermutlich darauf, dass Heparin mit seiner negativen Oberflächenladung durch die Bindung an den RyR die Anzahl an negativen Ladungen erhöht und somit die lokale Konzentration an Calciumionen steigert. Diese Hypothese wird dadurch untermauert, dass auch andere Polyanionen, wie z.B. Pentosanpolysulphat, eine ähnliche Wirkung haben (Bezprozvanny et al., 1993).

Protamin ist ein bekanntes Antidot für Heparin und besitzt eine große Anzahl an positiven Ladungen und basischen Aminosäuren.

Die Bedeutung der Oberflächenladung des RyR für die Kanalaktivität wurde besonders deutlich, indem gezeigt werden konnte, dass das positiv geladene Protamin die Aktivität des RyR inhibiert. Denn durch die positiven Ladungen des Protamin werden Calciumionen vom RyR ferngehalten, die für seine Aktivierung benötigt werden (Koulen et al., 2000).

Da Doxorubicin, ein Zytostatikum, bekannterweise kardiotoxisch ist, wurde seine Wirkung auf den kardialen RyR mittels der Bilayer Technik untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass es den Kanal zunächst aktiviert, um ihn dann irreversibel zu inhibieren. Da dieses Verhalten durch Zugabe von DTT (Dithiothreitol) verhindert werden konnte, geht man davon aus, dass die Oxidation von Sulfhydrylgruppen des RyR eine wesentliche Rolle für den Durchfluss der Calciumionen spielt (Ondrias et al., 1990).

1.3.5.4. Die Modulation durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung des RyR

Wahrscheinlich spielt die Phosphorylierung eine Rolle bei der Regulation des kardialen RyR, nicht aber des Skelettmuskeltyps. Während der β -adrenergen Stimulation von Herzmuskelzellen kommt es zur Phosphorylierung des RyRs durch die Phosphokinase A (PKA) (Shoshan-Barmatz et al., 1998) und dadurch zu einem gesteigerten Ansprechen des Kanals auf Calcium und zu einer beschleunigten Adaptation des RyRs (Valdivia et al., 1995). Dabei gibt es an jeder Untereinheit einen bestimmten Serinrest (Serin 2809), der von der PKA phosphoryliert wird.

Die Phosphorylierung des RyR Typ 2 durch die PKA wird durch die Gegenwart von Isoproterenol, einem Sympathomimetikum, gesteigert, so dass von einem Regulationsmechanismus durch beta-adrenerge Stimulation in Myozyten ausgegangen werden kann (Sorrentino, 1995).

Die Wirkungen der Phosphorylierung des kardialen RyR (s. auch Punkt 1.3.5.6.1.b und 1.3.6.2.1.) erklären Marx et al. dadurch, dass das FKBP12.6 (s. Punkt 3.4.9.1.) dabei vom Kanal abdissoziiert und so dessen Regulation und Stabilisierung des Kanals durch dieses Protein entfällt (Marx et al., 2000).

1.3.5.5. Die Modulation durch Interaktionen mit assoziierten Proteinen

Der RyR ist von vielen anderen Proteinen umgeben, die kovalent an den Kanal binden und ihn dabei modifizieren, andere Proteine an ihn binden, sein Calciumbindungsverhalten verändern oder direkt seine Kanaleigenschaften beeinflussen (Mackrill, 1999). Die wichtigsten sind im Folgenden genannt.

1.3.5.5.1. Zytosolische modulatorische Proteine

a) Calmodulin

Calmodulin ist ein 17kDa großes Calcium-bindendes Protein, das sowohl RyR des Skelettmuskels als auch des Herzmuskels moduliert, indem es die mittlere Offenzeit vermindert, ohne die Einzelkanalleitfähigkeit zu verändern. Dabei kommt es vermutlich zu einer direkten Interaktion zwischen dem Calmodulinprotein und dem Kanal, da seine Wirkung nicht ATP-abhängig ist (Mackrill, 1999).

b) FK-506-BP

FK-506 ist ein Makrolid- Antibiotikum und ein sehr wirksames Immunsuppressivum, das an eine Familie von intrazellulären Rezeptoren bindet, die als FK-506-bindende Proteine (FKBP) bezeichnet werden. Diese FKBP besitzen *Cis -Trans*-Peptidylprolylisomerase-Aktivität und sind mit dem RyR assoziiert (Brillantes et al., 1994), wobei jeweils ein FKBP-Molekül mit einem Monomer des RyR verbunden ist .

Am häufigsten kommt das FKBP12 mit einem Molekulargewicht von 12 kDa vor, das die immunsuppressive Wirkung von Cyclosporin A und auch von FK-506 selbst vermittelt. Der kardiale RyR jedoch zeichnet sich durch die Assoziation mit dem FKBP 12.6 aus, das eng mit dem FKBP12 verwandt ist.

Die Wirkung der FKBP auf den RyR besteht in einer Stabilisierung des Zustands der Pore, so dass die geschlossene Konformation stabilisiert wird, der Übergang zum vollständig offenen Kanal gewährleistet ist und er seine vollständige Leitfähigkeit aufweist. Ryanodinrezeptoren, deren FKBP12 entfernt worden waren, wiesen dagegen wechselnde Zustände auf, in denen die Leitfähigkeit 25%, 50% und 75% der maximalen Leitfähigkeit betrug, wobei man diese als “subconductance states” bezeichnet. Zusätzlich kommt es nach der Dissoziation des FKBP vom RyR zu einer erhöhten Offenwahrscheinlichkeit des Kanals, die auf seine gesteigerte Sensitivität gegenüber der Calcium-abhängigen Aktivierung zurückzuführen ist (Marx et al., 2000).

Hierbei führen sowohl FK-506 als auch Rapamycin durch ihre Bindung an das FKBP12 zu dessen Dissoziation vom RyR (Shoshan-Barmatz et al., 1998). Dass bei diesen Medikamenten keine wesentlichen Nebenwirkungen auf Herz und Skelettmuskeln beschrieben wurden, ist dadurch zu erklären, dass die Dosierung auf ein Maß beschränkt bleibt, das nur einen kleinen Anteil der FKBP bindet (Kaftan et al., 1996).

Die Züchtung von Mäusen , die kein FKBP12 exprimieren, resultiert darin, dass die Tiere zwar phänotypisch unauffällige Skelettmuskeln besitzen, aber an schwerer dilatativer Kardiomyopathie leiden. Für die Regulation des kardialen RyR spielt daher das FKBP12.6 eine essentielle Rolle. Die RyR beider Muskeltypen zeigen lang dauernde Subconductance-States (Shou e al., 1998). Die Physiologische Bedeutung des FKBP12.6 liegt daher darin, durch die Stabilisierung des geschlossenen Zustandes des RyR Typ 2 den Calciumausstrom während der Diastole zu verhindern und in der Systole zu erhöhen und dadurch die Muskelverkürzung zu steigern (Prestle et al., 2001). Außerdem konnte festgestellt werden, dass das FKBP12.6 die Aktivität der RyRen

untereinander koordiniert (Marx et al., 2001).

Die Bedeutung des FKBP im Zusammenhang mit der Kardiomyopathie wird unter dem Punkt 1.3.6.2.1. abgehandelt.

1.3.5.5.2. Intraluminale modulatorische Proteine (Calsequestrin und Calreticulin)

Calretikulin und Calsequestrin sind strukturell verwandt und vermögen bis zu 40 Mol Calcium pro Mol Protein über ihre sauren Aminosäuren zu binden, wobei sie große Konformationsänderungen eingehen (Mackrill, 1999). Sie befinden sich im Lumen des ER/SR und nehmen dort die Rolle des dynamischen Calciumspeichers wahr (Shoshan-Barmatz et al., 1998).

1.3.6. Pathologische Veränderungen des RyR

Bekannte Mutationen des RyR Typ1 führen zu maligner Hyperthermie und Central Core Disease. Inzwischen sind auch Mutationen erfasst für den RyR Typ 2 , und es besteht ein Zusammenhang zwischen hyperphosphorylierten RyR Typ 2 und Herzversagen (Sorrentino et al., 2000).

1.3.6.1.Maligne Hyperthermie und Central Core Disease

Sowohl beim Menschen als auch bei Tieren spielen Mutationen des Gens für den RyR Typ 1 eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Krankheiten.

Beim Menschen sind verschiedene Mutationen bekannt, die Central Core Disease und maligne Hyperthermie verursachen.

Das Krankheitsbild der malignen Hyperthermie, das durch bestimmte Anästhetika bei den

Betroffenen ausgelöst wird, ist charakterisiert durch tonische Muskelkontraktionen und hohes Fieber, gefolgt von Multiorganversagen (Nelson, 2002). Die Therapie besteht in der Gabe von Dantrolen (Shoshan-Barmatz et al., 1998), das den Calciumeinstrom durch den RyR1 (und RyR Typ 3) inhibiert (Zhao et al., 2001).

Central Core disease ist eine seltene beim Menschen vorkommende Myopathief orm, die der malignen Hyperthermie verwandt ist und durch eine abnorme Histologie der quergestreiften Muskulatur gekennzeichnet ist (Shoshan-Barmatz et al., 1998).

1.3.6.2. Kardiale Krankheiten

1.3.6.2.1. Herzinsuffizienz

FKBP stabilisieren die Kanalfunktion (Brillantes et al., 1994) und ermöglichen eine unter benachbarten RyR koordinierte Aktivität der Kanäle (Marx et al., 1998). Die Phosphorylierung des kardialen RyR führt zur Dissoziation der FKBP12.6 vom Kanal. Dies resultiert in einer Veränderung der Kanalaktivität, so dass es zu einer erhöhten Offenwahrscheinlichkeit, einer Destabilisierung des Kanals und somit zum Auftreten von subconductance-states und einer gesteigerten Sensitivität gegenüber calciuminduzierter Aktivierung kommt. Daher können in diesem Zustand bereits zytosolische Calciumkonzentrationen zur Aktivierung des Kanals ausreichen. Dieser pathologische Einstrom aus dem SR führt zu einer Erniedrigung des Calciumgehalts des SR und des maximal möglichen Calciumeinstroms (peak Ca^{2+} release) und zu einer Zunahme des diastolischen Calciumeinstroms, der Herzrhythmusstörungen auslösen kann (Marks , 2000).

Während normalerweise in der Zelle die Phosphorylierung der RyR physiologisch reguliert wird, werden die Kanäle bei Herzversagen durch die PKA hyperphosphoryliert. Dies ist darauf zurückzuführen, dass es beim Herzversagen zu einer gesteigerten Sympathikusaktivierung kommt, so dass die Katecholaminspiegel im Blut erhöht sind und dadurch die adrenerge Signaltransduktion in Gang gesetzt wird, die eine verstärkte Entstehung von cAMP und somit die Aktivierung der PKA bewirkt, während außerdem der Gehalt an Proteinphosphatase 1 und 2, die normalerweise mit dem RyR Typ 2 assoziiert sind, erniedrigt ist (Marx et al., 2000). Diese Erkenntnisse könnten die Erklärung dafür liefern, warum Betablocker bei Herzinsuffizienz

erfolgreich eingesetzt werden (Marks, 2000).

Die abnehmende Wirkung von beta-adrenergen Agonisten auf die Kontraktilität von insuffizienten Herzen wurde zwar bisher der Downregulation und Desensitivierung der Beta-Rezeptoren zugeschrieben. Vermutlich beruht der fehlende Effekt aber darauf, dass die RyR Typ 2 schon hyperphosphoryliert sind und daher nicht mehr weiter phosphoryliert werden können (Marx et al., 2000).

Untersuchungen über eine mögliche Up- oder Downregulation von RyR bei Kardiomyopathie lieferten kontroverse Ergebnisse, in denen zwar bei unterschiedlich verursachten Herzversagen unterschiedliche Veränderungen auf der Stufe der Bildung von mRNA, nicht aber von RyR-Proteinen selbst festgestellt wurden (Hasenfuß, 1998).

Eine veränderte Expression von intakten RyR hätte auch wahrscheinlich keine entscheidende Wirkung auf den Calciumeinstrom in die Zelle, da sie möglicherweise kompensiert werden könnte, wenn die vorhandenen RyR bei erhöhtem Calciumgehalt des SR eine gesteigerte Aktivität aufweisen (Diaz et al., 2000).

Allgemein gilt aber, dass es beim Herzversagen zu Veränderungen im Calciumhaushalt der Zelle gekommen ist (Lehnart et al., 1998).

Denn im Rahmen der Herzinsuffizienz ist nicht nur die Aktivität der RyR direkt betroffen, sondern es kommt vermutlich infolge der Downregulation der beta1-Rezeptoren im Myokard zu einer verminderten Bildung von cAMP, so dass dadurch die SERCA2 und somit auch der RyR eine verminderte Tätigkeit aufweisen (Movsesian, 1998).

Mittlerweile gibt es Ergebnisse, die zeigen, dass die Therapie der Herzinsuffizienz mit Betablockern deswegen erfolgreich sein könnte, weil sie die Struktur und Funktion des kardialen Ryanodinrezeptors wiederherstellen (Reiken et al., 2001), wodurch wiederum die Bedeutung des Ryanodinrezeptors beim Herzversagen dargestellt werden konnte.

Bei der Alkohol-bedingten Kardiomyopathie allerdings geht man von den Folgen des oxidativen Stresses aus und konnte auch dementsprechend eine Besserung durch die Überexpression des Enzyms Katalase zeigen (Zhang et al., 2003). Auch bei der Diabetes-induzierten Herzinsuffizienz konnte eine Dysfunktion des RyR Typ 2 beobachtet werden, die möglicherweise auf Disulfidbrücken zwischen den SH-Gruppen des Kanals zurückzuführen ist und durch Insulin verbessert werden konnte (Bidasee et al., 2003a,b,c).

1.3.6.2.2. Arrhythmien

Defekte im Mechanismus des Calciumeinstroms aus dem SR können aber nicht nur die Kontraktilität beeinträchtigen, sondern auch diastolische Depolarisationen (afterdepolarisations) verursachen, die ventrikuläre Arrhythmien auslösen können (Marks, 2000).

Zusätzlich können inappropriate Kanalaktivierungen und niedrige Calciumkonzentration zu verfrühten oder verspäteten Afterdepolarisationen beitragen und somit Arrhythmien bis hin zum plötzlichen Herztod auslösen (Marx et al., 2000).

Inzwischen sind diverse angeborene Herzrhythmusstörungen entdeckt worden, die mit Mutationen des Ryanodinrezeptors Typ 2 in Zusammenhang gebracht werden, wie z.B. die polymorphe ventrikuläre Arrhythmie (Bauce et al., 2002; Laitinen et al., 2001), die arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie Typ 2 (Tiso et al., 2001) und die katecholaminerge polymorphe ventrikuläre Tachykardie (Marks et al., 2002).

1.3.6.2.3. Ischämie

Kommt es im Rahmen einer Angina pectoris oder eines Myokardinfarktes zur gesteigerten anaeroben Glykolyse, fallen vermehrt Zwischenprodukte dieses Stoffwechselweges an. Dabei konnte mittels der Planar-Bilayer-Methode am isolierten RyR gezeigt werden, dass diese Intermediate, und zwar vor allem FDG (Fruktose-1,6-Diphosphat), den kardialen RyR aktivieren und somit eine entscheidende Rolle bei der Regulation des Kanals spielen. Diese Ergebnisse sind vor allem interessant vor dem Hintergrund, dass Glykolyseenzyme mit dem SR assoziiert sind und dass eine Inhibierung der Glykolyse zur Calciumüberladung führt, wenn es zur Akkumulation von Glykolyse-Intermediaten im Myokard kommt (Kermode et al., 1998).

Allerdings gibt es auch eine Arbeit, die in ischämiegeschädigten Herzmuskelzellen eine reduzierte Anzahl von RyR gefunden hat (Zucchi et al., 1994).

Inzwischen sind bereits erste pharmakologische Ansätze vorhanden, die im Falle einer Ischämie des Herzens durch Beeinflussung des Ryanodinrezeptors eine kardioprotektive Wirkung erwarten lassen (Saeki et al., 2002).

1.4. Die Bilayer-Methode

Versuche mit künstlichen Lipidmembranen sind seit den frühen 60iger Jahren möglich. Dabei wurden die Bilayer hauptsächlich als Modelle für biologische Membranen verwendet (Tien et al., 1991).

Diese Methode eignet sich prinzipiell dazu, die Funktion isolierter Proteine zu examinieren, denn mit der Planaren-Bilayer-Methode werden einzelne Kanalproteine in künstliche Lipidmembranen eingelagert und dann elektrophysiologisch untersucht (s. Methoden-Kapitel). Dies ist möglich, da ein Einzelkanalprotein ca. 10^6 Ionen pro Sekunde passieren lässt, und das ist genug Strom, um mit Hilfe von Verstärkern erfasst werden zu können.

Dabei sind Bilayer besonders dann von großem Nutzen, wenn die zu untersuchenden Kanäle an kleinen Vorsprüngen von Zellen, z.B. an Zilien, lokalisiert sind oder auf intrazellulären Membranen sitzen, wie z.B. der RyR (Ehrlich, 1992).

Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass die Proteinmoleküle in ein biochemisch definiertes System eingefügt werden, so dass die biophysikalischen Proportionen und auch die Einflüsse einzelner Substanzen untersucht werden können, ohne dass die komplexen Vorgänge in der Zelle durch Interferenzen die Kausalzusammenhänge verdunkeln.

Außerdem können die Versuchsbedingungen sowohl auf der Cis- als auch auf der Transseite des Kanalproteins der jeweiligen Fragestellung angepasst werden. Zudem kann der Effekt von Mutationen konkret examiniert werden.

Die Nachteile allerdings bestehen nicht nur in elektrischen Störgeräuschen und Artefakten, sondern auch darin, dass die Bilayer-Formation und auch die Inkorporation des Kanals nicht vollständig kontrolliert werden können und somit gewisse Hürden bei jedem Experiment darstellen (Favre et al., 1999).

Ein weiterer Nachteil ergibt sich durch die teilweise schlechte Reproduzierbarkeit, da möglicherweise eine Lage von Lösungsbestandteilen direkt vor dem Bilayer nicht einmal durch den sich drehenden Magneten im Cis-Kompartiment bewegt wird, die Fläche der Bilayer variiert, die Form der Kompartimente bei unterschiedlichen Arbeitsgruppen verschieden ist und nicht zuletzt aufgrund der mangelnden Stabilität, wobei die Lipidmembran bei jedem einzelnen Schritt des Versuchs, wie z.B. bei der Fusion der Proteine mit dem Bilayer, der Perfusion mit der Pufferlösung oder der Zugabe von Substanzen, wie eine Seifenblase zerplatzen kann.

Der Kritikpunkt, dass sich die Proteine im Bilayerexperiment in einem völlig unphysiologischen Umfeld befinden, konnte insofern entkräftet werden, als mittels Patch-Clamp-Versuchen gezeigt werden konnte, dass die Daten aus Untersuchungen mit dem Bilayer den Verhältnissen in vivo sowohl qualitativ als auch z.T. quantitativ entsprechen (Mirzabekov et al., 1999).

Daher bleibt das Hauptproblem der Bilayermethode die Instabilität und begrenzte Haltbarkeit der Lipidmembranen (Krysinki et al., 1999).

1.5. Das Reagenz MTSEA⁺ (2-Aminoethyl-Methanethiosulfonat)

Ryanodinrezeptoren enthalten 80 - 100 Cysteinreste in jeder der vier Untereinheiten, von denen ungefähr 25 % kovalent modifiziert werden können durch exogene Reagenzien, während die restlichen Cysteinreste Disulfide innerhalb des Proteins ausbilden (Dulhunty et al., 2000).

Untersuchungen mit verschiedenen Sulfhydrylreagenzien weisen darauf hin, dass entscheidende Sulfhydrylgruppen des RyR oxidiert und reduziert werden können und dabei eine wichtige Rolle spielen für die Regulation des Kanals (Shoshan-Barmatz et al., 1998). Dabei entstanden bei dem Versuch, die ausschlaggebenden Thiolgruppen des Kanals zu lokalisieren, bei deren Oxidation es zur Aktivierung oder zur Inaktivierung des RyR kommt, zwei Modelle. Der Unterschied zwischen beiden liegt vor allem darin, dass die SH-Gruppe, deren Oxidation zur Aktivierung führt ist, in einem Modell lumenständig, im anderen dagegen fern von der Pore angesiedelt wird, so dass die Frage offen bleibt, ob es zu einer direkten Beeinflussung kommt oder ob allosterische Effekte eine Rolle spielen (Eager et al., 1999).

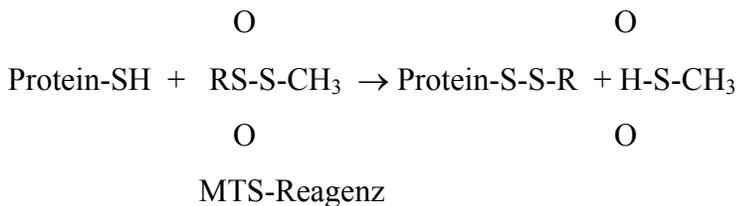
Sowohl endogene (Glutathion, H₂O₂, reaktive Sauerstoffverbindungen) als auch exogene pharmakologische Oxidantien aktivieren den RyR des Skelettmuskels (Mackrill, 1999). Dabei gibt es ein interessantes Modell von Abramson und Salama (1988, 1989), nach dem drei Thiolgruppen pro Untereinheit abwechselnd oxidiert und reduziert werden beim Übergang vom geschlossenen Zustand zum offenen und wieder zurück zum geschlossenen Zustand (Suzuki et al., 1999).

Diese Oxidationsvorgänge sind von physiologischer Bedeutung, da im sich kontrahierenden Muskel reaktive Sauerstoffverbindungen und reaktive Stickstoffverbindungen gebildet werden. Die S-Nitrosylierung des kardialen RyR kann endogen geschehen, bei einer S-Nitrosylierung

von bis zu 12 SH-Gruppen des RyR kommt es zu einer Aktivierung des Kanals.

Allerdings liegen die Sulfhydrylgruppen wahrscheinlich in vivo meist in reduzierter Form vor, da Zellen Thiol-reduzierende Substanzen enthalten, wobei Glutathion überwiegt (Xu et al., 1998).

Die Methanethiosulfonate reagieren mit den Thiolgruppen der Proteine:



Reagiert das MTSEA⁺ mit den Thiolgruppen von Cysteinresten des RyR, dann werden je nach Lage dieser Reste die biophysikalischen Eigenschaften des Kanals verändert, die mittels elektrophysiologischer Messungen festgestellt werden können (www.trc-canada.com).

Das MTSEA⁺ ist besonders geeignet für diese Experimente, da es zum einen hydrophil ist und zum anderen spezifisch mit Cysteinresten reagiert. Deshalb wird es seit einiger Zeit verwendet, um die mit Wasser gefüllte Pore von Ionenkanälen zu untersuchen (Quinn et al., 1997). In der All-trans-Konfiguration entspricht die Form des MTSEA⁺- Moleküls einem Zylinder mit einem Durchmesser von 6 Å und einer Länge von 10 Å (Karlin et al., 1998), so dass es vermutlich exakt durch den RyR passt, dessen cis-seitige Öffnung einen Durchmesser von 25 Å und dessen transseitige Apertur einen Durchmesser von 6 Å besitzt (Quinn et al., 1997).

Die Wirkung von MTSEA⁺ auf den RyR des Skelettmuskel wurde daher von Quinn et al. (1997) examiniert. Dabei stellte sich heraus, dass der Kanal nur auf MTSEA⁺ ansprach, wenn es der Cis-Seite des offenen RyR zugegeben wurde, wobei es zunächst zu einer reversiblen Aktivierung führte. Außerdem kam es zu einer schrittweisen Reduktion der Amplitude, die Zeitabstände aber zwischen den einzelnen Schritten nahmen dabei zu, so dass man davon ausgehen muss, dass die Entstehung dieser Modifikationsstufen nicht unabhängig voneinander geschieht. Es wurde auch ein neutrales Methanethiosulfonat (MTS) verwendet, das jedoch einen geringeren Effekt hatte, vermutlich aufgrund von negativen Ladungen, die die Pore des RyR säumen (Quinn et al., 1997). Wie bereits unter dem Punkt 1.3.6.2.1 erwähnt spielen die SH-Gruppen des Kanals und die Ausbildung von Disulfidgruppen auch bei pathologischen Veränderungen des Herzmuskels, wie beispielsweise beim Diabetes mellitus, eine Rolle (Bidasee et al., 2003 a,b,c).

1.6. Die Zielsetzung der Doktorarbeit

Zunächst wurde versucht, ein Protokoll zur Herstellung von SR-Vesikeln aus Herzen gesunder Mäuse zu entwickeln, da in der Literatur noch keine Versuche mit kardialen murinen RyR in Bilayern beschrieben sind.

Dann wurden mit diesen Vesikeln erst die biophysikalischen Eigenschaften des RyR Typ 2 der Mäuseherzen untersucht, um dann Versuche, die Hinweise zur Struktur des RyR Typ 1 gegeben hatten, mit dem kardialen RyR durchzuführen und zu erweitern.

1.6.1. Die Entwicklung von SR-Vesikeln aus Herzen gesunder Mäuse

Im Herzen findet sich vor allem der RyR Typ 2, der sich in einigen funktionellen Eigenschaften vom RyR Typ 1 unterscheidet (vergleiche Punkte 3.2 bis 3.5). Bisher sind in der Literatur mehrheitlich Untersuchungen zum Skelettmuskeltyp des RyR (RyR Typ1) zu finden.

Da inzwischen aber bekannt ist, dass der RyR Typ 2 eine entscheidende Rolle beim chronischen Herzversagen spielt (Marx et al., 2000), ist es wichtig, ein stabiles Präparat des kardialen RyR für Untersuchungen mit der Bilayermethode zur Verfügung zu haben, wobei allerdings gerade der Typ 2 dieses Calciumkanals die Bilayer in höherem Maße destabilisiert, als dies beim Skelettmuskeltyp des RyR der Fall ist (Coronado et al., 1992).

Denn mit der Bilayermethode können zum Einen gezielte Untersuchungen zur Struktur des RyR Typ 2 gemacht werden, zum Anderen könnten aber auch eventuell Medikamente entwickelt werden, die gezielt den Kanal beeinflussen.

Bisher ist in der Literatur noch kein Bilayerversuch mit einem RyR-Präparat aus murinen Herzen beschrieben, der sich aber geradezu anbietet, da mit Hilfe von Knockoutmäusen konkret Untersuchungen zur Struktur des Kanals und zum Thema der Herzinsuffizienz gemacht werden könnten.

1.6.2. Die Versuche mit der Bilayermethode

1.6.2.1. Die Technik der Bilayermethode

Bei dieser Methode wird ein Protein, in diesem Fall der Ryanodinrezeptor-Calciumkanal, mit einer künstlichen Membran fusioniert. Diese Membran wird von zwei Schichten von Phospholipiden gebildet und daher als Bilayer bezeichnet. Sie trennt zwei Kompartimente voneinander, in denen sich je nach Versuchsplan bestimmte Lösungen befinden, die nur durch das Kanalprotein miteinander in Verbindung stehen. Bewegen sich nun Ionen durch den Kanal, so kann mit Hilfe von Elektroden auf beiden Seiten der Membran ein Strom gemessen werden. Daher werden mit dieser Methode die biophysikalischen Eigenschaften von Ionenkanälen untersucht.

1.6.2.2. Die biophysikalischen Eigenschaften des RyR Typ 2

Zunächst sollte nicht nur mit Hilfe des Westernblottings gezeigt werden, dass der RyR Typ 2 in den entwickelten SR-Vesikeln enthalten war, sondern es galt zu zeigen, dass das Protein auch seine Funktion beibehalten hatte im Zuge der Herstellung des Präparates, und zu untersuchen, ob sich der kardiale RyR von denen anderer Säugetiere unterscheidet.

Daher wurden mit zwei verschiedenen Ladungsträgern, nämlich Barium und Cäsium, die Strom-Spannungskurven und die Calciumkurven des RyR erstellt und die mittleren Offenzeiten und Offenwahrscheinlichkeiten gemessen.

Bisher deuten Untersuchungen darauf hin, dass der Anteil des RyR, der die Kanalfunktion inne hat, bei den verschiedenen Isoformen konserviert ist und sich die unterschiedlichen Typen hauptsächlich durch die restliche Proteinstruktur unterscheiden (Sharma et al., 1998).

Da aber keine Übereinstimmung herrscht darüber, wie viele Poren der RyR enthält (Vergleiche Punkt 3.3) und daher auch nicht darüber, wie weit sich die Kanalstruktur über das Protein

erstreckt, sollten in dieser Arbeit schließlich die Untersuchungen mit dem Reagenz MTSEA⁺, die für den RyR Typ 1 Hinweise auf die Struktur gegeben hatten, am RyR Typ 2 durchgeführt werden.

2.Methoden und Materialien

2.1. Die Gewinnung von Ryanodinrezeptor-Calcium-Kanälen aus Herzen gesunder Mäuse

Vesikel aus den Membranen des Sarkoplasmatischen Retikulums (SR) wurden von Herzen gesunder Mäuse isoliert, indem die Methode von Borgatta et al. (1990) modifiziert wurde.

Die Herzen gesunder Mäuse wurden abgewogen und nach Zugabe der Pufferlösung im Verhältnis von einem Gramm Herzmasse zu 8 ml Pufferlösung mit Hilfe eines Polytronstabes (Brinkmann) und eines Potter-Homogenisators auf Eis homogenisiert.

Die verwendete Pufferlösung bestand aus 10mM Imidazol, 2mM Pefablock SC Plus, 2 mM PSC Protector-Lösung, 10 µM Trypsin-Inhibitor, 1 µM Pepstatin, 10 µM Leupeptin und 2 µM Aprotinin (pH 7,4 ; 4°C) und die einzelnen Bestandteile wurden von der Boehringer Mannheim GmbH bezogen.

Das Homogenisat wurde mit 2800 g für 20 Minuten zentrifugiert. Dabei wurden die Optima LE-80k Ultrazentrifuge von Beckmann und ein Beckmann 45 Ti Rotor benutzt.

Der resultierende Überstand wurde in einem Verhältnis von 1 : 1 mit dem oben genannten Puffer kombiniert und mit 6300 g für 15 Minuten zentrifugiert. Dieser Schritt wurde wiederholt, um mitochondriale Verunreinigungen zu entfernen (Favre et al., 1999).

Dann wurde wieder der Überstand mit den zugesetzten Proteaseinhibitoren zentrifugiert, und zwar bei 20 000 g für 120 Minuten.

Danach wurde das Sediment in einer Lösung vom vierfachen Volumen des Sediments resuspendiert, die sich aus 20 mM MOPS, 20 mM KCl und den oben erwähnten Proteaseinhibitoren zusammensetzte.

Dieses Homogenisat wurde mit 49 000 g für 30 Minuten zentrifugiert.

Das hierbei entstehende Sediment wurde im Verhältnis 1 Volumen Sediment zu 3 Volumina Pufferlösung aus 20 mM MOPS (3-(N-Morpholino-)Propansulfonsäure), 20 mM KCl und 20mM Sucrose (Sigma Chemicals) resuspendiert und bei - 80° Celsius in Portionen von 5 µl gefroren und in Eppendorf Tuben aufbewahrt.

2.2. Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Präparate

Die Bestimmung wurde nach Bradford mittels Reagenzien von Biorad durchgeführt.

Diese Methode beruht darauf, dass der Farbstoff Coomassie-Blau seine Farbe ändert, wenn er an basische und aromatische Aminosäuren bindet. Diese Farbänderung wird mit einem Photometer erfasst, wobei die Absorption bei 595 nm gemessen wird. Voraussetzung für die Konzentrationsmessung ist die Erstellung einer Eichkurve mit Hilfe von bekannten Proteinkonzentrationen. Danach kann die gesuchte Konzentration der zu analysierenden Proteinlösung anhand der gemessenen Absorption des zu untersuchenden Präparates und anhand der Eichkurve abgelesen werden. (www.discover.bio-rad.com)

2.3. Der Nachweis des Ryanodin Rezeptors mittels Western Blot

2.3.1. Die Vorbehandlung der Proteine

Die Proben mit den SR-Vesikeln wurden mit dem Probenpuffer in einem Verhältnis von 1 Volumen Probe und 7 Volumina Probenpuffer kombiniert und dann bei 95 °C 4 Minuten lang erhitzt.

Der Probenpuffer enthielt folgende Substanzen (Biorad) in 8 ml :

1 ml 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8

0,8 ml Glycerol

1,6 ml 10 % SDS

0,4 ml 2-Mercaptoethanol

0,4 ml 1% Bromphenolblau

3,8 ml destilliertes Wasser

Durch die Behandlung der Proteine mit SDS (Natrium-Lauroylsulfat, englisch: sodium dodecyl sulfate) ist bei der Elektrophorese nur noch die Masse der Proteine ausschlaggebend und nicht mehr die Form oder die Ladung; denn SDS ist ein amphipathisches Detergens, das die Proteine

in ihre Untereinheiten zerlegt und sie denaturiert. Es bindet an die entfalteten Peptidketten und verleiht ihnen eine stark negative Ladung (Koolmann et al., 1998).

Die Proben wurden dann 5 Minuten lang zentrifugiert (Eppendorf Tischzentrifuge, 4500 rpm) und auf Eis gestellt.

2.3.2. Die Elektrophorese

Es wurde ein Tris-HCl-Ready-Gel mit einer Polyacrylamidkonzentration von 5 % von Biorad verwendet.

Das Gel wurde senkrecht in die Gelkammer geladen und die Kammer mit kalt gestelltem Laufpuffer (4°C) gefüllt.

Der Laufpuffer enthielt :

3,0 g/l Tris

14,4 g/l Glycin

1,0 g/l SDS

Dann wurden die Bahnen mit jeweils 20µl der Proben geladen.

Die Elektrophorese wurde mit 200 V und ca. 500 mA durchgeführt und nach 45 Minuten beendet bzw., wenn die Bromphenolbande am unteren Rand des Gels angelangt war.

2.3.3 Der Transfer

Während die Elektrophorese lief, wurden das Filterpapier, die Filterkissen und die PVDF-Membran im Transferpuffer eingeweicht.

Der Transferpuffer enthielt :

25 mM Tris

26 mM Glycin

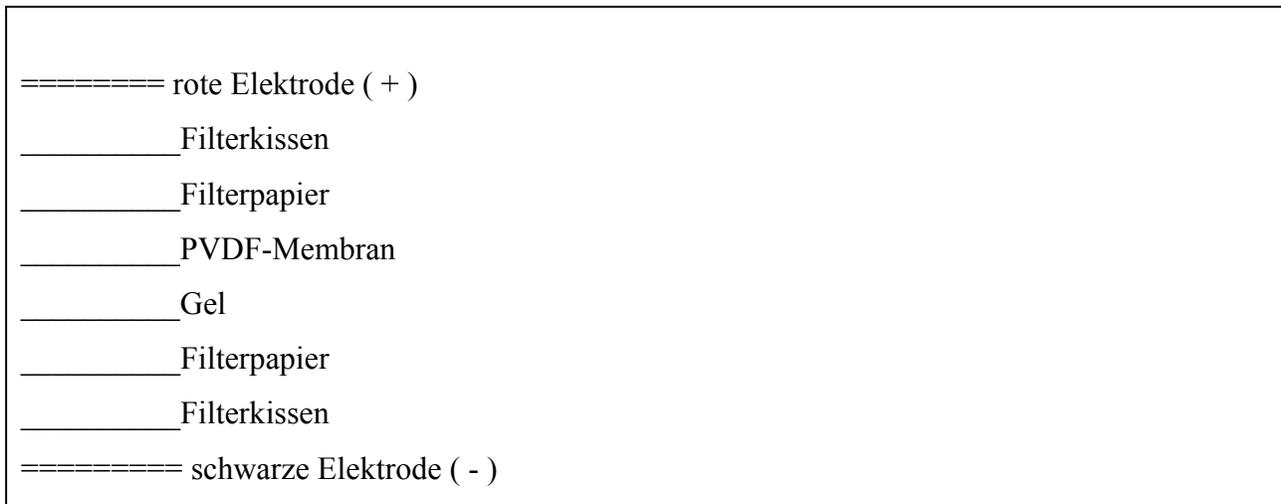
0,5 mM SDS

20 mM Methanol

Die PVDF-Membran (Biorad) allerdings musste vorher noch für einige Sekunden in 100%igem

Methanol getränkt werden.

Vor dem Transfer wurde auch das Gel in den Transferpuffer gegeben. Nachdem die verschiedenen Lagen aufeinander entsprechend dem Schema 1 angeordnet wurden, wurde das Transfersystem (Biorad) im Kühlraum gestartet und lief 1 Stunde lang bei 100 Volt, so dass die Proteine bei entsprechender Orientierung der Elektroden (s. Schema 1) vom Gel auf die PVDF-Membran übertragen wurden.



Schema 1.

Das Schema zeigt die Anordnung der verschiedenen Lagen während des Transfers.

2.3.4. Die Detektion der Proteine

Nach dem Transfer wurde die PVDF-Membran für eine Stunde in der Blockierlösung inkubiert, um eine unspezifische Bindung der Antikörper im folgenden Schritt zu vermeiden.

Die Blockierungslösung enthielt:

- 500 ml PBS
- 25 mg Milchpulver
- 5 mg BSA
- 0,25 mg Tween 20

Dann wurde der Blockierungspuffer verworfen und der Blot mit dem Erst-Antikörper, einem

polyklonalen Antikörper von Kanninchen gegen den RyR Typ2, eine Stunde lang inkubiert (Verdünnung 1 : 3000, verdünnt in Blockierungspuffer).

Anschließend wurde die Membran dreimal für jeweils 10 Minuten in PBS-Puffer gewaschen.

Der PBS-Puffer (pH 7,35) enthielt:

0,263 g/l NaH_2PO_4

1,15 g/l NaH_2PO_4

9,0 g/l NaCl

Als Zweit-Antikörper wurde ein Ziege-gegen-Kanninchen-HRP-Konjugat (Biorad, Verdünnung 1:2000) zugegeben und die Membran in Aluminiumfolie gewickelt, um den Marker des Zweit-Antikörpers vor Licht zu schützen.

An diesen Antikörper war ein Peroxidase-Marker gekoppelt, der mit den Lumi-GLO-chemilumineszierenden Substraten (Kirkegaard & Perry Laboratories) reagierte, die appliziert wurden.

Nach einer Stunde folgten weitere drei Spülgänge.

Bei der Reaktion des Peroxidase-Markers mit diesen Substraten entstand ein Produkt, das Licht emittierte; und dieses Licht wurde zur Belichtung eines Films genutzt. Die Belichtung (fünf Minuten) und Entwicklung des Films erfolgten in der Dunkelkammer. Auf diese Weise kann durch die Lichtemission des markierten Zweit-Antikörpers, der an den Erst-Antikörper gebunden hat, der gesuchte RyR Typ 2 aufgezeigt werden.

2.4. Die Bilayer Technik

Bei dieser Technik wird ein Transportprotein in eine künstliche Lipidmembran eingefügt und elektrophysiologisch der Ionenfluss durch diesen Kanal gemessen.

Dadurch ist es möglich, die grundlegenden Eigenschaften von Ionenkanälen ohne interferierenden Einflüssen der komplexen Geschehnisse in der Zelle zu untersuchen.

2.4.1. Die Grundausrüstung

Als Grundausrüstung benötigt man ein System aus zwei Teflon-Kompartimenten (sog. Cup-and-Chamber-System), ein Oszilloskop, um den Stromfluss beobachten zu können, einen Faraday-Käfig, einen Vibrations-Isolationstisch, einen Stimulator, um das Haltepotential einstellen zu können, einen „Stirrer“ (s.u.) und einen Videorekorder zur Aufzeichnung der Kanalaktivität. Zusätzlich kann man ein Mikroskop verwenden, um die Codierung des Lochs im Tefloncup und das Bilayer zu begutachten.

Der Faraday-Käfig dient dabei der Isolierung der Elektroden und des Bilayers im Cup-and-Chamber-System gegenüber elektromagnetischen Störungen, die verschiedene Quellen haben können. Zu diesen zählen elektrisches Licht, Stromkabel und andere elektrische Geräte. Der Käfig, der für diese Arbeit verwendet wurde, besteht aus einem Aluminiumdrahtmaschenwerk und war zusätzlich auf einem Vibrationsisolationstisch (Newport Corp., CA) angebracht, um mechanische Störungen zu vermeiden.

Außerdem sind Lipide, Proteinvesikel, Verstärker, ein Transfersystem zu einem PC und eine geeignete Software für die Auswertung der Kanalaktivität wichtige Komponenten der Versuchsausrüstung. Damit die Lösungen der Kompartimente gleichmäßig vermengt werden können, muss das Cup-and-Chamber-System auf einer Metallbox platziert werden, unter der sich ein Magnet befindet, der mittels eines kleinen Rotors (125 rpm) ein kleines Magnetstäbchen bewegt, das sich in dem Kammersystem befindet, so die darin befindliche Lösung umrührt und daher als sog. „Stirrer“ bezeichnet wird.

2.4.2. Das „Cup-and-Chamber“-System

Bei den Versuchen dieser Arbeit wurde ein zylinderförmiger Teflonbehälter (sog. Cup) mit einem Durchmesser von 8 mm und einer Höhe von 12 mm verwendet, der auf halber Höhe eine Apertur mit einem Durchmesser von 200 μm besitzt. Die optimale Größe des Lochs wird dabei für die jeweiligen Versuche empirisch ermittelt. Denn eine große Öffnung liefert dünne Membranen mit großen elektrischen Störgeräuschen, die auch mechanisch sehr fragil sind, während ein kleines

Loch mit einem dicken Bilayer die Fusion der Proteine mit der Lipidmembran erschwert.

Dieses Tefloncup wird fest in den einen Kreis einer Achterfigur eingefügt, die aus einem Plastikblock aus Delrin ausgestanzt ist, und bildet das Trans-Kompartiment. Der zweite Kreis der Acht stellt das zweite Kompartiment dar und wird als Cis-Kompartiment bzw. Chamber bezeichnet. Das Loch im Cup ist die einzige Verbindung zwischen den beiden Kompartimenten. Der Plastikblock enthält außerdem Einlassungen für die Elektroden. Cup und Chamber wurden von Warner Instrument Corporation bezogen (Darstellung 3).



Darstellung 3.

Hier sind zwei Cup-und-Chamber-Systeme von Warner Instruments zu sehen (www.warnerinstruments.com). In die hintere Öffnung des schwarzen Delrinblocks wird ein passender weisser Teflonbecher eingefügt. Dieser besitzt ein Loch mit einem Durchmesser von 200 μm , das als Verbindung zum Cis-Kompartiment fungiert. Vorne am Delrinblock ist ein Fenster angebracht. Ausserdem sind die sog. Stirrer abgebildet und die Agarbrücken.

Die beiden Kompartimente, die durch die Teflonbarriere getrennt werden, sind folgendermaßen als *Cis*- und *Trans*-Kompartimente definiert. Das *Cis*-Kompartiment steht über 3M KCl-Agarbrücken mit einer 3M KCl-Lösung in Verbindung, die über eine Ag/AgCl-Elektrode mit einem Spannungsgenerator in Kontakt steht, so dass eine bestimmte Spannung am Bilayer angelegt werden kann. Das *Trans*-Kompartiment wird über Agarbrücken und Silberelektroden mit dem Input eines Strom messenden Verstärkers (Strom-Spannungs-Umwandler) verknüpft. Das Output dieses Verstärkers kann mittels eines Oszilloskops erfasst werden.

Der positive Strom ist folgendermaßen definiert: Befindet sich im *Cis*-Kompartiment die höhere Konzentration an Kationen und wurde ein kationenselektiver Kanal in die Membran inkorporiert, dann wird der Strom, der bei 0 mV Haltespannung von *cis* nach *trans* fließt, als positiv bezeichnet (Labarca et al., 1992).

Um die Lösungen im Cis-Kompartiment auswechseln zu können, wurden zwei Schläuche mit Durchmessern von jeweils 2 mm mit Hilfe von Plastikringen in der Ciskammer befestigt. Zur

Perfusion wurde der eine der Schläuche an eine Spritze mit der neuen Lösung und der andere an eine leere Spritze angeschlossen. Dann wurde gleichzeitig die alte Lösung abgesaugt und die neue zugegeben, wobei darauf zu achten war, dass der Flüssigkeitspegel nicht unter die Apertur sank, damit die Membran intakt blieb.

2.4.3. Die Lipide

Es wurden 1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phospho-L-Serin (Natriumsalz), -Phosphocholin und -Phosphoethanolamin in einer Konzentration von 5mg/ ml Chloroform von Avanti Polar-Lipids, Inc., Alabaster, AL bezogen.

Die Lipide wurden in Chloroform bei -80 °Celsius aufbewahrt. Vor dem Gebrauch wurde das Chloroform entfernt, indem die Lipid-Chloroform-Mischung in einem Reagenzglas durch den Zustrom von Argongas getrocknet wurde. Danach wurden sie mit einer dekanhaltigen Lösung versetzt.

Dabei werden für die Kodierung des Teflonlochs 125µl Phosphatidylcholin und 25µl Phosphatidylserin zusammen getrocknet und in 25 µl Dekan gelöst (sog. Prepaint, s.u.), für die Lipidmembran dagegen 150µl Phosphatidylethanolamin und 50µl Phosphatidylserin, so dass das Prepaint 30 mg Lipide / ml Dekan und die Mischung für die Lipidmembran 60 mg Lipide / ml Dekan enthält. Das Phosphatidylserin hat sich insofern in der Mischung bewährt, als ein saures Lipid die Wahrscheinlichkeit der Fusion von Proteinen mit der Membran erhöht (Labarca et al., 1992).

2.4.4. Die Codierung

Bevor die Kompartimente mit den Salzlösungen aufgefüllt wurden, musste die Begrenzung der Apertur des Tefloncup mit dem sogenannten Prepaint kodiert werden, damit die Lipide, die den Bilayer bilden sollten, besser am Rand dieses Lochs hafteten und so die Stabilität des Systems

gewährleisteten.

Dazu wurde das Ende einer 50 μ l-fassenden Glaspipette mit dem Bunsenbrenner zugeschmolzen , damit mit dieser Pipette die Lipide auf das Teflonloch aufgetragen werden konnten.

Die Lipide wurden unter Sichtkontrolle mit dem Mikroskop (vier- bis zehnfache Vergrößerung) über das Loch gestrichen und bildeten zunächst einen Film über dem Loch, der allmählich trocknete und dann einen hydrophoben Ring bildete, der die Apertur umfasste. Das Trocknen dauerte in der Regel 10 Minuten, wobei der gesamte Vorgang ein- bis zweimal wiederholt wurde, bis die Kodierung vollständig war.

Der Lipidring wird als Prepaint bezeichnet und bildete die Fassung für die Lipidmembran bzw. für das Bilayer.

2.4.5. Das Bilayer

Sobald das Prepainting beendet war, wurden die beiden Kompartimente jeweils mit für die anstehenden Versuche geeigneten Lösungen gefüllt, so dass die Apertur vollständig in der Flüssigkeit stand. Dabei sollten die Flüssigkeiten in beiden Kammern auf gleicher Höhe stehen, um das Vorwölben der Membran zu einer Seite hin zu vermeiden.

Nachdem die Lipide mittels der Glaspipette im Teflonloch deponiert wurden und dadurch die Apertur mit einer Fettschicht überzogen war, wurde die Schichtdicke der Lipide spontan dünner, bis schließlich ein Bilayer entstand, d.h., es bildeten sich zwei Lagen von Phospholipiden. Dieses Ausdünnen der Lipidmembran kann man mit dem Mikroskop und elektrisch mit Hilfe des Kapazitätstestes überprüfen. Die Kapazität ist direkt proportional zur Membranfläche (0,5 μ F/cm² bei der Lipid-Dekan-Mischung (Ehrlich, 1992)) und beträgt bei einer Aperturgröße von 200 μ m ca. 157 pF .

Betrachtet man diese Bilayer durch das Mikroskop, sind sie schwarz und reflektieren kaum Licht wegen der destruktiven Interferenz des reflektierten Lichts von den beiden Lipidmonolayern (Ehrlich, 1992). Daher werden sie auch oft black lipid membranes (BLM) (Müller, 1962) genannt.

Der Widerstand dieser Bilayer beträgt meist mehr als $10^8 \Omega \text{ cm}^2$ (Favre et al., 1999).

2.4.6. Die Salzlösungen im *Cis*-und *Trans* -Kompartiment

Es wurden verschiedene Lösungen verwendet, um sowohl Barium als auch Cäsium als Ladungsträger zu untersuchen. Die Reagenzien wurden von Sigma Chemical (St.Louis, MO) bezogen.

Calcium selbst, das ja der physiologische Ladungsträger im RyR ist, eignet sich nicht für die Versuche, da hohe Konzentrationen die Kanalaktivität beeinflussen bzw. inhibieren. Cäsium dagegen ist vor allem deshalb günstig, da es die in den Proteinvesikeln auch enthaltenen Kaliumkanäle hemmt und außerdem eine doppelt so große Leitfähigkeit wie Calcium besitzt und daher das Verhältnis von Signal zu Störgeräusch verbessert (Coronado et al., 1992).

a) Barium als Ladungsträger

Im *Cis*-Kompartiment, das in den Versuchsanordnungen dem Zytosol entsprechen soll, befinden sich 1,4 ml eines Puffers, der aus 250 mM Hepes- und 110 mM Trislösung zusammengesetzt ist und auf den pH von 7,35 titriert wurde.

Der Puffer im *Trans*-Kompartiment enthält 700 µl einer 250 mM Hepes- und 55 mM Bariumhydroxidlösung und wurde ebenso titriert, um den physiologischen pH von 7,35 zu erreichen.

b) Cäsium als Ladungsträger

Soll Cäsium der Ladungsträger sein, wird die *Cis*-Kammer mit 1,4 ml einer Lösung aus 250 mM Cäsiumhydroxid und 50 mM Trisma-Acetat (pH 7,35) gefüllt. Die *Trans* -Kammer enthält 50 mM Cäsiumhydroxid und 10mM Tris-Acatat und wird ebenfalls auf einen pH von 7,35 gebracht.

Bei diesen beiden Versuchsbedingungen strömen die Ladungsträger allerdings in unterschiedlichen Richtungen. Diese zeigt sich in der Richtung des Ausschlags am Oszilloskop. Die Bariumhydroxidlösung wurde ursprünglich in das *Trans*-Kompartiment gegeben, da es das

SR/ER mit seiner Calciumspeicherfunktion präsentieren soll. Weil im Weiteren die Ladungsträger variiert werden sollten, wurde die Lösung, die austauschbar sein sollte, in das *Cis*-Kompartiment pipettiert, da dieses einer Perfusion aus technischen Gründen besser zugänglich ist.

2.4.7. Fusion der Vesikel mit dem Bilayer

Nun werden 5 μl der SR-Vesikel, die eine Proteinkonzentration von ca. 25 $\mu\text{g/ml}$ besitzen, in das *Cis*-Kompartiment pipettiert. Dann muss aus unbekanntem Gründen die Lösung im Ciskompartiment durch das rotierende Magnetstäbchen in Bewegung gehalten werden, wenn es zur Inkorporation von Proteinen in die Lipidmembran kommen soll.

Um die Fusion der Vesikel mit dem Bilayer zu fördern, können verschiedene Maßnahmen ergriffen werden.

Zunächst wird die Fusion durch große Membranflächen begünstigt. Da das Hintergrundgeräusch durch elektrische Störungen jedoch direkt proportional zur Fläche des Bilayers ist (Ehrlich, 1992), muss hier ein Kompromiss getroffen werden.

Das Erhöhen der Calciumkonzentration auf 10 μM im *Cis*-Kompartiment steigert die Fusionsrate, weil zweifach geladene Kationen zur Bindung von Vesikeln an das Bilayer führen. Besteht zusätzlich ein osmotischer Gradient im System (s.u.), verursacht das Anschwellen der Vesikel eine Vergrößerung der Kontaktfläche und eine Interaktion der Vesikelmembran mit der Lipidmembran, so dass es zur Fusion der beiden kommt.

Außerdem ist ein osmotischer Gradient wichtig für die Vesikelfusion, wobei sich die Vesikel in der hyperosmolaren Lösung befinden sollten. Während der Gradient im oben beschriebenen Cäsiumsystem schon besteht, kann er im Bariumsystem durch drei- bis viermaliges Hinzufügen einer 3M KCl-Lösung erzeugt werden. Dabei ist zu erwähnen, dass diese Maßnahme bei natürlichen Vesikeln besser geeignet ist als bei aufgereinigten reinen RyR-Vesikeln, da zur Steigerung des intravesikulären Drucks Ionenkanäle benötigt werden, die die Kalium- und Chlorid-Ionen ins Innere der Vesikel lassen. Ohne diese würde es nämlich durch die 3M KCl-

Lösung zum Schrumpfen der Vesikel kommen (Cohen et al., 1993).

Ebenso nützlich ist die Sucroslösung, die dem Präparat bei seiner Herstellung (siehe 2.1.) beigelegt wird. Da die Vesikelwand impermeabel ist für Sucrose, schwellen die Vesikel in der Lösung des *Cis*-Kompartiments durch den Einstrom von Wasser an, wodurch die Fusion induziert wird.

Die Zusammensetzung der Lipidmischung aus den verschiedenen Phospholipiden ist auch bedeutsam für die Fusion, denn in reinen Phosphatidylcholin-Membranen kommt es nicht zur Fusion (Darszon, 1986). Die Anwesenheit von saurem Phosphatidylserin und von Phosphatidylethanolamin erhöht die Wahrscheinlichkeit einer Fusion (Favre et al., 1999).

Bei der Lipidmischung spielt auch die Anwesenheit eines Lösungsmittels eine Rolle, wobei es sich in den hier durchgeführten Versuchen um Dekan handelt. Dieses steigert die Inkorporation von Kanalproteinen in das Bilayer, indem sich "Dekan-Mikrolinsen" formieren, d.h. das Dekan separiert sich aus der Lipidmembran und bildet linsenförmige Tropfen von 1µm Durchmesser. Diese aggregieren sich um die Kontaktstelle der Vesikel und vergrößern somit den Berührungsbereich mit dem Bilayer (Cohen et al., 1993).

Auch das Anlegen von positiver und negativer Spannung in raschem Wechsel erhöht erfahrungsgemäß die Wahrscheinlichkeit einer Inkorporation der Vesikelmembran in das Bilayer (Herr Dr. Peter Koulen, im Gespräch).

Haben sich Kanalproteine in die Bilayermembran eingelagert, so ist dies an den charakteristischen Ausschlägen am Oszilloskop, an einer Änderung der Leitfähigkeit und an einem Anstieg des Stroms durch das Bilayer zu erkennen.

Der Nachteil der Bilayer-Technik ist, dass auch Defekte in der Lipidmembran oder Artefakte einen Ionenstrom durch einen Kanal vortäuschen können, so dass man mit dieser Methode nur Kanalproteine untersuchen sollte, die einen bekannten Agonisten oder Antagonisten besitzen, mit Hilfe dessen man die Fusion des Proteins mit der Membran überprüfen kann (Ehrlich, 1992).

2.4.8. Die Verstärker und Filter

Jedes Kompartiment des Bilayersystems steht mit einer Elektrode in Verbindung, wobei die eine mit einem Impuls-Generator verbunden ist, mit dem eine Spannung an das Bilayer angelegt werden kann, während die andere an einen Strom-Spannungs-Wandler angeschlossen ist, um den Strom zu verstärken und ihn mit Hilfe eines Oszillkops aufzuzeigen (Darszon, 1986).

Der Eingang (Input) aus der Bilayer-Klemme (headstage “bilayer clamp probe” von Warner Instrument Corporation) wird in den Verstärker “bilayer clamp BC-525C” (Warner Instrument Corporation, New Haven, CT) geleitet und von dort werden 10mV / pA in den “LPF-100 A Low Pass Bessel Filter” weitergegeben und passieren den Filter von 1000 Hz.

Dann gehen die Signale zwei Wege, zum einen gelangen sie durch den 500-Hz-Filter (npi “LPBF-48DG”) und werden am Bildschirm des Oszilloskops (Tektronix D11 single beam storage) aufgezeigt. Zum anderen werden sie in den digitalen Daten-Rekorder (Instrutech Corporation, “VR-10B CRC) gesendet und von dort ungefiltert mittels des Fetchex-Programms (pClamp Version 6.0.5) von Axon Instruments, Burlingame, CA, auf einen PC transferiert und gespeichert.

2.4.9. Die Auswertung mit pclamp 6.05 (Axon Instruments)

Nachdem die Daten vom Oszilloskop mit Hilfe des Fetchex-Teils des Programms pclamp 6.05 digitalisiert wurden, konnten die Kanalaktivitäten mit dem Fetchan-Teil ausgewertet und schließlich unter Verwendung von Pstat als Graphen dargestellt werden. Um die Amplituden des RyR mit der Software von Axon Instruments zu ermitteln, wurden Kanalöffnungen ausgeschlossen, die kürzer als 3 Millisekunden waren. Öffnungen des Calciumkanals sind in den Graphiken als Ausschläge nach unten dargestellt.

3. Ergebnisse

Nachdem das neue Präparat aus den Membranen des sarkoplasmatischen Retikulums von Herzen gesunder Mäuse entwickelt wurde, konnte es mit der Methode der SDS-Gelelektrophorese auf seinen Gehalt an Ryanodinrezeptor-Calciumkanälen vom Typ 2 untersucht werden. Dann folgten Experimente mit der Bilayermethode. Diese zeigten die biophysikalischen Eigenschaften des Kanals und gaben Hinweise auf die Struktur des kardialen Ryanodinrezeptors.

3.1. Der Nachweis des Ryanodinrezeptors Typ 2 mittels Westernblotting

Um zu prüfen, ob der kardiale Ryanodinrezeptor-Calciumkanal in den neu entwickelten Präparaten aus den Herzen gesunder Mäuse enthalten ist, wurde eine SDS-Gelelektrophorese mit den SR-Vesikeln durchgeführt. Die Vesikel wurden in Probenpuffer denaturiert und mittels SDS-PAGE in einem 5%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Der primäre Antikörper ist gegen den Ryanodinrezeptor-Calciumkanal Typ 2 gerichtet und detektiert mit Hilfe des Zweitantikörpers, der mit einem Peroxidasemarker versehen ist, eine Bande, die der molekularen Masse von ca. 500 - 600 kDa entspricht.

In der Abbildung 1 ist daher eine Bande bei ca. 550 kDa zu erkennen, so dass der Calciumkanal hiermit in den Vesikeln nachgewiesen werden konnte.

Daher konnte das neue Präparat verwendet werden, um die biophysikalischen Merkmale des Ryanodinrezeptor-Calciumkanals Typ 2 zu untersuchen.

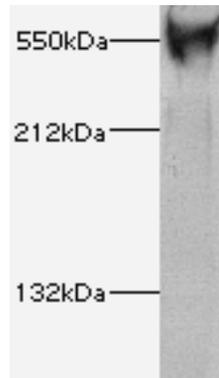


Abbildung 1.

In der Abbildung ist der Westernblot zu sehen, der bei ca. 550 kDa eine Bande aufweist, die durch die Bindung des Antikörpers gegen den Ryanodinrezeptor-Calciumkanal zustande kam und die Position des kardialen RyR in der Elektrophorese anzeigt. Der verwendete Marker zeigte die Banden von 212 kDa und 132 kDa an.

Da diese Gelelektrophorese allerdings nicht den Schluss zulässt, dass der in den Vesikeln enthaltene Kanal auch seine Funktion beibehalten hat im Zuge der Präparation, folgten als nächstes Bilayerexperimente, die die allgemeinen biophysikalischen Merkmale des Calciumkanals beleuchteten.

3.2. Die Leitfähigkeit des kardialen Ryanodinrezeptor-Calciumkanals

Der murine Ryanodinrezeptor-Calciumkanal Typ 2 konnte zunächst durch die Ermittlung der Leitfähigkeit mit der Bilayermethode charakterisiert werden. Dazu wurden unterschiedlich große Spannungen an das Bilayer mit dem inkorporierten Calciumkanal angelegt, um dann den Strom durch den Kanal zu messen, wobei der Quotient aus Strom und Spannung die Leitfähigkeit ergab.

a) Die Erhebung der Strom-Spannungskurve mit Barium als Ladungsträger

Für die Erstellung der Strom-Spannungskurve des Ryanodinrezeptors Typ 2 (Abb.2) wurden Einzelkanalmessungen unter verschieden großen Spannungen durchgeführt, wobei die unterschiedlichen Spannungsgrößen immer jeweils drei Minuten lang an die Membran angelegt wurden.

Dann wurden die gemessenen Stromamplituden als Funktion der jeweiligen Spannung aufgetragen, um den Graphen in Abbildung 2 zu erhalten.

Im Einzelnen betrug der Strom dabei $5,06 \pm 0,98$ pA bei 10 mV, $4,44 \pm 0,82$ pA bei 5 mV, $4,14 \pm 1,31$ pA bei 2,5 mV und $3,82 \pm 0,82$ pA, wenn keine Spannung angelegt wurde. Stellte man eine negative Spannung von - 5 mV ein, so wurde ein Strom von $3,33 \pm 0,90$ pA erfasst, und bei einer Spannung von - 10 mV konnten $2,68 \pm 0,80$ pA ermittelt werden.

Die Leitfähigkeit des Ryanodinrezeptors Typ 2 für Barium als Ladungsträger betrug daher $117,95 \pm 8,90$ pS ($n = 2$).

Dabei befand sich in der transeitigen Kammer des Bilayersystems eine 55 mM Bariumhydroxidlösung, während die Cis-Seite am Anfang des Experiments kein Barium beinhalten.

Aus der Form des Graphen ist ersichtlich, dass die Amplitude des kardialen Ryanodinrezeptor-Calciumkanals nicht spannungsabhängig ist, da sonst keine Gerade zu sehen wäre, sondern mit zunehmender Spannung die Amplitude überproportional ansteigen würde.

Das bedeutet, dass die Leitfähigkeit ein konstantes Merkmal des Ryanodinrezeptors darstellt und ihre Größe auch zu seiner Identifikation herangezogen werden kann. Denn wird während eines Versuches mit dem Oszilloskop die Aktivität eines Kanals festgestellt, gilt es bei der Verwendung von Präparaten, die nicht aufgereinigt wurden und verschiedene Arten von Proteinkanälen enthalten, den zu untersuchenden Kanal mittels unterschiedlicher Parameter zu identifizieren.

Strom-Spannungskurve des RyR Typ 2

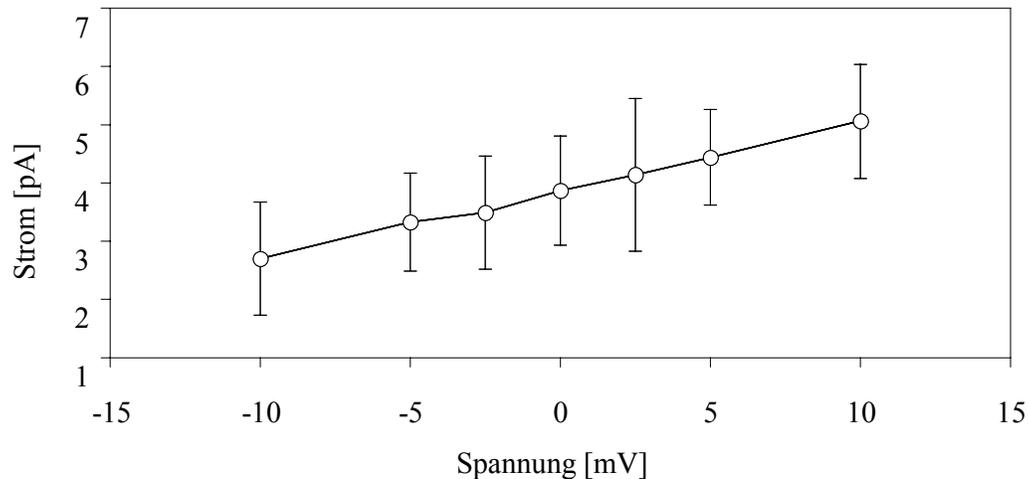


Abbildung 2.

Die Strom-Spannungs-Kurve des Ryanodinrezeptor-Calciumkanals Typ 2 aus Herzen gesunder Mäuse mit Barium als Ladungsträger.

Die Leitfähigkeit des Calciumkanals betrug in dem dargestellten Experiment $117,27$

$\pm 3,49$ pS.

Die folgenden Abbildungen zeigen Einzelkanalmessungen, Amplitudenhistogramme und Offenzeiten des Ryanodinrezeptors Typ 2, die unter verschiedenen Spannungen ermittelt wurden, um die Kurve in Abbildung 2 zu erlangen. Dabei wird deutlich, dass die Offenzeiten unverändert kurz zwischen ca. 4 bis 12 ms blieben, während die Amplituden erwartungsgemäß direkt proportional mit der angelegten Spannung anstiegen. Die Offenwahrscheinlichkeiten des Kanals schwankten zwischen 2 % und 16 % (absolute Offenwahrscheinlichkeit), wobei die Verteilung zufällig war.

Im Einzelnen wurden folgende Messungen erhoben:

Wurden 10 mV an die Lipidmembran angelegt, so konnte in dem repräsentativen Versuch ein Strom von $5,06 \pm 0,98$ pA gemessen werden (Abb. 3) und meist betrug die Offenzeiten vier bis sechs Millisekunden.

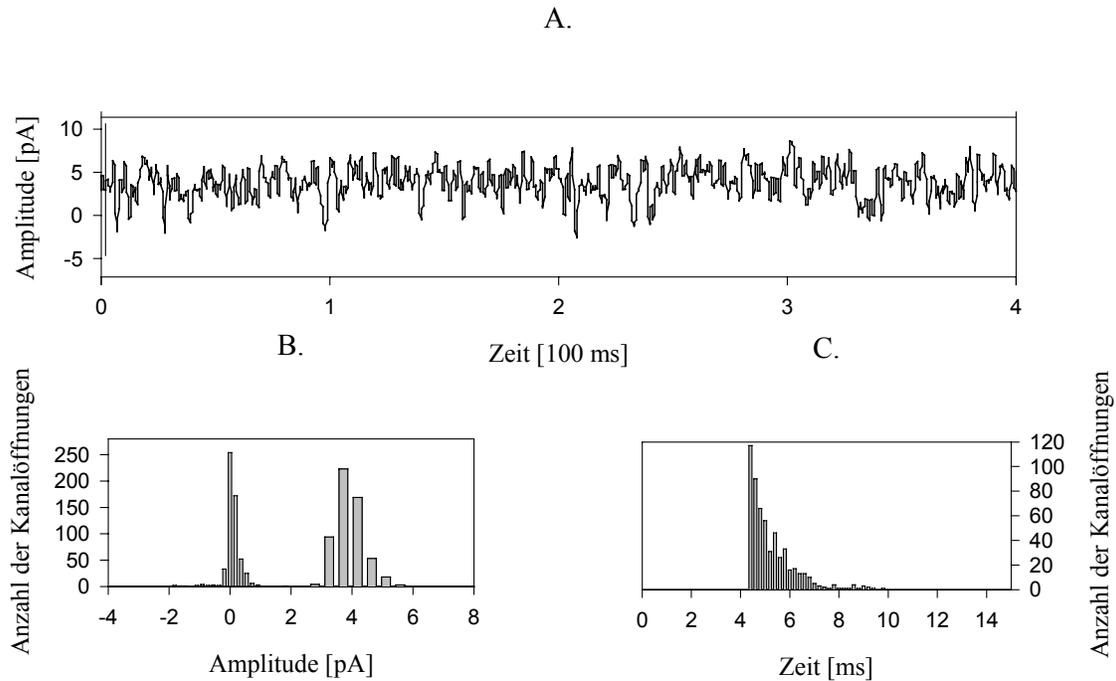


Abbildung 3.

Der Ryanodinrezeptor Typ 2 in planaren Bilayern mit Barium als Ladungsträger unter einer Spannung von 10mV

(A) Einzelkanalmessungen des RyR Typ 2

(B) Amplitudenhistogramm des RyR Typ 2

(C) Offenzeiten des RyR Typ 2

Die Messungen der Stromamplitude unter 5 mV ergaben $4,44 \pm 0,82$ pA (Abb.4). Auch hier dauerten die Offenzeiten des Kanals meist vier bis sechs Millisekunden, so dass sie scheinbar nicht von der angelegten Spannung beeinflusst wurden.

Auch die Offenwahrscheinlichkeit änderte sich, wie oben bereits erwähnt, nicht wesentlich.

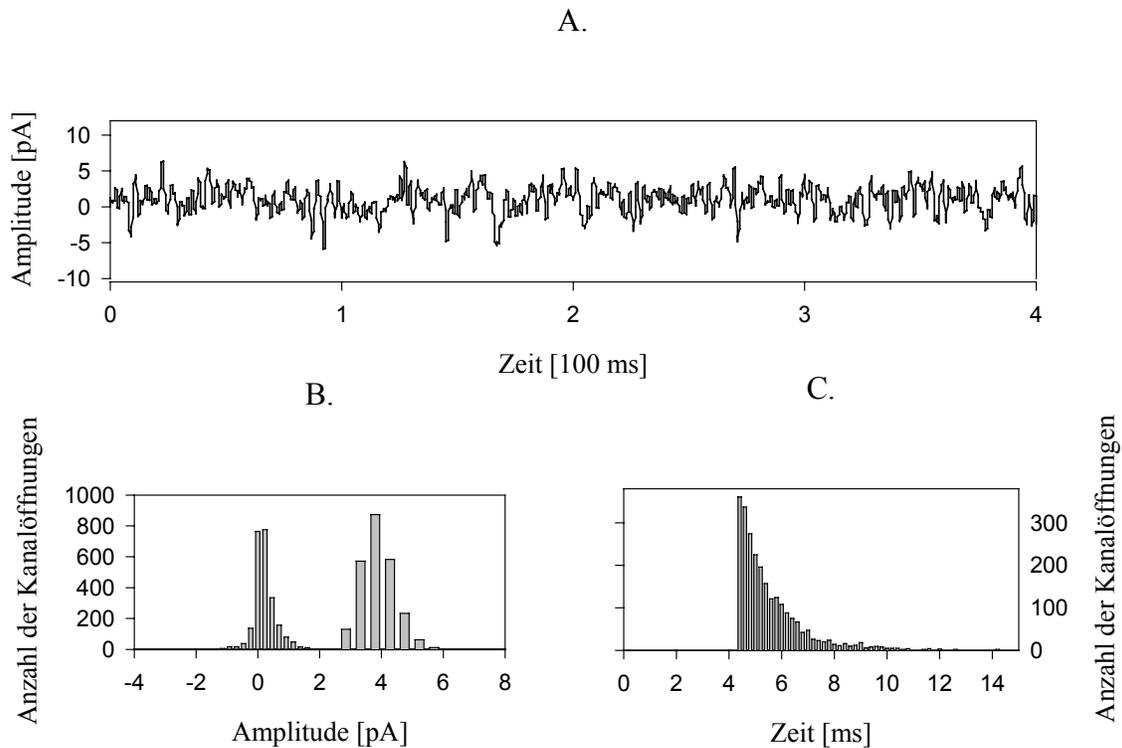


Abbildung 4.

Der Ryanodinrezeptor Typ 2 in planaren Bilayern mit Barium als Ladungsträger unter einer Spannung von 5mV

- (A) Einzelkanalmessungen des RyR Typ 2
- (B) Amplitudenhistogramm des RyR Typ 2
- (C) Offenzeiten des RyR Typ 2

Unter 2,5 mV floss ein Strom von $4,14 \pm 1,31$ pA (Abb.5). Wie auch in den zuvor durchgeführten Messungen änderten sich weder die Offenzeit noch die Offenwahrscheinlichkeit des Ryanodinrezeptors, sondern blieben relativ konstant bei den bekannten Werten. Da diese beiden Parameter charakteristisch sind für den RyR Typ 2, konnte man davon ausgehen, dass durch das Anlegen einer anderen Spannung von Versuch zu Versuch der Kanal nicht aus der Lipidmembran gelockert und durch einen anderen Ionenkanal ersetzt worden war, sondern stabil im Bilayer saß.

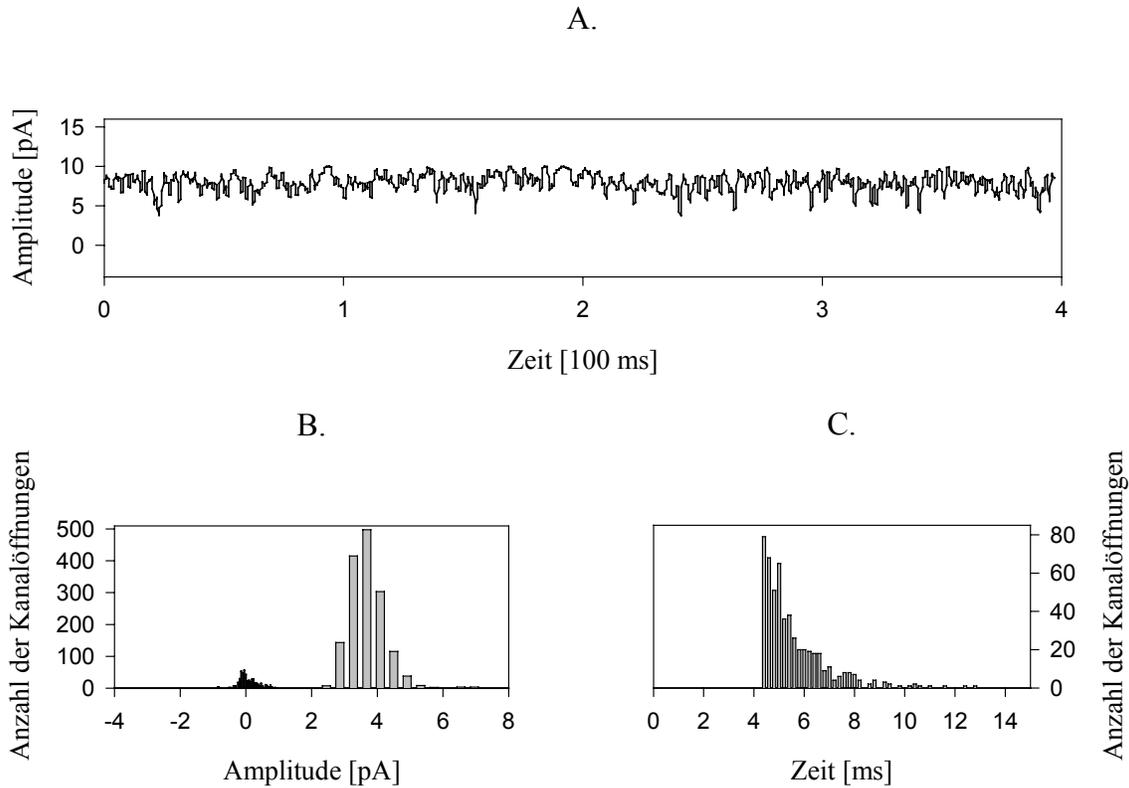


Abbildung 7.

Der Ryanodinrezeptor Typ 2 in planaren Bilayern mit Barium als Ladungsträger unter einer Spannung von - 5mV

- (A) Einzelkanalmessungen des RyR Typ 2
- (B) Amplitudenhistogramm
- (C) Offenzeiten des RyR Typ 2

Unter einer Spannung von - 10 mV wurden auch wieder Einzelkanalmessungen durchgeführt und es floss ein Strom von $2,68 \pm 0,80$ pA durch den Kanal (Abb.8). Auch hier verhielten sich Offenwahrscheinlichkeit und Offenzeit konstant und lieferten entsprechende Werte wie die Versuche unter den anderen Spannungen, d.h. die Offenzeiten bewegten sich am häufigsten zwischen vier und sechs Millisekunden und die Offenwahrscheinlichkeit betrug im Mittel 12%.

andererseits der Ryanodinrezeptor eine höhere Leitfähigkeit für Cäsium besitzt als für Calcium oder Natrium (Coronado et al., 1992).

Die Leitfähigkeit des Ryanodinrezeptors Typ 2 für Cäsiumionen betrug in den durchgeführten Versuchen durchschnittlich $528,28 \pm 11,43$ pS, wobei die Stromamplitude des Calciumkanals bei einer Spannung von 0 mV über dem Bilayer $-19,29 \pm 6,35$ pA groß war ($n = 4$). Dabei befand sich eine 250 mM Cäsiumchloridlösung im cisseiteigen Kompartiment des Bilayersystems, während die Konzentration auf der Transseite 50 mM betrug.

Zur Darstellung der Strom-Spannungskurve (Abb.9) bzw. der Leitfähigkeit des RyR Typ 2 wurden die jeweiligen Stromamplituden des Kanals unter der Anlage verschiedener Spannungen an das Bilayer mit dem inkorporierten Calciumkanal gemessen. Die Messdauer für eine Spannungsgröße betrug wieder mindestens drei Minuten.

Strom-Spannungskurve des Ryanodinrezeptors Typ 2

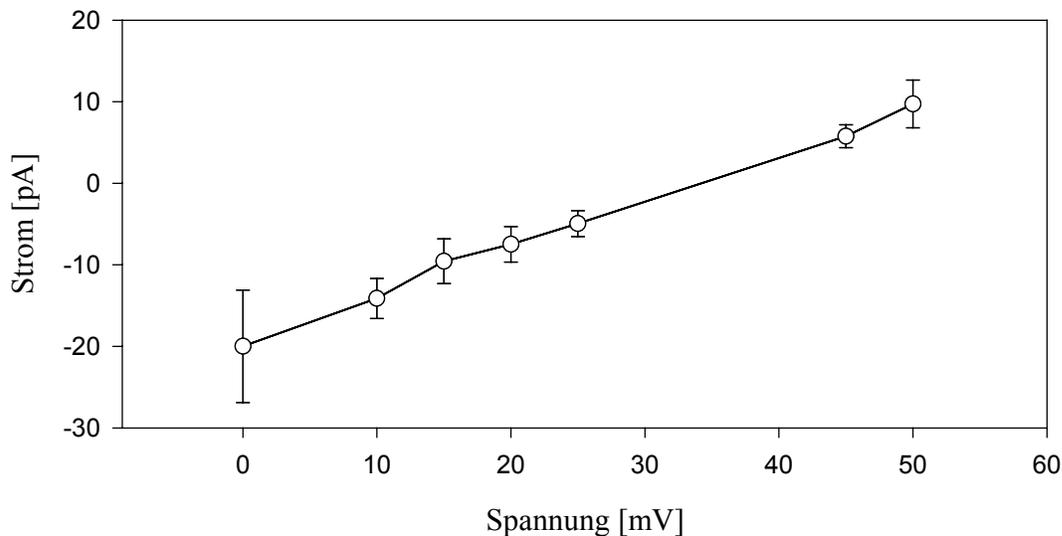


Abbildung 9

Strom - Spannungskurve des Ryanodinrezeptors Typ 2 mit Cäsium als Ladungsträger
Die Leitfähigkeit des Kanalproteins betrug in dem dargestellten Experiment $593,90 \pm 24,64$ pS.

Die folgenden Abbildungen zeigen Einzelkanalmessungen und die zugehörigen

Amplitudenhistogramme und Offenzeiten des Ryanodinrezeptors Typ 2, die unter verschiedenen Spannungen ermittelt wurden und so die Grundlage zur Darstellung der Strom-Spannungskurve und damit auch der Leitfähigkeit waren.

Wurde keine Spannung an die Membran mit dem Kanal angelegt, so betrug die Amplitude des erfassten Stroms - 19,99 +/- 6,89 pA (Abb.10).

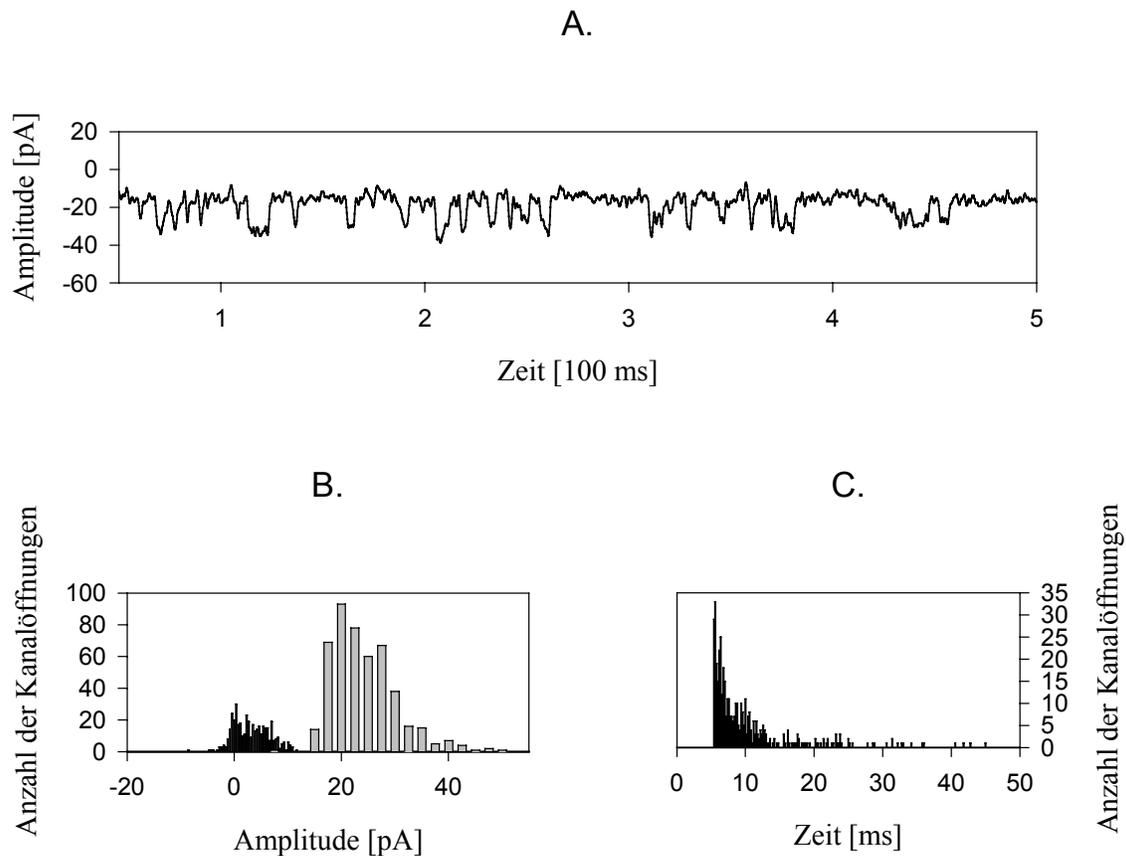


Abbildung 10.

Der Ryanodinrezeptor Typ 2 in planaren Bilayern mit Cäsium als Ladungsträger unter einer Spannung von 0 mV

- (A) Einzelkanalmessungen des RyR Typ 2
- (B) Amplitudenhistogramm des RyR Typ 2
- (C) Offenzeiten des RyR Typ 2

Unter einer Spannung von 10 mV floss ein Strom von $-14,12 \pm 2,46$ pA durch den Calciumkanal (Abb.11).

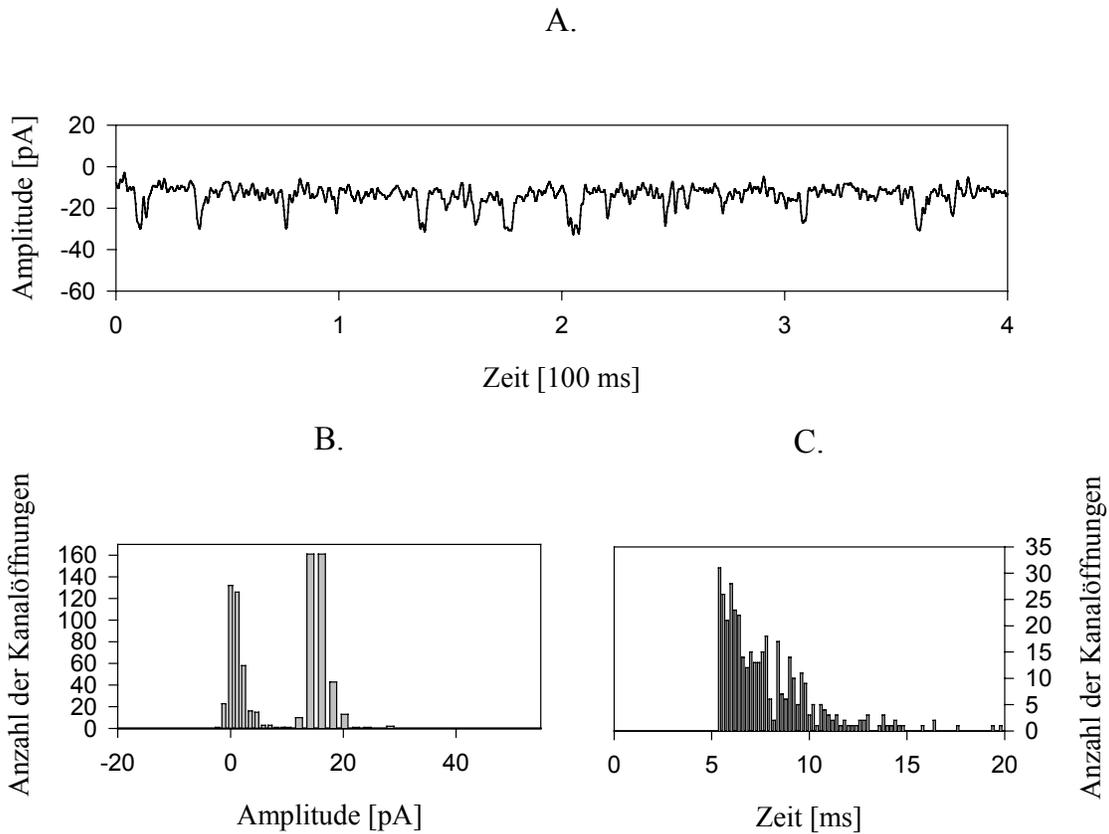


Abbildung 11.

Der Ryanodinrezeptor Typ 2 in planaren Bilayersystem mit Cäsium als Ladungsträger unter einer Spannung von 10 mV

- (A) Einzelkanalmessungen des RyR Typ 2
- (B) Amplitudenhistogramm des RyR Typ 2
- (C) Offenzeiten des RyR Typ 2

Wurde eine Spannung von 15 mV an das Bilayersystem angelegt, so betrug die Amplitude des gemessenen Stroms nur noch $-9,56 \pm 2,74$ pA (Abb.12).

Stand die Lipidmembran unter einer Spannung von 45 mV, so wurde eine Amplitude von + 5,77 +/- 1,41 pA ermittelt (Abb.15).

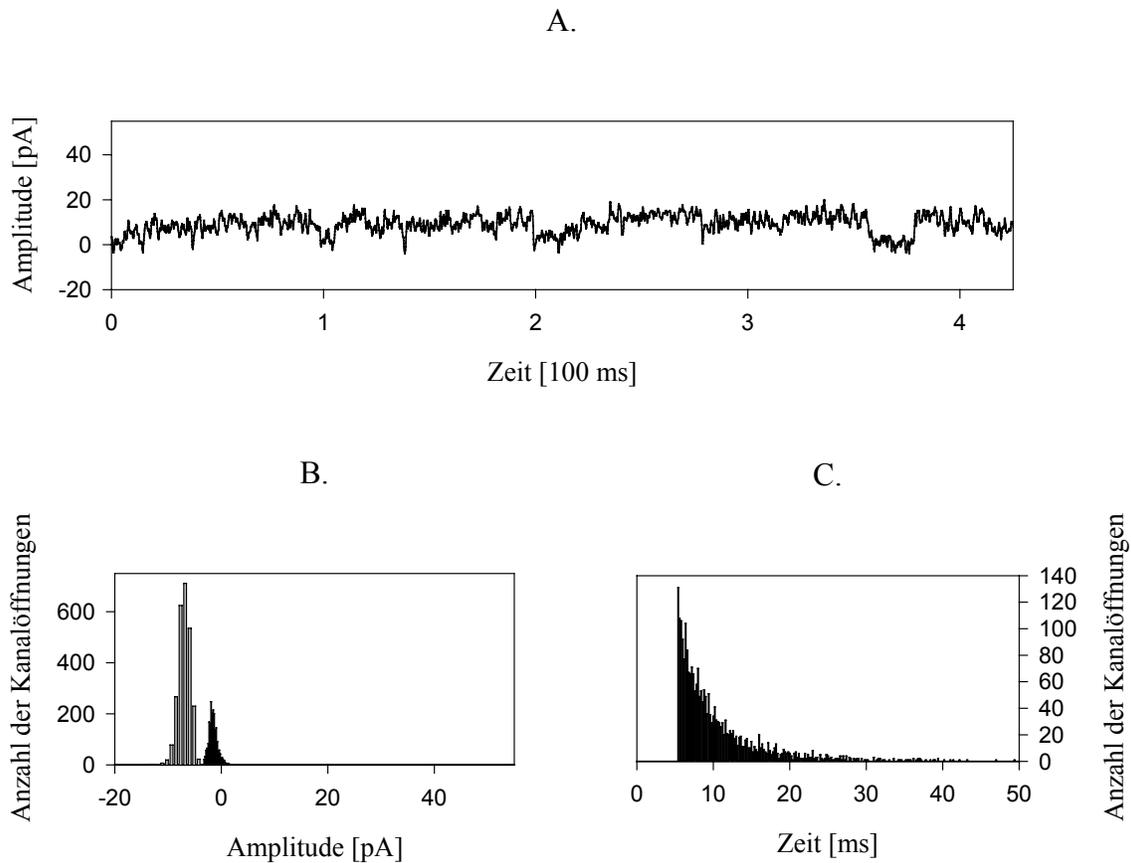


Abbildung 15.

Der Ryanodinrezeptor Typ 2 in planaren Bilayern mit Cäsium als Ladungsträger unter einer Spannung von 45 mV

- (A) Einzelkanalmessungen des RyR Typ 2
- (B) Amplitudenhistogramm des RyR Typ 2
- (C) Offenzeiten des RyR Typ 2

3.3. Die glockenförmige Calciumkurve des Ryanodinrezeptors Typ 2

Zur weiteren Charakterisierung des Ryanodinrezeptor-Calciumkanals wurde die Wirkung unterschiedlicher Calciumkonzentrationen auf die Aktivität des Kanals untersucht.

Daher wurden zur Darstellung dieser Abhängigkeit der Aktivität des kardialen Ryanodinrezeptor-Calciumkanals von der Konzentration freier Calciumionen auf der Cisseite des Kanals die unterschiedlichen Offenwahrscheinlichkeiten ($P(O)$) bei Calciumkonzentrationen zwischen 10mM (pCa 2) und 10 nM (pCa 8) bzw. 100 nM (pCa 7) bestimmt. Unter der Offenwahrscheinlichkeit versteht man den Anteil der Versuchszeit, während der der Kanal offen ist. Sie ist abhängig von der Öffnungsfrequenz und von der Öffnungsdauer. Dabei wurden die Offenwahrscheinlichkeiten (normalisierte Werte) als Funktion der Calciumkonzentration aufgetragen.

Um zu zeigen, dass die Wertigkeit der transportierten Ionen keinen Einfluss auf die Aktivität des Kanalproteins hat, wurden die Messungen sowohl mit zweiwertigen Barium- als auch mit einwertigen Cäsiumionen durchgeführt (Abb. 18 und Abb.19).

a) Die Calciumabhängigkeit des Ryanodinrezeptors Typ 2 mit Barium als Ladungsträger

Die maximale Offenwahrscheinlichkeit des Ryanodinrezeptors Typ 2 von den Herzen gesunder Mäuse konnte bei einer Calciumkonzentration von 0,1 mM ermittelt werden ($n = 2$). Befand sich eine größere oder kleinere Menge freier Calciumionen auf der Cis-Seite des Kanals, so war die Aktivität des Ryanodinrezeptor-Calciumkanals geringer, wobei sich der Kanal um so seltener öffnete, je weiter sich die Calciumkonzentrationen vom optimalen pCa von 4 entfernten. Bei Werten von 10 nM bzw. 10 mM belief sich die normalisierte Offenwahrscheinlichkeit bei ca. 0,01 (Abb.17).

Im Einzelnen betrug die normalisierte Offenwahrscheinlichkeit bei einer Calciumkonzentration von 100 nM Calciumkonzentration 6%. Bei einem pCa von 6 konnte eine Wahrscheinlichkeit von 11% ermittelt werden, und bei der Calciumkonzentration, die ein Zehntel der optimalen

Konzentration betrug, also bei einer 0,01 mM Lösung, wurde eine Offenwahrscheinlichkeit von 48% berechnet. Diese nahm mit über den Optimalwert steigender Calciumkonzentration wieder ab, so dass ein pCa von 3,5 zu einer Wahrscheinlichkeit von 24% und ein pCa von 3 zu einer Offenwahrscheinlichkeit von nur noch 5% führte (Abb.17).

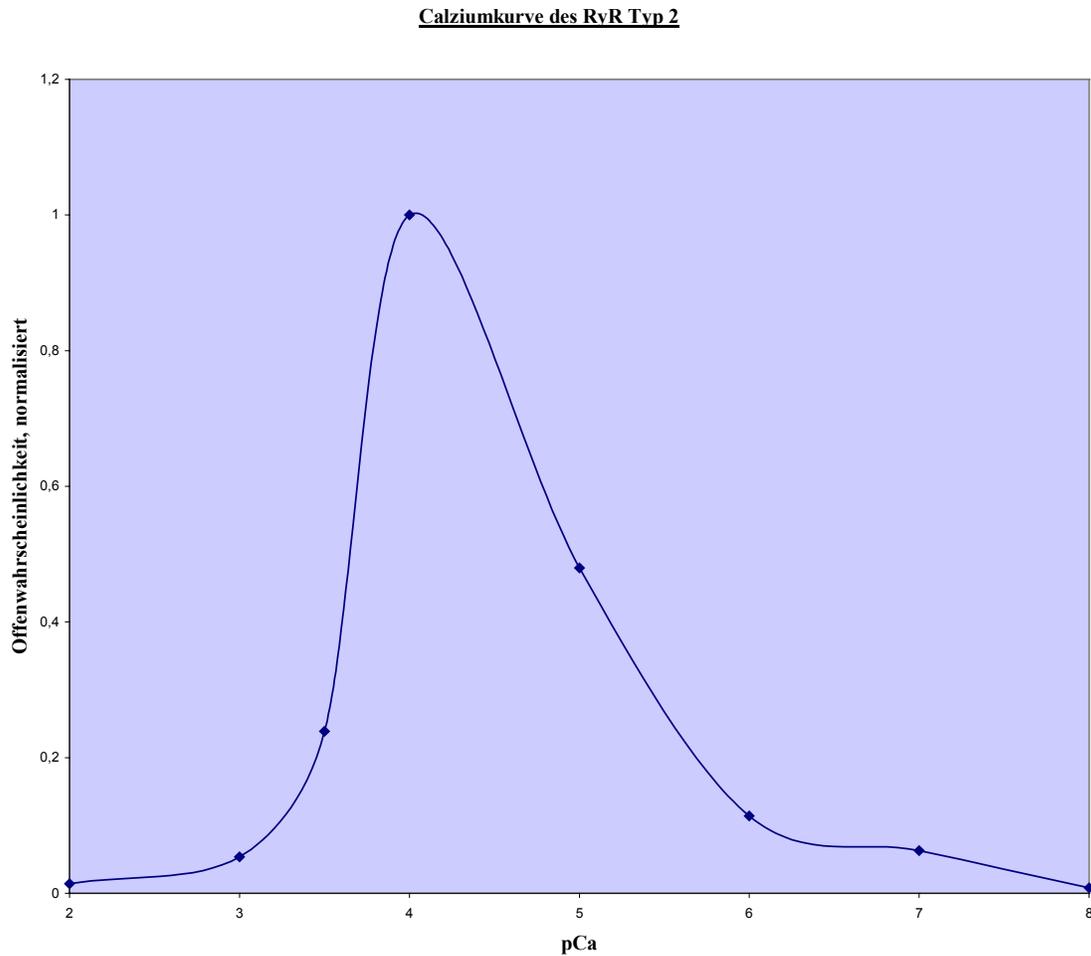


Abbildung 17.

Die Calciumkurve des Ryanodinrezeptors Typ 2 mit Barium als Ladungsträger .
Es ist die Aktivität des kardialen Ryanodinrezeptors in Abhängigkeit von der Calciumkonzentration auf der Cisseite des Kanals dargestellt.

b) Die Calciumabhängigkeit des RyR Typ 2 mit Cäsium als Ladungsträger

Erwartungsgemäß verhielt sich der kardiale RyR bezüglich der Calciumabhängigkeit mit Cäsium als Ladungsträger ähnlich wie mit Barium. Auch hier wurde die maximale Offenwahrscheinlichkeit des Kanals bei einem pCa-Wert von 4 gemessen, während die geringsten Aktivitäten bei Konzentrationen von 100 nM bzw. 10 mM verzeichnet wurden (Abb. 18).

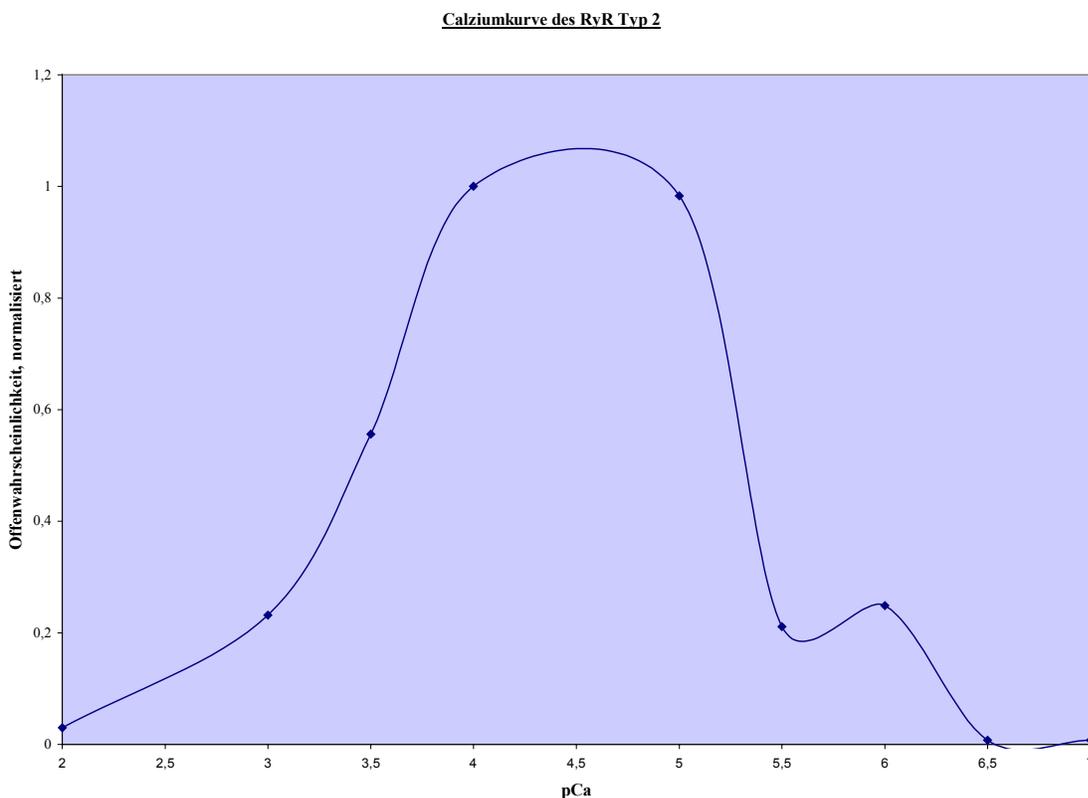


Abbildung 18.

Die Calciumkurve des Ryanodinrezeptors Typ 2 mit Cäsium als Ladungsträger .
Es ist die Aktivität des kardialen Ryanodinrezeptors in Abhängigkeit von der Calciumkonzentration auf der Cisseite des Kanals dargestellt.

Im Einzelnen konnten bei einem pCa von 7 und 6,5 eine Offenwahrscheinlichkeit von 0,8 % ermittelt werden. Die Calciumkonzentration von 1 μ M führte zu einer Offenwahrscheinlichkeit

von 25 %, wobei eine 10 μM Lösung die Wahrscheinlichkeit auf 98% ansteigen ließ. Die optimale Calciumkonzentration von 0,1 mM führte zum Aktivitätsmaximum, während schon eine Änderung zum pCa von 3,5 nur noch eine Offenwahrscheinlichkeit von 56% zuließ. Weniger als die Hälfte davon betrug sie bei einer Konzentration von 1 mM mit 23% und fiel auf 3% ab, wenn die Calciumkonzentration 0,1 mM betrug.

Mit diesen beiden Calciumkurven ist der Kanal soweit biophysikalisch charakterisiert, dass hinreichend gezeigt ist, dass es sich bei den vermessenen Kanälen der entwickelten Vesikel um den Ryanodinrezeptor-Calciumkanal handelt.

Außerdem war nun bekannt, bei welchen Calciumkonzentrationen auch der murine Ryanodinrezeptor-Calciumkanal Typ 2 sein Aktivitätsmaximum besitzt, so dass nun im Weiteren Versuche durchgeführt werden konnten, die Hinweise auf die Struktur der Kanalpore ergaben.

3.4. Die Wirkung von MTSEA^+ auf den Ryanodinrezeptor Typ 2

Der Effekt der hydrophilen Substanz Methanethiosulfonatethylammonium (MTSEA^+) auf den Ryanodinrezeptor Typ 2 wurde untersucht, indem die wichtigsten Merkmale des Calciumkanals, nämlich mittlere Offenzeit, Offenwahrscheinlichkeit und Amplitude vor und nach der Zugabe von 0,05 mM MTSEA^+ -Lösung zur Cisseite des Kanals ermittelt wurden. Dabei handelt es sich bei der Offenwahrscheinlichkeit des Kanals um den Anteil der Versuchszeit, während der der Calciumkanal offen ist, so dass sie abhängig ist von der Öffnungsfrequenz und der Öffnungsdauer. Bei den Versuchen betrug die Calciumkonzentration im cisseitigen Kompartiment des Bilyersystems 0,1 mM (pCa = 4), um eine möglichst hohe Aktivität des Kanals zu erzielen.

Ziel dieser Versuchsanordnung war zum Einen, die MTSEA^+ -Wirkung auf den Skelettmuskeltyp des Ryanodinrezeptors mit der Wirkung auf das kardiale Isomer des Kanals zu vergleichen. Zum Anderen sollten diese Experimente Hinweise geben auf die Struktur der Kanalpore und darauf, inwieweit sich diese bei den zwei verschiedenen Isoformen des Kanals in Herzmuskel und Skelettmuskel unterscheidet.

a) Untersuchung der Wirkung von MTSEA⁺ auf den Ryanodinrezeptor Typ 2 mit Barium als Ladungsträger

Die mittlere Offenzeit des kardialen Ryanodinrezeptors blieb nach der MTSEA⁺-Zugabe unverändert (Abb. 20) , wobei die Offenwahrscheinlichkeit in dem hier dargestellten Versuch zufällig zwischen 0,01 und 0,13 (absolute Werte) schwankte und somit auch als unabhängig von der Zugabe der sulfhydrylgruppenhaltigen Substanz erschien.

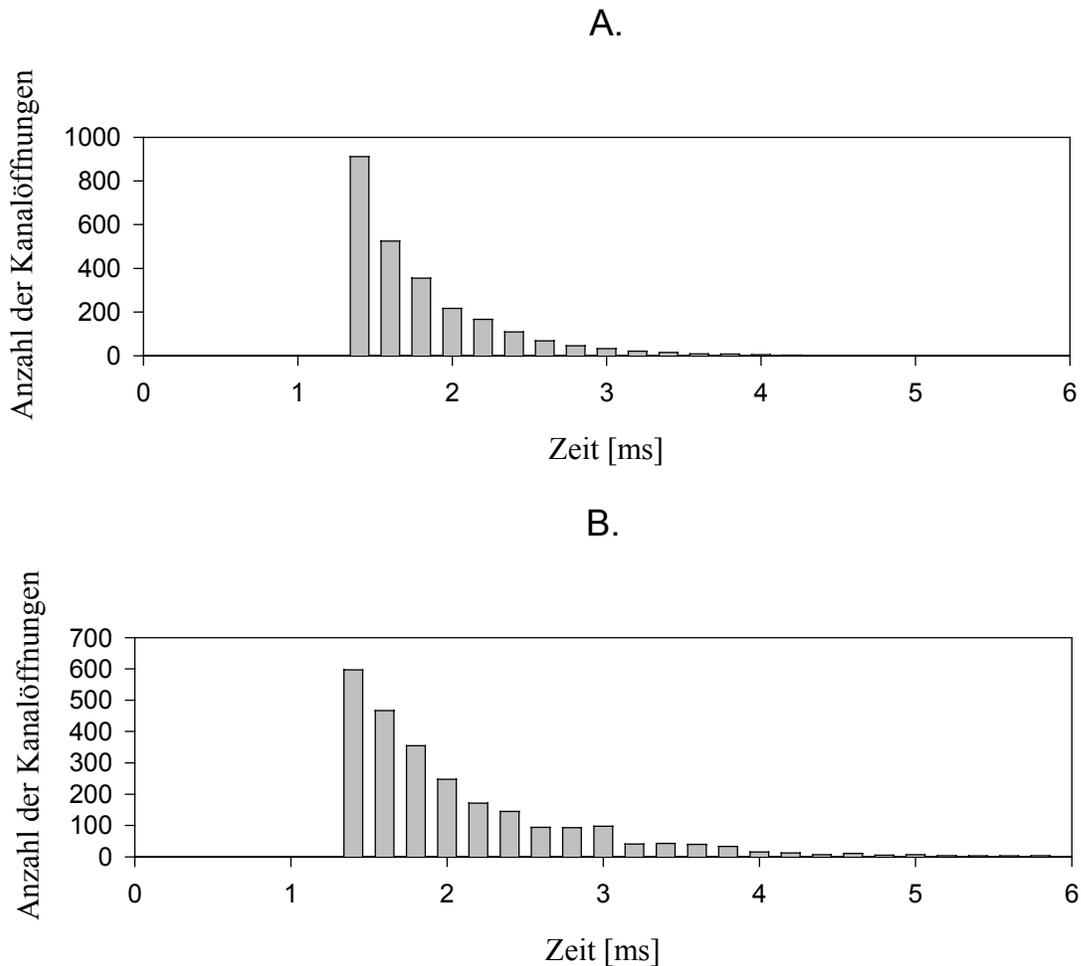


Abbildung 19.

Offenzeiten des Ryanodinrezeptors Typ 2 vor und nach der Behandlung mit 0,05 mM MTSEA⁺-Lösung ; Barium fungierte als Ladungsträger

(A) Offenzeiten vor der Behandlung mit MTSEA⁺

(B) Offenzeiten nach der Behandlung mit MTSEA⁺

Im Weiteren wurde die Amplitude des Ionenkanals beobachtet.

Nachdem die MTSEA⁺- Lösung in die cisseitige Kammer des Bilayersystems pipettiert wurde, so dass ihre Konzentration dort 0,05 mM betrug, kam es zu einer stufenweisen Reduktion der Amplitude des Stroms durch den Calciumkanal, wobei es bei jedem Schritt zu einer Verminderung um weitere ca. 25% der Ausgangsgröße kam (Abb.20). Diese schrittweise Abnahme der Amplitude des Ryanodinrezeptors Typ 2 war irreversibel.

Im Einzelnen konnte zunächst die volle Amplitude von 3,63 +/- 0,51 pA gemessen werden, die nach der Zugabe von MTSEA⁺ auf 73,9 % des Ausgangswertes, nämlich auf 2,68 +/- 0,38 pA abfiel.

Die nächste Stufe betrug dann 50,5 % der vollen Amplitude bzw. 1,83 +/- 0,23 pA. Zuletzt wurde ein Strom von 1,42 +/- 0,30 pA erfasst, dies entspricht 39,0 % der ursprünglich gemessenen Amplitude.

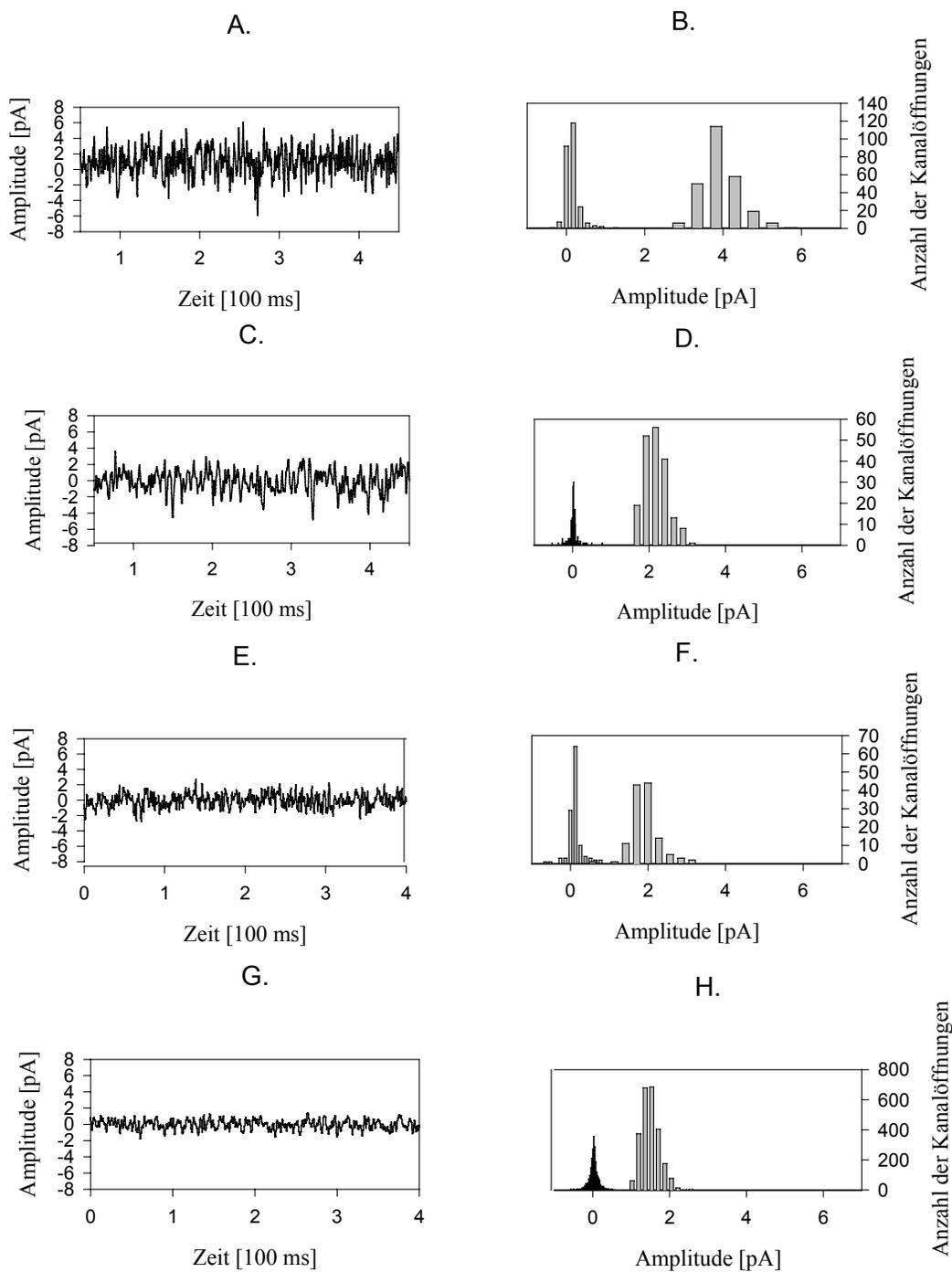


Abbildung 20.

Die stufenweise Abnahme der Stromamplitude des Ryanodinrezeptors Typ 2 nach der Behandlung mit 0,05 mM MTSEA⁺-Lösung und Barium als Ladungsträger in einem von zwei ähnlichen Experimenten (A) und (B) Die Einzelkanalmessungen des RyR Typ 2 und das Amplitudenhistogramm zeigen die volle Amplitude vor der Behandlung mit MTSEA⁺ (C) und (D) Die Einzelkanalmessungen des RyR Typ 2 und das Amplitudenhistogramm zeigen ca. 75% der ursprünglichen Amplitude 1,5 Minuten nach der Behandlung mit MTSEA⁺ (E) und (F) Die Einzelkanalmessungen des RyR Typ 2 und das Amplitudenhistogramm zeigen ca. 50% der ursprünglichen Amplitude 12,3 Minuten nach der Behandlung mit MTSEA⁺ (G) und (H) Die Einzelkanalmessungen des RyR Typ 2 und das Amplitudenhistogramm zeigen ca. 25% der ursprünglichen Amplitude 25,0 Minuten nach der Behandlung mit MTSEA⁺

Die Zeitabstände zwischen den vier Stufen wurden erfasst und erwiesen sich als unterschiedlich groß (Tabelle 1), und zwar nahmen sie zu, je weiter die Amplitude abnahm. Während nämlich der erste Schritt von der vollen Amplitude zu dem um ein Viertel reduzierten Strom durch den Kanal nur 1,5 Minuten betrug, dauerte der Übergang zur halben Amplitude 12,3 Minuten. Der letzte Schritt dauerte mit 25 Minuten am längsten.

Übergänge zwischen den Größenstufen der Amplitude des RyR Typ 2	Zeit zwischen den Übergängen
100 % - 73,9 %	1,5 Minuten
75 % - 50,5 %	12,3 Minuten
50 % - 39,0 %	25,0 Minuten

Tabelle 1.

Die zeitlichen Abstände zwischen den unterschiedlichen Amplitudenstufen des RyR Typ 2 nach der Behandlung mit 0,05 mM MTSEA⁺- Lösung in einem von zwei ähnlichen Versuchen mit Barium als Ladungsträger.

b) Untersuchung der Wirkung von MTSEA⁺ auf den Ryanodinrezeptor Typ 2 mit Cäsium als Ladungsträger

Ebenso wie bei den Experimenten mit Bariumionen als Ladungsträgern wurden die charakteristischen Eigenschaften des kardialen Ryanodinrezeptors vor und nach der Behandlung mit 0,05millimolarer MTSEA⁺-Lösung auf der zytosolischen Seite des Kanals eruiert.

Auch hier war die Offenzeit unverändert (Abb.21) und die Offenwahrscheinlichkeit schwankte in dem gezeigten Versuch zufällig zwischen 0,01 und 0,10 (absolute Offenwahrscheinlichkeit).

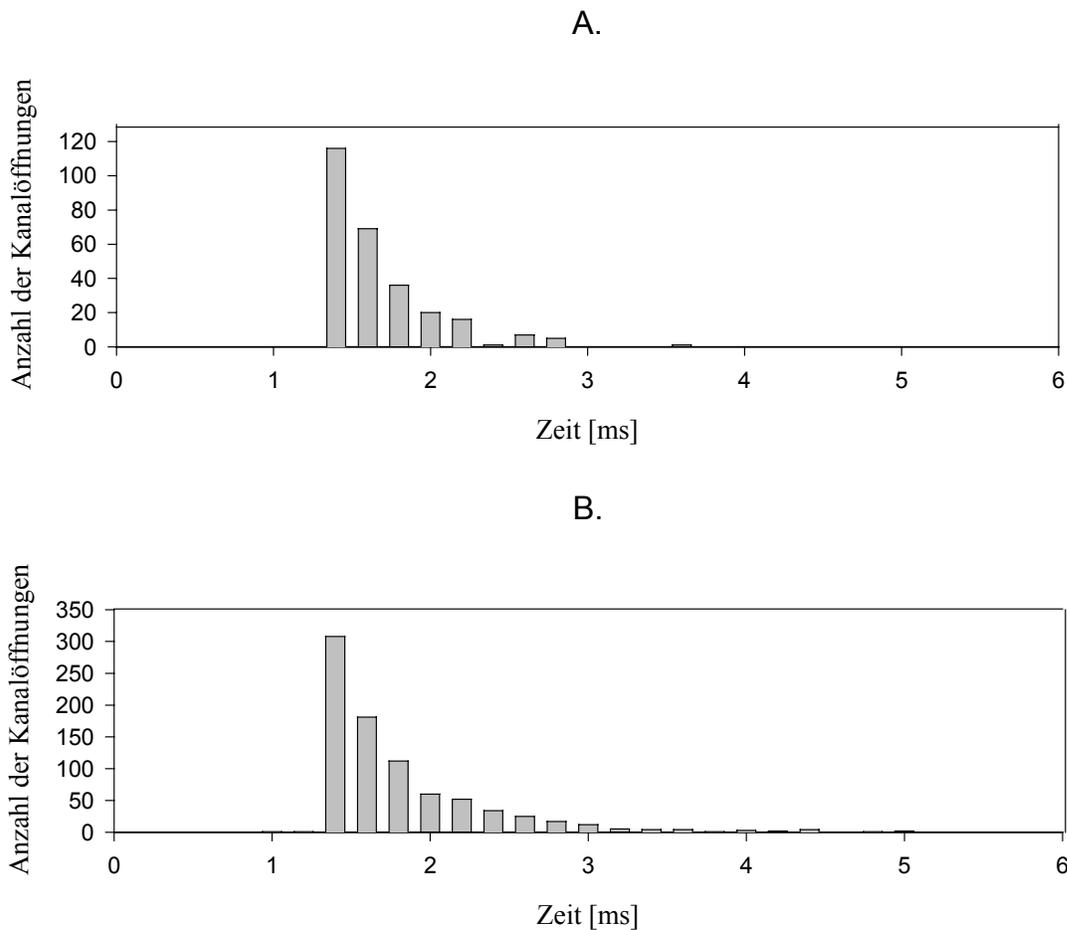


Abbildung 21.

Offenzeiten des Ryanodinrezeptors Typ 2 vor und nach der Behandlung mit 0,05 mM MTSEA⁺-Lösung ; Cäsium fungierte als Ladungsträger.

- (A) Offenzeiten vor der Behandlung mit MTSEA⁺
 (B) Offenzeiten nach der Behandlung mit MTSEA⁺

Als die MTSEA⁺-Lösung in das cisseiteige Kompartiment gegeben wurde, wurde wieder eine schrittweise Reduktion der Stromamplitude um jeweils ein weiteres Viertel der ursprünglichen Stromgröße durch den Ryanodinrezeptor Typ 2 gemessen. Allerdings konnte der Übergang von der vollen Amplitude zur 75%igen Stufe nicht beobachtet werden. Aber auch hier war die Verkleinerung des Stroms irreversibel.

Im Einzelnen betrug die volle Amplitude vor der Behandlung mit MTSEA⁺ 16,55 +/- 0,83 pA. Als nächste Stufe wurden 47,8 % dieses Ausgangswertes gemessen, das entsprach einem Wert von 7,91 +/- 1,31 pA. Zuletzt konnte ein Strom von 4,46 +/- 0,61 pA erfasst werden, so dass hiermit 27,0 % der ursprünglichen Amplitude erreicht worden waren (Abb. 22).

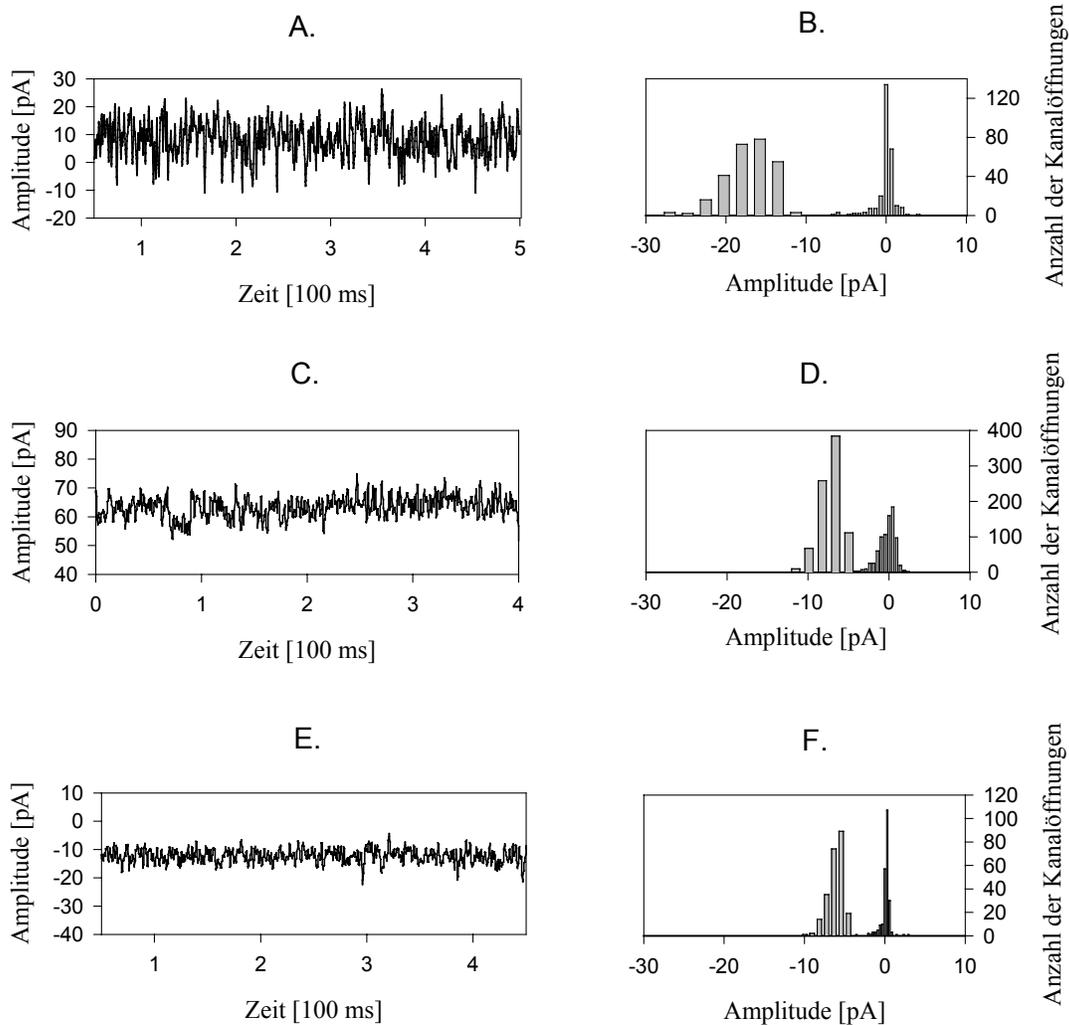


Abbildung 22.

Die stufenweise Abnahme der Stromamplitude des RyR Typ 2 nach der Behandlung mit 0,05mM MTSEA⁺- Lösung ; Cäsium fungierte als Ladungsträger.

(A) und (B) Die Einzelkanalmessungen des RyR Typ 2 und das Amplitudenhistogramm zeigen die volle Amplitude vor der Behandlung mit MTSEA⁺.

(C) und (D) Die Einzelkanalmessungen des RyR Typ 2 und das Amplitudenhistogramm zeigen ca. 50% der ursprünglichen Amplitude 21,6 Minuten nach der Behandlung mit MTSEA⁺.

(E) und (F) Die Einzelkanalmessungen des RyR Typ 2 und das Amplitudenhistogramm zeigen ca. 25% der ursprünglichen Amplitude 4,1 Minuten nach der Behandlung mit MTSEA⁺.

Die zeitlichen Abstände zwischen den Übergängen waren auch hier wieder unterschiedlich lang (Tabelle 2). Wieder dauerten die anfänglichen Schritte weniger lang als die darauf folgenden. Bei diesem Versuch konnte zwar die 75%ige Amplitude nicht erfasst werden, aber der Übergang zum halben Strom betrug nur 21,6 Minuten, während der Schritt zum Viertel der Ausgangsamplitude mit 41,3 Minuten fast doppelt so lang dauerte.

Übergänge zwischen den Größenstufen der Amplitude des RyR 2	Zeit zwischen den Übergängen
100 % - 47,8 %	21,6 Minuten
47,8 % - 27,0 %	41,3 Minuten

Tabelle 2.

Die zeitlichen Abstände zwischen den unterschiedlichen Amplitudenstufen des Ryanodinrezeptors Typ 2 nach der Behandlung mit 0,05 mM MTSEA⁺-Lösung mit Cäsium als Ladungsträger.

Die Versuche mit der reaktiven MTSEA⁺-Lösung ermöglichten nun Aussagen über die Vergleichbarkeit der Isoformen Typ 1 und Typ 2 und gaben Hinweise auf die Strukturähnlichkeit dieser beiden Ryanodinrezeptortypen.

Denn die stufenweise Amplitudenreduktion und die unterschiedlichen Zeitabstände zwischen den unterschiedlichen Stufen wurden schon beim Skelettmuskeltyp beobachtet und sind ein Hinweis darauf, dass die Kanalpore aus vier voneinander abhängigen Regionen des Kanals zusammengesetzt ist und den Leitungsweg für die transportierten Ionen darstellt (vergleiche Punkt 4).

4. Diskussion

Die Bedeutung des Ryanodinrezeptors auch für die klinische Forschung nahm vor allem in den letzten Jahren zu, da unter anderem gezeigt werden konnte, dass er eine entscheidende Rolle spielt bei der Herzinsuffizienz (Marx et al., 2000) und inzwischen wurden auch Mutationen des Kanals entdeckt, die mit familiären Herzrhythmusstörungen in Zusammenhang stehen (Bauce et al., 2002; Laitinen et al., 2001).

Mit dieser Arbeit wurde zunächst ein Präparat aus Mäuseherzen entwickelt, das es ermöglichen soll, auch genetisch veränderte Ryanodinrezeptor-Calciumkanäle von Säugetieren mit der Bilayermethode zu untersuchen. Dann wurden die biophysikalischen Merkmale des Kanals erfasst, um zu fest zu stellen, inwieweit der murine Ryanodinrezeptor-Calciumkanal vom Herzmuskeltyp mit dem anderer Säugetiere und mit dem Ryanodinrezeptor vom Skelettmuskeltyp vergleichbar ist. Zudem wurden Versuche gemacht, die Hinweise auf die Struktur der Kanalpore gaben und damit auch einen Strukturvergleich zwischen dem Ryanodinrezeptor Typ 1 und 2 lieferten. Denn angesichts der erheblichen Unterschiede zwischen den Isoformen 1 und 2 des Ryanodinrezeptors, die die Regulation des Kanalproteins betreffen, wie z.

B. die Modifikation durch Calmodulin (Balshaw et al., 2001; Fruen et al., 2000), müssen auch mögliche Unterschiede in der Struktur der Kanalpore genau untersucht werden, wenn auch vermutet wird, dass diese zwischen dem Typ 1 und Typ 2 konserviert ist (Sutko et al., 1996).

Allerdings sind diesen Ansätzen auch Grenzen gesetzt. Denn bei der Herstellung des Präparates des Ryanodinrezeptors können Verunreinigungen und Instabilität im Bilayer Schwierigkeiten bereiten. Die Bilayermethode kann dem Kanalprotein nur ein unphysiologisches Milieu bieten. Dies hat einerseits den Nachteil, dass es schwierig wird, die Ergebnisse im Zusammenhang mit den komplexen Vorgängen in der Zelle zu interpretieren, andererseits aber auch den Vorteil, dass keine unbekannt GröÙen die Eigenschaften des Kanals verändern, sondern seine Merkmale unter genau definierten Bedingungen erfasst werden können.

4.1. Die Präparation von Vesikeln mit dem murinen Ryanodinrezeptor-Calciumkanal Typ2

Der Grund für die Entwicklung eines Präparates aus murinem Herzmuskelgewebe für Bilayerexperimente, das bisher in der Literatur noch nicht beschrieben ist, besteht darin, dass es bisher nur von einigen Gattungen Knockout-Modelle gibt. Diese sind Hühner, Fische, Würmer, Fliegen (*Drosophila*) und Mäuse. Um Untersuchungen machen zu können, die auch für die Ryanodinrezeptoren des Menschen aussagekräftig sein sollen, eignen sich in erster Linie die Ryanodinrezeptoren von Mäusen bzw. Knockoutmäusen, zumal bekannt ist, dass sich die Kanäle z. B. von Fischen (Koulen et al., 2001a) und Wirbellosen anders verhalten als die von einigen untersuchten Säugetieren, wie z.B. von Kaninchen (Quinn et al., 1998).

Mit Hilfe von geklonten RyR könnte man dann z.B. die Struktur der Calciumkanäle erforschen, indem u.a. Cysteinreste in der mutmaßlichen Pore durch nicht reaktive Aminosäurereste ersetzt werden, um zu erfassen, welche Cysteinreste sich in der Pore befinden und ob es evtl. Veränderungen bei der Herzinsuffizienz gibt.

SR-Vesikel, die in Bilayermembranen inkorporiert werden sollen, müssen allerdings bestimmte Eigenschaften besitzen.

Entscheidend ist zunächst, dass die RyR in ausreichender Menge in der Mikrosomenfraktion enthalten sind.

Bei der Zentrifugation wurden vier Schritte unterschiedlicher Geschwindigkeit und Dauer gewählt, um sukzessive unerwünschte Bestandteile im Sediment zu entfernen und schließlich die Mikrosomenfraktion mit einem möglichst hohen Gehalt an RyR Typ 2 zu erhalten.

Im ersten Schritt (20 Minuten lang, 2800 g) werden Mitochondrien, Zellkerne und Zytoskelett verworfen, im zweiten und dritten Schritt (15 Minuten lang, 6300 g, 120 Minuten lang, 20000 g) dann Lysosomen, Peroxisomen und eventuell zurückgebliebene Mitochondrien. Die Membranen des ER bzw. SR befinden sich schließlich nach der letzten Zentrifugation im Sediment (Reid et al., 1974, Koolman et al., 1998, Favre et al., 1999). Allerdings gelingt es nicht immer, ein Präparat zu gewinnen, das ausschließlich Membranen des sarkoplasmatischen bzw. endoplasmatischen Retikulums enthält, da die mikrosomale Fraktion z.T. auch Plasmamembrananteile, Golgiapparatfragmente und sekretorische Vesikel enthält, die jedoch

auch durch einen Sucrosegradienten nicht mit Sicherheit zu entfernen sind (Shoshan-Barmatz et al., 1998). Daher wurde auch auf diesen Gradienten verzichtet, da mit dieser Methode teilweise auch die gewünschten Anteile des Sediments verloren gehen können.

Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Fusionsfähigkeit der Vesikel mit der Lipidmembran. Diese kann durch diverse Methoden erhöht werden, wobei bei der Präparation der SR-Vesikel die Pufferlösung, in der die Vesikel resuspendiert werden, entscheidend ist für die Fusion mit dem Bilayer. Daher wurde eine Lösung mit 20 mM MOPS, 20 mM KCl und 20 mM Sucrose verwendet, die dafür sorgt, dass die Vesikel anschwellen und sich so leichter mit der Lipidmembran vereinigen. Dabei ist die Sucrose ausschlaggebend, da sie nicht permeabel ist für die Vesikelwand (Cohen et al., 1993).

Auch wichtig ist, dass die Vesikel nach der Inkorporation das Bilayer nicht zu sehr destabilisieren. Dies war bisher besonders bei kardialen RyR ein Problem, während die RyR von Skelettmuskelpräparaten die Membran weniger gefährden (Coronado et al., 1992).

Dennoch müssen kardiale Präparate verwendet werden, wenn die Versuche speziell für die Zustände im Herzen aussagekräftig sein sollen, da es doch wesentliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Isoformen des RyR gibt (vergleiche Einleitung), die es noch weiter zu erforschen gilt. Gerade wenn die Experimente auch klinisch richtungsweisend sein sollen, dürfen die Isoformen nicht gleichgesetzt werden, da Modulatoren der Kanaleigenschaften unterschiedliche Effekte haben. Beispielsweise entfaltet Dantrolen seine Wirkung nur bei der Skelettmuskel-Isoform des RyR, nicht aber bei der kardialen Form (Zhao et al., 2001).

Um nach der Entwicklung des neuen Präparates zu demonstrieren, dass der RyR Typ 2 tatsächlich auch in den Vesikeln enthalten ist, wurde zunächst ein Westernblotting durchgeführt, das zeigte, dass ein Protein mit entsprechendem Molekulargewicht enthalten war. Dann wurden biophysikalische Experimente vorgenommen, um die Funktionsfähigkeit des Präparates und die Identität des Kanals zu untersuchen.

4.2. Die Strom-Spannungskurve des murinen Ryanodinrezeptors Typ 2

Zuerst wurden die Basisuntersuchungen an dem neuen RyR Typ2 vorgenommen, wobei mit der Messung der Amplitude unter verschiedenen Spannungen begonnen wurde, um die Leitfähigkeit

des Kanalproteins zu berechnen. Dabei wurden zwei verschiedene Ladungsträger verwendet, nämlich Barium und Cäsium. Auf das physiologischerweise transportierte Calcium wurde, wie bereits in der Einleitung erwähnt, verzichtet, da es zu Interferenzen mit der Aktivität des Kanals kommen würde (vgl. auch Punkt 4.3., Calciumabhängigkeit des murinen RyR Typ 2.).

Interessanterweise funktionieren bestimmte Versuche nicht immer mit allen Ladungsträgern. Beispielsweise zeigten Versuche mit Suramin nur dann eine Reduktion der Leitfähigkeit des RyR, wenn Calcium als Ladungsträger fungierte, nicht jedoch bei Cäsium. Vermutlich resultierten in diesem Falle die Konformationsänderungen innerhalb des Kanals in Veränderungen der Affinität in der Pore, die eher divalente als monovalente Kationen betrafen (Sitsapesan et al., 1999). Daher sollte in den grundlegenden Experimenten zunächst getestet werden, mit welchen Ionen charakteristische Merkmale des Proteins untersucht werden können, um dann die Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Ionen interpretieren zu können.

Im Folgenden konnten sowohl mit Barium als auch mit Cäsium Strom-Spannungskurven erhoben werden, die auch in etwa den in der Literatur beschriebenen entsprachen. Die Leitfähigkeit des RyR Typ 2 für Barium betrug im Mittel $117,95 \pm 8,90$ pS, wobei die Werte in der Literatur zwischen 115 ± 6 pS (Koulen et al., 2000) und 220 pS (Tinker et al., 1992) schwanken.

Dabei bezieht sich der erste Wert auf den Ryanodinrezeptor Typ 1 von Kaninchen, während der zweite mit dem kardialen Ryanodinrezeptor von Schafen erhoben wurde. Allerdings wurde auch mit dem kardialen Ryanodinrezeptor, der aus den Herzen von Hunden gewonnen worden war, eine Amplitude von 4 pA gemessen. Da die Amplitude des Kanals bei den Messungen dieser Arbeit $3,82 \pm 0,96$ pA betrug, kann man sagen, dass die kardialen Ryanodinrezeptoren von Mäusen mit denen anderer Säugetiere, wie z.B. mit denen von Hunden und Schafen, vergleichbar sind.

Außerdem liefern Experimente mit diesen zweiwertigen Ionen physiologische Zahlen, denn die Leitfähigkeit für Calcium beträgt 120 pS beim Skelettmuskeltyp und 100 pS beim Herzmuskeltyp (Bezprozvanny et al., 1991). Um allerdings die Störgeräusche gegenüber den Kanalöffnungen kleiner erscheinen zu lassen, ist Cäsium als Ladungsträger sehr gut geeignet, da es eine größere Leitfähigkeit besitzt. Diese bewegt sich zwischen 541 pS und 567 pS in der Literatur (Brillantes et al., 1994), wobei in den Versuchen dieser Arbeit ein Wert von $528,28 \pm 11,43$ pS erhoben wurde.

Die Offenzeiten des Kanals schwankten sowohl bei der Erhebung der Strom-Spannungskurve mit

beiden Ladungsträgern als auch später bei den Versuchen mit dem Reagenz MTSEA⁺ zwischen 0 und 15 ms. Auch diese Werte sind mit denen in der Literatur vergleichbar (Kaftan et al., 1996; Valdivia et al., 1995).

Ein weiteres Merkmal des Kanals zeigt sich in der Form der Strom-Spannungskurve, es handelt sich um eine Gerade (Brillantes et al., 1994), so dass man sagen kann, dass der Calciumkanal nicht spannungsabhängig aktiviert wird.

Diese Messungen sind daher schon eine erste Bestätigung dafür, dass es sich bei dem Protein, das mit dem Bilayer fusioniert ist, tatsächlich um den RyR handelt. Um weitere Sicherheit zu gewinnen, wurden die Offenwahrscheinlichkeiten des RyR bei verschiedenen Calciumkonzentrationen im cisseitigen Kompartiment gemessen.

4.3. Die Calciumabhängigkeit des murinen Ryanodinrezeptors Typ 2

Ein ganz entscheidendes Charakteristikum des RyR ist seine calciumabhängige Aktivierung. Trägt man die Offenwahrscheinlichkeit des Proteins als Funktion der Calciumkonzentration an der Cisseite des Kanals auf, so erhält man eine glockenförmige Kurve (Bezprozvanny et al., 1991). Messungen der Offenwahrscheinlichkeit des in das Bilayer inkorporierten Kanals bei verschiedenen Calciumkonzentrationen zwischen 10 mM und 10 nM ergaben ebenfalls eine Glockenform, so dass die Identität des RyR hiermit ausreichend gezeigt war. Denn ein weiterer Calciumkanal des SR/ER, der mit dem RyR verwandt ist (siehe Einleitung) und auch calciumabhängig aktiviert wird, nämlich der IP₃-Rezeptor-Calziumkanal, zeigt keine Aktivität in der Abwesenheit von IP₃ (Bezprozvanny et al., 1991).

Auch diese Messungen wurden sowohl mit Barium als auch mit Cäsium durchgeführt, um zu zeigen, dass divalente und monovalente Ionen soweit keine unterschiedlichen Wirkungen auf die calciumabhängige Aktivierung des murinen kardialen RyR haben.

Die Calciumkonzentrationen, die bei den Versuchen getestet wurden, entsprechen auch in etwa der physiologischen Spannweite der Calciumkonzentrationen, die in der Zelle auftreten können (Bezprozvanny et al., 1991).

Die Grundform der Kurven mit dem aufsteigendem Schenkel bei steigenden Calciumkonzentrationen, dem Aktivitätsmaximum bei einem pCa von 4 und dem wieder

absteigenden Schenkel bei abfallendem Calciumniveau im cisseitigen Kompartiment des Bilayersystems entspricht dem in der Literatur beschriebenen Verhalten des RyR (Koulen et al., 2000, Bezprozvanny et al., 1991, Xu et al., 1998, Balshaw et al., 1999).

Auch dieses Merkmal des murinen kardialen RyR unterscheidet sich in den durchgeführten Untersuchungen nicht von den Eigenschaften der kardialen RyR anderer Säugetiere; denn der RyR Typ 2 ist u.a. dadurch gekennzeichnet, dass er empfindlicher auf niedrige Calciumkonzentrationen reagiert (Sorrentino, 1993) und somit den Höhepunkt der Offenwahrscheinlichkeit früher erreicht als dies beim Skelettmuskeltyp der Fall ist. Beim RyR Typ 1 findet sich dieses Maximum bei einer Calciumkonzentration von etwa 0,01 mM (Koulen et al., 2000, Balshaw et al., 1999, Xu et al., 1998). Vor diesem Hintergrund passen die Ergebnisse der Messungen des RyR der murinen Herzen mit einer maximalen Offenwahrscheinlichkeit bei einer Calciumkonzentration von 0,1 mM zu den Beschreibungen in der Literatur. Außerdem konnte mit Vesikeln aus dem Kleinhirn von Hunden, wo der Ryanodinrezeptor Typ 2 ebenfalls gefunden wurde, eine maximale Aktivierung des Kanals bei einem pCa von 4,5 gemessen werden (Striggow et al., 1997). Auch die Feststellung, dass der Herzmuskeltyp des RyR höherer Calciumkonzentrationen bedarf zu seiner Hemmung (Xu et al., 1998; Hayek et al., 2000), konnte bestätigt werden. Denn während der Skelettmuskeltyp des Calciumkanals bereits inaktiv ist bei einem pCa von 3, war der RyR Typ 2 noch aktiv.

Ein Problem bei der Erfassung der Offenwahrscheinlichkeit des RyR ist zum Einen die von Kanal zu Kanal unterschiedliche Aktivität (Koulen et al., 2000), zum anderen aber auch die komplexen Beeinflussungsmöglichkeiten. Denn es konnte beobachtet werden, dass eine Erhöhung der Kaliumchlorid- bzw. der Natriumchloridkonzentration den Calciumstrom aus Vesikeln des Sarkoplasmatischen Vesikeln erhöht und die Offenwahrscheinlichkeit des RyR steigert (Shoshan-Barmatz et al., 1998). Da aber zur Fusionsförderung in den Bilayerexperimenten meist eine 3M Kaliumchloridlösung zugefügt werden muss, sind jedenfalls die absoluten Zahlen der Calciumaktivität nicht verwertbar.

4.4. Die Bilayerversuche mit der MTSEA⁺-Lösung

Obwohl es vielzählige Untersuchungen zur Struktur des RyR gab, ist bisher ungeklärt geblieben,

wie viele Poren der RyR besitzt, durch die die Calciumionen geleitet werden. Dabei gibt es zwei unterschiedliche Positionen: Zum Einen ist es möglich, dass die vier Untereinheiten des Kanals eine gemeinsame Pore bilden. Die andere Variante besteht darin, dass jede Untereinheit eine eigene Pore liefert. Auch die Tatsache, dass vier Leitfähigkeitsstufen ("subconductance states") beobachtet werden konnten, brachten nicht genügend Hinweise, da sowohl die vier Poren einen vereinigten Ionenfluss durch den Kanal ermöglichen könnten, als auch eine Pore in ihrer Größe durch Konformationsänderungen der Untereinheiten beeinflusst werden könnte (Quinn et al., 1997).

Um diese Frage der Anzahl der Kanalporen zu klären, wurde das Reagenz MTSEA⁺ in Bilayerversuchen verwendet. MTSEA reagiert hochspezifisch mit Schwefelwasserstoffgruppen und ist daher speziell für den Angriff an Cystein-Aminosäureresten geeignet. Zudem ist es hydrophil und konnte daher schon zur Strukturanalyse anderer Kanäle verwendet werden, wie z.B. zur Analyse des Acetylcholinrezeptors (Akabas et al., 1992; Akabas et al., 1994), da es dadurch geeignet ist, den mit Wasser gefüllten Leitungsweg für die Calciumionen zu explorieren. Der RyR besitzt ungefähr 90 Cysteinreste in seiner Primärstruktur (Otsu et al., 1990), wobei sich an der Oberfläche des RyR Typ 1 ein Cysteinrest und an der Oberfläche des kardialen Typen des Calciumkanals drei Cysteinreste befinden, während in der mutmaßlichen transmembranären Region in beiden Isoformen gleichermaßen drei Cysteinreste zu finden sind (Marks et al., 1990). Daher wurde auch bereits die besonders hohe Sensitivität des Rezeptors gegenüber Reagenzien, die Schwefelwasserstoffgruppen modifizieren, beschrieben, wobei dies auch für die Reduktion und Oxidation dieser Gruppen gilt, so dass dem Ryanodinrezeptor die Funktion eines Redoxsensors zugeschrieben werden kann (Feng et al., 2000). Auch die klinische Bedeutung hierfür konnte bereits durch Zhang et al. (2003) gezeigt werden (vgl. Einleitung Punkt 1.3.6.2.1). Die Experimente mit dem Reagenz MTSEA⁺ wurden bereits mit dem RyR Typ 1 in Bilayern durchgeführt. Dabei ergab sich, dass die Amplitude des Calciumkanals in vier Stufen reduziert wurde, wobei die Zeitintervalle zwischen den Reduktionsschritten mit abnehmender Amplitude zunahmten und man daher davon ausgehen kann, dass die Veränderungen des Kanals nicht unabhängig voneinander geschehen und sich gegenseitig beeinflussen. Dabei wäre als Erklärung hierfür möglich, dass das MTSEA⁺ mit den Cysteinresten an vier Stellen innerhalb der Pore reagiert, die sehr nahe benachbart sind (Quinn et al., 1997). Allerdings sind auch allosterische Reaktionen denkbar.

Um zu klären, ob sich die Poren von RyR Typ 1 und 2 in ihrem Gehalt an reaktiven Cysteinresten

voneinander unterscheiden, wurden Bilayerexperimente mit dem Reagenz MTSEA⁺ an dem murinen Präparat des RyR Typ 2 durchgeführt. Es wurden dabei niedrige Konzentrationen an MTSEA⁺ (0,05 mM) verwendet, da höhere Konzentrationen (5 mM bzw. 0,2 mM) in einer kompletten Blockierung des Kanals bzw. in rapiden Übergängen zwischen den verschiedenen Reduktionsstufen resultieren (Quinn et al., 1997).

Diese Experimente ergaben vergleichbare Ergebnisse wie die Versuche mit dem Skelettmuskeltyp. Dies war zum Einen zwar auch zu erwarten, da zwischen den verschiedenen Isoformen eine 66%ige Homologie besteht, die v.a. die Kanalstruktur betrifft (Sorrentino et al., 2000). Zum Anderen gibt es aber auch wesentliche Unterschiede zwischen den Isoformen (vergleiche Einleitung), so dass Untersuchungen nötig waren, um im Speziellen Gewissheit über die Cysteinreste im Kanal zu erhalten.

Dabei kam es nach der Zugabe von MTSEA⁺ zu einer irreversiblen Erniedrigung der Amplitude des RyR Typ 2, die ebenfalls in Stufen erfolgte. Die Messungen wurden, wie bei allen Versuchsanordnungen, auch hier wieder mit den beiden Ladungsträgern Barium und Cäsium durchgeführt.

Mit Barium als Ladungsträger konnten alle vier Amplitudenstufen erfasst werden. Diese betragen in einem repräsentativen Versuch 100 %, 73,9 %, 50,54 % und 39,0 % der vor der Behandlung mit MTSEA⁺ gemessenen Amplitude. Während die ersten drei Werte den in der Literatur beschriebenen Viertelschritten entsprachen, war der Wert für die letzte Amplitudenstufe vergleichsweise zu hoch, da der Kanal zuletzt nur noch ein Viertel der ursprünglichen Amplitude durch die Pore leiten sollte (Quinn et al., 1997).

Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass mit zunehmender Dauer von Bilayerexperimenten die Lipidmembran einen Defekt davon tragen kann, so dass sie durchlässig wird für Ionen, die dann insgesamt die gemessene Amplitude größer erscheinen lassen.

In den Versuchen mit Cäsium konnten nur drei Stufen gemessen werden, die 100%, 47,8 % und 27,0% der ursprünglichen Stromamplitude maß.

Das Problem bei der Zugabe von MTSEA⁺ besteht darin, dass eine gewisse Zeit nötig ist, bis die 0,05 mM MTSEA⁺-Lösung gleichmäßig im Ciskompartiment verteilt ist, so dass möglicherweise auch besonders hohe lokale Konzentrationen am RyR aktiv sind, die zu rapiden Übergängen zwischen den Viertelstufen führen können und somit wahrscheinlich bei dem dargestellten Versuch mit Cäsium als Ladungsträger so schnell schon während des Stirrings zu einer 50%igen Reduktion der Amplitude des Kanals führten, dass die Zwischenstufen nicht erfasst werden

konnten. Die Übergänge selbst konnten nicht erfasst werden, da dies sehr schwierig ist, wenn die Kanalöffnungen kurz sind.

Die MTSEA⁺-Lösung wurde dem cisseitigen Kompartiment zugegeben, da Quinn et al. (1997) herausgefunden hatten, dass das Reagenz in der transseitigen Kammer keine Wirkung zeigte. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die Struktur des Kanals. Denn wegen der Trichterform des RyR ist der Eingang in den Kanal auf der Cisseite geräumiger, da er hier einen Durchmesser von 25 Å hat (Radermacher et al., 1994). Daher bietet er mehr Platz für die MTSEA⁺-Moleküle. Der Kanal ist 10 Å lang und hat auf der Transseite einen Durchmesser von 7 Å, so dass zwar die Möglichkeit besteht, dass ein MTSEA⁺-Molekül die Pore passiert, da es gerade durchpasst, aber die Wahrscheinlichkeit ist viel geringer als auf der Cisseite (Quinn et al., 1997). Denn ein MTSEA⁺-Molekül in der all-*trans*-Konfiguration passt von seiner Form und Größe her gerade in einen Zylinder mit einem Durchmesser von 6 Å und einer Länge von 10 Å. Die Seitenketten der Cysteinreste des Kanals haben Kontakt mit Wasser und den Ionen, die durch die Pore strömen. Daher sind die Ionen im weiteren Abschnitt des Kanals hydriert, während sie im schmaleren Teil z.T. dehydriert sind, wie auch das MTSEA⁺-Molekül, denn es wäre nicht genügend Raum in dem transmembranären Abschnitt der Pore für ein hydriertes MTSEA⁺-Ion. Daher kontaktieren die Seitenketten des Proteins die Ionen selbst, so dass das MTSEA⁺ mit den Cysteinresten reagieren kann. Diese Seitenketten spielen deshalb auch die Schlüsselrolle für die Selektivität und Größe der Ionenleitung im Kanal (Karlin et al., 1998) und sollten aus diesem Grund näher beleuchtet werden.

Allerdings kann die Wirkung des MTSEA⁺ nicht eindeutig der Cisseite zugeordnet werden, da es in Phospholipidvesikel eindringen und Zellmembranen überqueren kann (Karlin et al., 1998).

Die Versuche fanden bei einer Calciumkonzentration auf der Cisseite des RyR von 0,1 mM statt, um die Offenwahrscheinlichkeit möglichst hoch zu halten, da die beschriebene Wirkung nur eintrat, wenn das MTSEA⁺ auf einen offenen Kanal traf (Quinn et al., 1997).

Die Offenzeiten des Kanals waren, wie auch bei Quinn et al. (1997) in allen Versuchen unbeeinflusst von dem MTSEA⁺-Reagenz. Dies, und dass nur die Leitfähigkeit irreversibel betroffen war, spricht dafür, dass tatsächlich die Cysteingruppen in der Pore betroffen sind und nicht die Regionen des RyR, die regulatorische Funktionen besitzen.

Der vermutete Mechanismus der Wirkweise des MTSEA⁺ besteht darin, dass es eine sterische und elektrostatische Hürde für die Ionenbewegung durch die Pore bildet. Denn die Innenauskleidung der Pore enthält negative Ladungen, um die Kationen dort zu konzentrieren

und so ihre Leitung durch den Kanal zu erhöhen. Dabei ist bekannt, dass das entscheidende Segment des Kanals die Struktur einer α -Helix besitzt, so dass die Cysteinreste auf der hydrophilen Seite der α -Helix vertikal angeordnet sind. Hierbei könnten jeweils zwei Cysteinreste pro Untereinheit nahe dem zytoplasmatischen Eingang des Kanals lokalisiert sein (Takeshima et al., 1989). Wird die Oberflächenladung im Leitungsweg des Kanals durch die Bindung von MTSEA^+ positiver, so sinkt die Konzentration der Kationen in der Pore, und die Amplitude des Stroms nimmt ab. Da die Dauer der Übergänge mit jeder weiteren Reduktion der Amplitude abnimmt, liegen die Bindungsstellen für die MTSEA^+ -Moleküle vermutlich dicht nebeneinander. Dies ist mit einer sterischen und elektrostatischen gegenseitigen Beeinflussung der MTSEA^+ -Moleküle vereinbar (Quinn et al., 1997).

Die Ergebnisse der Arbeit stimmen insgesamt mit den Experimenten am Skelettmuskeltyp des RyR (Quinn et al., 1997) überein und lassen daher vermuten, dass auch der kardiale RyR dementsprechend eine einzelne Pore zur Leitung der Calciumionen aus dem SR in das Zytoplasma besitzt. Denn würde es vier Poren geben, dann müssten die Reduktionsschritte unabhängig voneinander eintreten. Es wären zwar auch Konformationsänderungen in anliegenden Untereinheiten denkbar, aber da es zu keinen Änderungen der Kanalfunktion kommt, die diese Hypothese stützen würden, ist diese Variante eher unwahrscheinlich.

Zudem gibt es andere Arbeiten außer der von Quinn et al. (1997) die für eine einzelne Pore sprechen.

Tinker et al. (1992) stellten fest, dass es eine einzige Bindungsstelle für Kationen gibt im RyR, und Samsó et al. (1998) konnten bei der dreidimensionalen Rekonstruktion des Calciumkanals eine einzelne zentrale Pore darstellen.

Aber nicht nur hinsichtlich der Aufklärung der Struktur des Ryanodinrezeptor-Calciumkanals ist die Untersuchung von Cysteinresten interessant, sondern das Vorhandensein von reaktivem Schwefelwasserstoff hat auch physiologische bzw. pathophysiologische Bedeutung. Denn Versuche mit Quinonen konnten die Relevanz des RyR bei oxidativen Zellschädigungen zeigen. Quinone sind ubiquitär vorkommende Substanzen, die mit reaktiven Sulfhydrylgruppen des RyR reagieren, man findet sie u.a. in Medikamenten; denn Doxorubicin beispielsweise ist ein Anthraquinon, dessen Wirkung auf den kardialen RyR bereits von Ondrias et al. (1990) untersucht wurde. Aber auch im Zigarettenrauch, in Dieselabgasen und als Metabolite von bestimmten Pestiziden kommen sie vor. Diese Quinone sind mit Veränderungen in der zellulären Calciumregulation assoziiert, wobei der exakte Mechanismus noch unklar ist. Als mögliche

Erklärung gilt, dass es zur Oxidation der hyperreaktiven Schwefelwasserstoffgruppen der Cysteinreste kommt, die in der Öffnung des RyR resultiert und so zum unkontrollierten Anstieg der zytoplasmatischen Calciumkonzentration und zum Zelltod führt (Feng et al., 1999).

Weiterhin könnten Versuche mit dem kardialen SR-Präparat genauer Aufschlüsse geben über die Wirkungen von Calciumkanalblockern. Denn diese sollen zwar direkt die DHPR (L-Typ-Calciumkanäle) blockieren, könnten aber durch das Zusammenwirken des DHPR mit dem RyR (vergleiche Einleitung) auch auf diesen einen indirekten Einfluss haben.

Allerdings haben die Calciumkanalblocker offensichtlich auch einen unmittelbaren Effekt auf die RyR, denn es wurde eine inhibierende Wirkung von Propranolol auf die Einzelkanalaktivität des RyR festgestellt, wenn auch insgesamt ein Calciumeinstrom in die Zelle induziert wird, wobei die unterschiedlichen Auswirkungen vom Elektrolytmilieu und weiteren Modulatoren des RyR abhängig waren (Shohan-Barmatz et al., 1998). Daher erscheint der Wirkungsmechanismus des Calciumkanalblockers sehr komplex und weiter untersuchungsbedürftig.

Allerdings dürfte zur vollständigen Aufklärung der Verhältnisse im Herzen nicht nur die Bilayermethode ein zu unphysiologisches Milieu liefern, um tatsächlich klinisch relevante Aussagen machen zu können, sondern limitierend für das Verständnis von Herzversagen und Arrhythmien ist die Unmöglichkeit der Messung von intrazellulären Calciumkonzentrationen der Kardiomyozyten im schlagenden Herzen (Marks, 2000).

Aber die Bilayermethode selbst hat einige Nachteile, wenn es darum geht, den kardialen Ryanodinrezeptor-Calciumkanal zu untersuchen. Denn zum Einen weist der RyR eine hohe Heterogenität von Kanal zu Kanal auf, zum Anderen bestehen unphysiologische Bedingungen bei den Versuchen. Denn z.T. fehlen Magnesiumionen, ATP und andere Modulatoren, oder es besteht möglicherweise eine nicht gemessene lokale Calciumkonzentration am Eingang des RyR, die die regulatorischen Regionen des Calciumkanals beeinflussen könnte (Fan et al., 1999). Dadurch werden zwar repräsentative Aussagen für die Klinik verhindert, aber es können dennoch die Grundlagen, wie z.B. die Struktur des Kanals erforscht werden, die nötig sind, um die Physiologie und Pathophysiologie im Detail zu verstehen.

4.5. Ausblick auf weiterführende Forschung

In Zukunft werden Bilayerversuche möglich sein, in denen genetisch veränderte Ryanodinrezeptoren eines Säugetieres untersucht werden. Dabei können sowohl Experimente zur weiteren Aufklärung der Struktur des Kanals durchgeführt werden als auch Versuche, die potentielle Rezeptorstellen für Modulatoren des Kanals erfassen. Hier könnten Vergleiche mit Präparaten insuffizienter Herzen Aufschluss geben über die Rolle bestimmter Regionen und deren Veränderungen im Zuge bestimmter Erkrankungen.

Damit wird es möglich werden, noch genauer zum Einen die Wirkung von Substanzen zu beleuchten, die bei physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen in der Zelle entstehen, wie z. B. Fruktosediphosphat, zum Anderen aber auch den Einfluss von Pharmaka auf den Ryanodinrezeptor-Calciumkanal.

Da es gerade in letzter Zeit interessante Untersuchungen des kardialen Ryanodinrezeptors zur Herzinsuffizienz (Marx et al., 2000) und zu genetisch bedingten Herzrhythmusstörungen (Bauce et al., 2002, Laitinen et al., 2001) gab, werden weitere Projekte folgen müssen, die sowohl die biophysikalischen Eigenschaften des Kanals beleuchten als auch mit Hilfe dieser Daten die physiologischen und pathophysiologischen Zusammenhänge aufzeigen. Daher gewinnt der Ryanodinrezeptor auch für die klinische Forschung immer mehr an Bedeutung.

5. Zusammenfassung

Der Ryanodinrezeptor-Calciumkanal (RyR) ist ein intrazellulärer Calciumkanal, der in den meisten Zelltypen zu finden ist und die Membran des sarkoplasmatischen bzw. endoplasmatischen Retikulums durchsetzt, das als intrazellulärer Calciumspeicher fungiert. Er ist für die Freisetzung von Calcium aus diesem Speicher in die Zelle verantwortlich.

Von diesem Kanalprotein gibt es drei Isoformen, wobei der RyR Typ 1 vor allem im Skelettmuskel vorkommt, während der RyR Typ 2 im Herzmuskel vorherrscht. Die Isoformen unterscheiden sich dabei vermutlich kaum in der Struktur der Pore(n), sondern hauptsächlich in den regulatorischen Regionen.

Da mindestens diese beiden Isoformen mit Krankheiten in Zusammenhang gebracht werden konnten, ist die Aufklärung der Struktur dieser Kanäle auch von klinischer Bedeutung.

Daher wurden in dieser Arbeit Versuche mit der Bilayermethode durchgeführt. Denn mit dieser Technik werden Kanalproteine in eine Lipidmembran eingefügt und dann elektrophysiologisch untersucht, indem der Strom durch den Kanal gemessen wird. Dabei können die Amplitude des Stroms, die Leitfähigkeit des Kanals für unterschiedliche Ionen, aber auch die Offenzeiten und die Offenwahrscheinlichkeit des Proteins erfasst werden. Auf diese Weise ist es möglich, mit geeigneten Ladungsträgern und Modulatoren des Kanals die Wirkung von verschiedenen Substanzen auf das Verhalten des Proteins und seine Struktur zu untersuchen.

Um mit der Bilayermethode speziell Aussagen über den kardialen RyR machen zu können und die Möglichkeit zu haben, mit Knockout-Modellen spezifische Fragen nach der Struktur oder nach pathologischen Veränderungen, wie z.B. der Herzinsuffizienz, zu bearbeiten, wurde zuerst ein Präparat aus murinen Herzen entwickelt, das Vesikel aus der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums enthielt. Denn in der Literatur sind bisher keine Bilayerexperimente mit kardialen RyR-Präparaten von Mäusen beschrieben. Zunächst konnte der RyR Typ 2 mittels Westernblot in den Vesikeln des Sarkoplasmatischen Retikulums nachgewiesen werden.

Diese Vesikel wurden dann mit der Bilayermethode untersucht, und es konnte festgestellt werden, dass die grundlegenden Charakteristika des murinen RyR Typ 2 mit denen anderer Säugetiere übereinstimmten. Im Einzelnen ergaben die Basisuntersuchungen des Kanals in

Bilayern eine Leitfähigkeit für Barium von 117,95 +/- 8,90 pS und für Caesium eine von 528,28 +/- 11,43pS. Wurde die Offenwahrscheinlichkeit bei unterschiedlichen Calciumkonzentrationen gemessen, ergab sich mit beiden Ladungsträgern ein Maximum bei einem pCa von 4.

Danach wurden mit diesem Präparat Versuche unternommen mit zwei Zielen, nämlich zum Einen die Beantwortung der Frage, ob sich die Pore des Skelettmuskeltyps hinsichtlich des Gehalts reaktiver Cysteinreste von dem des Herzmuskeltyps unterscheidet, und zum Anderen die Erarbeitung von Hinweisen über die Anzahl der Poren pro Kanal, die den Leitungsweg für die Calciumionen bildet bzw. bilden.

Daher wurden Experimente mit dem Reagenz MTSEA⁺ durchgeführt, die Quinn et al. (1997) in ähnlicher Weise am Skelettmuskeltyp des RyR vorgenommen hatten, denn dieses reagiert spezifisch mit den Cysteinresten des Calciumkanals und liefert deshalb einerseits Informationen über das Vorhandensein von Cysteinresten im Kanal und Hinweise über die Anzahl der Pore(n), andererseits gibt es im Vergleich mit der Arbeit von Quinn et al. (1997) auch Aufschluss über die mutmaßliche strukturelle Ähnlichkeit zwischen den Porenregionen der Isoformen 1 und 2.

Bei der Zugabe von MTSEA⁺ zur Cisseite des kardialen Calciumkanals konnte, ähnlich wie bei Quinn et al., allerdings mit zwei verschiedenen Ladungsträgern, eine stufenweise Abnahme der Amplitude des RyR Typ 2 festgestellt werden, die auf die Reaktion des MTSEA⁺ mit den Cysteinresten in der Pore des Kanals zurückzuführen ist und die Schlussfolgerungen zulässt, dass die Porenregion des kardialen RyR der des Skelettmuskeltyp-Kanals ähnlich ist und aus einem gemeinsamen Leitungsweg für die Calciumionen besteht, der sich aus den vier Untereinheiten des RyR zusammensetzt.

6. Literaturverzeichnis

Akabas MH, Stauffer DA, Xu M, Karlin A (1992). Acetylcholine receptor channel structure probed in cysteine-substitution mutants. *Science*, 258, 307-310.

Akabas MH, Kaufmann C, Archdeacon P, Karlin A (1994). Identification of acetylcholine receptor channel-lining residues in the entire M2 segment of the α subunit. *Neuron*, 13, 919-927.

Bauce B, Rampazzo A, Basso C, Bagattin A, Daliento L, Tiso N, Turrini P, Thiene G, Danieli GA, Nava A (2002). Screening for ryanodine receptor type 2 mutations in families with effort-induced polymorphic ventricular arrhythmias and sudden death. Early diagnosis of asymptomatic carriers. *J Am Coll Cardiol*, 40 (2), 341-349.

Belshaw D, Gao L, Meissner G (1999). Luminal loop of the ryanodine receptor: a pore-forming segment ? *Proc Natl Acad Sci USA*, 96, 3345 - 3347.

Belshaw DM, Xu L, Yamaguchi N, Pasek DA, Meissner G (2001). Calmodulin binding and inhibition of cardiac muscle calcium release channel (ryanodine receptor). *J Biol Chem*, 276 (23), 20144-53.

Bezprozvanny I, Watras J, Ehrlich BE (1991). Bell-shaped calcium response curves of $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -reticulum of cerebellum, *Nature*, 351, 751-754.

Bezprozvanny I B, Ondrias K, Kaftan E, Stoyanovsky A, Ehrlich BE (1993). Activation of the calcium release channel (ryanodine receptor) by heparin and other polyanions is calcium dependent, *Molecular Biology of the Cell*, 4, 347-352.

Bidasee KR, Nallani K, Besch HR Jr, Dincer UD (2003 a). Streptozotocin-induced diabetes increases disulfide bond formation on cardiac ryanodine receptor (RyR2). *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 305 (3):989-98.

Bidasee KR, Nallani K, Yu Y, Cocklin RR, Zhang Y, Wang M, Dincer UD, Besch HR (2003 b). Chronic diabetes increases advanced glycation end products on cardiac ryanodine receptors/calcium-release channels. *Diabetes*, 52 (7): 1825-36.

Bidasee KR, Nallani K, Henry B, Dincer UD, Besch HR Jr (2003 c). Chronic diabetes alters function and expression of ryanodine receptor calcium-release channels in rat hearts. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 249 (1-2): 113-23.

Borgatta L, Watras J, Katz AM, Ehrlich BE (1991). Regional differences in calcium-release channels from heart, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 88, 2486-2489.

Brillantes A-MB, Ondrias K, Scott A, Kobrinsky E, Ondriasova E, Moschella MC, Jayaraman T, Landers M, Ehrlich BE, Marks AR (1994). Stabilisation of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK506-binding protein, *Cell*, 77, 513-523.

Cohen FS, Niles WD (1993). Reconstituting channels into planar membranes: a conceptual framework and methods for fusing vesicles to planar bilayer phospholipid membranes, *Methods Enzymol*, 220, 50-68.

Coronado R, Kawano S, Lee CJ, Valdivia C, Valdivia HH (1992). Planar bilayer recording of ryanodine receptors of sarcoplasmic reticulum, *Methods Enzymol*, 207, 699-707.

Darszon A (1986). Planar bilayers: a powerful tool to study membrane proteins involved in ion transport, *Methods Enzymol*, 127, 486-502.

Diaz ME, Trafford AW, O'Neill SC, Eisner DA (2000). Can changes of ryanodine receptor expression affect cardiac contractility ? *Cardiovasc Res*, 45, 1068-1069.

Dulhunty A, Haarmann C, Green D, Hart J (2000). How many cysteine residues regulate ryanodine receptor channel activity ? *Antioxid Redox Signal*, 2 (1), 27-34.

Eager KR, Dulhunty AF (1999). Cardiac ryanodine receptor activity is altered by oxidizing

reagents in either the luminal or cytoplasmic solution, *J Membrane Biol*, 167, 205-214.

Ehrlich BE (1992). Incorporation of ion channels in planar lipid bilayers:How to make bilayers work for you, *The Heart and Cardiovascular System*, Second Edition, 551-560.

Ehrlich BE, Bezprozvanny I (1994). Intracellular calcium release channels, *Chin J Physiol*, 37, 1-7.

Fan J-S, Palade P (1999). One calcium ion may suffice to open the tetrameric cardiac ryanodine receptor in rat ventricular myocytes, *Journal of physiology*, 516, 769 - 780.

Favre I, Sun Y-M, Moczydlowski E (1999). Reconstitution of native and cloned channels into planar bilayers, *Methods Enzymol*, 294, 287-304.

Feng W, Liu G, Xia R, Abramson JJ, Pessah IN (1999). Site-selective modification of hyperreactive cysteines of ryanodine receptor complex by quinones, *Mol Pharm*, 55, 821 -831.

Feng W, Liu G, Allen PD, Pessah IN (2000). Transmembrane redox sensor of ryanodine receptor complex, *J Biol Chem*, 275, 35902-35907.

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

Fruen BR, Bardy JM, Byrem TM, Strasburg GM, Louis CF (2000). Differential Ca²⁺ sensitivity of skeletal and cardiac muscle ryanodine receptors in the presence of calmodulin. *Am J Physiol Cell Physiol*, 279, C724-C733.

Ganong WF, Lange J, Lange D (1997). The general & cellular basis of medical physiology. In: *Review of medical physiology*, a Lange medical book, Appleton & Lange , Stamford, Connecticut, eighteenth edition, S. 36.

Giannini G, Conti A, Mammarella S, Scrobogna M, Sorrentino V (1997). The ryanodine

receptor / calcium release channel genes are widely and differentially expressed in murine brain and peripheral tissues. *J Cell Biol*, 7, 500-509.

Guse AH (2000). Cyclic ADP-ribose, *J Mol Med*, 78, 26-35.

Gyorke I, Gyorke S (1998) Regulation of the cardiac ryanodine receptor channel by luminal Ca^{2+} involves luminal Ca^{2+} sensing sites, *Biophys J*, 75, 2801-2810.

Hasenfuss G (1998). Alterations of calcium-regulatory proteins in heart failure, *Cardiovasc Res*, 37, 279-289.

Hasenfuss G, Pieske B (2002). Calcium cycling in congestive heart failure. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 34 (8), 951-69.

Hayek SM, Zhu X, Bhat MB, Zhao J, Takeshima H, Valdivia HH, Ma J (2000). Characterization of a calcium-regulation domain of the skeletal-muscle ryanodine receptor. *Biochem J*, 351, 57-65.

Kaftan E., Marks AR, Ehrlich BE (1996). Effects of rapamycin on ryanodine receptor / Ca^{2+} release channels from cardiac muscle, *Circ Res*, 78, 990-997.

Karlin A, Akabas MH (1998). Substituted-cysteine accessibility method, *Methods Enzymol*, 293, 123-145.

Kermode H, Chan WM, Williams AJ, Sitsapesan R (1998). Glycolytic pathway intermediates activate cardiac ryanodine receptors, *FEBS lett*, 431, 59-62.

Koolman J, Roehm KH, 1998, Zellorganellen. In: Taschenatlas der Biochemie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 2. überarbeitete und erweiterte Auflage, S. 192 - 193.

Koulen P, Ehrlich BE (2000). Reversible block of the calcium release channel / ryanodine receptor by protamine, a heparine antidote, *Molecular Biology of the Cell*, 11, 2213-2219.

Koulen P, Janowitz T, Johenning FW, Ehrlich BE (2001 a). Characterization of the calcium-release channel/ryanodine receptor from zebrafish skeletal muscle, *J Membr Biol*, 183 (3), 155-163.

Koulen P, Thrower EC (2001 b). Pharmacological modulation of intracellular Ca^{2+} channels at the single-channel level, *Mol Neurobiol*, 24 (1-3), 65-86.

Krysinki P, Tien HT, Ottova A (1999). Charge-transfer processes and redox reactions in planar lipid monolayers and bilayers, *Biotechnol Prog*, 15, 974-990.

Labarca P, Latorre R (1992). Insertion of ion channels into planar lipid bilayers by vesicle fusion, *Methods Enzymol*, 207, 447-463.

Laitinen PJ, Brown KM, Piippo K, Swan H, Devaney JM, Brahmabhatt B, Donarum EA, Marino M, Tiso N, Viitasalo M, Toivonen L, Stephan DA, Kontula K (2001). Mutations of the cardiac ryanodine receptor (RyR2) gene in familial polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation*, 103 (4), 485-490.

Lehnart SE, Schillinger W, Pieske B, Prestle J, Just H, Hasenfuss G (1998). Sarcoplasmic reticulum proteins in heart failure, *Ann NY Acad Sci*, 853, 220-230.

Mackrill JJ (1999). Protein-protein interactions in intracellular Ca^{2+} -release channel function, *Biochem J*, 337, 345-361.

Marks AR, Fleischer S, Tempst P (1990), Surface topography analysis of the ryanodine receptor/junctional channel complex based on proteolysis sensitivity mapping. *J Biol Chem*, 265, 13143 - 113149.

Marks AR (2000). Cardiac intracellular calcium release channels: role in heart failure, *Circ Res*, 87, 8-11.

Marks AR, Priori S, Memmi M, Kontula K, Laitinen PJ (2002). Involvement of the cardiac ryanodine receptor/calcium release channel in catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Journal of Cellular Physiology*, 190 (1), 1-6.

Marx SO, Ondrias K, Marks AR (1998). Coupled gating between individual skeletal muscle Ca^{2+} release channels (ryanodine receptors), *Science*, 281, 818-821.

Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Jayaraman T, Burkhoff D, Rosemblyt N, Marks AR (2000). PKA Phosphorylation dissociates FKBP 12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor) : defective regulation in failing hearts, *Cell*, 101, 365-376.

Marx SO, Gaburjakova J, Gaburjakova M, Henrikson C, Ondrias K, Marks AR (2001). Coupled gating between cardiac calcium release channels (ryanodine receptors), *Circulation Research*, 88 (11), 1151-8.

Michalak M, Dupraz Ph, Shohan-Barmatz V (1988). Ryanodine binding to sarcoplasmic reticulum membrane; comparison between cardiac and skeletal muscle, *Biochim Biophys Acta*, 939, 587-594.

Mirzabekov TA, Silberstein AY, Kagon BL (1999). Use of planar lipid bilayer membranes for rapid screening of membrane active compounds, *Methods Enzymol*, 294, 661-674.

Movsesian MA (1998). c-AMP-mediated signal transduction and sarcoplasmic reticulum function in heart failure, *Ann NY Acad Sci*, 853, 231-239.

Mueller P, Rudin DO, Tien HT, Westcott WC (1962). *Nature (London)*, 194, 979.

Nelson TE (2002). Malignant hyperthermia: a pharmacogenetic disease of Ca^{2+} regulation proteins, *Curr Mol Med*, 2 (4), 347-369.

Ogawa Y, Kurebayashi N, Murayama T (2000). Putative roles of type 3 ryanodine receptor isoforms (RyR 3), *Trends Cardiovasc Med*, 10, 65-70.

Ondrias K, Borgatta L, Kim DH, Ehrlich BE (1990). Biphasic effects of Doxorubicin on the calcium release channel from sarcoplasmic reticulum of cardiac muscle, *Circ Res*, 67, 1167-1174.

Otsu K, Willard HF, Khanna VK, Zorzato F, Green NM, Mc Lennan DH (1990). Molecular cloning of cDNA encoding the Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor) of rabbit cardiac muscle sarcoplasmic reticulum, *J Biol Chem*, 265, 13472 -13483.

Prestle J, Janssen PM, Janssen AP, Zeitz O, Lehnart SE, Bruce L, Smith GL, Hasenfuss G (2001). Overexpression of FK506-binding protein FKBP12.6 in cardiomyocytes reduces ryanodine receptor-mediated Ca(2+) leak from the sarcoplasmic reticulum and increases contractility. *Circulation Research*, 88 (2), 188-94.

Quinn KE, Ehrlich BE (1997). Methanethiosulfonate derivatives inhibit current through the ryanodine receptor / channel, *J Gen Physiol*, 109, 255-264.

Quinn KE, Castellani L, Ondrias K, Ehrlich BE (1998). Characterization of the ryanodine receptor/channel of invertebrate muscle, *Am J Physiol* , 274 , R494 - R502.

Radermacher M, Rao V, Grasucci R, Frank J, Timermann AP, Fleischer S, Wagenknecht T (1994). Cryoelectron microscopy and the three-dimensional reconstruction of the calcium release channel/ryanodine receptor from skeletal muscle. *J Cell Biol*, 127, 411 -423.

Reid E, Williamson R (1974). Centrifugation, *Methods Enzymol*, 31, 713 - 733.

Reiken S, Gaburjakova M, Gaburjakova J, He Ki KL, Prieto A, Becker E, Yi Gh GH, Wang J, Burkhoff D, Marks AR (2001). Beta-adrenergic receptor blockers restore cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) structure and function in heart failure. *Circulation*, 104 (23), 2843-2848.

Saeki K, Obi I, Ogiku N, Shigekawa M, Imagawa T, Matsumoto T (2002). Cardioprotective effects of 9-hydroxyellipticine on ischaemia and reperfusion in isolated rat heart, *Jpn J*

Pharmacol, 89 (1), 21-28.

Samsó M, Wagenknecht T (1998). Contributions of electron microscopy and single-particle techniques to the determination of the ryanodine receptor three-dimensional structure, *Journal of structural Biology*, 121, 172-180.

Sharma MR, Penczek P, Grassucci R, Xin H-B, Fleischer S, Wagenknecht T (1998). Cryoelectron microscopy and image analysis of the cardiac ryanodine receptor, *J Biol Chem*, 273, 18429-18434.

Sharma MR, Jeyakumar LH, Fleischer S, Wagenknecht T (2000). Three-dimensional structure of ryanodine receptor isoform three in two conformational states as visualized by cryoelectron microscopy, *J Biol Chem*, 275, 9485-9491.

Shoshan-Barmatz, Ashley RH (1998). The structure, function and cellular regulation of ryanodine-sensitive Ca^{2+} release channels, *Int Rev Cytol*, 183, 185-270.

Shou W, Aghdasi B, Armstrong DL, Guo Q, Bao S, Charng M-J, Mathew LM, Schneider MD, Hamilton SL, Matzuk MM (1998). Cardiac defects and altered ryanodine receptor function in mice lacking FKBP 12, *Nature*, 391, 489-492.

Sitsapesan R, Similarities in the effects of DIDS, DBDS and Suramin on cardiac ryanodine receptor function (1999). *J Membrane Biol*, 168, 159 - 168.

Sorrentino V, Volpe S (1993). Ryanodine receptors: how many, where and why ? *Trends Pharmacol Sci*, 14, 98-103.

Sorrentino V (1995). The ryanodine receptor family of intracellular calcium release channels, *Adv Pharma*, 33, 67-90.

Sorrentino V, Barone V, Rossi D (2000). Intracellular Ca^{2+} release channels in evolution, *Curr Opin Genet Dev*, 10, 662-667.

Stokes DL, Wagenknecht T (2000). Calcium transport across the sarcoplasmic reticulum, structure and function of Ca²⁺-ATPase and the ryanodine receptor, *Eur J Biochem*, 267, 5274-5279.

Strigrow F, Ehrlich BE (1996). Ligand-gated calcium channels inside and out, *Curr Opin Cell Biol*, 8, 490-495.

Strigrow F, Ehrlich BE (1997). Regulation of intracellular calcium release channel function by arachidonic acid and leukotriene B₄, *Biochem Biophys Res Commun*, 237, 413-418.

Sutko JL, Airey JA (1996). Ryanodine receptor Ca²⁺ release channels : Does diversity in form equal diversity in function ? , *Physiol Rev*, 76, 1027-1071.

Suzuki YJ, Ford GD (1999). Redox regulation of signal transduction in cardiac and smooth muscle, *J Mol Cell Cardiol*, 31, 345-353.

Takeshima H, Nishimura S, Matsumoto T, Ishida H, Kangawa K, Minamino N, Matsuo H, Ueda M, Hanaoka M, Hirose T, Numa S (1989). Primary structure and expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor, *Nature*, 339, 439 - 445.

Takeshima H, Iino M, Takekura H, Nishi M, Kuno J, Minowa O, Takano H, Noda T (1994). Excitation-contraction uncoupling and muscular degeneration in mice lacking functional skeletal muscle ryanodine-receptor gene, *Nature*, 369, 556-559.

Takeshima H, Ikemoto T, Nishi M, Nishiyama N, Shimuta M, Sugitani Y, Kuno J, Saito I, Saito H, Endo M , et al. (1996). Generation and characterization of mutant mice lacking ryanodine receptor type 3, *J Cell Biol*, 271, 19649-19652.

Takeshima H, Komazaki S, Hirose K, Nishi M, Noda T, Iino M (1998). Embryonic lethality and abnormal cardiac myocytes in mice lacking ryanodine receptor type 2, *EMBO J*, 17, 3309-3316.

Takeshima H (2002). Intracellular Ca^{2+} store in embryonic cardiac myocytes. *Front Biosci*, 7, d1642-52.

Tanna B, Welch W, Ruest L, Sutko JL, Williams AJ (2001). Ryanoid modification of the cardiac muscle ryanodine receptor channel results in relocation of the tetraethylammonium binding site. *J Gen Physiol*, 117 (5), 385-394.

Thews G, Vaupel P (1997) *Herzfunktion, Elektromechanische Kopplung und Beeinflussung der Herzaktion*. In: "Vegetative Physiologie", Springer Verlag, 3. Auflage, S. 106.

Tien HT, Salamon Z, Ottova A (1991). Lipid bilayer-based sensors and biomolecular electronics. *Crit Rev Biomed Eng*, 18 (5), 323-340.

Tijkskens P, Meissner G, Franzini-Armstrong C (2003). Location of ryanodine and dihydropyridine receptors in frog myocardium. *Biophysical Journal*, 84 (2Pt1), 1079-92.

Tinker A, Williams AJ (1992). Divalent cation conduction in the ryanodine receptor channel of sheep cardiac muscle sarcoplasmic reticulum, *J Gen Physiol*, 100, 479-493.

Tiso N, Stephan DA, Nava A, Bagattin A, Devaney JM, Stanchi F, Larderet G, Brahmabhatt B, Brown K, Bauce B, Muriago M, Basso C, Thiene G, Danieli GA, Rampazzo A (2001). Identification of mutations in the cardiac ryanodine receptor gene in families affected with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy type 2 (ARVD2). *Hum Mol Genet*, 10 (3), 189-194.

Uehara A, Yasukochi M, Imanaga I (1996). Modulation of ryanodine binding to the cardiac Ca^{2+} release channel by arachidonic acid, *J Mol Cell Cardiol*, 28, 43-51.

Uehara A, Yasokochi M, Imanaga I, Nishi M, Takeshima H (2002). Store-operated Ca^{2+} entry uncoupled with ryanodine receptor and junctional membrane complex in heart muscle cells. *Cell Calcium*, 31 (2), 89-96.

Valdivia HH, Kaplan JH, Ellis-Davis GCR, Lederer WJ (1995). Rapid adaptation of cardiac ryanodine receptors: modulation by Mg^{2+} and phosphorylation, *Science*, 267, 1997-2000.

Wagenknecht T, Samsó M (2002). Three-dimensional reconstruction of the ryanodine receptors. *Front Biosci*, 7, d1464-1474.

Wang S-Q, Song L-S, Lakatta EG, Cheng H (2001). Ca^{2+} signalling between single L-type Ca^{2+} channels and ryanodine receptors in heart cells, *Nature*, 440, 592-596.

Williams AJ (1997). The functions of two species of calcium channels in cardiac muscle excitation-contraction coupling, *Eur Heart J*, 18, A27-A35.

Williams AJ (2002). Ion conduction and selectivity in the ryanodine receptor channel. *Front Biosci*, 7, d1223-1230.

www.warnerinstruments.com

www.trc-canada.com

Xu L, Tripathy A, Pasek DA, Meissner G (1998). Potential for pharmacology of ryanodine receptor / calcium release channels, *Ann NY Acad Sci*, 853, 130-148.

Xu K, Tavernarakis N, Driscoll M (2001). Necrotic cell death in *C. elegans* requires the function of calreticulin and regulators of Ca^{2+} release from the endoplasmic reticulum. *Neuron* 31 (6), 957-71.

Yang HT, Tweedie D, Wang S, Guia A, Vinogradova T, Bogdanov K, Allen PD, Stern MD, Lakatta EG, Boheler KR (2002). The ryanodine receptor modulates the spontaneous beating rate of cardiomyocytes during development, *Proc Natl Acad Sci USA*, 99 (14), 9225-9230.

Zhang X, Klein AL, Alberle NS, Norby FL, Ren BH, Duan J, Ren J (2003). Cardiac-specific overexpression of catalase rescues ventricular myocytes from ethanol-induced cardiac contractile

defect. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 35 (6), 645-52.

Zhao F, Chen SRW, Louis CF, Fruen BR (2001). Dantrolene inhibition of ryanodine receptor Ca^{2+} release channels. Molecular mechanism and isoform selectivity, *J Biol Chem*, 276 (17), 13810-6.

Zucchi R, Ronca-Testoni S, Yu G, Galbani P, Ronca G, Mariani M (1994). Effect of ischaemia and reperfusion on cardiac ryanodine receptors-sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} channels, *Circ Res*, 74, 271-280.

7. Danksagung

Sehr herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. med. Eckhard Alt dafür, dass er diese Doktorarbeit ermöglicht und unterstützt hat.

An dieser Stelle möchte ich mich ebenso ganz herzlich bei Herrn Dr. Peter Koulen sowohl für die Betreuung der Doktorarbeit im Labor in Yale als auch für seine große Hilfsbereitschaft in New Haven bedanken. Zudem bin ich Herrn Dr. Peter Koulen sehr dankbar für seine Hilfe bei der Überarbeitung des Skripts.

Weiterhin gilt mein Dank Frau Dr. Barbara Ehrlich, Herrn Dr. Edmond Buck, Herrn Dr. Edwin Thrower, Frau Juliana Rengifo und Frau Brenda De Gray für ihre freundliche Unterstützung im Labor.

Auch meiner Gastfamilie in New Haven, Susan, Bob und Susannah Frew, bin ich zu großem Dank verpflichtet.

Zuletzt möchte ich allerdings meinen allergrößten Dank meiner Familie aussprechen, die mich immer unterstützt.

8. Verzeichnis häufig verwendeter Abkürzungen

DHPR	Dihydropyridinrezeptor-Calciumkanal
ER	endoplasmatisches Retikulum
FKBP	FK506-bindendes Protein
IP ₃	Inositoltriphosphat
PKA	Phosphokinase A
P(O)	Offenwahrscheinlichkeit
RyR	Ryanodinrezeptor-Calciumkanal
SDS	Natriumlaurylsulfat, englisch: sodium dodecyl sulfate
SERCA	Calcium-ATPase des SR/ER
SR	sarkoplasmatisches Retikulum