

Einfluß von einigen Elektrolyten auf die Herzglykosid- und β -Blocker-Bindung an ihren membrangebundenen Rezeptor

W. Krawietz / M. Pruchniewski / E. Erdmann

Medizinische Klinik I der Universität München, Klinikum Großhadern (Direktor: Prof. Dr. G. Riecker)

Durch Verwendung von radioaktiv markierten Pharmaka ist es möglich geworden, Untersuchungen über das Bindungsverhalten von Herzglykosiden und β -Rezeptor-Blockern an ihre membrangebundenen Rezeptoren durchzuführen. Die Affinität von Herzglykosiden zum Herzglykosidrezeptor kann durch Mg^{2+} gesteigert werden, während K^+ möglicherweise über eine Konformationsänderung der Membran die Affinität unter Beibehaltung der Bindungskapazität senkt.

Einleitung

Der pharmakologischen Wirkung von Herzglykosiden und β -adrenergen Antagonisten geht eine spezifische Bindung an ihre Rezeptoren voraus. β -Rezeptor und Herzglykosidrezeptor stellen umschriebene Membranstrukturen dar und vermitteln auf molekularer Ebene die Wirkung dieser Pharmaka.

Durch die Einführung von radioaktiv markierten β -Blockern und radioaktiv markierten Herzglykosiden wurde es möglich, einige Eigenschaften beider Rezeptortypen zu charakterisieren. Für den β -adrenergen Rezeptor läßt sich eine enge Verbindung mit der Adenylatzyklase aufzeigen, woraus sich die Vorstellung eines β -Rezeptor-gekoppelten Adenylatzyklasesystems entwickelte [1 bis 4]. Herzglykoside erwiesen sich als sehr spezifische Inhibitoren der membrangebundenen, eng mit dem aktiven Kationentransport verknüpften $(Na^+ + K^+)$ -ATPase, so daß der Digitalisrezeptor als Teil des aktiven Na^+ - und K^+ -Transportsystems angesehen werden muß [5 bis 8].

Durch biochemische Methoden ist es gelungen, die Spezifität dieser Rezeptoren für bestimmte Pharmaka nachzuweisen. Die Affinität der Pharmaka zu ihrem Rezeptor, gemessen an den Affinitätskonstanten, entspricht den Konzentrationen, die von Plasmaspiegelbestimmungen bekannt sind.

Die Herzglykosidrezeptor-gekoppelte $(Na^+ + K^+)$ -ATPase benötigt zur Aktivierung mehrere Elektrolyte gemeinsam und in unterschiedlicher Konzentration [9]. Ein Mangel an K^+ z.B. führt zur Hemmung dieses Mem-

branzym, ebenso wie dies nach Einwirkung von Herzglykosiden beobachtet wird. Bei Hypokaliämien z. B. als Folge einer Diuretika-, Laxantien- oder Kortikoidtherapie werden in der Klinik häufig Symptome einer Digitalisintoxikation beobachtet. Wir haben daher die Auswirkungen von Elektrolyten auf die Pharmakon-Rezeptor-Bindung und ihre Beeinflussung der Rezeptor-gekoppelten Enzymaktivität untersucht.

Während die Beeinflussung des β -Rezeptors durch Mg^{2+} keinen spezifischen Effekt zeigt, wird die β -Rezeptor-gekoppelte Adenylatzyklase Mg^{2+} -abhängig in ihrer basalen und $Gpp(NH)_p$ -Isoprenalin-stimulierten Aktivität erheblich gesteigert. Die im molekularen Bereich gewonnenen Erkenntnisse ermöglichen Einblicke in die Wirkungsmechanismen von Pharmaka.

Material und Methodik

1. *Herzglykosidrezeptor und $(Na^+ + K^+)$ -ATPase*
 3H -Ouabain (g-Strophanthin) mit einer spezifischen Aktivität von 12 Ci/mmol war von New England Nuclear, Dreieichenhain. *Membranpräparation:* Herzmuskelzellmembranen aus Ventrikelmuskulatur wurden nach Matsui und Schwarz [10] angereichert. Die Aktivität der $(Na^+ + K^+)$ -aktivierbaren ATPase wurde im optisch gekoppelten Test nach Schoner et al. [11] gemessen. Eine Enzymeinheit (U) ist definiert als der Umsatz von $1\mu\text{mol}$ ATP pro Minute bei 37°C . Protein wurde nach Lowry et al. [12] bestimmt, mit Rinderserumalbumin als Standard. *Messung der 3H -Ouabain-Bindung:* Da die Bindungsstellen für Herzglykoside membrangebunden sind, gelingt es, das nach der Inkubation rezeptorgebundene von nicht rezeptorgebundenem Strophanthin durch Ultrazentrifugation zu trennen. Von der gesamten membrangebundenen Menge an 3H -Ouabain wird die Menge abgezogen, die sich nicht durch hohe Konzentrationen (10^{-4} M) unmarkierten Strophanthins verdrängen läßt (= unspezifische Bindung). Das Resultat wird als „spezifische Bindung“ definiert. Für eine ausführliche Be-

schreibung der Methodik wird auf frühere Arbeiten verwiesen [7, 11, 13].

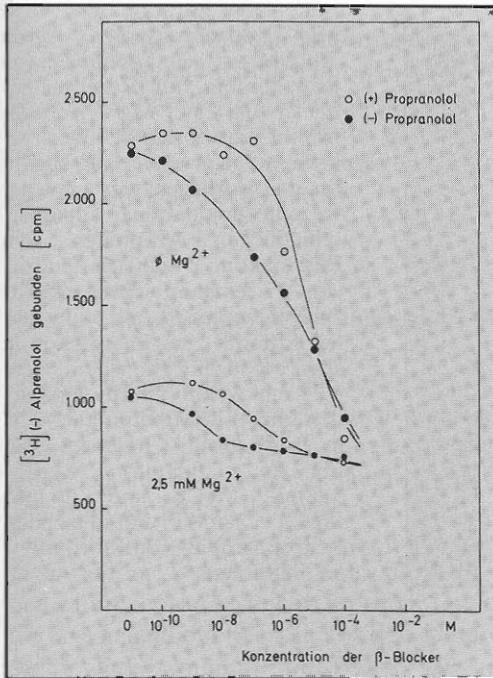


Abbildung 1 Stereospezifische Verdrängung von ^3H -Alprenolol aus seinen Bindungsstellen in Herzmuskelzellmembranen durch Propranolol. Die stereospezifische Wirkung der Isomeren des β -adrenergen Antagonisten ist unabhängig von der Mg^{2+} -Konzentration. Die spezifische und unspezifische Bindungskapazität für den radioaktiv markierten β -adrenergen Antagonisten werden jedoch erhöht. 0,6 bis 0,9 mg Protein (Herzmuskelzellmembran) wurden bei 37°C in 75 mM Tris-HCl, pH 7,4, 25 mM MgCl_2 mit (-) und (+)-Propranolol und ^3H -Alprenolol über 4 Minuten inkubiert

2. β -adrenerger Rezeptor und Adenylatzyklase

Material: Die für den Adenylatzyklase-Assay und die Rezeptorbindungsstudien verwendeten Substanzen sind an anderer Stelle beschrieben [14].

Membranpräparation: Männliche Meerschweinchen (300 bis 500 g Gewicht) wurden durch Genickschlag getötet, die Herzen rasch entnommen, von Bindegewebe, Vorhöfen und Blut in 0,9%iger NaCl-Lösung gesäubert. Anschließend wurden die Ventrikel zerschnitten, und ein Membranhomogenat wurde nach der Methode von Drummond und Severson [15] sowohl für die β -Rezeptor-Bindungs-Experimente als auch für die Adenylatzyklase-Aktivitätsmessung verwendet.

Adenylatzyklase-Assay: Eine 2-Schritt-Inkubation wurde für die konzentrationsabhängigen Messungen verwendet. Beim ersten Schritt (10 Minuten bei 0°C) wurden Herzmuskelzellmembranen in Abwesenheit der Adenylatzyklasereagenzien unter Zugabe von Agonisten, Antagonisten und $\text{Gpp}(\text{NH})_p$ inkubiert. Adenylatzyklasereagenzien wurden am Ende der Vorinkubation zugegeben und während des zweiten Schrittes bei 37°C über 10 Minuten inkubiert. Die Endkonzentration der Reagenzien ist: 1 mM MgCl_2 , 5 mM Kreatinphosphat, 0,33 mM EDTA, 0,66 mM Dithiothreitol, 1 mM cyclic-AMP, 2 mM Isobutylmethylxanthin, Tris-HCl-Puffer, pH 7,8, 0,25 mM ^{32}P -ATP (20 bis 40 cpm/pmol). Das Endvolumen beträgt 60 μl , und die Konzentration der Herzmuskelzellmembranen beträgt 1,0 bis 5,0 mg/ml. Die Reaktion wurde beendet und ^{32}P -cAMP nach der Methode von Salomon [16] isoliert. Die Aktivität der Adenylatzyklase wird in Picomole cAMP/mg Prot. \times 10 min ausgedrückt.

Rezeptorbindungsversuche: Frische Membransuspension (1,4 bis 2,0 mg Prot./ml) wurde bei 37°C in 75 mM Tris-HCl, pH 7,4, 25 mM MgCl_2 mit verschiedenen β -

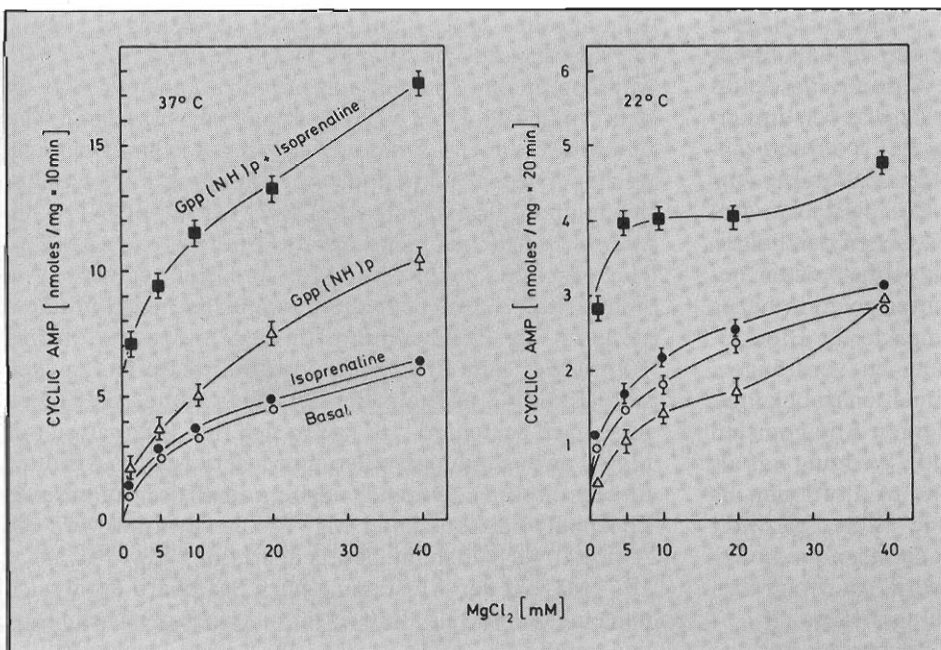


Abbildung 2 Abhängigkeit der Adenylatzyklaseaktivität der Herzmuskelzellmembranen von Temperatur und verschiedenen Magnesiumkonzentrationen. Die Konzentration von $\text{Gpp}(\text{NH})_p$ beträgt $7 \mu\text{M}$, die von Isoprenaline $12 \mu\text{M}$ (Inkubationsbedingungen siehe „Methodik“)

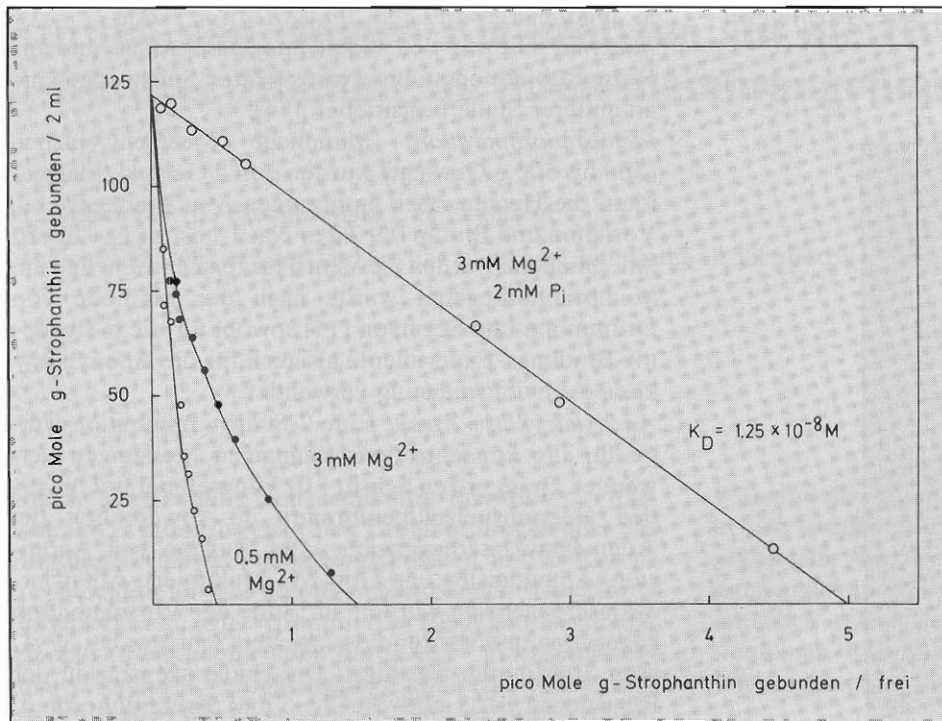


Abbildung 3 Abhängigkeit der g-Strophanthin-Bindung von der Mg^{2+} -Konzentration. Bei einer Mg^{2+} -Konzentration von 3,0 mM ist die Affinität von Strophanthin zum Rezeptor höher als bei einer Mg^{2+} -Konzentration von 0,5 mM. Der gekrümmte Kurvenverlauf spricht für das Vorliegen verschiedener Rezeptorpopulationen mit unterschiedlichen Affinitäten zum Pharmakon. Durch die Zugabe von Pi entsteht eine einheitliche Rezeptorart mit konstanter Affinität zum Pharmakon in allen Konzentrationsbereichen. 0,27 mg Membranprotein wurden über 120 Minuten bei 37 °C in 50 mM Imidazol-HCl, pH 7,25, 0,5 mM $MgCl_2$, 3,0 mM $MgCl_2$ und 3,0 mM $MgCl_2$ + 2 mM Pi und steigenden g-Strophanthin-Konzentrationen inkubiert

Rezeptor-blockierenden Substanzen in 1 ml Endvolumen für 4 Minuten inkubiert. Durch rasche Filtration (Whatman GF/C) und Nachspülen mit 20 ml Pufferlösung wurden gebundener und nichtmembrangebundener Anteil des radioaktiv markierten β -Blockers getrennt. Die an die Zellmembran gebundene Radioaktivität wurde mittels Flüssigkeitsszintillationszählung gemessen. Die unspezifische Bindung wurde in Gegenwart von 10^{-5} M Propranolol bestimmt [17].

Ergebnisse

Die Dissoziationskonstanten radioaktiv markierter β -Blocker für ihre Rezeptorbindung an Herzmuskelzellmembranen liegen im Bereich von 10^{-9} M [14]. Dieser niedrige Konzentrationsbereich für die halbmaximale Rezeptorbindung weist auf die hohe Affinität dieses Rezeptors für die β -Blocker hin. Durch Zugabe von unmarkierten β -adrenergen Antagonisten, z.B. (+)- und (-)-Propranolol, ist es möglich, den markierten Blocker vom Rezeptor zu verdrängen (Abb. 1). Die β -Blocker-Rezeptor-Bindung ist also reversibel. Zwischen den beiden isomeren Formen des β -adrenergen Antagonisten besteht ein etwa 100facher Wirkungsunterschied in bezug auf die Fähigkeit nicht radioaktiv markierter Blocker, markierte Blocker aus ihrer Bindung zu verdrängen. Auch aus pharmakologischen Experimenten ist bekannt, daß die (+)-isomere Form der adrenergen Antagonisten eine 100fach geringere β -blockierende Wirkung hat als die (-)-isomere Form. Bei höheren Konzentrationen als 10^{-5} M besteht offensichtlich keine Stereospezifität mehr (Abb. 1). Wenn trotzdem der gebundene radioaktiv markierte Antagonist verdrängt wird, so erfolgt dies aus vorwiegend unspezifischen Bindungsstellen.

Die abgebildeten Inkubationsversuche wurden mit un-

terschiedlichen Mg^{2+} -Konzentrationen durchgeführt. Fehlt Mg^{2+} im Inkubationsmedium, so werden insgesamt mehr radioaktiv markierte β -Blocker-Moleküle von den Membranen gebunden. Die genaue Betrachtung zeigt, daß gleichermaßen sowohl mehr unspezifische als auch spezifische Bindungsstellen besetzt werden. Die unterschiedliche Affinität der beiden isomeren Formen bleibt aber bestehen. Bei einer Mg^{2+} -Konzentration von 2,5 mM verringert sich der Anteil an spezifischen und an unspezifischen Bindungsstellen.

Die β -Rezeptor-gekoppelte Adenylatzyklase wird in Anwesenheit von Mg^{2+} aktiviert (Abb. 2). Bei 37 °C wird die basale Aktivität von 1,03 nmol cAMP/mg \times 10 min (ohne $MgCl_2$) auf 6,0 nmol cAMP/mg \times 10 min in Anwesenheit von 40 mM $MgCl_2$ gesteigert.

Mit Isoprenalin, einem β -adrenergen Agonisten, und einem Nukleotid, Gpp(NH)_p, vermag eine zusätzliche Aktivierung bis auf 17,5 nmol cAMP/mg \times 10 min erreicht werden. Diese Effekte sind, wie Abbildung 2 zeigt, deutlich temperaturabhängig: Bei 22 °C wirkt Gpp(NH)_p bis 20 mM $MgCl_2$ hemmend auf die Bildung von cAMP. Herzglykoside haben ohne Mg^{2+} nur eine schwache Affinität ($K_D = 2600$ nM) zu ihrer spezifischen Bindungsstelle an der Zellmembran. In Gegenwart von 0,5 bis 10 nM Mg^{2+} nimmt die Rezeptoraffinität für Herzglykoside ($K_D = 48$ nM) zu. Bei der Auftragung der Ergebnisse nach Scatchard [18] lassen sich (bei Inkubation mit Mg^{2+}) zwei Bindungsstellen mit differierender Affinität finden (Abb. 3). Durch Zugabe von Pi (anorganisches Phosphat) bei konstanter Mg^{2+} -Konzentration wird die Affinität für Ouabain deutlich erhöht ($K_D = 1,25 \times 10^{-8}$ M); bei der Auftragung nach Scatchard ergibt sich nun eine Gerade als Hinweis für nur eine spezifische Bindungsstelle.

In Gegenwart steigender K^+ -Konzentrationen (Abb. 4) verringert sich die Menge des rezeptorgebundenen Strophanthins deutlich. Dieser Befund läßt einen Antagonismus zwischen der Herzglykosidbindung und Kalium vermuten, gibt für sich allein aber keinen Hinweis darauf, ob die Affinität des Pharmakons zum Rezeptor oder die Zahl der Bindungsstellen für Ouabain verändert sind. Durch Bestimmung der Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeiten [19] konnte gezeigt werden, daß in Gegenwart von K^+ eine geringere Affinität des Rezeptors für Strophanthin besteht.

Diskussion

Durch radioaktiv markierte Pharmaka ist es in den letzten Jahren möglich geworden, spezifische Bindungsstellen auf verschiedenen Zelloberflächen zu lokalisieren. Verglichen mit bisher möglichen physiologischen Messungen von Effekten, bedeuten die Untersuchungen von Bindungskinetiken eine genauere Analyse des ersten Schrittes der Pharmakonwirkung. Die Bindung der Substanz an ihren Rezeptor ist z. B. durch Elektrolyte stark beeinflussbar. Durch Mg^{2+} kann die Affinität zum Herzglykosidrezeptor gesteigert werden. Diese Affinitätsänderung gegenüber Herzglykosiden könnte bedingt sein durch Konformationsänderungen des Rezeptorproteins. Es wäre vorstellbar, daß Mg^{2+} und einwertige Kationen das Gleichgewicht zwischen diesen Konformationszuständen ändern [9]. Bestätigt wird diese Annahme in der Auftragung nach Scatchard für die unterschiedlichen Ionenkonzentrationen und -zusammensetzungen im Inkubationsmedium. Bei niedriger Mg^{2+} -

Konzentration und ohne PO_4^{3-} im Inkubationsmedium sinkt nicht nur die Affinität des Rezeptors zum Herzglykosid, sondern es zeigen sich auch verschiedene Rezeptorpopulationen, erkennbar an dem gekrümmten Kurvenverlauf in Abbildung 3. Durch Zugabe von Phosphat (Pi) zeigt sich nur noch eine hochaffine Bindungsstelle, die Bindungskapazität wird hingegen nicht verringert. Offensichtlich wirken sich also die Elektrolytveränderungen im Sinne einer Affinitätsänderung der Rezeptoren, bedingt durch eine Konformationsänderung der Membranen, aus. Der Gleichgewichtszustand zwischen den Konformationszuständen wird ebenfalls durch Liganden und Substrat der $(Na^+ + K^+)$ -ATPase beeinflusst. Bei Anwesenheit von $(Mg^{2+} + Pi)$ und $(Mg^{2+} + Na^+ + ATP)$ verlagert sich das Gleichgewicht zur hochaffinen Konformation, während der nichtaffine Zustand durch K^+ begünstigt wird [9].

Der β -adrenerge Rezeptor wird in seiner Konformation durch Mg^{2+} wohl nicht verändert. Die Affinität zum Rezeptor bleibt erhalten, ebenso die Spezifität, erkennbar an der unterschiedlichen Affinität von (+)- und (-)-isomerer Form des β -adrenergen Antagonisten. Spezifische und unspezifische Bindungskapazität werden jedoch reduziert.

Die β -Rezeptor-gekoppelte Adenylatzyklase wird durch das Nukleotid $Gpp(NH)_p$ und durch Mg^{2+} in der Enzymaktivität beeinflusst. Lefkowitz [20, 21] konnte zeigen, daß $Gpp(NH)_p$ effektiver als GTP die Adenylatzyklase stimuliert, da gebildetes GDP das GTP von der Nukleotidbindungsstelle des Enzyms verdrängt. Bindungsstudien mit 3H - $Gpp(NH)_p$ haben gezeigt, daß dessen eigene Bindungskinetik unabhängig von der Bindung des β -Blockers an den Rezeptor ist. Aus diesen Untersuchungen folgt, daß neben der Nukleotidbindungsstelle des Enzyms eine weitere allosterische Bindungsstelle für Mg^{2+} neben dem katalytischen Zentrum ($ATP \rightarrow cAMP$) besteht. Diese Vorstellung wird durch weitere experimentelle Ergebnisse unterstützt [22, 23]. Die Mg^{2+} -induzierte Aktivierung erfolgt bei diesen rezeptorgekoppelten Enzymsystemen aufgrund bisher vorliegender Befunde über eine Konformitätsänderung des Rezeptors und/oder des Enzyms.

Das genaue Studium der ersten Schritte der Pharmakonwirkung am Beispiel der Pharmakon-Rezeptor-Interaktion ermöglicht Rückschlüsse auf den Wirkungsmechanismus von Medikamenten, dessen Kenntnis zur rationalen Therapie beiträgt.

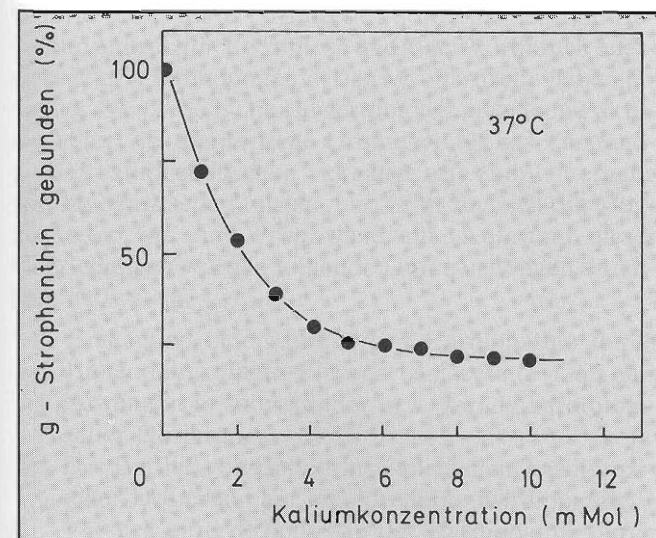


Abbildung 4 Kaliumeffekt auf die Bindung von g-Strophanthin an menschliche Herzmuskelzellmembranen. Veränderungen der Kaliumkonzentrationen führen zu einer entsprechenden Veränderung der Besetzung des Digitalisrezeptors mit 3H -Strophanthin. 0,9 mg Membranprotein wurden inkubiert in einem Medium von 50 mM Imidazol-HCl-Puffer, pH 7,25, 3 mM $MgCl_2$, 3 mM Imidazol-Pi, 4×10^{-9} M 3H -Ouabain und den angegebenen Konzentrationen KCl bei 37 °C für 240 Minuten

Literatur

- [1] Aurbach G. D., S. A. Fedak, C. J. Woodard, J. S. Palmer, D. Hauser, F. Troxler: β -adrenergic receptor: Stereospecific interaction of iodinated β -blocking agent with high-affinity site. *Science* 186, 1223-1224 (1974)
- [2] Lefkowitz R. J., C. Murkherjee, M. Coverstone, M. G. Caron: Stereospecific 3H (-)-alprenolol binding sites, β -adrenergic receptors and adenylate cyclase. *Biochem. biophys. Res. Comm.* 60, 703-709 (1974)
- [3] Bilezikian J. P., G. D. Aurbach: A β -adrenergic receptor of the turkey erythrocyte. *J. biol. Chem.* 248, 5575-5583 (1973)

W. Krawietz et al., Einfluß von einigen Elektrolyten auf die Herzglykosid- und β -Blocker-Bindung

- [4] Kaumann A. J., L. Birnbaumer: Studies on receptor-mediated activation of adenylate cyclase. IV. *J. biol. Chem.* 249, 7874–7885 (1974)
- [5] Schatzmann H. J.: Herzglykoside als Hemmstoffe für den aktiven Kalium- und Natrium-Transport durch die Erythrocytenmembran. *Helv. physiol. pharmacol. Acta* 11, 346–354 (1953)
- [6] Skou J.: Enzymatic basis for active transport of Na^+ and K^+ across cell membrane. *Physiol. Rev.* 45, 586–617 (1965)
- [7] Erdmann E., W. Schoner: Ouabain-receptor interactions in (Na^+ + K^+)-ATPase preparations. IV. The molecular structure of different cardioactive steroids and other substances and their affinity to the glykoside receptor. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 283, 335–356 (1974)
- [8] Repke K., H. J. Portius: Über die Identität der Ionenpumpen-ATPase in der Zellmembran des Herzmuskels mit einem Digitalis-Rezeptorenzym. *Experientia (Basel)* 19, 452–459 (1963)
- [9] Erdmann E., W. Schoner: Ouabain-receptor interactions in (Na^+ + K^+)-ATPase preparations. II. Effect of cations and nucleotides on rate constants and dissociation constants. *Biochim. Biophys. Acta* 330, 302–315 (1973)
- [10] Matsui H., A. Schwartz: Mechanism of cardiac glykoside inhibition of the (Na^+ + K^+)-ATPase from cardiac tissue. *Biochim. Biophys. Acta (Amst.)* 151, 655–663 (1968)
- [11] Schoner W., C. von Ilberg, R. Kramer, W. Seubert: On the mechanism of Na^+ and K^+ -stimulated hydrolysis of adenosine triphosphate. II. Purification and properties of a (Na^+ + K^+)-ATPase from ox brain. *Europ. J. Biochem.* 1, 334–343 (1967)
- [12] Lowry O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. biol. Chem.* 193, 265–275 (1951)
- [13] Erdmann E., W. Schoner: Ouabain-receptor interactions in (Na^+ + K^+)-ATPase preparations from different tissues and species. Determination of kinetic constants and dissociation constants. *Biochim. Biophys. Acta (Amst.)* 307, 386–398 (1973)
- [14] Krawietz W., D. Poppert, E. Erdmann, H. Glossmann, C. J. Struck, C. Konrad: β -adrenergic receptors in Guinea-pig myocardial tissue. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 295, 215–224 (1976)
- [15] Drummond G. J., D. L. Severson: Preparation and characterization of adenylate cyclase from heart and skeletal muscle. *Methods in enzymology (Academic Press)* 38, 143–150 (1974)
- [16] Salomon Y., C. Londons, M. Rodbell: A highly sensitive adenylate cyclase assay. *Anal. Biochem.* 58, 541–548 (1974)
- [17] Krawietz W., M. Weinstein, M. Pruchniewski, E. Erdmann: Properties of specific and unspecific ^3H -alprenolol binding to cardiac cell membranes. 11th FEBS Meeting, Abstract Book, A 122 1/2. Copenhagen 1977
- [18] Scatchard G.: The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann. New Y. Acad. Sci.* 51, 660–672 (1949)
- [19] Erdmann E., P. Presek, R. Swozil: Über den Einfluß von Kalium auf die Bindung von Strophanthin an menschliche Herzmuskelzellmembranen. *Klin. Wschr.* 54, 383–387 (1976)
- [20] Lefkowitz R. J.: Guanosine triphosphate binding sites in solubilized myocardium. Relation to adenylate cyclase activity. *J. biol. Chem.* 250, 1006–1011 (1975)
- [21] Lefkowitz R. J., D. Mullikin, M. G. Caron: Regulation of β -adrenergic receptors by guanyl-5'-yl-imidodiphosphate and other purine nucleotides. *J. Biol. Chem.* 251, 4686–4692 (1976)
- [22] Marcus R., G. D. Aurbach: Adenyl cyclase from renal cortex. *Biochim. Biophys. Acta*, 242, 410–421 (1971)
- [23] Hammes G. G., M. Rodbell: Simple model for hormoneactivated adenylate cyclase systems. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 73, 1189–1192 (1976)

Für die Verfasser: Dr. W. Krawietz, Medizinische Klinik I der Universität München, Klinikum Großhadern, Marchioninistraße 15, 8000 München 70