

Aus dem Institut für Experimentelle und Klinische
Pharmakologie und Toxikologie der Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. M. Schwaninger

Untersuchungen zur
Pharmakologie
spannungsabhängiger
Natriumkanäle
aus
Skelett- und Herzmuskel

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

– Aus der Sektion Medizin –

vorgelegt von

Charlotte Hölscher

aus Georgsmarienhütte

Lübeck 2017

Erklärung

Ich versichere, die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Benutzung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt zu haben.

Berlin, den 15. November 2017

1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Heinrich Terlau
2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. physiol. Martin Tegtmeier
- Tag der mündlichen Prüfung: 24.04.2018

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 24.04.2018

- Promotionskommission der Sektion Medizin -

2.1.4. Geräte	30
2.2. Methoden	32
2.2.1. Molekularbiologische Methoden	32
2.2.1.1. RNA-Synthese	32
2.2.1.2. Transfektion	37
2.2.2. Das Xenopus-Expressionssystem	39
2.2.2.1. Operationstechnik	39
2.2.2.2. Präparation der Oozyten	40
2.2.2.3. Injektion von RNA	40
2.2.3. Elektrophysiologische Methoden	41
2.2.3.1. Zwei-Elektroden-Spannungsklemme	41
2.2.3.2. Patch-Clamp-Messungen	46
2.2.3.3. Statistik	49
3. Ergebnisse	50
3.1. RNA-Synthese	50
3.2. TEVC-Experimente	51
3.2.1. Expression der Natriumkanäle in Oozyten	51
3.2.2. Registrierung von Original-Stromkurven verschiedener Natriumkanal-Isoformen mittels einer Zwei-Elektroden-Spannungsklemme	51
3.2.3. Natrium-Stromblockade durch μ -GIIIA	53
3.2.4. Dosis-Wirkungskurve und Bestimmung der IC_{50}	58
3.3. Patch-Clamp-Experimente	60
3.3.1. Transfektionsergebnisse	61
3.3.2. Registrierung der Originalstromkurve von $mNa_v1.5$ mittels Patch-Clamp-Messungen	61
4. Diskussion	63
4.1. Resistenz kardialer Natriumkanal-Isoformen gegenüber μ -GIIIA	64
4.1.1. Der Conotoxin-Rezeptor	64
4.2. Blockade skelettmuskulärer Natriumkanäle durch μ -GIIIA	68
4.2.1. Die mittlere inhibitorische Toxinkonzentration IC_{50}	68
4.2.2. Lineare vs. kooperative Bindung	70
4.2.3. Morphologische und funktionelle Unterschiede zwischen μ -GIIIA und μ -GIIIB	70
4.2.4. Die Position von μ -GIIIA in der Natriumkanal-Pore	72
4.3. Zusammenfassung	76
A.	91
A.1. Abkürzungsverzeichnis	91

A.2. Danksagung 94

Abbildungsverzeichnis

1.	Das Aktionspotenzial	3
2.	Die α -Untereinheit des Natriumkanals	4
3.	Die S5/S6-Segment-Linkerregion des Natriumkanals	5
4.	Ionenselektivität des Natriumkanals	6
5.	Kugel-Ketten-Modell für die Aktivierung und Inaktivierung eines spannungsgesteuerten Ionenkanals	9
6.	Unterschiede in der Aminosäuresequenz verschiedener Natriumkanal-Subtypen	10
7.	Chromosomale Lokalisation von α - und β -Untereinheiten spannungshängiger Natriumkanäle	11
8.	Strukturformel von Tetrodotoxin (TTX)	16
9.	Organigramm der Conopeptid-Superfamilien und -Familien mit Darstellung ausgewählter Zielstrukturen	17
10.	Aminosäuresequenzen der Conotoxine μ -GIIIA und μ -GIIIB	20
11.	Vektor pSP64T	26
12.	Der elektrophysiologische Messplatz	43
13.	Originalstromkurven von $mNa_v1.4$	52
14.	Originalstromkurven von $mNa_v1.5$	52
15.	Originalstromkurven von $hNa_v1.5$	53
16.	Blockade von $mNa_v1.4$ durch $1 \mu M \mu$ -GIIIA	54
17.	Reversibilität der Blockade von $mNa_v1.4$ durch μ -GIIIA	55
18.	Nettostrom von $mNa_v1.4$ während der Toxinapplikation	55
19.	Keine Blockade von $mNa_v1.5$ durch μ -GIIIA	56
20.	Nettostrom von $mNa_v1.5$ während der Toxinapplikation	56
21.	Keine Blockade von $hNa_v1.5$ durch μ -GIIIA	57
22.	Nettostrom von $hNa_v1.5$ während der Toxinapplikation	58
23.	Annäherungen an eine Dosis-Wirkungskurve	59
24.	Originalstromkurve von $mNa_v1.5$	61
25.	Originalstromkurven von $mNa_v1.5$	62

26.	Aminosäuresequenzvergleich verschiedener Natriumkanal-Isoformen im Bereich des äußeren Carboxylattrings	65
27.	Aminosäuresequenzvergleich verschiedener Natriumkanal-Isoformen im Bereich der DII S5-P-Linkerregion	66
28.	Lösungsstruktur von μ -PIIIA aus drei Blickwinkeln	73
29.	Molekularstruktur von μ -GIIIA und μ -PIIIA	74
30.	Bindungsmodell von μ -GIIIA an die Natriumkanal-Porenregion	75

Tabellenverzeichnis

1. Tabelle 1: Toxin-Bindungsstellen bei spannungsabhängigen Natriumkanälen 14
2. Tabelle 2: Ionenkanal-bindende Conotoxine mit familiärer Zugehörigkeit,
Angriffsort und Disulfid-Muster 18

1. Einleitung

1.1. Elektrische Signalübertragung von Zellen

1.1.1. Historie

Die Anfänge elektrophysiologischer Forschung reichen bis in das achtzehnte Jahrhundert zurück. Luigi Galvani entdeckte gegen Ende des 18. Jahrhunderts einen Zusammenhang zwischen Elektrizität und Muskelkontraktionen, als er präparierte Froschschenkel mit einem Blitzableiter verband [114]. Ernst von Brücke beschrieb vor über 160 Jahren wassergefüllte Poren in Zellmembranen, die den gerichteten transmembranären Transport bestimmter Partikel ermöglichen, und prägte so den Begriff des „Kanals“ [64]. Wilhelm Ostwald hielt 1890 diesen gerichteten Transport geladener Teilchen, den sogenannten Ionenstrom über eine Membran, für den entscheidenden Faktor bei der Vermittlung elektrischer Signale [110]. Julius Bernstein beschrieb 1868 das Phänomen der Entstehung eines Aktionspotenzials und veröffentlichte 1902 eine Membrantheorie, die das Ruhemembranpotenzial einer Zelle als ein Diffusionsgleichgewicht von Kationen über eine semipermeable Membran begreift [64, 124].

Im Verlauf des 20. Jahrhunderts konkretisierten zahlreiche Wissenschaftler die Vorstellung von Kanalproteinen als transmembranäre ionenselektive Poren: Hodgkin und Huxley begannen um 1930 mittels elektrophysiologischer Methoden Ionenströme zu messen. In den folgenden Jahrzehnten entdeckten sie den Zusammenhang zwischen der spannungsabhängigen Änderung der Membranleitfähigkeit für Natrium- und Kaliumionen und der Entstehung und Fortleitung von Aktionspotenzialen [48]. Es folgten Versuche mit selektiv blockierenden Toxinen wie Tetrodotoxin, Saxitoxin und Tetraethylammonium (TEA), welche die Theorie der ionenselektiven Kanäle bestätigten [103]. Katz und Miledi prägten 1972 die Vorstellung von Ionenkanälen als den kleinsten leitfähigen Einheiten der Zelle. Mitte der 70er Jahre gelang Neher und Sakmann dann die exakte Untersuchung einzelner Ionenkanäle in Froschmuskelzellen mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik [105].

Heutzutage erlauben moderne Analysemethoden wie die Kristallstrukturanalyse die Erforschung molekularer Strukturen bis in das vermeintlich kleinste Detail. Die Entwicklung einer Strategie zur gezielten Mutation einzelner Desoxynukleotide innerhalb

einer DNA-Sequenz ("*site-directed mutagenesis*") brachte Michael Smith 1993 den Nobelpreis für Chemie ein [72, 125]. Vielfältige Methoden zur Präparation, Klonierung und Transkription von DNA-Fragmenten gelten inzwischen als molekularbiologische Standardverfahren und werden im Methodenteil dieser Arbeit eingehend beschrieben.

1.1.2. Elektrophysiologische Grundlagen von Ionenströmen

Zellmembranen bestehen aus einer Lipiddoppelschicht, welche das Zellinnere gegenüber dem extrazellulären Milieu elektrisch isoliert. Ein Ionenstrom, also die gerichtete Bewegung geladener Teilchen über eine Membran, wird durch komplexe makromolekulare Transportmoleküle wie Carrier oder Kanalproteine ermöglicht.

Die Aufrechterhaltung eines elektrochemischen Gleichgewichtes ist zur Erfüllung der jeweiligen gewebespezifischen Aufgaben einer Zelle unerlässlich. Lebende Zellen bilden daher unter Energieverbrauch ein sogenanntes Gleichgewichts- oder Ruhemembranpotenzial aus, welches für elektrisch erregbare Gewebe üblicherweise zwischen -70 mV (Nervenzellen) und -90 mV (Herz- und Skelettmuskelzellen) liegt. Dieses Ruhemembranpotenzial entsteht durch die unterschiedliche Verteilung von Ionen auf beiden Seiten der Zellmembran, welche in erster Linie von einer Na-K-ATPase verursacht wird. Es bewegt sich in der Nähe des Kalium-Gleichgewichtspotenzials von -90 mV, da im Ruhezustand die Leitfähigkeit von Zellmembranen für Kalium am größten ist.

Die transmembranäre Natriumleitfähigkeit hingegen ist im Ruhezustand aufgrund überwiegend geschlossener Natrium-selektiver Ionenkanäle gering, die elektrochemische Triebkraft jedoch auf Grund der niedrigen intrazellulären Natriumionenkonzentration (ca. 15 mmol/l) gegenüber der hohen extrazellulären Natriumionenkonzentration (ca. 145 mmol/l) und des Vorhandenseins negativer Ladungen auf der zytoplasmatischen Seite der Phospholipidmembran sehr hoch, da das Gleichgewichtspotenzial unter diesen Bedingungen bei ca. +60 mV liegt.

Bei der Entstehung eines Aktionspotenzials wird dieser Gleichgewichts- oder Ruhezustand beendet, indem sich spannungsabhängige Natriumkanäle in der Zellmembran öffnen. Natriumionen strömen entlang des elektrochemischen Gradienten in die Zelle ein und führen nach Überschreiten eines Schwellenpotenzials zur raschen Depolarisation der Zellmembran gemäß dem Alles-oder-nichts-Prinzip. Dies ist in der graphischen Darstellung des Membranpotenzials über die Zeit als der sogenannte Aufstrich, der ab dem Überschreiten der Nulllinie im Englischen auch als „overshoot“ bezeichnet wird, sichtbar (vgl. Abb. 1).

Dieses schlagartige Öffnen spannungsabhängiger Natriumkanäle ist jedoch aus zweierlei Gründen nur von sehr kurzer Dauer: Zum einen wird durch den Einstrom von Kationen in die Zelle das Membranpotenzial auf positive Werte angehoben; das elektrische Feld

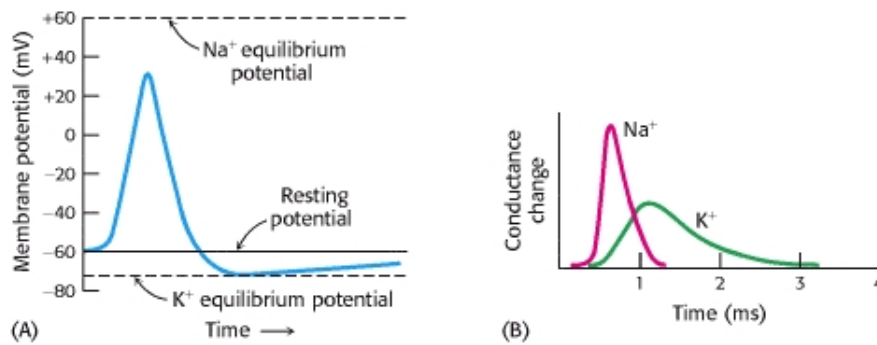


Abbildung 1.: Das Aktionspotenzial

Links: Schematische Darstellung eines Aktionspotenzials als Änderung des Membranpotenzials über die Zeit. Rechts: Änderung der Membranleitfähigkeit für Natrium- und Kaliumionen während eines Aktionspotenzials. Bildquelle: [12]

wendet sich somit binnen kürzester Zeit gegen die in die Zelle einströmenden Natriumionen. Zum anderen inaktivieren spannungsabhängige Natriumkanäle gewebe- und reizabhängig spontan innerhalb weniger Millisekunden. Durch den schnellen Abfall der Natriumleitfähigkeit und den ausgeprägten Auswärtsstrom von Kaliumionen kommt es zu einer raschen Repolarisation der Zelle, die bei Nervenzellen innerhalb weniger Millisekunden beendet ist.

Das Ziel und die Konsequenz eines Aktionspotenzials ist somit im Allgemeinen die Fortleitung des Impulses bis zu einem Effektor, welcher das Signal übersetzt und eine nicht-elektrische Reaktion generiert.

1.1.3. Natriumkanäle

1.1.3.1. Grundlegender Aufbau und Eigenschaften

Die Klassifikation von Ionenkanälen kann sowohl an Hand der Selektivität eines Kanals für ein bestimmtes Ion als auch unter Berücksichtigung des die Offenheitswahrscheinlichkeit des Kanals beeinflussenden Reizes erfolgen. So reagieren manche Ionenkanäle auf die Bindung eines Liganden an einen spezialisierten Rezeptor (ligandengesteuerte Kanäle), andere benötigen ein bestimmtes Membranpotenzial zum Öffnen oder Schließen der Pore (spannungsabhängige Kanäle). Dies wird bei der Nomenklatur dieser Kanalproteine durch ein tiefgestelltes v für *voltage* ausgedrückt (z.B. $\text{Na}_v1.4$).

Spannungsabhängige Natriumkanäle sind integrale Membranproteine, die in Folge eines depolarisierenden Reizes den raschen und weitgehend selektiven Durchtritt von Natriumionen aus dem Extrazellulärraum in das Zellinnere ermöglichen. Die trichterförmigen, ca. 14 nm hohen Kanäle übernehmen somit eine entscheidende Rolle bei der Generierung und Fortleitung von Aktionspotenzialen innerhalb elektrisch erregbarer Zellverbände. Sie sind aus einer die Kanalpore bildenden α -Untereinheit und bis zu vier angegliederten,

die Eigenschaften der Pore beeinflussenden β -Untereinheiten aufgebaut.

Eine ca. 2000 Aminosäuren umfassende Polypeptidkette formt die porenbildende α -Untereinheit, das Kernstück des Natriumkanals. In der vorliegenden Arbeit wird der von der Nomenklaturkommission der International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) empfohlene „single letter code“ der Aminosäuren zur Beschreibung einer Sequenz bzw. eines Sequenzabschnitts von Peptiden verwendet. Die Aminosäurekette bildet vier homologe Domänen, welche, von extrazellulär betrachtet, im Uhrzeigersinn kreisförmig angeordnet sind. Jede dieser vier Domänen besteht aus sechs Transmembransegmenten, die durch hydrophile Zwischenstücke verbunden sind (vgl. Abb. 2).

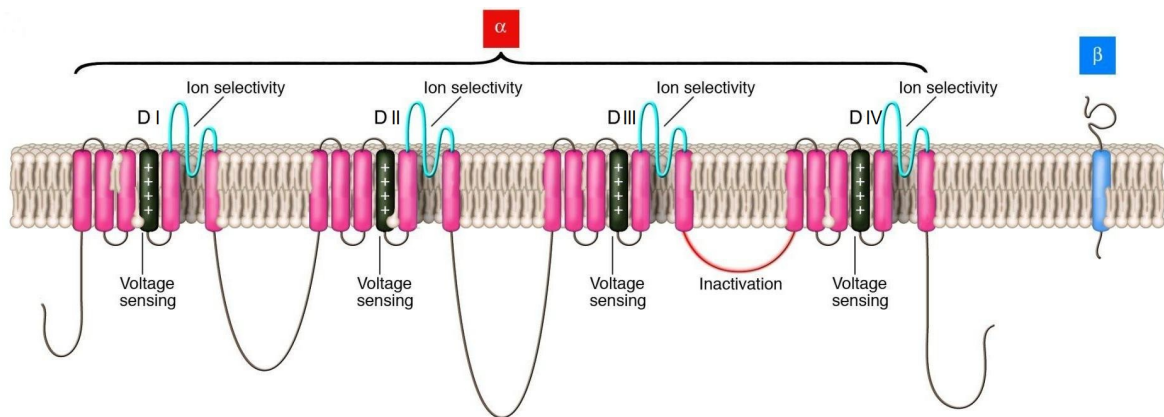


Abbildung 2.: Die α -Untereinheit des Natriumkanals

Schematische Darstellung der vier Domänen DI-IV mit je sechs transmembranären Segmenten. Das Segment 4, hier schwarz gekennzeichnet, beinhaltet den überwiegend positiv geladenen Spannungssensor. Die hellblau dargestellten Verbindungsstücke zwischen den Segmenten S5 und S6 aller vier Domänen bilden die Kanalpore. Bildquelle: [53]

1.1.3.2. Selektivitätsfilter

Die dem Extrazellulärraum zugewandte Seite des Natriumkanals weist eine trichterförmige Konfiguration auf. Dieser Trichter wird von einem weiteren äußeren Carboxylatring und einem inneren Ring, dem sogenannten Selektivitätsfilter, der den engsten Abschnitt der Natriumkanalpore darstellt, gebildet [107, 129]. Beide Ringe sind überwiegend negativ geladen, was in erster Linie auf das Vorkommen negativ geladener Glutamat-Seitenketten zurückzuführen ist [61, 45].

Betrachtet man die Struktur dieser Region etwas genauer, stellt man fest, dass es sich bei diesen „Ringen“ nicht um zusammenhängende Aminosäureketten handelt. Vielmehr tragen bestimmte hydrophile extrazelluläre Abschnitte zwischen den Segmenten 5 und 6 aller vier Domänen zu der Ringstruktur bei [129, 45, 131]. Diese S5/S6-Segment-Linker können in drei Abschnitte gegliedert werden (vgl. Abb. 3): S5-P, die Porenschleife (zu

engl.: *P-Loop*) mit den Segmenten SS1 (absteigender Schenkel) und SS2 (aufsteigender Schenkel) sowie P-S6. Während die Aminosäure-Sequenzen der Abschnitte S5-P und P-S6 zwischen den verschiedenen Natriumkanal-Isoformen recht variabel sind, ist die Sequenz des P-Loops mit $\geq 95\%$ Übereinstimmung stark konserviert [86].

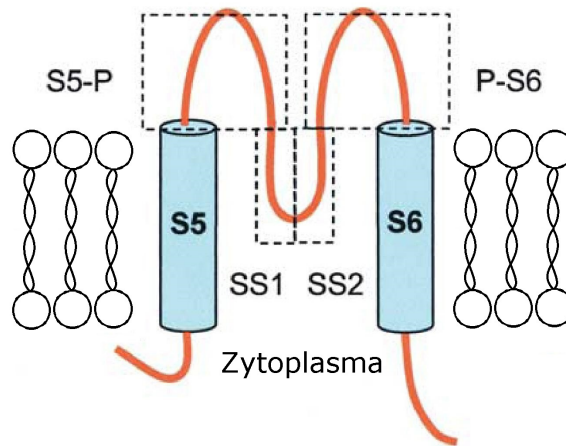


Abbildung 3.: Die S5/S6-Segment-Linkerregion des Natriumkanals
Die in drei Abschnitte gegliederte Linkerregion zwischen S5 und S6, hier rot dargestellt, bildet einen Teil des Selektivitätsfilters. Bildquelle: [86], eigene Bearbeitung.

Etwa 21 Aminosäuren lang ist ein solcher S5/S6-Segment-Linker, der als Tetramer ein sogenanntes β -Fass formt. Dieses bildet einen Teil der Kanalpore, indem es sich von außen gewissermaßen in die Membran hinein stülpt und den extrazellulären Porenabschnitt auskleidet [60, 145].

Der äußere Carboxylatring vieler Natriumkanalisoformen besteht in seinen wesentlichen Bestandteilen aus den Aminosäuren Glutamat (E) in Domäne I und II und Aspartat (D) in Domäne III und IV, abgekürzt auch als EEDD-Lokus bezeichnet [139, 143, 132]. Die Aminosäure-Sequenzanalyse des häufig zu elektrophysiologischen Messungen herangezogenen Kanaltyps $rNa_v1.4$ lokalisiert die Bestandteile des äußeren Carboxylatrings an den Positionen E403, E758, D1241 und D1532 [143].

Die ausgeprägte Ionenselektivität der Kanäle wird in erster Linie durch den als mechanische und elektrische Barriere fungierenden Selektivitätsfilter, ein stark konserviertes Aminosäuremotiv am zytoplasmatischen Ende der Kanalpore, erzielt [45, 68, 132]. Anhand der vier entscheidenden Aminosäuren Aspartat (D) in Domäne I, Glutamat (E) in Domäne II, Lysin (K) in Domäne III und Alanin (A) in Domäne IV wird dieses Aminosäurecluster auch DEKA-Motiv genannt [61, 45, 131]. Der Umstand, dass die exakte Struktur dieses Aminosäuremotivs zwischen den verschiedenen Natriumkanal-Isoformen variiert, erklärt die unter Punkt 1.2.3 beschriebene Variabilität der Natriumstromblockade durch spezifische Toxine [49].

- Mechanische Barriere:

Insbesondere die elektrostatische Interaktion von Lysin an Position 1237 der Domäne III mit Glutamat an Position 755 der Domäne II spielt für die Porenform des $rNa_v1.4$ -Kanals und somit auch für die Selektivität für Natrium- gegenüber Kaliumionen eine entscheidende Rolle [62]. Die Kanalpore ist im Bereich des DEKA-Motivs mit einem minimalen Durchmesser von 0.32×0.52 nm so eng, dass die einströmenden Natriumionen (Durchmesser 0.19 nm) ihre Hydrathülle vor Durchtreten der Pore deutlich verkleinern müssen, was die Transitzeit auf 5-10 ns pro Natriumion verlängert und außerdem Energie kostet [64]. Die elektrostatische Anziehungskraft saurer Carboxylatgruppen (COO^-) der Glutamat-Seitenketten im Selektivitätsfilter übertrifft jedoch den Energieaufwand, der den Natriumionen während ihrer Passage durch den Verlust eines Teils ihrer Hydrathülle entsteht [33, 64, 39].

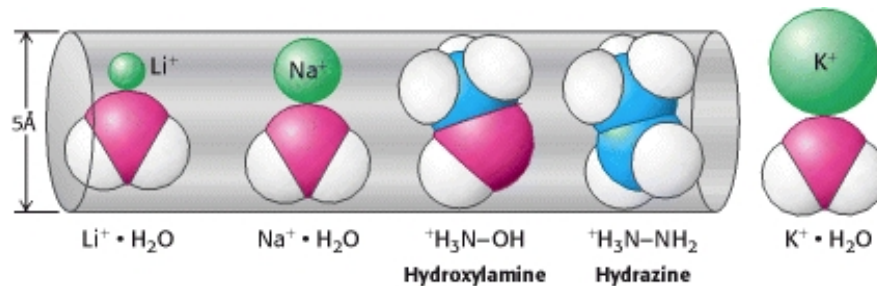


Abbildung 4.: Mechanisch bedingte Ionenselektivität des Natriumkanals

Die schematische Darstellung des Natriumkanals mit einem Durchmesser von ca. 5 Å zeigt: hydratisierte Natrium- und Lithium-Ionen können die Pore passieren, während hydratisierte Kaliumionen nicht hindurch gelangen. Bildquelle: [76]

Kaliumionen könnten aufgrund ihres größeren Durchmessers von 0.27 nm die Natriumkanalpore nur als vollständig dehydratisierte Ionen durchqueren; dies ist jedoch energieaufwändig und somit unwahrscheinlich, wenn auch nicht ausgeschlossen (s.u.) [64]. Zweiwertige Metallionen können die Natriumkanal-Pore nicht passieren, da die durchschnittliche Kanalöffnungszeit von 0.1 ms die zur Dehydratisierung dieser Ionen erforderliche Zeit um ein Vielfaches unterschreitet [61, 64].

- Elektrische Barriere:

Offenbar spielt nicht allein der Durchmesser, sondern auch die Ladung der Filterregion eine Rolle für die Permeabilität des Kanals. Wird die Nettoladung des Selektivitätsfilters von -1 durch den Austausch von Aminosäuren des DEKA-Lokus verändert, beeinflusst dies sowohl die Selektivität der Ionenkanalpore für Natriumionen als auch die Natriumleitfähigkeit des Kanals. Nach Austausch der positiv (Lysin an Position 1422) bzw. neutral (Alanin an Position 1714) geladenen Aminosäurereste der Domäne III

und IV des rNa_v1.2-Kanals durch Aminosäuren mit negativ geladener Seitenkette (z.B. Glutamat) steigt die Permeabilität für Kalium- und Calciumionen deutlich an [61]. Wird die Nettoladung des Selektivitätsfilters hingegen durch den Austausch negativ geladener Aminosäuren in stärker positiv geladene Bereiche verschoben, führt dies zu einer relevanten Abnahme der Natriumleitfähigkeit [129, 61, 87].

Die Natriumselektivität der Natriumkanäle ist jedoch auch im Originalzustand nicht absolut: Nach einer Untersuchung von Chandler und Meves beträgt die Kaliumpermeabilität offener Natriumionenkanäle bis zu 10 % der Permeabilität für Natriumionen [29]. In noch höherem Maße gelangen Hydroxylammonium (NH₃OH), Lithium- und Thalliumionen durch die offene Natriumkanalpore; im Gegensatz zu methylierten Kationen, die diese Kanäle nicht passieren können [29, 64].

1.1.3.3. Spannungssensor

Als Signal zur Kanalöffnung bzw. -schließung dient bei spannungsabhängigen Ionenkanälen die Änderung des Membranpotenzials. Ein Spannungssensor detektiert Potenzialänderungen benachbarter Membranabschnitte in Form von Änderungen des umgebenden elektrischen Feldes. An seinem Aufbau sind die S4-Segmente der Domänen I-IV maßgeblich beteiligt, während die ebenfalls zum Spannungssensor-Komplex gehörigen Segmente 1-3 die Kanalaktivierung modulieren und unterstützen [64, 16]. Die Aminosäuresequenz der S4-Segmente unterschiedlicher Domänen ist nicht deckungsgleich: Sie sind unterschiedlich stark positiv geladen und tragen auf verschiedene Arten zur Kanalaktivierung bei [28]. Gemeinsam ist den S4-Segmenten aller Domänen jedoch das Vorkommen regelmäßig angeordneter Arginin- und Lysin-Reste im hydrophoben Zentrum der Kanalpore, die während der Depolarisation der umgebenden Membran ihren Standort verändern [4, 57, 148, 131, 64].

Die Bewegung der bei physiologischem pH-Wert überwiegend positiv geladenen S4-Segmente während einer Depolarisation erfolgt in Form einer Rotation der Segmente in Richtung des Extrazellulärraumes (zu engl.: *helical screw*) [18, 57] und wird von den Segmenten S1-S3 unterstützt [15, 64, 5, 16]. Dabei müssen nach einer Untersuchung von Hirschberg et al. 12 elementare Ladungen die gesamte Membran einmal durchqueren, um die Öffnung eines Natriumkanals zu initiieren [65]. Diese Ladungsverschiebung über die Membran kann als sogenannter „gating current“ mit Hilfe elektrophysiologischer Methoden registriert und von der durch den nachfolgenden Ionenstrom induzierten Potenzialänderung abgegrenzt werden [131, 15, 64].

Die Aktivierung des Spannungssensors triggert eine weniger als 1 ms andauernde Kon-

formationsänderung des Kanals, die in der englischen Fachliteratur auch als „gating“ bezeichnet wird. Dem Spannungssensor eng benachbarte Aminosäurereste der S5- und S6-Segmente, die wie Torflügel (zu engl.: *gates*) am zytoplasmatischen Ende der Pore angeordnet sind, verändern dabei ihre Position und ermöglichen so den passiven Durchtritt bestimmter Ionen entlang ihres elektrochemischen Gradienten.

Natriumionen strömen in die Zelle ein und verschieben das ursprünglich stark negative Membranpotenzial in positivere Bereiche. Angrenzende, bislang unerregte Membranabschnitte werden elektrotonisch erregt, benachbarte spannungsabhängige Natriumkanäle öffnen sich und das Aktionspotenzial pflanzt sich weiter fort. Eine Hyperpolarisation der Membran dagegen führt zu einer Bewegung der S4-Segmente in Richtung des Intrazellulärtraumes, da die positiv geladenen Reste des Spannungssensors von der stark negativen Ladung auf der zytoplasmatischen Membranseite angezogen werden. Die Spannungsabhängigkeit von Ionenkanälen ist unter wechselnden Umgebungsbedingungen nicht konstant: Hohe extrazelluläre Konzentrationen divalenter Kationen wie Calcium oder Magnesium stabilisieren Membranen. Das bedeutet, das Schwellenpotenzial zur Auslösung von Aktionspotenzialen ist in positivere Bereiche verlagert - die Zellmembran ist schwerer erregbar. Umgekehrt führt das Absinken der extrazellulären Konzentration zweiwertiger Kationen zu einer gesteigerten Exzitabilität der Zelle.

1.1.3.4. Kanalinaktivierung

Natriumkanäle inaktivieren nicht etwa durch bloßes Zufallen der zytoplasmatischen Torflügel, sondern durch den Verschluss der Kanalpore mittels eines räumlich etwas abseits gelegeneren Kanalrestes [64]. Dieser Vorgang setzt voraus, dass sich die S4-Segmente zuvor durch einen überschwelligem Reiz in Richtung des Extrazellulärtraumes bewegt und damit das zytoplasmatische Tor der Kanalpore geöffnet haben. Hierauf folgt ein als „open-state inactivation“ bezeichneter Mechanismus (s. Abb. 5)[5].

Diesen Mechanismus untersuchten Armstrong und Bezanilla in den 70er Jahren und proklamierten ihr „ball-and-chain-model“, dem zufolge ein überwiegend positiv geladener Aminosäurerest des Ionenkanals wie eine Kugel an einer Kette auf der intrazellulären Seite der Kaliumkanalpore hängt. Die Verlagerung der S4-Helices in Richtung Extrazellulärtraum und die damit verbundene Öffnung der Torflügel auf der zytoplasmatischen Seite der Pore ermöglichen die Annäherung und Bindung dieser Kugel an einen Rezeptor unterhalb des Selektivitätsfilters, wodurch die Pore für einige Millisekunden verschlossen wird (inaktiviert) [6, 64, 5]. Auch überschwellige Depolarisationen haben dann zunächst keine Ionenströme zur Folge. Diese Form der Inaktivierung wird in Anlehnung an den bei Kaliumkanälen dafür verantwortlichen N-terminalen zytoplasmatischen Rest auch als N-Typ-Inaktivierung bezeichnet [66, 67].

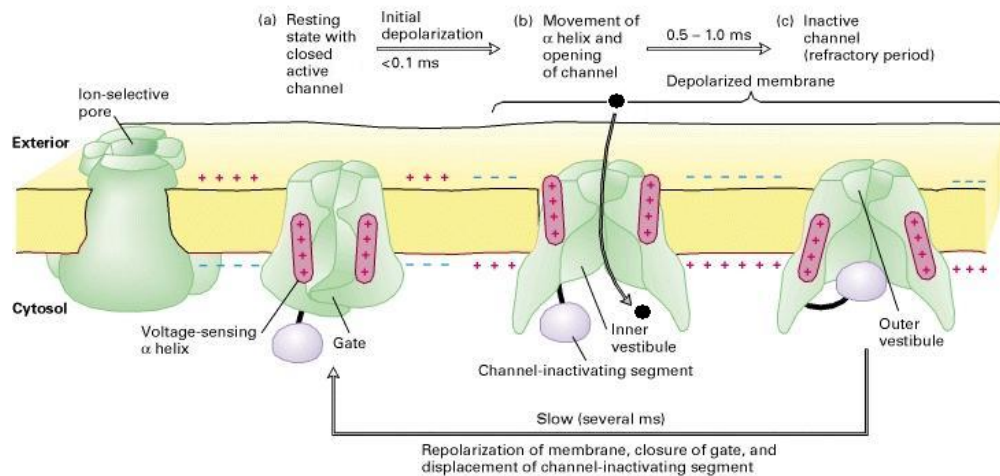


Abbildung 5.: Kugel-Ketten-Modell für die Aktivierung und Inaktivierung eines spannungsgesteuerten Ionenkanals

Von links nach rechts: Der Kanal im Ruhezustand (a) wird mittels eines depolarisierenden Reizes aktiviert (b). Innerhalb einer Millisekunde kommt es zur Inaktivierung des Kanals durch Anlagerung des Inaktivierungssegmentes (c). Die Wiederherstellung des Ruhezustands dauert einige Millisekunden. Bildquelle: [88]

Ein vergleichbarer Mechanismus ist für den Inaktivierungsmechanismus spannungsabhängiger Natriumkanäle verantwortlich. Hier formt die Linkerregion zwischen Domäne III und IV eine in das Zytoplasma ragende Schleife, die von William Catterall als „hinged lid“, zu deutsch: Scharnierdeckel, bezeichnet wird [64]. Sie besteht aus 60 überwiegend positiv geladenen Aminosäureresten mit einem charakteristischen hoch konservierten Cluster aus Isoleucin, Phenylalanin und Methionin (dem sogenannten IFM-Motiv), der im Zuge der Kanalinaktivierung die Kanalpore von innen blockiert [11, 9, 64, 132]. Die NMR-spektroskopisch ermittelte Molekülstruktur des Kanalproteins sowie eine Reihe von Mutagenese-Experimenten von Rohl et al. aus dem Jahr 1999 legen den Schluss nahe, dass das IFM-Motiv gemeinsam mit dem angrenzenden Threonin einen essentiellen Bestandteil des Inaktivierungsmechanismus darstellt (IFMT-Motiv) [117, 96, 150]. Es existieren außerdem weitere Formen der Inaktivierung als Reaktion auf unterschwellige oder langanhaltende Reize, die jedoch hier nicht näher erörtert werden sollen.

In reizleitenden Organsystemen wird durch die zeitlich begrenzte Inaktivierung des Kanals eine unidirektionale Fortleitung des Impulses sichergestellt. Die Inaktivierung endet mit der Repolarisation der Zellmembran: Wird die dem Zellinneren zugewandte Seite der Membran wieder negativ gegenüber dem extrazellulären Medium, gleiten die S4-Segmente zurück in ihre Ausgangsposition, und das Überwiegen positiver Ladungsanteile verdrängt die Inaktivierungsschleife von der Bindungsstelle auf der zytoplasmatischen Seite der Kanalpore. Somit ist der Kanal in seine Grundkonformation zurückgekehrt und kann mittels überschwelliger Reize erneut aktiviert werden.

1.1.3.5. Natriumkanal-Isoformen

Bisher konnten neun verschiedene Natriumkanal-Isoformen mit unterschiedlicher Primärsequenz und daraus resultierend auch unterschiedlichen elektrophysiologischen Eigenschaften kloniert und untersucht werden [49, 21]. Diese Isoformen einer Natriumkanal- α -Untereinheit werden von verschiedenen Genen kodiert, welche der Genfamilie spannungsabhängiger Natriumkanäle, auch SCN-Familie genannt, zugerechnet werden [56, 49]. Im Vergleich mit Kalium- und Calciumkanälen ist die Familie der Natriumkanäle recht homogen bezüglich ihres Aufbaus und ihrer Eigenschaften [64]. Die verschiedenen Natriumkanal-Subtypen unterscheiden sich jedoch in Bezug auf ihre Lokalisation und pharmakologischen Eigenschaften voneinander. So sind zum Beispiel die Natriumkanal-typen $\text{Na}_v1.4$ und $\text{Na}_v1.5$ muskelspezifisch lokalisiert, während $\text{Na}_v1.1$, $\text{Na}_v1.2$, $\text{Na}_v1.3$ und $\text{Na}_v1.6$ vorrangig im zentralen Nervensystem zu finden sind.

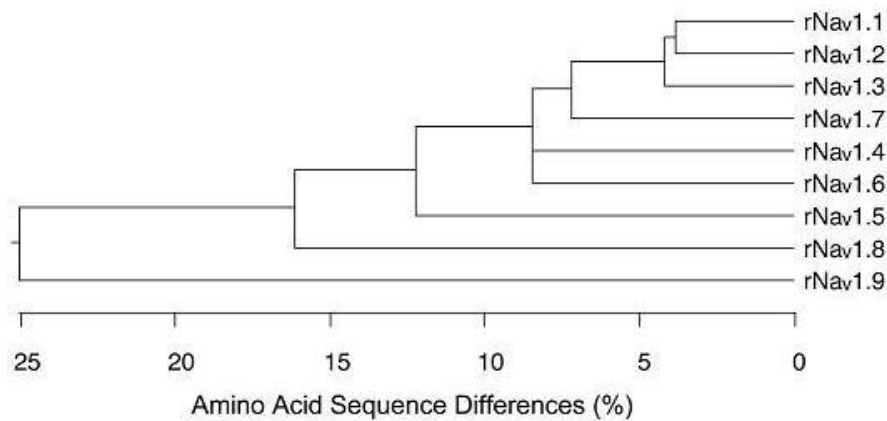


Abbildung 6.: Aminosäure-Sequenzvergleich verschiedener Natriumkanal-Isoformen
Während die Natriumkanal-Subtypen $\text{rNa}_v1.1$ und $\text{rNa}_v1.2$ eng verwandt sind, unterscheidet sich die Aminosäuresequenz des $\text{rNa}_v1.9$ -Kanals deutlich von derjenigen der übrigen Natriumkanäle. Bildquelle: [21]

Das SCN4A -Gen ist auf dem langen Arm von Chromosom 17 zwischen Position 23 und 25.3 lokalisiert und kodiert den skelettmuskulären Natriumkanal $\text{Na}_v1.4$ (gelegentlich auch SkM1 genannt) [141, 92].

Das SCN5A -Gen ist auf dem kurzen Arm von Chromosom 3 an Position 21 lokalisiert und kodiert den kardialen Natriumkanal $\text{Na}_v1.5$ (auch als hH1 bezeichnet) [55, 64].

Das Vorhandensein von neun unterschiedlichen Isoformen eines einzigen Ionenkanals erklärt sich aus den jeweiligen Funktionszuweisungen: Elektrisch erregbare Gewebe mit verschiedenartigen Aufgaben benötigen eine an die spezifischen lokalen Bedürfnisse angepasste Zusammensetzung verschiedener Kanalproteine. So beträgt die Dauer des Aktionspotenzials einer Nervenzelle etwa eine Millisekunde, die einer Skelettmuskel-

zelle etwa zehn Millisekunden und die einer Herzmuskelzelle über 150 ms. Auch die Geschwindigkeit, mit der sich die Ionenkanäle von depolarisierenden Reizen erholen, variiert zwischen den einzelnen Isoformen. Dieses Zeitintervall zwischen dem Schließen des Kanals und der wieder hergestellten Bereitschaft, auf einen erneuten Reiz hin eine Konformationsänderung zu durchlaufen, wird als Refraktärzeit bezeichnet.

Die unterschiedlichen Natriumkanal-Isoformen mit ihren spezifischen elektrophysiologischen Eigenschaften ermöglichen die Erfüllung verschiedenster biologischer Funktionen - von der hochfrequenten repetitiven Entladung in Nervenzellen bis zur langen Plateauphase des Aktionspotenzials in Kardiomyozyten.

1.1.3.6. Kanalerkrankungen

Pathophysiologische Bedeutung erlangen die Ionenkanäle, wenn Mutationen der α -Untereinheit erbliche Erkrankungen wie bestimmte Formen von Herzrhythmusstörungen, Epilepsie, Migräne oder Myopathien hervorrufen. Natriumkanal-Erkrankungen können sowohl eine Einschränkung ("*loss-of-function*") als auch einen Zuwachs ("*gain-of-function*") an Funktionsfähigkeit zur Folge haben. Mittlerweile sind über 1000 Natriumkanal-Mutationen bekannt, welche einen Krankheitswert beim Menschen aufweisen. Durch Mutationsanalysen können solche Erbkrankheiten seit einigen Jahren auf chromosomaler Ebene lokalisiert und diagnostiziert werden (vgl. Abb. 7).

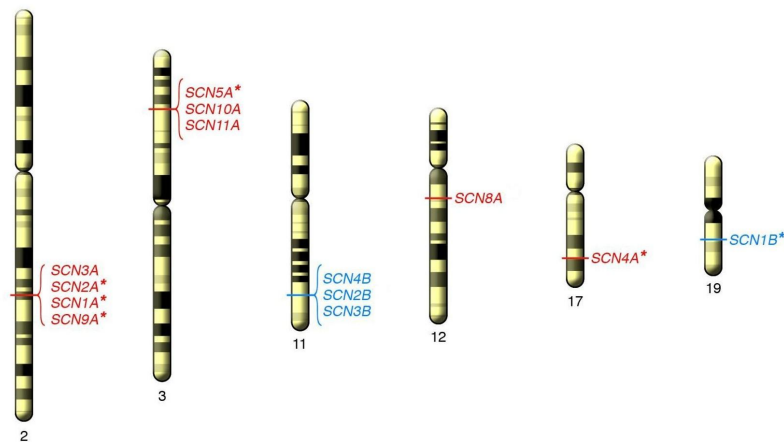


Abbildung 7.: Chromosomale Lokalisation von α - und β -Untereinheiten spannungsabhängiger Natriumkanäle

Auf den Chromosomen 2, 3, 11, 12, 17 und 19 befinden sich Gene, die die α - (rot) und die β -Untereinheiten (blau) spannungsabhängiger Natriumkanäle kodieren. * weist auf einen Zusammenhang mit einer humanen Erbkrankheit (Kanalerkrankung) hin. Bildquelle: [53]

Mehr als 70 verschiedene Defekte des SCN4A-Gens verursachen seltene neuromuskuläre Erkrankungen wie die Paramyotonia congenita und hypo-, bzw. hyperkaliämische periodische Paralysen sowie kongenitale myasthene Syndrome [54, 138, 32, 69]. Alle vier Natriumkanal-Domänen können von einer Mutation des SCN4A-Gens betroffen sein. Abhängig von der exakten Lokalisation des Defekts können Störungen der Ionenleitfähigkeit, eine verringerte Aktionspotenzial-Amplitude oder Beeinträchtigungen im Inaktivierungsmechanismus der Kanäle auftreten, die zu den typischen klinischen Symptomen der Betroffenen in Form von periodischen Paralysen oder Myotonien führen [26, 73, 69].

Die periodischen Paralysen sind durch eine inkomplette Inaktivierung der Natriumkanäle gekennzeichnet. Dies hat einen kleinen Natrium-Reststrom zur Folge, der zu einer permanenten Inaktivierung anderer Natriumkanäle und somit zu einem verringerten Natriumeinstrom in die Zelle führt - es kommt zu Lähmungen der Skelettmuskulatur [53]. Das Krankheitsbild der Paramyotonia congenita mit kälteinduzierter Myotonie nach kraftvollen Muskelkontraktionen kann unter anderem durch Mutationen im S4-Segment der Domäne IV (z.B. R1448C) verursacht werden [26, 46]. Pathophysiologisches Korrelat sind der verspätete Eintritt der Kanäle in die Inaktivierung und eine beschleunigte Repolarisation der Zellmembran - der Natriumeinstrom in die Zelle nimmt zu. Mutationen im S3-Segment der Domäne IV (z.B. L1433R) haben ganz ähnliche Effekte [73].

Mehr als 400 unterschiedliche Mutationen des SCN5A-Gens und assoziierter regulatorischer Genabschnitte führen durch eine Steigerung bzw. eine Verminderung des Natriumeinstroms in die Kardiomyozyten zu kardialen Reizbildungs- und Reizleitungsstörungen [80, 1, 69]. Während die Steigerung des Natriumeinstroms in die Kardiomyozyten eine Verlängerung des Aktionspotenzials zur Folge hat und für Krankheitsbilder mit abnorm verzögerter Repolarisation, beispielsweise einer Form des Long-QT-Syndroms, verantwortlich ist, führt ein verringerter Natrium-Einstrom zu Überleitungsstörungen und verminderter kardialer Erregbarkeit, wie man sie beim Sick-Sinus-Syndrom oder beim Brugada-Syndrom antrifft [3].

Eine Reihe von Mutationen des SCN5A-Gens, die zu Herzrhythmusstörungen führen, betreffen Aminosäuresequenzen der DIII/DIV-Linkerregion oder der S4-Segmente von Domäne III und IV [8] und beeinflussen somit die Funktion von Porenarealen, die unmittelbar an der Kanalinaktivierung beteiligt sind. Wie bei den skelettmuskulären Natriumkanal-Isoformen können jedoch alle vier Domänen der α -Untereinheit von einer Mutation im SCN5A-Gen betroffen sein. Zu den häufigsten Aberrationen in diesem Bereich gehören Mutationen, die Krankheitsbilder wie das Long-QT-Syndrom oder das Brugada-Syndrom auslösen können. Seltener auftretende Mutationen können Krankheitsbilder wie den plötzlichen Kindstod (SIDS), eine Form der dilatativen Kar-

diomyopathie oder familiär auftretendes Vorhofflimmern verursachen [69].

Etwa 10% aller Long-QT-Syndrome werden durch Mutationen im SCN5A-Gen verursacht. Durch eine Störung der Inaktivierung kommt es zu einem persistierenden kleinen Natrium-Einstrom, der trotz seines geringen Ausmaßes (lediglich 0.5-2% des Einwärtsstroms während eines Aktionspotenzials) eine verlängerte Depolarisation der Zellen mit konsekutiv verzögerter Myokardrepolarisation zur Folge hat. Diese abnorme Verlängerung der QT-Zeit prädisponiert die Betroffenen zur Ausbildung von Reentry-Kreisen durch früh einfallende Extrasystolen mit daraus resultierenden bösartigen polymorphen ventrikulären Tachyarrhythmien (meistens Torsade-de-pointes-Tachykardien) [53].

Dagegen wird das Brugada-Syndrom unter anderem durch Mutationen hervorgerufen, die eine beschleunigte Inaktivierung und die verzögerte Repolarisation der Kardiomyozyten bewirken können. Dies verkürzt die Dauer des Aktionspotenzials und vermindert den Natriumstrom über die Membran; ein Phänomen, welches oftmals mit charakteristischen EKG-Veränderungen in Form von ST-Hebungen in den rechts-präkordialen Ableitungen sowie einem Rechtsschenkelblock einhergeht und mit einem hohen Risiko für die Entwicklung eines Kammerflimmerns behaftet ist [8, 53].

1.1.3.7. Pharmakologie der Natriumkanäle

Verschiedene natürlich vorkommende Substanzen, die von Tieren oder Pflanzen zur Jagd oder zur Verteidigung gegen Räuber produziert werden, agieren an spannungsabhängigen Natriumkanälen. Bislang sind mehrere verschiedene Rezeptorseiten (im Englischen auch als *Sites* bezeichnet) für Neurotoxine an Natriumkanälen erforscht und beschrieben worden, vgl. Tabelle 1 [20, 16]. Je nach Bindungsort entfalten die Toxine unterschiedliche Wirkungen auf die Kanäle. Man kann drei grundsätzliche Angriffspunkte und -mechanismen pharmakologisch wirksamer Substanzen an Natriumkanälen unterscheiden [17, 19, 23, 20]:

1. Verschluss der Pore → Blockade des Ionenstroms (Site 1)
2. Bindung an die intrazelluläre Seite des Kanals → Stabilisierung („Einfrieren“) der Kanal-Konformation durch einen allosterischen Mechanismus (Site 2 und 5)
3. Bindung an die extrazelluläre Seite des Kanals → Stabilisierung („trapping“) des Spannungssensors (Site 3, 4 und 6)

Site	Toxin	Wirkort	Effekt
1	TTX STX μ -Conotoxine	Selektivitätsfilter [103]	Stromblockade
2	Veratridin Batrachotoxin Aconitin Grayanotoxin	S6-Segment D I/IV [136, 2, 134]	persistierende Kanalaktivierung
3	α -Skorpiontoxine Seeanemonentoxine	S3/S4-Segment-linker D IV S5/S6-Segment-linker D I/IV [101, 14, 128, 116]	verzögerte Inaktivierung
4	β -Skorpiontoxine	extrazelluläre S1/S2- und S3/S4-Segment-linker D II [90, 24]	Stabilisierung des Offenzustands
5	Brevetoxine Ciguatoxine	S6-Segment D I S5-Segment D IV [22, 135, 133]	persistierende Kanalaktivierung
6	δ -Conotoxine	S4-Segment D IV [44, 81]	Verzögerung der Inaktivierung

Tabelle 1.:

Unterschiedliche pharmakologische Substanzen beeinflussen spannungsabhängige Natriumkanäle an mindestens sechs verschiedenen Bindungsstellen. Erstellt anhand [19] und modifiziert nach [16].

1.1.3.8. Spezies-bedingte Unterschiede pharmakologischer Eigenschaften von Natriumkanälen

Nicht nur die verschiedenen Natriumkanal-Isoformen innerhalb eines Organismus unterscheiden sich in ihrer Verteilung und den jeweiligen kanalspezifischen Eigenschaften voneinander. Auch unterschiedliche Spezies weichen in Bezug auf den Aufbau und die Eigenschaften ihrer Natriumkanal-Isoformen voneinander ab.

Im Grunde ist die starke Konservierung des grundlegenden Motivs der Ionenkanäle im Allgemeinen und der Natriumkanäle im Besonderen insofern bemerkenswert, als man bedenken muss, dass ein viele Millionen Jahre dauernder Evolutionsprozess am grundsätzlichen Aufbau der Aminosäuresequenz und der daraus resultierenden Eigenschaften von Natriumkanälen vergleichsweise wenig verändert hat. Die Ähnlichkeiten des bakteriellen Natrium-Kanals NaChBac mit der α -Untereinheit eukaryotischer Natriumkanäle ist beeindruckend [115, 77].

Dennoch existieren Unterschiede zwischen den Natriumkanal-Isoformen verschiedener Spezies, welche die Übertragbarkeit von molekularbiologischen Erkenntnissen auf die Funktionsweise der Kanalproteine einer anderen Spezies in Frage stellen. Ein Beispiel hierfür ist die wechselseitige Beeinflussung von Expression und Funktion zwischen dem

Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator (CFTR) und dem epithelialen Natriumkanal ENaC in unterschiedlichen Organismen. Der CFTR dient einerseits als Chloridkanal, andererseits als Regulatorprotein, welches die Anzahl epithelialer Natriumkanäle in den Atemwegen kontrolliert. Bei Fehlen oder einer Dysfunktion des CFTR führt eine verstärkte Natriumkanal-Aktivität zu einem Eindicken des Atemwegssekrets und somit zu einer verringerten mukoziliären Clearance. Während die Co-Expression des CFTR mit epithelialen Natriumkanälen in einem *Xenopus*-Expressionssystem die Anzahl muriner und humaner ENaC gleichermaßen verringert, beeinflusst die Aktivierung des co-exprimierten CFTR lediglich die Dichte muriner ENaC auf der Zelloberfläche. Der humane epitheliale Natriumkanal ist durch eine Aktivierung des co-exprimierten CFTR nicht beeinflussbar. Eine Rolle hierfür scheint eine 21 Aminosäuren umfassende C-terminale Sequenz des ENaC zu spielen [146].

Dies lässt Rückschlüsse auf die Unberechenbarkeit der Übertragung experimenteller Erkenntnisse aus Tiermodellen auf die Wirkung am Menschen zu, beispielsweise bei der Entwicklung von Pharmaka, welche an Ionenkanälen wirken, wie im Falle bestimmter Antiarrhythmika oder Antikonvulsiva.

Das Kernthema der vorliegenden Arbeit stellte die vergleichende Untersuchung der pharmakologischen Eigenschaften muriner und humaner Natriumkanäle aus Muskelzellen dar. Obwohl eine hohe Konservierung der Aminosäuresequenzen zwischen Mensch- und Maus-Kanälen unstrittig ist, können bereits geringe Änderungen in der Aminosäuresequenz bestimmter Kanalabschnitte entscheidende Unterschiede in Bezug auf die Sensitivität gegenüber pharmakologischen Substanzen erzeugen. Bei der Entwicklung pharmakologischer Substanzen stellt sich daher die Frage, ob Pharmaka, welche an Zielmolekülen murinen Ursprungs untersucht wurden, auch eine Wirkung an menschlichen Zielgeweben entwickeln werden.

1.2. Toxine

1.2.1. Tetrodotoxin und Saxitoxin

Bis zur Entdeckung verschiedener Natriumkanal-wirksamer Toxine wie z.B. die Batrachotoxine oder bestimmte Conotoxine wurden Natriumkanäle lediglich an Hand ihrer Empfindlichkeit gegenüber dem Guanidiniumgift Tetrodotoxin (TTX) in TTX-sensitive und TTX-insensitive Isoformen unterschieden.

TTX ist ein äußerst potentes Gift, das in den 1950er Jahren erstmals aus Kugelfischen isoliert werden konnte und - unabhängig von der Kanalkonformation - bereits in nanomolaren Konzentrationen bestimmte Natriumkanal-Isoformen spannungsabhängig,

selektiv und vollständig blockiert [51, 97, 102]. Erst vor einigen Jahren wurde bekannt, dass Tetrodotoxin nicht von den Kugelfischen selber, sondern von Bakterien produziert wird und erst über die Nahrungskette in die Fische gelangt [102].

Saxitoxin (STX), ein strukturell und pharmakologisch eng verwandtes Neurotoxin, das von nahezu ubiquitär in Meeren, Flüssen, Teichen und Mooren vorkommenden Algenspezies produziert wird, zeigt eine ganz ähnliche Wirkung wie TTX [100, 64].

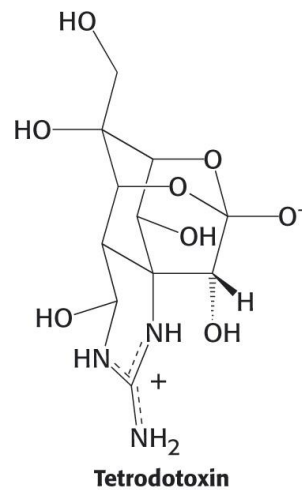


Abbildung 8.: Strukturformel von Tetrodotoxin (TTX) Bildquelle: [13]

Der Wirkmechanismus von TTX und STX, welche um eine überlappende Bindungsstelle konkurrieren, besteht in einer Blockade der Kanalpore und einer daraus resultierenden Blockade des Ionenstroms (vgl. Tabelle 1) [63, 64, 99]. Beide Toxine zeigen eine ausgeprägte Präferenz für bestimmte neuronale und skelettmuskuläre Natriumkanäle. Die Bindung an kardiale Natriumkanäle ($Na_v1.5$) und einige Natriumkanal-Isoformen des peripheren Nervensystems ($Na_v1.8$, $Na_v1.9$) dagegen erfolgt mit bis zu 500fach niedrigerer Affinität [64, 49] und - im Gegensatz zu den TTX-sensitiven Isoformen - nicht mittels Blockade der Kanalpore, sondern durch eine Beeinflussung des Aktivierungsmechanismus [35, 64].

Mittlerweile konnte der P-Loop der Domäne I als primäre Zielstruktur von TTX und STX identifiziert werden. Die Beobachtung, dass ursprünglich TTX-sensible Kanäle nach ladungsverändernder Mutation im Bereich des Selektivitätsfilters oder des äußeren Carboxylatringes TTX-resistent werden, lässt einige Rückschlüsse auf die exakte Position der TTX-Bindungsstelle am Natrium-Kanal zu [107, 129]. So führt beispielsweise die Mutation F385C in ursprünglich TTX-sensitiven neuronalen Natriumkanälen zu einem drastischen Verlust der Blockierbarkeit durch Guanidiniumtoxine. Dabei nehmen die neuronalen Natriumkanäle Eigenschaften an, die typisch sind für kardiale Natriumkanäle, welche an Position 385 immer ein Cystein tragen [60]. Ein weiterer entscheidender Aminosäure-Rest für die Isoform-spezifische Kanalblockade von TTX scheint Tyrosin

an Position 401 der skelettmuskulären Natriumkanalisform zu sein, welches nach Austausch durch Cystein an genannter Position den Kanal deutlich resistenter gegenüber TTX werden lässt [7, 119].

Weitere Experimente mit ladungsverändernden Mutationen an verschiedenen Seiten des extrazellulären Porenabschnittes zeigten, dass die Bindungsstelle von TTX mit der Bindungsstelle von STX am Selektivitätsfilter selber übereinstimmt. In der Peripherie jedoch bindet TTX stärker als STX an das Tyrosin an Position 401, während STX etwas weiter in Richtung des Extrazellulärtraumes lokalisiert zu sein scheint [113].

1.2.2. Conotoxine

Kegelschnecken sind räuberische, in tropischen Gewässern lebende Gastropoden, die zu Jagd- oder Verteidigungszwecken giftige Substanzen bilden und ihren Opfern mit Hilfe einer winzigen Harpune injizieren können [108]. Sie lassen sich abhängig von ihrer bevorzugten Beute in drei Gruppen einteilen: Schneckenjäger, Wurmjäger und Fischjäger [130, 74]. Bislang sind etwa 700 verschiedene Kegelschneckenspezies entdeckt und charakterisiert worden, von denen einige bis zu 200 verschiedene Peptide, sogenannte Conopeptide oder Conotoxine (hier synonym verwendet), als pharmakologisch aktive Substanzen produzieren können [49, 74].

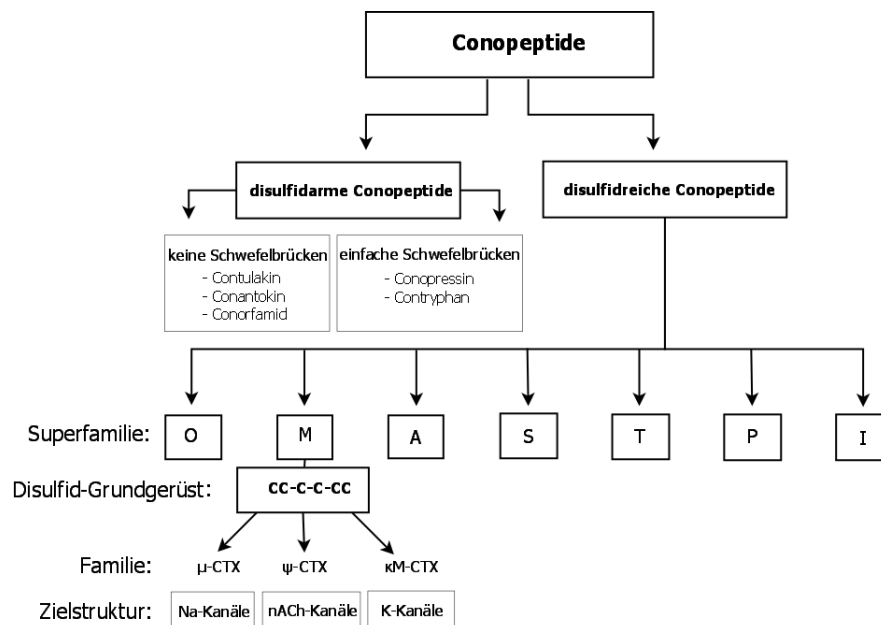


Abbildung 9.: Organigramm der Conopeptid-Superfamilien und -Familien mit Darstellung ausgewählter Zielstrukturen.

Die grundsätzliche Einteilung der Conopeptide erfolgt anhand der Anzahl der vorhandenen Schwefelbrücken. Modifiziert nach [130].

Conotoxine können anhand der Anzahl von Schwefelbrücken in ihrer Primärsequenz in eine disulfidreiche und eine disulfidarme Gruppe unterschieden werden [94]. Die größere Gruppe der disulfidreichen Peptide kann weiter in sieben mit lateinischen Großbuchstaben bezeichnete Superfamilien unterteilt werden [130]. Die Mitglieder dieser Superfamilien besitzen gemeinsame, stark konservierte Präkursor-mRNA-Sequenzen. Das bedeutet, dass die Aminosäuresequenzen der unprozessierten messenger-RNA innerhalb einer Superfamilie großteils übereinstimmen. Unterschiede in den Proteinstrukturen der Peptide kommen erst durch umfangreiche prä- und posttranslationale Modifikationen wie beispielsweise die Hydroxylierung von Prolinresten zustande [36]. Oft teilen die Familien innerhalb einer Superfamilie ein gemeinsames Disulfid-Gerüst (z.B. in der M-Superfamilie), gelegentlich können aber auch zwei alternative Gerüste innerhalb einer Superfamilie vorkommen, wie das bei der A-Superfamilie der Fall ist [94].

Die Superfamilien bestehen aus einzelnen Conotoxin-Familien, die mit griechischen Buchstaben bezeichnet werden. Ihre Mitglieder teilen neben dem gemeinsamen Disulfidmuster auch ihre Zielstruktur; beispielsweise blockieren alle Mitglieder der μ -Conotoxin-Familie spannungsabhängige Natriumkanäle [36, 94].

Etwas verwirrend ist mitunter der Umstand, dass Conotoxine aus verschiedenen Superfamilien die gleiche Zielstruktur besitzen können. Sie teilen jedoch weder ein gemeinsames Disulfid-Muster noch agieren sie an denselben Aminosäuren des Zielproteins. Manchmal sind die durch die Toxinbindung ausgelösten funktionellen Effekte sogar völlig gegensätzlich (vgl. Tabelle 2) [94]. Beispielsweise führt die Bindung eines μ O-Conotoxins an einen Natriumkanal zur Stromblockade, während die Bindung eines δ -Conotoxins an denselben Natriumkanal über den Mechanismus der verzögerten Inaktivierung eine Zunahme des Natriumstroms zur Folge hat.

Superfamilie	Familie	Angriffsort	Effekt	Disulfid-Struktur
M-Superfamilie	μ -Conotoxine	Na-Kanäle	Kanalblockade an Site I	CC-C-C-CC
O-Superfamilie	μ O-Conotoxine	Na-Kanäle	Kanalblockade \neq Site I	C-C-CC-C-C
	δ -Conotoxine	Na-Kanäle	verzögerte Inaktivierung	C-C-CC-C-C
A-Superfamilie	κ A-Conotoxine	K-Kanäle	Stromblockade	CC-C-C-C-C
O-Superfamilie	κ -Conotoxine	K-Kanäle	Kanalblockade	C-C-CC-C-C
	ω -Conotoxine	Ca-Kanäle	Kanalblockade	C-C-CC-C-C

Tabelle 2.:

Auswahl von Conotoxin-Superfamilien, die mit spannungsabhängigen Kationenkanälen interagieren, sowie einige untergeordnete Familien, Angriffsorte und Wirkungen der Toxinbindung. Erstellt und modifiziert nach [36, 93, 130].

Conotoxine zeichnen sich durch eine bemerkenswerte Spezifität für ihre jeweilige, meist im Nervensystem lokalisierte Zielstruktur aus (oft ein Ionenkanal, seltener ein Rezeptor

oder ein Transportmolekül) [94]. Dies hat einen guten Grund: Weil das Gift einer Kegelschnecke aus einer Vielzahl unterschiedlicher Toxinkomponenten besteht, verhindert nur die ausgeprägte Selektivität des einzelnen Conotoxins für seinen jeweiligen Angriffspunkt, dass sich die verschiedenen Wirkungen gegenseitig aufheben, anstatt synergistisch zu wirken [130].

Da sich die räuberischen Kegelschnecken weder durch besondere Geschwindigkeit noch durch große Kraft auszeichnen, sind sie auf ein schnell wirksames und äußerst potentes Gift angewiesen, um Beute zu schlagen oder Angreifer abzuwehren [108, 130].

Die hohe Spezifität der Toxinbindung erlaubt den Einsatz von Conotoxinen mit der Zielstruktur des spannungsabhängigen Ionenkanals als pharmakologisches Werkzeug zur Differenzierung und Charakterisierung eng verwandter Ionenkanal-Isoformen. Darüber hinaus zeigen diese Toxine eine Abhängigkeit ihres Bindungsverhaltens von der Kanalkonformation und liefern somit pathophysiologisch wichtige Informationen zu Struktureigenschaften der Kanalpore sowie der Charakteristik elektrischer Signalübertragung bestimmter Zellen [94, 130].

Conotoxine haben auch für den Menschen eine nicht unerhebliche Bedeutung: Die Gifte einiger Conus-Arten wie z.B. *Conus geographus* oder *Conus tulipa* enthalten Peptide, die auch beim gesunden Erwachsenen binnen Minuten zu Sehstörungen, Muskellähmungen und unbehandelt oft auch zum Tod durch Atemlähmung führen können [149, 93]. Andererseits ist mit Ziconotide (Prialt[®]) bereits seit dem Jahr 2005 ein Conopeptid als Schmerzmittel auf dem europäischen Markt zugelassen. Weitere Conotoxine mit ganz unterschiedlichen Zielstrukturen werden derzeit hinsichtlich ihres analgetischen, antiepileptischen, neuro- oder kardioprotektiven Potenzials untersucht [43].

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Peptid der disulfidreichen M-Superfamilie verwendet: das Conotoxin μ -GIIIA aus *Conus geographus* [37, 130]. μ -Conotoxine sind mit 22-25 Aminosäuren im Vergleich zu den polypeptidischen Toxinen anderer Giftarten relativ kleine Moleküle und verfügen über eine große Anzahl posttranslational modifizierter Aminosäuren [36]. μ -GIIIA blockiert in erster Linie spannungsabhängige Natriumkanäle der Skelettmuskulatur ($\text{Na}_v1.4$) mit einer IC_{50} von ca. 30 nM [84], für andere Natriumkanal-Subtypen zeigt es eine deutlich niedrigere Affinität [37, 85].

1.2.3. Mechanismus der Kanalblockade

Die Bindungsstelle von μ -GIIIA, die auch als „Neurotoxin-Seite 1“ oder „Site 1“ bezeichnet wird [49], liegt auf der extrazellulären Seite der Pore, überlappend mit der Bindungsstelle von TTX und STX am Selektivitätsfilter des Natriumkanals [127, 41](vgl. Tabelle 1). Aufgrund der räumlichen Überschneidung der Bindungsstellen wirken die μ -Conotoxine als kompetitive Antagonisten von TTX und STX [98, 147]. Die Bindung

eines Liganden an die Neurotoxin-Seite 1 führt zur Blockade des Natriumkanals, und der Gesamtstrom über die Membran im Rahmen einer Depolarisation nimmt abhängig von der Toxinkonzentration ab. Essentiell für diese Kanalblockade ist das Vorhandensein einer positiv geladenen Guanidinium-Gruppe, die sowohl TTX/STX als auch das Conotoxin μ -GIIIA aufweisen [126]. Dies ist nur einer der insgesamt 7 positiv geladenen Reste von μ -GIIIA, die eine wichtige Rolle bei der Bindung des Toxins an seine Zielstruktur spielen [34].

Ebenso wie TTX und STX binden und dissoziieren auch die μ -Conotoxine spannungsabhängig von ihrem Rezeptor [50, 97, 10].

Aminosäuresequenzen von μ -GIIIA und μ -GIIIB:

μ -GIIIA: R D C C T O O K K C K D R Q C K O Q R C C A – NH₂
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22

μ -GIIIB: R D C C T O O R K C K D R R C K O M K C C A – NH₂

Abbildung 10.: Die Aminosäuresequenzen von μ -GIIIA und μ -GIIIB unterscheiden sich nur an vier Positionen. In dieser Abbildung wurden die vier abweichenden Aminosäuren von μ -GIIIB rot markiert. Der Argininrest an Position 13 spielt bei der Bindung der Conotoxine eine wichtige Rolle, ebenso wie die anderen positiv geladenen Reste (hier blau markiert). Erstellt und modifiziert anhand von [122, 37, 130, 34].

Trotz vieler augenfälliger Gemeinsamkeiten unterscheiden sich TTX/STX und μ -GIIIA bezüglich ihres exakten Bindungsortes und -verhaltens: TTX und STX binden an wenige, hoch konservierte Aminosäurereste des Selektivitätsfilters und blockieren dadurch hochpotent, aber recht unspezifisch verschiedene Natriumkanal-Isoformen gleichermaßen. Conotoxine dagegen haben eine räumlich viel ausgedehntere Bindungsstelle, bestehend aus einer Anordnung unterschiedlicher Reste und interagieren aus diesem Grunde hochselektiv nur mit ausgewählten Natriumkanal-Isoformen [109, 10, 49]. Die geringste strukturelle Abweichung innerhalb der als Macrosite bezeichneten Bindungsstelle führt zum unvollständigen Porenverschluss und somit zu Leckströmen [70, 49]. Intensive Reihen von Experimenten mit dem nativen μ -GIIIA sowie mit durch Punktmutation veränderten μ -GIIIA- und Natriumkanal-Varianten führten zur Identifizierung einer Reihe entscheidend am Bindungs- und Blockadeverhalten beteiligter Aminosäurereste von Toxin und Kanal.

Auf der Seite des Toxins sind dies vorrangig die positiv geladenen Seitenketten der Aminosäuren R1, K8, K9, K11, R13, K16 und R19 (Einbuchstaben-Code; vgl. Abb. 10) [120, 10, 40, 84, 144, 34]. Eine Untersuchung aus dem Jahr 2016 betont die Bedeutung der drei Disulfidbrücken von μ -GIIIA, welche die dreidimensionale Struktur des Peptids in Form einer Pyramide stabilisieren und somit die Toxinbindung an skelettmuskuläre Natriumkanäle überhaupt erst ermöglichen.

Die für den sterischen und elektrostatischen Verschluss der Natriumkanalpore in erster Linie verantwortliche Aminosäure ist ein Argininrest an Position 13 des Conotoxins μ -GIIIA [120, 41]. Als Schlüsselstruktur der Blockade wurde die Guanidiniumgruppe der Seitenkette von R13 identifiziert [121]. Da der sterische Verschluss des Kanals durch den vergleichbar mit einer umgekehrten Pyramide tief in die Pore eintauchenden Rest R13 unvollständig ist, müssen elektrostatische Interaktionen von R13 mit der Porenregion für die vollständige „Abdichtung“ der Pore sorgen [30, 70]. Wird das Arginin an dieser Stelle durch einen anderen Aminosäurerest wie zum Beispiel Alanin ersetzt, resultiert eine ungleich niedrigere Bindungsrate des Toxins an den Kanal und somit eine Verringerung der Kanalblockade durch das Toxin [120, 10, 70]. Aber auch der Austausch der für die biologische Aktivität von μ -GIIIA weniger stark ausschlaggebenden positiv geladenen Aminosäure Arginin an Position 19 durch Alanin führt zu einer deutlich verringerten Toxinsensitivität des Natriumkanals um den Faktor 580 [34].

Auch auf Seiten des Natriumkanals konnte bislang eine Reihe für die Toxinbindung wichtiger Aminosäuren identifiziert werden. Hierzu gehören insbesondere die am Aufbau des äußeren Carboxylatrings der Ionenkanalpore beteiligten Aminosäurereste aller vier Domänen (für rNa_v1.4: E403, E758, D1241 und D1532, vgl. Abb. 26) sowie eine Reihe von Aminosäuren im Bereich der weniger stark konservierten S5-P-Linkerregion und der P-S6-Linkerregion von Domäne II [40, 84, 34].

Als unmittelbare Zielstruktur des Argininrestes an Position 13 von μ -GIIIA gilt Glutamat an Position 758 der Domäne II [30, 84, 71]. Da E758 als Bestandteil des äußeren Carboxylatrings jedoch eine zwischen den verschiedenen Kanal-Isoformen stark konservierte Aminosäure darstellt, muss die selektive Blockierbarkeit des skelettmuskulären Natriumkanals im Gegensatz zu der relativen Unempfindlichkeit der kardialen Isoform auch durch andere, kanal-spezifischere Aminosäurereste in größerer räumlicher Distanz zum Selektivitätsfilter bedingt sein [27, 49]. Insbesondere diverse Isoformen-spezifische Aminosäurereste der S5-P-Linkerregion und der P-S6-Linkerregion der Domäne II scheinen in Bezug auf die Selektivität der μ -Conotoxine eine entscheidende Rolle zu spielen [84, 85, 86].

Der Grund für das auffallend häufige Auftauchen von Aminosäureresten der Domäne II in der Liste der an der Toxinbindung entscheidend beteiligten Aminosäuren ist vermutlich die asymmetrische Form des Natriumkanals, welche eine Toxinbindung nur in einer ganz bestimmten Ausrichtung gestattet [84].

1.3. Fragestellung und Zielsetzung

Spannungsabhängige Natriumkanäle sind wesentlich an der Ausbildung von Aktionspotenzialen elektrisch erregbarer Zellen beteiligt. Bisher sind zehn Gene bekannt, die für diese Natriumkanäle kodieren. Neben der Lokalisation in den verschiedenen Geweben und der Stromcharakteristika unterscheiden sich die verschiedenen Natriumkanäle in ihren pharmakologischen Eigenschaften. So können Natriumkanäle zum Beispiel in Bezug auf ihre Sensitivität für den Natriumkanalblocker Tetrodotoxin eingeteilt werden. Auch aus den Giften der räuberisch im Meer lebenden Kegelschnecken wurden in der Vergangenheit verschiedene Peptide isoliert, die mit Natriumkanälen interagieren. Diese sogenannten Conotoxine führen entweder zu einer Reduktion des Natriumstroms durch Kanalblockade (μ -Conotoxine, μ O-Conotoxine) oder zu einer Erhöhung des Natriumstroms durch Verzögerung der schnellen Inaktivierung (δ -Conotoxine).

In diesem Projekt sollte die Affinität von μ -Conotoxinen, welche spezifisch an Subtypen von Natriumkanälen binden, ermittelt und in Bezug auf ihre Wirkung auf Natriumkanäle der Maus und des Menschen verglichen werden. Hierzu sollten verschiedene Natriumkanäle (mNa_v1.4, mNa_v1.5, hNa_v1.5) heterolog exprimiert und die pharmakologischen Eigenschaften dieser Kanäle funktionell mittels elektrophysiologischer Messungen untersucht werden. Zielsetzung war es, die pharmakologischen Eigenschaften muriner und humaner Natriumkanäle zu vergleichen.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Versuchsobjekte

2.1.1.1. Versuchstiere

Die verwendeten Oozyten stammen von weiblichen Krallenfröschen (*Xenopus laevis* [42, 52]). Die vornehmlich jungen Weibchen (durchschnittliche Lebenserwartung 15-25 Jahre) sind zungenlos, atmen über Lungen und stammen ursprünglich aus Afrika. Die in dieser Untersuchung verwendeten Tiere stammen aus einer US-amerikanischen Zucht der Firma NASCO (Fort Atkinson, 901 Janesville Avenue P.O. Box 901, Fort Atkinson, WI 53538-0901) und wurden zu fünf in 80 cm x 50 cm x 30 cm großen Glasbecken gehalten, die mit luftbetriebenen Filtern und Versteckmöglichkeiten ausgestattet waren. Zweimal wöchentlich erfolgte die Fütterung der Tiere mit handelsüblichem Teichfischfutter (eine Handvoll TetraPond Sticks pro Aquarium), einmal wöchentlich wurde das alte Aquarienwasser durch abgestandenes Leitungswasser und Reptisafe Wasseraufbereiter von Zoo Med ersetzt. Die Raumtemperatur betrug konstant 17 °C , der fensterlose Raum wurde 12 Stunden am Tag von zwei Neonröhren erhellt.

2.1.1.2. Zellkultur

Die Patch-Clamp-Experimente wurden unter Verwendung einer humanen embryonalen Nierenzelllinie (HEK-293) durchgeführt. Die HEK-293-Zellen wurden in DMEM low glucose mit 10% FCS gehalten und einmal wöchentlich subkultiviert. Dazu wird das enthaltene Medium abgesaugt, die Zellen zweimal gründlich mit PBS gespült und 0.5 ml Accutase hinzugegeben. Nach einer halben Minute wird die Accutase abgesaugt und die Zellen durch Zugabe von 5 ml frischen Mediums resuspendiert. Ungefähr 0.5 ml dieser Suspension werden in eine neue Zellkulturflasche überführt und mit 5 ml frischem Medium angereichert.

Die Transfektion dieser Zellen mit Natriumkanal-kodierender cDNA für die Patch-Clamp-Experimente wird im Methodenteil (Kapitel 2.3.1.2) erläutert.

2.1.2. Substanzen und Versuchslösungen

Agarosegel: Zur Herstellung eines 18 cm x 30 cm großen Agarosegels werden in einem Erlenmeyerkolben 2 g Agarose in 200 ml TAE-Puffer gelöst, 4 μ l Ethidiumbromid hinzugegeben, der Erlenmeyerkolben kurz geschwenkt und die Agaroselösung luftblasenfrei in eine Gelplatte mit Ladetaschenkamm gegossen, wo sie langsam erkaltet (Dauer: ca. 1 Stunde).

Agarose: Roth Agarose NEEO Ultra-Qualität f.d. DNA/RNA-Elektrophorese

TAE-Puffer: Invitrogen 10x TAE-Buffer (auf 1x verdünnen!)

(400 mM Tris-Acetate and 10 mM EDTA)

pH at 23 °C : 8.3

Ethidiumbromid: BIO RAD Ethidium Bromide Solution, 10 mg/ml

Agarplatten: 32 g LB-Agar (LB steht für lysogeny broth, ein komplexes Nährmedium zur Anzucht von Bakterienkulturen) werden in einem Liter Aqua dest. gelöst und für 15 Minuten bei 121 °C autoklaviert. Hinzu kommt Ampicillin in einer Konzentration von 100 μ g/ml. Der Ampicillin-Agar wird unter der Werkbank in sterile Petrischalen gegossen und erkaltet.

LB-Agar: invitrogen Lennox L Agar

Ampicillin-Tabletten: Stratagene Amp Tabs 2.5 mg/tablet

Antibiotika: Penicillin/Streptomycin: Gibco BRL (10000 IU/ml - 10000 UG/ml), Cat.-No. 15140-114

100 ml Penicillin/Streptomycin über Nacht im Kühlschrank auftauen lassen, am nächsten Tag zu je 1 ml aliquotieren und bei -20 °C lagern.

Dosierung: 1 ml/100 ml Barth-Medium mit Calcium.

Zinacef 750: Wirkstoff: Cefuroxim-Natrium

Hoechst AG Glaxo GmbH, Zulassungsnummer: 334.03.00

20 mg Zinacef abwiegen und in 50 ml destilliertem Wasser lösen. Die Lösung zu je 1 ml aliquotieren und bei -20 °C lagern. Dosierung: 1ml/100 ml Barth-Medium mit Calcium.

Barth-Medium ohne Calcium: 88 mM NaCl, 1 mM KCl, 2.4 mM NaHCO₃, 0.82 mM MgSO₄, 7.5 mM Tris HCl

pH 7.4 mit NaOH einstellen.

Barth-Medium mit Calcium: 88 mM NaCl, 1 mM KCl, 2.4 mM NaHCO₃, 0.82 mM MgSO₄, 7.5 mM Tris HCl, 0.33 mM Ca(NO₃)₂, 0.41 mM CaCl₂

pH 7.4 mit NaOH einstellen.

Barth-Medium mit Calcium vor dem Gebrauch mit Antibiotika versetzen: Pro 100 ml Barth-Medium: 1 ml Penicillin/Streptomycin + 1 ml Cefuroxim (Zinacef 750)

Betäubungsmittel (Tricaine): 1.25 g 3-Aminobenzoic Acid Ethyl Ester (Methansulfonat-Salz; SIGMA A-5040) in etwas Leitungswasser lösen. 50 ml 0.5 M NaHCO₃ zugeben, bis pH 7 erreicht wird und auf 1 l auffüllen. In eine Flasche abfüllen und im Kühlschrank aufbewahren. Diese Lösung kann mehrfach verwendet werden.

DEPC-Wasser: 500 ml Aqua bidest mit 500 μ l Diethylpyrocarbonat (DEPC) versetzen und über Nacht offen unter dem Abzug stehen lassen. Dann die Gefäße lose abdecken und für 20 Minuten bei 121 °C autoklavieren. DEPC: SIGMA Diethyl-Pyrocarbonat

DMEM low glucose: serumfrei; mit 10% bzw. 20% FCS

PAA (The Cell Culture Company) DMEM Low Glucose (1g/l), mit L-Glutamin

DNA-Größenmarker: Roche DNA Molecular Weight Marker X, 0.07-12.2 kbp, 0.25 μ g/ μ l

DNA Transfektion: Die Plasmide für die Transfektion wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Zimmer, Institut für Physiologie, Friedrich-Schiller-Universität Jena zur Verfügung gestellt. Das zugesandte DNA-Material umfasste:

- hNa_v1.5 pTSV40G-hH1 (human SCN5A)
- mNa_v1.5 pTSV40Gnew-mH1 (murine SCN5A)
- mNa_v1.4 pTSV40Gnew-mH2 (murine SCN4A)

DNA Transformation: Die DNA für die Transformation stammt ebenfalls von Herrn Dr. Zimmer, Institut für Physiologie, Friedrich-Schiller-Universität Jena. Der verwendete Vektor pSP64T stammt von A.L. George, Vanderbilt University, Nashville, TN, USA (s. Abb. 11).

- pSP64T-hH1
- pSP64T-mH2
- pSP6T4-mH1

Extrazelluläre Lösung für Patch-Clamp-Experimente: 140 mM NaCl, 2 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM Glukose, 10 mM HEPES, pH 7.4 (NaOH)

Intrazelluläre Lösung für Patch-Clamp-Experimente: 100 mM KCl, 10 mM HEPES, 10 mM EGTA, 10 mM NaCl, 4 mM Mg ATP, pH 7.2 (KOH)

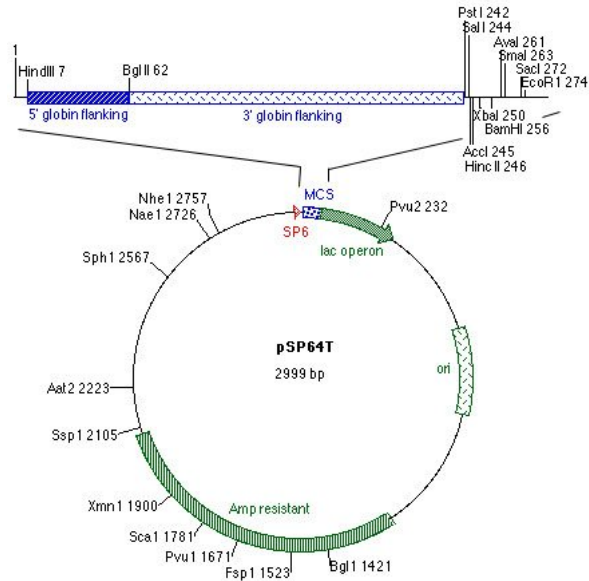


Abbildung 11.: Vektor pSP64T

Verwendungszweck: vgl. Kapitel 2.3.1.1 Abschnitt Transformation. Bildquelle: <http://www.xenbase.org/>, RRID:SCR_003280

Escherichia coli-Bakterien (Transformation): Invitrogen OneShot Top10 Competent Cells, Version M 6 April 2004

Ethanol 70% und 100% , vergällt: Herstellung in der universitätseigenen Apotheke.

FCS-Medium: Biochrom AG Fötale Bovines Serum, EU-zugelassene Herkunft: S O115

Flüssigmedium: LB Broth Base (Lennox L Broth Base)

20 g auf einen Liter Aqua dest. geben, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ampicillin Tabletten (Stratagene) hinzufügen und 15 Minuten lang bei 121 °C autoklavieren.

HEKFectin: Bio Rad HEKFectin Cell Line Specific Lipid

Isopropanol: Herstellung in der universitätseigenen Apotheke.

Kits:

Kit zur Plasmidpräparation: Plasmid DNA Purification Kit, Nucleo Bond plasmid purification, Macherey-Nagel

Kit zur Transkription: mMessage mMachine Protocol, Capped Transcription Reaction Assembly, Ambion

Kit zum quantitativen RNA-Assay: Quant-iTTM RiboGreen RNA Reagent and Kit, Molecular probes, invitrogen detection technologies

Ladepuffer:

600 μl Glycerol (GIBCO BRL, M.W. 92.10)

+ 1200 μl DEPC (SIGMA)

+ 200 μ l 2.5% Xylen-Cyanol in DEPC (BIO RAD)

Normal Frog Ringer (NFR): 115 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, pH 7.2 (NaOH)

PBS-Puffer: PAA (The Cell Culture Company) Dulbecco's PBS without Ca & Mg

Restriktionsenzyme: New England Biolabs (NEB) Restriktionsendonucleasen

	Herkunft	Schnittsequenz
NotI	Nocardia otitidis-caviarum (ATCC 14630), 10,000 u/ml	5'...GC↓GGCCGC...3' 3'...CGCCGG↑CG...5'
XbaI	Xanthomonas badrii (ATCC 11672), 20,000 u/ml	5'...T↓CTAGA...3' 3'...AGATC↑T...5'
EcoRI	E.coli RY13 (R.N. Yoshimori), 2,000 u/ml	5'...G↓AATTC...3' 3'...CTTAA↑G...5'

Natriumkanal-kodierende RNA: Die kanalkodierende RNA wurde ebenso wie die DNA von Herrn Dr. Zimmer, Institut für Physiologie, Friedrich-Schiller-Universität Jena, zur Verfügung gestellt.

- hNa_v1.5 (cRNA hH1, human SCN5A)
- mNa_v1.4 (cRNA mH2 bzw. SKM, mouse SCN4A)
- mNa_v1.5 (cRNA mH1, mouse SCN5A)
- rNa_v1.4 (cRNA rat SCN4A)

RTV: HTF Elektro GmbH Refag, Göttingen

Hellermann Silicon RTV 615, Lösungen A und B je 0.25 kg

18 g RTV 615 A und 2 g RTV 615 B gut miteinander vermischen, aliquotieren (ca. 0.5 ml pro Eppendorfgefäß) und bei -20 °C lagern.

Skinning Solution: 200 mmol L-Asparaginsäure, 20 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 5 mM EGTA, 10 mM HEPES-KOH, pH 7.4 (KOH)

SOC-Medium: invitrogen P/N 46-0700

Sodiumacetat Pufferlösung: SIGMA 3M: 0.2 μ m filtered, pH 5.2 bei 25 °C

TAE-Puffer: 242 g Tris-Puffer in 57.1 ml Acetat (Eisessig) lösen, 100 ml 0.5M EDTA (pH 8.0) hinzugeben und mit destilliertem Wasser auf 1 l auffüllen.

TE-Puffer: Für 10 ml TE-Puffer mischt man 100 μ l 1M Tris-Puffer (pH 7.4) mit 20 μ l 0.5M EDTA (pH 8.0) und fügt 9880 μ l DEPC-Wasser hinzu.

Tris-Puffer: Tris(hydroxymethyl)-aminomethan von Ambion

Toxine:

Das Conotoxin μ -GIIIA (Sequenz: RDCCTOOKKCKDRQCKOQRCCA [75]) erhielten wir als tiefgekühlte Trockensubstanz von Prof. Dr. Baldomero M. Olivera, University of Utah, USA. Jedes Eppendorfgefäß enthielt 20 nmol μ -GIIIA, die wir in je 1 ml DEPC-Wasser aufnahmen. Dies bezeichnen wir als Stock-Lösung 1 (20 μ M).

Fügt man zu 1990 μ l NFR-Lösung 10 μ l dieser Stock-Lösung 1 hinzu, erhält man eine 100 nM Lösung. Diese Toxinverdünnung wurde Stock-Lösung 2 genannt.

Verdünnungsreihe:

Toxinkonzentration	Stock 2	+	NFR
1 nM	20 μ l	+	1980 μ l
2 nM	40 μ l	+	1960 μ l
5 nM	100 μ l	+	1900 μ l
10 nM	200 μ l	+	1800 μ l
20 nM	400 μ l	+	1600 μ l
50 nM	1 ml	+	1 ml
100 nM	= Stock 2		

Toxinkonzentration	Stock 1	+	NFR
200 nM	20 μ l	+	1980 μ l
500 nM	50 μ l	+	1950 μ l

Trypsin: PAA (The Cell Culture Company) Trypsin EDTA (1:250) UV-Inactivated

Worthington Collagenase Typ 2 CLS-2: Kollagenase X4P7665

Aktivität der eingesetzten Chargen: 218 u/mg, bzw. 249 u/mg

CellSystems Biotechnologie Vertrieb GmbH

53562 St. Katharinen, Cat. No.: LS 004176

Worthington biochemicals corporation 730 Vassar Ave Lakewood, NJ 08701

Zubereitung der Kollagenase-Lösung: Auf einer Feinwaage werden 22 mg Kollagenase abgewogen und in einen sterilisierten Erlenmeyerkolben gegeben, hinzu kommen 10 ml Barth-Medium ohne Calcium.

2.1.3. Hilfsmittel

Augenschere: GROSSE, MARTIN Mikroschere, Westcott 11.4 cm, 41/2"

Injektionspipetten: Hilgenberg BO-Glaskapillaren, Enden geschnitten, Länge: 75 mm, Außendurchmesser: 2.0 mm, Wandstärke: 0.2 mm, Artikelnummer: 1408013

Die Injektionspipetten-Rohlinge werden wie die Transferpettor-Caps vier Stunden lang

bei 180 °C im Sterilisator gebacken, um eine Kontamination mit RNAsen auszuschließen.

Kulturflaschen: Cellstar Gewebekulturflaschen 50 ml, 25 cm², steril

Kulturschalen: Cellstar Gewebekulturschalen 35/10 mm

Messdraht: ADVENT Research Materials Ltd, Halesworth, Suffolk (England)
Silver Wire Purity 99,99%, Temper annealed Quadruple Teflon (PTFE)
Insulated, bare wire diameter 0.2 mm

Messkammern: Herstellung in der institutseigenen Werkstatt

Messpipetten für die Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Messungen (TEVC):
Hilgenberg GmbH Borosilicatkapillaren mit Filament 0.267 mm, Enden geschnitten,
Länge: 75 mm, Außendurchmesser: 2.0 mm, Wanddicke: 0.42 mm, Artikelnummer:
1403531

Messpipetten für die Patch-Clamp-Messungen: Kimble Glass, Inc. KIMAX-51,
Size/Cap 1.5-1.8 x 100 mm

Nadelhalter: Fine Science Tools GmbH, Bestellnr.: 12010-14

Nahtmaterial: MAXON* 4-0 1.5 Metric 6604-31, Monofilament Polyglyconate Syn-
thetic Absorbable Suture 18" 45 cm

Pasteurpipetten: WV Mainz Pasteur Capillary Pipettes, Short Size 150 mm

Petrischalen: FALCON 35 x 10 mm (Lagerung der Oozyten), Artikelnummer 1008
bei Schütt

Petrischalen: FALCON 60 x 15 mm (Selektion und Defollikulieren der Oozyten),
Becton Dickinson Labware, Artikelnummer 1016 bei Schütt

Pinzetten stumpf: GROSSE

MARTIN Splitterpinzetten, Feilchenfeld, 11.5 cm, 41/2"

Pinzetten spitz: Merck, Pinzetten nach Dumont, Edelstahl mit extra feiner Spitze Nr.
5, gerade, 110 mm, Artikelnummer: 2.322 191

Pinzetten zum Defollikulieren: Fine Science Tools GmbH Heidelberg, Bestell-Nr.:
11251-20

Pipettenbefestigung: HEKA Pipette holder, HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH

Pipettenglasbehälter: SCHOTT Duran

Serologische Pipetten: greiner bio-one, Cellstar 5 ml (606 180) / Cellstar 10 ml (607
180)

Transferpettor-Caps: BRAND KB, 10 μ l, Glaskapillare orange; Artikelnummer:

2701902

Die Transferpettor-Caps werden zunächst in vergälltem Ethanol (70%) gelagert und wenige Tage vor Gebrauch für vier Stunden bei 180 °C sterilisiert.

Transferpettorspritze: Braun Omnicam 20, 0.3 x 0.8 mm; 0.5 ml V40

Zählkammer: Fuchs-Rosenthal Assistent, Tiefe 0.200 mm; 0.065 mm²

Zellkulturschalen: NUNC (Deckel als Untersätze für die elektrophysiologischen Messkammern) mit Nocken, steril, Durchmesser 40 mm, Artikelnummer: 153066, NUNC GmbH & Co KG Wiesbaden - Biebrich

2.1.4. Geräte

Anti-Vibrationssystem: HALCYONICS

Brutschrank für E. coli: HERAEUS Thermo electron corporation Brutschrank Typ B 6120 mit Zeitschaltuhr

Brutschrank für HEK293: Kendro Laboratory Products, HERAEUS Typ B5060 EK-CO₂, CO₂-Auto-Zero Inkubator

Chlorierungsgerät: ACI 01 (Automatic Apparatus for Chloriding Ag Wires by Electrolysis) npi electronic GmbH

Computer und Software: Apple PowerMac G4/933/51, MAC OS X MACOM

PatchMaster v2.03, HEKA Elektronik

IGOR pro Version 5.0

GraphPad Prism 5

Durchflussanlage: Lorenz MPCU-3 ohne externe peristaltische Pumpe

Elektrophorese-Gerät: BIO RAD Sub-Cell GT Typ 15 x 15 cm TR mit BIO RAD Versorgungsgerät Power Pac 300

Injektionsmikroskop: ZEISS STEMI 2000-C

sowie eine SCHOTT Kaltlichtquelle Typ KL 1500 LCD

Kamera: KAPPA Farbkamera CF 15 DSP verbunden mit einem SONY Monitor

Kühlbrutschrank: Memmert Kühlbrutschrank Modell ICP 400

Lichtmikroskop: ZEISS Mikroskop STEMI SV6

sowie eine ZEISS Kaltlichtquelle KL 1500 LCD

Mikromanipulator (Injektion): Märzhäuser MM33 rechts mit Klemme 1/2"

Mikromanipulatoren (Messung): Märzhäuser MM33 rechts und links ohne Klemme

Mikroschmiede: Narishige MF 900 Mikroforge Mikroskop inkl. Objektiv, Seriennummer 00108

Mikroskop: ZEISS Axiovert 200

Lichtquelle: Power Supply EA-PS 3016-10

Oszilloskop: Tektronix TDS 3032 2-Kanal Digital Oszilloskop

Photometer: BIO RAD Smart Spec 3000 Spectrophotometer

zugehörige Küvetten: BIO RAD LABS Quartz Spectrophotometer Küvetten, Cell Micro, 16.50-Q-10/8.5 mm

Pipettenziehgerät A: HEKA temperature controlled pipette puller PIP5

Pipettenziehgerät B: Pipetten Poliergerät L/M-3P-A, List-Medical

Pipetten Polier- und Beschichtungsgerät: ZEISS Axiovert 25, Luigs & Neumann Erhitzer

Pipettierhilfe: Hirschmann Laborgeräte, pipetus-akku

Pumpe: Ismatec Schlauchpumpe Typ ISM 306, Ca-2E/8, 12 Volt

Schüttelinkubator: GFL Schüttelinkubator 3032 inklusive Zubehör
EXME 040485100002000

Schwenkmanipulatoren: Luigs & Neumann Schwenkmanipulator mini inkl. Säule

Thermocycler: Biometra UNO-Thermoblock

UV-Transilluminator (Lichtkasten): Phase Typ 312 NM

Verstärker für den Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp: npi electronic Turbo Tec-10 CX

Verstärker für den Patch-Clamp: HEKA Patch-Clamp EPC 10 mit PCI-Board

Werkbank: LaboTect GmbH, Reine Werkbank, Modell B40-112

Zentrifuge: eppendorf Centrifuge 5415D inklusive Standardrotor F45-24-11

2.2. Methoden

2.2.1. Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1. RNA-Synthese

Transformation

Die Transformation stellt den letzten Schritt einer Klonierung dar. Bei der Klonierung wird ein DNA-Fragment in einen bakteriellen Vektor integriert und nach Transformation in geeignete Bakterienkulturen millionenfach vervielfältigt.

Die von Herrn Dr. Zimmer zugesandte kanalkodierende DNA ist bereits mit einem geeigneten plasmidischen Vektor, dem pSP64T-Vektor, ligiert und kann ohne weiteres zur Transformation verwendet werden.

Üblicherweise werden für die Transformation *E. coli*-Stämme herangezogen, welche durch Zentrifugation und Resuspendierung in Calciumchlorid chemisch kompetent geworden sind. Das bedeutet, die betreffenden Bakterienstämme haben eine deutliche Steigerung ihrer Fähigkeit, bakterielle Plasmide einzuschleusen und die darauf kodierten Proteine zu exprimieren, erfahren.

1 μl des plasmidischen Vektor-Insert-Konstruktes wird auf 100 μl chemisch kompetenter gefrorener *E. coli* pipettiert und vorsichtig umgerührt. Nach 30minütiger Lagerung auf Eis wird das Röhrchen nun für 30 Sekunden in 42 °C heißes Wasser getaucht und sofort wieder auf Eis gestellt. Dieser sogenannte Hitzeschock bewirkt die Aufnahme des Plasmides in das Zellinnere des Bakteriums.

Dann gibt man 250 μl SOC-Medium hinzu und inkubiert die *E. coli* bei 37 °C für eine Stunde im schüttelnden Inkubator. Nach Ablauf der Zeit werden 50 μl der *E. coli*-Suspension auf Ampicillin-getränkte Agarplatten pipettiert und mit einem sterilisierten Glasspatel verstrichen. Die Agarplatten mit den Bakterienkolonien inkubieren bis zum folgenden Tag bei 37 °C im Brutschrank.

Am folgenden Tag können einzelne Kolonien mit einem sterilen Spatel aufgenommen und in ein Flüssigmedium (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ampicillin) überimpft werden. Dank eines im Vektor-Insert-Konstrukt integrierten Ampicillin-Resistenzgens können ausschließlich die Bakterien in Kolonien wachsen, welche das Plasmid auch tatsächlich aufgenommen haben. Das Mediumröhrchen wird wiederum über Nacht im Schüttelinkubator bei 37 °C inkubiert und somit die Bakterien mit Natriumkanal-kodierenden Plasmiden weiter vermehrt.

Plasmidpräparation

Durch die Transformation wurde die kanalkodierende DNA vervielfältigt. Nun gilt es, diese DNA mittels einer Plasmidpräparation von störenden Proteinen und anderen Fremdstoffen zu trennen und aufzureinigen.

Kleinere Plasmidmengen von 25 bis 75 μg werden mit Hilfe einer sogenannten Minipräparation, größere Mengen bis 350 μg mit Hilfe einer Midipräparation und große Mengen bis zu 1 mg mittels einer Maxipräparation isoliert. Übersteigt die zu erwartende Ausbeute an plasmidischer DNA 1 mg, bieten sich Mega- oder Gigapräparationen an. Da bei den durchgeführten Experimenten die photometrische Bestimmung der plasmidischen DNA-Konzentration Werte zwischen 170 und 417 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ergeben hatte, bot sich die Durchführung einer Maxipräparation der Plasmide unter Zuhilfenahme eines Plasmid DNA Purification Kits von Macherey-Nagel an.

Durch Zentrifugation des bakterienhaltigen Mediums mit 4,500 x g für 20 Minuten bei 4 °C erhält man ein Pellet, das in insgesamt 36 ml Pufferlösung mit RNase A resuspendiert wird. Die Pufferlösung enthält SDS zur alkalischen Lysierung der Bakterien, RNase A dient der Elimination störender RNA-Kontaminationen.

Dann kann die isolierte DNA gefiltert und an einer Anionenaustauschersäule (Nucleo-Bond AX500) gebunden werden. Diese Bindung findet zwischen den negativ geladenen Phosphatgruppen der Desoxynukleotide und der positiv geladenen Säulenmatrix statt und ermöglicht es, die DNA durch Waschen mit einer Pufferlösung weiter aufzureinigen. Anschließend erfolgt die Elution der isolierten und gereinigten DNA.

Um die DNA zu konzentrieren und zu entsalzen, wird das gewonnene Eluat im weiteren Verlauf mit Isopropanol ausgefällt, das Gemisch in einer 30 ml-Spritze aufgezogen und filtriert. Die filtrierte Lösung kann nun verworfen werden, die DNA befindet sich in dem Filter. Es folgt ein Waschdurchgang, in dessen Verlauf 2 ml 70% Ethanol langsam durch den Filter gepresst und anschließend verworfen werden. Der Filter wird getrocknet und auf eine mit 600 μl TE-Puffer gefüllte 1 ml-Spritze gesteckt. Beim Filtrieren des Puffers wird die in dem Filter enthaltene aufgereinigte und entsalzte DNA eluiert und in einem sterilen Eppendorfgefäß aufgefangen.

Die Konzentration der DNA-Lösung kann nun photometrisch bestimmt werden.

Linearisierung von DNA-Fragmenten

Nach erfolgter Plasmidpräparation ist die DNA zwar aufgereinigt, liegt jedoch immer noch als ringförmiges Molekül vor. Um eine Transkription durchführen zu können, muss die zirkuläre DNA mit Hilfe spezifischer Restriktionsendonukleasen in einen linearen Doppelstrang verwandelt werden. Diesen Vorgang bezeichnet man als Linearisierung.

Restriktionsendonukleasen gehören ursprünglich zum Schutzmechanismus bakterieller Mikroorganismen mit der Aufgabe, „fremde“ DNA (beispielsweise aus Bakteriophagen) zu erkennen und zu zerstören. Die „eigene“ DNA wird durch Methylierung kenntlich gemacht und somit vom enzymatischen Abbau verschont. Es existiert eine Vielzahl von Restriktionsenzymen, von denen jedes eine ganz bestimmte, aus 4-8 Basenpaaren bestehende DNA-Sequenz erkennt.

Bei der Suche nach dem geeigneten Restriktionsenzym wählt man eines, welches eine in dem Plasmid vorkommende Basensequenz erkennt und zerschneidet, dabei jedoch den kodierenden Abschnitt der DNA unbehelligt lässt. Im Idealfall kommt diese spezifische Sequenz nur ein einziges Mal in dem gesamten DNA-Doppelstrang vor, da ansonsten mehrere DNA-Fragmente unterschiedlicher Größe auftauchen.

Die verwendeten Restriktionsendonukleasen gehören alle zum Subtyp IIP, charakterisiert durch das Erkennen und Schneiden nicht-methylierter palindromischer DNA-Sequenzen von 6 bzw. 8 Basenpaaren Länge. Als Palindrome werden in diesem Zusammenhang DNA-Sequenzen bezeichnet, bei denen beide Stränge in einer Richtung die gleiche Basenabfolge zeigen.

- hNa_v1.5 wurde mit XbaI linearisiert.
- mNa_v1.4 wurde mit NotI linearisiert.
- mNa_v1.5 wurde mit EcoRI linearisiert.

Das angestrebte Verhältnis von Enzymaktivität zu DNA-Menge beträgt 5 Units (u) pro μg DNA, insgesamt werden je Kanaltyp 5 μg DNA eingesetzt.

Die nötige Menge DNA und das Restriktionsenzym nebst zugehörigem Enzympuffer werden in ein steriles Eppendorfgefäß pipettiert und mit DEPC-Wasser auf 50 μl aufgefüllt. Die Eppendorfgefäße kommen nun für zwei Stunden bei 37 °C in einen Thermocycler. Dort findet die Linearisierung der ringförmigen DNA-Stränge statt.

Es besteht die Möglichkeit, die Vollständigkeit der Restriktion zu kontrollieren. Dies gelingt, indem man eine definierte Menge DNA jedes Plasmidtyps mit DEPC-Wasser auf 50 μl auffüllt und als Kontrollprobe mit den tatsächlichen Proben mitlaufen lässt, d.h. zunächst ebenfalls für zwei Stunden in den Thermocycler stellt.

Gelelektrophorese und DNA-Extraktion

Bei der Gelelektrophorese werden Moleküle an Hand von Größe und Ladung getrennt. Dazu benötigt man ein in einer ionischen TAE-Pufferlösung liegendes Gel, an das eine elektrische Spannung angelegt wird. Zur Trennung von DNA und hochmolekularen Proteinen eignen sich insbesondere die relativ großporigen 1%igen Agarosegele mit einer durchschnittlichen Porengröße von 150 nm.

Um die einzelnen DNA-Stränge im Gel sichtbar zu machen, werden bei der Her-

stellung des Gels 4 μl Ethidiumbromid hinzugegeben. Ethidiumbromid ist ein roter Phenanthridin-Farbstoff, der in Nucleinsäuren interkaliert und dabei sein Absorptionsspektrum verändert. Im Gel enthaltene Nucleinsäuren sind daher nach der Elektrophorese bei 302 nm im UV-Transilluminator sichtbar.

Die Gelelektrophorese ist eine geeignete Methode, den Erfolg der durchgeführten Restriktion zu überprüfen. Je 45 μl DNA-Probe werden zu je 9 μl Ladepuffer gegeben, ein Eppendorfgefäß wird mit 2.5 μl eines DNA-Größenmarkers und 2.5 μl Ladepuffer beschickt und alle Proben (inklusive der nicht-restringierten Kontrollprobe) gemäß eines festen Schemas in die Ladetaschen eines 1%igen Agarosegels pipettiert.

Nun legt man eine Spannung an (10 Volt pro cm Gelstrecke) und lässt die Proben etwa 45 Minuten durch das Gel laufen.

Unter einem UV-Transilluminator kann das Gel jetzt in Bezug auf die entstandenen DNA-Banden untersucht werden. Da die Plasmide im Idealfall nur ein Mal geschnitten wurden, sollte auch nur eine Bande im Gel sichtbar sein. Mehrere Banden sind ein Hinweis darauf, dass entweder nicht die gesamte DNA geschnitten wurde, somit ein Teil noch ringförmig vorliegt und eine zweite Bande bildet, oder dass die Endonuklease die DNA nicht spezifisch an nur einer Stelle, sondern mehrfach restringiert hat. Die Lokalisation der Kontrollprobenbanden liefert einen Aufschluss darüber, auf welcher Höhe des Gels unzureichend geschnittene Reste der tatsächlichen Proben zu finden wären. An Hand des Größenmarkers lässt sich die Größe des entstandenen Fragments in Basenpaaren abschätzen.

Um die erfolgreich linearisierte DNA wieder aus dem Gel zu isolieren, werden die Banden zunächst mit einem Skalpell herausgeschnitten und in sterilen Eppendorfgefäßen verwahrt. Im weiteren Verlauf wird die DNA an Hand eines QIAEX II Agarose Gel Extraction Protocols extrahiert. Dieses Protokoll bedient sich der Silica-Suspensionsmethode, einem Verfahren, welches die Eigenschaft von Silikaten in Gegenwart chaotroper Salze, DNA zu binden, ausnutzt. Dazu werden QX1-Puffer (ein Hochsalzpuffer mit einer hohen Konzentration chaotroper Salze) und 10 μl QIAEX II-Puffer (die sogenannte Glasmilch) zu den Gelklumpen pipettiert und die Eppendorfgefäße für 10 Minuten bei 50 °C inkubiert. Dann werden die Proben wiederholt zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und das entstandene Pellet mit verschiedenen Waschpuffern resuspendiert, um sämtliche Agarose- und Salzreste zu eliminieren. Das aufgereinigte DNA-Pellet wird schließlich in 20 μl DEPC-Wasser aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

Die Konzentration der linearisierten DNA kann photometrisch bestimmt werden. Bei nicht zufriedenstellenden DNA-Konzentrationen besteht die Möglichkeit, Natriumacetat und 100% iges Ethanol zuzugeben, die DNA über Nacht bei -20 °C auszufällen, am folgenden Tag zu zentrifugieren und den Überstand abzupipettieren, um das erhaltene Pellet in wenig Volumen aufzunehmen.

Transkription

Als Transkription bezeichnet man die RNA-Synthese anhand einer DNA-Sequenz. Um bestimmte Ionenkanaltypen in *Xenopus*-Oozyten [42] untersuchen zu können, ist es notwendig, diese Kanäle als Vorstufen, nämlich in Form der kanalkodierenden RNA, in die Oozyten einzuschleusen. In den Oozyten findet aufgrund der dort vorhandenen Protein-Biosynthese die Translation, also die Synthese der Natriumkanäle statt.

Die Transkription der kanalkodierenden DNA wird mittels eines Capped Transcription Reaction Assembly aus dem mMessage mMachine Protocol von Ambion durchgeführt. Dieses Kit ist speziell auf die Synthese von 0.3-0.5 kb großen RNA-Transkripten zugeschnitten. Das Kit umfasst eine SP6 RNA-Polymerase, die Ribonucleotide für die Basenpaarung (2x NTP/CAP), eine Pufferlösung sowie nuclease-freies Wasser. Die Reagenzien werden schonend aufgetaut und bis zu ihrer Verwendung auf Eis gelagert; lediglich die Pufferlösung sollte Raumtemperatur aufweisen. 20 μl nuclease-freies Wasser werden mit 10 μl Ribonucleotidlösung in ein sterilisiertes Eppendorfgefäß pipettiert, hinzu kommen 2 μl Pufferlösung sowie 1 μg der linearisierten Template-DNA. Die Transkription beginnt, sobald die RNA-Polymerase dem Reaktionsgemisch hinzugegeben wird. Optimale Reaktionsbedingungen garantiert die zweistündige Inkubationszeit im Thermocycler bei konstanten 37 °C .

Die transkribierte RNA kann mit Hilfe einer Phenol-Chloroform-Extraktion und Isopropanol-Fällung aufgereinigt werden. Zunächst wird die Transkription durch Zugabe von 15 μl Ammoniumacetat gestoppt und die RNA-haltige Lösung dann mit einem Volumen Phenol-Chloroform versetzt und gemischt. Das Phenol denaturiert die vorhandenen Proteine, welche sich in der sogenannten Interphase anordnen. Das Phenol selber wird vom Chloroform in der unteren organischen Phase festgehalten, die RNA dagegen sammelt sich in der oberen wässrigen Phase und kann vorsichtig abpipettiert werden. Die Fällung der RNA erfolgt durch Zugabe eines Volumens Isopropanol. Durch 45minütige Lagerung bei -20 °C und anschließende 20minütige Zentrifugation bei 4 °C und maximaler Geschwindigkeit erhält man ein RNA-haltiges Pellet, das sich in einem beliebigen Volumen DEPC-Wasser aufnehmen lässt. Die RNA wird bei -80 °C gelagert.

Quantitativer RNA-Assay mittels Ribo-Green

Eine Abschätzung der RNA-Ausbeute gelingt mit Hilfe eines sogenannten Quant-iTTM RiboGreen RNA Reagent and Kit von Invitrogen.

Die Entscheidung fiel zugunsten der Durchführung eines high-range Assays, welcher RNA-Mengen zwischen 20 ng und 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ detektiert. Um eine Standardkonzentrationskurve zu erstellen, gibt man 100 μl 200fach verdünnten Quant-iTTM RiboGreen RNA

Reagenzes zu abnehmenden Konzentrationen einer im Kit enthaltenen ribosomalen RNA-Standardlösung (die Verdünnung erfolgt mit TE-Puffer). Die Konzentrationsbestimmung erfolgt mit Hilfe eines Spektrofluorometers bei Wellenlängen zwischen 480 und 520 nm.

2.2.1.2. Transfektion

Als Transfektion wird das Einschleusen fremder Nukleinsäuren in eukaryotische Zellen bezeichnet. Man unterscheidet die transiente, also vorübergehende Transfektion von einer stabilen Transfektion. Es existieren unterschiedliche chemische, biologische und physikalische Verfahren zur Transfektion. Zu den gängigsten chemischen Methoden gehören die Calciumphosphat-Präzipitation und die Lipofektion. Beide ermöglichen die Aufnahme der negativ geladenen Nukleinsäuren in das Zellinnere. Im Falle der Calciumphosphat-Präzipitation bildet die DNA nach Zugabe von Calciumchlorid und Natriumphosphat mit dem ausfallenden Calciumphosphat Kristalle, die endozytotisch in die Zelle aufgenommen werden. Bei der Lipofektion werden Nukleinsäuren liposomal gebunden und gelangen auf diese Weise in das Zellinnere.

Im Rahmen der normalen Proteinbiosynthese der Zelle werden die kodierten Proteine, beispielsweise die Natriumkanäle, exprimiert und in die Zellmembran eingebaut, wo sie elektrophysiologisch untersucht werden können.

Die für die Untersuchung von Ionenkanälen und Rezeptoren relativ häufig eingesetzten Zelllinien sind:

- HEK-293-Zellen: Die Abkürzung HEK bezeichnet das Ursprungsgewebe dieser Zellen, nämlich die humane embryonale Niere.
- CHO-Zellen: Auch die Abkürzung CHO weist auf die Herkunft dieser Zellen hin, die aus den Ovarien chinesischer Hamster stammen.
- HeLa-Zellen: Die Abkürzung HeLa bezieht sich auf den Namen der Patientin Henrietta Lacks, deren Zervixkarzinomzellen seit über fünfzig Jahren in Laboratorien kultiviert und zu Forschungszwecken herangezogen werden.

Eine gute Kontrolle über den Erfolg einer Transfektion stellt die Integration von GFP-DNA in jenen plasmidischen Vektor dar, welcher auch die Natriumkanal-kodierende DNA beinhaltet. GFP-DNA kodiert für ein spezielles Markerprotein, das sogenannte green fluorescent protein. Erfolgreich transfizierte Zellen exprimieren neben dem angestrebten Zielprotein auch das bei Anregung mit blauem oder ultraviolettem Licht fluoreszierende GFP. Durch den Einsatz eines Fluoreszenzmikroskopes lassen sich so die transfizierten, grün leuchtenden Zellen sehr leicht von nicht transfizierten Zellen

unterscheiden. Die grün fluoreszierenden Zellen haben offenbar die transfizierten Nucleinsäuren, nämlich das GFP wie auch den Natriumkanal, erfolgreich exprimieren können und eignen sich für elektrophysiologische Messungen.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Lipofektion mit HEKFectin (Firma Bio-Rad) durchgeführt.

Um den Zellen optimale Wachstumsbedingungen zu bieten, werden die Cover Slips, auf denen sie ausgesät werden sollen, zuvor mit Poly-L-Lysin beschichtet. Dazu werden unter der sterilen Werkbank je 1-2 Tropfen Poly-L-Lysin auf in Ethanol gewaschene und 4 Stunden im Sterilisator gebackene Cover Slips pipettiert und diese 20-30 Minuten stehen gelassen. Danach werden die Cover Slips dreimal mit sterilem destilliertem Wasser gespült und die überschüssige Flüssigkeit wird mittels einer serologischen Pipette abgesaugt.

Die HEK-293-Zellen werden in zwei 35 mm Petrischalen auf je 3-5 beschichteten Cover Slips ausgesät. In jede Petrischale werden hierfür 2 ml einer Zellsuspension pipettiert, deren Zelldichte 10^5 - 10^6 Zellen pro 2 ml beträgt. Die beiden Petrischalen werden nun 48-72 Stunden im Brutschrank bei 37 °C gelagert.

Nach Ablauf der zweitägigen Wachstumszeit kann die Transfektion durchgeführt werden. Hierzu werden unter der Werkbank zwei sterile Eppendorfgefäße (sog. Cups) vorbereitet:

- Cup A wird mit 200 μ l serumfreiem DMEM sowie 0.5-2 μ g plasmidischer DNA bestückt.

- Cup B enthält 200 μ l serumfreies DMEM sowie 24 μ l HEKFectin.

Unmittelbar nach dem Ansetzen werden die Inhalte von Cup A und Cup B zusammengeführt und 30 Minuten bei Raumtemperatur unter der Werkbank inkubiert.

In der Zwischenzeit sollten die zu transfizierenden Zellen in ihren Petrischalen aus dem Brutschrank genommen, das enthaltene Medium abgesaugt und die Cover Slips einmal mit serumfreiem DMEM gespült werden.

200 μ l des Transfektionsgemisches (Cup A + B) werden zusammen mit 800 μ l serumfreiem DMEM in jede Petrischale pipettiert und die Zellen im Brutschrank inkubiert. Nach 4-5 Stunden gibt man wiederum unter der sterilen Werkbank 1 ml DMEM mit 20% FCS in jede Petrischale und stellt die Zellen für 24 Stunden zurück in den Brutschrank. Am folgenden Tag ist ein Großteil der Zellen transfiziert und kann z.B. in Patch-Clamp-Messungen eingesetzt werden. Die Effektivität der Transfektion lässt sich mit Hilfe der Fluoreszenzintensität durch die GFP-Markierung bestimmen. Die durchschnittliche Effektivität der Transfektion mit HEKFectin liegt nach 48 Stunden bei ca. 80% [123].

2.2.2. Das *Xenopus*-Expressionssystem

Das *Xenopus*-Oozyten-Expressionssystem [95] ist ein weitverbreitetes System zur heterologen Expression unterschiedlicher Proteine und stellt eine geeignete Methode zur elektrophysiologischen und pharmakologischen Charakterisierung membrangebundener Rezeptoren und Ionenkanäle dar.

Injiziert man einen Ionenkanal kodierende mRNA in das Zellinnere, wird dieser Kanal binnen 24 Stunden bis zu einigen Tagen vom zelleigenen Proteinbiosyntheseapparat der Oozyte exprimiert und in der Regel als voll funktionsfähiger Ionenkanal in die Zellmembran integriert.

Die besondere Eignung des *Xenopus*-Expressionssystems beruht zum einen auf der Größe der Zellen: Reife Oozyten besitzen einen Durchmesser von etwa 1.0 mm und können problemlos sowohl injiziert als auch mittels intra- und extrazellulärer Messelektroden untersucht werden.

Außerdem verfügen Oozyten über eine geringe Dichte an endogenen Ionenkanälen. Eine große Anzahl zelleigener Ionenkanäle würde die elektrophysiologischen Untersuchungen insofern verfälschen, als die gemessenen Ströme eine Summe aller Ströme über die Membran darstellen und somit endogene Ströme potentiell einen großen Anteil am gemessenen Signal hätten.

Die *Xenopus*-Oozyten werden nach Dumont in sechs verschiedene Reifestadien eingeteilt [42]. Zellen, die für Genexpression und elektrophysiologische Messungen geeignet sind, befinden sich in den Stadien V und VI. Sie verfügen über einen dunkelbraun gefärbten animalen und einen schwächer pigmentierten vegetativen Pol.

Die Oozyten sind von mehreren Schichten und Membranen umgeben: Der zytoplasmatischen Membran der Oozyte liegt unmittelbar eine dünne Vitellinschicht auf. Sie wird umgeben von einem einzelligen Plattenepithel, der sogenannten Follikelschicht. Die äußere Hülle der Oozyten wird durch die Theka, bestehend aus kollagenem Bindegewebe, gebildet.

2.2.2.1. Operationstechnik

Die Oozyten für das Expressionssystem stammen von den unter Punkt 2.2.1.1 genannten Krallenfröschen und müssen operativ entnommen werden. Der Frosch wird für die Betäubung 20-30 Minuten in ein eisgekühltes Tricainebad gesetzt, bis er keinerlei Reaktion auf äußere Reize mehr zeigt. In diesem Zustand kann man ihn rücklings in eine eisgefüllte flache Plastikschaale legen, die Bauchhaut trockentupfen und mit der spitzen Pinzette eine Hautfalte fassen, die man mit Hilfe einer Augenschere ca. 1.5 cm lang einschneidet. Durch den Hautschnitt besteht nun freie Sicht auf den faszienumhüllten

Muskel. Man greift die Faszie mit der spitzen Pinzette, zieht den Muskel ein Stück heraus und schneidet ihn möglichst parallel zum Hautschnitt ein. Jetzt sieht man bereits die ersten Oozytenpakete unter der Muskelschicht, greift mit der stumpfen Pinzette in den Bauchraum hinein und windet die schlauchförmigen Säckchen vorsichtig durch den schmalen Spalt hinaus, wo sie abgeschnitten werden. Die Oozytenschläuche werden in eine mit Barth-Medium ohne Calcium gefüllte FALCON Petrischale gelegt und kurz inspiziert: Reife Oozyten sind ca. 1.0-1.2 mm im Durchmesser groß und weisen eine klare schwarz-weiße Polung auf. Sind genügend Oozyten entnommen, können der Muskel- und der Hautschnitt unter Zuhilfenahme eines Nadelhalters und sterilen Nahtmaterials einzeln mit jeweils 2-3 Stichen verschlossen werden.

Der Frosch wird kurz unter fließendem Wasser abgespült und dann in einem kalten Wasserbad mit dem Kopf oberhalb der Wasseroberfläche gelagert, um ein Ertrinken des Tieres zu vermeiden. Nach etwa vierstündiger Aufwachphase, während der man gelegentlich nach dem Frosch sehen sollte, kann das Tier in das Aquarium zurückgebracht werden.

2.2.2.2. Präparation der Oozyten

Die Oozytenschläuche werden nach der Entnahme manuell mit Hilfe der Pinzetten und Scheren aus dem OP-Besteck aufgetrennt und zu kleinen Oozytenbündeln zerschnitten. Die vollständige Isolierung der einzelnen Oozyten gelingt durch einen Kollagenaseverdau: Die Oozytenbündel werden in die Kollagenaselösung gegeben und bei 17.8 °C zwei Stunden im Schüttelbad inkubiert.

Bei der eingesetzten Enzymmenge empfiehlt es sich, nach etwa einer Stunde unter dem Mikroskop einen ersten Blick auf die Oozyten zu werfen. Diese Kontrolle ermöglicht es, einen übermäßig starken Verdau rechtzeitig zu erkennen und die Oozyten durch vorzeitige Zugabe von Barth-Medium mit Calcium vor der Auflösung zu bewahren.

Nach zwei Stunden sollten die Oozyten größtenteils vereinzelt und defollikuliert vorliegen. Sie sind nunmehr lediglich von der dünnen Vitellinmembran umgeben. Die Zugabe von Barth-Medium mit Calcium stoppt den Verdau durch die Kollagenase.

Die defollikulierten Oozyten werden bei 18 °C in mit Barth-Medium mit Calcium gefüllten und gekennzeichneten FALCON Petrischalen gelagert. Bei täglichem Mediumwechsel sind die Zellen auf diese Weise einige Tage haltbar.

2.2.2.3. Injektion von RNA

Zunächst werden mit Hilfe eines Elektrodenziehgerätes die Injektionspipetten gezogen. Hierbei ist die Verwendung von Handschuhen wichtig, um eine Kontamination der

Injektionspipetten mit ubiquitär vorkommenden Ribonukleasen, auch RNAsen genannt, zu vermeiden. Für zufriedenstellende Injektionsergebnisse empfiehlt es sich, die Spitzen der Injektionspipetten mittels einer „Mikroschmiede“ zunächst abzubrechen und dann durch vorsichtiges Annähern an einen glühenden Heizdraht in eine spitz zulaufende Form zu bringen, ähnlich den geschliffenen Spitzen industriell gefertigter Kanülen. Die Injektionspipetten können vor der Injektion in einem sterilen Behälter bis zu 12 Stunden gelagert werden.

Bis zu 10 defollikulierte Oozyten werden in einer speziell gefertigten Petrischale mit Ausbohrungen für die einzelnen Oozyten perlenschnurartig aufgereiht und das Medium bis auf einen kleinen Rest abgesaugt. Nun verbindet man eine Injektionspipette mittels eines kleinen Schlauches mit einer handelsüblichen Braun Omnifix 10 ml Spritze und spannt sie in die Halterung des Mikromanipulators ein. Ungefähr 1.5 μ l RNA werden unter Zuhilfenahme einer Transferpette in die Transferpette-Caps aufgenommen und portionsweise in die Injektionspipetten überführt. Wenn sich dies als schwierig erweisen sollte, kann man mit der angeschlossenen Spritze durch leichten Unterdruck den RNA-Tropfen gewissermaßen ansaugen. Nun befinden sich ca. 300 nl in der Injektionspipette; eine Menge, die für etwa 5-6 Oozyten ausreicht.

Die Injektionspipette wird mit Hilfe des Mikromanipulators so ausgerichtet, dass ihre Spitze exakt auf die erste Oozyte gerichtet ist. Nun sticht man die Injektionspipette unter ständiger mikroskopischer Sichtkontrolle in die Oozyte ein und lässt ca. 50 nl der nukleinsäurehaltigen Lösung in die Zelle laufen. Falls der Flüssigkeitspegel in der Injektionspipette nicht von selber absinkt, kann durch leichten Überdruck auf der angeschlossenen Spritze das gewünschte Volumen injiziert werden.

Um eine Kontamination der Anlage mit RNAsen zu vermeiden, müssen während des gesamten Injektionsvorgangs sterile Handschuhe getragen und die beteiligten Geräte und Flächen regelmäßig mit vergälltem Ethanol (70%) abgewischt werden.

Die injizierten Oozyten werden in eine mit Datum und Kanaltyp entsprechend gekennzeichnete und mit Barth-Medium mit Calcium gefüllte NUNC Petrischale gelegt und für 1-7 Tage bei täglichem Mediumwechsel im Kühlbrutschrank bei 18 °C gelagert.

2.2.3. Elektrophysiologische Methoden

2.2.3.1. Zwei-Elektroden-Spannungsklemme

Zur Charakterisierung der Ströme von Ionenkanälen hat sich die Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (TEVC) etabliert. Sie wird zur Messung von Ionenströmen über die gesamte Zellmembran eingesetzt und eignet sich auch für große Zellen (wie die verwendeten *Xenopus*-Oozyten) mit hoher Ionenkanaldichte.

Die membranständigen spannungsabhängigen Ionenkanäle einer Zelle ändern ihre Ionenleitfähigkeit in Abhängigkeit des aktuellen Membranpotenzials. Grundvoraussetzung für elektrophysiologische Versuche ist es, die Zelle durch Applikation eines sogenannten Haltestroms auf ein definiertes Membranpotenzial zu „klemmen“. Dies ist bei spannungsabhängigen Ionenkanälen in der Regel zunächst ein Membranpotenzial, bei welchem die beispielsweise zu untersuchenden Natriumkanäle geschlossen, aber aktivierbar sind (z.B. -80 bis -100 mV).

Zur Messung werden eine Spannungs- und eine Stromelektrode in die Zelle eingestochen. Über die Spannungselektrode detektiert ein Verstärker permanent die aktuelle Membranspannung der Zelle und vergleicht sie mit einem vom Experimentator vorgegebenen Sollwert. Weicht die gemessene Spannung von diesem Sollwert ab, wird vom Verstärker über die Stromelektrode gezielt Strom appliziert und die Zelle dadurch auf das gewünschte Membranpotenzial „geklemmt“. Durch eine gezielte Depolarisation öffnen sich spannungsabhängige Natriumkanäle und Kationen strömen in die Zelle ein. Die dadurch bewirkte Änderung des zu applizierenden Stromes dient als indirekte Messgröße für das Ausmaß des Ionenstroms durch die Natriumkanäle.

Messplatzaufbau

Zur Durchführung der Experimente wurde ein elektrophysiologischer Messplatz benutzt, an dem sowohl TEVC-Messungen an Froschoozyten als auch Patch-Clamp-Experimente an kultivierten Zellen möglich sind.

Der Messplatz ist durch einen Faraday'schen Käfig von externen elektromagnetischen Störgrößen abgeschirmt, ein Antivibrationssystem verringert mechanische Umgebungseinflüsse während der elektrophysiologischen Messungen. Das inverse Mikroskop ist zentral auf dem schwingungsgedämpften Labortisch platziert. Links und rechts des Objektisches sind über Mikromanipulatoren bewegliche Pipettenhalter mit integriertem Vorverstärker an Schwenkmanipulatoren befestigt. Sie enthalten eine Befestigung für die Messpipetten, welche in die Oozyten eingestochen werden.

Eine Kamera überträgt die mikroskopische Aufsicht direkt auf einen Monitor. Im Objektisch befindet sich eine kreisförmige Aussparung, in welche die Messkammer eingelassen werden kann. Ein dünner Schlauch lässt die Ringer-Lösung aus einem Reservoirbehälter oberhalb der Messkammerebene der Schwerkraft folgend in die Messkammer laufen. Diese Perfusion lässt sich mit Hilfe eines zwischengeschalteten Applikationsventils (Hamilton) unterbrechen. Ein Messfühler übermittelt ständig den Flüssigkeitspegel der Kammer an eine MPCU-Durchflussanlage, an der das gewünschte Badvolumen in der Messkammer eingestellt werden kann. Überschüssiges Medium wird mittels einer kleinen peristaltischen Pumpe, die über einen Schlauch mit der Kammer verbunden ist, entfernt.

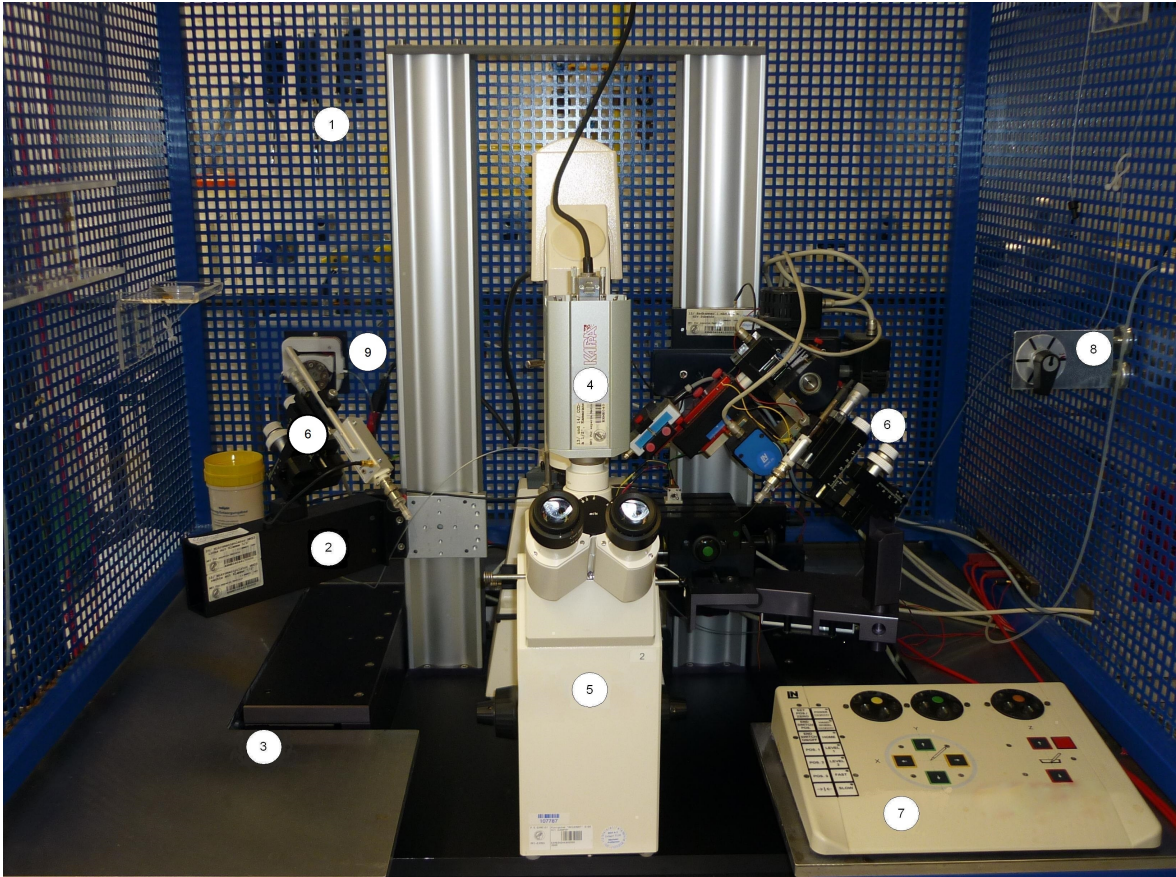


Abbildung 12.: Der electrophysiologische Messplatz

Dieser kombinierte electrophysiologische Messplatz ist sowohl für TEVC- als auch für Patch-Clamp-Messungen geeignet.

1: Faraday'scher Käfig, 2: Schwenkmanipulator mit Pipettenhalter, 3: Antivibrationsystem, 4: Kamera, 5: inverses Mikroskop, 6: Mikromanipulatoren für die Zwei-Elektroden-Spannungsklemme, 7: elektronisch gesteuerte Manipulatoren für die Patch-Clamp-Messungen, 8: Applikationsventil, 9: peristaltische Pumpe (Ismatec). Modifiziert nach Abb. 5 aus der Diplomarbeit „Untersuchungen zur Wirkungsweise von Conustoxinen auf spannungsabhängige Natriumkanäle“, A. Brink, Institut für Botanik der Georg-August-Universität zu Göttingen, 1998

Herstellung der Messelektroden

Für die Zwei-Elektroden-Messungen benötigt man einen Vorrat frisch gezogener Messpipetten, die mit Hilfe eines PIP5 Pipettenziehgerätes hergestellt werden können. Dabei werden die Messpipetten-Rohlinge durch eine Glühdrahtschlaufe gefädelt, fixiert und mittig auseinandergeschmolzen, sodass alle Pipetten über ein nahezu identisch geformtes spitz zulaufendes Ende verfügen.

Diese Pipetten werden an einem Polier- und Beschichtungsgerät mit RTV überzogen, um die Kapazität der Pipetten gering zu halten, und luftblasenfrei mit 2M KCl-Lösung befüllt, um eine elektrische Leitfähigkeit zwischen der Elektrode und der angestochebenen Oozyte zu gewährleisten. Nun taucht man die über dem Bunsenbrenner erhitzten stumpfen Pipettenenden kurz in Wachs, um zu verhindern, dass die in der Messpipette befindliche KCl-Lösung durch den Kapillareffekt in den Pipettenhalter gesogen wird. Dann können die Messpipetten über die Messelektrode, eine Silber/Silber-Chlorid-Elektrode, gestülpt und am Pipettenhalter befestigt werden.

Die Messelektroden werden unter Zuhilfenahme eines Chlorierungsgerätes hergestellt, indem ein ca. 5.5 cm langes Stück Silberdraht in einer galvanischen Zelle mit 2 M KCl einige Minuten lang chloriert wird. Für die Messungen dienen als extrazelluläre Indifferenzelektrode zwei gesinterte Silber-/Silberchlorid-Pellets, die am äußeren Rande der Messkammer platziert werden.

Die Messpipetten werden zur Messung in die Oozyten eingestochen und fungieren als elektrischer Kontakt zwischen dem Intrazellulärraum der Oozyte und der Silber/Silberchlorid-Elektrode, die über den Vorverstärker des Pipettenhalters mit dem eigentlichen EPC 10 Verstärker verbunden ist. Ein A/D-Board digitalisiert die vom Verstärker generierten analogen Signale und stellt so eine Verbindung zwischen Verstärker und Computer her.

TEVC-Messungen

Da die durch die Kollagenasebehandlung defollikulierten Oozyten immer noch von ihrer Vitellinmembran umgeben sind, gelangen die im Rahmen pharmakologischer Experimente applizierten Substanzen nur schwer durch diese Hüllschicht hindurch an ihren eigentlichen Wirkort, die Kanalproteine in der zytoplasmatischen Membran. Zur Entfernung der Vitellinmembran werden die Oozyten für einige Minuten in eine hypertone „Skinning Solution“ gelegt, in der sie auf Grund des osmotischen Drucks zusammenschrumpfen. Die durchsichtig schimmernde Vitellinschicht kann nun mit Hilfe zweier spitzer Pinzetten mechanisch entfernt werden.

Nun wird eine Oozyte mittig in einer mit NFR gefüllten Messkammer platziert, die

Messkammer in die Halterung des Objektisches gesetzt und fixiert und die beiden Erdungspellets so positioniert, dass sie ständigen Kontakt mit der Badlösung haben. Strom- und Spannungselektrode lassen sich mit Hilfe der Schwenk- und der Mikromanipulatoren zunächst makroskopisch, später unter ständiger mikroskopischer Sichtkontrolle an die Oozyte heranführen.

Der Widerstand der Messelektroden im Bad ist in der Regel zunächst noch sehr hoch, so dass beide Elektroden am Boden der Messkammer kontrolliert abgebrochen werden müssen. Ziel ist es, einen Elektrodenwiderstand zwischen 0.6 und 1.2 M Ω zu erreichen. Jetzt können die Elektroden, beginnend mit der Spannungselektrode, im Current-Clamp-Modus in die Oozyte eingestochen werden. Dabei ist ein Audio-Signal behilflich, welches durch die Messung des Ruhemembranpotenzials der Zelle die erfolgreiche intrazelluläre Platzierung der Messelektrode registriert und akustisch signalisiert.

Im Display kann nun die aktuelle Membranspannung der Oozyte abgelesen werden. Sie beträgt in der Regel zwischen -20 und -60 mV. Dabei korreliert die Spannung häufig mit der Vitalität der Zelle: Je negativer das Potenzial, desto intakter die Oozyte.

Beim Wechsel in den Voltage-Clamp-Modus wird die Membranspannung auf den am Computer vorgegebenen Wert von beispielsweise -100 mV geklemmt. Im unteren Display des Verstärkers erscheint daraufhin der sogenannte Haltestrom, also die Strommenge, welche für das Erreichen des Wunschpotenzials appliziert werden muss. Je höher der Haltestrom, desto mehr Leckagen weist die Zellmembran der Oozyte auf. Für den Haltestrom sind Werte zwischen 0.01 und 0.1 μ A optimal.

Damit kapazitive Ströme, also Umladeströme, die auf Grund der Kondensatoreigenschaften der Membran entstehen, die Messungen nicht beeinträchtigen und lediglich die tatsächlichen Ionenströme über die Membran aufgezeichnet werden, können diese Ströme vor Beginn der Messungen am Verstärker kompensiert werden. Zu diesem Zweck werden ab dem Wechsel in den Voltage-Clamp-Modus vom Verstärker kleine Prüfpulse appliziert. Diese Prüfpulse induzieren ebenso wie ein experimenteller Testpuls kapazitive Ströme, die auf dem Computerbildschirm sichtbar sind und am Verstärker kompensiert werden können.

Bei einem angelegten Membranpotenzial von -100 mV sind nahezu alle spannungsabhängigen Natriumkanäle geschlossen. Um Ionenströme aufzeichnen zu können, wird die Membran mittels eines 20 ms andauernden Testpulses auf ein Testpotenzial von -10 mV depolarisiert (Filter: 3kHz). Die Depolarisation bewirkt eine Öffnung der Kanäle und einen Natriumeinstrom in die Zelle.

Sobald Moleküle (in diesem Fall die Natriumionen) elektrogen in die Zelle einströmen, ändert sich der vom Verstärker zu applizierende Haltestrom, der notwendig ist, um das geänderte Potenzial aufrecht zu erhalten. Dieser applizierte Strom ist eine Messgröße, die dem Natriumstrom durch die Membrankanäle entspricht.

Ein wichtiges Kriterium für die Eignung einer Oozyte für die Messung ist die Größe des gemessenen Peak-Stroms, der bei den eingesetzten Natriumkanaltypen bei einem Testpotenzial von -10 mV im Idealfall zwischen 2 und 8 μA liegen sollte. Ist der maximale Natriumeinstrom größer, besteht die Gefahr der Registrierung von Strömen, bei welchen die Spannungsklemme nicht exakt ist (sogenannte ungeklemmte Ströme).

Es besteht die Möglichkeit, mittels einer Strom-Spannungs-Kurve (IV-Curve) die Spannungsabhängigkeit der Kanäle genauer zu beschreiben. Dabei wird die Zellmembran in 10 mV-Schritten bei -100 mV beginnend depolarisiert. Dieses Vorgehen ermöglicht beispielsweise die Ermittlung des kanalspezifischen Schwellenpotenzials.

In dem vorliegenden Projekt wurden die Natriumkanäle mit einem spezifischen Toxin (Conotoxin $\mu\text{-GIIIA}$) blockiert. Zur Beobachtung eventueller Stromänderungen während und nach der Zugabe des Conotoxins startet man noch vor Zugabe des Toxins einen Serienpuls, der die Membran in 10-sekündigen Abständen von -100 auf -10 mV depolarisiert und wartet acht bis zehn solcher Pulse mit konstanter Stromantwort ab, bevor man mit der Toxinapplikation beginnt.

Die Toxinapplikation erfolgt durch langsame Zugabe von insgesamt 2 ml Lösung in den äußeren Bogen der Messkammer. Die Pumpe verhindert automatisch ein Überfluten der Kammer, indem sie eine äquivalente Menge Medium aus dem anderen Messkammerbogen absaugt. Dadurch erreicht man einen kompletten Austausch der NFR-Badlösung durch die Toxinlösung.

Der Serienpuls wird frühestens 10 Minuten nach Toxinapplikation beendet. Falls ein Effekt nachweisbar war, lässt sich dieses Ergebnis mit einer erneuten Strom-Spannungs-Kurve festhalten. Um herauszufinden, ob die Kanalblockade reversibel ist, wird ein weiterer Serienpuls gestartet und die Perfusion eingeschaltet. Frisches NFR-Medium durchspült nun langsam die Kammer, und die Toxinlösung wird nach und nach abgepumpt. Ist die Blockade reversibel, wird eine weitere Strom-Spannungs-Kurve aufgezeichnet.

2.2.3.2. Patch-Clamp-Messungen

Die Patch-Clamp-Technik, die Mitte der 70er Jahre von Neher und Sakmann zum ersten Mal beschrieben wurde [104], eignet sich insbesondere für die Messung von Gesamtzellströmen und von Strömen einzelner Ionenkanäle über Membranareale kleiner oder mittelgroßer Zellen [58].

Messplatzaufbau

Da auch bei der Patch-Clamp-Methode elektrische Ströme im Rahmen extern vorgegebener Membranpotenziale gemessen werden, unterscheiden sich die durchgeführten

Patch-Clamp-Messungen - abgesehen von den für die jeweiligen Verstärker eingesetzten elektronischen Bauteilen und Verschaltungen - in der Durchführung der Experimente nur in wenigen Punkten von den TEVC-Messungen:

1. Statt zweier Mikroelektroden wird nur eine einzige Messelektrode verwendet, die über den Pipettenhalter an einem mittels eines Bedienfeldes dreidimensional beweglichen Mikromanipulator befestigt ist.
2. Die Herstellung eines elektrischen Kontaktes zwischen Zelle und Messpipette erfolgt nicht durch Anstechen, sondern durch „Ansaugen“ mit anschließendem Durchbrechen der Zellmembran („whole-cell-Konfiguration“).
Zu diesem Zweck ist der Pipettenhalter über einen dünnen Schlauch mit einer 20 ml Spritze verbunden, mit der unter Zuhilfenahme eines 3-Wege-Hahnes manuell ein Über- oder Unterdruck angelegt werden kann.
3. Als Verstärker fungierte ein Patch-Clamp EPC 10 Verstärker von HEKA.
4. Das inverse Mikroskop kam bereits beim Voltage-Clamp zum Einsatz. In dem Patch-Clamp-Aufbau wird zusätzlich eine integrierte Fluoreszenzfunktion zur Detektion erfolgreich transfizierter Zellen genutzt.

Patch-Clamp-Messungen

Die transfizierten Zellen auf den Cover Slips wurden in eine mit extrazellulärem Medium befüllte Messkammer gelegt, welche von der Perfusionsanlage kontinuierlich mit frischer extrazellulärer Lösung durchspült wird.

Für Patch-Clamp-Messungen werden spezielle Messpipetten benötigt, deren Herstellung mit Hilfe eines Pipetten-Ziehgerätes und eines Pipetten-Polier- und Beschichtungsgerätes erfolgt. Zunächst werden, ähnlich der TEVC-Methode, Pipettenrohlinge in dem Pipettenziehgerät durch eine Glühdrahtschlaufe gefädelt, befestigt und durch Aktivierung des Glühdrahtes mittig geschmolzen und gezogen, sodass aus einem Rohling zwei vergleichbar geformte Pipettenspitzen entstehen. Jede einzelne Messpipette wird dann mit RTV beschichtet, anders jedoch als bei den TEVC-Pipetten unter mikroskopischer Sichtkontrolle bis unmittelbar vor die Pipettenspitze, um die Kapazität der Messpipette so gering wie möglich zu halten. Die Hitze eines glühenden Drahtes poliert die scharfe Abbruchkante der Pipetten und beseitigt RTV-Reste an der Pipettenspitze; man sollte jedoch darauf achten, durch das mögliche Anschmelzen des Glases die winzige Öffnung nicht zu verschließen.

Die Messpipette wird zu etwa einem Fünftel mit intrazellulärer Lösung gefüllt, über die chlorierte Messelektrode geschoben und am Pipettenhalter befestigt. Das hintere offene

Ende der Pipette wird über einen dünnen Schlauch mit einer 20 ml Spritze verbunden. Ein leichter Überdruck vor dem Eintauchen in die Badkammer verhindert, dass die Pipettenöffnung auf dem Weg zu den Zellen durch Schmutzpartikel verunreinigt wird. Mit dem Mikromanipulator wird nun die Messpipette in Richtung der Messkammer bewegt, bis die Pipettenspitze Kontakt mit der Badlösung hat und am Verstärker ein Spannungsabgleich durchgeführt werden kann. Der Widerstand der Pipettenspitze betrug bei den durchgeführten Messungen in der Regel zwischen 3 und 5 M Ω .

Nun kann die Pipette unter Zuhilfenahme des dreidimensional beweglichen Mikromanipulators vorsichtig an die Zellen herangefahren werden. Sobald die Pipettenspitze Kontakt mit einer Zelle bekommt, steigt der Widerstand an.

Die Messpipetten dienen nicht dem Anstechen der Zelle, sondern sollen sich mit ihrem glatten Rand der Zellmembran auflegen und unter manueller Anlage eines leichten Unterdrucks am hinteren Ende der Pipette gewissermaßen an der Zelle festsaugen. Durch dieses Manöver entsteht zwischen dem mit intrazellulärer Lösung gefüllten Pipetteninneren und der extrazellulären Lösung außen ein hochohmiger elektrischer Widerstand, das sogenannte Gigaseal, mit Widerständen von mindestens 1 G Ω . Diese Messkonfiguration wird als „cell-attached-configuration“ oder auch „on-cell-configuration“ bezeichnet. In der „cell-attached-configuration“ können Ströme durch einzelne Ionenkanäle innerhalb des Membranareals unter der Messpipette gemessen werden [58].

Sobald ein Gigaseal entstanden ist, wird der Unterdruck beseitigt - das Seal bleibt erhalten. Dies ist auf die Ausbildung von Wasserstoff- und Salzbrückenbindungen sowie auf Van-der-Waals-Kräfte zwischen Membran und Borosilikatpipette zurückzuführen. Nun kann am Verstärker ein Abgleich der schnellen kapazitiven Ströme durchgeführt werden. Außerdem wird das Membranpotenzial von initial 0 mV auf stärker negative Werte bis beispielsweise -60 mV geklemmt.

Durch kurze elektrische Pulse oder kurze starke Unterdrücke innerhalb der Pipette lässt sich die Membran unterhalb der Pipettenöffnung durchbrechen, ohne dass das Gigaseal dabei zerstört wird. In dieser sogenannten „whole-cell-configuration“ besteht eine Kontinuität zwischen dem Zellinneren und dem Inneren der Pipette. Ionenströme über die gesamte Zellmembran können so abgeleitet werden.

Eine Kompensation langsamer transienter Ströme, die aufgrund der Kapazität der Zelloberfläche entstehen, erfolgt über eine entsprechende Einstellung des Verstärkers. Außerdem wird eine sogenannte R_S -Kompensation durchgeführt. Dies bedeutet, dass durch eine leichte Steigerung der Stromapplikation zytosolische Serienwiderstände ausgeglichen werden. Je stabiler die Zelle ist, desto mehr Kompensation duldet sie auch. In den hier durchgeführten Experimenten an transfizierten HEK-293-Zellen ließen sich jedoch nicht mehr als 40% R_S -Kompensation erzielen.

Nun kann die Zelle auf Ruhemembranpotenziale zwischen -80 und -100 mV geklemmt

werden. Erfolgreich transfizierte Zellen weisen bei der Applikation von Testpulsen Natriumströme von bis zu 10 nA auf, deren Eigenschaften z.B. durch die Erstellung einer Strom-Spannungskurve genauer untersucht werden können.

Bei der Durchführung eines Serienpulses kann, analog zum Vorgehen bei der TEVC-Methode, nach ca. 10 Pulsen mit konstanter Stromantwort mit der Toxinapplikation begonnen werden. Dazu wurde die Perfusion mit der extrazellulären Lösung unterbrochen und 2 ml einer Toxinlösung vorsichtig in die Messkammer pipettiert. Eine Kanalblockade durch das hinzugefügte Toxin ist als abnehmende Stromantwort auf den Serienpuls ersichtlich und auch quantifizierbar.

Durch Wiedereinschalten der Perfusion kann die Kanalblockade auf ihre Reversibilität untersucht und das Resultat mittels einer Strom-Spannungskurve dokumentiert werden.

2.2.3.3. Statistik

Die Erstellung der Dosis-Wirkungskurve und die Berechnung der mittleren inhibitorischen Toxinkonzentration IC_{50} erfolgten mit Hilfe der Statistik-Software Graph Pad Prism 5 (Graph Pad Software Inc.).

Es wurden hierbei aus 29 Experimenten die arithmetischen Mittelwerte und - sofern für eine Verdünnungsreihe mehrere Experimente durchgeführt worden waren - die Standardabweichungen berechnet.

Die aus diesen Daten erstellten Dosis-Wirkungskurven wurden als

- Standard-Hill-Kurve ($\log(\text{inhibitor})$ vs. response)
- erweiterte Hill-Kurve ($\log(\text{inhibitor})$ vs. normalized response - variable slope)
- Richards-Kurve (asymmetric - five parameter)

dargestellt.

Die der Berechnung der entsprechenden Kurvenform zugrunde liegenden Formeln sind im Ergebnisteil (Kapitel 3.2.4) aufgeführt und erläutert.

Die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde mit Unterstützung durch Herrn Dr. rer. pol. Reinhard Vonthein, Dipl.-Stat. (Univ.) im Rahmen einer biometrischen Beratung der Universität Lübeck vorgenommen.

3. Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung pharmakologischer Eigenschaften von murinen und humanen Natriumkanal-Isoformen ($mNa_v1.4$, $mNa_v1.5$ und $hNa_v1.5$) im Hinblick auf die unterschiedliche Sensitivität der Kanäle gegenüber dem Kegelschneckengift μ -GIIIA.

3.1. RNA-Synthese

Im ersten Schritt dieser Arbeit ging es um die Synthese natriumkanalkodierender RNA. Hierzu wurde eine Transformation der aus Jena zugesandten und bereits in den pSP64T Vektor integrierten DNA durchgeführt (vgl. Kapitel 2: Material und Methoden).

Die photometrisch ermittelten DNA-Konzentrationen nach erfolgter Plasmidpräparation waren zufriedenstellend:

- $hNa_v1.5$ pDNA: 312 $\mu\text{g/ml}$
- $mNa_v1.4$ pDNA: 417 $\mu\text{g/ml}$
- $mNa_v1.5$ pDNA: 170 $\mu\text{g/ml}$

Nach der Linearisierung der plasmidischen DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt und die DNA extrahiert. Die Konzentration der linearisierten DNA wurde erneut photometrisch bestimmt:

- $hNa_v1.5$ lin dsDNA: 0.4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
- $mNa_v1.4$ lin dsDNA: 0.55 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
- $mNa_v1.5$ lin dsDNA: 0.325 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

Da die empfohlene DNA-Konzentration für eine erfolgreiche Transkription laut Herstellerangaben 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ beträgt, die unsererseits erzielten DNA-Konzentrationen somit grenzwertig niedrig waren und dies die zu erwartende Ausbeute in der Transkription möglicherweise eingeschränkt hätte, entschieden wir uns zur Ausfällung der Proben mithilfe von Natriumacetat und Ethanol mit anschließender Zentrifugation und Eluierung

der linearisierten DNA in einem geringeren Flüssigkeitsvolumen.

Die anschließende Transkription der DNA-Proben verlief erfolgreich. Im quantitativen RNA-Assay ließen sich unerwartet große Mengen an RNA messen:

- hNa_v1.5 RNA: 119.0 µg/ml
- mNa_v1.4 RNA: 89.8 µg/ml
- mNa_v1.5 RNA: 118.1 µg/ml

Laut Hersteller beträgt die durchschnittliche kumulative Ausbeute bei Verwendung einer SP6-Polymerase ca. 15-25 µg RNA. Somit lag genügend RNA vor, um die geplanten elektrophysiologischen Untersuchungen durchführen zu können.

3.2. TEVC-Experimente

3.2.1. Expression der Natriumkanäle in Oozyten

Das Xenopus-Expressionssystem ließ sich rasch etablieren. Zunächst erfolgte die Expression eines sogenannten Test-Kanals rNa_v1.4 in Xenopus-Oozyten. Im Durchschnitt konnten pro Operation 10-15 Oozyten erfolgreich defollikuliert und RNA injiziert werden. Bei ca. der Hälfte der injizierten Oozyten konnten im Rahmen elektrophysiologischer Messungen Natriumströme durch depolarisierende Reize ausgelöst werden.

Die Expression der eigens transkribierten Natriumkanäle hNa_v1.5, mNa_v1.4 und mNa_v1.5 jedoch schlug in vielfach wiederholten Versuchen fehl. In keinem Experiment ließ sich ein Natriumstrom bei den injizierten Oozyten messen.

Herr Dr. Zimmer aus Jena hatte neben der plasmidischen DNA auch die entsprechende cRNA der jeweiligen Kanaltypen zur Verfügung gestellt. Nach Injektion dieser RNA der drei im Fokus stehenden Natriumkanaltypen konnten membranpotenzial-abhängige Natriumeinströme in die injizierten Oozyten registriert werden.

3.2.2. Registrierung von Original-Stromkurven verschiedener Natriumkanal-Isoformen mittels einer Zwei-Elektroden-Spannungsklemme

Mit Hilfe der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme konnten nach Applikation eines depolarisierenden Reizes Natriumströme bei den Oozyten gemessen werden (vgl. Abb. 13-15).

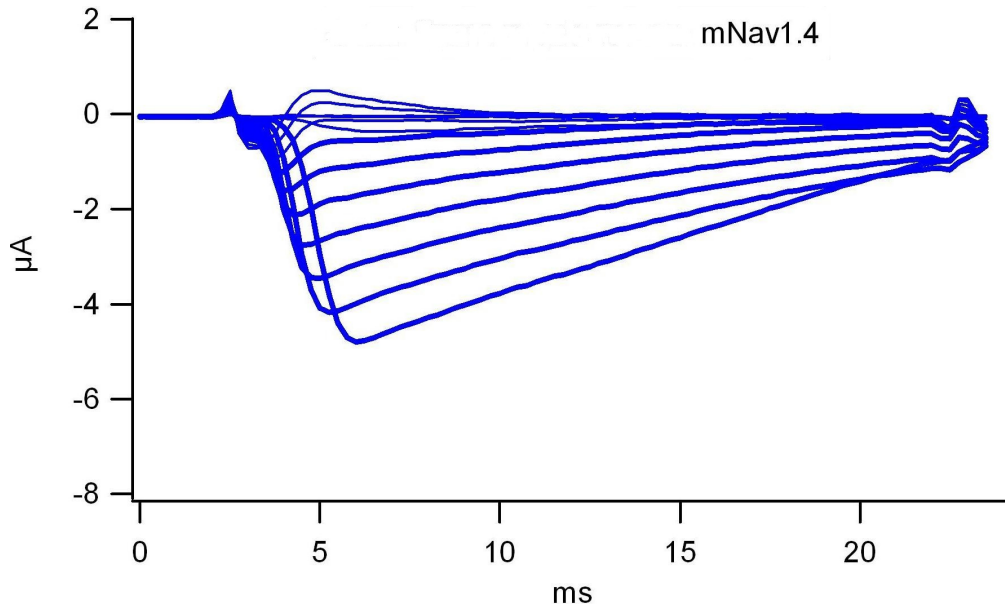


Abbildung 13.: Originalstromkurven des murinen Ionenkanals $mNa_v1.4$ bei Depolarisation der Zellmembran

Diese Abbildung zeigt den Natriumeinstrom durch $mNa_v1.4$ -Kanäle in eine Oozyte in Abhängigkeit eines die Membran depolarisierenden Stromimpulses. Bei stufenweiser Depolarisation der Zellmembran von -100 mV auf zuletzt -10 mV kommt es zu einer spannungsabhängigen Aktivierung der membranständigen Natriumkanäle, welche einen messbaren Ionenstrom zur Folge hat.

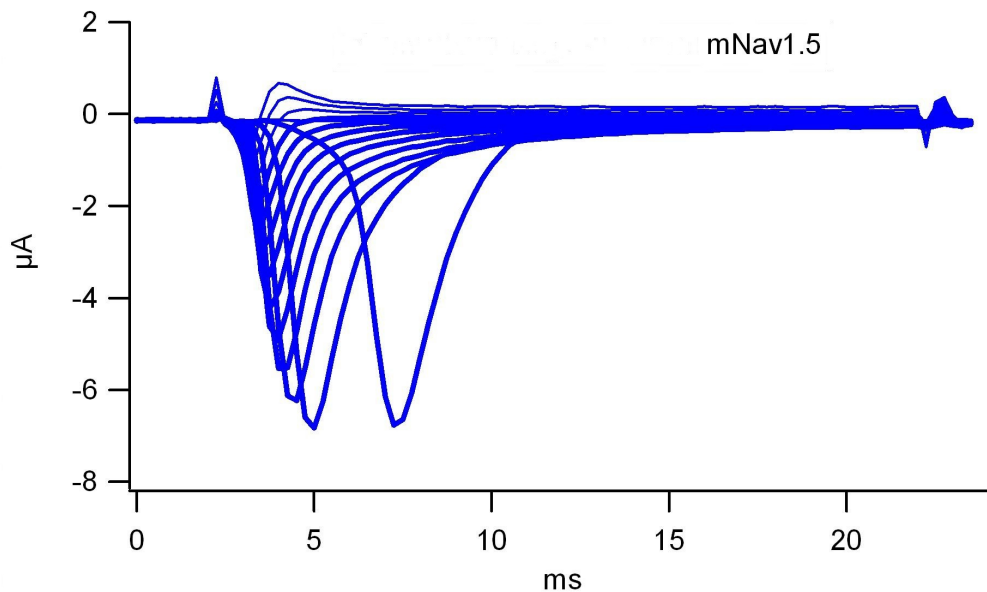


Abbildung 14.: Originalstromkurven des murinen Ionenkanals $mNa_v1.5$ bei Depolarisation der Zellmembran

Diese Abbildung zeigt den Natriumeinstrom durch $mNa_v1.5$ -Kanäle in eine Oozyte in Abhängigkeit eines depolarisierenden Reizes. Bemerkenswert ist die raschere Inaktivierung der Kanäle im Vergleich zu den Kanälen der Skelettmuskulatur.

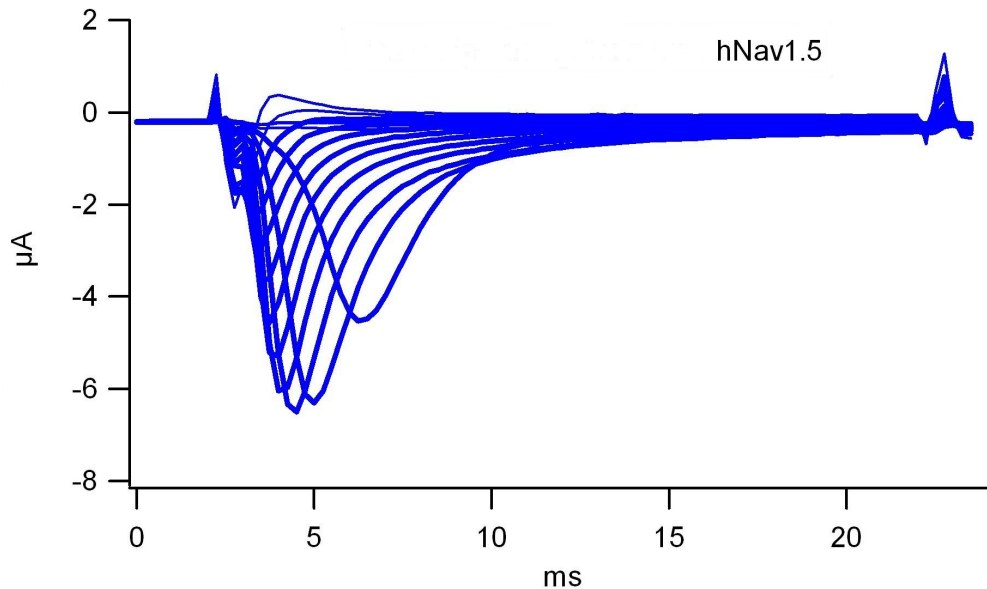


Abbildung 15.: Originalstromkurven des humanen Ionenkanals $hNa_v1.5$ bei Depolarisation der Zellmembran
 Diese Abbildung zeigt den spannungsabhängigen Natriumeinstrom durch $hNa_v1.5$ -Kanäle in eine Oozyte. Die Stromcharakteristika ähneln denen des murinen herzmuskelspezifisch lokalisierten Ionenkanals.

Die Unterschiede zwischen den Natriumkanal-Isoformen beschränken sich nicht allein auf ihre Sensitivität gegenüber verschiedenen Toxinen. Der Vergleich der humanen mit der murinen Isoform von $Na_v1.5$ offenbart auf den ersten Blick die unterschiedliche Kinetik des Aktivierungs- und Inaktivierungsprozesses (vgl. Abb. 13 - 15).

Während der skelettmuskuläre Natriumkanal über 20 ms bis zum vollständigen Sistieren des Ionenstroms über die Membran benötigt, ist der Stromfluss bei den kardialen Isoformen der Natriumkanäle bereits binnen 10 ms abgeschlossen. Die herzmuskelspezifisch lokalisierten Natriumkanäle inaktivieren somit etwa doppelt so schnell wie die skelettmuskulären Isoformen.

Die Eigenschaften von Aktivierung und Inaktivierung variieren nicht nur zwischen den verschiedenen Natriumkanal-Isoformen, sondern hängen auch von der jeweiligen Spezies (z.B. Maus, Ratte oder Mensch) und dem verwendeten Expressionssystem ab [137].

3.2.3. Natrium-Stromblockade durch μ -GIIIA

Nach erfolgreicher Expression der Natriumkanäle $mNa_v1.4$, $mNa_v1.5$ und $hNa_v1.5$ und Etablierung der elektrophysiologischen Messmethode konnte die Empfindlichkeit dieser Natriumkanal-Subtypen gegenüber dem Conopeptid μ -GIIIA untersucht werden.

Die Applikation von $1 \mu\text{M}$ μ -GIIIA führt bei dem skelettmuskulären Natriumkanal

$mNa_v1.4$ zu einer signifikanten Stromabnahme (vgl. Abb. 16). Zur Registrierung der Veränderung von Nettoströmen über die Zeit wird ein sogenannter Serienpuls appliziert, welcher die Membran in zehnstündigen Abständen von -100 mV auf -10 mV depolarisiert. Bei Applikation einer den Ionenkanal blockierenden Substanz sind mit Hilfe dieses Serienpulses der zeitliche Verlauf und das Ausmaß der Kanalblockade bei einer definierten Toxinkonzentration nachvollziehbar. In Abb. 16 sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nur die Stromantworten des ersten (blau) und des letzten (schwarz) depolarisierenden Stromimpulses abgebildet.

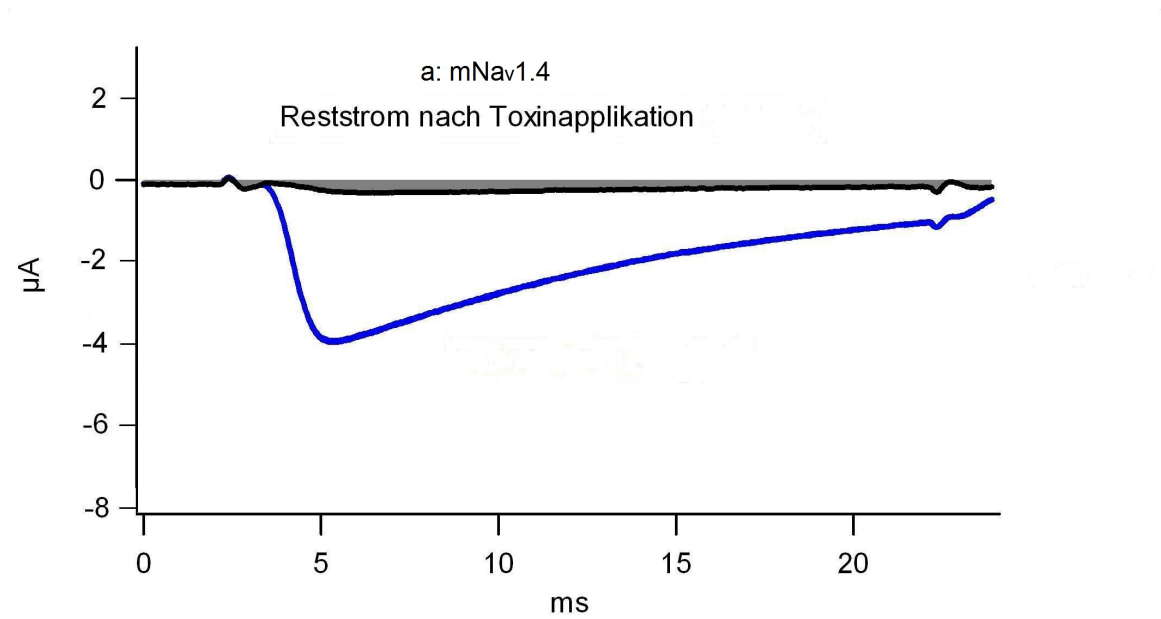


Abbildung 16.: Natrium-Stromblockade durch μ -GIIIA

Abnahme des Natriumeinstroms in die Zelle nach Blockade von $mNa_v1.4$ durch $1 \mu M$ μ -GIIIA. Der Gesamtstrom vor Applikation des Conotoxins (blau) betrug $-3.9 \mu A$. Nach Applikation des Conotoxins ist lediglich ein geringer Reststrom (schwarz) von $-0.2 \mu A$ festzustellen.

Die Blockade der Natriumkanäle durch μ -GIIIA ist nach Entfernung des Toxins durch einen Austausch des extrazellulären Mediums und konstante Perfusion der Messkammer mit Ringer-Lösung innerhalb von ca. 30 Minuten vollständig reversibel (vgl. Abb. 17).

In der zusammenfassenden Darstellung der Nettostrom-Mittelwerte mehrerer Experimente über die Zeit nach Applikation von μ -GIIIA ist die zeitliche Dynamik der Natriumkanal-Blockade und die Restitution des Natriumstroms nach Auswaschen des Toxins zu sehen (vgl. Abb. 18).

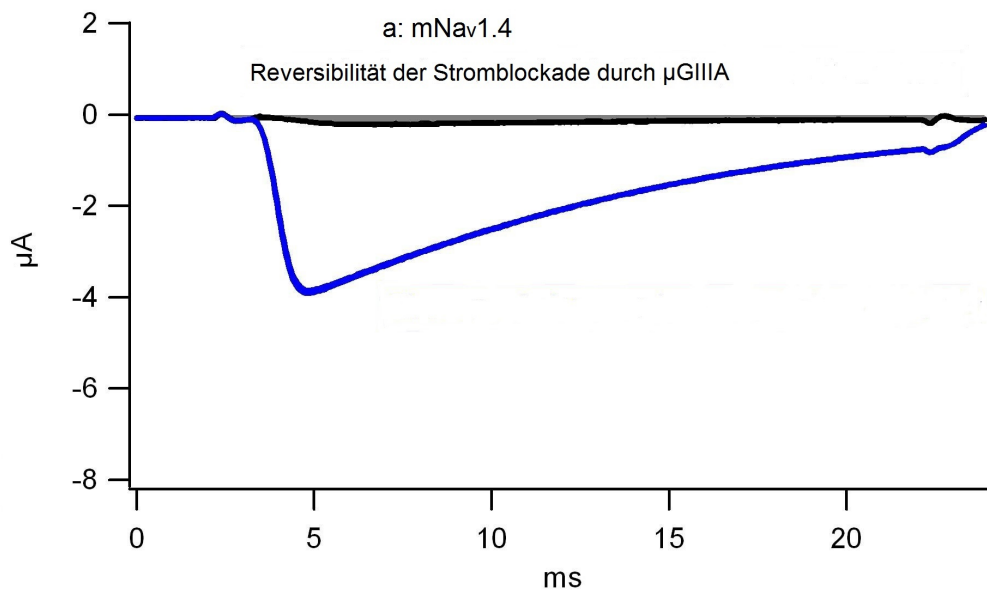


Abbildung 17.: Reversibilität der Stromblockade von $mNa_v1.4$ durch μ -GIIIA
Initial ist nur ein geringer Reststrom von $-0.2 \mu A$ (schwarz) messbar. Nach dem Auswaschen beträgt der restituierte Strom (blau) $-3.85 \mu A$.

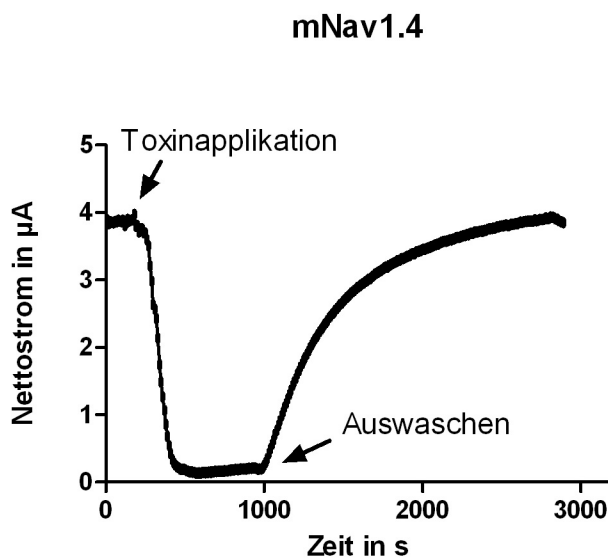


Abbildung 18.: Nettostrom von $mNa_v1.4$ während der Toxinapplikation
Der auf der Y-Achse abgebildete Nettostrom ist der Mittelwert mehrerer experimentell ermittelter Natriumkanalströme in die Zelle in Abhängigkeit der Zeit nach Applikation des Conotoxins μ -GIIIA. Es wird ersichtlich, dass der $mNa_v1.4$ -Kanal innerhalb weniger Minuten durch $1 \mu M \mu$ -GIIIA reversibel blockiert wird (maximale Blockade 5.2 Minuten nach Toxinapplikation).

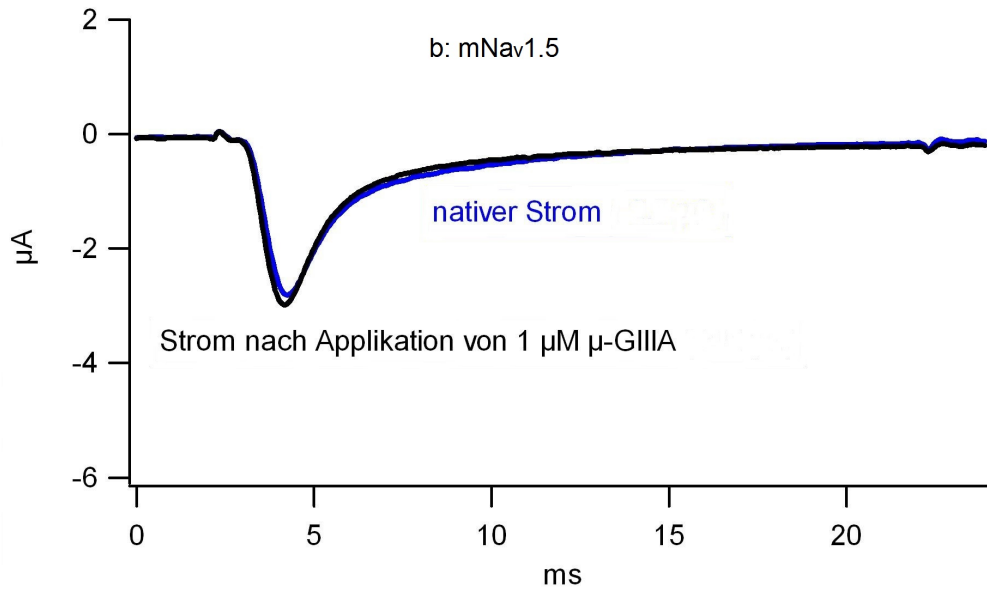


Abbildung 19.: Ausbleibende Blockade von $mNa_v1.5$ durch μ -GIIIA

Der murine Natriumkanal $mNa_v1.5$ wird durch $1 \mu M$ μ -GIIIA nicht blockiert. Der native Strom (blau) beträgt vor Applikation des Toxins $-2.9 \mu A$. Nach Toxingabe ist weiterhin ein Stromfluss von $-2.9 \mu A$ messbar (schwarz).

Die herzmuskelspezifischen Natriumkanäle $mNa_v1.5$ und $hNa_v1.5$ lassen sich hingegen auch durch hohe Toxinkonzentrationen von $1-2 \mu M$ μ -GIIIA nicht blockieren (vgl. Abb. 19 - 22).

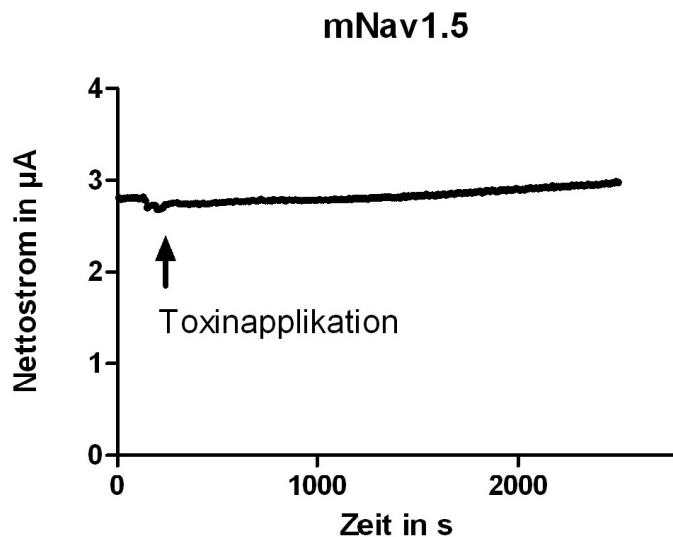


Abbildung 20.: Nettostrom von $mNa_v1.5$ während der Toxinapplikation

Der Nettostrom als Mittelwert aus vier experimentell ermittelten Stromflusscharakteristika bei Applikation von $1 \mu M$ μ -GIIIA vermittelt die ausbleibende Blockade von $mNa_v1.5$ -Kanälen durch das Conotoxin.

Zur Untersuchung der pharmakologischen Wirkung von μ -GIIIA auf herzmuskelspezifisch lokalisierte murine Natriumkanal-Isoformen wurden insgesamt zehn Experimente an vier verschiedenen Oozyten durchgeführt. Die Applikation von bis zu $3 \mu\text{M}$ μ -GIIIA bewirkt bei der kardialen Natriumkanal-Isoform $\text{mNa}_v1.5$ keine Kanalblockade; es konnte ganz im Gegenteil sogar eine marginale Zunahme des Natriumeinstroms in die Zelle festgestellt werden (Mittelwert $1.3 \pm 0.5 \%$).

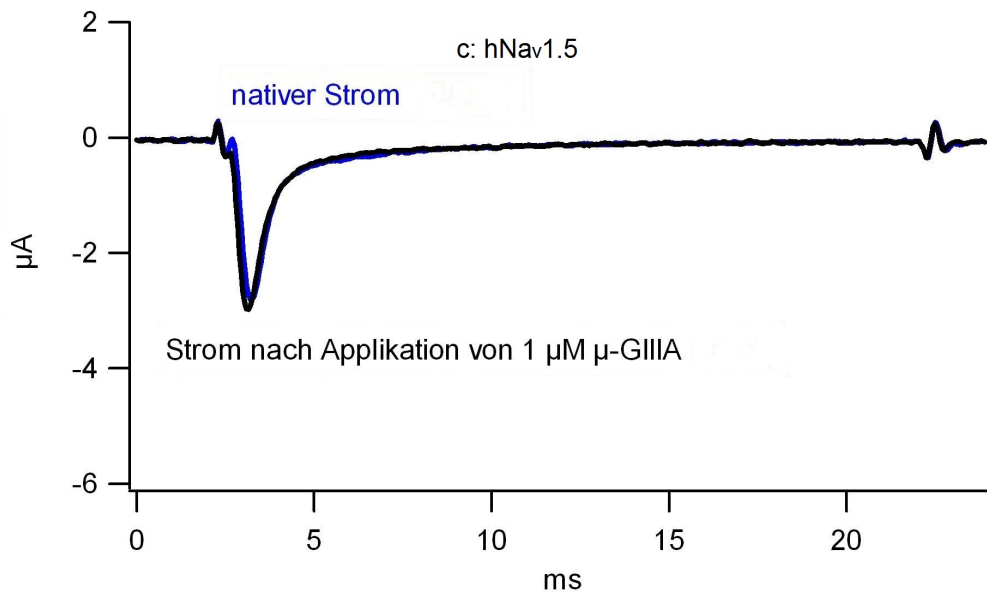


Abbildung 21.: Ausbleibende Blockade von $\text{hNa}_v1.5$ durch μ -GIIIA

Der humane Natriumkanal $\text{hNa}_v1.5$ wird durch $1 \mu\text{M}$ μ -GIIIA nicht blockiert. Der native Strom (blau) beträgt vor Applikation des Toxins $-2.9 \mu\text{A}$. Nach Toxingabe ist weiterhin ein Stromfluss von $-3 \mu\text{A}$ messbar (schwarz).

Zur Untersuchung der pharmakologischen Wirkung von μ -GIIIA auf herzmuskelspezifisch lokalisierte humane Natriumkanal-Isoformen wurden insgesamt vier Experimente an drei verschiedenen Oozyten durchgeführt. Die Applikation von bis zu $2 \mu\text{M}$ μ -GIIIA bewirkt bei der kardialen Natriumkanal-Isoform $\text{hNa}_v1.5$ ebenfalls keine Kanalblockade, sondern es konnte auch bei dieser Natriumkanal-Isoform eher eine geringfügige Zunahme des Natriumeinstroms in die Zelle festgestellt werden (Mittelwert $1.7 \pm 4.0 \%$).

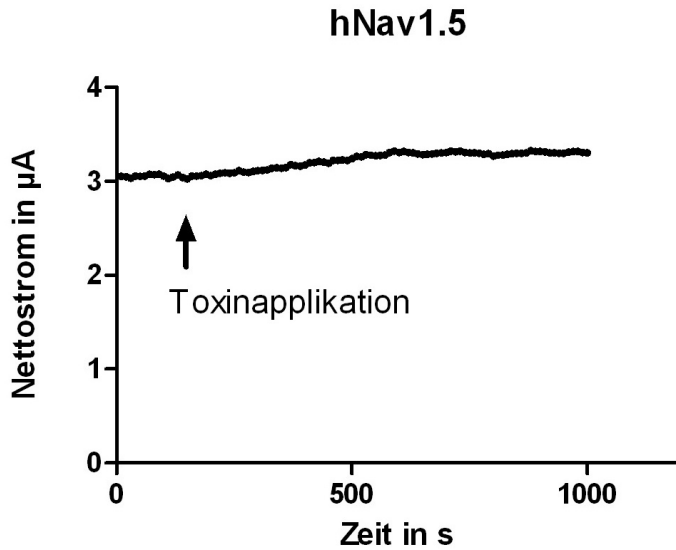


Abbildung 22.: Nettostrom von $hNa_v1.5$ während der Toxinapplikation

Der auf der Y-Achse abgebildete Nettostrom ist der Mittelwert mehrerer experimentell ermittelter Natriumkanalströme in die Zelle in Abhängigkeit der Zeit nach Applikation des Conotoxins μ -GIIIA. Es wird ersichtlich, dass der $hNa_v1.5$ -Kanal durch $1 \mu\text{M}$ μ -GIIIA nicht blockiert wird.

3.2.4. Dosis-Wirkungskurve und Bestimmung der IC_{50}

Um für die Blockade von $mNa_v1.4$ durch das Toxin μ -GIIIA Dosis-Wirkungskurven erstellen zu können, wurde eine Messung evozierter Natriumströme bei steigenden Konzentrationen des eingesetzten Toxins durchgeführt. Insgesamt wurden 29 Messungen an acht verschiedenen Oozyten durchgeführt. Aus den gewonnenen Daten wurden mit Hilfe der Statistiksoftware GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc.) Dosis-Wirkungskurven erstellt, welche die Berechnung einer mittleren inhibitorischen Toxinkonzentration IC_{50} ermöglichen sollen.

Die Standard-Hill-Kurve ($\log(\text{inhibitor})$ vs. response , Abb. 23A) bildet aus den logarithmisch angeordneten Daten unter Annahme eines definierten Hill-Koeffizienten von -1.0 einen symmetrisch sigmoidalen Kurvenverlauf.

Die zu Grunde liegende Formel bei der Berechnung der Kurvenform lautet hier:

$$Y = \frac{\text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom})}{(1 + 10^{((X - \text{Log}IC_{50}))})}$$

Als Bottom bzw. Top werden die Ordinaten des unteren ("Bottom") bzw. des oberen ("Top") Plateaus der Kurve bezeichnet. Weil die Kurve einerseits die Obergrenze von 100% etwas überschreitet und andererseits die Untergrenze von 0% nicht erreicht, kann die IC_{50} mittels der Standard-Hill-Kurve nur sehr ungenau bestimmt werden.

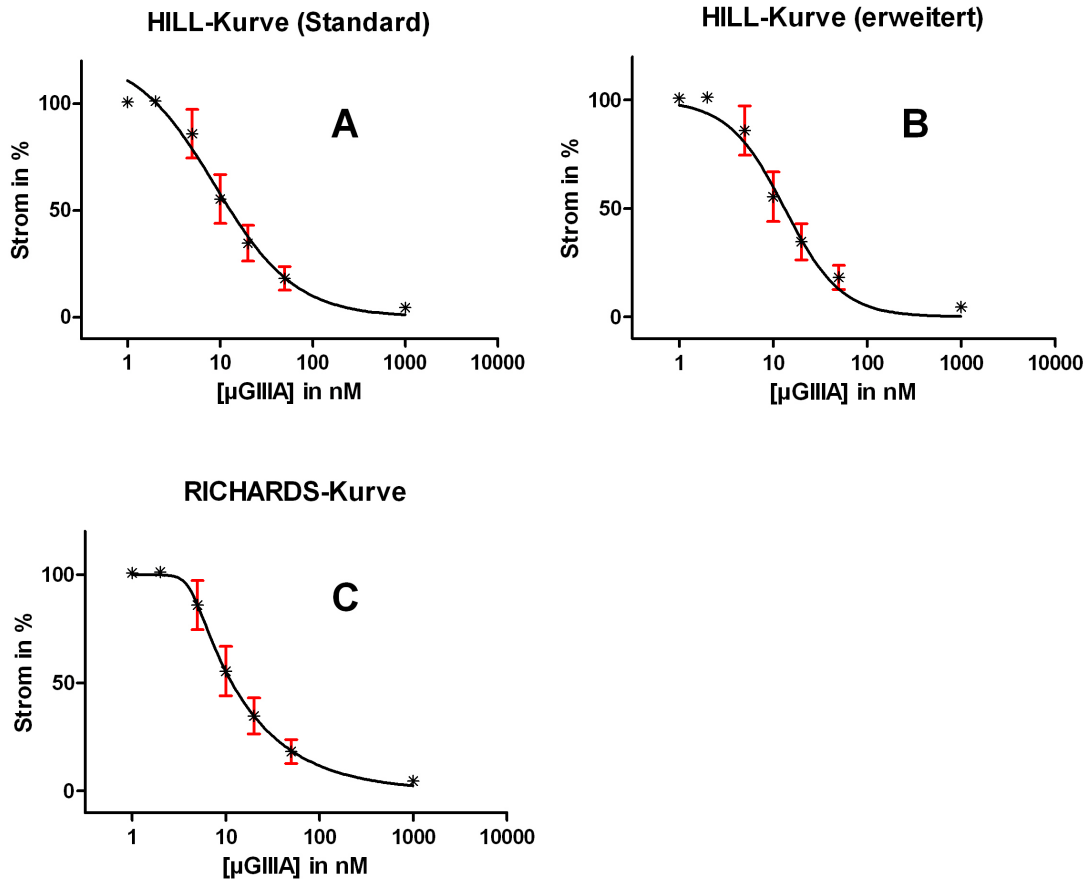


Abbildung 23.: Dosis-Wirkungskurven für die Natriumstromblockade durch μ -GIIIA
 Um eine mittlere inhibitorische Konzentration berechnen zu können, existieren verschiedene Formeln, anhand derer sich die ermittelten Daten in einer Dosis-Wirkungskurve abbilden lassen und welche die (näherungsweise) Errechnung der IC_{50} gestatten. A: Hill-Kurve, $c = -1.0$. B: Hill-Kurve, $c = -1.44$. C: Richards-Kurve

Die erweiterte Hill-Kurve (*log(inhibitor) vs. normalized response - variable slope*, Abb. 23B) hingegen siedelt die Dosis-Wirkungskurve zwischen 0 und 100% auf der Y-Achse an. Der Hill-Koeffizient wird hier aus dem Kurvenverlauf berechnet und beträgt für den vorliegenden Datensatz -1.44. Die IC_{50} wird mit 13.27 nM angegeben (95%-Konfidenzintervall: 11.2-15.7 nM).

Die zu Grunde liegende Formel bei der Berechnung der Kurvenform lautet hier:

$$Y = \frac{100}{(1 + 10^{((\text{Log}IC_{50} - X) \times \text{Hill-Koeffizient}))}}$$

Die Richards-Kurve (*asymmetric - five parameter*, Abb. 23C) führt zusätzlich zu den bereits genannten Größen (Hill-Koeffizient, IC_{50} , oberes und unteres Kurvenplateau) als weiteren Parameter die Variable S ein, welche eine mögliche Asymmetrie der Kurven-

form berücksichtigt. Sie bietet im Vergleich zu den Hill-Kurven eine bessere Anpassung an die experimentell ermittelten Daten und eine geringere Standardabweichung der Residuen (Bestimmtheitsmaß) $Sy.x$. Als $Sy.x$ wird die Standardabweichung der Y-Werte (Stromfluss in %) für ein gegebenes X (Toxin-Konzentration) bezeichnet. $Sy.x$ beträgt für die drei gezeigten Dosis-Wirkungskurven 23A: 9.474%, 23B: 9.370% und 23C: 8.256%. Damit ist die Richards-Kurve den Hill-Kurven unter Berücksichtigung statistischer Validitätsparameter überlegen, und die daraus abgeleitete mittlere inhibitorische Toxin-konzentration IC_{50} von 11.62 nM kann als das genaueste Ergebnis betrachtet werden. Die zu Grunde liegende Formel bei der Berechnung der Kurvenform lautet hier:

$$Y = Bottom + \frac{(Top - Bottom)}{(1 + 10^{((LogXb - X) \times Hill - Koeffizient)})^S}$$

$$LogXb = LogIC_{50} + \frac{1}{Hill - Koeffizient} \times Log((2^{(1/S)}) - 1)$$

Die Variable S beträgt für den vorliegenden Datensatz 0.1026, die IC_{50} wird auf 11.62 nM (95%-Konfidenzintervall: 9.7-13.9 nM) beziffert.

Eine alternative - aber ungenauere - Methode zur Bestimmung der IC_{50} eines Toxins lässt sich laut Ferber et al. (2003) anhand einer einzigen Dosis-Wirkungsbeziehung mit Hilfe der folgenden Formel errechnen [47]:

$$IC_{50} = \left(\frac{Reststrom}{(Ausgangsstrom - Reststrom)} \right) \times Toxinkonzentration$$

Mittels dieser Formel kann nach Einbeziehung der Messergebnisse von Experimenten mit 10 nM, 20 nM und 50 nM μ -GIIIA (n = 13) eine mittlere IC_{50} von 12.1 nM (95%-Konfidenzintervall: 9.3-14.8 nM) ermittelt werden.

3.3. Patch-Clamp-Experimente

Um die im Oozyten-Expressionssystem erhaltenen Ergebnisse in einem anderen Expressionssystem zu validieren, sollten ähnliche Experimente an transfizierten HEK-293-Zellen durchgeführt werden.

3.3.1. Transfektionsergebnisse

Die Transfektion der HEK-293-Zellen mit Natriumkanal-kodierender DNA verlief erfolgreich. Die von Schmidt und Al-Hasani berichtete durchschnittliche Effektivität der Transfektion von ca. 80% gelang jedoch nicht [123]. Lediglich etwa die Hälfte der transfizierten Zellen fluoreszierte unter dem Mikroskop als Zeichen einer erfolgreichen Integration plasmidischer DNA in das Genom der Zellen.

3.3.2. Registrierung der Originalstromkurve von $mNa_v1.5$ mittels Patch-Clamp-Messungen

Mit Hilfe des Patch-Clamp-Verfahrens konnten nach Applikation eines depolarisierenden Reizes in der „whole-cell-Konfiguration“ Natriumströme über den Membranabschnitt aufgezeichnet werden (vgl. Abb. 24 und 25).

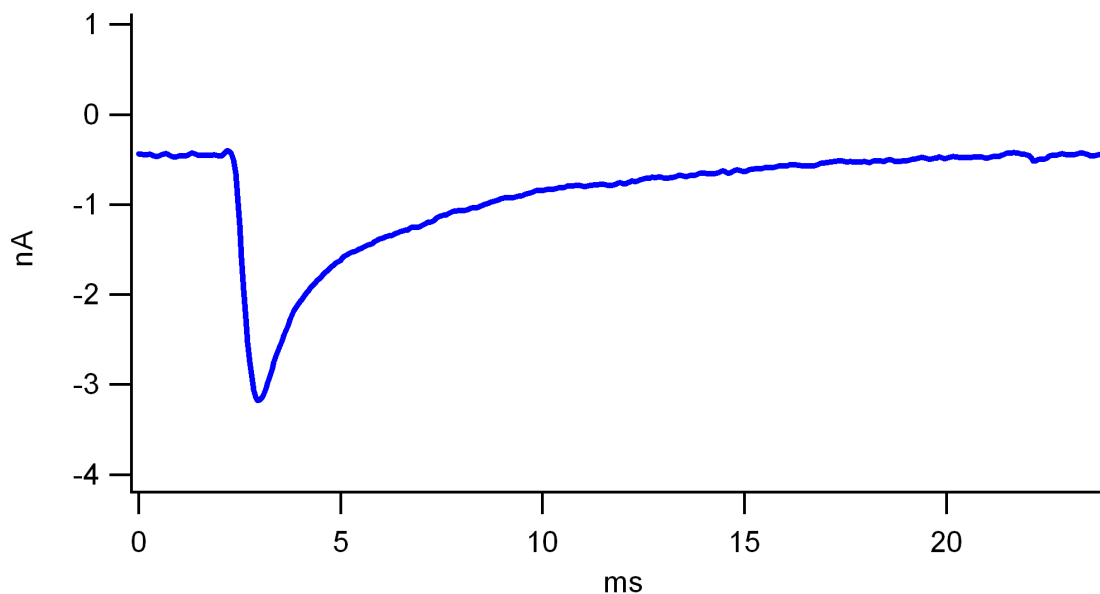


Abbildung 24.: Originalstromkurve des murinen Ionenkanals $mNa_v1.5$ bei Depolarisation der Zellmembran

Bei Depolarisation der Zellmembran auf ein Testpotenzial von -10 mV findet infolge einer spannungsabhängigen Aktivierung der in die Membran integrierten Natriumkanäle ein messbarer Natriumstrom über den beobachteten Membranabschnitt statt.

Bereits bei der wiederholten Depolarisation der Zellmembran zur Erstellung spannungsabhängiger Originalstromkurven wurde allerdings ersichtlich, dass die transfizierten Zellen deutlich instabiler waren als die Zellen aus dem Oozyten-Expressionssystem. Hinzu kommt, dass aufgrund der wesentlich geringeren Oberfläche der HEK-Zellen im Vergleich zur Oozyte und aufgrund der unterschiedlichen Messverfahren eine deutlich

geringere Anzahl von Natriumkanälen in den beobachtbaren Zellmembranabschnitt integriert ist und somit in diesem Expressionssystem lediglich ein Bruchteil des im Xenopus-Expressionssystem gemessenen Natriumeinstroms registriert werden kann: Während sich der Natriumeinstrom in die Xenopus-Oozyten im Bereich mehrerer μA bewegt, werden bei den HEK-Zellen lediglich Natriumströme im Bereich weniger nA gemessen.

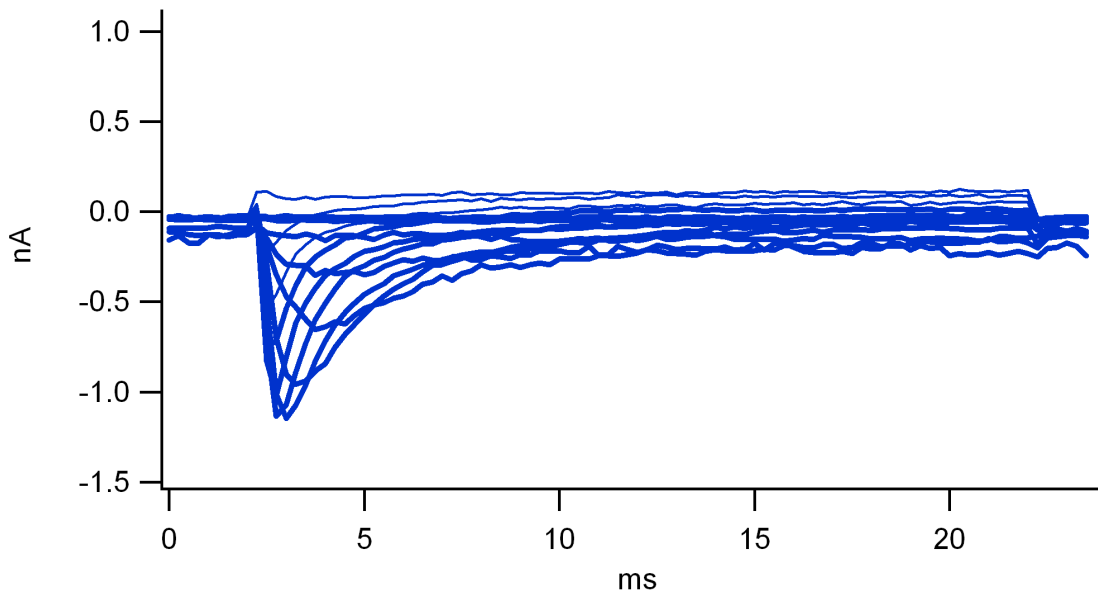


Abbildung 25.: Originalstromkurven des murinen Ionenkanals $mNa_v1.5$ bei Depolarisation der Zellmembran

Die gegenüber dem Oozyten-Expressionssystem geringere Stromdichte der transfizierten Zelle wird bereits auf den ersten Blick an den deutlich geringeren Strömen ersichtlich.

Eine Untersuchung der Wirkweise von μ -GIIIA an den exprimierten Natriumkanälen war bei den durchgeführten Experimenten nicht erfolgreich. Die Applikation des Toxins führte bei allen untersuchten Zellmembranabschnitten zur Ablösung des Gigaseals, was die Bestimmung eines potentiellen Effektes dieses Peptides auf $mNa_v1.5$ -Kanäle bei HEK-293-Zellen unmöglich machte.

4. Diskussion

Umfangreiche Forschungsarbeiten der vergangenen Jahrzehnte zu den Eigenschaften spannungsabhängiger Natriumkanäle haben ein fundiertes Verständnis der Elektrophysiologie und Pharmakologie bestimmter Kanal-Isoformen entstehen lassen. Da spannungsabhängige Natriumkanäle eine wichtige Rolle in elektrisch erregbaren Zellverbänden wie Herzmuskelzellen, Zellen des zentralen Nervensystems oder der Skelettmuskulatur spielen, ist ihre (Fehl-)Funktion und deren Beeinflussbarkeit durch pharmakologisch aktive Substanzen von großem Interesse.

Insbesondere der Umstand, dass einige Toxine eine äußerst selektive Wirkung an ausgesuchten Ionenkanal-Isoformen entfalten, die Funktion strukturell sehr ähnlicher Kanäle jedoch unbeeinträchtigt lassen, fasziniert Wissenschaftler auf der ganzen Welt. Das Interesse an hochpotenten, selektiv wirkenden Substanzen ist groß, da ein sehr selektives Pharmakon in der Regel eine geringe Rate unerwünschter Nebenwirkungen aufweist. Darüber hinaus erlauben diese Toxine einen Einblick in die molekularen Strukturen unterschiedlicher Kanal-Isoformen und die Konformation der Kanäle.

Ziel dieser Arbeit war es, an heterolog exprimierten Natriumkanal-Isoformen murinen und humanen Ursprungs ($mNa_v1.4$, $mNa_v1.5$, $hNa_v1.5$) mittels elektrophysiologischer Messungen die Beeinflussbarkeit des Natriumeinstroms durch μ -Conotoxine vergleichend zu untersuchen. Besonderes Interesse galt der Frage, ob zwischen humanen und murinen kardialen Natriumkanälen ($Na_v1.5$) ein Unterschied in der Stromblockade durch das Conotoxin μ -GIIIA festzustellen sei. Hintergrund dieser These sind Abweichungen der Aminosäuresequenz in der Nähe der vermuteten Bindungsstelle von μ -GIIIA.

In den durchgeführten Experimenten wurde kein Spezies-bedingter Unterschied in Bezug auf die Conotoxin-Sensitivität kardialer Natriumkanäle durch μ -GIIIA festgestellt: Weder murine noch humane Natriumkanal-Isoformen des Herzmuskels ließen sich durch das Conotoxin μ -GIIIA blockieren. Somit besteht trotz der Aminosäure-Sequenzunterschiede kein Unterschied in den pharmakologischen Eigenschaften in Bezug auf die Bindung von μ -GIIIA zwischen murinen und humanen kardialen Natriumkanal-Isoformen.

Das folgende Kapitel ist in zwei Abschnitte gegliedert: Der erste Teil behandelt die Resistenz kardialer Natriumkanal-Isoformen gegenüber dem Conotoxin μ -GIIIA. Dazu wird die Rolle und die Lokalisation des sogenannten Conotoxin-Rezeptors herangezogen, um den Hintergrund der Annahme unterschiedlicher Conotoxin-Sensitivitäten zwischen murinen und humanen Natriumkanal-Isoformen zu erläutern. Im zweiten Teil dieses

Kapitels werden die Blockade skelettmuskulärer Natriumkanäle durch das Conotoxin μ -GIIIA thematisiert und verschiedene Methoden zur Berechnung der mittleren inhibitorischen Toxinkonzentration von μ -GIIIA erläutert. Der Vergleich zwischen μ -GIIIA und den strukturell ähnlichen Conotoxinen μ -GIIIB und μ -PIIIA soll Hinweise auf die exakte Position des gebundenen Toxins in der Natriumkanalpore geben. Eine kurze Übersicht über aktuelle Methoden zur Bestimmung der dreidimensionalen Struktur eines Toxin-Kanal-Komplexes beschließt das Kapitel.

4.1. Resistenz kardialer Natriumkanal-Isoformen gegenüber μ -GIIIA

Im Gegensatz zu den spannungsabhängigen Natriumkanälen der Skelettmuskulatur lassen sich kardiale Natriumkanal-Isoformen durch das Conotoxin μ -GIIIA nicht blockieren. Die hohe Selektivität des Toxins gegenüber bestimmten Natriumkanal-Isoformen ist in der Aminosäuresequenz der Zielstruktur der Conotoxine, dem sogenannten Conotoxin-Rezeptor, begründet. Abweichungen dieser Aminosäuresequenz können die Bindungsbereitschaft des Toxins an einen Natriumkanal beeinflussen.

4.1.1. Der Conotoxin-Rezeptor

Die Suche nach der Zielstruktur von μ -GIIIA am Natriumkanal, dem sogenannten Conotoxin-Rezeptor, ist eines der zentralen Themen dieser Arbeit.

In den vergangenen Jahren wurde diese Frage bereits intensiv untersucht. Ein Konsens besteht dahingehend, dass der Bindung von Conotoxinen an Natriumkanäle ein komplexerer Mechanismus zu Grunde liegt als der Bindung von Tetrodotoxin oder Saxitoxin. Mit einem relativen Molekulargewicht von ca. 2600 beträgt die molekulare Masse von μ -GIIIA etwa das Zehnfache der molekularen Masse von Tetrodotoxin und Saxitoxin [86]. Analog zu diesem entscheidenden Massenunterschied muss die Bindungsstelle der Conotoxine an der Natriumkanalpore deutlich größer und komplexer gestaltet sein als die Bindungsstelle von vergleichsweise kleineren Molekülen wie Tetrodotoxin und Saxitoxin.

Die vergleichende Betrachtung der Aminosäuresequenzen Conotoxin-sensitiver und -insensitiver Natriumkanal-Isoformen soll bei der Suche nach dem Conotoxin-Rezeptor helfen, weil eine Abweichung in der Aminosäuresequenz die Voraussetzung für unterschiedliche Empfindlichkeiten der Natriumkanal-Isoformen gegenüber dem Toxin

μ -GIIIA ist. Die Abbildungen 26 und 27 zeigen auszugsweise zwei entscheidend an der Toxinbindung beteiligte Sequenzabschnitte verschiedener Natriumkanal-Isoformen.

Ein grundsätzliches Problem bei dem Vergleich von Aminosäuresequenzen verschiedener Natriumkanal-Isoformen sei jedoch gleich vorangestellt: Da verschiedene Natriumkanal-Isoformen durch unterschiedlich lange Aminosäuresequenzen kodiert werden, können homologe Positionen eine andere Nummerierung aufweisen. Eine anschauliche Darstellung dieses Problems wurde 2003 von Ronald A. Li und Mitarbeitern anhand der Natriumkanal-Isoformen hH1 (syn.: hNa_v1.5) und μ 1 (syn.: rNa_v1.4) veröffentlicht [85].

EEDD-Motiv (äußerer Carboxylatring)

	402	403	404	757	758	759	1241	1242	1243	1532	1533	1534
mNa _v 1.4	W	E	N	I	E	T	M	D	I	W	D	G
	402	403	404	757	758	759	1240	1241	1242	1531	1532	1533
rNa _v 1.4	W	E	N	I	E	T	M	D	I	W	D	G
	374	375	376	900	901	902	1422	1423	1424	1713	1714	1715
hNa _v 1.5	W	E	R	I	E	T	M	D	I	W	D	G
	374	375	376	902	903	904	1424	1425	1426	1715	1716	1717
mNa _v 1.5	W	E	R	I	E	T	M	D	I	W	D	G

Abbildung 26.: Das EEDD-Motiv: Aminosäuresequenzabschnitte verschiedener muriner und humaner Natriumkanal-Isoformen im Bereich des porenbildenden äußeren Carboxylattrings

Die EEDD-Motive unterschiedlicher Natriumkanal-Isoformen (fett hervorgehoben) stellen stark konservierte Aminosäuresequenzen dar. Bemerkenswert ist allerdings der Umstand, dass die Position des Motivs zwischen skelettmuskulären und kardialen Isoformen variiert. Erstellt und modifiziert anhand von [61, 151, 143].

Es kristallisierten sich zwei wesentliche Elemente des Conotoxin-Rezeptors bei spannungsabhängigen Natriumkanälen heraus: Zum einen bildet - ähnlich wie bei TTX und STX - die unmittelbare Umgebung der Kanalpore eine wichtige Zielstruktur für die μ -Conotoxine. Aufgrund der hohen Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen im Bereich des äußeren Carboxylattrings, welcher ein hoch konserviertes Motiv zwischen den Natriumkanal-Isoformen darstellt (vgl. Abb. 26), muss es jedoch noch eine zweite Bindungsstelle für Conotoxine geben, deren Aminosäuresequenz zwischen den verschiedenen Natriumkanal-Isoformen stärker variiert als das EEDD-Motiv des äußeren Carboxylattrings. Als Resultat umfangreicher Experimente rückte nun ein anderer Abschnitt der Aminosäuresequenz in den Fokus des Interesses: die DII S5-P-Linkerregion.

Domäne II, S5-P-Linkerregion

	723	724	725	726	727	728	729	730	731	732	733
hNa _v 1.5	L	R	D			S	D	S	G	L	L
mNa _v 1.5	L	R	H	R	I	S	D	S	G	L	L
mNa _v 1.4	C	V	C	K	I	A	S	D	C	S	L
rNa _v 1.4	C	V	C	K	I	A	S	D	C	N	L

Abbildung 27.: Aminosäuresequenzabschnitte der entscheidend an der Toxinbindung beteiligten S5-P-Linkerregion der Domäne II

Das für die Fragestellung dieser Arbeit entscheidende Arginin-Isoleucin-Pärchen der murinen kardialen Natriumkanal-Isoform an Position 726 und 727 ist blau hervorgehoben. Rot markiert sind die entsprechenden Aminosäuren der skelettmuskulären Kanalisformen. Auffällig ist die große Übereinstimmung der Aminosäuresequenz zwischen dem Skelettmuskelkanaltyp der Ratte und dem der Maus. Erstellt und modifiziert anhand von [85].

Punktmutationen der murinen skelettmuskulären Natriumkanal-Isoform an Position 724 (Valin), 725 (Cystein), 728 (Alanin), 730 (Aspartat) und 731 (Cystein) [85] und an Position 729 (Serin) und 732 (Asparagin) [86] verringern die Sensitivität der Natriumkanäle gegenüber μ -Conotoxinen; ein Umstand, der als Beweis für die Beteiligung dieser Aminosäuren an der Bindung von μ -Conotoxinen gewertet wird. Der Schritt von der Identifizierung verschiedener an der Toxinbindung beteiligter Aminosäuren zur Entschlüsselung von Aufbau und Lokalisation des Conotoxin-Rezeptors ist jedoch groß. Diese Arbeit konzentrierte sich auf die Identifizierung weiterer an der Toxinbindung beteiligter Aminosäuren im Bereich der DII S5-P-Linkerregion. Insbesondere die Position 726 könnte aufgrund der Abweichung der Aminosäuresequenz zwischen kardialen (nicht-sensitiven) und skelettmuskulären (sensitiven) Natriumkanälen für die pharmakologischen Eigenschaften der Kanäle potentiell von Bedeutung sein. Bei einem genauen Vergleich der Aminosäuresequenz der murinen kardialen Natriumkanal-Isoform (mNa_v1.5) mit der humanen Isoform (hNa_v1.5) fällt überdies auf, dass das Arginin-Isoleucin-Paar an Position 726 und 727 bei der humanen Isoform vollständig fehlt. Da in der Literatur lediglich Daten zu der Sensitivität der humanen Natriumkanal-Isoform hNa_v1.5 gegenüber μ -GIIIA veröffentlicht sind, musste die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass die murine Natriumkanal-Isoform mNa_v1.5 - möglicherweise infolge dieser Abweichung in der Aminosäuresequenz - eine höhere Sensitivität gegenüber μ -GIIIA aufweisen könnte. Ein Indiz für diese These ist die bei physiologischem pH-Wert positive Ladung der basischen Aminosäuren Arginin (R) und Lysin (K), sodass es sich bei der Abweichung der Aminosäuresequenz zwischen mNa_v1.4 und mNa_v1.5 um eine ladungserhaltende Abweichung an Position 726 handelt.

Neben einer Ermittlung der mittleren inhibitorischen Toxinkonzentration IC₅₀ von

μ -GIIIA gegenüber der bekanntermaßen sensitiven Natriumkanal-Isoform $mNa_v1.4$ war daher die Frage von besonderem Interesse, ob sich ein Unterschied zwischen der humanen und der murinen Isoform kardialer Natriumkanäle in Bezug auf das Blockadeverhalten durch μ -GIIIA feststellen lässt. Bei einer Bestätigung der Annahme, dass der murine kardiale Natriumkanal $mNa_v1.5$ im Gegensatz zu der humanen Kanalisiform durch nanomolare Konzentrationen von μ -GIIIA blockiert wird, sollten zielgerichtete Mutationen im Bereich der DII S5-P-Linkerregion Klarheit bezüglich der Rolle des Arginin-Isoleucin-Paares in Bezug auf die Toxin-Sensitivität der Natriumkanäle schaffen.

Geplant waren unter anderem

1. die Deletion des Arginin-Isoleucin-Paares in der DII S5-P-Linkerregion des murinen $Na_v1.5$ Kanals (Position 726 und 727),
2. die Insertion von Arginin und Isoleucin in der DII S5-P-Linkerregion des humanen $Na_v1.5$ Kanals (Position 726 und 727)

und die anschließende Untersuchung der Sensitivität der mutierten Natriumkanal-Isoformen gegenüber dem Conotoxin μ -GIIIA.

Nachdem der Nachweis einer Sensitivität muriner $Na_v1.5$ -Kanäle im Oozyten-Expressionssystem nicht gelang, wurde der Versuch unternommen, die Natriumkanal-Isoformen in einem anderen Expressionssystem, nämlich in HEK-293-Zellen zu exprimieren. Die dahinterstehende Überlegung besagte, dass möglicherweise das Expressionssystem Einfluss auf die pharmakologischen Eigenschaften der zu untersuchenden Natriumkanäle haben könnte. Die Untersuchung spannungsabhängiger Natriumkanäle in HEK-293-Zellen erwies sich jedoch als schwierig, da die transfizierten Zellen sehr instabil waren und die Toxinapplikation unweigerlich zur Ablösung des Membranareals unter der Pipettenspitze führte.

Obwohl die durchgeführten Versuche keinen Hinweis auf eine unterschiedliche Sensitivität muriner vs. humaner $Na_v1.5$ -Kanälen gegenüber dem Conotoxin μ -GIIIA lieferten, ist die Relevanz dieses Sequenzabschnittes und insbesondere der Position 726 für die Bindung von μ -Conotoxinen damit nicht widerlegt. Möglicherweise ist trotz des Ladungserhalts an Position 726 die Sequenzabweichung zwischen kardialen und skelettmuskulären Isoformen so gravierend, dass eine Toxinbindung nicht zustande kommt. Die nunmehr vorliegenden Ergebnisse schließen eine Beteiligung von Lysin an Position 726 an der spezifischen Toxinbindung durch μ -GIIIA an murinen skelettmuskulären Natriumkanälen keineswegs aus.

4.2. Blockade skelettmuskulärer Natriumkanäle durch μ -GIIIA

μ -Conotoxine blockieren Natriumkanäle des Skelettmuskels ($\text{Na}_v1.4$) selektiv und reversibel. Dieser Grundsatz gilt jedoch nicht für alle im Skelettmuskel lokalisierten Natriumkanal-Isoformen gleichermaßen: Ebenso wie bei den kardialen Natriumkanälen variiert die exakte Aminosäuresequenz von Natriumkanälen des Skelettmuskels zwischen verschiedenen Spezies. Solche Sequenzunterschiede können, sofern sie die an der Toxinbindung beteiligten Abschnitte einer Natriumkanal-Isoform betreffen, zu erheblichen Unterschieden in den pharmakologischen Eigenschaften dieser Kanäle führen. Tatsächlich bestätigen Untersuchungen wie jene von Cummins et al. aus dem Jahr 2002 die fehlende Sensitivität humaner skelettmuskulärer Natriumkanäle ($\text{hNa}_v1.4$) gegenüber den Conotoxinen μ -GIIIA und μ -GIIIB, welche auf Sequenzunterschiede im Bereich der DII S5-P-Linkerregion zurückgeführt wird [38] - eine Erkenntnis, welche die Frage nach der Übertragbarkeit tierexperimentell ermittelter Wirksamkeiten und IC_{50} -Werte eines von den μ -Conotoxinen abgeleiteten Pharmakons auf den Menschen aufwirft.

4.2.1. Die mittlere inhibitorische Toxinkonzentration IC_{50}

Wie erwartet, konnte in den durchgeführten Versuchen die murine skelettmuskuläre Natriumkanal-Isoform $\text{mNa}_v1.4$ durch das Conotoxin μ -GIIIA vollständig und reversibel blockiert werden. Die rechnerisch ermittelte IC_{50} von 11.6 nM bzw. 12.1 nM stimmt im Wesentlichen mit der in der Literatur beschriebenen mittleren inhibitorischen Konzentration von μ -GIIIA gegenüber spannungsabhängigen skelettmuskulären Natriumkanälen überein. Es existieren unterschiedliche Methoden zur Berechnung der IC_{50} . In Kapitel 3.2.4 sind verschiedene Formeln zur näherungsweise Berechnung der mittleren inhibitorischen Toxinkonzentration aufgeführt. Es ist wahrscheinlich, dass die Richards-Formel die genaueste der genannten Methoden darstellt, da die statistischen Validitätsparameter für diese Formel am günstigsten ausfallen, so dass diese Formel auch in der vorliegenden Untersuchung zur Berechnung der experimentell ermittelten mittleren inhibitorischen Toxinkonzentration zugrunde gelegt wurde. Eine einfache Alternative stellt eine von Michael Ferber vorgestellte Formel dar, welche die Berechnung einer mittleren inhibitorischen Toxinkonzentration anhand einer einzigen Messung erlaubt [47]. Je geringer allerdings die Anzahl der Experimente ist, desto stärker fallen hierbei Messungenauigkeiten ins Gewicht.

Die in der Literatur angegebene IC_{50} von μ -GIIIA variiert je nach Publikation zwischen 6.3 nM [126], 11.2 nM [34], 19 nM [118], 30 nM [83, 84], 51 nM [25] bis hin zu 54 nM

[31]. Ein möglicher Grund für diese Variationsbreite der IC_{50} -Werte kann die insgesamt äußerst geringe Toxinmenge sein, die zu einer halbmaximalen Blockierung des Stromes führt, welche das System sehr störanfällig macht. So ist zum Beispiel bei den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten bereits das Volumen der Badkammer nicht exakt definiert, und es wurde ein Lösungsaustausch vorgenommen. Ein quantitativer Austausch der die zu untersuchende Oozyte umgebenden Lösung durch eine exakt konzentrierte Toxinlösung ist in der Realität nur mittels hoher Volumina an zugegebener Lösung zu erzielen. Die Verwendung verschiedener Expressionssysteme hingegen scheidet als mögliche Ursache für die Unterschiede in der mittleren inhibitorischen Toxinkonzentration aus: Die oben genannten IC_{50} -Werte von μ -GIIIA wurden alle unter Verwendung des Oozyten-Expressionssystems ermittelt. In einer anderen Studie aus dem Jahr 2016 wird für μ -GIIIA eine IC_{50} von 69 nmol ermittelt - in diesem Fall wurden die Natriumkanäle in HEK293-Zellen exprimiert. In Anbetracht der Schwankungsbreite der IC_{50} innerhalb eines Expressionssystems (wie des Oozyten-Expressionssystems) scheint diese Abweichung nicht wesentlich zu sein [59].

Ein entscheidender Faktor ist schließlich die bei den verschiedenen Publikationen jeweils auffallend geringe Anzahl von Experimenten. Dieser Umstand ist dem großen zeitlichen und materiellen Aufwand der Methode, beginnend bei der Gewinnung der Oozyten und der Injektion von RNA über die Messung elektrischer transmembranärer Ströme und schließlich der experimentellen Applikation von Toxinlösungen unterschiedlicher Konzentrationen, geschuldet. In einer Publikation aus der Arbeitsgruppe von Ronald A. Li aus dem Jahr 2003 beispielsweise werden unter anderem die relative Unempfindlichkeit kardialer Natriumkanal-Isoformen gegenüber μ -Conotoxinen untersucht und für die skelettmuskuläre gegenüber der kardialen Isoform eine IC_{50} von 29.7 nM gegenüber 15.3 μ M ermittelt - anhand von insgesamt zehn Experimenten [85]. Entsprechend groß sind die Standardabweichungen.

Beachtenswert ist überdies der Umstand, dass es sich bei den in der Literatur genannten mittleren inhibitorischen Toxinkonzentrationen jeweils um Versuche mit einer Natriumkanal-Isoform aus dem Skelettmuskel der Ratte ($rNa_v1.4$) handelte und nicht - wie in den vorliegenden Versuchen - um die Natriumkanal-Isoform der Maus ($mNa_v1.4$). Da Spezies-abhängige Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber blockierenden Substanzen nicht unüblich sind, musste eine Abweichung der hier ermittelten IC_{50} -Werte gegenüber den bislang veröffentlichten Daten in Betracht gezogen werden. Die IC_{50} der Blockade von $mNa_v1.4$ -Kanälen durch μ -GIIIA liegt jedoch im unteren Bereich der in der Literatur angegebenen IC_{50} zur Blockade von $rNa_v1.4$ -Kanälen durch μ -GIIIA. Da sich die Aminosäuresequenzen der an der Toxinbindung beteiligten Porenregion zwischen $rNa_v1.4$ und $mNa_v1.4$ außerdem nicht wesentlich unterscheiden (vgl. Abb. 26 und 27), kann man von einer Vergleichbarkeit der mittleren inhibitorischen Toxinkonzentrationen ausgehen.

tration von μ -GIIIA gegenüber skelettmuskulären Natriumkanälen murinen Ursprungs ausgehen.

Somit ist festzuhalten, dass die in dieser Arbeit erhobenen Befunde keinen Hinweis auf unterschiedliche pharmakologische Eigenschaften zwischen den Natriumkanal-Isoformen der Maus (mNa_v1.4) und der Ratte (rNa_v1.4) in Bezug auf die Empfindlichkeit gegenüber dem Toxin μ -GIIIA liefern.

4.2.2. Lineare vs. kooperative Bindung

Die Bindung von pharmakologisch wirksamen Substanzen an ihr Rezeptormolekül erfolgt nicht immer anhand einer linearen Dosis-Wirkungsbeziehung. Manche Toxine beeinflussen durch die Bindung an einen Rezeptor dessen Affinität für das Toxin in einem positiven (Erhöhung der Bindungsbereitschaft) oder einem negativen Sinn. Dieses Phänomen wird als kooperative Bindung bezeichnet, und man unterscheidet positive und negative Kooperativität.

Der Hill-Koeffizient hilft dabei, diese Unterscheidung zu treffen. Beträgt der Hill-Koeffizient 1, besteht keine Kooperativität, d.h. die Bindung eines Toxinmoleküls beeinflusst die Affinität des Rezeptors für weitere Toxinmoleküle nicht. Ist der Hill-Koeffizient > 1 , steigt die Bindungsbereitschaft des Rezeptors durch die Toxinbindung; ist der Hill-Koeffizient < 1 , sinkt die Bindungsbereitschaft des Rezeptors. Der experimentell ermittelte Hill-Koeffizient von -1.44 (das negative Vorzeichen kommt dadurch zustande, dass es sich hier um eine Abnahme des Natriumstroms handelt) entsprach annähernd der allgemein gültigen Annahme einer nicht-kooperativen Bindung (vgl. Abb. 23B), sodass von der für alle Guanidinium-Toxine proklamierten linearen Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen μ -GIIIA und den verwendeten spannungsabhängigen Natriumkanälen ausgegangen werden kann [64, 86].

4.2.3. Morphologische und funktionelle Unterschiede zwischen μ -GIIIA und μ -GIIIB

Zwischen den eng verwandten μ -Conotoxinen GIIIA und GIIIB gibt es nur vier Sequenzunterschiede; und falls einer dieser Aminosäuresequenzunterschiede zwischen den Toxinen einen der positiv geladenen Toxinreste betrifft (z.B. K/R an Position 8 oder R/K an Position 19), so handelt es sich meist um eine ladungserhaltende Veränderung (vgl. Abb. 10). Nach eingehenden Untersuchungen von Ronald A. Li und Mitarbeitern aus den Jahren 2001 - 2004 steht fest: Das Verhalten von μ -GIIIA und μ -GIIIB bezüglich der Blockierung von Wildtyp-mNa_v1.4-Kanälen ist identisch und die IC₅₀-Werte

sind vergleichbar. Allerdings existieren offenbar Unterschiede, was die Blockierung der Ströme mutierter Natriumkanäle betrifft [84, 86]. Insbesondere bedingt durch die nicht ladungsneutrale Sequenz-Abweichung an Position 14 (Q14 bei μ -GIIIA vs. R14 bei μ -GIIIB) scheint es demnach einen entscheidenden Unterschied bezüglich der Toxin-affinität für durch gezielte Mutagenese erzeugte Varianten der Natriumkanal-Domäne II zu geben. Bei dem Toxin μ -GIIIA konnte die Affinität des polaren, ungeladenen Glutaminrestes Q14 zu den ausgetauschten Aminosäureresten D762K und E765K nur unwesentlich verringert werden, während das Toxin μ -GIIIB mit der basischen Seitenkette des Arginins an Position 14 eine deutlich niedrigere Affinität zu den mutierten Natriumkanal-Isoformen aufwies [86].

Darüber hinaus herrscht keine vollständige Einigkeit über die exakte Aminosäuresequenz der Conotoxine zwischen den einzelnen Forschergruppen: In einer Publikation von Li und Tomaselli aus dem Jahr 2004 werden Aminosäuresequenzen von μ -GIIIA und μ -GIIIB abgebildet, die sich in einigen Punkten von den Aminosäuresequenzen unterscheiden, welche in Arbeiten anderer Forschungsgruppen, beispielsweise 1998 von Shon und Mitarbeitern, 2003 von Terlau und Olivera bzw. 2004 von French und Terlau, veröffentlicht wurden. Bei dem Toxin μ -GIIIA herrscht Uneinigkeit über die Besetzung von Position 5 (Threonin vs. Tyrosin), bei dem Toxin μ -GIIIB handelt es sich gleich um die drei Positionen 5 (Threonin vs. Tyrosin), 8 (Arginin vs. Lysin) und 11 (Lysin vs. Arginin) [126, 130, 49, 86], vgl. Abb. 10.

Mittlerweile sind die Aminosäure-Sequenzen der genannten Conopeptide im Netz unter der Internet-Adresse www.conoserver.org frei zugänglich. Der ConoServer ist eine Datenbank, welche es sich seit dem Jahr 2007 zur Aufgabe gemacht hat, umfangreiche Informationen in Bezug auf Klassifikation, Aminosäuresequenzen, physikalische und pharmakologische Eigenschaften sowie weiterführende Literaturhinweise in Bezug auf nahezu alle bislang identifizierten Conotoxine bereitzustellen. Die Daten stammen aus verschiedenen englischsprachigen Datenbanken wie zum Beispiel UniProtKB/Swiss Prot, NCBI protein and nucleic acids databases, GenBank oder The World Wide Protein Data Bank und werden regelmäßig anhand aktueller Publikationen ergänzt und überarbeitet. Die Verwendung einer einheitlichen Nomenklatur und übereinstimmender Toxin-Aminosäuresequenzen ist eine entscheidende Voraussetzung für die vergleichende Betrachtung experimentell ermittelter Daten, da die geringste Abweichung innerhalb der Aminosäuresequenz eines Toxins oder seines Rezeptors Auswirkungen auf das Bindungsverhalten und die Toxinaffinität nach sich ziehen kann. Somit wären Forschungsergebnisse, welche auf Untersuchungen basieren, die mit Peptiden von abweichender Aminosäuresequenz durchgeführt wurden, für andere Forschungsgruppen nur eingeschränkt verwertbar.

4.2.4. Die Position von μ -GIIIA in der Natriumkanal-Pore

Lange Zeit war die exakte räumliche Position des gebundenen Conotoxins in der Natriumkanal-Pore unbekannt. Die Aminosäuresequenz allein verrät nur wenig über das dreidimensionale Erscheinungsbild eines Proteins. Vor etwa 25 Jahren konnte mit Hilfe der NMR-Spektroskopie erstmalig eine Tertiär-Struktur des μ -Conotoxins GIIIA vorgestellt werden [79, 140]. Das Aussehen der wesentlich größeren Natriumkanal-Pore hingegen blieb noch etwas länger im Unklaren. Einige Jahre diente ein Molekularmodell von Lipkind und Fozzard aus dem Jahr 2000, welches die Struktur der Natriumkanalpore aus der Röntgenkristall-Strukturanalyse eines Kaliumkanals ableitete, als Anhaltspunkt für das Aussehen der Natriumkanalpore. Da sich die Porenform dieses Natriumkanal-Modells an Daten orientierte, welche aus Experimenten mit gebundenen Guanidiniumtoxinen (TTX oder STX) an der Natriumkanalpore stammten, genügte es den Ansprüchen an Untersuchungen zur Bindungsorientierung eines größeren Toxinmoleküls wie μ -Conotoxin GIIIA jedoch nicht. Zu diesem Zweck wurde das Porenmodell 2007 von Gaurav Choudhary und seinen Kollegen überarbeitet, sodass Experimente zur Position von μ -GIIIA in der Natriumkanalpore möglich waren und Untersuchungen über entscheidend an der Toxinbindung beteiligte Toxin- und Kanalabschnitte durchgeführt werden konnten [34].

Näheren Aufschluss über die dreidimensionale Struktur einer Natriumkanal-Pore lieferte im Jahr 2011 eine Arbeit aus dem Labor William A. Catteralls, welche mittels Röntgenkristall-Strukturanalyse den aus dem Bakterium *Arcobacter butzleri* stammenden spannungsabhängigen Natriumkanal Na_vAb untersuchte [112]. In den folgenden Jahren wurde das Modell eines spannungsabhängigen Natriumkanals auf der Basis der Röntgenkristall-Strukturanalyse von Na_vAb und Na_vRh von verschiedenen Forscherteams zur Überprüfung experimentell ermittelter Daten zu Interaktionen zwischen μ -GIIIA und spannungsabhängigen Natriumkanälen genutzt [78, 89, 111]. Bei der Erstellung eines Modells eukaryotischer spannungsabhängiger Natriumkanäle auf der Basis der Röntgenkristall-Strukturanalyse eines prokaryotischen Natriumkanals bleibt jedoch unklar, inwieweit die Molekülstruktur eines Homotetramers (Na_vAb) Aufschluss über die Struktur eines heterotetrameren Moleküls wie dem eukaryotischen spannungsabhängigen Natriumkanal geben kann [69].

Eine weitere Annäherung an die Molekülstruktur spannungsabhängiger Natriumkanäle gelang 2015, als mittels Kryo-Elektronenmikroskopie die Struktur des $\text{Ca}_v1.1$ -Komplexes aus dem Skelettmuskel des Kaninchens erstmals graphisch dargestellt werden konnte [142].

Weiterhin existiert jedoch noch keine dreidimensionale Struktur eines von einem Säugetier stammenden Natriumkanals und es ist auch immer noch nicht genau bekannt, wie ein gebundenes Conotoxin in der Pore platziert ist. Aus der Kenntnis der exakten

Positionierung der μ -Conotoxine in der Natriumkanal-Pore versprechen sich Wissenschaftler weitere Aufschlüsse über die Form der Kanalpore und Rückschlüsse auf das Bindungs- und Blockadeverhalten von Toxinen gegenüber strukturell eng verwandten Kanal-Isoformen.

Ein weiterer Annäherungsversuch zur Lösung dieses Problems besteht in der vergleichenden Betrachtung der Natriumstromblockade durch das dem μ -GIIIA eng verwandte Conotoxin μ -PIIIA, ein weiteres Peptid aus der M-Superfamilie von *Conus purpurascens*. Die Bindung von μ -PIIIA an spannungsabhängigen Natriumkanälen ist in den vergangenen Jahren intensiv erforscht worden. In einer Untersuchung von McArthur et al. aus dem Jahr 2011 wird die Orientierung des gebundenen Toxins μ -PIIIA anhand der Änderung von Ladungsbewegungen innerhalb des transmembranären elektrischen Feldes, welche durch die Annäherung bestimmter, oberflächlich angeordneter geladener Toxinreste verursacht wird, ermittelt [91].

Diese Änderung der transmembranären Spannung bei Annäherung des Toxins wird von McArthur und seinen Kollegen auf eine Verschiebung einzelner Natrium-Ionen innerhalb des Selektivitätsfilters zurückgeführt. Hieraus resultiert ein Konformationsmodell des gebundenen Conotoxin-Moleküls, in welchem die Toxin-Aminosäuren R2 und G6 zur extrazellulären Seite zeigen, während die basischen Toxin-Aminosäuren R12, R14, K17 und R20 tiefer in die Porenöffnung hineinragen.

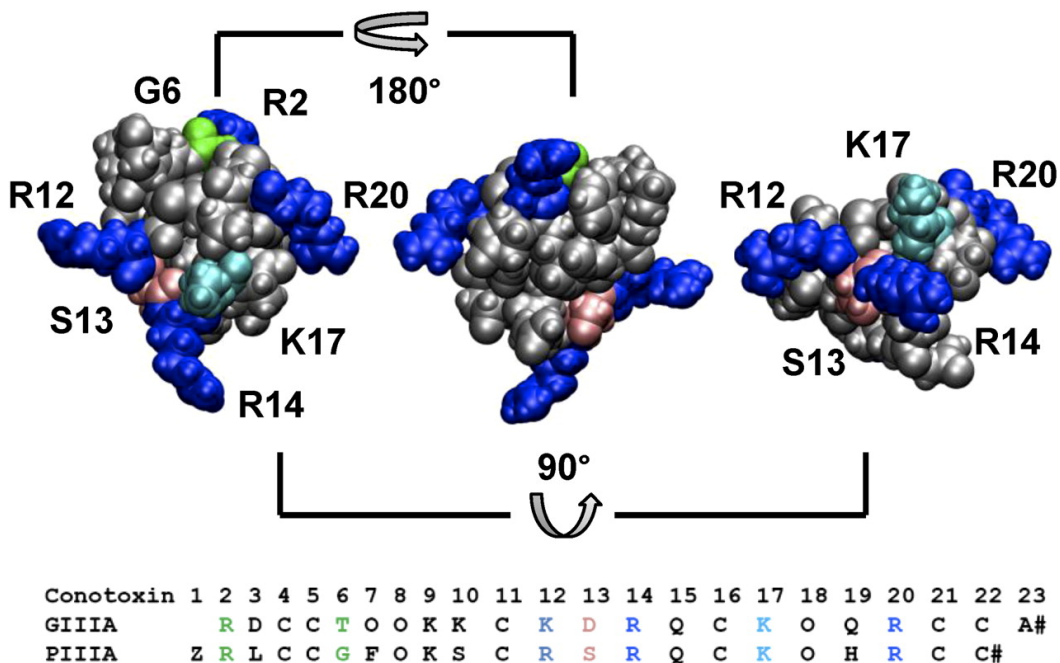


Abbildung 28.: Lösungsstruktur von μ -PIIIA aus drei Blickwinkeln

Blau: basische Toxinreste [dunkelblau: Arginin (R), hellblau: Lysin (K)]. Grün: Glycin (G). Rosa: Serin (S). Im unteren Bildteil sind die Aminosäuresequenzen von μ -GIIIA und μ -PIIIA aufgelistet, die für die Toxinbindung entscheidenden Aminosäuren wurden hier ebenfalls farbig markiert. Bildquelle: [91]

Aufgrund der engen Verwandtschaft der beiden Toxine liegen Rückschlüsse von Experimenten mit μ -PIIIA auf das Bindungsverhalten von μ -GIIIA nahe.

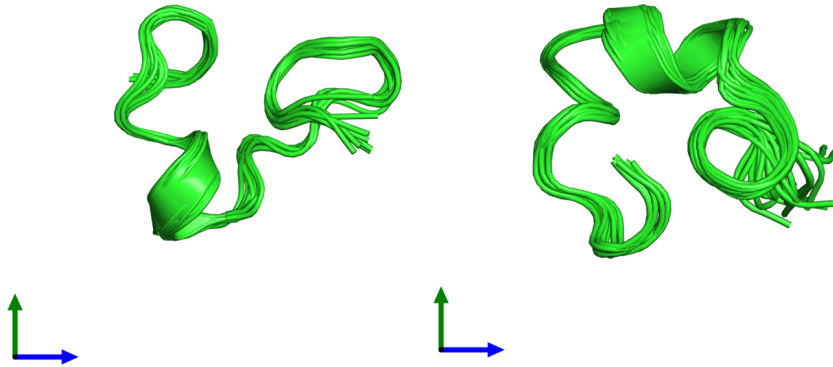


Abbildung 29.: Molekularstruktur von μ -GIIIA und μ -PIIIA

Eine graphische Darstellung der Molekülstrukturen von μ -GIIIA (links) und μ -PIIIA (rechts) offenbart Ähnlichkeiten, aber auch Unterschiede zwischen den eng verwandten Peptiden. Bildquelle: [140, 106]

Da die Aminosäuresequenzen von μ -GIIIA und μ -PIIIA nur geringfügig voneinander abweichen (bei der Betrachtung beider Toxin-Sequenzen muss das gemeinsame Disulfid-Gerüst in Übereinstimmung gebracht werden, um einen Vergleich ziehen zu können, da durch die unterschiedliche Länge der Peptide die Nummerierung divergiert; vgl. Abb. 28), liegt der Schluss nahe, dass die Konformation des μ -GIIIA-Kanal-Komplexes der Konformation des μ -PIIIA-Kanal-Komplexes ähnelt.

Tatsächlich unterstreicht eine Untersuchung von Choudhary et al. aus dem Jahr 2007 die Bedeutung der an homologen Positionen beider Toxine auftauchenden positiv geladenen Aminosäuren K11, R13, K16 und R19 für die Bindung des Toxins μ -GIIIA im Bereich des negativ geladenen äußeren Carboxylattrings der Pore spannungsabhängiger Natriumkanäle [34] und leitet aus den ermittelten Interaktionen ein Modell für den Toxin-Kanal-Komplex ab (vgl. Abb. 30).

Rasch stößt der Untersucher jedoch auch auf einige wichtige funktionelle Unterschiede zwischen den strukturell sehr ähnlichen Peptiden: Die Kanalblockade durch μ -GIIIA ist deutlich spezifischer für Muskelgewebe, wohingegen μ -PIIIA neben skelettmuskulären auch bestimmte neuronale Natriumkanäle blockiert [118]. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass sich diese vergleichsweise geringere Selektivität von μ -PIIIA nicht auf verschiedene Natriumkanal-Isoformen beschränkt: μ -PIIIA blockiert auch die Kaliumkanal-Subtypen $K_v1.1$ und $K_v1.6$ [82]. Überdies verschließt μ -GIIIA den Kanal reversibel, während μ -PIIIA mit skelettmuskulären Natriumkanälen vom Frosch eine irreversible Bindung mit der Porenregion eingeht [126].

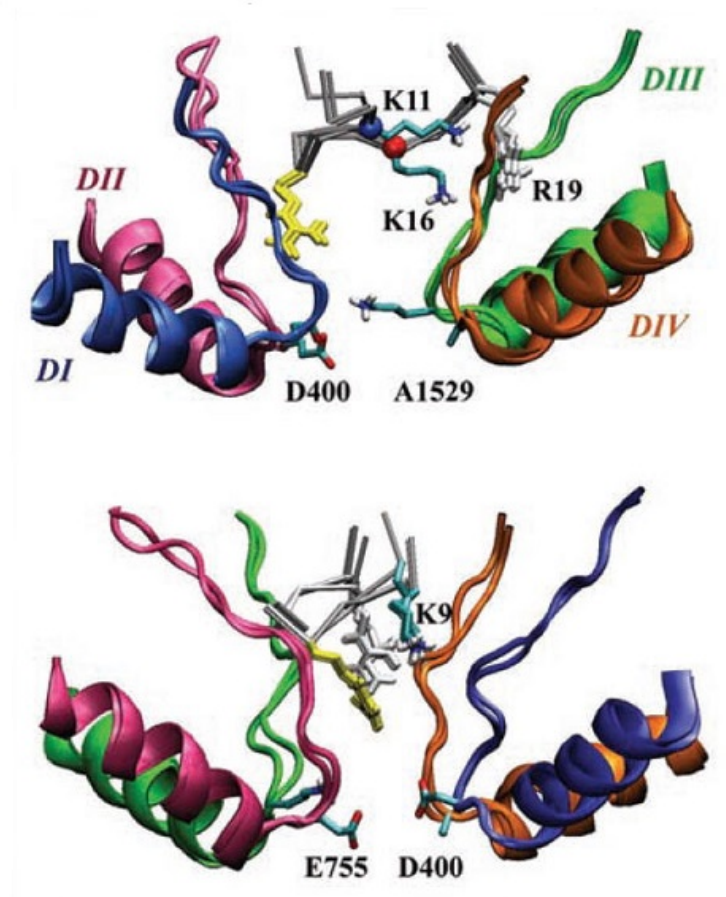


Abbildung 30.: Bindungsmodell von μ -GIIIA an die Natriumkanal-Porenregion
 Modellhafte Darstellung der räumlichen Beziehung entscheidender Toxinreste (Gelb: Arginin (R13), Blau: Lysin (K11), Rot: Lysin (K16), Grün: Arginin (R19)) zu ausgewählten Zielstrukturen aller vier Domänen spannungsabhängiger Natriumkanäle. Bildquelle: [34].

Die technischen Möglichkeiten zur Entschlüsselung der Molekülstruktur von Proteinen und zur Beobachtung der Interaktionen zwischen verschiedenen Molekülen haben sich in den vergangenen Jahren rasch weiterentwickelt. Mittels Protein-Kristallographie und Moleküldynamik-Simulationen können mittlerweile dreidimensionale Modelle von Proteinen erstellt werden. Ähnlich dem Modell des gebundenen μ -PIIIA an der Natriumkanal-Pore von Gaurav Choudhary aus dem Jahr 2007 lassen sich die räumlichen Beziehungen bindungsrelevanter Toxin-Reste zur Natriumkanal-Pore heutzutage graphisch darstellen. Moderne Verfahren wie die 3D-Kryo-Elektronenmikroskopie eröffnen Möglichkeiten in der Darstellung großer Molekülkomplexe, welche den klassischen strukturbioologischen Methoden wie der Röntgenkristall-Strukturanalyse oder der NMR-Technik bislang vorenthalten waren. Trotz dieser Fortschritte sind jedoch weiterhin elektrophysiologische Untersuchungen und Mutagenese-Studien ein wichtiger Bestandteil in der Entschlüsselung von Struktur-Funktionsbeziehungen zwischen einem Toxin und dem Rezeptor.

4.3. Zusammenfassung

Das zentrale Thema dieser Arbeit war die vergleichende Untersuchung der Wirkung des Conotoxins μ -GIIIA auf die Natriumkanal-Isoformen $mNa_v1.4$, $mNa_v1.5$ und $hNa_v1.5$. Da die Aminosäuresequenzen der genannten Kanal-Isoformen im Bereich der Natriumkanal-Pore nur geringfügig voneinander abweichen, könnten Unterschiede in der Toxinsensitivität Aufschluss über einzelne an der Toxinbindung beteiligte Aminosäuren zulassen. Hieraus ließen sich Rückschlüsse auf das Aussehen des Toxin-Kanal-Komplexes ableiten, welche die Erstellung eines Modells erlaubten, anhand dessen potentielle pharmakologische Substanzen experimentell untersucht werden könnten.

Das Untersuchungsmaterial umfasste natriumkanal-kodierende DNA und RNA, welche sowohl in Oozyten als auch in HEK293-Zellen exprimiert wurde, sowie das Toxin μ -GIIIA, welches die evozierten Natriumkanal-Ströme reversibel blockieren sollte.

Zunächst sollte mittels molekularbiologischer Methoden natriumkanal-kodierende RNA aus der entsprechenden DNA hergestellt werden. Hierzu wurde die DNA mittels Transformation vervielfältigt und durch eine Plasmidpräparation mit anschließender Linearisierung und Extraktion isoliert. Es folgte eine Transkription der DNA unter Zuhilfenahme eines RNA-Synthesekits. Die entstandene RNA wurde in eigens präparierten Oozyten exprimiert, bzw. per Tranfektion in HEK293-Zellen eingeschleust. Da die Expression der transkribierten RNA nicht gelang, erfolgte schließlich die Expression extern erzeugter natriumkanal-kodierender RNA-Proben. Mittels Zwei-Elektroden-Spannungsklemme konnten die Natriumkanäle der Oozyten elektrophysiologisch vor, während und nach der Toxinapplikation untersucht werden.

Die Natriumkanal-Isoform $mNa_v1.4$ ließ sich durch das Toxin μ -GIIIA reversibel blockieren. Eine Dosis-Wirkungskurve ermöglichte die Berechnung der mittleren inhibitorischen Toxinkonzentration, welche im wesentlichen mit den bislang publizierten Daten übereinstimmt. Die kardialen Natriumkanal-Isoformen ließen sich durch das eingesetzte Toxin nicht blockieren. Eine Patch-Clamp-Untersuchung ermöglichte ebensolche Experimente mit den Natriumkanälen der HEK293-Zellen. Allerdings waren die Zellen sehr vulnerabel, sodass keine elektrophysiologischen Untersuchungen während oder nach einer Toxinapplikation möglich waren.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass kardiale Natriumkanal-Isoformen, gleich ob murinen oder humanen Ursprungs, durch μ -GIIIA nicht blockiert werden. Die murine Natriumkanal-Isoform des Skelettmuskels hingegen lässt sich reversibel durch μ -GIIIA blockieren. Ein Unterschied zwischen den in dieser Arbeit verwendeten $mNa_v1.4$ -Kanälen und den in der Literatur vorrangig genannten $rNa_v1.4$ -Kanälen war nicht festzustellen. Im Rahmen der Literaturrecherche fiel jedoch auf, dass die Aminosäuresequenzen der eingesetzten Toxine zwischen verschiedenen Publikationen voneinander abweichen - ein Umstand, welcher die Bedeutung einheitlicher Definitionen unterstreicht.

Literaturverzeichnis

- [1] ABRIEL, H.: Cardiac sodium channel Na(v)1.5 and interacting proteins: Physiology and pathophysiology. In: J Mol Cell Cardiol 48 (2010), Jan, Nr. 1, S. 2–11
- [2] ALBUQUERQUE, E. X. ; DALY, J. W. ; WITKOP, B.: Batrachotoxin: chemistry and pharmacology. In: Science 172 (1971), Jun, Nr. 3987, S. 995–1002
- [3] AMIN, A. S. ; ASGHARI-ROODSARI, A. ; TAN, H. L.: Cardiac sodium channelopathies. In: Pflugers Arch - Eur J Physiol (2009), Nov, Nr. 460, S. 223–237
- [4] ARMSTRONG, C. M.: Sodium channels and gating currents. In: Physiol Rev 61 (1981), Jul, Nr. 3, S. 644–683
- [5] ARMSTRONG, C. M.: Na channel inactivation from open and closed states. In: Proc Natl Acad Sci U S A 103 (2006), Nov, Nr. 47, S. 17991–17996
- [6] ARMSTRONG, C. M. ; BEZANILLA, F.: Inactivation of the sodium channel. II. Gating current experiments. In: J Gen Physiol 70 (1977), Nov, Nr. 5, S. 567–590
- [7] BACKX, P. H. ; YUE, D. T. ; LAWRENCE, J. H. ; MARBAN, E. ; TOMASELLI, G. F.: Molecular localization of an ion-binding site within the pore of mammalian sodium channels. In: Science 257 (1992), Jul, Nr. 5067, S. 248–251
- [8] BALSER, J. R.: Inherited sodium channelopathies: novel therapeutic and proarrhythmic molecular mechanisms. In: Trends Cardiovasc Med 11 (2001), Aug, Nr. 6, S. 229–237
- [9] BALSER, J. R. ; NUSS, H. B. ; CHIAMVIMONVAT, N. ; PÉREZ-GARCÍA, M. T. ; MARBAN, E. ; TOMASELLI, G. F.: External pore residue mediates slow inactivation in mu 1 rat skeletal muscle sodium channels. In: J Physiol 494 (Pt 2) (1996), Jul, S. 431–442
- [10] BECKER, S. ; PRUSAK-SOCHACZEWSKI, E. ; ZAMPONI, G. ; BECK-SICKINGER, A. G. ; GORDON, R. D. ; FRENCH, R. J.: Action of derivatives of mu-conotoxin GIIIA on sodium channels. Single amino acid substitutions in the toxin separately affect association and dissociation rates. In: Biochemistry 31 (1992), Sep, Nr. 35, S. 8229–8238

- [11] BENNETT, P. B. ; VALENZUELA, C. ; CHEN, L. Q. ; KALLEN, R. G.: On the molecular nature of the lidocaine receptor of cardiac Na⁺ channels. Modification of block by alterations in the alpha-subunit III-IV interdomain. In: Circ Res 77 (1995), Sep, Nr. 3, S. 584–592
- [12] BERG, J. M. ; TYMOCZKO, J. L. ; STRYER, L.: Biochemistry. 5th Edition. Section 13.5 : Specific Channels Can Rapidly Transport Ions Across Membranes, Subsection 13.5.3, Fig. 13.19. New York: W. H. Freeman, 2002
- [13] BERG, J. M. ; TYMOCZKO, J. L. ; STRYER, L.: Biochemistry. 5th Edition. Section 13.5 : Specific Channels Can Rapidly Transport Ions Across Membranes, Subsection 13.5.4. New York: W. H. Freeman, 2002
- [14] BERGMAN, C. ; DUBOIS, J. M. ; ROJAS, E. ; RATHMAYER, W.: Decreased rate of sodium conductance inactivation in the node of Ranvier induced by a polypeptide toxin from sea anemone. In: Biochim Biophys Acta 455 (1976), Nov, Nr. 1, S. 173–184
- [15] BEZANILLA, F.: The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. In: Physiol Rev 80 (2000), Apr, Nr. 2, S. 555–592
- [16] BÖRJESSON, S. I. ; ELINDER, F.: Structure, function, and modification of the voltage sensor in voltage-gated ion channels. In: Cell Biochem Biophys 52 (2008), Nr. 3, S. 149–174
- [17] CATTERALL, W. A.: Neurotoxins that act on voltage-sensitive sodium channels in excitable membranes. In: Annu Rev Pharmacol Toxicol 20 (1980), S. 15–43
- [18] CATTERALL, W. A.: Molecular properties of voltage-sensitive sodium channels. In: Annu Rev Biochem 55 (1986), S. 953–985
- [19] CATTERALL, W. A.: Molecular properties of sodium and calcium channels. In: J Bioenerg Biomembr 28 (1996), Jun, Nr. 3, S. 219–230
- [20] CATTERALL, W. A. ; CESTÈLE, S. ; YAROV-YAROVY, V. ; YU, F. H. ; KONOKI, K. ; SCHEUER, T.: Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. In: Toxicon 49 (2007), Feb, Nr. 2, S. 124–141
- [21] CATTERALL, W. A. ; GOLDIN, A. L. ; WAXMAN, S. G.: International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. In: Pharmacol Rev 57 (2005), Dec, Nr. 4, S. 397–409

- [22] CATTERALL, W. A. ; RISK, M.: Toxin T4(6) from *Ptychodiscus brevis* (formerly *Gymnodinium breve*) enhances activation of voltage-sensitive sodium channels by veratridine. In: Mol Pharmacol 19 (1981), Mar, Nr. 2, S. 345–348
- [23] CESTÈLE, S. ; CATTERALL, W. A.: Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. In: Biochimie 82 (2000), Nr. 9-10, S. 883–892
- [24] CESTÈLE, S. ; QU, Y. ; ROGERS, J. C. ; ROCHAT, H. ; SCHEUER, T. ; CATTERALL, W. A.: Voltage sensor-trapping: enhanced activation of sodium channels by beta-scorpion toxin bound to the S3-S4 loop in domain II. In: Neuron 21 (1998), Oct, Nr. 4, S. 919–931
- [25] CHAHINE, M ; CHEN, L Q. ; FOTOUHI, N ; WALSKY, R ; FRY, D ; SANTARELLI, V ; HORN, R ; KALLEN, R G.: Characterizing the mu-conotoxin binding site on voltage-sensitive sodium channels with toxin analogs and channel mutations. In: Receptors & channels 3 (1995), S. 161–174
- [26] CHAHINE, M. ; GEORGE, A. L. ; ZHOU, M. ; JI, S. ; SUN, W. ; BARCHI, R. L. ; HORN, R.: Sodium channel mutations in paramyotonia congenita uncouple inactivation from activation. In: Neuron 12 (1994), Feb, Nr. 2, S. 281–294
- [27] CHAHINE, M. ; SIROIS, J. ; MARCOTTE, P. ; CHEN, L. ; KALLEN, R. G.: Extrapore residues of the S5-S6 loop of domain 2 of the voltage-gated skeletal muscle sodium channel (rSkM1) contribute to the mu-conotoxin GIIIA binding site. In: Biophys J 75 (1998), Jul, Nr. 1, S. 236–246
- [28] CHANDA, B. ; BEZANILLA, F.: Tracking voltage-dependent conformational changes in skeletal muscle sodium channel during activation. In: J Gen Physiol 120 (2002), Nov, Nr. 5, S. 629–645
- [29] CHANDLER, W. K. ; MEVES, H.: Voltage clamp experiments on internally perfused giant axons. In: J Physiol 180 (1965), Oct, Nr. 4, S. 788–820
- [30] CHANG, N. S. ; FRENCH, R. J. ; LIPKIND, G. M. ; FOZZARD, H. A. ; DUDLEY, S.: Predominant interactions between mu-conotoxin Arg-13 and the skeletal muscle Na⁺ channel localized by mutant cycle analysis. In: Biochemistry 37 (1998), Mar, Nr. 13, S. 4407–4419
- [31] CHEN, L. Q. ; CHAHINE, M. ; KALLEN, R. G. ; BARCHI, R. L. ; HORN, R.: Chimeric study of sodium channels from rat skeletal and cardiac muscle. In: FEBS Lett 309 (1992), Sep, Nr. 3, S. 253–257
- [32] CHERIAN, A. ; BAHETI, N. N. ; KURUVILLA, A.: Muscle channelopathies and electrophysiological approach. In: Ann Indian Acad Neurol 11 (2008), Jan, Nr. 1, S. 20–27

- [33] CHIAMVIMONVAT, N. ; PÉREZ-GARCÍA, M. T. ; TOMASELLI, G. F. ; MARBAN, E.: Control of ion flux and selectivity by negatively charged residues in the outer mouth of rat sodium channels. In: J Physiol 491 (Pt 1) (1996), Feb, S. 51–59
- [34] CHOUDHARY, G. ; ALISTE, M. P. ; TIELEMAN, D. P. ; FRENCH, R. J. ; DUDLEY, S. C.: Docking of mu-conotoxin GIIIA in the sodium channel outer vestibule. In: Channels (Austin) 1 (2007), Nr. 5, S. 344–352
- [35] COHEN, C. J. ; BEAN, B. P. ; COLATSKY, T. J. ; TSIEN, R. W.: Tetrodotoxin block of sodium channels in rabbit Purkinje fibers. Interactions between toxin binding and channel gating. In: J Gen Physiol 78 (1981), Oct, Nr. 4, S. 383–411
- [36] CRAIG, A. G. ; BANDYOPADHYAY, P. ; OLIVERA, B. M.: Post-translationally modified neuropeptides from *Conus* venoms. In: Eur J Biochem 264 (1999), Sep, Nr. 2, S. 271–275
- [37] CRUZ, L. J. ; GRAY, W. R. ; OLIVERA, B. M. ; ZEIKUS, R. D. ; KERR, L. ; YOSHIKAMI, D. ; MOCZYDŁOWSKI, E.: *Conus geographus* toxins that discriminate between neuronal and muscle sodium channels. In: J Biol Chem 260 (1985), Aug, Nr. 16, S. 9280–9288
- [38] CUMMINS, T. R. ; AGLIECO, F. ; DIB-HAJJ, S. D.: Critical molecular determinants of voltage-gated sodium channel sensitivity to mu-conotoxins GIIIA/B. In: Mol Pharmacol 61 (2002), May, Nr. 5, S. 1192–1201
- [39] DUDEV, T. ; LIM, C.: Factors governing the Na(+) vs K(+) selectivity in sodium ion channels. In: J Am Chem Soc 132 (2010), Feb, Nr. 7, S. 2321–2332
- [40] DUDLEY, S. C. ; CHANG, N. ; HALL, J. ; LIPKIND, G. ; FOZZARD, H. A. ; FRENCH, R. J.: mu-conotoxin GIIIA interactions with the voltage-gated Na(+) channel predict a clockwise arrangement of the domains. In: J Gen Physiol 116 (2000), Nov, Nr. 5, S. 679–690
- [41] DUDLEY, S. C. ; TODT, H. ; LIPKIND, G. ; FOZZARD, H. A.: A mu-conotoxin-insensitive Na⁺ channel mutant: possible localization of a binding site at the outer vestibule. In: Biophys J 69 (1995), Nov, Nr. 5, S. 1657–1665
- [42] DUMONT, J. N.: Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. In: J Morphol 136 (1972), Feb, Nr. 2, S. 153–179
- [43] ESSACK, M ; BAJIC, V B. ; ARCHER, J A C.: Conotoxins that confer therapeutic possibilities. In: Marine drugs 10 (2012), Jun, S. 1244–1265

- [44] FAINZILBER, M. ; KOFMAN, O. ; ZLOTKIN, E. ; GORDON, D.: A new neurotoxin receptor site on sodium channels is identified by a conotoxin that affects sodium channel inactivation in molluscs and acts as an antagonist in rat brain. In: J Biol Chem 269 (1994), Jan, Nr. 4, S. 2574–2580
- [45] FAVRE, I. ; MOCZYDLOWSKI, E. ; SCHILD, L.: On the structural basis for ionic selectivity among Na⁺, K⁺, and Ca²⁺ in the voltage-gated sodium channel. In: Biophys J 71 (1996), Dec, Nr. 6, S. 3110–3125
- [46] FEATHERSTONE, D. E. ; FUJIMOTO, E. ; RUBEN, P. C.: A defect in skeletal muscle sodium channel deactivation exacerbates hyperexcitability in human paramyotonia congenita. In: J Physiol 506 (Pt 3) (1998), Feb, S. 627–638
- [47] FERBER, M. ; SPORNING, A. ; JESERICH, G. ; DELACRUZ, R. ; WATKINS, M. ; OLIVERA, B. M. ; TERLAU, H.: A novel conus peptide ligand for K⁺ channels. In: The Journal of biological chemistry 278 (2003), Jan, S. 2177–2183
- [48] FIDZINSKI, P: Elektrophysiologische Charakterisierung künstlicher Ionenkanäle in lebenden Zellen, Humboldt-Universität zu Berlin, Medizinische Fakultät - Universitätsklinikum Charité, Diss., 2006
- [49] FRENCH, R. J. ; TERLAU, H.: Sodium channel toxins – receptor targeting and therapeutic potential. In: Curr Med Chem 11 (2004), Dec, Nr. 23, S. 3053–3064
- [50] FRENCH, R. J. ; WORLEY, J. F. ; KRUEGER, B. K.: Voltage-dependent block by saxitoxin of sodium channels incorporated into planar lipid bilayers. In: Biophys J 45 (1984), Jan, Nr. 1, S. 301–310
- [51] FUHRMAN, F. A.: Tetrodotoxin. In: Sci Am 217 (1967), Aug, Nr. 2, S. 60–71
- [52] GEIB, S. ; SANDOZ, G. ; CARLIER, E. ; CORNET, V. ; CHEYNET-SAUVION, V. ; WAARD, M. D.: A novel *Xenopus* oocyte expression system based on cytoplasmic coinjection of T7-driven plasmids and purified T7-RNA polymerase. In: Receptors Channels 7 (2001), Nr. 5, S. 331–343
- [53] GEORGE, A. L.: Inherited disorders of voltage-gated sodium channels. In: J Clin Invest 115 (2005), Aug, Nr. 8, S. 1990–1999
- [54] GEORGE, A. L. ; KOMISAROF, J. ; KALLEN, R. G. ; BARCHI, R. L.: Primary structure of the adult human skeletal muscle voltage-dependent sodium channel. In: Ann Neurol 31 (1992), Feb, Nr. 2, S. 131–137
- [55] GEORGE, A. L. ; VARKONY, T. A. ; DRABKIN, H. A. ; HAN, J. ; KNOPS, J. F. ; FINLEY, W. H. ; BROWN, G. B. ; WARD, D. C. ; HAAS, M.: Assignment of the human heart tetrodotoxin-resistant voltage-gated Na⁺ channel alpha-subunit

- gene (SCN5A) to band 3p21. In: Cytogenet Cell Genet 68 (1995), Nr. 1-2, S. 67–70
- [56] GOLDIN, A. L.: Resurgence of sodium channel research. In: Annu Rev Physiol 63 (2001), S. 871–894
- [57] GUY, H. R. ; SEETHARAMULU, P.: Molecular model of the action potential sodium channel. In: Proc Natl Acad Sci U S A 83 (1986), Jan, Nr. 2, S. 508–512
- [58] HAMILL, O. P. ; MARTY, A. ; NEHER, E. ; SAKMANN, B. ; SIGWORTH, F. J.: Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. In: Pflugers Arch 391 (1981), Aug, Nr. 2, S. 85–100
- [59] HAN, P ; WANG, K ; DAI, X ; CAO, Y ; LIU, S ; JIANG, H ; FAN, C ; WU, W ; CHEN, J: The Role of Individual Disulfide Bonds of mu-Conotoxin GIIIA in the Inhibition of NaV1.4. In: Marine drugs 14 (2016), Nov
- [60] HEINEMANN, S. H. ; SCHLIEF, T. ; MORI, Y. ; IMOTO, K.: Molecular pore structure of voltage-gated sodium and calcium channels. In: Braz J Med Biol Res 27 (1994), Dec, Nr. 12, S. 2781–2802
- [61] HEINEMANN, S. H. ; TERLAU, H. ; STÜHMER, W. ; IMOTO, K. ; NUMA, S.: Calcium channel characteristics conferred on the sodium channel by single mutations. In: Nature 356 (1992), Apr, Nr. 6368, S. 441–443
- [62] HILBER, K. ; SANDTNER, W. ; ZARRABI, T. ; ZEBEDIN, E. ; KUDLACEK, O. ; FOZZARD, H. A. ; TODT, H.: Selectivity filter residues contribute unequally to pore stabilization in voltage-gated sodium channels. In: Biochemistry 44 (2005), Oct, Nr. 42, S. 13874–13882
- [63] HILLE, B.: The receptor for tetrodotoxin and saxitoxin. A structural hypothesis. In: Biophys J 15 (1975), Jun, Nr. 6, S. 615–619
- [64] HILLE, B.: Ion Channels of Excitable Membranes. Sinauer Associates Inc., U.S., 2001
- [65] HIRSCHBERG, B. ; ROVNER, A. ; LIEBERMAN, M. ; PATLAK, J.: Transfer of twelve charges is needed to open skeletal muscle Na⁺ channels. In: J Gen Physiol 106 (1995), Dec, Nr. 6, S. 1053–1068
- [66] HOSHI, T. ; ZAGOTTA, W. N. ; ALDRICH, R. W.: Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation. In: Science 250 (1990), Oct, Nr. 4980, S. 533–538

- [67] HOSHI, T. ; ZAGOTTA, W. N. ; ALDRICH, R. W.: Two types of inactivation in Shaker K⁺ channels: effects of alterations in the carboxy-terminal region. In: Neuron 7 (1991), Oct, Nr. 4, S. 547–556
- [68] HUANG, C. J. ; MOCZYDLOWSKI, E.: Cytoplasmic polyamines as permeant blockers and modulators of the voltage-gated sodium channel. In: Biophys J 80 (2001), Mar, Nr. 3, S. 1262–1279
- [69] HUANG, W ; LIU, M ; YAN, S F. ; YAN, N: Structure-based assessment of disease-related mutations in human voltage-gated sodium channels. In: Protein & cell 8 (2017), Jun, S. 401–438
- [70] HUI, K. ; LIPKIND, G. ; FOZZARD, H. A. ; FRENCH, R. J.: Electrostatic and steric contributions to block of the skeletal muscle sodium channel by mu-conotoxin. In: J Gen Physiol 119 (2002), Jan, Nr. 1, S. 45–54
- [71] HUI, K. ; MCINTYRE, D. ; FRENCH, R. J.: Conotoxins as sensors of local pH and electrostatic potential in the outer vestibule of the sodium channel. In: J Gen Physiol 122 (2003), Jul, Nr. 1, S. 63–79
- [72] HUTCHISON, C. A. ; PHILLIPS, S. ; EDGELL, M. H. ; GILLAM, S. ; JAHNKE, P. ; SMITH, M.: Mutagenesis at a specific position in a DNA sequence. In: J Biol Chem 253 (1978), Sep, Nr. 18, S. 6551–6560
- [73] JI, S. ; GEORGE, A. L. ; HORN, R. ; BARCHI, R. L.: Paramyotonia congenita mutations reveal different roles for segments S3 and S4 of domain D4 in hSkM1 sodium channel gating. In: J Gen Physiol 107 (1996), Feb, Nr. 2, S. 183–194
- [74] KASTIN, A. J.: Handbook of Biologically Active Peptides. Chapter 55 : Conus Snail Venom Peptides, S. 381 - 388. Academic Pr Inc, 2006
- [75] KEIZER, D. W. ; WEST, P. J. ; LEE, E. F. ; YOSHIKAMI, D. ; OLIVERA, B. M. ; BULAJ, G. ; NORTON, R. S.: Structural basis for tetrodotoxin-resistant sodium channel binding by mu-conotoxin SmIIIa. In: J Biol Chem 278 (2003), Nov, Nr. 47, S. 46805–46813
- [76] KEYNES, R. D.: Ion Channels in the Nerve-Cell Membrane. In: Scientific American 240 (1979), Nr. 3, S. 126 – 135
- [77] KOISHI, R. ; XU, H. ; REN, D. ; NAVARRO, B. ; SPILLER, B. W. ; SHI, Q. ; CLAPHAM, D. E.: A superfamily of voltage-gated sodium channels in bacteria. In: J Biol Chem 279 (2004), Mar, Nr. 10, S. 9532–9538
- [78] KORKOSH, V S. ; ZHOROV, B S. ; TIKHONOV, D B.: Folding similarity of the outer pore region in prokaryotic and eukaryotic sodium channels revealed by docking of

- conotoxins GIIIA, PIIIA, and KIIIA in a NavAb-based model of Nav1.4. In: The Journal of general physiology 144 (2014), Sep, S. 231–244
- [79] LANCELIN, J. M. ; KOHDA, D. ; TATE, S. ; YANAGAWA, Y. ; ABE, T. ; SATAKE, M. ; INAGAKI, F.: Tertiary structure of conotoxin GIIIA in aqueous solution. In: Biochemistry 30 (1991), Jul, Nr. 28, S. 6908–6916
- [80] LEI, M. ; HUANG, C. L-H ; ZHANG, Y.: Genetic Na⁺ channelopathies and sinus node dysfunction. In: Prog Biophys Mol Biol 98 (2008), Nr. 2-3, S. 171–178
- [81] LEIPOLD, E. ; HANSEL, A. ; OLIVERA, B. M. ; TERLAU, H. ; HEINEMANN, S. H.: Molecular interaction of delta-conotoxins with voltage-gated sodium channels. In: FEBS Lett 579 (2005), Jul, Nr. 18, S. 3881–3884
- [82] LEIPOLD, E. ; ULLRICH, F. ; THIELE, M. ; TIETZE, A. A. ; TERLAU, H. ; IMHOF, D. ; HEINEMANN, S. H.: Subtype-specific block of voltage-gated K(+) channels by mu-conopeptides. In: Biochemical and biophysical research communications 482 (2017), Jan, S. 1135–1140
- [83] LI, R. A. ; ENNIS, I. L. ; FRENCH, R. J. ; DUDLEY, S. C. ; TOMASELLI, G. F. ; MARBÁN, E.: Clockwise domain arrangement of the sodium channel revealed by (mu)-conotoxin (GIIIA) docking orientation. In: J Biol Chem 276 (2001), Apr, Nr. 14, S. 11072–11077
- [84] LI, R. A. ; ENNIS, I. L. ; TOMASELLI, G. F. ; FRENCH, R. J. ; MARBÁN, E.: Latent specificity of molecular recognition in sodium channels engineered to discriminate between two indistinguishable mu-conotoxins. In: Biochemistry 40 (2001), May, Nr. 20, S. 6002–6008
- [85] LI, R. A. ; ENNIS, I. L. ; XUE, T. ; NGUYEN, H. M. ; TOMASELLI, G. F. ; GOLDIN, A. L. ; MARBÁN, E.: Molecular basis of isoform-specific micro-conotoxin block of cardiac, skeletal muscle, and brain Na⁺ channels. In: J Biol Chem 278 (2003), Mar, Nr. 10, S. 8717–8724
- [86] LI, R. A. ; TOMASELLI, G. F.: Using the deadly mu-conotoxins as probes of voltage-gated sodium channels. In: Toxicon 44 (2004), Aug, Nr. 2, S. 117–122
- [87] LI, R. A. ; VÉLEZ, P. ; CHIAMVIMONVAT, N. ; TOMASELLI, G. F. ; MARBÁN, E.: Charged residues between the selectivity filter and S6 segments contribute to the permeation phenotype of the sodium channel. In: J Gen Physiol 115 (2000), Jan, Nr. 1, S. 81–92
- [88] LODISH, H ; BERK, A ; ZIPURSKY, SL ; MATSUDAIRA, P ; BALTIMORE, D ; DARNELL, J: Molecular Cell Biology, 4th Edition. Section 21.2 : The Action

- Potential and Conduction of Electric Impulses , Fig. 21-13. New York: W.H. Freeman, 2000
- [89] MAHDAVI, S ; KUYUCAK, S: Molecular dynamics study of binding of mu-conotoxin GIIIA to the voltage-gated sodium channel Na(v)1.4. In: PloS one 9 (2014), S. e105300
- [90] MARCOTTE, P. ; CHEN, L. Q. ; KALLEN, R. G. ; CHAHINE, M.: Effects of Tityus serrulatus scorpion toxin gamma on voltage-gated Na⁺ channels. In: Circ Res 80 (1997), Mar, Nr. 3, S. 363–369
- [91] MCARTHUR, J. R. ; SINGH, G. ; O'MARA, M. L. ; MCMASTER, D. ; OSTROUMOV, V. ; TIELEMAN, D. P. ; FRENCH, R. J.: Orientation of mu-conotoxin PIIIA in a sodium channel vestibule, based on voltage dependence of its binding. In: Mol Pharmacol 80 (2011), Aug, Nr. 2, S. 219–227
- [92] MCCLATCHEY, A. I. ; LIN, C. S. ; WANG, J. ; HOFFMAN, E. P. ; ROJAS, C. ; GUSELLA, J. F.: The genomic structure of the human skeletal muscle sodium channel gene. In: Hum Mol Genet 1 (1992), Oct, Nr. 7, S. 521–527
- [93] MCINTOSH, J. M. ; JONES, R. M.: Cone venom – from accidental stings to deliberate injection. In: Toxicon 39 (2001), Oct, Nr. 10, S. 1447–1451
- [94] MCINTOSH, J. M. ; SANTOS, A. D. ; OLIVERA, B. M.: Conus peptides targeted to specific nicotinic acetylcholine receptor subtypes. In: Annu Rev Biochem 68 (1999), S. 59–88
- [95] METHFESSEL, C. ; WITZEMANN, V. ; TAKAHASHI, T. ; MISHINA, M. ; NUMA, S. ; SAKMANN, B.: Patch clamp measurements on Xenopus laevis oocytes: currents through endogenous channels and implanted acetylcholine receptor and sodium channels. In: Pflugers Arch 407 (1986), Dec, Nr. 6, S. 577–588
- [96] MIYAMOTO, K. ; KANAORI, K. ; NAKAGAWA, T. ; KURODA, Y.: Solution structures of the inactivation gate particle peptides of rat brain type-IIA and human heart sodium channels in SDS micelles. In: J Pept Res 57 (2001), Mar, Nr. 3, S. 203–214
- [97] MOCZYDLOWSKI, E. ; HALL, S. ; GARBER, S. S. ; STRICHARTZ, G. S. ; MILLER, C.: Voltage-dependent blockade of muscle Na⁺ channels by guanidinium toxins. In: J Gen Physiol 84 (1984), Nov, Nr. 5, S. 687–704
- [98] MOCZYDLOWSKI, E. ; OLIVERA, B. M. ; GRAY, W. R. ; STRICHARTZ, G. R.: Discrimination of muscle and neuronal Na-channel subtypes by binding competition between [³H]saxitoxin and mu-conotoxins. In: Proc Natl Acad Sci U S A 83 (1986), Jul, Nr. 14, S. 5321–5325

- [99] MORAN, O. ; PICOLLO, A. ; CONTI, F.: Tonic and phasic guanidinium toxin-block of skeletal muscle Na channels expressed in Mammalian cells. In: Biophys J 84 (2003), May, Nr. 5, S. 2999–3006
- [100] NAKAMURA, Y. ; NAKAJIMA, S. ; GRUNDFEST, H.: The action of tetrodotoxin on electrogenic components of squid giant axons. In: J Gen Physiol 48 (1965), Jul, Nr. 6, S. 985–996
- [101] NARAHASHI, T.: Chemicals as tools in the study of excitable membranes. In: Physiol Rev 54 (1974), Oct, Nr. 4, S. 813–889
- [102] NARAHASHI, T.: Tetrodotoxin: a brief history. In: Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci 84 (2008), Nr. 5, S. 147–154
- [103] NARAHASHI, T. ; MOORE, J. W. ; SCOTT, W. R.: Tetrodotoxin blockage of sodium conductance increase in lobster giant axons. In: J Gen Physiol 47 (1964), May, S. 965–974
- [104] NEHER, E. ; SAKMANN, B.: Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. In: Nature 260 (1976), Apr, Nr. 5554, S. 799–802
- [105] NEHER, E. ; SAKMANN, B. ; STEINBACH, J. H.: The extracellular patch clamp: a method for resolving currents through individual open channels in biological membranes. In: Pflugers Arch 375 (1978), Jul, Nr. 2, S. 219–228
- [106] NIELSEN, K. J. ; WATSON, M. ; ADAMS, D. J. ; HAMMARSTRÖM, A. K. ; GAGE, P. W. ; HILL, J. M. ; CRAIK, D. J. ; THOMAS, L. ; ADAMS, D. ; ALEWOOD, P. F. ; LEWIS, R. J.: Solution structure of mu-conotoxin PIIIA, a preferential inhibitor of persistent tetrodotoxin-sensitive sodium channels. In: The Journal of biological chemistry 277 (2002), Jul, S. 27247–27255
- [107] NODA, M. ; SUZUKI, H. ; NUMA, S. ; STÜHMER, W.: A single point mutation confers tetrodotoxin and saxitoxin insensitivity on the sodium channel II. In: FEBS Lett 259 (1989), Dec, Nr. 1, S. 213–216
- [108] OLIVERA, B. M.: Conus venom peptides, receptor and ion channel targets, and drug design: 50 million years of neuropharmacology. In: Mol Biol Cell 8 (1997), Nov, Nr. 11, S. 2101–2109
- [109] OLIVERA, B. M. ; RIVIER, J. ; SCOTT, J. K. ; HILLYARD, D. R. ; CRUZ, L. J.: Conotoxins. In: J Biol Chem 266 (1991), Nov, Nr. 33, S. 22067–22070
- [110] OSTWALD, W.: Memorial on the foundation of an international chemical institute. In: Science 40 (1914), Jul, Nr. 1022, S. 147–158

- [111] PATEL, D. ; MAHDAVI, S. ; KUYUCAK, S.: Computational Study of Binding of mu-Conotoxin GIIIA to Bacterial Sodium Channels NaVAb and NaVRh. In: Biochemistry 55 (2016), Mar, S. 1929 – 1938
- [112] PAYANDEH, J. ; SCHEUER, T. ; ZHENG, N. ; CATTERALL, W. A.: The crystal structure of a voltage-gated sodium channel. In: Nature 475 (2011), Jul, Nr. 7356, S. 353–358
- [113] PENZOTTI, J. L. ; FOZZARD, H. A. ; LIPKIND, G. M. ; DUDLEY, S. C.: Differences in saxitoxin and tetrodotoxin binding revealed by mutagenesis of the Na⁺ channel outer vestibule. In: Biophys J 75 (1998), Dec, Nr. 6, S. 2647–2657
- [114] PICCOLINO, M.: Animal electricity and the birth of electrophysiology: the legacy of Luigi Galvani. In: Brain Res Bull 46 (1998), Jul, Nr. 5, S. 381–407
- [115] REN, D. ; NAVARRO, B. ; XU, H. ; YUE, L. ; SHI, Q. ; CLAPHAM, D. E.: A prokaryotic voltage-gated sodium channel. In: Science 294 (2001), Dec, Nr. 5550, S. 2372–2375
- [116] ROGERS, J. C. ; QU, Y. ; TANADA, T. N. ; SCHEUER, T. ; CATTERALL, W. A.: Molecular determinants of high affinity binding of alpha-scorpion toxin and sea anemone toxin in the S3-S4 extracellular loop in domain IV of the Na⁺ channel alpha subunit. In: J Biol Chem 271 (1996), Jul, Nr. 27, S. 15950–15962
- [117] ROHL, C. A. ; BOECKMAN, F. A. ; BAKER, C. ; SCHEUER, T. ; CATTERALL, W. A. ; KLEVIT, R. E.: Solution structure of the sodium channel inactivation gate. In: Biochemistry 38 (1999), Jan, Nr. 3, S. 855–861
- [118] SAFO, P. ; ROSENBAUM, T. ; SHCHERBATKO, A. ; CHOI, D. Y. ; HAN, E. ; TOLEDO-ARAL, J. J. ; OLIVERA, B. M. ; BREHM, P. ; MANDEL, G.: Distinction among neuronal subtypes of voltage-activated sodium channels by mu-conotoxin PIIIA. In: J Neurosci 20 (2000), Jan, Nr. 1, S. 76–80
- [119] SATIN, J. ; KYLE, J. W. ; CHEN, M. ; BELL, P. ; CRIBBS, L. L. ; FOZZARD, H. A. ; ROGART, R. B.: A mutant of TTX-resistant cardiac sodium channels with TTX-sensitive properties. In: Science 256 (1992), May, Nr. 5060, S. 1202–1205
- [120] SATO, K. ; ISHIDA, Y. ; WAKAMATSU, K. ; KATO, R. ; HONDA, H. ; OHIZUMI, Y. ; NAKAMURA, H. ; OHYA, M. ; LANCELIN, J. M. ; KOHDA, D.: Active site of mu-conotoxin GIIIA, a peptide blocker of muscle sodium channels. In: J Biol Chem 266 (1991), Sep, Nr. 26, S. 16989–16991
- [121] SATO, K ; YAMAGUCHI, Y ; ISHIDA, Y ; OHIZUMI, Y: Roles of basic amino acid residues in the activity of mu-conotoxin GIIIA and GIIIB, peptide blockers of

- muscle sodium channels. In: Chemical biology & drug design 85 (2015), Apr, S. 488–493
- [122] SATO, S. ; NAKAMURA, H. ; OHIZUMI, Y. ; KOBAYASHI, J. ; HIRATA, Y.: The amino acid sequences of homologous hydroxyproline-containing myotoxins from the marine snail *Conus geographus* venom. In: FEBS Lett 155 (1983), May, Nr. 2, S. 277–280
- [123] SCHMIDT, U. ; AL-HASANI, H.: Production of Lentiviruses using HEK293T Cell-Specific Lipid Reagent for Multiplasmid Transformation. In: Gene Transfer, Bulletin 5408 Bio Rad Laboratories, Inc. (2007)
- [124] SEYFARTH, E.-A.: Julius Bernstein (1839-1917): pioneer neurobiologist and biophysicist. In: Biol Cybern 94 (2006), Jan, Nr. 1, S. 2–8
- [125] SHAMPO, M. A. ; KYLE, R. A.: Michael Smith – Canadian biochemist wins 1993 Nobel Prize. In: Mayo Clin Proc 78 (2003), Jul, Nr. 7, S. 804
- [126] SHON, K. J. ; OLIVERA, B. M. ; WATKINS, M. ; JACOBSEN, R. B. ; GRAY, W. R. ; FLORESCA, C. Z. ; CRUZ, L. J. ; HILLYARD, D. R. ; BRINK, A. ; TERLAU, H. ; YOSHIKAMI, D.: μ -Conotoxin PIIIA, a new peptide for discriminating among tetrodotoxin-sensitive Na channel subtypes. In: J Neurosci 18 (1998), Jun, Nr. 12, S. 4473–4481
- [127] STEPHAN, M. M. ; POTTS, J. F. ; AGNEW, W. S.: The microI skeletal muscle sodium channel: mutation E403Q eliminates sensitivity to tetrodotoxin but not to μ -conotoxins GIIIA and GIIIB. In: J Membr Biol 137 (1994), Jan, Nr. 1, S. 1–8
- [128] TEJEDOR, F. J. ; CATTERALL, W. A.: Site of covalent attachment of alpha-scorpion toxin derivatives in domain I of the sodium channel alpha subunit. In: Proc Natl Acad Sci U S A 85 (1988), Nov, Nr. 22, S. 8742–8746
- [129] TERLAU, H. ; HEINEMANN, S. H. ; STÜHMER, W. ; PUSCH, M. ; CONTI, F. ; IMOTO, K. ; NUMA, S.: Mapping the site of block by tetrodotoxin and saxitoxin of sodium channel II. In: FEBS Lett 293 (1991), Nov, Nr. 1-2, S. 93–96
- [130] TERLAU, H. ; OLIVERA, B. M.: *Conus* venoms: a rich source of novel ion channel-targeted peptides. In: Physiol Rev 84 (2004), Jan, Nr. 1, S. 41–68
- [131] TERLAU, H. ; STÜHMER, W.: Structure and function of voltage-gated ion channels. In: Naturwissenschaften 85 (1998), Sep, Nr. 9, S. 437–444
- [132] TIKHONOV, D. B. ; ZHOROV, B. S.: Sodium channels: ionic model of slow inactivation and state-dependent drug binding. In: Biophys J 93 (2007), Sep, Nr. 5, S. 1557–1570

- [133] TRAINER, V. L. ; BADEN, D. G. ; CATTERALL, W. A.: Identification of peptide components of the brevetoxin receptor site of rat brain sodium channels. In: J Biol Chem 269 (1994), Aug, Nr. 31, S. 19904–19909
- [134] TRAINER, V. L. ; BROWN, G. B. ; CATTERALL, W. A.: Site of covalent labeling by a photoreactive batrachotoxin derivative near transmembrane segment IS6 of the sodium channel alpha subunit. In: J Biol Chem 271 (1996), May, Nr. 19, S. 11261–11267
- [135] TRAINER, V. L. ; THOMSEN, W. J. ; CATTERALL, W. A. ; BADEN, D. G.: Photoaffinity labeling of the brevetoxin receptor on sodium channels in rat brain synaptosomes. In: Mol Pharmacol 40 (1991), Dec, Nr. 6, S. 988–994
- [136] ULBRICHT, W.: The effect of veratridine on excitable membranes of nerve and muscle. In: Ergeb Physiol 61 (1969), S. 18–71
- [137] ULBRICHT, W.: Sodium channel inactivation: molecular determinants and modulation. In: Physiol Rev 85 (2005), Oct, Nr. 4, S. 1271–1301
- [138] VICART, S. ; STERNBERG, D. ; FONTAINE, B. ; MEOLA, G.: Human skeletal muscle sodium channelopathies. In: Neurol Sci 26 (2005), Oct, Nr. 4, S. 194–202
- [139] VORA, T. ; CORRY, B. ; CHUNG, S.-H.: A model of sodium channels. In: Biochim Biophys Acta 1668 (2005), Feb, Nr. 1, S. 106–116
- [140] WAKAMATSU, K. ; KOHDA, D. ; HATANAKA, H. ; LANCELIN, J. M. ; ISHIDA, Y. ; OYA, M. ; NAKAMURA, H. ; INAGAKI, F. ; SATO, K.: Structure-activity relationships of mu-conotoxin GIIIA: structure determination of active and inactive sodium channel blocker peptides by NMR and simulated annealing calculations. In: Biochemistry 31 (1992), Dec, Nr. 50, S. 12577–12584
- [141] WANG, J. Z. ; ROJAS, C. V. ; ZHOU, J. H. ; SCHWARTZ, L. S. ; NICHOLAS, H. ; HOFFMAN, E. P.: Sequence and genomic structure of the human adult skeletal muscle sodium channel alpha subunit gene on 17q. In: Biochem Biophys Res Commun 182 (1992), Jan, Nr. 2, S. 794–801
- [142] WU, J. ; YAN, Z. ; LI, Z. ; YAN, C. ; LU, S. ; DONG, M. ; YAN, N.: Structure of the voltage-gated calcium channel Cav1.1 complex. In: Science (New York, N.Y.) 350 (2015), Dec, S. aad2395
- [143] XIONG, W. ; FARUKHI, Y. Z. ; TIAN, Y. ; DISILVESTRE, D. ; LI, R. A. ; TOMASELLI, G. F.: A conserved ring of charge in mammalian Na⁺ channels: a molecular regulator of the outer pore conformation during slow inactivation. In: J Physiol 576 (2006), Nov, Nr. Pt 3, S. 739–754

- [144] XUE, T. ; ENNIS, I. L. ; SATO, K. ; FRENCH, R. J. ; LI, R. A.: Novel interactions identified between micro-Conotoxin and the Na⁺ channel domain I P-loop: implications for toxin-pore binding geometry. In: Biophys J 85 (2003), Oct, Nr. 4, S. 2299–2310
- [145] YAMAGISHI, T. ; LI, R. A. ; HSU, K. ; MARBÁN, E. ; TOMASELLI, G. F.: Molecular architecture of the voltage-dependent Na channel: functional evidence for alpha helices in the pore. In: J Gen Physiol 118 (2001), Aug, Nr. 2, S. 171–182
- [146] YAN, W. ; SAMAHA, F. F. ; RAMKUMAR, M. ; KLEYMAN, T. R. ; RUBENSTEIN, R. C.: Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator differentially regulates human and mouse epithelial sodium channels in *Xenopus* oocytes. In: J Biol Chem 279 (2004), May, Nr. 22, S. 23183–23192
- [147] YANAGAWA, Y. ; ABE, T. ; SATAKE, M.: Mu-conotoxins share a common binding site with tetrodotoxin/saxitoxin on eel electroplax Na channels. In: J Neurosci 7 (1987), May, Nr. 5, S. 1498–1502
- [148] YANG, N. ; HORN, R.: Evidence for voltage-dependent S4 movement in sodium channels. In: Neuron 15 (1995), Jul, Nr. 1, S. 213–218
- [149] YOSHIBA, S.: An estimation of the most dangerous species of cone shell, *Conus* (*Gastrium*) *geographus* Linne, 1758, venom's lethal dose in humans. In: Nippon Eiseigaku Zasshi 39 (1984), Jun, Nr. 2, S. 565–572
- [150] YU, F. H. ; YAROV-YAROVY, V. ; GUTMAN, G. A. ; CATTERALL, W. A.: Overview of molecular relationships in the voltage-gated ion channel superfamily. In: Pharmacol Rev 57 (2005), Dec, Nr. 4, S. 387–395
- [151] ZIMMER, T. ; BOLLENSDORFF, C. ; HAUFE, V. ; BIRCH-HIRSCHFELD, E. ; BENNDORF, K.: Mouse heart Na⁺ channels: primary structure and function of two isoforms and alternatively spliced variants. In: Am J Physiol Heart Circ Physiol 282 (2002), Mar, Nr. 3, S. H1007–H1017

Anhang A.

A.1. Abkürzungsverzeichnis

Fachspezifische Abkürzungen:

DEKA-Motiv	Teil des Selektivitätsfilters einiger Natriumkanal-Isoformen
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige DNA
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEDD-Motiv	Teil des äußeren Carboxylattrings einiger Natriumkanal-Isoformen
EGTA	Ethylenglykol-bis(β -Aminoethylester)-N, N, N', N',-Tetraessigsäure
FCS	Fötale Kälberserum
hNa _v 1.5	humaner spannungsabhängiger Natriumkanal des Herzmuskels
HEK-293-Zellen	Zelllinie aus der humanen embryonalen Niere, s. Kapitel 2.2.1.2
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethan-Sulfonsäure
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration eines Wirkstoffs
IFMT-Motiv	vermittelt die Inaktivierung spannungsabhängiger Natriumkanäle
K _v 1.1	spannungsabhängiger Kaliumkanal (ZNS)
K _v 1.6	spannungsabhängiger Kaliumkanal (ZNS)
mNa _v 1.4	muriner spannungsabhängiger Natriumkanal (Skelettmuskel Maus)
mNa _v 1.5	muriner spannungsabhängiger Natriumkanal (Herzmuskel Maus)
mRNA	engl. für messenger RNA, zu deutsch: Boten-RNA
μ -GIIIA	Conotoxin der M-Superfamilie, Zielstruktur: vor allem Na _v 1.4
μ -GIIIB	Conotoxin der M-Superfamilie, Zielstruktur: vor allem Na _v 1.4
μ -PIIIA	weniger selektives Conotoxin der M-Superfamilie
NFR	Normal Frog Ringer
NMR-Spektroskopie	Kernspinresonanzspektroskopie
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung

Patch-Clamp-Technik	elektrophysiologische Messmethode, s. Kapitel 2.2.3.2
pDNA	plasmidische Desoxyribonukleinsäure
rNa _v 1.4	muriner spannungsabhängiger Natriumkanal (Skelettmuskel Ratte)
RNA	Ribonukleinsäure
RTV	Raumtemperatur vulkanisierender Kleber
SCN-Familie	Genfamilie spannungsabhängiger Natriumkanäle, s. Kap. 1.1.3.5
SDS	Natriumlaurylsulfat
STX	Saxitoxin, ein Nervengift, s. Kapitel 1.2.1
SOC	Nährmedium mit Glukose
TAE	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-Puffer + EDTA + Acetat
TE	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-Puffer + EDTA
TEVC-Technik	elektrophysiologische Messmethode, s. Kapitel 2.2.3.1
TTX	Tetrodotoxin, ein Nervengift, s. Kapitel 1.2.1

Maßeinheiten:

A	Ampere
cm	Zentimeter (1 m = 100 cm)
GΩ	Gigaohm (1 Ω = 1 x 10 ⁻⁹ GΩ)
g	Gramm (Maßeinheit einer Masse/ Gewichts)
Hz	Hertz (Maßeinheit einer Frequenz)
kHz	Kilohertz (1 Hz = 0,001 kHz)
l	Liter (Maßeinheit eines Volumens)
M	Molar (Maßeinheit einer Stoffmengenkonzentration)
MΩ	Megaohm (1 Ω = 1 x 10 ⁻⁶ MΩ)
m	Meter (Maßeinheit einer Entfernung)
mg	Milligramm (1 g = 1 000 mg)
ml	Milliliter (1 l = 1 000 ml)
mm	Millimeter (1 m = 1 000 mm)
mmol	Millimol (1 mol = 1 000 mmol)
mol	Mol (Maßeinheit einer Stoffmenge)
ms	Millisekunde (1 s = 1 000 ms)
mV	Millivolt (1 V = 1 000 mV)
μA	Mikroampere (1 A = 1 000 000 μA)
μg	Mikrogramm (1 g = 1 000 000 μg)
μl	Mikroliter (1 l = 1 000 000 μl)
μM	Mikromolar (1 M = 1 000 000 μM)
n	Anzahl

nA	Nanoampere (1 A = 1 000 000 000 nA)
nM	Nanomolar (1 M = 1 000 000 000 nM)
nm	Nanometer (1 m = 1 000 000 000 nm)
nmol	Nanomol (1 mol = 1 000 000 000 nmol)
Ω	Ohm (Maßeinheit des elektrischen Widerstandes)
s	Sekunde (Maßeinheit der Zeit)
V	Volt (Maßeinheit der elektrischen Spannung)

Sprachliche Abkürzungen:

Abb.	Abbildung
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
d.h.	das heißt
engl.	englisch
inkl.	inklusive
s.	siehe
syn.	synonym
u.a.	unter anderem
vgl.	vergleiche
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel

A.2. Danksagung

Mein Dank gilt an erster Stelle meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Heinrich Terlau, für die Bereitstellung des Themas sowie für die umfassende Betreuung und Unterstützung meiner Arbeit.

Außerdem möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Peter Dominiak für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und das Überlassen des Materials bedanken.

Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Universität zu Lübeck bin ich dankbar für die konstruktive und angenehme Zusammenarbeit; insbesondere danke ich Herrn Dr. Walter Häuser und Herrn Prof. Dr. Olaf Jöhren für die Einarbeitung in verschiedene experimentelle Methoden und die Betreuung meiner Laborversuche, Herrn Dr. Jan Wenzel für die Bereitstellung des Computerprogramms Igor pro 5.0.

Auch Herrn Florian Henke sowie Herrn Kris Erik Schwerdt möchte ich für ihre Einführung in die Textverarbeitung mittels LaTeX und die vielfältige Hilfe bei der Verwendung der Software danken.

Herrn Prof. Dr. Thomas Zimmer vom Institut für Physiologie des Universitätsklinikums Jena danke ich für die Bereitstellung von Natriumkanal-kodierenden DNA- und RNA-Proben, Herrn Baldomero M. Olivera, PhD von der University of Utah für die Bereitstellung des Conotoxins.

Schließlich danke ich meiner Kollegin und Freundin Dr. med. Bente Heinig und meinem Lebensgefährten Dr. med. Lars Esmann für ihren freundschaftlichen Rat, ihre fachliche Unterstützung und ihre unermüdlichen Appelle, die Arbeit zu vervollständigen.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern und meiner Schwester, die mich jederzeit in jeder Hinsicht unterstützt haben.