

**Modulation von Aktivität und Selektivität
heterolog exprimierter spannungsabhängiger
Natriumkanäle durch extrazelluläre Natrium- und
Kalziumionen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Angelika Lampert
geboren am 10. Oktober 1975 in Nürnberg

Gutachter

1. Professor Dr. Stefan H. Heinemann

2. Professor Dr. Klaus Benndorf

3. PD Dr. Heinrich Terlau

Tag der öffentlichen Verteidigung: 07. Januar 2003

Abkürzungsverzeichnis

$[Ca^{2+}]_a$	extrazelluläre Kalziumionenkonzentration
$[Ca^{2+}]_i$	intrazelluläre Kalziumionenkonzentration
$[Ca^{2+}]_i$ transient	kurzer intrazellulärer Kalziumkonzentrationsanstieg
$[Na^+]$	Natriumionenkonzentration
$[Na^+]_a$	extrazelluläre Natriumionenkonzentration
$[Na^+]_i$	intrazelluläre Natriumionenkonzentration
8brcAMP	8-bromo-zyklisches Adenosin-Tri-Phosphat, membranpermeables zyklisches ATP
AC	Adenylatzyklase
Aktivierung	Öffnen des Kanals
ATP	Adenosin-Tri-Phosphat, zellulärer Energieträger
Ausplattieren	Zellen aus einer Kulturflasche ablösen und auf kleine Messschalen verteilen
Ca^{2+}	Kalziumionen
Ca-Kanal	spannungsgesteuerter Kalziumionenkanal, α -Untereinheit
DIII/DIV-Schleife	Verbindungsstück zwischen der Domäne III und IV der Natriumkanal α -Untereinheit
DIV	Domäne IV der Kanal- α -Untereinheit
DNS	Desoxyribonukleinsäure, Grundbaustein der Genoms im Zellkern
GHK-Gleichung	Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung
G-Protein	globuläres, GTP-bindendes Protein, welches zelluläre Regulation vermittelt
GTP	Guanidin-Tri-Phosphat, zellulärer Energieträger der G-Proteine stimuliert
GTP γ S	nicht-hydrolysierbare Variante des GTP

HEK293-Zellen	Zelllinie, die aus einem embryonalen Nierentumor entstand, <i>human embryonal kidney cells</i>
hNav1.5	menschlicher Na-Kanal I des Herzens
i	Einzelkanalleitwert
IFM-Motiv	Abfolge der Aminosäuren Isoleucin, Phenylalanin und Methionin im Verbindungsstück zwischen der Domäne III und IV des Na-Kanals, die für die schnelle Inaktivierung verantwortlich ist.
Inaktivierung	Schließen der Kanalpore bei depolarisierter Membran
ISO	Isoproterenol, aktiviert die Adenylatzyklase
Kaveolen	60-100 nm große Membraneinschnürungen nahe der Zellmembran, t.w. über enge Hälse mit ihr verbunden. Sie haben eine wesentliche Rolle in der Signaltransduktion
K _d	halbmaximale Konzentration, auch Mentenkonstante genannt. Konzentration, bei welcher der y-Wert (hier die Amplitude) die Hälfte des maximal möglichen Wertes annimmt
K-Kanal	spannungsgesteuerter Kaliumionenkanal bestehend aus vier gleichen α -Untereinheiten
mRNS	messengerRNS, translatierte DNS, zur Proteinherstellung in der Zelle benötigt
n	Anzahl der Experiment bzw. bei den Rauschanalysen Anzahl der funktionsfähigen Kanäle pro Zelle
Na ⁺	Natriumionen
Na-Kanal	spannungsgesteuerter Natriumionenkanal, α Untereinheit
PKA	Proteinkinase A
p _o	maximale Offenwahrscheinlichkeit in %
PTX	Pertussistoxin, Keuchhustengift, G _i -Protein Blocker
rNav1.2	Na-Kanal II des Gehirns der Ratte
rNav1.4	Na-Kanal I des Skelettmuskels der Ratte

RNS	Ribonukleinsäure
S4	viertes Transmembransegment einer Domäne der α -Untereinheit des Natriumkanals, fungiert als Spannungssensor
SEM	standard error of mean, mittlerer Fehler des Mittelwertes
Slip-Mode-Permeation	von Santana <i>et al.</i> 1998 vorgeschlagener Zustand des Na-Kanals, in dem auch Kalziumionen in wesentlichem Ausmaß permeieren können.
TTX	Tetrodotoxin, selektiver Na-Kanalblocker

Inhaltsübersicht

1	Einleitung	1
1.1	Familie der spannungsabhängigen Na-Kanäle.....	2
1.2	Primärstruktur der Na-Kanäle.....	4
1.2.1	Kanalproteinkomplex	4
1.2.2	α -Untereinheiten.....	5
1.2.3	Pore und Permeation	6
1.2.4	Spannungssensoren	7
1.2.5	Inaktivierung	8
1.2.6	Neurotoxine.....	9
1.3	Regulation der Na-Kanäle	10
1.3.1	β -Untereinheiten.....	10
1.3.2	Sympathische Stimulation und G-proteinvermittelte Kanalregulation	10
1.3.2.1	Effekte von Phosphorylierungen auf die Selektivität.....	13
1.3.3	Mechanische Stimulation	14
1.3.4	Veränderung der Schalt- und Permeationseigenschaften durch Kationen	15
1.4	Aufgabenstellung.....	17
1.4.1	Regulation der Selektivität durch sympathische Stimulation (Slip-Mode-Permeation).....	17
1.4.2	Quantitative Beschreibung der Stromänderung durch mechanischen Stress	17
1.4.3	Beeinflussung der Stromamplitude durch extrazelluläre Ionen	17
2	Material und Methoden	19
2.1	Molekularbiologie	19
2.1.1	DNS und RNS der Na-Kanäle.....	19
2.1.2	Verwendete Zelllinien und Kultur	19
2.1.3	Transfektionsmethoden	20
2.1.4	Oozytenpräparation und -injektion	20
2.1.5	Zelllysate, Proteingele und Westernblots.....	21
2.1.6	Aufreinigung von Kaveolen und Immunopräzipitation	22
2.2	Elektrophysiologische Messmethoden.....	23
2.2.1	Ganzzell-Patch-Clamp-Messungen.....	23
2.2.1.1	Geräte, Materialien und Software	23

2.2.1.2	Perfusionssystem.....	25
2.2.1.3	Lösungen.....	26
2.2.2	Zwei-Elektroden-Spannungsklemme.....	28
2.2.2.1	Geräte, Materialien und Software.....	28
2.2.2.2	Lösungen.....	28
2.2.3	Selektivitätsbestimmung mit Hilfe des Umkehrpotentials.....	29
2.2.4	Bestimmung der Inaktivierungszeitkonstante.....	31
2.2.5	Michaelis-Menten-Beziehungen.....	31
2.2.6	Nichtstationäre Rauschanalyse.....	32
2.3	Elektronenmikroskopie.....	33
2.3.1	Gefrierbruchtechnik.....	33
2.3.2	Ultradünnschnitt-Elektronenmikroskopie von in Epoxydharz eingebetteten Herzmuskelbiopsien.....	34
2.3.3	Immunzytologische Elektronenmikroskopie.....	34
3	Ergebnisse.....	36
3.1	Slip-Mode-Permeation durch hNa_v1.5.....	36
3.2	Auswirkung von mechanischer Stimulation auf die Stromamplitude durch rNa_v1.4.....	40
3.2.1	Quantitative Beschreibung der Stromamplitudenabnahme.....	40
3.2.2	Kaveolen.....	45
3.2.2.1	Elektronenmikroskopischer Kaveolennachweis.....	46
3.2.2.2	Kanaldetektion in aufgereinigten Kaveolen.....	46
3.2.2.3	Immunzytologischer Na-Kanalnachweis in Kaveolen.....	49
3.3	Einfluss von extrazellulären divalenten Kationen auf den Auswärtsstrom durch Na-Kanäle.....	51
3.3.1	Einfluss von [Ca ²⁺] _a und [Mg ²⁺] _a auf den Na ⁺ -Auswärtsstrom durch hNa _v 1.5.....	52
3.3.1.1	Regulation des hNa _v 1.5-Auswärtsstroms durch [Ca ²⁺] _a	53
3.3.1.2	Vergleich der Regulation des hNa _v 1.5-Auswärtsstroms durch [Ca ²⁺] _a und [Mg ²⁺] _a	57
3.3.1.3	Nichtstationäre Rauschanalysen von hNa _v 1.5.....	60
3.3.2	Regulation des rNa _v 1.4-Auswärtsstroms durch [Ca ²⁺] _a und [Mg ²⁺] _a	64
3.3.3	Regulation des rNa _v 1.2-Auswärtsstroms durch [Ca ²⁺] _a	66
3.3.4	Schaltvorgänge.....	67
3.3.5	Einfluss der Porenstruktur auf die Amplitudenmodulation durch [Ca ²⁺] _a	68

3.3.6	Nichtinaktivierende Stromkomponente	70
3.3.6.1	Abhängigkeit von $[Ca^{2+}]_a$	71
3.3.6.2	Zeitabhängigkeit.....	72
3.3.6.3	Wirkung von TTX.....	73
4	Diskussion.....	75
4.1	Slip-Mode-Permeation	75
4.2	Amplitudenreduktion nach mechanischer Stimulation von rNav1.4	79
4.3	Regulation der Auswärtsstromamplitude durch hNav1.5, rNav1.4 und rNav1.2 durch extrazelluläre divalente Kationen.....	85
4.3.1	Nichtinaktivierende Stromkomponente	91
5	Schlussfolgerungen	93
6	Literatur	94
7	Anhang.....	105

Zusammenfassung

- Spannungsgesteuerte Natriumkanäle werden durch Membrandepolarisation geöffnet und leiten dann selektiv Na^+ . Diese strukturell gut untersuchte Selektivität ist vor allem gegenüber divalenten Kationen stark ausgeprägt.
- Ausgehend von Untersuchungen von Santana *et al.*, die eine sympathisch induzierte Kalziumionenpermeation durch spannungsgesteuerte Natriumkanäle in Rattenherzmuskelzellen beschrieben haben, wurde anhand heterolog exprimierter humaner Herznatriumkanäle I ($\text{hNa}_v1.5$) in HEK293-Zellen diese sogenannte Slip-Mode-Permeation mit der Ganzzell-Patch-Clamp-Methode untersucht.
- Durch Umkehrpotentialmessungen wurde die Selektivität des Natriumkanals vor und nach Aktivierung der Adenylatzyklase durch Forskolin bestimmt, sowie ohne und mit Koexpression der β Untereinheit. Mit $[\text{Na}^+]_a = [\text{Na}^+]_i$ und $[\text{Ca}^{2+}]_i = 0$ mM ergab sich bei 2 mM $[\text{Ca}^{2+}]_a$ keine signifikante Steigerung des Umkehrpotentials. Die theoretische maximale Permeabilität innerhalb des errechneten Fehlers stieg auf $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}} = 0,08$ bzw. 0,03 (ohne und mit Koexpression der β Untereinheit) nach Forskolinexposition.
- Mit den hier angewendeten Methoden konnte keine Slip-Mode-Permeation durch $\text{hNa}_v1.5$ nachgewiesen werden.
- Mechanische Reizung der Zellen während obiger Experimente führte zu einer Reduktion der Einwärtsstromamplitude durch $\text{hNa}_v1.5$ und durch den Skelettmuskelnatriumkanal I der Ratte ($\text{hNa}_v1.4$). 79 Messungen an mit $\text{rNa}_v1.4$ stabil transfizierten HEK293-Zellen zeigten im Median eine relative Abnahme der Amplitude um 0,11, welche fünf Tage nach dem Ausplattieren der Zellen am stärksten ausgeprägt war. Kleine Stromamplituden wurden stärker beeinflusst als große.
- Die mechanisch induzierte Stromreduktion konnte weder durch $\text{GTP}\gamma\text{S}$ (führt zu Dauerstimulation von G-Proteinen) noch durch Pertussistoxin (inhibiert G_i -Proteine) verhindert bzw. verstärkt werden.
- Sowohl in HEK293-Zellen als auch in Herzmuskelzellen konnten mit elektronenmikroskopischen Aufnahmen in Gefrierbruch- bzw. Ultradünnschnitttechnik Kaveolen nachgewiesen werden (in Übereinstimmung mit Masson-Pevet *et al.* 1980). Wären Natriumkanäle in Kaveolen lokalisiert, könnte mechanisch induzierte Internalisierung dieser Membraneinstülpungen zur beobachteten Stromreduktion führen.

- Es ergaben sich aus folgenden Experimenten Hinweise für eine Kolo-kalisation des Natriumkanals mit Kaveolen:
 - a.) Zur Isolation von Kaveolen wurden Immunopräzipitate von Lysaten von mit hNav1.5 bzw. rNav1.4 transfizierten HEK293-Zellen und Herzmuskelstücken mit dem Antikörper gegen Kaveolin-1 (Markerproteine der Kaveolen) hergestellt. Diese wurden dann in einem Westernblot mit einem Antikörper gegen Natriumkanäle detektiert.
 - b.) Mit einer Immunogoldmarkierung eines in Gefrierbruchtechnik erstellten Präparates wurden Gruppierungen mehrerer Goldkörnchen, welche der Bindung eines Antikörpers gegen den Natriumkanal entsprechen, in Kaveolen nachgewiesen.
- Eine spannungsabhängige Blockierung und Verschiebung der Aktivierung der Na-Kanäle durch $[Ca^{2+}]_a$ ist bekannt. Erhöhte extrazelluläre Kalziumionen-konzentrationen führten in den in dieser Arbeit beschriebenen Experimenten zu einer Steigerung des Auswärtsstroms durch hNav1.5. Die Kanal-Ion-Interaktion lässt sich mit einer modifizierten Michaelis-Menten-Gleichung beschreiben.
- Einen ähnlichen Effekt hatten extrazelluläre Magnesiumionen-konzentrationen auf die Auswärtsstromamplitude durch hNav1.5, allerdings mussten 5fach höhere Konzentrationen eingesetzt werden. Auch diese Messwerte ließen sich mit der modifizierten Michaelis-Menten-Gleichung abschätzen.
- Nichtstationäre Rauschanalysen von hNav1.5 zeigten, dass bei Erhöhung der $[Ca^{2+}]_a$ von 2 mM auf 20 mM die Offenwahrscheinlichkeit von 26% auf 60% stieg. Dabei sank die Einzelkanalamplitude von 406 fA (2 mM $[Ca^{2+}]_a$) auf 280 fA (20 mM $[Ca^{2+}]_a$), n=5.
- Untersuchungen an mit rNav1.4 transfizierten HEK293-Zellen zeigten, dass dieser Kanal weniger stark durch $[Ca^{2+}]_a$ reguliert ist wie hNav1.5. Vor allem bei hohen $[Ca^{2+}]_a$ zeigte sich kaum ein Anstieg des Auswärtsstroms. $[Mg^{2+}]_a$ hingegen hatte, bei hoher Streubreite der Messdaten, regulierenden Einfluss auf rNav1.4.
- Der Rattengehirnnatriumkanal II (rNav1.2) verhielt sich in Untersuchungen des Auswärtsstroms mit variierender $[Ca^{2+}]_a$ ähnlich wie rNav1.4. Die Amplitude wurde bei hohen Potentialen sogar tendenziell kleiner.
- Die Kalziumionen scheinen nicht über die Porenregion der Domäne I mit dem Kanalprotein zu interagieren. Die Mutante F385C•N388R von rNav1.2 (rNav1.2_F385C•N388R) hat in der Porenregion der Domäne I die selbe Aminosäure-abfolge wie hNav1.5. Im Oozytenexpressionssystem zeigte sie die selbe Beeinflussbarkeit des Auswärtsstroms durch $[Ca^{2+}]_a$ wie rNav1.2. Beide waren deutlich schwächer durch $[Ca^{2+}]_a$ regulierbar als hNav1.5.

1 Einleitung

Spannungsgesteuerte Natriumkanäle (Na-Kanäle) sind sehr große Membranglykoproteine (~260 kDa). Als dynamische Moleküle reagieren sie, ähnlich wie spannungsabhängige Kaliumkanäle (K-Kanäle) und Kalziumkanäle (Ca-Kanäle), auf Änderungen des Membranpotentials mit Konformationsänderungen, welche zur Öffnung ihrer Kanalpore führen, und so eine Verbindung zwischen Zelläußerem und –innerem schaffen, über die Na^+ -Ionen in die Zelle einströmen können (Catterall 1992; Catterall 2000). Sie werden als Produkte von Multigenfamilien ubiquitär in den Membranen erregbarer Zellen exprimiert, und sind vor allem für die Erregungsweiterleitung und –ausbreitung verantwortlich.

Hodgkin und Huxley konnten durch ihre grundlegenden Experimente am Tintenfischaxon mit der Technik der Spannungsklemme als erste die Entstehung von Aktionspotentialen an erregbaren Membranen plausibel erklären (Hodgkin und Huxley 1952). Sie beschrieben eine Änderung der Permeabilität für Natrium- und Kaliumionen innerhalb von Millisekunden als Reaktion auf die Depolarisation der Zellmembran. Für diese schnelle Veränderung der Membraneigenschaften waren, wie spätere Studien zeigten, Na- und K-Kanäle verantwortlich.

Bei einem Ruhemembranpotential von beispielsweise -80 mV bleiben die Na-Kanäle geschlossen. Wird die Membran über die Erregungsschwelle von ca. -30 mV depolarisiert, ändern sie sehr schnell ihre Konformation und öffnen die Pore. Innerhalb von wenigen Millisekunden inaktivieren die Na-Kanäle, d. h. sie lassen trotz depolarisierter Membran keinen Ionenfluss durch ihre Poren mehr zu. Dies wird durch spannungsabhängige Konformationsänderungen, sogenannte Schaltvorgänge, erreicht. Diese Schaltvorgänge können in mehrere Phasen unterteilt werden: die Phase der Aktivierung (Öffnen des Kanals), der Inaktivierung (Schließen der Pore bei depolarisierter Membran) und der Erholung von der Inaktivierung, die dazu führt, dass sich der Kanal wieder öffnen lässt (Deaktivierung). Abbildung 1-1 zeigt einen typischen Verlauf des Na^+ -Stroms durch den Na-Kanal I des menschlichen Herzens ($\text{hNa}_v1.5$). Ab einer Depolarisation der Zellmembran von -50 mV öffnet der Kanal; er leitet selektiv Na^+ -Strom und inaktiviert innerhalb weniger Millisekunden.

Die spannungsabhängige Aktivierung und Inaktivierung können mit dem Modell nach Hodgkin und Huxley (HH Modell, Hille 1992) mit drei unabhängigen Aktivierungs- und einem Inaktivierungsschalter grob beschrieben werden. Es ergeben sich so mehrere Kanalzustände, die in dem Schaltschema in Abbildung 1-1 D zusammengefasst sind. Die Öffnung der Kanäle erfolgt über mehrere Aktivierungszustände, in denen die Kanäle noch geschlossen sind. Von jedem dieser Zustände aus können sie inaktivieren. Das HH Modell ist eine einfache und nützliche

Beschreibung der Kinetik des Na-Kanals, die sich auf viele Experimentaldaten anwenden lässt. Spätere Untersuchungen zeigten, dass Aktivierung und Inaktivierung gekoppelt sind (Aldrich et al. 1983). Es gibt mehrere Typen der Inaktivierung, die schnell bzw. langsam ablaufen können (Chandler und Meves 1970; Furue et al. 1998).

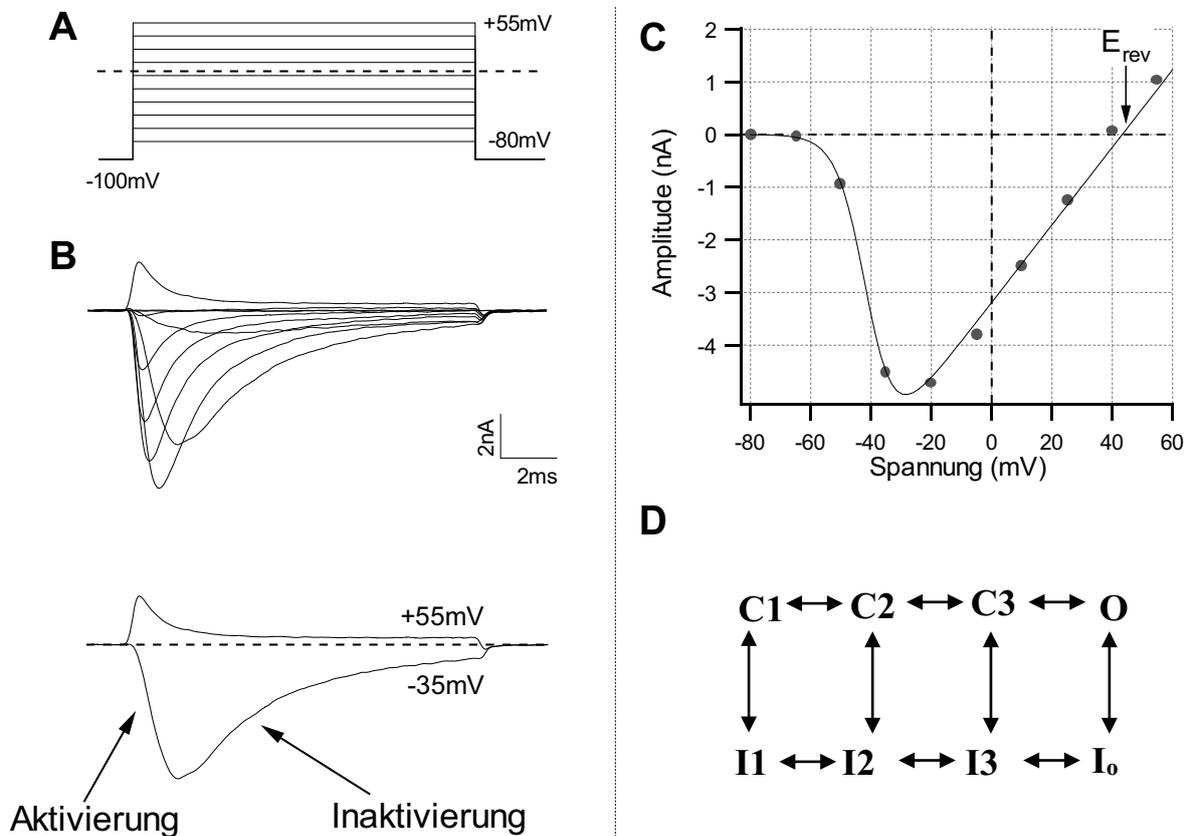


Abbildung 1-1. Normaler Stromkurvenverlauf des Na-Kanals I des menschlichen Herzens ($hNa_v1.5$) bei physiologischen Lösungen. **A**: Spannungsprotokoll. **B**: Stromantwort; $hNa_v1.5$ exprimiert in HEK293-Zellen in Ganzzell-Patch-Clamp-Konfiguration. **C**: Strom-Spannungskennkurve (Punkte) mit Näherungskurve nach Goldman-Hodgkin-Katz (Linie, vergleiche 2.2.1.1, S.25). **D**: Schaltschema des Na-Kanals mit drei verschiedenen Zuständen: geschlossen (C1-C3), offen (O) und offen oder geschlossen inaktiviert (I0, I1-I3).

1.1 Familie der spannungsabhängigen Na-Kanäle

Bisher konnten zehn Gene für α -Untereinheiten von Na-Kanälen im menschlichen Genom sowie in dem der Maus identifiziert werden. Die α -Untereinheit alleine bildet funktionsfähige Kanäle (260 kDa). Das erste Gen eines Na-Kanals des *Electrophorus electricus* wurde von Noda et al. 1984 kloniert.

Gen	Typ	Bezeichnungen	Expressionsort	Chromosom	Krankheiten
α-Untereinheiten					
SCN1A	Na _v 1.1	rBI, HBSCI, GPBI, SCN1A	ZNS, PNS	2q24	
SCN2A	Na _v 1.2	rBII, HBSCII, HBA, rNa_v1.2	ZNS	2q23-24	
SCN3A	Na _v 1.3	rBIII	ZNS	2q24	
SCN4A	Na _v 1.4	μ 1, SkM1, rNa_v1.4	Skelettmuskel	17q23-24	HYPP, PMC
SCN5A	Na _v 1.5	hH1, H1, SkM2, hNa_v1.5	Herzmuskel, uninnervierter Skelettmuskel	3p21	LQT3
SCN8A	Na _v 1.6	PN4, NaCh6, CerIII, Scn8a	ZNS, PNS	12p13	MED
SCN9A	Na _v 1.7	PN1, NaS, hNE-Na	PNS; Schwannzellen	2q24	
SCN10A	Na _v 1.8	PN3, SNS, NaNG	DRG	3p22-24	
SCN11A	Na _v 1.9	PN5, SNS2, NaN, NaT, SCN12A	PNS	3p21-24	
SCN7A, SCN6A	Na _x	Na _v 2.1, Na _v 2.3, NaG, SCL11	Herzmuskel, Uterus, Skelettmuskel, Astrozyten, DRG	2q21-23	
β-Untereinheiten					
SCN1B		β 1, Na β 1.1, splice-Variante Na β 1.1A	ZNS, PNS, Muskel	19q13	GEFS+
SCN2B		β 2, Na β 2.1	ZNS	11q22	
SCN3B		β 3	Hippokampus, Striatum		

Tabelle 1-1: Gene des Na-Kanals der Säugetiere (Plummer und Meisler 1999; Goldin et al. 2000; Shah et al. 2001). Es ist die Lokalisation im humanen Genom angegeben. ZNS: zentrales Nervensystem. PNS: peripheres Nervensystem. DRG: dorsal root ganglion. HYPP: Hyperkaliämische paroxysmale Paralyse. PMC: Paramyotonia congenita. LQT3: LongQT-Syndrom 3. MED: Motor-endplate disease. GEFS+: Generalisierte Epilepsie mit febrilen Konvulsionen. Literatur für in dieser Arbeit verwendete Untereinheiten: α : rNa_v1.2 der Ratte: Noda et al. 1986. hNa_v1.5 des Menschen: Gellens et al. 1992. rNa_v1.4 der Ratte: Trimmer et al. 1989. β 1: Isom et al. 1992; McClatchey et al. 1993.

Seither konnten mehrere α - und β -Untereinheiten von Na-Kanälen des Gehirns, des Skelettmuskels sowie des Herzens gefunden werden (siehe Tabelle 1-1). In Herzzellen der Maus, sowie in einer embryonalen Stammzelllinie des Hippokampus der Ratte konnten mehrere splice-Varianten des $\text{Na}_v1.5$ isoliert werden (Korsgaard et al. 2001; Zimmer et al. 2002).

In dieser Arbeit wurden drei verschiedene Na-Kanäle untersucht: der menschliche Herzkanal I ($\text{hNa}_v1.5$), der Skelettmuskelkanal I der Ratte ($\text{rNa}_v1.4$) und der Rattengehirnkanal II ($\text{rNa}_v1.2$).

1.2 Primärstruktur der Na-Kanäle

Die Kombination von molekularbiologischen Methoden (Proteinklonierungen und gezielte Mutationen einzelner Aminosäuren oder ganzer Kanalabschnitte) mit verbesserter elektrophysiologischer Technik (Hamill et al. 1981) erbrachten detaillierte Kenntnisse über die molekulare Struktur, Funktion und Regulation des Na-Kanals.

1.2.1 Kanalproteinkomplex

Na-Kanäle setzen sich aus einer α - und einer bzw. mehrerer β -Untereinheiten zusammen, von denen jeweils zahlreiche Isoformen bekannt sind. In dieser Arbeit sind mit „Na-Kanälen“ stets die bereits alleine funktionsfähigen α -Untereinheiten gemeint.

Na-Kanäle sind mit 36 bzw. 33 kDa schweren β -Untereinheiten assoziiert Shah et al. 2001, die regulatorisch auf die Kanalfunktion einwirken. Die $\beta 1$ -Untereinheit ist über ionische, nicht-kovalente Wechselwirkungen mit der α -Untereinheit assoziiert, während die $\beta 2$ -Untereinheit durch Disulfidbrücken gebunden ist Marban et al. 1998. Die Na-Kanäle des Skelettmuskels bestehen nur aus α - und $\beta 1$ -Untereinheiten (Barchi et al. 1984), während die des Gehirns mit einer $\beta 1$ -, $\beta 2$ - und $\beta 3$ -Untereinheit assoziiert sein können (Isom et al. 1992; Isom et al. 1995; Whitaker et al. 1999; Morgan et al. 2000).

Im Herzen haben Untersuchungen zur Expression und Funktion der β -Untereinheiten zu keinem eindeutigen Ergebnis geführt (Balsler 1999). In frühen Arbeiten konnte die $\beta 1$ -Untereinheit mit spezifischen Antikörpern im Rattenherz identifiziert werden (Sutkowski und Catterall 1990). Allerdings immunopräzipitierte die α -Untereinheit des Herz-Na-Kanals mit keinem weiteren Protein, schien also mit keiner weiteren Untereinheit verbunden zu sein (Cohen und Levitt 1993). Durch in situ Hybridisierung wurde von Isom et al. 1992 und Makita et al. 1994 die $\beta 1$ -Untereinheit-mRNS im Herzen identifiziert. McClatchey et al. 1993 gelang es, die cDNS der $\beta 1$ -Untereinheit aus Rattenherzmuskeln zu klonieren. Letztgenanntes weist darauf hin, dass die $\beta 1$ -Untereinheit des Na-Kanals im Herzen exprimiert wird.

1.2.2 α -Untereinheiten

Die α -Untereinheiten der Na-Kanäle sind große, zwischen 260 und 270 kDa schwere Proteine (Catterall 1992). Sie lassen sich in vier ähnliche Domänen (D I – IV) mit jeweils sechs transmembranalen Segmenten (S1-S6) aufteilen, welche die Struktur einer α -Helix aufweisen (Noda et al. 1984). Die vier Domänen sind homolog zu den α -Untereinheiten der K-Kanäle (Heinemann 1997). Sie sind über zytoplasmatische Aminosäurenketten miteinander verbunden (siehe Abbildung 1-2).

Sato et al. 1998 konnten durch Untersuchungen mit dem Transmissions-Elektronenmikroskop (negative-stain) zeigen, dass der solubilisierter Na-Kanal des *E. electricus* aus vier Domänen besteht, die sich um eine zentrale Pore lagern. Das Protein hatte eine Höhe von 14 nm. Das eine asymmetrische Ende, welches vermutlich nach außen zeigt, hatte einen Durchmesser von 12 nm, das andere, symmetrischere von 7-10 nm. Mit Hilfe einer Kombination aus Kryoelektronenmikroskopie und Einzelpartikelanalyse konnten Sato et al. 2001 zeigen, dass der solubilisierter, kristallisierte Na-Kanal des *E. electricus* ein glockenförmiges, 13,5 nm langes Protein ist. Am quadratischen Fuß des Kanals hatte es einen Durchmesser von 10 nm, am sphärischen Kopf von 6,5 nm. Das Protein zeigte mehrere innere Höhlen. Diese gemessene dreidimensionale Struktur stimmt gut mit den durch elektrophysiologische Untersuchungen und Mutationsexperimente gewonnenen Vorstellungen überein (für einen Kommentar zu den Ergebnissen von Sato et al. 2001 vergleiche Catterall 2001).

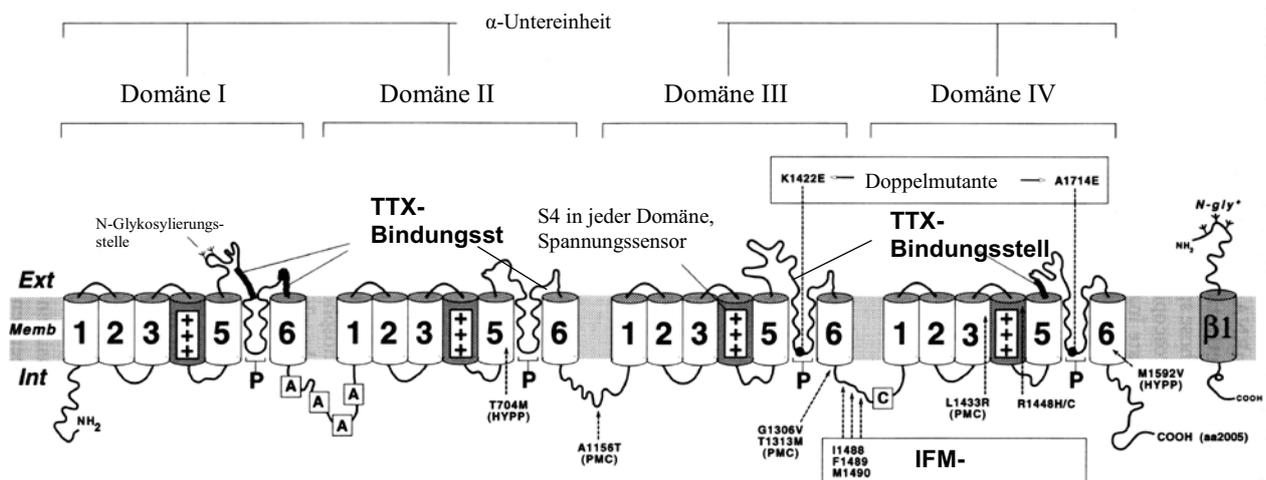


Abbildung 1-2. Schematische Darstellung eines Na-Kanalproteins mit α - und $\beta 1$ -Untereinheit. Struktur der α -Untereinheit mit Einteilung in Domänen und Transmembransegmenten. Die angezeigte Doppelmutante führt zu stark erhöhter Kalziumleitfähigkeit. Die eingezeichneten Punktmutationen können Krankheiten hervorrufen (vergleiche Tabelle 1-1). Phosphorylierungsstellen der Proteinkinase A sind mit einem A im Viereck gekennzeichnet, der Proteinkinase C mit einem C im Viereck, in Anlehnung an den Rattengehirnkanal II ($rNa_v1.2$). Details siehe Text. Mit Veränderungen übernommen aus Conley und Brammar 1999.

1.2.3 Pore und Permeation

Die Lage der Pore konnte durch die Wirkungen der Toxine Tetrodotoxin (TTX) und Saxitoxin auf den Ionenstrom durch Na-Kanäle lokalisiert werden. Diese blockieren den neuronalen Na-Kanal in nanomolarer Konzentration durch Bindung an den extrazellulären Teil des Kanals (siehe auch 1.2.6). Einzelmutationen, welche die Toxinsensitivität beeinflussen (Noda et al. 1989; Pusch et al. 1991), sowie Experimente mit Antikörpern gegen Kanalstrukturen (Thomsen und Catterall 1989), führten zu der Annahme, dass die Pore des Na-Kanals durch das Peptidverbindungsstück zwischen den Transmembransegmenten S5 und S6 aller vier Domänen gebildet wird (Terlau et al. 1991). Die Experimente bestätigten Modelle von Guy und Seetharamulu 1986, die vorschlugen, dass dieses Verbindungsstück, jetzt Porenregion genannt, in die Membran eintaucht und so Teil der ionenleitenden Struktur wird.

Es entstehen vermutlich zwei Ringe innerhalb der Pore, die von je vier Aminosäuren gebildet werden. Jede Domäne beteiligt sich pro Ring mit einer Aminosäure (siehe Abbildung 1-3 A; Terlau et al. 1991; Heinemann 1997). Der äußere Ring wird im Na-Kanal II des Gehirns der Ratte von den Aminosäuren Glutamat, Glutamat, Methionin und Asparaginat gebildet. Sie haben wesentliche Bedeutung in der Affinität zu den Toxinen TTX und STX. Der innere Ring, welcher aus den Aminosäuren Asparagin, Glutamat, Lysin und Alanin zusammengesetzt wird (in Einzelbuchstabenschreibweise DEKA), trägt ebenfalls zur Toxinsensitivität bei und hat Einfluss auf die Permeationseigenschaften des Kanals (Heinemann et al. 1992b; Favre et al. 1996). Dieser Ring ist innerhalb der Familie der Na-Kanäle hochkonserviert.

Na-Kanäle zeichnen sich durch eine starke Selektivität gegenüber Kalium- und Kalziumionen aus (vergleiche Tabelle in Abbildung 1-3 B). Durch Vergleich der Proteinsequenzen der Na-Kanäle mit den Ca-Kanälen konnten die für die Selektivität der Kanäle wichtigen Aminosäuren bestimmt werden (Heinemann et al. 1992b; Heinemann et al. 1994). Ca-Kanäle haben einen ähnlichen Aufbau wie Na-Kanäle. Der oben beschriebene innere Ring wird bei diesen Kanälen durch vier negativ geladene Glutaminsäurereste gebildet. Der Na-Kanal weist hier nur zwei negativ geladene Reste auf, Asparagin aus der Domäne I und Glutamat aus der Domäne II. Die anderen beiden Domänen steuern einen positiven Rest (Lysin aus Domäne III) und einen neutralen Rest (Alanin aus Domäne IV) bei. Wird die neutrale Aminosäure Alanin zu einem negativen Glutamat mutiert, wird die Na^+/K^+ -Selektivität des Na-Kanals stark vermindert. Austausch des einzelnen, positiven Restes Lysin gegen ein negatives Glutamat im inneren Ring, führt zur kompletten Aufhebung der Selektivität des Na-Kanals (Heinemann et al. 1992b). Es genügte schon die Neutralisierung des positiv geladenen Lysins in der Domäne III,

um die Na^+/K^+ -Selektivität aufzuheben (Schlief et al. 1993; Schlief et al. 1996). Alle diese Mutanten sind durch extrazelluläre Kalziumionen blockierbar.

Durch Austausch zweier Aminosäuren, des Lysins und Alanins des inneren Rings gegen Glutamat, war es möglich, dem Na-Kanal die Permeationseigenschaften eines Ca-Kanals zu übertragen. Diese Kanalmutante wurde durch Kalziumionen in geringer Konzentration blockiert. Bei physiologischen Konzentrationen leitete sie hauptsächlich Ca^{2+} (Heinemann et al. 1992b). So konnte der Selektivitätsfilter des Na-Kanals strukturell identifiziert werden.

Durch Experimente mit der Cystein-Scanning-Methode konnten obige Ergebnisse bestätigt und erweitert werden (Pérez-García et al. 1997). Weitere Aminosäuren in der Pore, die nicht an der Bildung der beiden beschriebenen Ringe beteiligt sind, wurden als für die Selektivität wesentlich erkannt (Tomaselli et al. 1995; Chiamvimonvat et al. 1996a; Chiamvimonvat et al. 1996b).

In der Porenregion liegen auch Aminosäuren, die für die unterschiedlichen Blockierungseigenschaften der Na-Kanäle gegenüber divalenten Ionen verantwortlich sind (siehe Kapitel 1.3.4).

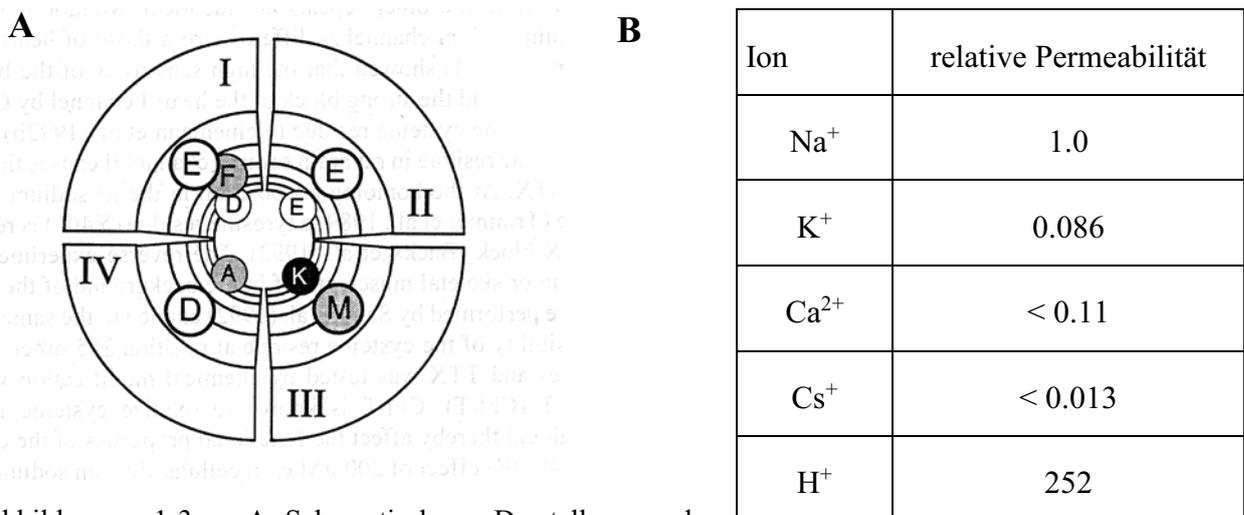


Abbildung 1-3. **A:** Schematische Darstellung des Selektivitätsfilter des Na-Kanals aus Heinemann 1997, Blick von außen in die Pore. Beschriftung der Aminosäuren in Einzelbuchstabenschreibweise. **B:** Relative Permeabilitäten für den Na-Kanal des Ranvier'schen Schnürrings des Frosches für die angegebenen Ionen unter physiologischen Bedingungen, aus Hille 1992.

1.2.4 Spannungssensoren

Der spannungsgesteuerte Na-Kanal ist mit Strukturelementen ausgestattet, die ihm erlauben, Spannungsänderungen der Membran zu erkennen und darauf mit Öffnung des Kanals (Aktivierung) zu antworten. Die S4 aller vier Domänen des Na-Kanals enthalten jeweils vier bis acht positiv geladene Aminosäurereste (Arginin oder Lysin). Diese sind typischer Weise durch zwei hydrophobe Reste voneinander getrennt. Stühmer et al. 1989 konnten als erster zeigen, dass

diese positiven Ladungen wesentliche Bedeutung als Spannungssensoren der Na-Kanäle haben. Neuere Untersuchungen zeigten, dass die S4 für die Aktivierung sowie für die Inaktivierung von Bedeutung sind, wenn auch zu einem unterschiedlichen Grade (Chen et al. 1996; Kontis et al. 1997; Cha et al. 1999). Dabei bewegen sich diese Transmembransegmente nach außen (Yang und Horn 1995; Yang et al. 1996). Diese Ladungsbewegung kann als Schaltstrom gemessen werden (Armstrong und Bezanilla 1974).

1.2.5 Inaktivierung

Es können für den Na-Kanal mindestens zwei Inaktivierungsprozesse voneinander unterschieden werden: die langsame und die schnelle Inaktivierung.

Die schnelle Inaktivierung, von Hodgkin und Huxley 1952 erstmals beschrieben, führt zur Schließung der Pore innerhalb von Millisekunden. Die Kanäle erholen sich von diesem Zustand der Inaktivierung in einer ähnlich kurzen Zeitspanne und stehen erneut zur Aktivierung zur Verfügung. Aktivierbare Kanäle sind deaktiviert. Die strukturelle Basis dieser Kanalfunktion wurde intensiv erforscht. Die schnelle Inaktivierung ließ sich durch Antikörper, die gegen die zytoplasmatische Verbindung der Domänen III und IV (DIII/DIV-Schleife) gerichtet sind, verhindern (Vassilev et al. 1988, Vassilev et al. 1989). Punktmutationen dieses Bereiches konnten bestätigen, dass die schnelle Inaktivierung durch die DIII/DIV-Schleife vermittelt wird (Stühmer et al. 1989; Moorman et al. 1990; Patton et al. 1992). West et al. 1992 zeigten, dass durch Mutation der drei Aminosäuren Isoleucin (I), Phenylalanin (F) und Methionin (M) (IFM-Motiv) zu Glutamin die schnelle Inaktivierung unterdrückt wurde; die langsame Inaktivierung blieb davon aber unberührt. Ähnliche Mutationen kommen auch natürlicher Weise vor und verursachen durch Beeinträchtigung der Na-Kanalaktivierung Krankheiten wie die hyperkaliämische paroxysmale Paralyse (Hayward et al. 1999) oder eine erbliche Form des „Long-QT Syndroms“ (Bennett et al. 1995).

Man kann sich die DIII/DIV-Schleife als Schlinge vorstellen, die sich mit dem IFM-Motiv in die Kanalöffnung hineinbewegt, und so die Pore verschließt (Ball-Ketten-Modell). Dem IFM-Motiv dienen dabei andere zytoplasmatische Aminosäuren des Kanals als Rezeptor, wie das Verbindungsstück zwischen S4 und S5 der Domäne III (Smith und Goldin 1997) bzw. der Domäne IV (Tang et al. 1998, McPhee et al. 1998, Balser 1999). Sehr viele Mutationen, die u.a. mit kongenitalen neuromuskulären Syndromen in Verbindung gebracht werden, beeinflussen die schnelle Inaktivierung. Da diese Mutationen über das gesamte Kanalprotein verteilt sind, wird die schnelle Inaktivierung vermutlich durch Interaktionen verschiedener Strukturelemente mitbestimmt (McPhee et al. 1995; Patlak 1996).

Chandler und Meves 1970 beschrieben die langsame Inaktivierung von Na-Kanälen, die über die Dauer von Sekunden stattfindet und sich in einem ähnlich langen Zeitraum wieder zurückbildet. Die hierfür verantwortlichen Kanalstrukturen kann man über natürlich vorkommende Mutationen des Skelettmuskelkanals, welche die langsame Inaktivierung beeinflussen und zu Muskelschwächen bzw. Myotonien führen, näher eingrenzen. Sie liegen in räumlicher Nähe zur Pore an der zytoplasmatischen Seite der Segmente S5 und S6 der Domänen I, II und IV (Hayward et al. 1999). Es gibt Hinweise aus Mutationsexperimenten, dass Strukturelemente für die langsame Inaktivierung in der Porenregion liegen (Vilin et al. 1999).

Aldrich et al. 1983 propagierten nach Einzelkanalmessungen von Na-Kanälen, eine Kopplung von Aktivierung und Inaktivierung. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Vandenberg und Horn 1984 und Armstrong und Bezanilla 1977. Hodgkin und Huxley gingen anfangs davon aus, dass Aktivierung und Inaktivierung von einander unabhängig waren.

Mutationsexperimente am äußeren Ende des S4 der Domäne IV konnten die Kopplung bestätigen. Fügt man ein Cystein an der Stelle eines Arginins in das S4 ein, so konnte diese Verbindung weitgehend aufgehoben werden (Chahine et al. 1994). Die Mutanten inaktivierten wesentlich seltener während der Membrandepolarisation. Behandlung mit Methanthiosulfonaten (MTS) führte zu einer irreversiblen Steigerung der Inaktivierungsrate. MTS bindet kovalent an Cysteinreste und kann so das S4 in einer auswärtsgerichteten Position befestigen, die es der Inaktivierungsschleife erleichtert, an ihrem Rezeptor zu binden (Yang und Horn 1995; Yang et al. 1996). Es wird vermutet, dass S4 während der Aktivierung in diese äuswärtsgerichtete Position gebracht wird, die für die Inaktivierung Voraussetzung sein soll.

1.2.6 Neurotoxine

Die meisten Neurotoxine zeichnen sich durch eine sehr hohe Spezifität für Na-Kanäle aus und konnten zur Identifizierung des Kanalproteins sowie bestimmter Kanalstrukturen genutzt werden (vergleiche Abbildung 1-2). Es gibt zwei wesentliche Effekte der Neurotoxine auf den Na⁺-Strom: Störung des Ionentransportes und Veränderungen der Schaltvorgänge des Kanals (Catterall 1992). Es wurden mindestens neun Gruppen von Neurotoxinen beschrieben, die an verschiedenen Stellen am Na-Kanal angreifen (Zlotkin 1999).

Das in dieser Arbeit verwendete Tetrodotoxin (TTX) ist ein wasserlösliches heterozyklisches Guanidin, welches an der Porenregion des Kanals bindet (Terlau et al. 1991). Es blockiert die Leitfähigkeit des Na-Kanals. Die Na-Kanäle lassen sich nach ihrer TTX-Empfindlichkeit unterteilen. Während rNa_v1.2 und rNa_v1.4 schon durch nanomolare Konzentrationen, ca. 20 nM, halbmaximal blockiert werden, ist für hNa_v1.5 100 mal mehr Toxin nötig, ca. 6 µM

(Frelin et al. 1986; Ukomadu et al. 1992; Gellens et al. 1992). Die Toxinsensitivität ließ sich durch eine bzw. zwei Punktmutationen von einem Kanal auf den anderen übertragen (Noda et al. 1989; Heinemann et al. 1992b; Satin et al. 1992).

1.3 Regulation der Na-Kanäle

Bei der Darstellung verschiedener Regulationsmechanismen von Na-Kanälen in diesem Kapitel werde ich mich auf die in der Arbeit verwendeten Kanäle beschränken.

1.3.1 β -Untereinheiten

Koexpression von rNav1.2 mit der β 1-, β 2- bzw. β 3-Untereinheit in Froscheiern (Oozyten des südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis*) führte zu einer beschleunigten Inaktivierung und vermehrten Expression des Kanals (Isom et al. 1994; Isom et al. 1995; Shah et al. 2001). Dieselben Ergebnisse wurden für rNav1.4 beobachtet, wenn er mit der β 1-Untereinheit in Oozyten (oben genannte Froscheier) exprimiert wurde (Makita et al. 1994; Makielski et al. 1999; Shcherbatko et al. 1999; Tabarean et al. 1999).

Für hNav1.5 ist die Datenlage für die Assoziation mit und die funktionelle Beeinflussung durch die β -Untereinheit nicht eindeutig. Viele Arbeitsgruppen konnten eine Erhöhung der Expression in Oozyten, aber keine Veränderungen in der Stromkinetik finden (Makita et al. 1994; Makielski et al. 1999). Vilin et al. 1999 hingegen beschrieben einen sehr kleinen Einfluss der Koexpression der β -Untereinheit auf die schnelle und langsame Inaktivierung von hNav1.5. Mit der selben Versuchsanordnung konnten Nuss et al. 1995 zeigen, dass die Stromamplitude stieg, die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung jedoch unverändert blieb. Die Stromhöhe blieb auch nach Tagen in den koinjizierten Froscheiern höher, als in denjenigen, die mit hNav1.5 alleine injiziert wurden. Es konnte eine Erhöhung der Inaktivierungsrate sowie eine Zunahme aller drei Zeitkonstanten der Erholung von der Inaktivierung beschrieben werden. Zu ähnlichen Ergebnissen kommen auch An et al. 1998 und Wright et al. 1999, welche die β 1-Untereinheit mit hNav1.5 in einer humanen embryonalen Nierentumorzelllinie (HEK293-Zellen) koexprimierten. In diesem Expressionssystem wurde die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung zu positiveren Potentialen verschoben.

1.3.2 Sympathische Stimulation und G-proteinvermittelte Kanalregulation

Na-Kanäle können durch sympathische Stimulation reguliert werden. Adrenalin und Noradrenalin, die vorwiegenden Botenstoffe des Sympathikus, vermitteln ihre Wirkung auf Zellen u.a. durch Bindung an β -Rezeptoren, welche an G-Proteine gekoppelt sind.

G-Proteine bilden eine sehr große Familie, allein für die α -Untereinheit gibt es 17 Gene, bei denen teilweise alternatives splicing vorliegt. Nach ihrem Effekt auf die Adenylatzyklase werden sie in drei Gruppen eingeteilt: G_i inhibiert, G_s stimuliert und G_o lässt die Adenylatzyklase unverändert. Außerdem gibt es noch monomere G-Proteine, beispielsweise die Ras-Familie. G-Proteine wirken auf viele verschiedene Proteine regulatorisch. Je nach Phosphorylierungszustand des β -Rezeptors ist er mit G_i oder G_s gekoppelt (Daaka et al. 1997).

Die heterotrimeren G-Proteine (G_i , G_s , G_o) bestehen aus einer α , β und γ -Untereinheit. Die α -Untereinheit bindet GDP, das bei sympathischer Aktivierung über den β -Rezeptor gegen GTP ausgetauscht wird. Die β und γ Untereinheiten dissoziiert daraufhin als funktionelle Einheit von der α -Untereinheit ab. Wenn das GTP- zu einem GDP-Molekül hydrolysiert wurde, assoziieren die Untereinheiten wieder.

Bestimmte G-Protein-Gruppen können spezifisch durch Gifte beeinflusst werden. Das Pertussistoxin (PTX) entkoppelt G_i -Proteine vom Rezeptor und befestigt ein ADP-Ribose-Molekül an der α -Untereinheit; daraufhin kann das G_i -Protein nicht mehr aktiviert werden. Durch das Cholera toxin (CTX) wird die GTP-Hydrolyse verhindert. Dies hat zur Folge, dass das G-Protein nicht mehr konstitutiv aktiv ist. Ähnlich wirkt auch das Molekül GTP γ S, welches anstelle eines GTP-Moleküls bindet und nicht mehr hydrolysiert werden kann. Es interagiert mit allen G-Proteinen (Wickman und Clapham 1995).

Es gibt zwei Regulationswege für Na-Kanäle durch G-Proteine: zum einen durch direkte Interaktion der beiden Proteine; zum anderen indirekt über „second messengers“, meist über das von der Adenylatzyklase hergestellte cAMP, welches Proteinkinasen zur Phosphorylierung anregt (vergleiche Abbildung 1-4; Hille 1992; Cukierman 1996; Frohnwieser et al. 1997).

Die G-Protein-vermittelte Regulation des rNav1.2 geschieht einerseits durch direkte Modulation durch die $G\beta\gamma$ -Untereinheit am C-Terminus des Na-Kanalproteins (Ma et al. 1997). hNav1.5 besitzt keine $G\beta\gamma$ -Bindungsstelle (Chen et al. 1995), allerdings konnten regulatorische Effekte der $G\alpha$ -Untereinheit auf den Kanal gezeigt werden (Matsuda et al. 1992). Bereits ein n-terminales Stück der α -Untereinheit, $G_s\alpha_{33-42}$, kann die Stromerhöhungseffekte des ganzen G-Proteins auf den Herzkanal imitieren (Lu et al. 1999).

Für die indirekte Modulation über die Adenylatzyklase benötigt der Kanal eine PKA-Konsensus-Stelle, an der phosphoryliert werden kann. Sowohl hNav1.5 als auch rNav1.2 haben mehrere solcher Aminosäuresequenzen, an denen teilweise eine Phosphorylierung nachgewiesen werden konnte (hNav1.5: Catterall 1992; Schreibmayer et al. 1994; Fozzard und Hanck 1996; Murphy et al. 1996; Cukierman 1996; rNav1.2: Rossie 1999). Viele dieser Stellen

liegen in der DI/DII-Schleife, welche bei $rNa_v1.2$ besonders lang ist (vergleiche Abbildung 1-2, durch ein A im Viereck gekennzeichnet).

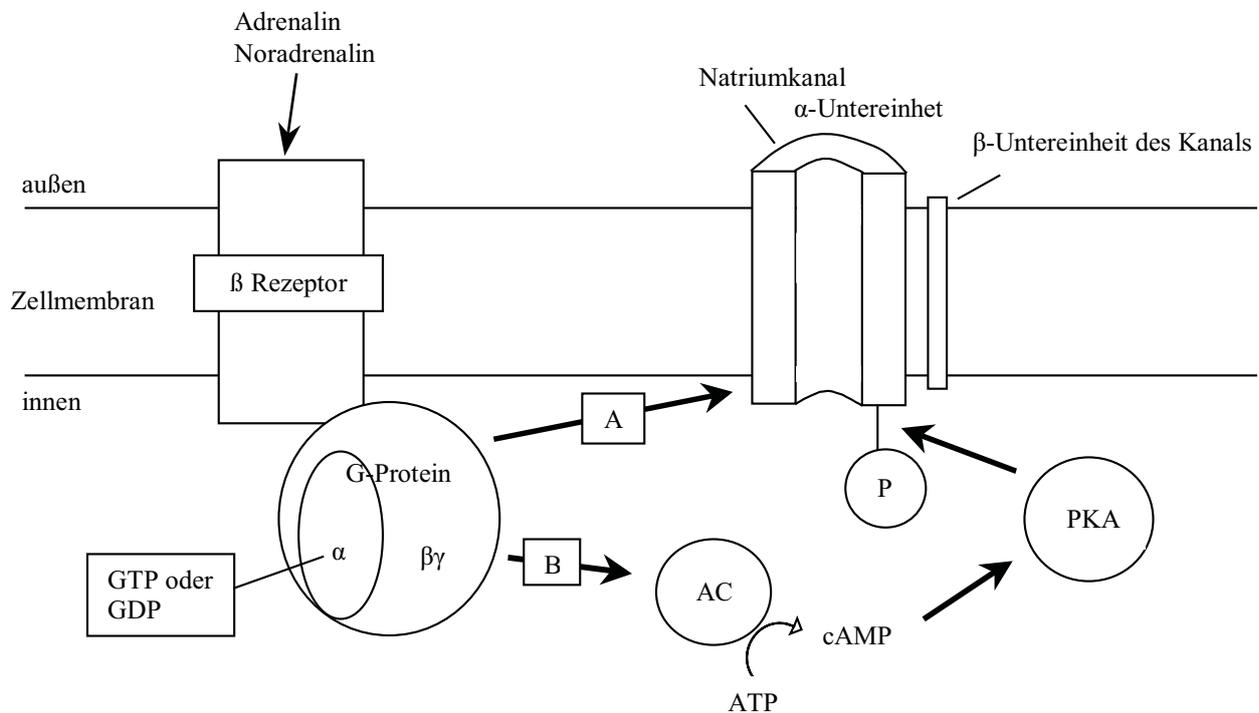


Abbildung 1-4. Schematische Darstellung der Anordnung des β -Rezeptors, des G-Proteins und des Na-Kanals in der Zellmembran. A: direkter Regulationsweg, B: indirekter Regulationsweg über Adenylatzyklase (AC) und Proteinkinase A (PKA), welcher zur Phosphorylierung des Kanals führt. AC und PKA sind membranständige Proteine, die hier zur Vereinfachung ohne Membrankontakt gezeichnet wurden.

An β -Kanaluntereinheiten konnten bisher keine Phosphorylierungen nachgewiesen werden (Rossie 1999).

Nach sympathischer Stimulation kommt es zu Veränderungen der Amplitude und der Kinetik des Stroms durch den Na-Kanal. Für $hNa_v1.5$ wird eine Veränderung der Selektivität diskutiert, wie weiter unten dargestellt.

Die Auswirkung der sympathischen Stimulation ist stark vom Expressionssystem abhängig, in dem der Kanal untersucht wird. Sogar der Entwicklungsstand der exprimierenden Zellen scheint Einfluss auf die Richtung der Amplitudenänderung zu haben. Isoproterenol bindet an den β -Rezeptor und aktiviert dadurch die Adenylatzyklase, die daraufhin vermehrt cAMP produziert. Dies führt zur Aktivierung der Proteinkinase A, welche den Na-Kanal phosphorylieren kann. Der Wirkstoff Forskolin stimuliert die Adenylatzyklase direkt.

In HEK293-Zellen, wie sie in dieser Arbeit verwendet wurden, konnte für $hNa_v1.5$ nach Stimulation mit Isoproterenol eine Amplitudenabnahme beobachtet werden (vergleiche für eine Übersicht Tabelle 7-1 im Anhang).

Auch $rNa_v1.2$ wird je nach Expressionssystem unterschiedlich durch sympathische Stimulation reguliert (siehe Tabelle 7-2 im Anhang). Durch die Koexpression des β -Rezeptors in Oozyten wurde die Stimulation verstärkt, wodurch sich die Amplitude erhöhte (Smith und Goldin 1992). In späteren Arbeiten konnte in Oozyten eine Stromabnahme gefunden werden. Li et al. 1993 untersuchten den Effekt von 8bromo-cAMP auf in CHO-Zellen exprimierte $rNa_v1.2$ Kanäle. Die Experimente zeigten eine Erhöhung der Amplitude. Nach PKC-Aktivierung hatte 8bromo-cAMP den gegenteiligen Effekt, d.h. die Amplitude sank. Hier wird deutlich, dass die Phosphorylierung der Kanäle einer sehr feinen Regulation unterliegt.

Verschiedene Reaktionen der Kanäle auf sympathische Stimulation könnten auf unterschiedliche Phosphorylierungs- oder Konformationszustände des Kanalproteins zurückzuführen sein.

1.3.2.1 Effekte von Phosphorylierungen auf die Selektivität

Kalziumionen gelten als Na-Kanalblocker (Nilius 1988) und wie oben ausgeführt, ist die Na-Kanalselektivität über Ca^{2+} durch den inneren Ring der Aminosäuren DEKA (Einbuchstabenschreibweise) in der Pore strukturell bedingt und stark ausgeprägt (vergleiche 1.2.3, Heinemann et al. 1992b; Favre et al. 1996).

Diese Selektivität bekommt v.a. im Herzen Bedeutung, da ein kleiner Kalziumioneneinstrom über die Zellmembran eine Triggerung bewirkt, die zu einer größeren Kalziumionenfreisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum führt. Dies ist eine wesentliche Voraussetzung für die Herzmuskelkontraktion.

Als die vorliegende Arbeit begonnen wurde, veröffentlichten Santana et al. 1998 Untersuchungsergebnisse, die darauf hindeuteten, dass der Na-Kanal nach sympathischer Stimulation von Rattenherzzellen weniger selektiv für Na^+ wird, und die relative Permeabilität P_{Ca}/P_{Na} für Ca^{2+} -Ionen auf bis zu 1,42 steigt. Sie beobachteten weiterhin an Rattenherzzellen nach Depolarisation ohne intrazelluläre Natriumionen einen kurzen intrazellulären Kalziumionenkonzentrationsanstieg ($[Ca^{2+}]_i$ Transient). Der Transient wurde mit einem konfokalen Lasermikroskop und dem Kalziumindikator fluo-3 nachgewiesen. Normalerweise wird der $[Ca^{2+}]_i$ Transient über einen Strom durch Ca-Kanäle ausgelöst, doch diese waren in dem beschriebenen Experiment mit Nifedipin blockiert. Zusätzlich wurde auf Spannungen depolarisiert, bei denen Ca-Kanäle nicht öffnen. Diese bereits früher gemachte Beobachtung wurde bisher durch zwei Vorschläge erklärt: I. Der Na^+/Ca^{2+} -Austauscher könnte von hohen Spannungen aktiviert werden und lässt Ca^{2+} eintreten (z.B. Lipp und Niggli 1994, Wasserstrom und Vites 1996). Dies wurde in der Arbeit von Santana et al. 1998 durch fehlendes

intrazelluläres Na^+ ausgeschlossen. II. Über spannungsabhängige Erregung der Ryanodin-Rezeptoren auf dem sarkoplasmatischen Retikulum könnte Ca^{2+} direkt freigesetzt werden (Hobai et al. 1997; Levi et al. 1997). Das hieße, dass dieser $[\text{Ca}^{2+}]_i$ Transient ohne Kalziumeinstrom von außen entstehen würde. Nach Entfernung der extrazellulären Kalziumionen konnten Santana et al. 1998 keine intrazelluläre Kalziumionenkonzentrationserhöhung mehr nachweisen. Die auslösenden Ionen mussten also von außen in die Zelle einströmen.

Da sich der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ Transient durch TTX unterdrücken ließ, schlossen Santana *et al.* daraus, dass es sich hier um einen Kalziumionenstrom durch die Na-Kanäle des Herzens handelte. Es wurde vorgeschlagen, dass es zu einer Selektivitätsänderung durch PKA-abhängige Kanalphosphorylierung kommt. Sie nannten diesen Zustand „Slip-Mode-Permeation“. Mit Hilfe von Umkehrpotentialmessungen bestimmten sie einen Permeabilitätskoeffizienten $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}}$ nach sympathischer Stimulation von bis zu 1,42.

1.3.3 Mechanische Stimulation

Seit über hundert Jahren ist bekannt, dass am menschlichen Herzmuskel eine Erhöhung der Wandspannung zur Zunahme der Inotropie führt. Dieser sogenannte Frank-Starling Mechanismus (Frank 1895) konnte auch an isolierten Herzzellen beobachtet werden (Cazorla et al. 1998). Na-Kanäle haben Einfluss auf die Größe des Aktionspotentials und können so an der Regulation der Kontraktion nach mechanischer Reizung beteiligt sein.

Das Zytoskelett der Zelle soll übermäßigen Formänderungen der Zelle entgegenwirken. Da es mit vielen Proteinen der Zelle in Verbindung steht, kann es mechanische Stimulationen weiterleiten. Mechanische Dehnung isolierter Kardiomyozyten führte sowohl beim Meer-schweinchen als auch beim Frosch zu einer Verkürzung des Aktionspotentials. Die Amplitude in den Zellen des Frosches nahm ab (Cazorla et al. 1998), was auf eine Abnahme der Aktivität des Na-Kanals infolge der Dehnung hindeutet.

Wie bereits in Kapitel 1.3.2 erwähnt, regulieren G-Proteine Na-Kanäle über verschiedene Mechanismen. Einige von ihnen, die G_i -Proteine, werden auch durch Zellschwellung beeinflusst. Die Konzentration des Botenstoffs cAMP ist in hypotonisch geschwollenen Rattenventrikelzellen nach β -adrenerger Stimulation niedriger als in isotonischen Zellen. Dies ist auf eine Inhibierung der Adenylatzyklase durch das G_i -Protein zurückzuführen. Axiale Streckung der Zellen erhöht die Konzentration von cAMP im Zellinneren. Einige Untereinheiten der G-Proteine interagieren mit Mikrotubuli und Mikrofilamenten (Cazorla et al. 1998), so dass eine Regulation der Adenylatzyklase über das Zytoskelett vermittelt sein könnte. Diese

Ergebnisse weisen darauf hin, dass die sympathische Regulation durch Zellschwellung und Zytoskelett beeinflusst werden kann.

1.3.4 Veränderung der Schalt- und Permeationseigenschaften durch Kationen

Die spannungsabhängigen Schaltvorgänge des Na-Kanals können durch die Konzentration und die Art des permeierenden Ions beeinflusst werden. Es ist bekannt, dass eine Änderung der intrazellulären Natriumionenkonzentration ($[Na^+]_i$) die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung der Na-Kanäle beeinflusst. Dagegen haben extrazelluläre Änderungen der Natriumionenkonzentration relativ wenig Einfluss auf Kinetik und Spannungsabhängigkeit des Na-Kanals im Tintenfischaxon (Armstrong und Bezanilla 1974; Correa und Bezanilla 1994; Tang et al. 1996). Anhand einer $hNa_v1.5$ -Mutante, bei der die schnelle Inaktivierung fast aufgehoben ist (F1485Q im IFM-Motiv), konnten Townsend und Horn 1997 einen Effekt der extrazellulären Alkalimetallionen auf die langsame Inaktivierung zeigen. Erhöhte extrazelluläre Natriumionenkonzentration ($[Na^+]_a$) führte zu schnellerer Erholung von der langsamen Inaktivierung. Die Inaktivierungsrate war vermindert.

Woodhull 1973 beschrieb bei Untersuchungen an Tintenfischaxonen eine Verstärkung des Natriumauswärtsstroms bei hoher extrazellulärer Kalziumionenkonzentration ($[Ca^{2+}]_a$). Sie vermutete, ohne dies experimentell zu überprüfen, dass Kalziumionen die langsame Inaktivierung der Na-Kanäle beeinflussen könnten. Ca^{2+} -Ionen reagieren in verschiedenen Aspekten so, als würden sie das Membranpotential verschieben. Da die langsame Inaktivierung spannungsabhängig ist, hielt Woodhull 1973 deren Veränderungen durch $[Ca^{2+}]_a$ für möglich.

Kalziumionen sind als Na-Kanalblocker bekannt. Erste Hinweise auf eine spannungsabhängige Blockierung des Na-Kanals durch Kalziumionen gab Woodhull 1973. Nilius 1988 beschrieb mit Hilfe von Einzelkanalmessungen an Meerschweinchenherzzellen eine spannungsabhängige Blockierung des Natriumeinwärtsstroms durch $[Ca^{2+}]_a$ ($K_d(0mV) = 35,1 \text{ mM}$). Weitere Untersuchungen zeigten, dass nicht nur Kalziumionen, sondern eine Vielzahl divalenter Ionen (Mg^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Ba^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+}) den Na-Kanal des Herzens in unterschiedlichem Ausmaß blockieren (Sheets et al. 1987; Sheets und Hanck 1992).

Das Konzentrationsgefälle des permeierenden Ions, hier des Natriumions, verursacht die treibende Kraft für den Strom. Townsend et al. 1997 beobachteten einen paradoxen Effekt an $hNa_v1.5$, exprimiert in Säugerzellen (tsA201-Zellen): Eine hohe treibende Kraft für Na^+ führte zu kleineren Strömen. Wurde ein Teil der $[Na^+]_a$ durch relativ impermeable Ionen, wie Cs^+ oder NMG^+ , ersetzt, so führte dies bei hohen Membranpotentialen zu niedrigeren Auswärtsströmen, obwohl die treibende Kraft erhöht wurde. An Oozyten-Patch-Untersuchungen konnte gezeigt

werden, dass die Offenwahrscheinlichkeit abnahm, die Aktivierungskinetik aber weitgehend unverändert blieb. Es handelte sich offenbar um einen schnellen, spannungsabhängigen Schaltmechanismus, der sich von der Aktivierung zu unterscheiden scheint.

Die in dieser Arbeit untersuchten Kanäle, hNa_v1.5, rNa_v1.4 und rNa_v1.2, werden durch divalente Kationen unterschiedlich stark blockiert, teilweise invers zu ihrer Empfindlichkeit gegenüber TTX (siehe 1.2.6, Frelin et al. 1986). So wird rNa_v1.2 durch ca. 2,4 mM [Ca²⁺]_a halbmaximal blockiert, hNa_v1.5 dagegen durch ca. 35 mM. Einige der für die TTX-Bindung verantwortlichen Aminosäuren liegen in der Porenregion. In der Domäne I unterscheiden sich rNa_v1.2 und hNa_v1.5 innerhalb der Pore nur um zwei Aminosäuren. Mutiert man diese in rNa_v1.2 zu den in hNa_v1.5 vorhandenen Aminosäuren (rNa_v1.2_F385C•N388R), so wird die Mutante durch [Ca²⁺]_a ähnlich blockiert wie hNa_v1.5 (Heinemann et al. 1992b; Heinemann et al. 1992a; Satin et al. 1992; Backx et al. 1992). Die halbmaximale Blockierungskonzentration für die Mutante liegt bei 26 mM [Ca²⁺]_a und bei mehr als 10 μM TTX. Schalt-Eigenschaften des Kanals, sowie die Na⁺/K⁺-Selektivität wurden durch die Mutation nicht verändert.

Kalziumionen blockieren nicht nur den Einwärtsstrom, sondern führen auch zu einer Verschiebung der Aktivierung zu positiveren Spannungen (Hille et al. 1975; Pusch 1990), was eine Erhöhung der Schwelle für elektrische Erregbarkeit nach sich zieht. Dies wird durch Veränderung des Oberflächenpotentials durch an negativen Ladungen der Zellmembran gebundene Ca²⁺ erklärt. Membranladungen verändern das elektrische Feld in der Zellmembran. Der Spannungssensor kann nur auf dieses intramembranale Feld reagieren. Viele ungebundene negative Ladungen an der Membranaußenfläche bewirken ein schwächer abfallendes elektrisches Feld in der Membran selbst, welches dem Zustand der Depolarisation näher kommt. Dies bewirkt, dass die Na-Kanäle leichter öffnen.

Auf die Membranlipide wirkt Ca²⁺ stabilisierend. Ähnliche, wenn auch schwächere Effekte hat Mg²⁺.

1.4 Aufgabenstellung

1.4.1 Regulation der Selektivität durch sympathische Stimulation (Slip-Mode-Permeation)

Na-Kanäle sind hochselektiv, besonders für Natriumionen über Kalziumionen. Physiologisch, beispielsweise bei der Kontraktionsentstehung im Herzen, ist diese Diskriminierung von großer Bedeutung. Die Selektivität galt bisher als feste Größe, die nur über die Proteinsequenz des Kanals bestimmt wird und zellulär nicht reguliert wird (Heinemann et al. 1992b).

Die Arbeit von Santana et al. 1998 legt die Vermutung nahe, dass die Selektivität zellulären Regulationsprozessen unterliegt. So beschreiben die Autoren eine Änderung der Selektivität des Na-Kanals des Herzens nach sympathischer Stimulation. Es gibt widersprüchliche Auffassungen über die Existenz dieser Regulation. Die genannte Untersuchung wurde in Herzzellen vorgenommen, so dass andere Wege des Kalziumioneneintritts oder eine Beeinflussung durch andere zelluläre Proteine nicht ausgeschlossen werden können. Um die Existenz der sogenannten Slip-Mode-Permeation und gegebenenfalls die molekulare Veränderung des Kanalproteins am isolierten menschlichen Herzkanal nachweisen zu können, sollte hNa_v1.5 in HEK293-Zellen heterolog exprimiert werden und die Veränderung des Umkehrpotentials als Maß für die Selektivität nach sympathischer Stimulation mit Forskolin bei verschiedenen [Ca²⁺]_a untersucht werden.

1.4.2 Quantitative Beschreibung der Stromänderung durch mechanischen Stress

Bei den Untersuchungen zur Selektivität fiel eine Abnahme der Stromamplitude nach mechanischer Stimulation durch das Perfusionssystem auf. Diese Amplitudenreduktion sollte an rNa_v1.4, exprimiert in HEK293-Zellen, experimentell erforscht werden. Die Schwankungen der Stromreduktion nach mechanischer Stimulation sollten im Zeitverlauf von vier Monaten quantitativ beobachtet werden, und auf Einflussmöglichkeiten und Ursachen hin untersucht werden.

1.4.3 Beeinflussung der Stromamplitude durch extrazelluläre Ionen

Bei wiederholten Veränderungen der [Ca²⁺]_a fiel eine ungewöhnliche Beeinflussung des Na⁺-Stroms bei hohen Membranpotentialen auf. Das als Kanalblocker bekannte Ca²⁺ erhöhte die Amplitude des Auswärtsstroms durch in HEK293-Zellen exprimierte hNa_v1.5. Diese Beeinflussung des Na⁺-Auswärtsstroms durch Kalziumionen sollte mit Ganzzell-Patch-Clamp-

Messungen, Rauschanalysen, im Vergleich mit dem divalenten Kation Mg^{2+} und mit zwei weiteren Na-Kanälen, $rNa_v1.4$ und $rNa_v1.2$, präzisiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Molekularbiologie

2.1.1 DNS und RNS der Na-Kanäle

Zur heterologen Expression der Kanäle hNa_v1.5, rNa_v1.4 und rNa_v1.2 sowie der β 1-Untereinheit in Säugerzellen wurden folgende Plasmid-DNS durch kompetente E. coli XL1 oder HB101 vervielfältigt und anschließend isoliert: (i) für hNa_v1.5: NahH1-pRc/CMV (Gellens et al. 1992, zur Verfügung gestellt von Dr. Alfred L. George, Jr., Vanderbilt University, Nashville, Tennessee, USA), (ii) für hNa_v1.5: Na μ 1-pcDNS3 (Trimmer et al. 1989, zur Verfügung gestellt von Dr. Jürgen Küpper, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried), (iii) für rNa_v1.2: NarB2_pCl-neo (Noda et al. 1986, zur Verfügung gestellt von Dr. Keiji Imoto, National Institute for Physiological Sciences, Okazaki, Japan) und (iv) für die β 1-Untereinheit Na β 1-pRc/CMV (Isom et al. 1992; Qu et al. 1995, zur Verfügung gestellt von Dr. W. J. Lederer, Medical Biotechnology Center and School of Medicine, University of Maryland, Baltimore, MD, USA). Diese Expressionsvektoren enthielten Gene für Ampicillin- und Neomycinresistenz. Aus den unter Selektionsdruck von 1% Ampicillin in TY-Medium gewachsenen E.coli wurde die Plasmid-DNS mit Quiagen Plasmid Maxi Kits isoliert.

Um die Kanäle in Oozyten zu exprimieren, wurde aus der vorhandenen DNS RNS hergestellt. Dazu wurde die Plasmid-DNS linearisiert und mit geeigneten Enzymen in RNS transskribiert (Sp6 mMessage mMachine Kit, Ambion, Austin, TX, USA).

Die Herstellung der DNS und RNS waren nicht Teil dieser Arbeit.

2.1.2 Verwendete Zelllinien und Kultur

Zur heterologen Expression der α - beziehungsweise β -Untereinheiten der untersuchten Ionenkanäle wurden HEK293-Zellen verwendet (human embryonic kidney cells; CAMR, Porton Down, Salisbury, UK). Für rNa_v1.4 und später auch für hNa_v1.5, wurden eine durch Dr. Hajun Chen stabil transfizierte HEK293_rNa_v1.4- (Chen et al. 2000) bzw. HEK293_hNa_v1.5-Zelllinie (Chen und Heinemann 2001) für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

Diese Zelllinien wurden in 40% „Dulbecco's Minimal Eagles Medium“ (DMEM) mit 10% fötalem Kälberserum und 40% F-12 unter einem CO₂- Druck von 5% bei 37 °C kultiviert.

Wenn die Zellen zu ca. 80% konfluent gewachsen waren, wurden sie vom Boden der Kulturflasche mit Trypsin abgelöst und auf kleine Messschalen ausplattiert. Nach 1-3 Tagen

waren sie in ausreichender Zahl gewachsen und für die Transfektionen bzw. die Ganzzell-Patch-Clamp-Messungen bereit.

2.1.3 Transfektionsmethoden

Es wurden zwei Transfektionsmethoden angewendet.

Zur Standard Kalzium-Phosphat-Methode (Sambrook et al. 1989) wurde die DNS in 100 µl 250 mM CaCl₂ aufgenommen und 100 µl 2 × BES (50 mM N,N-bis[2-Hydroxyethyl]-2-aminoethansulfonische Säure, 180 mM NaCl, 1,5 mM Na₂HPO₄; pH 6,96) zugegeben. Nach 20 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Mischung tropfenweise auf die zu ca. 40% konfluent wachsenden Zellen in 35 mm Messschalen gegeben. Die DNS-Konzentration betrug 2-2,5 µg/ml Kulturmedium. Nach 15-24 h wurde das Medium gewechselt.

Die Lipofection mit Fugene™ 6 Transfection Reagent (Boehringer-Mannheim) ist eine nichtliposomale Methode. 95 µl serumfreies Medium und 5 µl FuGENE 6 Transfection Reagent wurden gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die DNS zugegeben, und nach 15 min konnte die Mischung auf die zu ca. 40% konfluent wachsenden Zellen getropft werden. Die DNS-Konzentration betrug 2-2,5 µg/ml Kulturmedium. Nach 3-8 Stunden wurde das Medium gewechselt.

Bei beiden Methoden wurde die Marker DNS für CD8 im Verhältnis 1:5 kotransfiziert (Jurman et al. 1994), um die Zellen erkennen zu können, die DNS aufgenommen und exprimiert haben. Nach 1-2 Tagen konnten diese Zellen mit einem mit Metallkügelchen markierten Antikörper gegen CD8 (Dynabeads; Deutsche Dynal GmbH, Hamburg), erkannt werden. Sie wurden dann mit der Patch-Clamp Methode auf exprimierte Kanäle getestet und bei messbarem Strom wurden die verschiedenen Experimente durchgeführt.

Die β1-Untereinheit des hNa_v1.5 Na-Kanals wurde in die HEK293_hNa_v1.5-Zelllinie kotransfiziert. Auch hier wurde CD8 als Marker verwendet.

2.1.4 Oozytenpräparation und -injektion

Zur heterologen Expression der Na-Kanäle in Eizellen des südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* wurden die Frösche betäubt und die Oozyten operativ entnommen. Anschließend wurde die Follikelmembran mit Kollagenaselösung enzymatisch abgelöst. Dies war nicht Teil dieser Arbeit.

Die in TE-Puffer gelöste mRNS konnte mit Hilfe einer Mikropipette injiziert werden (50 nl pro Oozyte). Nach 2-3 Tagen Inkubationszeit bei 18 °C in Barths Lösung (Stühmer 1992;

Stühmer et al. 1992) konnten die Ionenströme durch die synthetisierten und in die Zellmembran transportierten Ionenkanäle gemessen werden.

In einem Teil der Oozyten wurde RNS der Doppelmutante rNav1.2_F385C•N388R des rNav1.2 injiziert. Die Aminosäuresequenz der Porenregion in der ersten Domäne dieser Mutante ist identisch mit derjenigen des hNav1.5. Hier sind wesentliche Bindungsstellen für die Blockierbarkeit durch divalente Ionen und Neurotoxine lokalisiert (Heinemann et al. 1992a).

2.1.5 Zelllysate, Proteingele und Westernblots

Um die Lokalisation des Na-Kanals in der Zellmembran zu untersuchen, war es nötig, das Kanalprotein mit einem Antikörper zu markieren. Dazu wurde der Kaninchen-Antikörper Anti-Pan Sodium Channel SP19 (alomone labs, Jerusalem, Israel) verwendet. Sein Epitop sind die Aminosäuren 1491-1508 des rNav1.1, das dem unter Na-Kanälen hochkonservierten intrazellulären Verbindungsstück zwischen der Domäne III und IV entspricht. In diesem Proteinabschnitt liegt u. a. das IFM-Motiv, das für die schnelle Inaktivierung des Na-Kanals verantwortlich ist (Gordon 1988, Vassilev et al. 1989).

Zur Durchführung des Westernblots für die Experimente zur Kolo-kalisation des Na-Kanals mit Kaveolen wurden folgende Zellen lysiert: (i) mit rNav1.4 und (ii) mit hNav1.5 stabil transfizierte HEK293-Zellen, (iii) ein Teil eines Schweineherzens, welches frisch vom Schlachthof (Firma Vogt, Jena; Schwein der Fettstufe R) gekauft wurde, sowie (iv) als Kontrolle untransfizierte HEK293-Zellen.

Der verwendete Lysispuffer enthielt 20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1% Triton, 10 mM Na-Pyrophosphat, 10 mM EDTA, 2 mM EGTA, 50 mM NaF, 10 µg/ml Leupeptin, 10 µg/ml Pepstatin.

Die HEK293-Zellen wurden in einer Petrischale kultiviert, bis sie den Boden bedeckten und mit dem Lysispuffer abgelöst. Die Zellen wurden bei 4 °C und 20000 Umdrehungen 20 min lang zentrifugiert.

Das frische Schweineherz wurde auf Eis in ca. 1,5 cm große Würfel zerschnitten und in ca. 20 ml Lysispuffer mit dem Mixer zerkleinert und bei 4 °C und 20000 Umdrehungen 20 min lang zentrifugiert.

Die Lysate wurden auf einem Proteingel aufgetrennt (SDS-Page, Laemmli et al. 1974). Dieses bestand aus einem 10%igen (bzw. entsprechend niederprozentigem) Acrylamid-Trenngel (2,8 ml Acrylamid Mix (26% Acrylamid, 0,7% Bis), 1,5 ml Trenngelpuffer (1,88 M Tris/HCl pH 8,8), 1,5 ml SDS (0,5%), 1,5 ml H₂O, 30 µl APS (10%), 5µl TEMED) und einem Sammelgel (0,8 ml Acrylamid Mix (26% Acrylamid, 0,7% Bis), 0,8 ml Sammelgelpuffer (0,625 M Tris/HCl

pH6.8), 0.8 ml SDS (0.5%), 1.6 ml H₂O, 20 µl APS (10%), 5 µl TEMED). Die Proben wurden 1:1 mit 2 x SDS Loading Puffer verdünnt, bei 95 °C 5 min gekocht und abzentrifugiert. Pro Probe wurden ca. 15 µl auf das Gel aufgetragen und mit dem Laufpuffer (15,1 g Tris Base, 72 g Glyzin, 5 g SDS mit Wasser auf 500 ml auffüllen und 1:10 verdünnen) über ca. 90 min bei 25 mA aufgetrennt. Als Markerbanden wurden der Full-Range Rainbow Molecular Weight Marker (RPN800, Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK) und 10 kDa Protein-Leiter (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) aufgetragen.

Die so aufgetrennten Proteine wurden auf eine Millipore-Membran (VDF-Membran, Pore size 0,45 µm, Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) transferiert. Dazu wurde das Gel, die Membran, welche kurz in Methanol getaucht wurde, und Whatman Papier (Chromatography Paper, 3 mm, Whatman International Ltd., Maidstone, UK) in Towin-Transferbuffer (25 mM Tris, 192 mM Glyzin, 20% Methanol, 0,05% SDS) eingelegt und anschließend auf der Blotting-Apparatur (Trans-Blot Semi Dry, Bio Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) von unten nach oben in folgender Reihenfolge gestapelt: Anode, Whatman Papier, Millipore-Membran, Gel, Whatman Papier, Kathode. Die Proteine wurden bei 2 mA pro cm² und einer maximalen Spannung von 25 mV ca. 90 min lang transferiert. Anschließend wurde die Membran mindestens eine halbe Stunde lang in PBS-T (PBS-Puffer mit 0,1% Tween versetzt), versetzt mit 2% Milchpulver, inkubiert, um freie Bindungsstellen für Proteine auf der Membran, an denen der Antikörper binden könnte, abzublocken.

Zur Immunodetektion mit dem ECL Western Blotting System (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK) wurde der Antikörper SP-19 (am Anfang des Kapitels beschrieben) in PBS-T 1:2000 verdünnt und die Membran damit 1h lang inkubiert. Nach Waschen mit PBS-T wurde die Membran 1h lang mit dem zweiten HRP-Peroxidase gekoppelten Antikörper in einer Verdünnung von 1:1000 inkubiert. Nach Einwirken der ECL-Detektionslösung (HRP-Streptavidin-Komplexe) auf die Membran wurde diese je nach Belichtungsstärke für 10 sec bis einige Minuten auf Fotopapier gelegt und dadurch visualisiert.

Der Antikörper wurde mit einem Kontrollpeptid des Antigens SP19 (alomone labs, Jerusalem, Israel) getestet. Das Peptid wurde direkt nach dem Übertragen der Proteine auf die Membran aufgetropft und durch den Antikörper deutlich detektiert.

2.1.6 Aufreinigung von Kaveolen und Immunopräzipitation

Konfluent gewachsene Zellen wurden mit PBS-Puffer gewaschen und vom Kulturflaschenboden abgeschabt, pelletiert und in PBS mit 1% Triton aufgenommen. Nach Homogenisierung

und erneutem Zentrifugieren enthielt der Überstand die in Triton-X100 unlöslichen kalveolinreichen Membrandomänen der Zellen.

Zur Immunopräzipitation wurde das Lysat mit unspezifischen Kaninchenantikörpern 1h lang inkubiert und danach mit ProteinA/G-Sepharose versetzt. Diese Immunopräzipitate wurden pelletiert und später als Kontrolle verwendet. Zum Überstand wurde der Anti-Kaveolin1-Antikörper (Anti-Kaveolin-1, polyklonaler Kaninchen IgG, Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, USA) zugegeben, nach einer Stunde mit ProteinA/G-Sepharose präzipitiert und pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Proben gewaschen, dann mit 2 x SDS-Loading Puffer gekocht und auf ein Proteingel für einen Westernblot aufgetragen. Die Detektion auf der Blotmembran erfolgte mit dem Antikörper SP19 (vergleiche 2.1.5.).

2.2 Elektrophysiologische Messmethoden

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Messmethoden für Ganzzell-Ableitungen benutzt, die Ganzzell-Patch-Clamp-Methode für HEK293-Zellen und die Zwei-Elektroden-Spannungsklemme für Oozyten.

Für beide Methoden war der jeweilige Messplatz schwingungsarm gelagert. Über ein Peltier-Element (Lorenz, Messgerätebau, Lindau), welches unter der jeweiligen zu messenden Zelle lag, konnte die Temperatur der Badlösung konstant gehalten werden. Bei allen Messungen lag die Badtemperatur bei ca. 20-23 °C.

2.2.1 Ganzzell-Patch-Clamp-Messungen

Ionenströme über die gesamte Zellmembran von HEK293-Zellen wurden mit der Ganzzell-Patch-Clamp-Methode gemessen (Neher et al. 1978; Hamill et al. 1981). Der mit der hierfür vorgesehenen Technik ausgestattete Messplatz war mit einem Faradaykäfig gegen elektromagnetische Störfelder abgeschirmt.

2.2.1.1 Geräte, Materialien und Software

Es wurden Patch-Pipetten je nach gewünschtem Spitzendurchmesser bzw. Widerstand ($0,8 \text{ M}\Omega < R < 3 \text{ M}\Omega$) entweder aus Kimble-Kimax-51-Glas (WPI, Sarasota, Florida, USA) oder aus Aluminiumsilikatglas (WPI, Sarasota, Florida, USA) mit Hilfe eines Micropipette Puller Model P-97 (Sutter Instrument Co., USA) gezogen.

Unter dem Mikroskop wurden die Pipetten mit Silikon-Kautschuk (RTV, General Electrics, Holland) ummantelt, um die kapazitive Aufladung des Pipettenglases herabzusetzen. Die Spitze der Pipette wurde nahe an einen heißen Platin-Iridium-Draht herangefahren und dadurch poliert.

Im Anschluss daran konnte die Pipette mit der jeweils benötigten Pipettenlösung gefüllt werden (vergleiche 2.2.1.3, S.26), und über einen Ag/AgCl- Draht an einen Vorverstärker angeschlossen werden. Für den On-Cell-Patch-Clamp-Modus wurde mit Hilfe von Mikromanipulatoren die Pipette an die in der Badlösung liegende Zelle herangeführt. Mit leichtem Unterdruck und gegebenenfalls durch Anlegen leichter negativer Spannung (-10 bis -20 mV) konnte eine hochohmige Membran-Pipetten-Abdichtung erreicht werden.

Um in den Ganzzell-Modus zu gelangen wurde durch einen kurzen Saugstoß das Membranstück unter der Pipettenöffnung zerstört ohne die Membran-Pipetten-Abdichtung zu beschädigen und so eine offene Verbindung zwischen Pipette und Zellinnerem geschaffen. Die Pipettenlösung konnte nun in die Zelle diffundieren. Der Zugangswiderstand lag meist bei 2 bis 3 M Ω . Er wurde zu mehr als 70% kompensiert um Spannungsfehler zu minimieren.

Die Stromantwort auf definierte Spannungssprünge wurde über einen Verstärker (EPC-9, HEKA Elektronik, Lambrecht) und einen AD/DA-Wandler an einen angeschlossenen MacIntosh-Computer weitergeleitet. Die Filterung betrug 2, 5 oder 10 kHz, die Digitalisierung erfolgte mit einer 4-5fachen Abtastrate.

Die Spannungssprünge wurden mit dem Programm Pulse (HEKA Elektronik) erstellt. Das Haltepotential lag bei -100 mV. Für Strom-Spannungskennlinien wurden je nach Fragestellung Stromsprünge zwischen -70 mV und +100 mV in ansteigenden 5 bis 15 mV Schritten angelegt. Der Einfluss mechanischer Zellreizung wurde an Testpulsen auf -10 mV bzw. 0 mV untersucht.

Leck- und Kapazitätsströme wurden mit der P/n-Methode korrigiert und abgezogen (Heinemann 1995). Dazu wurden kleine Spannungspulse bei negativen Potentialen applizieren, bei denen die Na-Kanäle nicht öffneten. Die dabei gemessenen Stromantworten wurden gemittelt, auf den Testpuls skaliert und von der Stromantwort auf den Testpuls abgezogen.

In den meisten Fällen wurden die Daten mit einem Tiefpassfilter bei 5 kHz gefiltert und mit 20 kHz aufgenommen. Für die nichtstationäre Rauschanalyse wurde der Strom mit 40 kHz abgetastet.

Nachdem die Membran unter der Pipette zerstört war, wurde ca. 5 min gewartet, bis sich ein Gleichgewicht zwischen Zellinnerem und Pipettenlösung hergestellt hatte. Nach dieser Zeit war die Membran-Pipetten-Abdichtung meist sehr stabil.

Das Ausgangspotential wurde jedes Mal abgeglichen, bevor eine Membran-Pipetten-Abdichtung hergestellt wurde.

Die Auswertung der Daten erfolgte mit den Programmen PulseFit, PulsTools (HEKA Elektronik), IgorPro (WaveMetrics, Lake Oswego, OR, USA) und Excel (Microsoft Corporation,

WA, USA). Die Daten werden, falls nicht anders erwähnt, als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt, wobei n die Anzahl der unabhängigen Experimente angibt.

Die Werte der Spannungskennlinie in Abbildung 1-1 wurden mit der Goldman-Hodgkin-Katz-Stromgleichung genähert: $I(U) = \Gamma U \frac{1 - e^{-(U-E_{rev})/25mV}}{1 - e^{-U/25mV}} \frac{1}{(1 + e^{-(U-U_m)/k_m})^3}$, wobei U das Testpotential, Γ die Leitfähigkeit und E_{rev} das Umkehrpotential ist. Der letzte Term beschreibt die Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle. U_m steht für die Spannung, die für die halbmaximale Aktivierung pro Untereinheit nötig ist, und k_m für den Steigungsfaktor. Für diese Gleichung wird von drei unabhängigen Schalteinheiten ausgegangen.

2.2.1.2 Perfusionssystem

Um die Badlösung nahe der Zelle in relativ kurzer Zeit bei bestehender Ganzzell-Patch-Clamp-Konfiguration austauschen zu können, wurde ein ventilgesteuertes Perfusionssystem benutzt.

Sieben 50 ml-Spritzen mit den eingesetzten Badlösungen hingen ca. 30 cm oberhalb der Badkammer. Sie waren über ein Schlauchsystem mit Ventilen mit einem Quarzrohr (ca. 100 μ m Durchmesser, meist doppelt so groß wie die zu messende Zelle) verbunden. Alle sieben Quarzrohre wurden auf eines vereinigt, die gemeinsame Endstrecke betrug ca. 3 cm. Mit einem Mikromanipulator wurde diese Quarzrohrspitze kurz vor Erstellung der Membran-Pipetten-Abdichtung bis auf Sicht im Mikroskop an die zu messende Zelle herangeführt.

Über das Programm Pulse konnten die Ventile direkt angesteuert werden, und so mit den Spannungspulsen synchronisiert werden. Nachdem ein Ventil für eine neue Badlösung geöffnet wurde, wurden für ca. 6 sec einfache Spannungssprünge auf -10 mV appliziert. Dadurch konnte ein eventueller Effekt auf die Stromamplitude direkt verfolgt werden, und die Effizienz des Lösungsaustausches beurteilt werden. Erst nach dieser Serie von Testpulsen erfolgte die eigentliche Messung in Form von Strom-Spannungskennlinien für diese Badlösung. Die Lösung tropfte mit einer Geschwindigkeit von ca. 40-70 Tropfen/min aus der Spitze des Perfusionssystems. Für die Experimente zur Beeinflussung der Auswärtsstromamplitude durch extrazelluläre divalente Ionen wurde die Strömung über Schraubventile möglichst gering gehalten. Es kam vor, dass die Membran-Pipetten-Abdichtung durch die mechanische Beanspruchung während des Perfusionsgebrauches verloren ging.

Die Toxinapplikation erfolgte während des Experiments mit einer Applikationspipette, die eine Öffnung von ungefähr 10 μ m Durchmesser hatte. Sie wurde wie die Patch-Pipetten aus Aluminiumsilikatglas mit dem Mikropipette Puller hergestellt (vergleiche 2.2.1.1). Die

Applikationspipette wurde so nahe an die zu messende Zelle herangeführt, dass sie im Fokus des Mikroskops sichtbar war. Mit leichtem Überdruck von ca. 2-10 cmH₂O, gesteuert über einen Druckregler (MPCU-3, Lorenz, Messgerätebau, Lindau), wurde das Toxin an die Zelle appliziert.

2.2.1.3 Lösungen

Für die elektrophysiologischen Experimente in Zellen wurden folgende Lösungskombinationen verwendet (vergleiche auch Tabelle 7-3, S.107 im Anhang):

- Physiologische Lösungen enthielten in der Pipette: 12 mM NaCl, 155 mM KCl, 10 mM Hepes, pH = 7,36 eingestellt mit KOH; im Bad: 145 mM NaCl, 4 mM KCl, 10 mM Hepes, 2 bzw. 10 mM CaCl₂, pH = 7,4 eingestellt mit NaOH (Lösungskombination A).
- Für die Experimente zur Slip-Mode-Permeation enthielt die Pipettenlösung: 10 mM NaCl, 110 mM CsCl, 5 mM MgCl₂, 10 mM EGTA, 10 mM Hepes, pH = 7,36 eingestellt mit CsOH; die Badlösung enthielt: 10 mM NaCl, 130 mM CsCl, 10 mM Hepes, 0,2 bzw. 2 bzw. 10 mM CaCl₂, pH = 7,4 eingestellt mit CsOH (Lösungskombination B).

Die Badlösungen wurden aus zwei Grundlösungen mit 0 bzw. 10 mM CaCl₂ gemischt. Hohe Cäsiumionenkonzentrationen bewirken eine Blockierung der endogenen Kaliumkanäle. Für die sympathische Stimulation wurde der Badlösung mit 2 mM [Ca²⁺] der Lösungskombination B 10 µM Forskolin (*coleus forskolii*, Calbiochem, La Jolla, CA, USA) zugesetzt. Bei Experimenten ohne Perfusionssystem wurden permanent 50 µM zugegeben. Forskolin stimuliert die Adenylatzyklase, welche über eine Konzentrationserhöhung von cAMP zur Aktivierung der Proteinkinase A führt. In HEK293-Zellen wurde Proteinkinase A nachgewiesen, die sich experimentell stimulieren ließ (Freedman et al. 1995; Roche et al. 1996; Chandra et al. 1999).

- Die Experimente zur Untersuchung der Auswirkung mechanischer Stimulation auf rNa_v1.4 wurden mit der Lösungskombination B durchgeführt; dabei enthielt die Badlösung konstant 2 mM CaCl₂ (Lösungskombination **B2**).
- Für einen Teil dieser Experimente wurde die Natriumionenkonzentration im Bad erhöht, so dass sich ein größerer Natriumeinwärtsstrom ergab und der Effekt deutlicher erkennbar werden konnte. Diese Badlösungen enthielten: 140 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 10 mM Hepes, 5 mM Glukose, pH = 7,4 eingestellt mit NaOH; die Pipettenlösung enthielt wie oben: 10 mM NaCl, 110 mM CsCl, 5 mM MgCl₂, 10 mM EGTA, 10 mM Hepes, pH = 7,36 eingestellt mit CsOH (Lösungskombination C).

- Um die Regulation der Stromamplitudenabnahme nach mechanischer Stimulation durch G-Proteine zu untersuchen, wurde der Pipettenlösung GTP γ S (Sigma) und ATP zugesetzt: 20 mM NaCl, 135 mM Kalium-Glutamat, 4 mM MgCl₂, 10 mM Hepes, 0,5 mM ATP, 400 μ M GTP γ S, pH = 7,36 eingestellt mit KOH. Die Kontrollexperimente hierzu wurden mit folgender Pipettenlösung durchgeführt: 10 mM NaCl, 120 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 10 mM Hepes, 10 mM EGTA, pH = 7,36 eingestellt mit KOH. Die Badlösung war in beiden Fällen: 140 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 10 mM Hepes, 5 mM Glukose, pH = 7,4 eingestellt mit NaOH (Lösungskombination **D**).
- Der G-Protein Inhibitor Pertussistoxin (PTX 22U1, Calbiochem, Novabiochem, La Jolla, CA, USA) wurde in einer Konzentration von 20 μ g/ml der Pipettenlösung aus Lösungskombination D (ohne GTP γ S) zugegeben (Kopf und Woolkalis 1991; Kusaka et al. 1998).

Die Untersuchungen zur Beeinflussung des Auswärtsstroms durch extrazelluläre divalente Ionen erforderte folgende Lösungskombinationen:

- Lösungskombination **E** ohne Natriumionen in der Badlösung:
Pipette: 12 mM NaCl, 155 mM KCl, 10 mM Hepes, pH = 7,36 eingestellt mit KOH
Bad: 150 mM CsCl, 10 mM Hepes, 2 bzw. 10 mM CaCl₂, pH = 7,4 eingestellt mit CsOH.
- Lösungskombination **F** mit CsF in der Pipettenlösung enthielt:
Pipette: 120 mM CsF, 20 mM NaCl, 10 mM EGTA, 10 mM Hepes, pH = 7,4 eingestellt mit CsOH.
Bad: 150 mM CsCl, 10 mM Hepes, 0/0,2/0,5/1/2/5/10 mM CaCl₂, pH = 7,4 eingestellt mit CsOH. Für höhere Kalziumionenkonzentrationen wurde wegen der zunehmenden Osmolarität die Cäsiumionenkonzentration im Bad gesenkt (pH = 7,4, CsOH):
135 mM CsCl, 10 mM Hepes, 20 mM CaCl₂.
Diese Lösungen wurden auch für Rauschanalysen eingesetzt. Hohe intrazelluläre Fluoridionenkonzentrationen sollen eine Inaktivierung intrazellulärer Enzyme bewirken, die regulatorisch auf den untersuchten Effekt wirken können, und minimieren eine spannungsabhängige Verschiebung der Aktivierung und Inaktivierung bei langandauernden Experimenten (Chahine et al. 1996).
- Analog dazu wurde für die Lösungskombination **G** Magnesium als divalentes externes Ion gewählt:
Pipette: 120 mM CsF, 20 mM NaCl, 10 mM EGTA, 10 mM Hepes, pH = 7,4 eingestellt mit CsOH.
Bad: 150 mM CsCl, 10 mM Hepes, 1/2/5/10 mM MgCl₂, pH = 7,4 eingestellt mit CsOH.

Für höhere Magnesiumionenkonzentrationen wurde die Cäsiumionenkonzentration im Bad gesenkt (pH = 7,4, CsOH):

135 mM CsCl, 10 mM Hepes, 20 mM MgCl₂ bzw.

100 mM CsCl, 10 mM Hepes, 50 mM MgCl₂.

2.2.2 Zwei-Elektroden-Spannungsklemme

2.2.2.1 Geräte, Materialien und Software

Bei der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme wird der Strom über die gesamte Zellmembran von Oozyten gemessen, wobei eine Elektrode zur Strominjektion dient, die andere die an der Membran abfallende Spannung kontrolliert (Stühmer et al. 1987, Stühmer et al. 1992). Dazu werden 2 Mikroelektroden in die Eizellen eingestochen. Die Elektroden werden aus Filamentglas (Hilgenberg, Malsfeld), welches unter Zugspannung mit dem Micropipette-Puller L/M-3P-A (List Medical, Darmstadt) kontrolliert erhitzt wird, gewonnen. Nachdem sie mit 2 M KCl gefüllt wurden, wird die Spitze abgebrochen. Der Widerstand lag zwischen 0,8 und 1,3 MΩ. Beide Elektroden sind an einen Messverstärker (Turbo-TEC 01, NPI, Tamm) mit analoger Kapazitätsneutralisation und hoher Ausgangsspannung zur schnellen Strominjektion angeschlossen. Über den angeschlossenen MacIntosh-Computer wurde die Haltespannung, bei der sich die meisten Na-Kanäle im geschlossenen Zustand befinden, auf -100 mV eingestellt. Es wurden die selben Spannungsprotokolle wie unter 2.2.1.1 für die Strom-Spannungskennlinien beschrieben angewendet. Die Filterung erfolgte mit einem 8-Pool-Bessel-Filter bei einer Grenzfrequenz von 1-2 kHz; die Abtastrate zur Digitalisierung war vierfach.

Die trotz analoger Kompensation verbleibenden Kapazitätstransienten und Leckströme wurden durch computergesteuerte Anwendung eines P/4 Protokolls vom Stromsignal abgezogen (wie bereits unter 2.2.1.1 beschrieben). Die Zeitauflösung für die Stromaufzeichnung betrug ca. 1 ms. Na-Kanäle öffnen und inaktivieren in einem Zeitraum von drei bis vier Millisekunden. Diese Methode wurde daher nicht zur Untersuchung der Stromkinetik, sondern nur der Maximalströme verwendet.

2.2.2.2 Lösungen

Für die Zwei-Elektroden-Spannungsklemme an Oozyten wurden die Badlösungen der Lösungskombination F gewählt (vergleiche 2.2.1.3, S.27). Der Lösungswechsel erfolgte von Hand, wobei mit einer Pumpe Überschüsse abgesaugt wurden. Der vollständige Austausch des Badvolumens konnte so in ca.10-15 sec erfolgen.

2.2.3 Selektivitätsbestimmung mit Hilfe des Umkehrpotentials

Die Selektivität des Na-Kanals wurde mit Hilfe des Umkehrpotentials (E_{rev}) bestimmt, wie u.a. bei Begenisich 1992 beschrieben. Das Umkehrpotential ist die Spannung, bei der bei geöffnetem Kanal kein messbarer Strom fließt. Der Gesamtstrom ändert bei diesem Potential die Richtung.

Gibt es nur ein permeierendes Ion X, so ist das Umkehrpotential das Nernstpotential (E_N) dieses Ions:

$$E_{N(X)} = \frac{RT}{z_x F} \ln \frac{[X]_i}{[X]_a} \quad \text{Gleichung 2-1,}$$

mit R als allgemeine Gaskonstante, T als Temperatur, z_x als Wertigkeit von X, und F als Faradaykonstante. Liegt ein permeables Ion in gleicher Konzentration auf beiden Membranseiten vor, fließt es bei 0 mV Spannung nicht durch den Kanal, auch wenn dieser geöffnet ist. Ist unter diesen Umständen bei 0 mV ein messbarer Strom vorhanden, muss ein anderes Ion Ladungsträger sein und das Umkehrpotential wird entsprechend dessen Konzentrationsgradienten und Permeabilität verschoben.

Nach der Theorie des konstanten Feldes wird von einer homogen permeablen Membran ohne Poren ausgegangen, die von den Ionen unabhängig und spontan passiert werden kann. Es wird angenommen, dass ein linearer Verteilungskoeffizient für die Ionen an der Grenzfläche Lösung-Membran vorliegt. Das elektrische Feld in der Membran wird als konstant angenommen. Unter diesen Voraussetzungen lässt sich aus der Nernst'schen Gleichung die Goldman-Hodgkin-Katz-Spannungsgleichung (GHK-Spannungsgleichung) ableiten (Hille 1992): Das Umkehrpotential E_{rev} , bei dem kein messbarer Strom durch den Kanal fließt, ist

$$E_{rev} = \left(\frac{RT}{zF} \right) \ln \frac{[X]_a + \left(\frac{P_y}{P_x} \right) [Y]_a}{[X]_i + \left(\frac{P_y}{P_x} \right) [Y]_i} \quad \text{Gleichung 2-2,}$$

wobei $[X]_a$ und $[Y]_a$ die Ionenkonzentrationen außen, $[X]_i$ und $[Y]_i$ jene auf der Innenseite der Membran und P_x bzw. P_y die jeweiligen Permeabilitäten der Ionen X und Y sind. Diese Gleichung gilt für monovalente Ionen.

Für die Untersuchung zur Slip-Mode-Permeation sollte das Umkehrpotential für mono- und divalente Ionen bestimmt werden. Mit der Lösungskombination B (10 mM $[Na^+]$ außen und innen, vergleiche Tabelle 7-3, S.107 im Anhang) sollte das Potential, bei dem kein Strom messbar ist, bei 0 mV liegen, wenn keine Kalziumionen durch den Na-Kanal fließen. Die

Permeabilität für Kalziumionen wurde als sehr gering beschrieben ($<0,1$; Hille 1992, S. 351); sie gelten als effektive Na-Kanalblocker (Woodhull 1973). Um eine eventuelle Permeation der divalenten Kalziumionen neben den monovalenten Natriumionen beschreiben zu können, muss die GHK-Spannungsgleichung (Gleichung 2-2) erweitert werden (Lewis 1979):

$$E_{rev} = \frac{RT}{F} \ln \frac{[Na^+]_a + 4P'_{Ca}[Ca^{2+}]_a}{[Na^+]_i + 4P'_{Ca}[Ca^{2+}]_i e^{FE_{rev}/RT}} \quad \text{Gleichung 2-3.}$$

Für die Kalziumionen wurde ein neuer Permeabilitätskoeffizient P'_{Ca} eingeführt, da Kalzium eine andere Valenz als Natrium hat. P'_{Ca} ist definiert als:

$$P'_{Ca} = \frac{P_{Ca}}{P_{Na}} \cdot \frac{1}{1 + e^{FE_{rev}/RT}} \quad \text{Gleichung 2-4.}$$

Eine alternative Gleichung findet sich bei Fatt und Ginsborg 1958.

Um eine möglichst große treibende Kraft der Kalziumionen für die Experimente zur Slip-Mode-Permeation zu erhalten, wurden in Lösungskombination B keine intrazellulären Kalziumionen zugesetzt. Eventuell freie Ionen wurden durch 10 mM EGTA gebunden, d.h. $[Ca^{2+}]_i$ kann gleich 0 mM angenommen werden. Die Natriumionenkonzentration betrug innen wie außen 10 mM, so dass $[Na^+]_i = [Na^+]_a = [Na^+]$.

Berücksichtigt man dies, ergibt Gleichung 2-3 aufgelöst nach P'_{Ca} :

$$P'_{Ca} = \frac{[Na^+] \cdot e^{E_{rev}F/RT} - [Na^+]}{4[Ca^{2+}]_a} = \frac{[Na^+] \cdot (e^{E_{rev}F/RT} - 1)}{4[Ca^{2+}]_a} \quad \text{Gleichung 2-5.}$$

Es ergibt sich aus Gleichung 2-4 für die relative Permeabilität P_{Ca}/P_{Na} :

$$\frac{P_{Ca}}{P_{Na}} = P'_{Ca} + P'_{Ca} \cdot e^{FE_{rev}/RT} \quad \text{Gleichung 2-6.}$$

Hierbei ist zu beachten, dass als Voraussetzung angenommen wurde, dass nur Na^+ bzw. Ca^{2+} durch den Kanal permeieren können. Da das Umkehrpotential für die Natriumionen mit $[Na^+]_i = [Na^+]_a$ bei 0 mV liegt und eventuell permeierende Kalziumionen das Umkehrpotential nur in positiver Richtung verschieben können ($[Ca^{2+}]_i = 0$ mM), haben die Gleichungen 2-5 und 2-6 für negative Umkehrpotentiale keine sinnvolle Lösung.

Die GHK-Spannungsgleichung wird oft und zufriedenstellend angewendet, obwohl sie von einigen Voraussetzungen ausgeht, die nicht gegeben sind. Der lineare Verteilungskoeffizient für die Ionen über der Grenzfläche Lösung-Membran berücksichtigt keine Oberflächenladungen, die durch elektrostatische Wechselwirkungen die lokale Ionenkonzentration verändern.

Verschiedene Ladungen auf der Innen- und Außenseite der Membran verursachen einen asymmetrischen Verteilungskoeffizienten.

Die Pore des Na-Kanals ist sehr wahrscheinlich inhomogen, so dass die Annahme der unabhängigen Ionenbewegung und des konstanten Diffusionskoeffizienten nicht mehr gegeben ist. Permeierende Ionen stoßen sich gegenseitig ab, und geladene Aminosäuren führen zu Interaktionen mit Dipolen und Ionen, die eine Stromsättigung zur Folge haben können.

Durch Modifikation der GHK-Gleichung kann die Inhomogenität des elektrischen Feldes oder des Verteilungs- und Diffusionskoeffizienten Rechnung getragen werden. Die Abweichungen von den Vorannahmen wirken sich mehr auf den Strom und weniger auf das gemessene Umkehrpotential aus, da Ladungen zu Ionenbindung führen können, die zwar auf den Strom Einfluss haben, aber nur in geringen Maße auf das Umkehrpotential, bei dem keine messbare Ionenbewegung stattfindet.

Die Bestimmung des Umkehrpotentials für die Experimente zur Slip-Mode-Permeation erfolgte auf 1 mV genau durch detaillierte Betrachtung jedes einzelnen Experiments. Die Ströme wurden durch Spannungspulse von einem Haltepotential von -100 mV in Schritten von 2 mV von -8 mV bis $+18$ mV provoziert. Durch lineare Extrapolation der Maximalströme wurde das Umkehrpotential bestimmt.

2.2.4 Bestimmung der Inaktivierungszeitkonstante

Nach mechanischer Stimulation durch das Perfusionssystem konnte eine Amplitudenabnahme des Na^+ -Stroms beobachtet werden. Um die schnelle Inaktivierung vor und nach Stimulation vergleichen zu können, wurde der abfallende Teil der Na^+ -Stromkurve mit einer einfachen Exponentialfunktion genähert, und die Inaktivierungszeitkonstante bestimmt:

$$I(t) = a_0 + a_1 e^{\frac{-t}{\tau}} \quad \text{Gleichung 2-7.}$$

$I(t)$ ist der Strom in Abhängigkeit von der Zeit t , a_0 ist der nichtinaktivierende Reststrom, a_1 die Amplitude und τ steht für die Inaktivierungszeitkonstante.

2.2.5 Michaelis-Menten-Beziehungen

Um den Effekt von $[\text{Ca}^{2+}]_a$ auf den Auswärtsstrom durch die Na-Kanäle zu untersuchen, wurden die Zellen mit Lösungen mit verschiedenen Kalziumionenkonzentrationen umspült. Dabei galt diejenige Konzentration, die den physiologischen Verhältnissen am nächsten kam, also 2 mM CaCl_2 enthielt, als Referenz. Jeder Messung bei einer anderen extrazellulären

Kalziumionenkonzentration folgte die selbe Messung bei 2 mM $[Ca^{2+}]_a$. In Abhängigkeit von der Spannung lässt sich dadurch die Amplitudenänderung bei X mM $[Ca^{2+}]_a$ im Bad als

$$RatioXmM(U) = \frac{I_{XmM}(U)}{I_{2mM}(U)} \quad \text{Gleichung 2-8}$$

darstellen, wobei I für die Amplitude und U für die Spannung stehen. Für I_{2mM} wurde der Mittelwert aus den Amplituden bei 2 mM $[Ca^{2+}]_a$ vor und nach der Messung bei X mM $[Ca^{2+}]_a$ gebildet.

Das gleiche Verhältnis wurde für $[Mg^{2+}]_a$ errechnet. Bei 10 mM $[Mg^{2+}]_a$ war die Amplitude in etwa so groß wie bei 2 mM $[Ca^{2+}]_a$. Daher wurde der Strom bei 10 mM $[Mg^{2+}]_a$ als Referenz gewählt.

Durch die Verhältnisbildung kann die Stromveränderung bei einer festgesetzten Spannung in Abhängigkeit von der Konzentration dargestellt werden. Es wird davon ausgegangen, dass der Strom bei 0 mM $[Ca^{2+}]_a$ 0 A beträgt. Die Daten lassen sich mit der Michaelis-Menten-Gleichung beschreiben

$$RatioXmV([Ca^{2+}]_a) = \frac{V_{\max}}{1 + \left(\frac{K_d}{[Ca^{2+}]_a} \right)^h} \quad \text{Gleichung 2-9,}$$

wobei RatioXmV für das Amplitudenverhältnis bei X mV, V_{\max} für das maximal erreichbare Verhältnis, K_d für die halb-maximale-Konzentration und h für den Hill-Koeffizient steht. K_d ist die Konzentration, bei der die Amplitude die Hälfte des maximal möglichen Wertes annimmt.

Unter der Annahme, dass bei 0 mM $[Ca^{2+}]_a$ Strom fließt, wird aus Gleichung 2-9 die modifizierte Michaelis-Menten-Gleichung:

$$RatioXmV([Ca^{2+}]_a) = V_{\min} + \frac{V_{\max} - V_{\min}}{1 + \left(\frac{K_d}{[Ca^{2+}]_a} \right)^h} \quad \text{Gleichung 2-10,}$$

wobei V_{\min} für die relative minimale Stromhöhe bei 0 mM $[Ca^{2+}]_a$ steht.

2.2.6 Nichtstationäre Rauschanalyse

Variationen des makroskopischen Stroms durch die Na-Kanäle, $I(U)$, beruhen entweder auf einer Veränderung des Einzelkanalstroms $i(U)$, der Anzahl n der vorhandenen Kanäle oder der Offenwahrscheinlichkeit p_o für diese Kanalpopulation oder einer Kombination aus diesen drei Parametern (Sigworth 1980).

Mit Hilfe der nichtstationären Rauschanalyse kann man aus dem Rauschen, das durch das beständige Öffnen und Schließen der Kanäle verursacht wird, Informationen über die drei genannten Parameter erhalten. Dazu wird die Varianz des Stroms mit dessen Mittelwert zum selben Zeitpunkt mit Hilfe eines Algorithmus von Heinemann und Conti 1992 verglichen.

Für eine bestimmte Badlösung beträgt der Gesamtstrom $I(U)$ bei n Kanälen und der Offenwahrscheinlichkeit p_o :

$$I(U) = n \cdot i(U) p_o(U) \quad \text{Gleichung 2-11,}$$

Daraus ergibt sich für die Varianz σ^2 des Stroms

$$\sigma^2 = \sigma_h^2 + i(U)I(U) - \frac{I^2(U)}{n} \quad \text{Gleichung 2-12,}$$

wobei σ_h^2 die Hintergrundvarianz ist. Gleichung 2-12 beschreibt eine Parabel, welche die I-Achse bei $n \cdot i(U)$ schneidet. An diesem Punkt ist die Offenwahrscheinlichkeit 1, das heißt, dass alle vorhandenen Kanäle geöffnet sind und kein Rauschen erzeugen.

Die Steigung dieser Parabel beträgt im Ursprung i . Mit Hilfe geeigneter Experimente lassen sich demnach i , n und p_o abschätzen.

In dieser Arbeit wurden Rauschanalysen an HEK293_hNav1.5-Zellen in Ganzzell-Patch-Clamp-Konfiguration durchgeführt.

Um möglichst genaue Daten für den Mittelwert des Stroms und seine Varianz zu erhalten wurden in schneller Folge 500 Spannungspulse auf +60 mV appliziert und die Stromantwort mit 40 kHz abgetastet. An eine Sequenz von 500 Spannungspulsen schlossen sich 300 Leckpulse auf -80 mV an.

Die Leckkorrektur, die Errechnung des Mittelwertes und der Varianz erfolgte mit Hilfe des Programms PulseTools (HEKA Elektronik) nach dem von Heinemann und Conti 1992 beschriebenen Algorithmus. Die Varianz des absteigenden Teiles der Stromkurve wurde über den Mittelwert des Stroms abgetragen und mit Gleichung 2-12 genähert (vergleiche 3.3.1.3, S.60 ff).

2.3 Elektronenmikroskopie

2.3.1 Gefrierbruchtechnik

HEK293-Zellen wurden in Kulturflaschen gezüchtet, bis sie den Boden ganz bedeckten. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS-Puffer (NaCl 8 g, KCl 0,2 g, Na₂HPO₄ 1,44 g, KH₂PO₄ 0,24 g in 800 ml H₂O auflösen auf 1 l auffüllen und pH mit HCl auf 7,4 einstellen), wurden sie

eine halbe bis eine Stunde lang in 2-2,5%iger Glutaraldehydlösung (Serva, Feinbiochemica, Heidelberg) fixiert. Die Zellen wurden erneut gewaschen und in 1 ml PBS-Puffer vom Flaschenboden abgeschabt. Nach langsamen Zentrifugieren wurde das Pellet in 100 µl PBS mit 20% Glycerin als Kälteschutz resuspendiert. Kleine Mengen der Zellsuspension wurden zwischen zwei 0,1 mm Kupferplättchen gebracht („Sandwich-Technik“) und in flüssigem Propan, das durch flüssigen Stickstoff gekühlt wurde, schockgefrostet.

Unter Vakuum wurden die Plättchen in einer BAF400T Gefrierbrucheinheit (Bal-Tec, Liechtenstein) bei $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufgebrochen. Die aufgebrochenen Proben wurden zur Kontrastierung in einem Winkel von 35° mit einer 2-2,5 nm Platin-Kohle-Schicht und zur Stabilisierung senkrecht mit einer 50 nm Kohle-Schicht bedampft. Anschließend wurden die organischen Bestandteile mit Natriumhypochlorid (12% aktives Cl, 1:1 mit Wasser verdünnt) abgedaut. Die Replika wurden in destilliertem Wasser gewaschen und auf unbeschichtete Kupfernetze aufgefischt. Diese konnten im EM 902 Elektronenmikroskop (Zeiss, Oberkochen) untersucht werden (Westermann et al. 1999).

2.3.2 Ultradünnschnitt-Elektronenmikroskopie von in Epoxydharz eingebetteten Herzmuskelbiopsien

Es wurden asservierte humane Herzmuskelbiopsien des Instituts für Pathologie untersucht, welche bereits fixiert vorlagen. Die Fixierung der Biopsien war in 4%igem Glutaraldehyd für vier Stunden erfolgt, anschließend wurden sie in Cacodylatpuffer gewaschen und mit 1% Osmiumtetroxyd für 2 h zusätzlich fixiert. Nach Dehydratisierung in ansteigender Konzentration von Aceton, wobei hierbei gleichzeitig zur zweiten Kontrastierung 2% Uranylacetat zugegeben wurde, und anschließend in 100% Propylenoxid, wurden die Proben in Vestopal (Boehringer) eingelegt, welches während 48 Stunden bei $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ auspolymerisierte. Im Lichtmikroskop wurde anhand eines Semidünnschnittes (ca. $1\text{ }\mu\text{m}$) eine passende Probe ausgewählt und unter optischer Kontrolle in sehr dünne Scheiben geschnitten. Ultradünne Schnitte (ca. 30-50 nm) wurden auf Kupfernetze aufgebracht und nach Reynold'scher Bleikontrastierung im EM 902 Elektronenmikroskop (Zeiss, Oberkochen) untersucht.

2.3.3 Immunzytologische Elektronenmikroskopie

Um die eventuelle Kolo-kalisation des Na-Kanals mit Kaveolen auf elektronenmikroskopischen Bildern nachzuweisen, wurden die Membranoberflächen mit der Gefrierbruchtechnik dargestellt und mit Antikörpern gegen Kaveolin-1 und Na-Kanäle behandelt.

Dazu wurden unfixierte HEK293_hNav1.5-Zellen in 1 ml PBS vom Boden der Kulturflasche abgeschabt, wie unter 2.3.1 beschrieben gefriergebrochen und mit Kohle-Platin und anschließend mit Kohle alleine bedampft. Für ca. 16 Stunden wurden Zellreste von den Replika mit 2,5% SDS in 10 mM Tris-HCl-Puffer und 30 mM Sukrose bei pH = 8 auf dem Schüttler abgedaut (Fujimoto 1997). Nach mehrfachem Waschen mit PBS wurden die Replika auf einen Tropfen PBS mit 1% BSA (bovine serum albumine, Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) gelegt und nach 30 min auf einem Tropfen mit 1:25 Anti-SP19-Antikörper (vergleiche 2.1.5) in TBS mit 0,5% BSA für 1h inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit 0,5% BSA in PBS wurden die Replika für eine Stunde auf einen Tropfen TBS mit 0,5% BSA und dem zweiten goldgebundenen Antikörper (Ziegen-Anti-Kaninchen-Antikörper mit 10 nm Gold Kügelchen, British Biocell International, Cardiff, UK) im Verhältnis 1:50 gelegt.

Nach erneutem Waschen wurden die Proben in 0,5% Glutaraldehyd in PBS fixiert, mit destilliertem Wasser gespült, auf beschichtete Kupfernetze (400mesh) aufgefischt und im Elektronenmikroskop untersucht (Hoischen et al. 2002).

Die unter 2.3.1, 2.3.2 und 2.3.3 beschriebenen Arbeitsschritte (außer der Kultur und Fixierung der HEK293-Zellen) wurden in Kooperation mit Dr. Martin Westermann (Institut für Ultrastrukturforschung, Friedrich-Schiller-Universität Jena) und Frau Beck (Pathologisches Institut der Friedrich-Schiller-Universität Jena) durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Slip-Mode-Permeation durch hNav1.5

Na-Kanäle sind für Na^+ -Ionen gegenüber Kationen wie K^+ und Ca^{2+} sehr selektiv (Heinemann et al. 1992b; Hille 1992). Die Diskrimination zwischen Na^+ und Ca^{2+} hat physiologisch besonders in den Herzmuskelzellen Bedeutung, da hier ein kleiner Ca^{2+} -Einwärtsstrom zu intrazellulärer Kalziumionenfreisetzung und damit zur Kontraktion führt. Die für diese Selektivität verantwortlichen Aminosäuren des Na-Kanals konnten identifiziert werden (Heinemann et al. 1992b), und man ging davon aus, dass es sich um eine nicht-veränderliche und nicht-regulierbare Kanaleigenschaft handelt.

Santana et al. 1998 berichteten eine starke Erhöhung der Kalziumionenleitfähigkeit durch Na-Kanäle in Herzzellen nach cAMP-abhängiger Phosphorylierung. Die Messungen wurden mit Rattenherzzellen durchgeführt. Um ein molekulares Verständnis dieses Phänomens erlangen zu können, sollte der Na-Kanal des Herzens isoliert und ohne Einflüsse von weiteren Kanälen oder Proteinen der Herzzellen untersucht werden. Dazu wurde hNav1.5 in HEK293-Zellen heterolog exprimiert und auf das von Santana et al. 1998 beschriebene Phänomen Slip-Mode-Permeation hin mit Umkehrpotentialmessungen untersucht.

Wir gingen davon aus, dass eine mögliche Kalziumionenpermeation relativ klein sein werde und sich daher auch nur gering auf das Na^+ -Umkehrpotential auswirken werde. Daher wurden Bedingungen gewählt, unter denen man das Umkehrpotential mit hoher Auflösung messen konnte. Das bedeutete, dass die $[\text{Na}^+]_i$ relativ zu $[\text{Ca}^{2+}]_a$ gering gehalten wurde. Es wurde für alle Messungen $[\text{Na}^+]_a$ zum großen Teil durch $[\text{Cs}^+]_a$ ersetzt, so dass $[\text{Na}^+]_i = [\text{Na}^+]_a$ und das theoretische Umkehrpotential ohne Slip-Mode-Permeation bei 0 mV lag, einem Potential, bei dem der Kanal aktiviert ist, eventuelle Ströme also gut messbar wären. Abbildung 3-1 A zeigt das Spannungsprotokoll und die Stromantwort, aus der über die Maximalströme das Umkehrpotential bestimmt wurde (Teil B der Abbildung).

Mit symmetrischen Natriumkonzentrationen in Bad- und Pipettenlösungen lag das Umkehrpotential der Kontrollmessungen mit der α -Untereinheit alleine ohne Forskolin-stimulation bei allen drei untersuchten $[\text{Ca}^{2+}]_a$ nahe 0 mV, siehe Tabelle in Abbildung 3-2 A.

Sympathische Stimulation mit 40 μM Forskolin, welches die zelleigene Proteinkinase A zu cAMP-abhängiger Kanalphosphorylierung anregt, führte zu einer Amplitudenreduktion (wie beispielsweise bei Ono et al. 1989 beschrieben). Die Badlösung wurde mit einem Perfusionssystem, gewechselt. Sollten die Na-Kanäle nach Stimulation mit Forskolin für Kalziumionen durchlässiger werden, wie es für die Slip-Mode-Permeation beschrieben wurde, müsste sich dies in einer Verschiebung des Umkehrpotentials in positiver Richtung auswirken. Wie der Tabelle in Abbildung 3-2 A zu entnehmen ist, blieb das Umkehrpotential nach sympathischer Stimulation bei ungefähr 0 mV, die Veränderungen waren nicht signifikant von null verschieden.

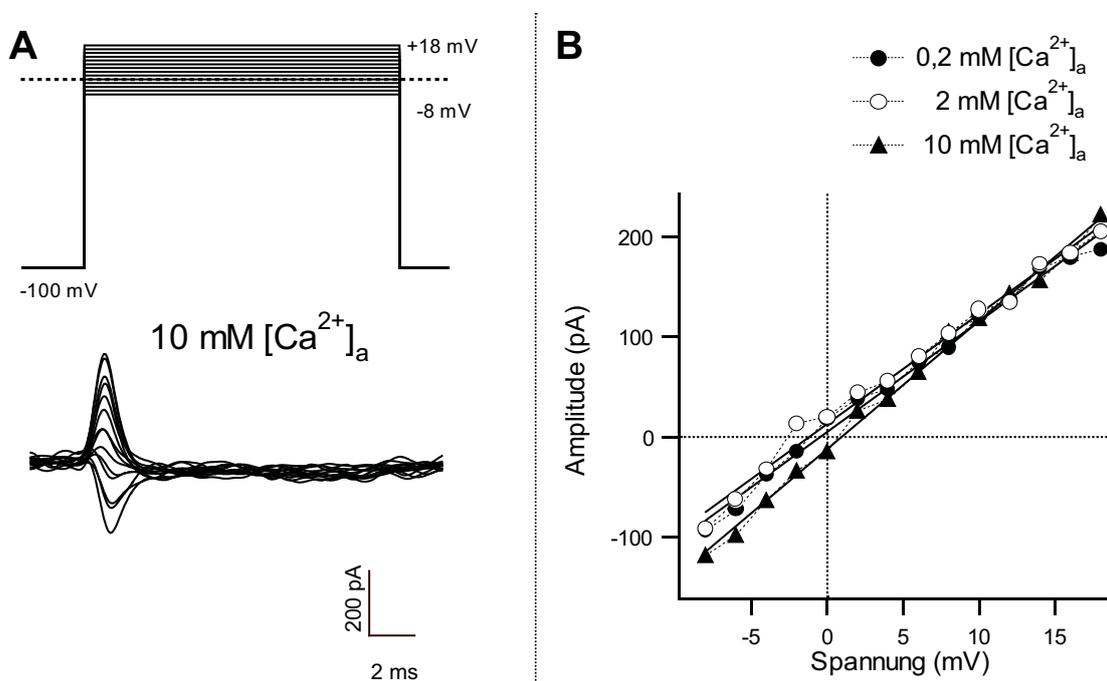


Abbildung 3-1. hNa_v1.5: **A**: Spannungsprotokoll (Spannungspulse von -100 mV auf Potentiale zwischen -8 mV und +18 mV in Schritten von 2 mV) und Originalaufnahmen der Stromantworten durch hNa_v1.5 transfiziert in HEK293-Zellen, [Ca²⁺]_a = 10 mM. **B**: Strom- Spannungskurve von Messungen derselben Zelle. Einzelne Messpunkte sind durch gerade gepunktete Linien verbunden. Die durchgezogenen Linien stellen lineare Näherungen an die Messpunkte dar. Lösungskombination B.

Die sehr geringe Verschiebung zu negativen Spannungen unter Forskolin kann nicht durch permeierende Kalziumionen verursacht sein, da [Ca²⁺]_i = 0 mM (die Pipettenlösung enthielt 10 mM EGTA). Sie kann auf andere permeierende Ionen (beispielsweise Cs⁺) oder den bei Messungen dieser kleinen Stromgrößen auftretenden Fehler zurückzuführen sein.

A

$[Ca^{2+}]_a$	Kontrolle	n	Forskolin-stimuliert	n
hNav1.5 α- Untereinheit				
0,2 mM	0,94 mV \pm 0,90 mV	6	-0,32 mV \pm 0,27 mV	6
2 mM	0,80 mV \pm 0,75 mV	7	0,32 mV \pm 0,42 mV	9
10 mM	0,96 mV \pm 0,70 mV	6	-0,09 mV \pm 0,33 mV	6
hNav1.5 α- und β1- Untereinheit				
0,2 mM	0,52 mV \pm 0,69 mV	8	0,35 mV \pm 0,79 mV	6
2 mM	0,42 mV \pm 0,85 mV	6	-0,11 mV \pm 0,73 mV	8
10 mM	0,55 mV \pm 0,61 mV	8	0,26 mV \pm 0,77 mV	5

B

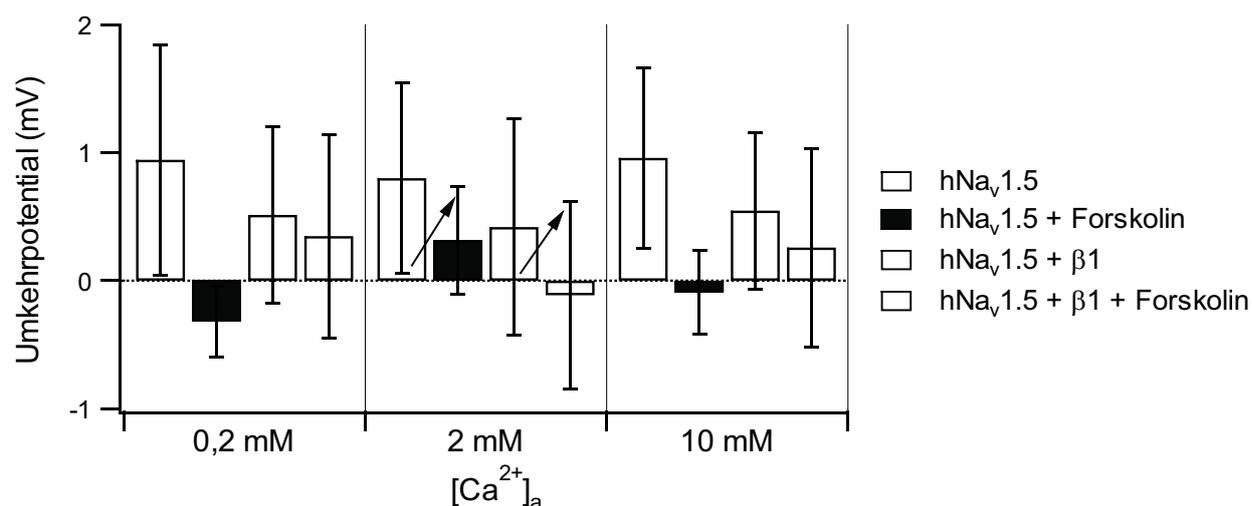


Abbildung 3-2. hNav_v1.5, Umkehrpotentiale bei drei verschiedenen $[Ca^{2+}]_a$ (Lösungskombination B ohne (Kontrolle) und mit 40 μ M Forskolin in der Badlösung). **A:** Mittelwerte der gemessenen Umkehrpotentiale, n gibt die Anzahl der gemessenen Zellen an. **B:** Mittelwerte der Umkehrpotentiale der α -Untereinheit vor (weiße Balken) bzw. nach Forskolinstimulation (graue Balken) und der koexprimierten α - und β 1-Untereinheit vor (gepunktete Balken) bzw. nach Forskolinstimulation (gestreifte Balken). Die Pfeile kennzeichnen die größte theoretisch denkbare Veränderung des Umkehrpotentials innerhalb des errechneten Fehlers im Sinne einer Slip-Mode-Permeation bei 2 mM $[Ca^{2+}]_a$.

Jeder Messpunkt, der in die Mittelwertberechnung einging, entstand aus 4 bis 37 Einzelmessungen pro Zelle. Die Fehlerangaben entsprechen dem SEM.

Die in den vorliegenden Experimenten nicht nachweisbare Kalziumpermeation durch den Na-Kanal könnte auf einen fehlenden Faktor zurückzuführen sein, der in Herzzellen natürlicherweise vorliegt. Na-Kanäle assoziieren mit β -Untereinheiten, und auch im Herzen kann von so einer Verbindung ausgegangen werden (vergleiche Einleitung 1.2.1, S.4). Die kleinere Untereinheit hat regulierenden Einfluss auf das Kanalprotein, sodass eine wesentliche Rolle in der Slip-Mode-Permeation nicht auszuschließen ist. Santana et al. 1998 führten ihre Experimente in Rattenherzzellen durch. Der Kanal interagiert dort mit der kleineren Untereinheit, daher wurde die hier untersuchte HEK293_hNav1.5-Zelllinie mit der $\beta 1$ -Untereinheit kotransfiziert. Als Marker-DNS wurde CD8 zugegeben, und nur Zellen, die mit einem Anti-CD8-Antikörper detektiert werden konnten, wurden untersucht.

Unter den gleichen Versuchsbedingungen wie oben lag das Umkehrpotential der mit der $\beta 1$ -Untereinheit kotransfizierten Kanäle bei ungefähr 0 mV, wie in der Tabelle in Abbildung 3-2 A dargestellt. Auch hier wurde es leicht in negative Richtung verschoben, was nicht mit der Theorie der Slip-Mode-Permeation erklärt werden kann.

Geht man davon aus, dass von den in den gewählten Lösungen vorhandenen Ionen nur Na^+ und Ca^{2+} permeabel sind, so kann bei symmetrischer $[\text{Na}^+]_i$ nur $[\text{Ca}^{2+}]_a$ das Umkehrpotential verschieben. Da $[\text{Ca}^{2+}]_i = 0$ mM, kann die Verschiebung nur von Null zu positiven Werten hin stattfinden. Es ist also theoretisch kein negatives Umkehrpotential möglich. Mit diesen Voraussetzungen ließ sich der Permeationskoeffizient $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}}$ mit Gleichung 2-6 aus 2.2.3, S.29 ff berechnen. Die Daten der Messungen bei 2 mM $[\text{Ca}^{2+}]_a$ α -Untereinheit alleine ergaben als konservativstes Ergebnis ein minimales Umkehrpotential der unstimulierten Zellen innerhalb des errechneten Fehlers von $E_{\text{rev}} = 0,05$ mV. Nach Stimulation betrug E_{rev} maximal 0,74 mV (vergleiche Abbildung 3-2 B, die Pfeile verdeutlichen die jeweils größtmögliche Veränderung des Umkehrpotentials im Sinne einer Slip-Mode-Permeation). Damit stieg $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}}$ bei 2 mM $[\text{Ca}^{2+}]_a$ als oberste Abschätzung von 0,01 ohne Stimulation auf 0,08 nach Forskolinexposition.

Betrachtet man die Daten der mit der $\beta 1$ -Untereinheit koexprimierten Kanäle, so muss für die Kontrolle das Umkehrpotential als gleich null angenommen werden, da nach den theoretischen Voraussetzungen das Umkehrpotential nicht negativ werden kann (theoretisch gibt es intrazellulär keine permeablen Ionen außer Na^+ , aber $[\text{Na}^+]_a = [\text{Na}^+]_i$). Für die Messungen nach Stimulation ergibt E_{rev} innerhalb des errechneten Fehlers maximal 0,62 mV. Die relative Permeabilität $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}}$ stieg theoretisch unter Forskolinstimulation maximal von 0 auf 0,031.

3.2 Auswirkung von mechanischer Stimulation auf die Stromamplitude durch rNa_v1.4

Bei den Untersuchungen zur Slip-Mode-Permeation fiel auf, dass zu Beginn eines Experimentes die Stromamplitude mit Einschalten des Perfusionssystems regelmäßig abnahm. Da die Zellen mit Badlösung umspült wurden, ist die Amplitudenabnahme nicht auf eine Ionenkonzentrationsänderung zurückzuführen. Vielmehr ist die mechanische Stimulation durch den Flüssigkeitsstrom als Auslöser in Betracht zu ziehen.

Die Stromabnahme nach Einschalten des Perfusionssystems konnte an hNa_v1.5 und rNa_v1.4 beobachtet werden. Für die folgenden Versuche wurde die bereits vorhandene stabil mit rNa_v1.4 transfizierte HEK293-Zelllinie verwendet (Chen et al. 2000).

3.2.1 Quantitative Beschreibung der Stromamplitudenabnahme

Abbildung 3-3 A zeigt jeweils drei typische Stromantworten auf einen Testpuls auf -20 mV durch rNa_v1.4 vor (schwarze Linien) und nach (graue Linien) Anschalten des Perfusionssystems. Der Abstand zwischen den Spannungspulsen betrug 15 Sekunden. Die Zelle wurde direkt nach dem Einschalten der Perfusion dem Flüssigkeitsstrom und damit einer mechanischen Beanspruchung ausgesetzt. Nach dieser Stimulation der Zelle kommt es zu einer Reduktion der Stromamplitude, wobei das Umkehrpotential gleich blieb (bei Lösungskombination C ca. 40 mV). Dieser Vorgang war teilweise reversibel.

Um die Stromabnahme zu quantifizieren, wurde aus der Amplitude vor mechanischer Stimulation (I_v) und danach (I_n) die relative Abweichung errechnet: $\frac{I_v - I_n}{I_v}$.

Im Verlauf der Experimente zeigte sich, dass die Amplitudenreduktion sehr variabel ist. Über vier Monate hinweg wurden 79 Messungen an HEK293_rNa_v1.4-Zellen durchgeführt. Abbildung 3-3 B veranschaulicht den zeitlichen Verlauf der Ausprägung der relativen Stromabnahme. Die Amplitudenabnahme ließ sich durch Anschalten des Perfusionssystems und durch einfaches Betropfen der Zellen mit Hilfe einer Pasteurpipette auslösen, wie dies bei den ersten elf Experimenten geschah. Abbildung 3-3 B lässt eine aperiodische Veränderung der Amplitudenabnahme erkennen. Nach anfänglich großer Stromabnahme nach mechanischer Stimulation wurde diese geringer, um dann um das Experiment mit der Nummer 60 wieder etwas ausgeprägter zu werden. Dies deutet darauf hin, dass die Dauer und Art der Zellkultivierung einen Einfluss auf die Stromreduktion nach mechanischer Stimulation haben könnte.

Das Histogramm in der Abbildung 3-3 C zeigt, dass die Stromamplitude nach mechanischer Stimulation in den meisten Fällen kleiner wurde, der Median liegt bei einer relativen Amplitudenreduktion von 0,11 (gestrichelte Linie).

Bei der Kultivierung werden die Zellen mit Trypsin vom Boden der Kulturflasche abgelöst und für die Messungen auf kleine Messschalen ausplattiert. Man geht davon aus, dass der Zellzyklus dadurch teilsynchronisiert wird. Betrachtet man die Messergebnisse mit unterschiedlichem zeitlichen Abstand zum Ausplattieren, so ist anzunehmen, dass sich die Zellen jeweils in anderen Zyklusphasen befinden. Dieser Umstand könnte sich auf die beobachteten Effekte auswirken.

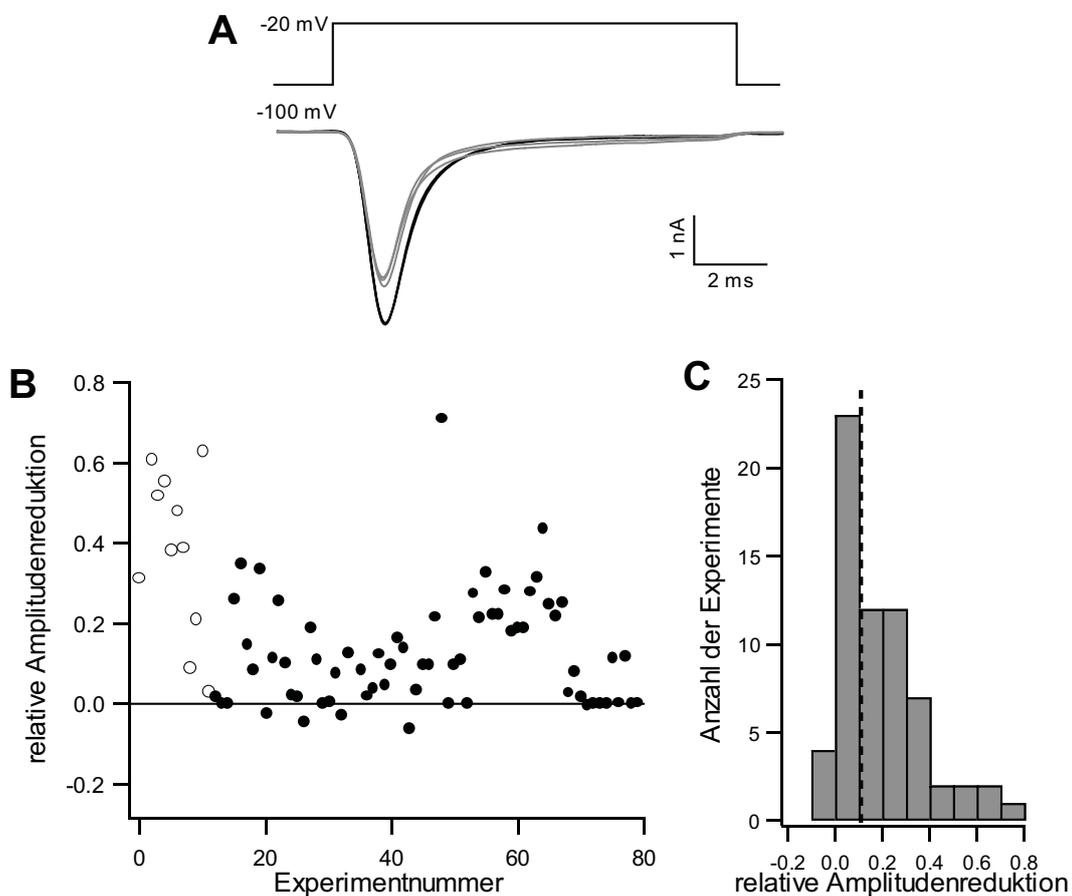


Abbildung 3-3. rNav1.4: **A:** Stromantworten auf jeweils drei Testpulse von -100 mV auf -20 mV vor (schwarze Linien) und nach (graue Linien) Anschalten des Perfusionssystems. **B:** Relative Amplitudenreduktion nach Anschalten des Perfusionssystems in chronologischer Folge der Experimente. **C:** Häufigkeiten der Ausprägungen der relativen Amplitudenreduktion. Die gestrichelte Linie zeigt den Median bei 0,11 an.

Lösungskombination B2 für die ersten elf Experimente (offene Kreise), dann Lösungskombination C (gefüllte Kreise und Teil A der Abbildung).

Um Einflussfaktoren der Zellkultur genauer betrachten zu können, wurde die Amplitudenabnahme in Abhängigkeit von der Zeit nach dem Ausplattieren untersucht. Wie in Abbildung 3-4 A dargestellt, war die relative Stromabnahme nach vier (0.25) bzw., schließt man die ersten elf Experimente aus, nach 5 Tagen (0.22) am größten.

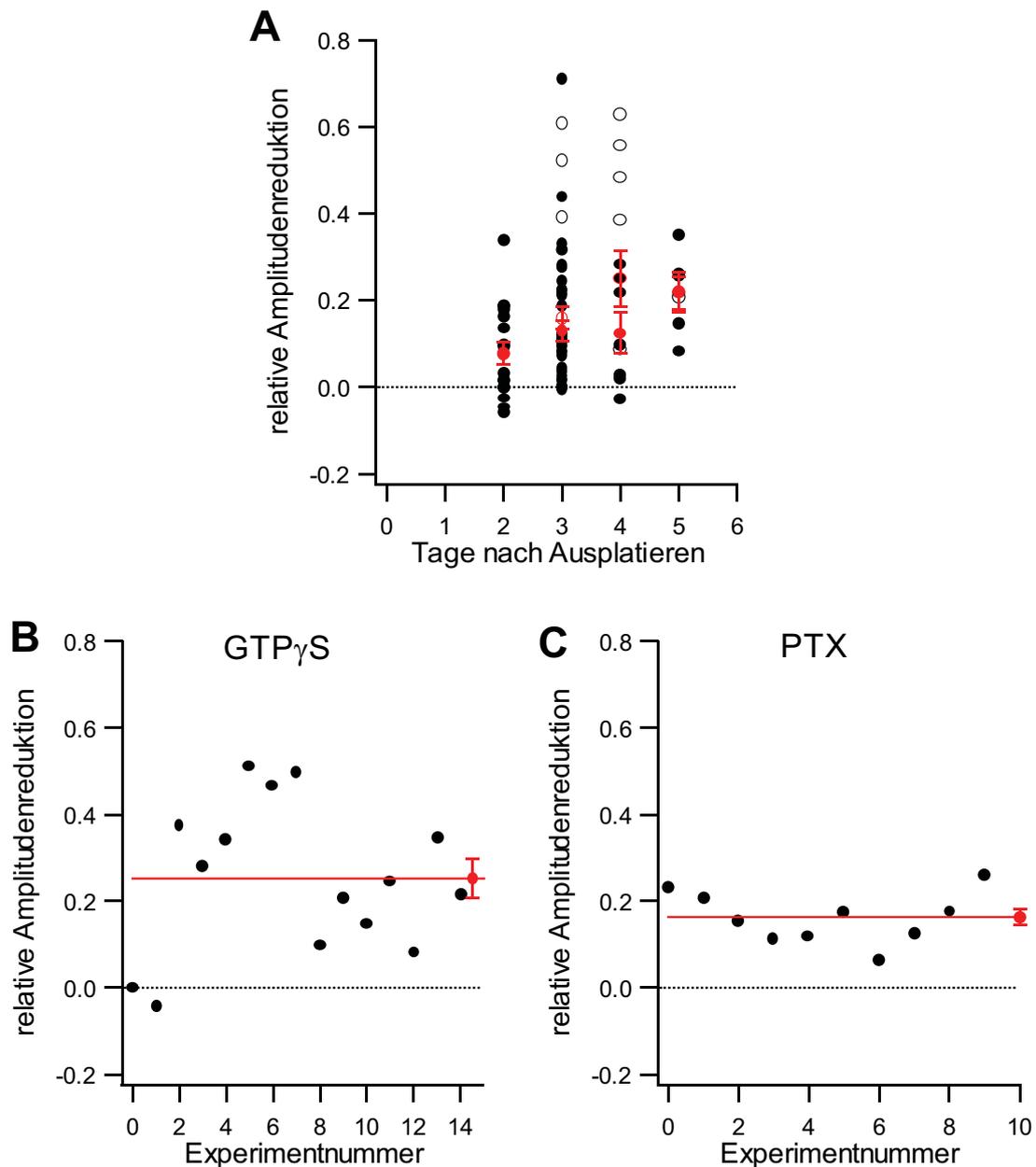


Abbildung 3-4. rNa_v1.4, relative Amplitudenreduktion nach mechanischer Stimulation: **A**: Darstellung des Ausmaßes der Amplitudenreduktion in Abhängigkeit des zeitlichen Abstandes zum Ausplattieren. Lösungskombination B2 (offene Kreise) und C (gefüllte Kreise). **B**: Messergebnisse mit GTP γ S in der Pipettenlösung; Experiment Nr.1, 2, 13, 14 erfolgten drei Tage, Nr. 3-7 vier Tage und Nr. 8-12 zwei Tage nach Ausplattieren. **C**: Messergebnisse mit PTX in der Pipettenlösung; Experiment Nr. 1-5 erfolgten drei, Nr. 6-10 vier Tage nach Ausplattieren.

Lösungskombination D für Teil B und C der Abbildung. Die roten Linien und Markierungspunkte stellen den Mittelwert dar, jeweils mit SEM.

Dieser zeitabhängige Anstieg der Empfindlichkeit der Zellen auf mechanische Stimulation bedeutet, dass eine zelluläre Regulation, beispielsweise aufgrund unterschiedlicher Zyklusphasen oder Zelldichten auf den Kulturschalen bzw. Nährstoffzusammensetzungen des Mediums, in Betracht gezogen werden kann.

Ein einflussreicher und gut untersuchter Signalweg der zellulären Regulation in Säugerzellen verläuft über G-Proteine. Auch Ionenkanäle unterliegen G-Protein-gesteuerten Prozessen. Diese lassen sich pharmakologisch, beispielsweise mittels Dauerstimulation durch GTP γ S, beeinflussen.

An Hand von 14 Experimenten wurde die Empfindlichkeit des Einwärtsstroms auf mechanische Stimulation mit 400 μ M GTP γ S in der Pipettenlösung untersucht. Wie in Abbildung 3-4 B dargestellt, war weiterhin eine Amplitudenreduktion auslösbar. Die Messungen wurden in etwa zeitgleich mit den Experimenten um Nummer 55 durch geführt (vergleiche Abbildung 3-3 B).

Der G_i-Proteinblocker PTX bewirkte als Zusatz zur Pipettenlösung ebenfalls keine Veränderung der Empfindlichkeit der Stromamplitude gegenüber mechanischem Stress (vergleiche Abbildung 3-4 C). Die Messungen wurden um das Experiment Nummer 75 durchgeführt.

Eine Regulationsmöglichkeit der Empfindlichkeit des Na-Kanals gegenüber mechanischem Stress durch G-Proteine konnte mit diesen Messungen nicht nachgewiesen werden.

Eine Reduktion der Stromamplitude könnte durch Änderung der Schaltvorgänge der Na-Kanäle ausgelöst werden. Durch mechanische Reizung könnte die Aktivierung oder Inaktivierung verändert werden, was sich auf die Stromamplitude auswirken würde. Als Indikator für Veränderungen der Schaltvorgänge wurde die Inaktivierungskonstante vor (τ_v) und nach Stimulation (τ_n) untersucht. Aus beiden Werten wurde ein Quotient gebildet, um die relative Veränderung darstellen zu können ($\frac{\tau_v - \tau_n}{\tau_v}$). Der Mittelwert lag bei $0,053 \pm 0,03$, also nur leicht von Null verschieden (Abbildung 3-5 A). Die Richtung der Veränderung würde eher für eine Amplitudenzunahme nach mechanischer Stimulation sprechen und kann die beschriebene Abnahme nicht erklären. Die Amplitudenreduktion scheint aufgrund dieser Datenlage nicht auf eine veränderte Inaktivierung zurückzuführen zu sein.

HEK293-Zellen exprimieren teilweise endogen Na-Kanäle (Ukomadu et al. 1992; Cummins et al. 1993), die in einem kleinen Prozentsatz der Zellen einen Strom bis 200 pA

messbar werden lassen. In transfizierten Zellen ist der gemessene Strom (mit den verwendeten Lösungen) meist größer als 1 nA. Es ist denkbar, dass die transfizierten Kanäle einer anderen zellinternen Prozessierung unterliegen, als die endogenen. So könnten eventuell die in HEK293-Zellen vorhandenen $\beta 1$ -Untereinheiten (Moran et al. 2000) nicht für alle Kanäle ausreichen, oder die Zytoskelettverbindung wird anders gestaltet. Es ist auch denkbar, dass die Kanäle in verschiedene Zellmembranabschnitte lokalisiert werden. Um zwischen endogenen und transfizierten Kanälen unterscheiden zu können, wurde die Stromamplitude vor mechanischer Stimulation als Indikator für die Kanalexpression untersucht. In Abbildung 3-5 B ist die relative Amplitudenreduktion über der Stromhöhe vor Anschalten des Perfusionssystems dargestellt. Die Stromveränderung scheint allgemein mit größerer Ausgangsamplitude geringer ausgeprägt zu sein. Die gestrichelte Linie ist eine den Daten angepasste Gerade, es ergibt sich ein Korrelationskoeffizient von 0,19. Dies deutet auf einen schwachen Zusammenhang zwischen Stromgröße und beobachtetem Effekt hin.

Bei 500 pA ist in Abbildung 3-5 B zur Verdeutlichung eine gepunktete Linie eingefügt. Größere Ströme können mit relativ hoher Wahrscheinlichkeit als durch transfizierte Kanäle hervorgerufen gelten. Vor allem die sehr kleinen Ströme, die möglicherweise durch endogene Kanäle fließen, zeigen eine Amplitudenreduktion nach mechanischer Stimulation.

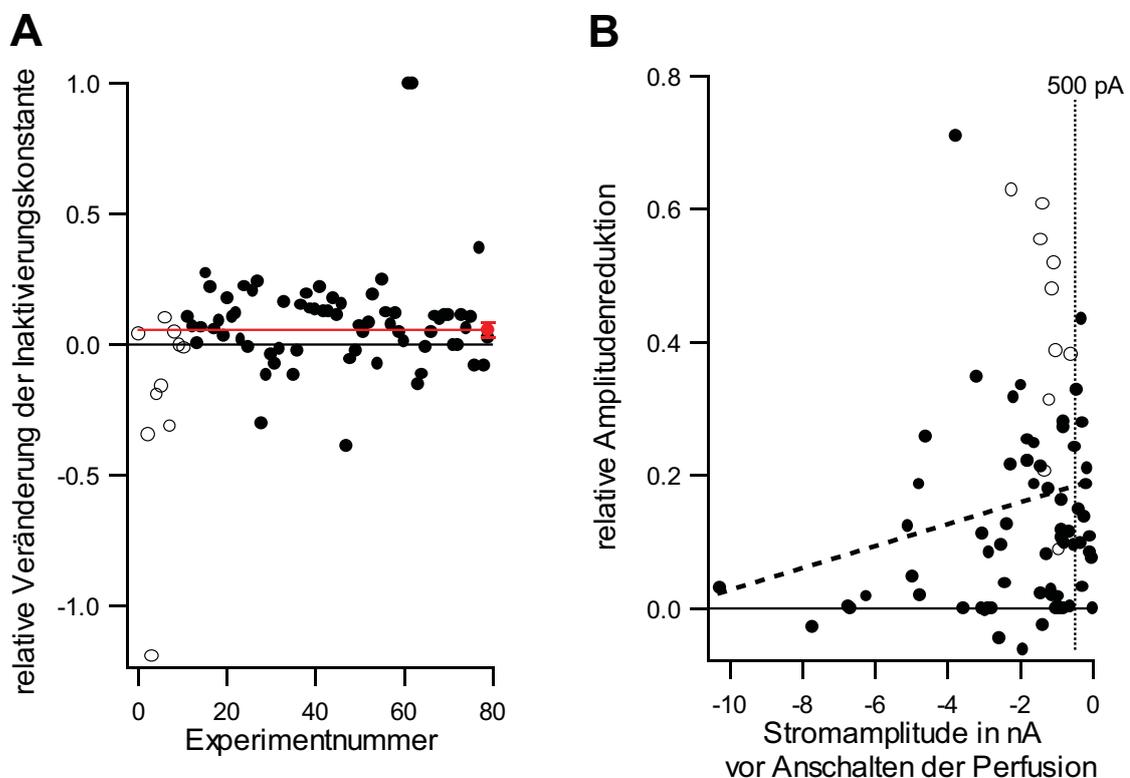


Abbildung 3-5. $rNa_{v1.4}$: **A**: Relative Änderung der Inaktivierungskonstante nach mechanischer Stimulation. Die rote Linie und der rot gefüllte Kreis stellen den Mittelwert mit SEM dar. **B**: Relative Amplitudenabnahme in Abhängigkeit von der Stromamplitude vor mechanischer Stimulation.

Lösungskombination B2 (offene Kreise) für die ersten elf Experimente, sonst Lösungskombination C (gefüllte Kreise).

3.2.2 Kaveolen

Die wissenschaftliche Debatte zu der Zeit, in der diese Experimente durchgeführt wurden, beschäftigte sich mit dem Phänomen der Signaltransduktion durch Kaveolen (vergleiche für eine Übersicht Anderson 1998). Kaveolen sind kleine Membraneinstülpungen, die sich einschnüren können. Sie haben ein Markerprotein, Kaveolin, welches in der Halsregion dieser Membranabschnitte gelegen ist. Je nach Zelltyp handelt es sich um Kaveolin-1, -2 oder -3, bzw. um eine Mischung aus diesen drei Proteinen (in Bindegewebszellen herrscht z. B. Kaveolin-1 vor). Die Proteine, die in der sich abschnürenden Membran gelegen sind, werden von der Zelloberfläche entfernt. Dadurch kann deren Expressionsgrad auf der Zellmembran in relativ kurzer Zeit reguliert werden.

Bisher ist nicht eindeutig geklärt, welcher Reiz die Internalisierung von Kaveolen veranlasst. Ein Zusammenhang mit G-Proteinen wird diskutiert (Schnitzer et al. 1995a; Li et al. 1995; Schnitzer et al. 1996; Henley et al. 1998; Rizzo et al. 1998), jedoch auch zytoskelettvermittelte Mechanismen, die eine Verbindung zur Mechanotransduktion möglich machen (Parton et al. 1994; zur Rolle der Kaveolen in der Mechanotransduktion siehe Rizzo et al. 1998).

Bisher wurden in diesen Membraneinstülpungen vor allem Proteine der Signaltransduktion identifiziert, wie beispielsweise die MAP-Kinase (Lisanti et al. 1994; Liu et al. 1996). Kaveolen haben vermutlich über heterotrimere G-Proteine einen Einfluss auf Aktivität und Kinetik von Ca-Kanälen in mit Kaveolin-1 und -3 transfizierten Neuroblastomzellen (Toselli et al. 2001). Von den Transportproteinen konnten unter anderem der Ca^{2+} -Kanal IP3-Rezeptor, Aquaporin-1 und die Ca^{2+} -ATPase in Kaveolen lokalisiert werden.

Wären auch Na-Kanäle in Kaveolen lokalisiert, so ließe sich daraus eine neue Erklärungshypothese für die in dieser Arbeit beschriebene Amplitudenreduktion nach mechanischer Stimulation entwickeln. Schnürten sich die Kaveolen nach mechanischer Reizung ab, so würden alle in ihnen gelegenen Kanäle von der Oberfläche entfernt. Auf diese Weise verringerte sich die Anzahl der verfügbaren Kanäle, dies würde dann zu einer Amplitudenreduktion führen.

Zur Klärung dieser Hypothese sollten Kaveolen in den für unsere Experimente relevanten HEK293-Zellen und Herzmuskelzellen, die den $\text{Na}_v1.5$ physiologischerweise in großer Anzahl exprimieren, nachgewiesen werden. In einem zweiten Schritt wurde der Nachweis der Lokalisation von Na-Kanälen in Kaveolen mit zwei verschiedenen Methoden versucht: im Westernblot von immunopräzipitierten Kaveolen und durch Immunogoldmarkierung der

Membranoberflächen, die durch elektronenmikroskopische Gefrierbruchtechnik sichtbar gemacht werden konnten.

3.2.2.1 Elektronenmikroskopischer Kaveolennachweis

Auf archivierten Dünnschnittpräparaten von in Epoxydharz eingebetteten Herzmuskelzellen (freundlicher Weise von Herrn Dr. Westermann, Institut für Ultrastrukturforschung, FSU-Jena / Frau Beck, Pathologisches Institut, FSU-Jena zur Verfügung gestellt) wurden Kaveolen nachgewiesen (Abbildung 3-6). Man erkennt die mit Pfeilen gekennzeichneten Membraneinstülpungen, die über einem Myofibrillenbündel gelegen sind. Oben links in der Abbildung sieht man Kaveolen einer Bindegewebszelle, die teilweise eingeschnürt an der Zellmembran liegen. Es konnte so, in Übereinstimmung mit Masson-Pevet et al. 1980, bestätigt werden, dass Herzmuskelzellen Kaveolen ausbilden.

In Abbildung 3-7 ist eine elektronenmikroskopische Untersuchung von HEK293-Zellen zu sehen. Die mit Hilfe der Gefrierbruchtechnik gespaltene Zellmembran zeigt unten rechts ein Feld abgebrochener Kaveolenhälse. Kaveolen haben einen Durchmesser von ca. 60 bis 100 nm, hier sind nur die sich verjüngenden Hälse sichtbar. Oben links ist eine ganze Kaveole mit einem Pfeil gekennzeichnet. Die Pfeilspitze rechts zeigt ein ummanteltes Transportvesikel; die Öffnung dieser Membraneinstülpung ist größer als die der Kaveolen.

Mit Hilfe elektronenmikroskopischer Techniken konnten sowohl in Herzmuskelzellen als auch in HEK293-Zellen Kaveolen nachgewiesen werden.

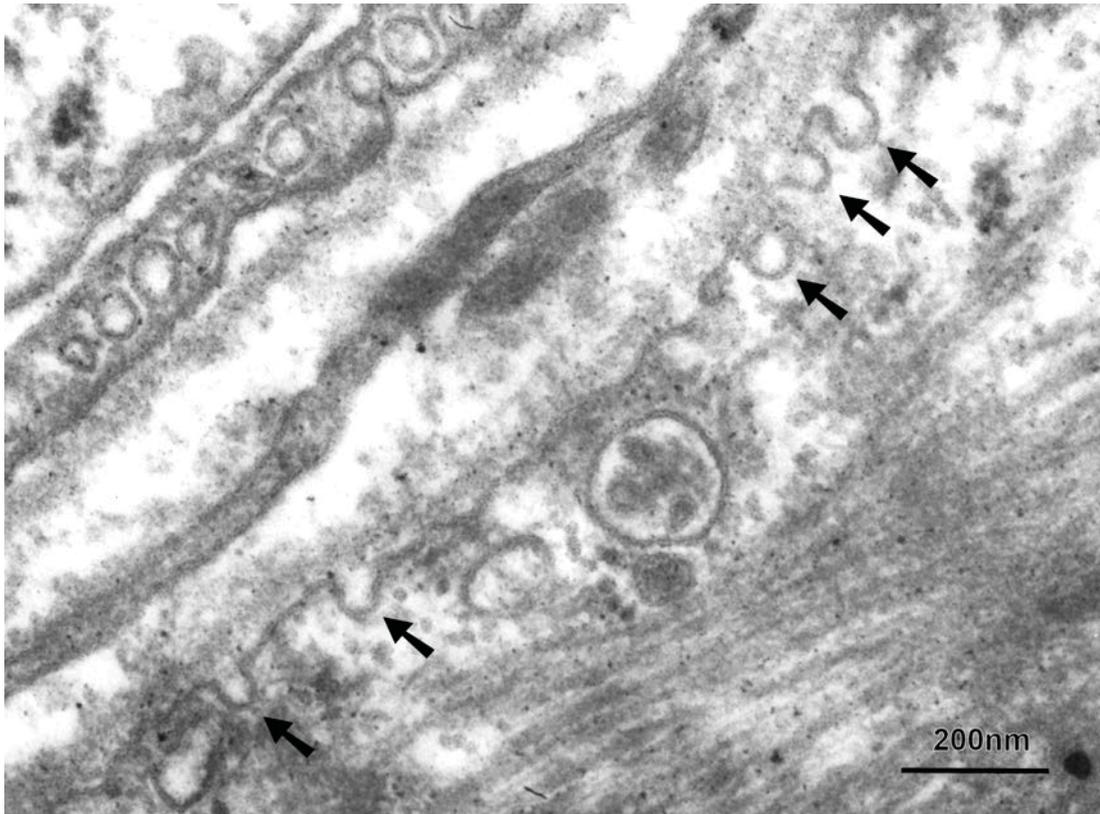


Abbildung 3-6. Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Dünnschnittes von in Epoxydharz eingelegten Herzmuskelzellen. Die Pfeile zeigen auf Kaveolen einer Kardiomyozytenzellmembran.

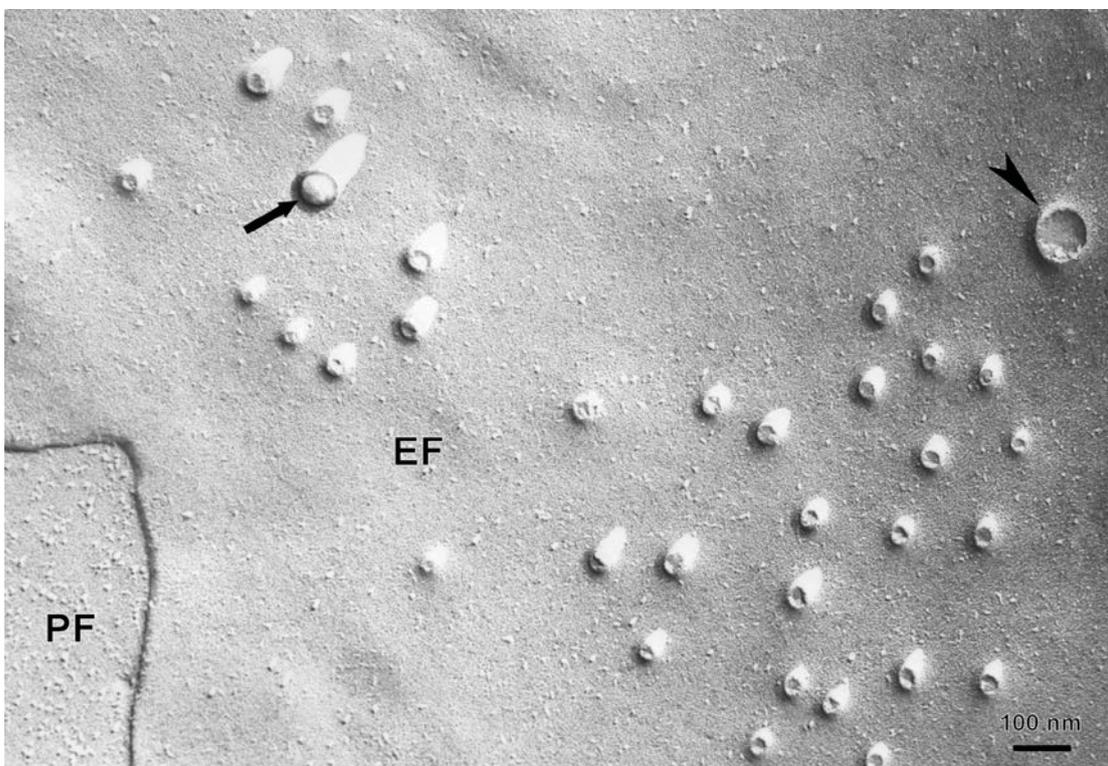


Abbildung 3-7. Elektronenmikroskopische Aufnahme (Gefrierbruchtechnik) der Zellmembran einer HEK293-Zelle mit abgebrochenen Kaveolen (unten rechts) und einem ummantelten Transportvesikel (Pfeilspitze). Der Pfeil zeigt auf eine ganze Kaveole. PF: protoplasmatische Fläche. EF: endoplasmatische Fläche.

3.2.2.2 Kanaldetektion in aufgereinigten Kaveolen

Nach dem gelungenen Nachweis von Kaveolen in den zu untersuchenden Zellen, sollte die Lokalisation der Na-Kanäle in diesen Membransäckchen erfolgen. Dazu wurden aus drei verschiedenen Zellarten TritonX100-unlösliche Membranabschnitte gewonnen und Kaveolen daraus mit einem Antikörper gegen das Markerprotein Kaveolin-1 immunopräzipitiert. Es wurden die Zelllinien HEK293_rNav1.4 und _hNav1.5, sowie Lysate eines Schweineherzens verwendet (vergleiche zur Methode 2.1.6, S.22).

Die Präzipitate mit Anti-Kaveolin-1, sowie diejenigen mit einem unspezifischen Antikörper als Kontrolle, wurden mit einem 5%igen SDS Gel aufgetrennt. Nach Übertragung auf eine Membran durch einen Westernblot wurde die Immunodetektion mit Antikörpern gegen das Markerprotein Kaveolin-1 und SP19 durchgeführt. Letztgenannter Antikörper richtet sich gegen das in der Familie der Na-Kanäle stark konservierte Inaktivierungsmotiv IFM (Gordon 1988).

Mit dem Antikörper gegen das vor allem in Bindegewebszellen vorkommende Kaveolin-1 konnte bei 45 kDa, ein Molekulargewicht welches dem Dimer des Kaveolins entsprechen könnte, eine Bande immundetektiert werden. Diese war besonders im Präzipitat mit Anti-Kaveolin-1 des Herzlysats und der HEK293_rNav1.4-Zellen deutlich zu erkennen (Daten nicht gezeigt).

Abbildung 3-8 zeigt das Ergebnis einer zweiten Immunodetektion mit dem Antikörper SP19, der gegen Na-Kanäle gerichtet ist. Das Kanalprotein hat ein Molekulargewicht von 260 kDa (Catterall 1992). Man kann beim Präzipitat der HEK293_rNav1.4-Zellen mit Anti-Kaveolin-1 (rNav1.4+) und in beiden Auftragungen des Herzlysats (Lysat+ und unspezifische Präzipitation Lysat-) eine Bande erkennen. Da der zweite Antikörper gegen das Kaninchenimmunglobulin gerichtet ist, ist es möglich, dass er den Präzipitationsantikörper erkennt (lange Kette bei 50 kDa, kurze Kette bei 25 kDa) und die entsprechenden Banden auf diese Interaktion zurück zuführen sind.

Dies ist ein Hinweis darauf, dass der Na-Kanal in Kaveolen lokalisiert sein kann. Da sich sehr viele unspezifische Hintergrundbanden zeigten, kann dies noch nicht als schlüssiger Beweis gelten und weitere Untersuchungen sind nötig.

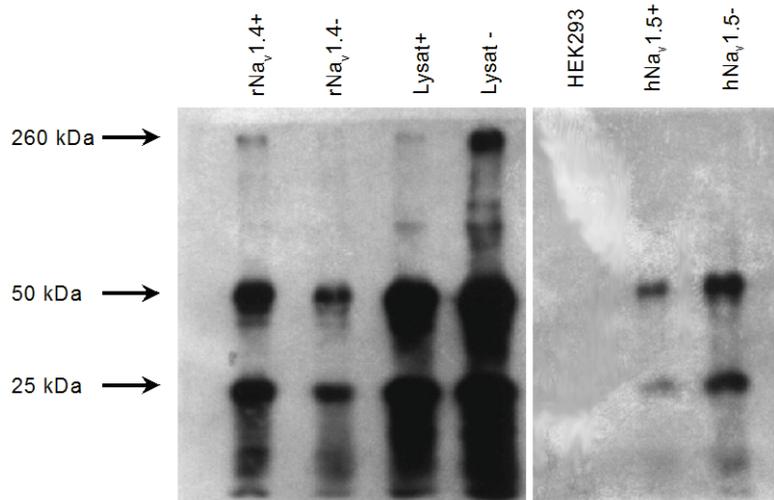


Abbildung 3-8. Westernblot der Immunopräzipitate mit dem Antikörper Anti-Kaveolin-1 (+). Detektion mit dem Antikörper SP19, der das 260 kDa schwere Na-Kanalprotein detektiert. Negativkontrollen (-) wurden mit unspezifischen Kaninchenantikörpern präzipitiert. Bei 50 und 25 kDa wurde die schwere und leichte Kette des Antikörpers der Immunopräzipitation detektiert. Lysat: Lysat von Schweineherzteilen. rNa_v1.4: HEK293_rNa_v1.4-Zellen, hNa_v1.5: entsprechend.

3.2.2.3 Immunzytologischer Na-Kanalnachweis in Kaveolen

In einem zweiten Ansatz sollte der Na-Kanal immunzytologisch in Kaveolen nachgewiesen werden.

Dazu wurden die mit der Gefrierbruchtechnik hergestellten Membranoberflächen mit dem Antikörper SP19 immunzytologisch markiert. Mit einem zweiten goldmarkierten Antikörper, der gegen den ersten gerichtet ist, konnte die Position der gebundenen SP19 Immunglobuline sichtbar gemacht werden.

Abbildung 3-9 A zeigt das Ergebnis der Immunogoldmarkierung einer HEK293_hNa_v1.5-Zelle. Die Goldkörnchen des zweiten Antikörpers sind als kleine schwarze Punkte zu erkennen. Die Kaveolen stellen sich wie oben in Abbildung 3-7 durch ihre abgebrochenen Hälse bzw. abgeflachte Membranausstülpungen dar.

An mehreren Stellen kann eine Gruppierung von drei bis vier Goldkörnchen detektiert werden, die an Kaveolen gelagert sind. Drei dieser Anhäufungen sind im Bildausschnitt vergrößert. Dies ist mit einer Lokalisation der Na-Kanäle in Kaveolen vereinbar.

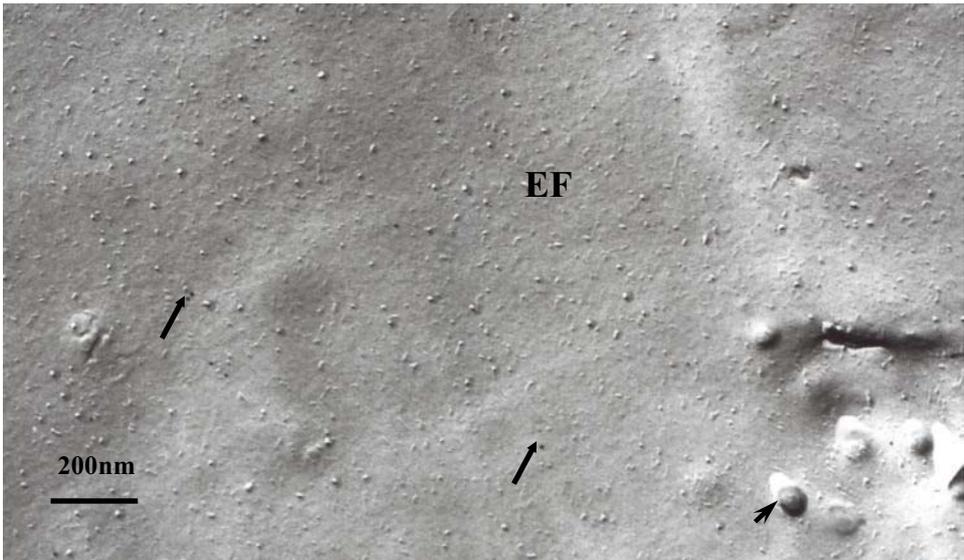
Abbildung 3-9 B zeigt an einer untransfizierten HEK293-Zelle die Hintergrundmarkierung des Antikörpers SP19 (Pfeile), man kann unten rechts einige Kaveolen erkennen (Pfeilspitze).

Abbildung 3-9. (folgende Seite) Gefrierbruchtechnik. **A:** Immunogoldmarkierung einer HEK293_hNa_v1.5-Zelle. Erster Antikörper: Anti-Pan-Na-Kanal SP19, zweiter Antikörper: goldmarkierter Anti-Kaninchenimmunglobulin-Antikörper. **B:** Hintergrundmarkierung einer nicht transfizierten HEK293-Zelle. Die Präparation erfolgte mit der selben Methode wie A. EF: endoplasmatische Fläche.

A



B



3.3 Einfluss von extrazellulären divalenten Kationen auf den Auswärtsstrom durch Na-Kanäle

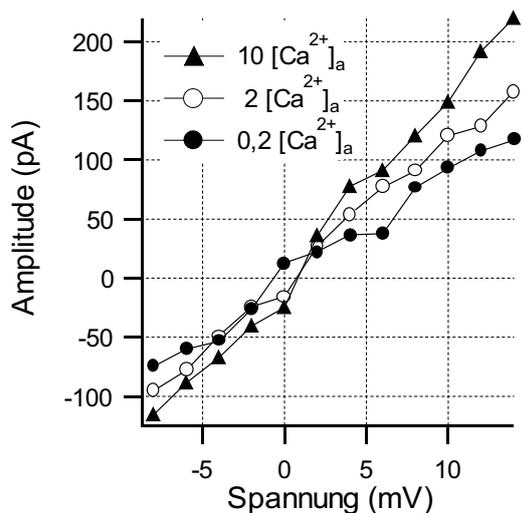
Um die Slip-Mode-Permeation untersuchen zu können, wurden sehr kleine Ströme gemessen. Dabei konnte eine Veränderung des Auswärtsstroms durch $[Ca^{2+}]_a$ beobachtet werden. Je höher die extrazelluläre Kalziumionenkonzentration gewählt wurde, desto größer war die Auswärtsstromamplitude. Abbildung 3-10 A zeigt die Strom-Spannungskennlinien eines Experimentes zur Slip-Mode-Permeation. Bei 10 mM $[Ca^{2+}]_a$ (gefüllte Dreiecke) ist der Auswärtsstrom durch hNa_v1.5 größer als bei niedrigeren Konzentrationen. Das steht im Widerspruch zu der bekannten Blockierbarkeit der Na-Kanäle durch Kalziumionen (Woodhull 1973; Hille et al. 1975; Pusch 1990; Hille 1992).

Mit annähernd physiologischen Lösungen (Lösungskombination A, vergleiche Tabelle 7-3 im Anhang) ist, wie beispielsweise in Abbildung 3-10 B, die Abnahme des Einwärtsstroms und die Verschiebung der Aktivierung durch erhöhte extrazelluläre Kalziumionenkonzentrationen zu erkennen.

Erhöhtes $[Ca^{2+}]_a$ scheint den Na⁺-Strom nicht nur zu blockieren (Einwärtsstrom, Abbildung 3-10 B), sondern auch zu aktivieren, wie es sich in seiner Wirkung auf den Auswärtsstrom äußert (Abbildung 3-10 A). Dies soll in den folgenden Kapiteln dargestellt werden.

A Slipmode-Permeation

Pip.: 10 NaCl, 110 CsCl, 5 MgCl₂, 10 EGTA
Bad: 10 NaCl, 130 CsCl, 0,2/2/10 CaCl₂



B Physiologische Bedingungen

Pip.: 12 NaCl, 155 KCl
Bad: 145 NaCl, 4 KCl, 2/10 CaCl₂

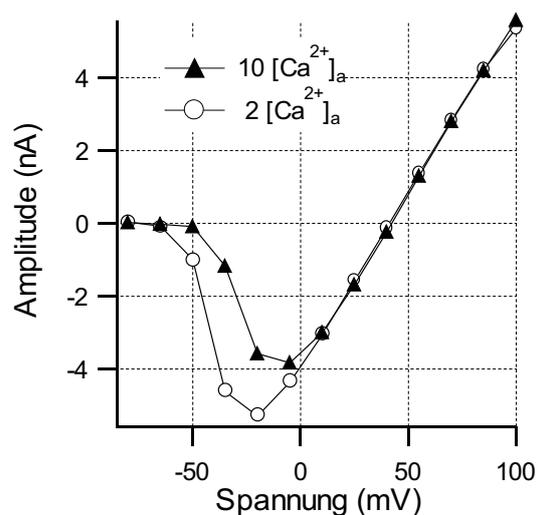


Abbildung 3-10. hNa_v1.5: Strom-Spannung-Kennlinien bei 0,2 mM (gefüllte Kreise), 2 mM (offene Kreise), 10 mM (gefüllte Dreiecke) $[Ca^{2+}]_a$. **A:** Untersuchung zur Slip-Mode-Permeation, Lösungskombination B. **B:** Blockierung des Einwärtsstroms bei 10 mM $[Ca^{2+}]_a$. Lösungskombination A. Die Konzentrationsangaben sind in mM.

3.3.1 Einfluss von $[Ca^{2+}]_a$ und $[Mg^{2+}]_a$ auf den Na^+ -Auswärtsstrom durch $hNav1.5$

Aufgrund der hohen extrazellulären Natriumionenkonzentration in physiologischen Lösungen (z. B. in Lösungskombination A) musste sehr stark depolarisiert werden, um einen Auswärtsstrom zu erhalten (vergleiche Abbildung 3-10 B). Um die Änderungen der Auswärtsstromamplitude deutlicher darstellen zu können, wurden die Natriumionen der Badlösung durch Cäsiumionen ersetzt (Lösungskombination E, vergleiche Tabelle 7-3 im Anhang). Dadurch wurde das Umkehrpotential zu negativen Spannungen verschoben und der Auswärtsstrom besser messbar.

In der Strom-Spannungskennlinie der Abbildung 3-11 A erkennt man die Zunahme des Auswärtsstroms durch Erhöhung von $[Ca^{2+}]_a$ bei annähernd physiologischen Lösungen (Lösungskombination E) ohne extrazelluläre Natriumionen.

Abbildung 3-11 B zeigt eine Stromspannungskennlinie die mit der Lösungskombination F (CsF in der Pipette) aufgezeichnet wurde. Fluorid wirkt als Kalziumchelator und reduziert die Permeation durch endogene Chloridkanäle. Es hat sich in der Patch-Clamp-Technik bewährt, da es, vermutlich durch Inaktivierung von intrazellulären Enzymen, zu sehr stabilen Zelleleitkonfigurationen führt. Der Auswärtsstrom wird auch unter diesen Bedingungen durch $[Ca^{2+}]_a$ reguliert (wie in Abbildung 3-11 B dargestellt) und konnte aufgrund stabilerer Experimentalbedingungen besser im Detail untersucht werden.

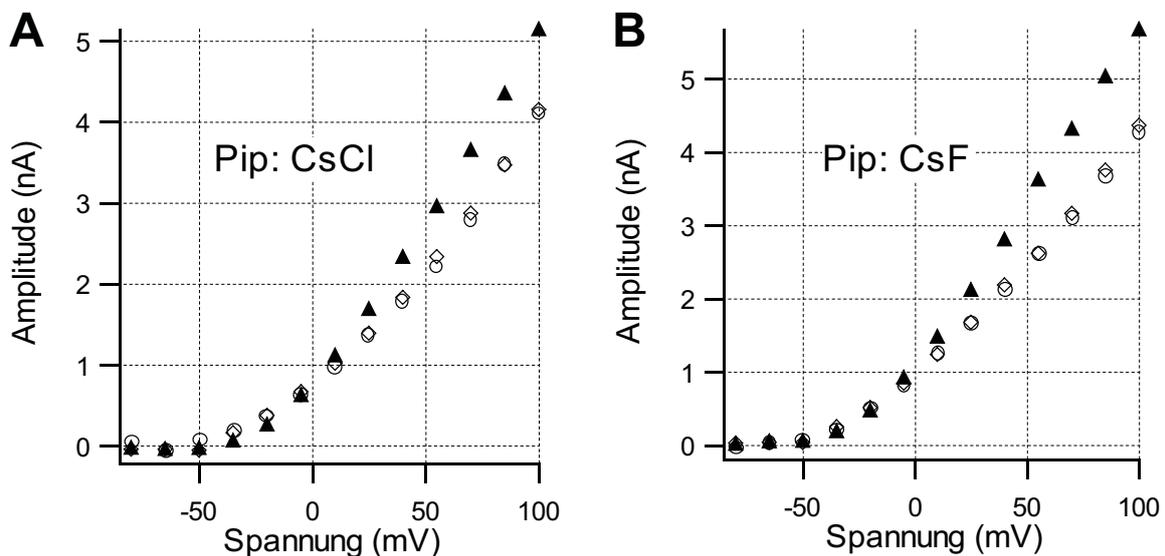


Abbildung 3-11. $hNav1.5$, Strom-Spannungs-Kennlinien, 2 mM $[Ca^{2+}]_a$ vor (offene Kreise) und nach (offene Rauten) der Messung bei 10 mM $[Ca^{2+}]_a$ (gefüllte Dreiecke). **A:** Lösungskombination E mit CsCl in der Pipette. **B:** Lösungskombination F mit CsF in der Pipette.

3.3.1.1 Regulation des hNav1.5-Auswärtsstroms durch $[Ca^{2+}]_a$

Die Zellen der stabil transfizierten HEK293_hNav1.5-Zelllinie wurden abwechselnd verschiedenen $[Ca^{2+}]_a$ ausgesetzt. Dabei wurde der maximale Auswärtsstrom bei Spannungen zwischen -80 mV und $+100$ mV gemessen (Strom-Spannungs-Kurven), wie in Abbildung 3-12 A mit Spannungsprotokoll dargestellt.

Abbildung 3-12 B zeigt den Stromverlauf bei Testpulsen auf $+40$ mV und $+100$ mV bei drei verschiedenen $[Ca^{2+}]_a$. Es ist die Amplitudenzunahme bei steigender Kalziumionenkonzentration zu erkennen. Die relativ große nichtinaktivierende Stromkomponente ist, wie unter 3.3.6 ab S.70 ausführlicher beschrieben, kein Na^+ -Strom. In einem Intervall von drei Millisekunden (in Abbildung 3-12 A markiert) wurde der Mittelwert des nichtinaktivierenden Stroms berechnet und als Korrekturfaktor vom Gesamtstrom subtrahiert. In Abbildung 3-12 werden sowohl die unkorrigierten (Teil B) wie auch die korrigierten Messdaten (Teil C) gezeigt. Im Folgenden wird nur mit den korrigierten Werten gearbeitet.

Die relative Stromzunahme durch die erhöhte extrazelluläre Kalziumionenkonzentration wurde quantifiziert. Dazu wurde die Amplitude bei 2 mM $[Ca^{2+}]_a$ als Referenz gewählt und ein Quotient mit dem maximalen Auswärtsstrom bei X mM $[Ca^{2+}]_a$ gebildet (relative Amplitudenänderung bei X mM $[Ca^{2+}]_a = I_{XmM} / I_{2mM}$, wobei I der Strom bei der jeweiligen $[Ca^{2+}]_a$ ist).

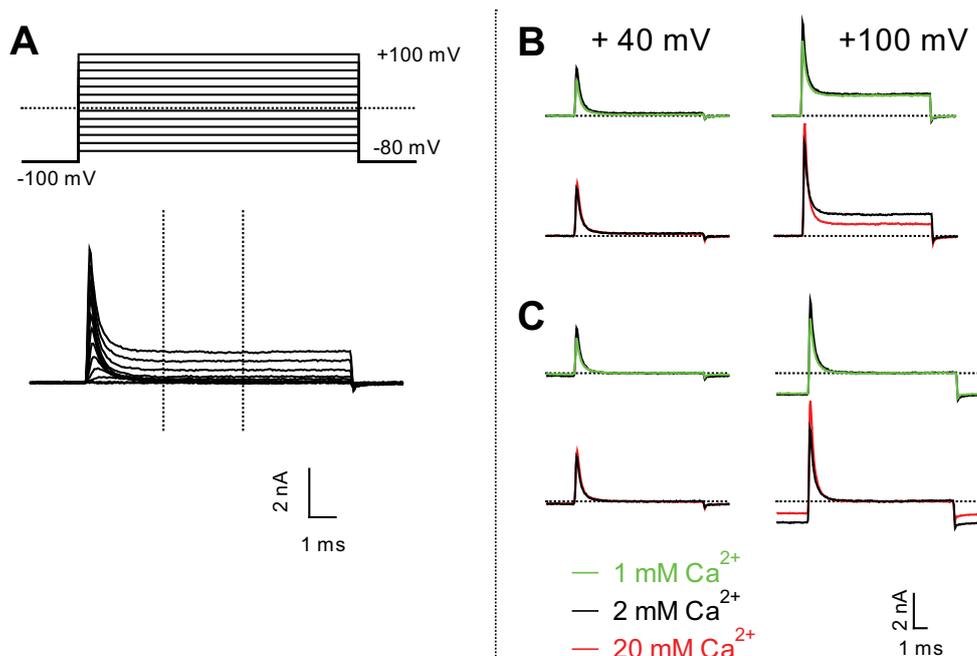


Abbildung 3-12. hNav1.5: **A:** Spannungsprotokoll mit dazugehörigen Stromantworten bei 2 mM $[Ca^{2+}]_a$. **B:** Überlagerung der Stromverläufe bei den angegebenen Membranpotentialen und $[Ca^{2+}]_a$. **C:** Stromverläufe nach Abzug der nichtinaktivierenden Stromkomponente.

Bei 2 mM $[Ca^{2+}]_a$ lag eine stabile Ableitungskonfiguration vor. Diese Konzentration liegt nahe der physiologischen Ca^{2+} -Konzentration im menschlichen Serum (2,8 mM, Schmidt und Thews 1997), und die Zellmembran scheint durch extrazelluläre divalente Ionen stabilisiert zu werden. In sehr niedrigen $[Ca^{2+}]_a$ ($< 0,1$ mM) war die relative Amplitudenänderung nicht systematisch messbar. Der Na^+ -Strom konnte im Verlauf eines Experiments abnehmen. Um diesen Einfluss zu minimieren, wurde aus den Messdaten bei 2 mM $[Ca^{2+}]_a$ vor und nach X mM $[Ca^{2+}]_a$ der Mittelwert gebildet. Dieser wurde dann mit der Amplitude bei X mM ins Verhältnis gesetzt.

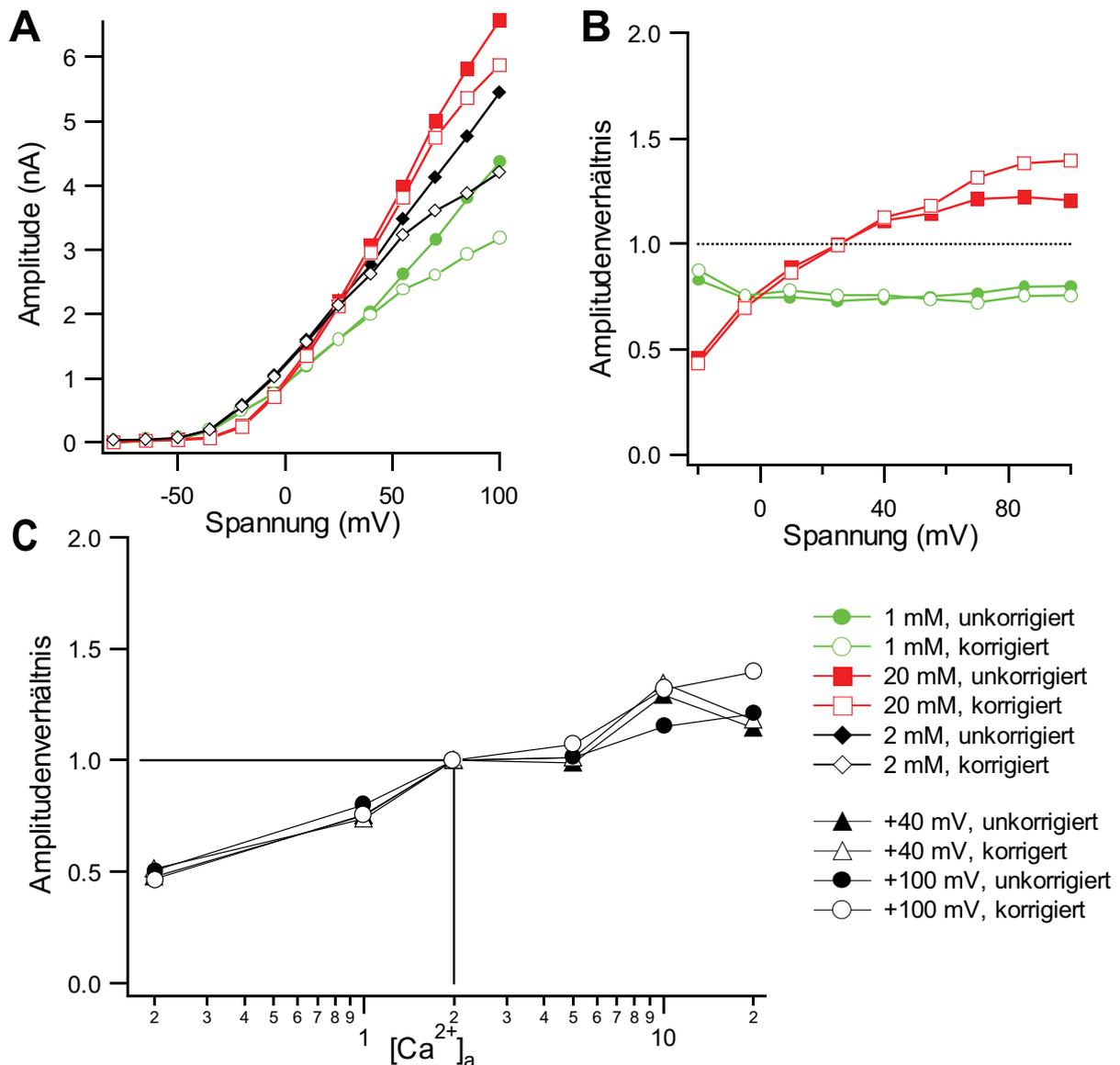


Abbildung 3-13. $hNa_v1.5$: **A**: Strom-Spannungskenn-Kurven bei drei verschiedenen $[Ca^{2+}]_a$. **B**: Verhältnisse der Amplituden bei der angegebenen $[Ca^{2+}]_a$ zu denjenigen bei 2 mM $[Ca^{2+}]_a$ im Spannungsbereich von -20 mV bis $+100$ mV. **C**: Amplitudenverhältnisse in Abhängigkeit von $[Ca^{2+}]_a$ bei $+100$ mV (Kreise) und $+40$ mV (Dreiecke).

Lösungskombination F. Alle Ergebnisse sind mit (offene Symbole) und ohne (gefüllte Symbole) Korrektur der nichtinaktivierenden Komponente dargestellt. Die Konzentrationsangaben beziehen sich auf $[Ca^{2+}]_a$. Alle Messwerte sind mit geraden Linien verbunden.

Abbildung 3-13 A zeigt typische Strom-Spannungs-Kennlinien bei 1, 2 und 20 mM $[Ca^{2+}]_a$. Es ist die Amplitudenänderung bei variierender $[Ca^{2+}]_a$ zu erkennen. Die offenen Symbole zeigen die korrigierten Messdaten nach Abzug der nichtinaktivierenden Komponente.

In Abbildung 3-13 B sind die Stromverhältnisse bei den jeweiligen Testspannungen dargestellt. Die Messwerte für eine $[Ca^{2+}]_a$ sind zur Veranschaulichung mit geraden Linien verbunden. Man kann die Verschiebung der Aktivierung durch erhöhtes $[Ca^{2+}]_a$ erkennen, und ab einem Membranpotential von ca. +60 mV sind die Kanäle weitgehend aktiviert und der Effekt auf die Amplitude bei hohen Kalziumionenkonzentrationen wird deutlich.

Betrachtet man die relative Stromänderung in Abhängigkeit von $[Ca^{2+}]_a$ so ergibt sich der in Abbildung 3-13 C dargestellte Zusammenhang für die Spannungen +40 mV und +100 mV.

Je höher das Testpotential ist, desto kompletter ist die Aktivierung, v.a. auch bei hohen $[Ca^{2+}]_a$, die bekanntlich die Aktivierung der Na-Kanäle zu positiveren Spannungen verschieben. Aus diesen Gründen wurde im Folgenden die relative Stromänderung bei +100 mV betrachtet. Abbildung 3-14 zeigt das Ergebnis von Messungen an 27 Zellen (offene Kreise). Die Amplitudenänderung bei verschiedenen $[Ca^{2+}]_a$ wurde bis zu neunmal pro Zelle gemessen. Aus diesen Mehrfachmessungen wurde der Mittelwert gebildet und als Messpunkt in das Schaubild der Abbildung 3-14 eingetragen.

Veränderungen von $[Ca^{2+}]_a$ hatte bei allen gemessenen 27 Zellen eine Beeinflussung des Auswärtsstroms von unterschiedlicher Größe zur Folge. Um den Trend dieser Beeinflussung zu veranschaulichen, wurde aus den Amplitudenverhältnissen der Mittelwert gebildet, welcher in Abbildung 3-14 mit SEM als gefüllte rote Kreise dargestellt ist. Er beträgt bei 20 mM 1,73 und bei 0,1 mM 0,59, d.h. der Auswärtsstrom hat im Mittel um 293% zugenommen, wenn die $[Ca^{2+}]_a$ von 0,1 mM auf 20 mM erhöht wurde.

Die Abschätzung der Daten erfolgte mit der Michaelis-Menten-Gleichung und ist mit einer gestrichelten Linie in Abbildung 3-14 dargestellt. Es ergaben sich für den maximalen Auswärtsstrom $V_{\max} = 3,76 \pm 28,7$, für die halbmaximale $[Ca^{2+}]_a$ $K_d = 41,26 \pm 0,64$ mM und für den mit dieser Abschätzung stark fehlerbehafteten Hill-Koeffizient $0,34 \pm 244$. Für die Funktion gilt die Annahme, dass bei 0 mM $[Ca^{2+}]_a$ kein Auswärtsstrom mehr messbar ist. Diese theoretische Voraussetzung wurde experimentell überprüft, wie weiter unten dargestellt.

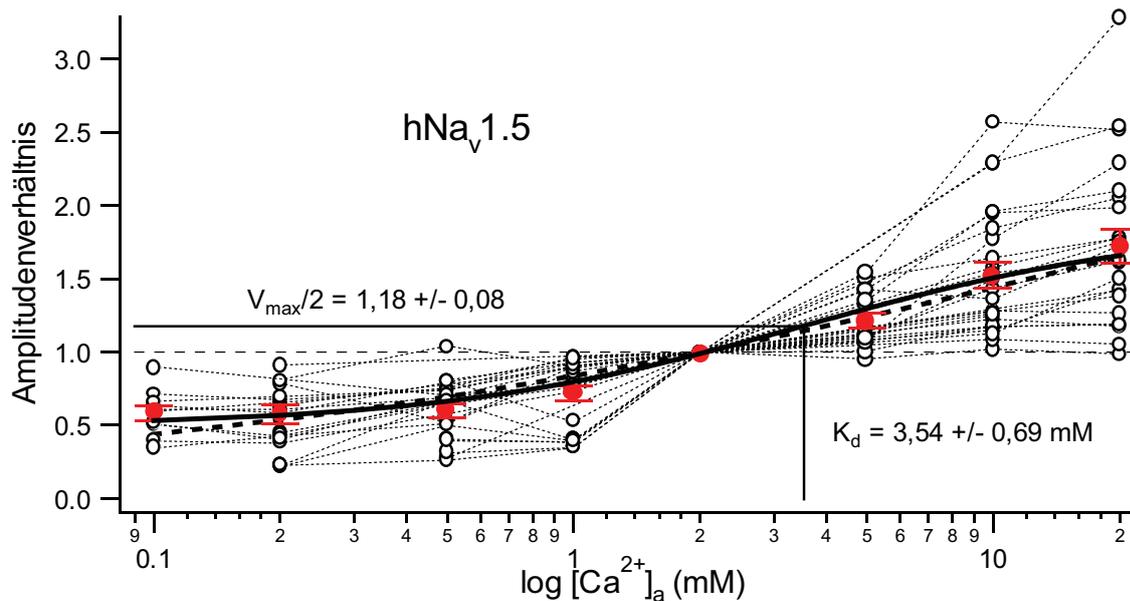


Abbildung 3-14. $hNa_v1.5$: Verhältnisse der Amplitudenänderung bei +100 mV aufgetragen gegen die logarithmische $[Ca^{2+}]_a$. Ergebnisse von Messungen an 27 Zellen (offene Kreise) mit Mittelwert (gefüllte rote Kreise) und SEM, n betrug für den Mittelwert der einzelnen Messpunkte: 10 für 0,1 mM, 18 für 0,2 mM, 19 für 0,5 mM, 22 für 1 mM, 15 für 5 mM, 24 für 10 mM und 23 für 20 mM $[Ca^{2+}]_a$. Die gestrichelte Linie ist das Ergebnis einer Michaelis-Menten-Abschätzung ohne, die durchgezogene Linie sowie die Angaben zu V_{max} und K_d mit der Annahme, dass bei 0 mM $[Ca^{2+}]_a$ der Auswärtsstrom ungleich 0 mA ist, Wichtung mit $1/SEM$. Lösungskombination F.

Nimmt man allerdings an, dass auch ohne $[Ca^{2+}]_a$ weiterhin Strom durch den Kanal fließt, so ergibt sich die in Abbildung 3-14 als durchgezogene Linie eingezeichnete Näherung der Mittelwerte. Die Schätzwerte für den maximalen Auswärtsstrom $V_{max} = 2,36 \pm 0,17$, die halbmaximale $[Ca^{2+}]_a$ $K_d = 3,55 \pm 0,69$ mM, und für den relativen Strom bei 0 mM $[Ca^{2+}]_a$ $V_{min} = 0,50 \pm 0,04$ sind sinnvoll und beschreiben die Messdaten zufriedenstellend. Der Hill-Koeffizient wurde auf 1 festgesetzt, ohne dass dies großen Einfluss auf den Funktionsverlauf hatte. Diese Abschätzung schließt nicht aus, dass die Messwerte bei kleinen $[Ca^{2+}]_a$ ein Minimum durchlaufen, und dass bei 0 mM $[Ca^{2+}]_a$ kein Strom mehr fließt. Bei Konzentrationen $< 0,1$ mM $[Ca^{2+}]_a$ war die Zell-Pipetten-Abdichtung instabil, so dass keine systematischen Messungen möglich waren.

Wenn $[Ca^{2+}]_a$ komplett entfernt wurde, wie dies für die Stromaufnahme der Abbildung 3-15 in der Mitte der Fall ist, konnte kein Strom mehr gemessen werden. Der Na-Kanal bedarf offensichtlich einer gewissen Konzentration an $[Ca^{2+}]_a$, um funktionsfähig zu sein, eventuell wird seine Faltung durch Kalziumionen stabilisiert. Außerdem ließ die Zell-Pipetten-Abdichtung stark nach. Wurde die Zelle nach der Messung mit 0 mM $[Ca^{2+}]_a$ von einer Lösung mit 20 mM $[Ca^{2+}]_a$ umspült, war sofort wieder ein Strom in der selben Größe wie vor dem Experiment messbar (Abbildung 3-15, linke und rechte Stromaufnahme).

Die Badlösung enthielt bei diesem Experiment ausschließlich monovalente Ionen. Es ist möglich, dass der Kanal nicht zwangsläufig $[Ca^{2+}]_a$, aber doch divalente Ionen in der Badlösung benötigt, um funktionsfähig zu sein. Um dies zu prüfen wurde der Effekt von $[Mg^{2+}]_a$, einem weiteren physiologisch vorkommenden divalentem Ion, auf die Auswärtsstromamplitude durch $hNa_v1.5$ untersucht.

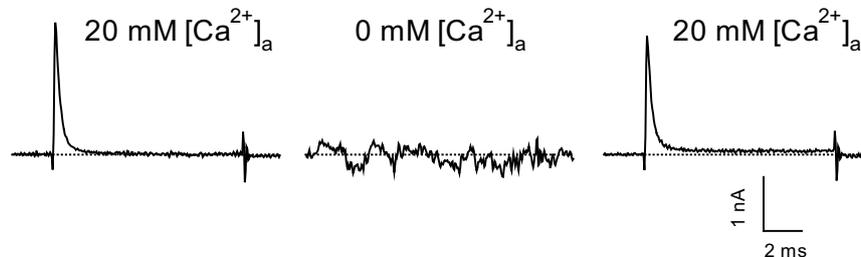


Abbildung 3-15. $hNa_v1.5$: Stromverlauf bei 0 mM $[Ca^{2+}]_a$ (Mitte), direkt davor und danach wurde dieselbe Zelle mit 20 mM $[Ca^{2+}]_a$ umspült (links bzw. rechts), Spannungspulse auf +60 mV. Lösungskombination F.

3.3.1.2 Vergleich der Regulation des $hNa_v1.5$ -Auswärtsstroms durch $[Ca^{2+}]_a$ und $[Mg^{2+}]_a$

Bei ersten Messungen mit Magnesiumionen in der Badlösung fiel auf, dass Mg^{2+} nicht in den selben Konzentrationen wie Ca^{2+} eingesetzt werden kann. Abbildung 3-16 A zeigt typische Stromaufnahmen bei 2 mM $[Ca^{2+}]_a$ und 10 mM $[Mg^{2+}]_a$. Teil B der Abbildung vergleicht die Amplitude bei verschiedenen $[Mg^{2+}]_a$ mit denjenigen bei 2 mM $[Ca^{2+}]_a$ an einer Zelle. Bei 10 mM, 20 mM und 50 mM $[Mg^{2+}]_a$ zeigte $hNa_v1.5$ eine ähnlich große Stromamplitude wie bei 2 mM $[Ca^{2+}]_a$ (die relative Amplitude zu 2 mM $[Ca^{2+}]_a$ betrug ~ 1). Um eventuelle Nebeneffekte der Ionen möglichst gering zu halten, wurde die kleinste Konzentration mit vergleichbarer Stromamplitude, also 10 mM $[Mg^{2+}]_a$, als Referenz für die folgenden Untersuchungen gewählt. Bei dieser Konzentration lag eine stabile Ableitkonfiguration vor. Es wurde, ähnlich wie bei den Untersuchungen zur Amplitudenregulation durch $[Ca^{2+}]_a$, die Stromänderung relativ zum Auswärtsstrom bei 10 mM $[Mg^{2+}]_a$ berechnet (relative Amplitudenänderung bei X mM $[Mg^{2+}]_a = I_{xmM}/I_{10mM}$).

Messungen an neun Zellen der HEK293_ $hNa_v1.5$ -Zelllinie zeigten eine Beeinflussbarkeit des Auswärtsstroms durch $[Mg^{2+}]_a$, wie in Abbildung 3-17 dargestellt.

Es ergab sich für Magnesiumionen an $hNa_v1.5$ eine ähnliche Abhängigkeit wie für Kalziumionen, die sich mit der modifizierten Michaelis-Menten-Gleichung beschreiben ließ. Dabei ergab sich für das maximale Verhältnis $V_{max} = 1,94 \pm 0,06$, für die halbmaximale Konzentration $K_d = 9,98 \pm 0,036$ mM, der Hillkoeffizient errechnete sich zu $1,95 \pm 0,16$ und das minimale Stromverhältnis V_{min} betrug $0,32 \pm 0,03$.

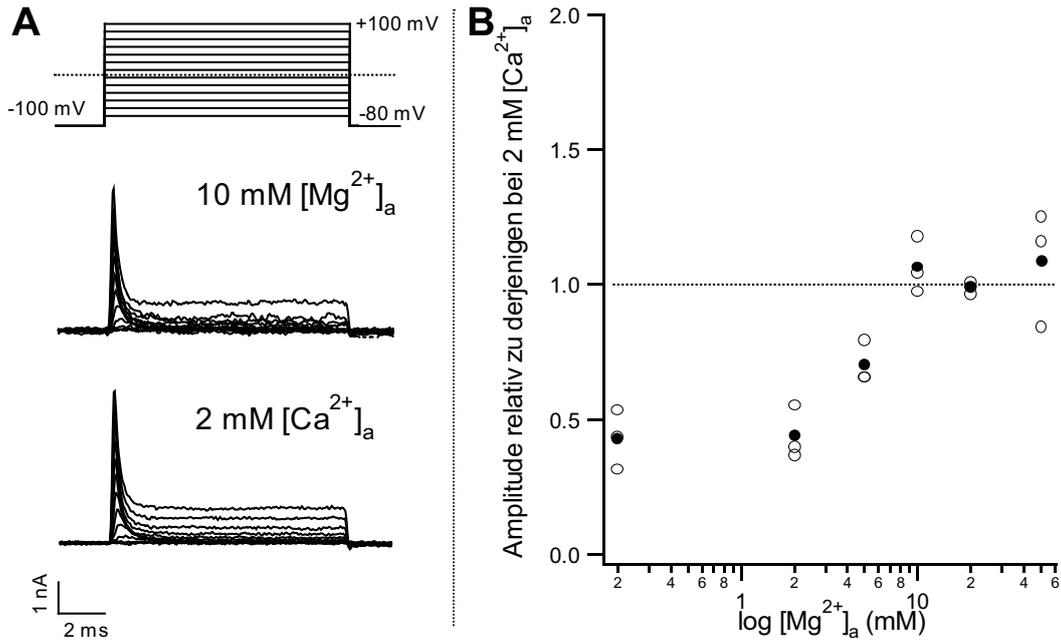


Abbildung 3-16. hNa_v1.5: **A:** Vergleich der Stromamplituden bei 10 mM [Mg²⁺]_a und 2 mM [Ca²⁺]_a. **B:** Stromamplitude bei der angegebenen [Mg²⁺]_a relativ zu derjenigen bei 2 mM [Ca²⁺]_a. Messergebnisse einer Zelle. Lösungskombinationen F und G.

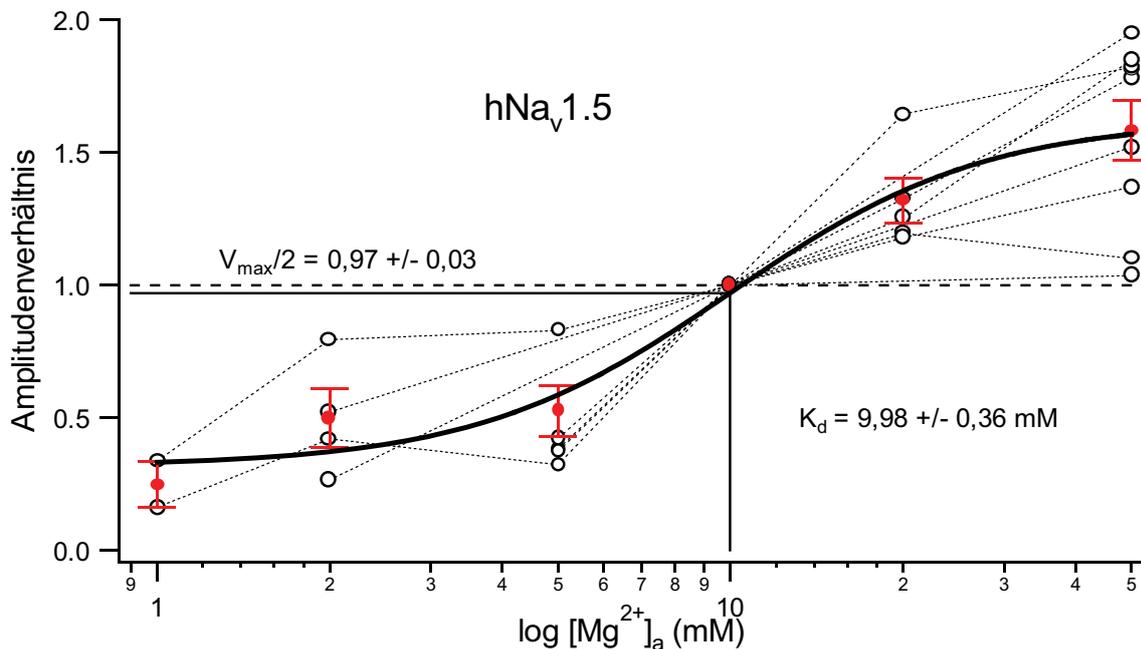
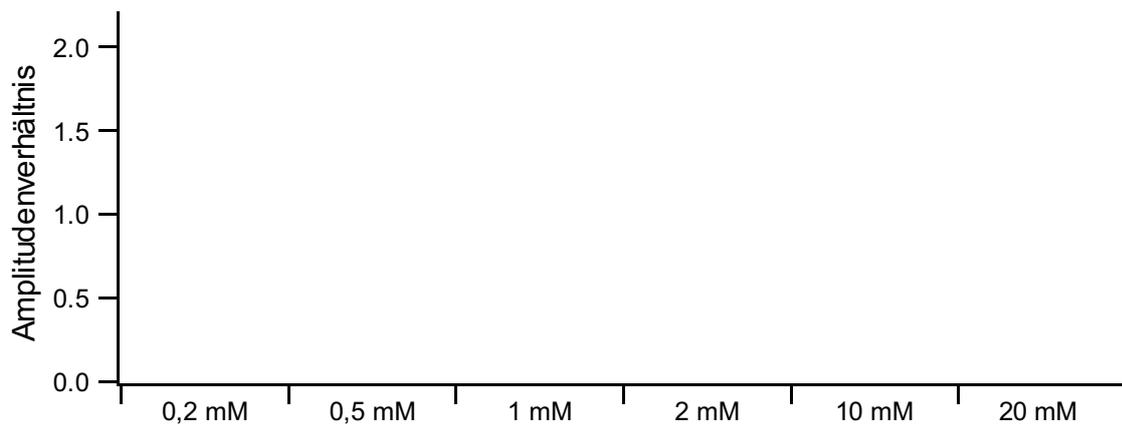


Abbildung 3-17. hNa_v1.5: Amplitudenverhältnisse bei variierender [Mg²⁺]_a, offene Kreise zeigen die Einzelmesswerte von neun Zellen, gefüllte Kreise den Mittelwert mit SEM. n=2 für 1 mM, n=4 für 2 mM, n=6 für 5 mM, n=5 für 20 mM und n=9 für 50 mM [Mg²⁺]_a. Durchgezogene Linie: modifizierte Michaelis-Menten-Näherung, Wichtung mit 1/SEM. Lösungskombination G.

3.3.1.2.1 Zeitabhängigkeit der Amplitudenänderung

An mehreren Zellen wurde die Auswärtsstromzunahme bei erhöhtem $[\text{Ca}^{2+}]_a$ bzw. $[\text{Mg}^{2+}]_a$ bis zu neunmal hintereinander gemessen. Dabei fiel auf, dass bei späteren Messungen die Änderungen größer ausfielen als bei den anfänglichen Aufnahmen. In Abbildung 3-18 ist die relative Stromänderung bei der angegebenen $[\text{Ca}^{2+}]_a$ bzw. $[\text{Mg}^{2+}]_a$ für jeweils eine Zelle abgetragen. Jeder Balken repräsentiert eine Messung, an der Musterung ist die zeitliche Abfolge zu erkennen. Zwischen zwei Messungen lagen drei bis vier Minuten.



3.3.1.3 Nichtstationäre Rauschanalysen von hNav1.5

Um die Ursache für die Amplitudenregulation durch extrazelluläre divalente Ionen näher zu bestimmen, wurden an hNav1.5 Rauschanalysen durchgeführt. Mit dieser Methode kann für eine Serie von Testpulsen der Einzelkanalleitwert i , die Offenwahrscheinlichkeit p_o und die Anzahl n der von der gemessenen Zelle exprimierten funktionsfähigen Kanäle gemessen werden.

Es wurden 500 Stromantworten auf Testpulse auf +60 mV in variierenden $[Ca^{2+}]_a$ mit dazugehörigen Leckpulsen aufgenommen. In Abbildung 3-19 A sind beispielhaft 20 Stromkurven (links) und der dazugehörige, bereits gemittelte Leckstrom (rechts) einer Zelle dargestellt. Nach Leckkorrektur der Einzelmessungen wurde der Mittelwert gebildet, welcher für dieses Experiment in Abbildung 3-19 B für 2 mM (links) und 20 mM $[Ca^{2+}]_a$ (rechts) dargestellt ist.

Unter diesen Messbedingungen ist wie bisher eine Auswärtsstromzunahme bei steigender $[Ca^{2+}]_a$ zu beobachten (vergleiche Abbildung 3-19). Die Varianz im in Abbildung 3-19 B angezeigten Intervall wurde über dem Strommittelwert abgetragen (Abbildung 3-20). Daran wurde mit einer nicht-linearen Methode eine Funktion angepasst (vergleiche zur Methode 2.2.6, S.32f).

Für das Beispiel ergaben sich für die drei Parameter Offenwahrscheinlichkeit p_o , Anzahl n und Einzelkanalstrom i die in der Tabelle der Abbildung 3-20 B dargestellten Werte.

Bei diesem Einzelbeispiel sieht man eine Steigerung der Offenwahrscheinlichkeit nach Erhöhung von $[Ca^{2+}]_a$ von 34% auf 70%. Daten von weiteren fünf Zellen zeigten ebenfalls eine deutliche Zunahme der Offenwahrscheinlichkeit, deren Mittelwerte bei 2, 10 und 20 mM $[Ca^{2+}]_a$ jeweils 26%, 40% und 60% betragen, also um das 2,3fache anstiegen (bei Änderung der $[Ca^{2+}]_a$ von 2 mM auf 20 mM, Abbildung 3-21 A).

Diese Steigerung der Offenwahrscheinlichkeit war mit einer Abnahme der Einzelkanalamplitude i verbunden, die im Mittel von 406 fA bei 2 mM auf 280 fA bei 20 mM $[Ca^{2+}]_a$ sank (Abbildung 3-21 B).

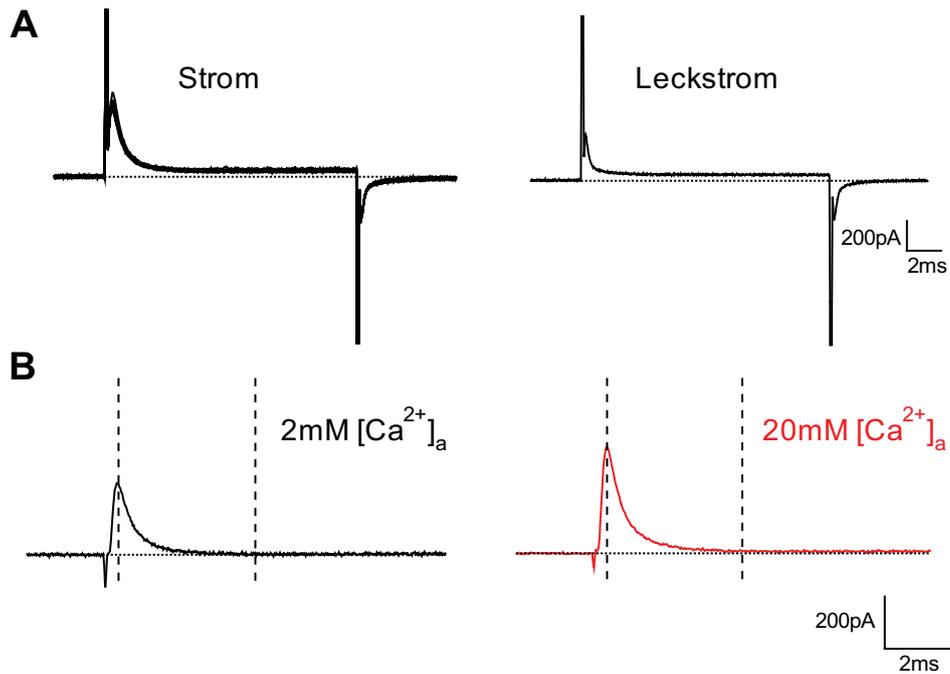


Abbildung 3-19. hNav_v1.5, Rauschanalyse: **A**: Beispiel von 20 Stromantworten auf einen Testpuls von +60 mV bei 2 mM $[Ca^{2+}]_a$ (übereinandergelegt), rechts der dazugehörige Leckpuls (Mittelwert von 300 Aufnahmen). **B**: Mittelwerte der Stromantworten nach Leckkorrektur bei 2 mM $[Ca^{2+}]_a$ (schwarz) bzw. bei 20 mM $[Ca^{2+}]_a$ (rot). Die gestrichelten Linien markieren den Bereich der Varianzanalyse. Lösungskombination F.

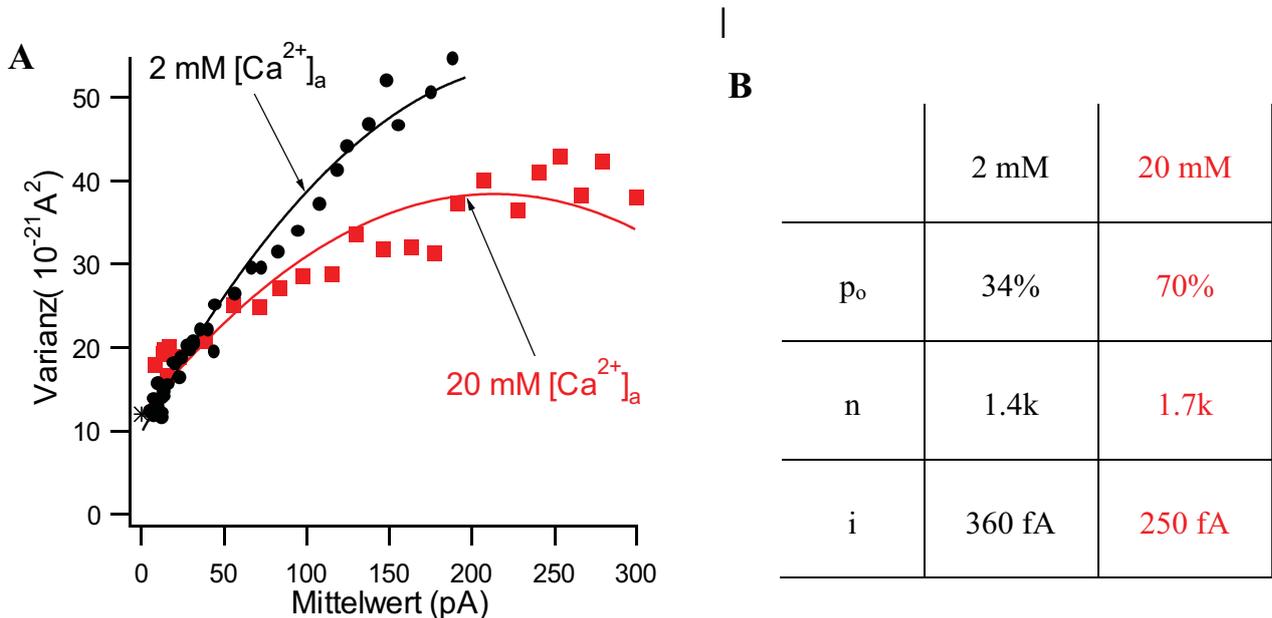


Abbildung 3-20. hNav_v1.5, Rauschanalyse: **A**: Abtragung der Varianzen über den Mittelwert der Stromamplitude von 500 Testpuls für eine Zelle bei 2 mM $[Ca^{2+}]_a$ (schwarze Punkte) und bei 20 mM $[Ca^{2+}]_a$ (rote Vierecke) mit jeweiliger Näherung (schwarze und rote Linie). **B**: Ergebnis der Näherung der Rauschanalyse für die Messung aus A. p_o : Offenwahrscheinlichkeit, n: Anzahl der funktionsfähigen Kanäle dieser Zelle, i: Einzelkanalleitwert.

Es wurde eine leichte Zunahme des Mittelwertes der Anzahl n der Kanäle gemessen (vergleiche Abbildung 3-21 C). Da die Anzahl der exprimierten Kanäle von Zelle zu Zelle unterschiedlich ist, wurde n bei 10 mM $[Ca^{2+}]_a$ als Referenz genommen und die Messergebnisse darauf normiert. Die Anzahl der Kanäle konnte durch diese Methode nicht sehr gut genähert werden, so dass keine eindeutige Aussage über die Veränderung von n möglich ist. Um die hohe Variabilität bei Messungen an ein und der selben Zelle darzustellen, wurden in Abbildung 3-21 C die Werte einer Zelle mit Linien verbunden.

Zur Überprüfung der Rauschanalyse wurden die Mittelwerte für p_o , i und n der jeweiligen $[Ca^{2+}]_a$ multipliziert und mit den gemessenen Stromamplituden der fünf Zellen in Abbildung 3-21 D verglichen. Es zeigen sich ähnliche Kurvenverläufe, dies deutet auf eine angemessene Beschreibung der Stromverhältnisse durch die Rauschanalyse hin.

Die Rauschanalyse von HEK293_hNa_v1.5-Zellen zeigte eine ansteigende Offenwahrscheinlichkeit des Na-Kanals mit höheren $[Ca^{2+}]_a$. Dies war von einer Abnahme in der Einzelkanalamplitude begleitet.

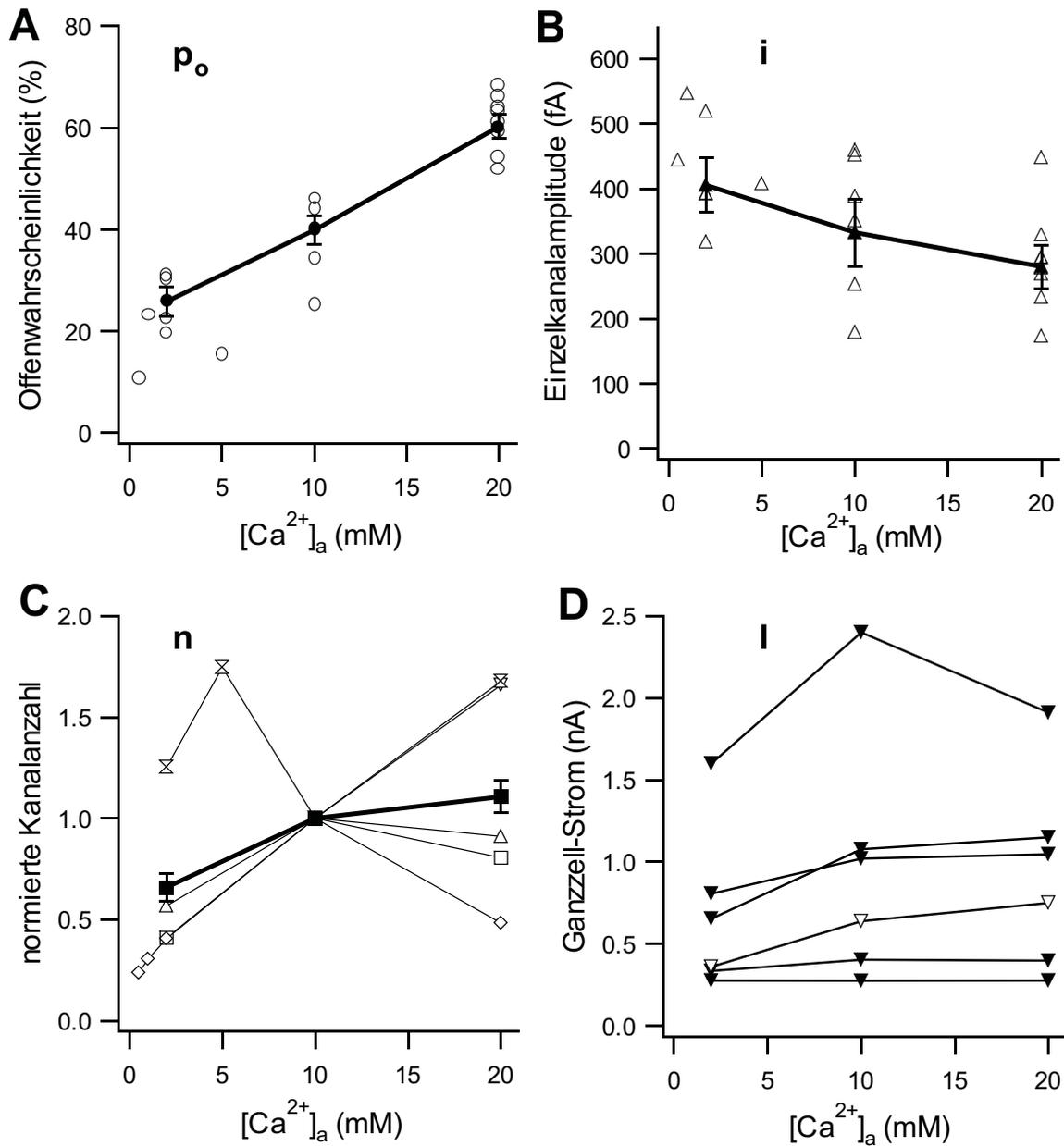


Abbildung 3-21. hNa_v1.5, Rauschanalyse: **A**: Offenwahrscheinlichkeiten von fünf Zellen bei verschiedenen $[Ca^{2+}]_a$ (offene Kreise) und Mittelwert (gefüllte Kreise). **B**: Einzelkanalamplitude von fünf Zellen (offene Dreiecke) und deren Mittelwert (gefüllte Dreiecke). **C**: Anzahl der Kanäle auf den Wert bei 10 mM $[Ca^{2+}]_a$ normiert (offene Symbole). Die gefüllten Vierecke zeigen den Mittelwert. **D**: In der Ganzzell-Patch-Clamp-Konfiguration gemessener (gefüllte Dreiecke) und aus den Mittelwerten der Rauschanalysen mit $I = i \cdot n \cdot p_o$ errechneter Gesamtstrom (offene Dreiecke) der fünf Zellen.

Fehlerbalken symbolisieren den SEM, alle Werte sind mit geraden Linien verbunden. Lösungskombination F.

3.3.2 Regulation des rNav1.4-Auswärtsstroms durch $[Ca^{2+}]_a$ und $[Mg^{2+}]_a$

Bisher wurde festgestellt, dass die Änderung von $[Ca^{2+}]_a$ eine Änderung der Auswärtsstromamplitude durch hNav1.5 nach sich zieht. Es sollte nun geprüft werden, ob dies eine spezielle Eigenschaft des Herzkanals darstellt, oder ob es sich hier um ein allgemeines Phänomen von Na-Kanälen handelt. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurden die gleichen Versuche wie unter 3.3.1 für den Herzkanal beschrieben, an der mit dem Na-Kanal I des Skelettmuskels stabil transfizierten HEK293_rNav1.4-Zelllinie durchgeführt.

Die Stromamplitude durch rNav1.4 wurde, wie an einem Beispiel in Abbildung 3-22 dargestellt, wenig von Änderungen in $[Ca^{2+}]_a$ beeinflusst.

Abbildung 3-23 zeigt die Ergebnisse von Messungen der Amplitudenverhältnisse bei Änderung von $[Ca^{2+}]_a$ an 15 HEK293_rNav1.4-Zellen. Zur Verdeutlichung der unterschiedlichen Regulation beider bisher untersuchten Kanäle durch $[Ca^{2+}]_a$ sind in Abbildung 3-23 neben den Ergebnissen von rNav1.4 die Näherung für die Daten von hNav1.5 (graue Linie) gemeinsam dargestellt.

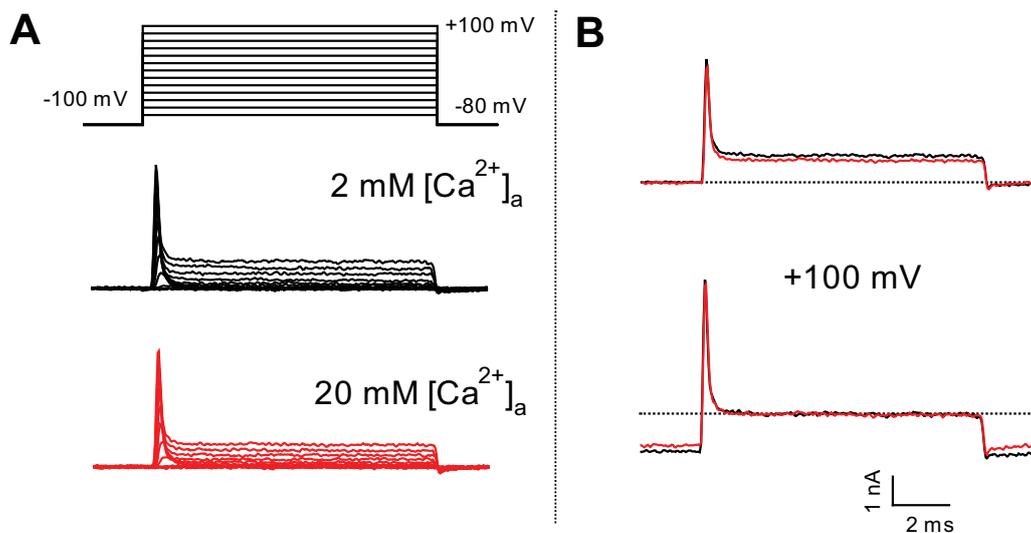


Abbildung 3-22. rNav1.4: **A:** Spannungsprotokoll und Stromantworten bei 2 bzw. 20 mM $[Ca^{2+}]_a$. **B:** Überlagerung der Stromantworten auf einen Testpuls auf +100 mV bei 2 mM (schwarze Linie) bzw. 20 mM $[Ca^{2+}]_a$ (rote Linie), unten korrigiert nach Abzug der nichtinaktivierenden Stromkomponente. Lösungskombination F.

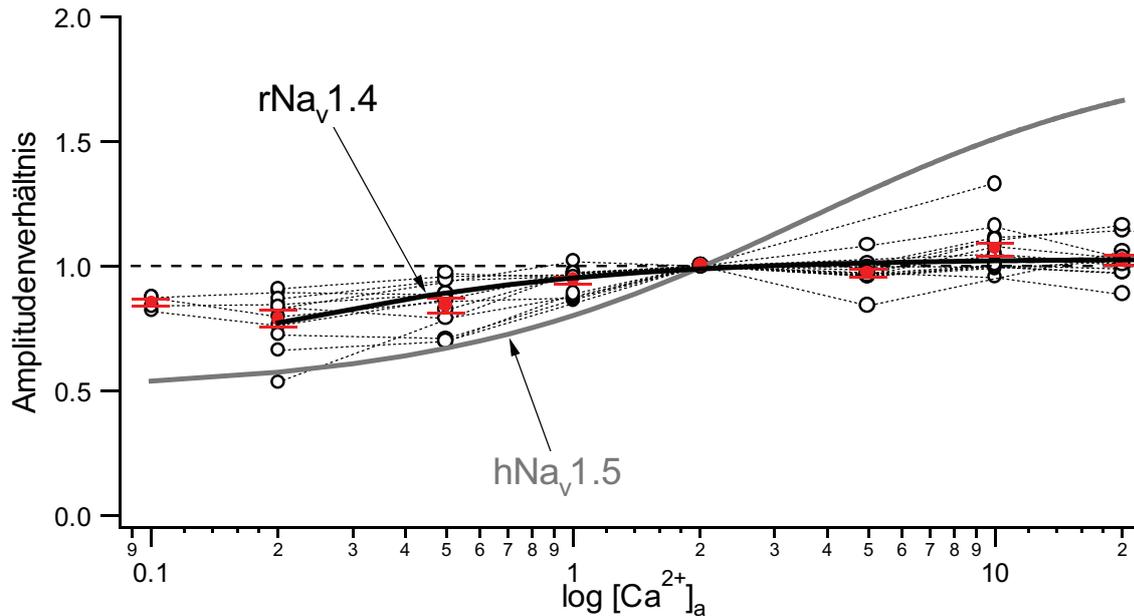


Abbildung 3-23. $rNa_{v1.4}$: Verhältnisse der Amplitudenänderung bei +100 mV aufgetragen gegen die logarithmische $[Ca^{2+}]_a$. Ergebnisse von 15 untersuchten Zellen (offene Kreise) mit Mittelwert der Einzelmessungen (gefüllte Kreise, zwei Ausreißer (nicht dargestellt) wurden nicht berücksichtigt). Die Fehlerbalken zeigen den SEM, wobei $n=4$ für 0,1 mM, $n=12$ für 0,2 mM, $n=12$ für 0,5 mM, $n=11$ für 1 mM, $n=11$ für 5 mM, $n=14$ für 10 mM und $n=12$ für 20 mM ist. Die Linien symbolisieren die Näherung nach der modifizierten Michaelis-Menten-Gleichung für $rNa_{v1.4}$ (schwarze Linie) und für $hNa_{v1.5}$ (graue Linie). Wichtung mit $1/SEM$. Lösungskombination F.

$rNa_{v1.4}$ unterlag einer geringeren Regulation durch $[Ca^{2+}]_a$ als $hNa_{v1.5}$. Für die Koeffizienten der Näherung mit der Michaelis-Menten-Gleichung ergab sich $1,44 \pm 0,58$ für das maximale Amplitudenverhältnis, $0,14 \pm 0,20$ mM für die halbmaximale Konzentration und $0,41 \pm 0,57$ für den relativen Strom bei 0 mM $[Ca^{2+}]_a$. Der Hill-Koeffizient konnte gleich 1 gesetzt werden, ohne den Verlauf der Funktion wesentlich zu beeinflussen. Es zeigte sich ein Unterschied in der Regulation der Na-Kanäle $rNa_{v1.4}$ und $hNa_{v1.5}$ durch extrazelluläre Kalziumionen, der vor allem in den für $rNa_{v1.4}$ wesentlich kleineren K_d und V_{max} deutlich wird (vergleiche für eine Übersicht der Ergebnisse der Näherungen Tabelle 7-5 im Anhang).

Wie $hNa_{v1.5}$, so wurde auch $rNa_{v1.4}$ auf Regulierbarkeit durch $[Mg^{2+}]_a$ untersucht.

Dazu wurden sechs Zellen der stabil transfizierten HEK293_ $rNa_{v1.4}$ -Zelllinie bei verschiedenen $[Mg^{2+}]_a$ untersucht. Die Experimente wurden unter den gleichen Versuchsbedingungen wie unter 3.3.1.2. für $hNa_{v1.5}$ durchgeführt. Der Auswärtsstrom bei 10 mM $[Mg^{2+}]_a$ wurde als Referenzwert zur Errechnung des Verhältnisses gewählt.

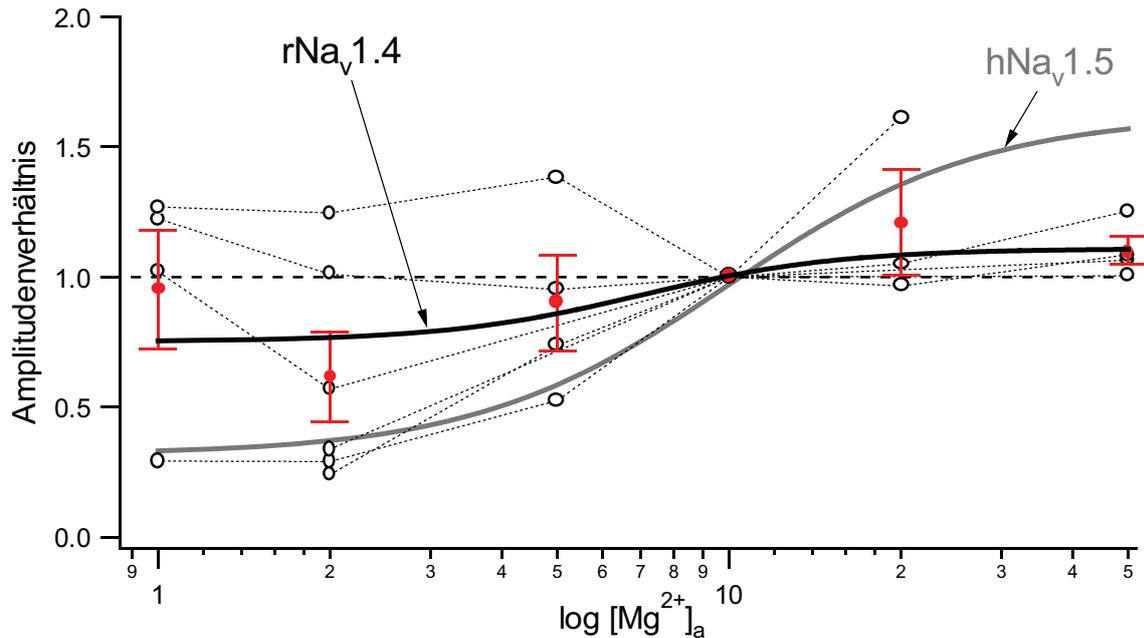


Abbildung 3-24. $rNa_v1.4$: Amplitudenänderung durch $rNa_v1.4$ bei verschiedener $[Mg^{2+}]_a$. Ergebnisse von sechs Zellen (offene Kreise), $n=4$ für 1 mM, 5 mM und 50 mM, $n=6$ für 2 mM und $n=3$ für 20 mM. Gefüllte Kreise symbolisieren den Mittelwert mit SEM, die schwarze Linie die modifizierte Michaelis-Menten-Näherung, Wichtung $1/SEM$. Die graue Linie stellt die Michaelis-Menten-Näherung für $hNa_v1.5$ dar. Lösungskombination G.

Wie in Abbildung 3-24 dargestellt, ist der $rNa_v1.4$ -Auswärtsstrom durch $[Mg^{2+}]_a$ regulierbar. Die Streuung der Messdaten ist größer als bei $[Ca^{2+}]_a$. Die Näherung mit der modifizierten Michaelis-Menten-Gleichung (schwarze Linie) ergab für die maximale Amplitudenänderung $1,86 \pm 0,24$, für die halbmaximale Konzentration $7,01 \pm 5,65$ mM, für den Hill-Koeffizienten $2,5 \pm 4,6$ und für den relativen Strom bei 0 mM $[Ca^{2+}]_a$ $0,75 \pm 0,18$. Allerdings ist die Variation der $rNa_v1.4$ -Amplitude durch $[Mg^{2+}]_a$ geringer als die des $hNa_v1.5$ -Auswärtsstroms (graue Linie in Abbildung 3-24).

3.3.3 Regulation des $rNa_v1.2$ -Auswärtsstroms durch $[Ca^{2+}]_a$

Um eine weitere Vergleichsmöglichkeit der Regulation der Na-Kanäle zu erhalten, wurde $rNa_v1.2$ aus dem Gehirn der Ratte transient in HEK293-Zellen transfiziert und auf seine Empfindlichkeit gegenüber $[Ca^{2+}]_a$ untersucht (Abbildung 3-25).

Ähnlich wie $rNa_v1.4$ reagierte $rNa_v1.2$ kaum auf Änderungen von $[Ca^{2+}]_a$ (Abbildung 3-26).

Bei den Untersuchungen von $rNa_v1.2$ fiel eine leichte Stromabnahme für hohe $[Ca^{2+}]_a$ auf. Dies verdeutlicht den Unterschied der Regulation durch $[Ca^{2+}]_a$ zu $hNa_v1.5$, bei dem gerade im Bereich hoher Divalentenkonzentrationen eine vermehrte Aktivität des Kanals gezeigt werden konnte.

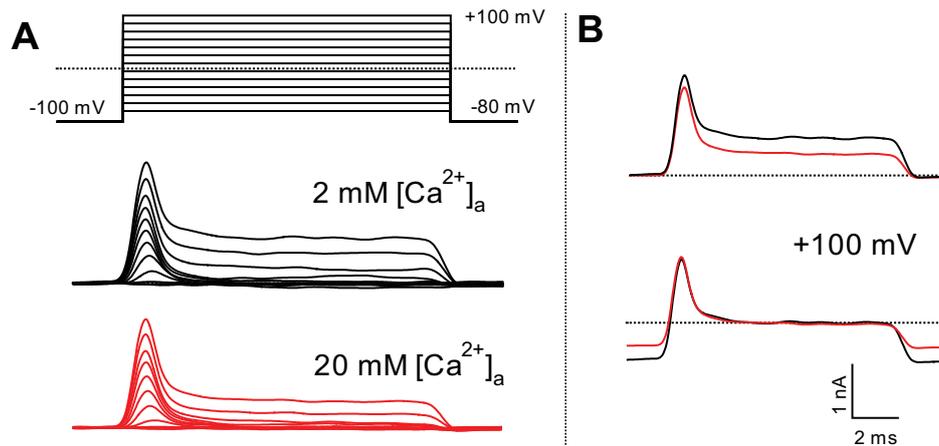


Abbildung 3-25. rNav_v1.2: **A:** Spannungsprotokoll und Stromantworten bei 2 bzw. 20 mM [Ca²⁺]_a. **B:** Überlagerung der Stromantworten auf einen Testpuls auf +100 mV bei 2 (schwarze Linie) bzw. 20 mM [Ca²⁺]_a (rote Linie). Lösungskombination F.

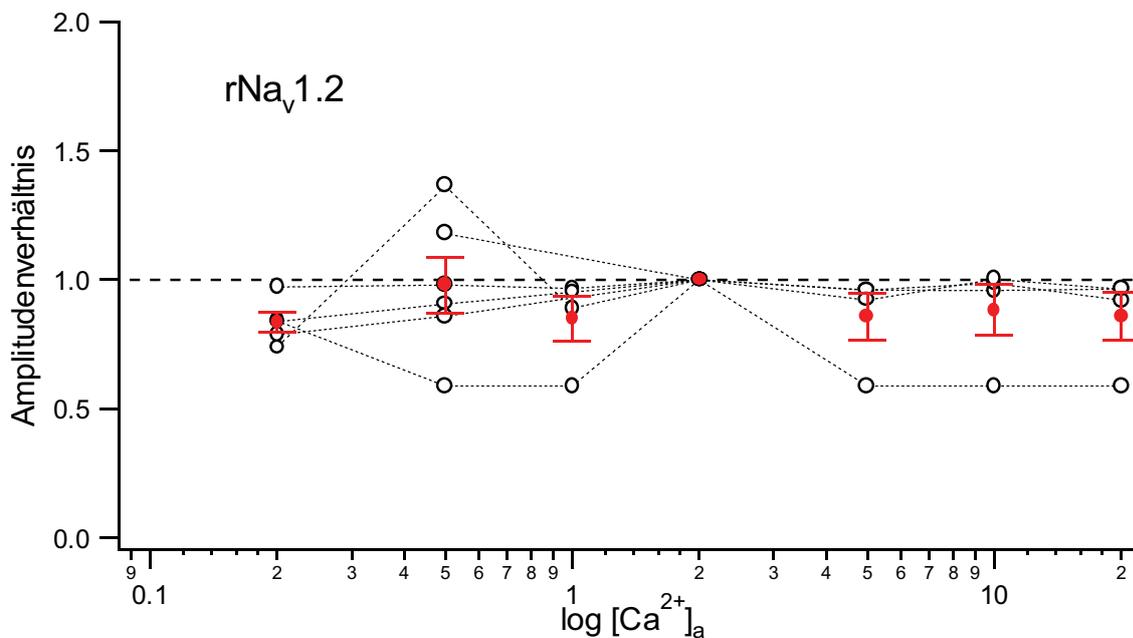


Abbildung 3-26. rNav_v1.2: Messungen an fünf Zellen (offene Kreise) und Mittelwert (gefüllte rote Kreise) mit SEM. Lösungskombination F.

3.3.4 Schaltvorgänge

Es konnte gezeigt werden, dass die Variation der Konzentration divalenter Ionen in der Badlösung zu Amplitudenänderungen des hNav_v1.5- und rNav_v1.4-Auswärtsstroms führte. Extrazelluläre divalente Ionen könnten Einfluss auf die Schaltvorgänge der Kanäle haben und so durch eine beschleunigte Aktivierung oder verlangsamte Inaktivierung zu einer Amplitudenzunahme führen.

Um dies zu überprüfen, wurden Stromkurven aller untersuchten Kanäle bei 2 und 20 mM $[Ca^{2+}]_a$ übereinandergelegt und skaliert. Es konnten keine Änderungen des Stromverlaufes nachgewiesen werden (Abbildung 3-27). Das lässt darauf schließen, dass die Schaltvorgänge weitgehend unverändert blieben.

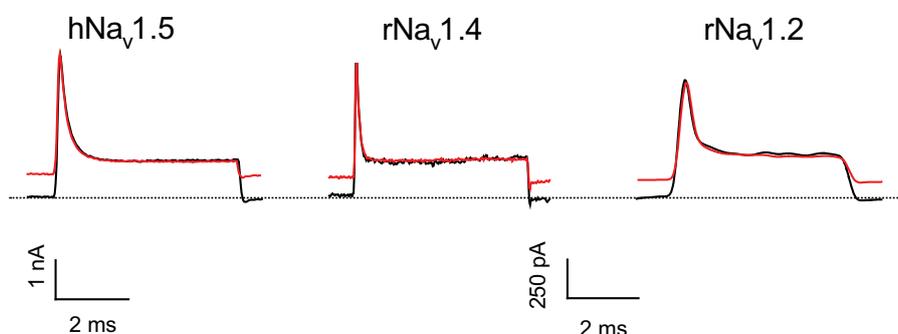


Abbildung 3-27. Originalstromaufnahmen von hNav_v1.5, rNav_v1.4 und rNav_v1.2 bei 2 mM (schwarze Linien) und 20 mM $[Ca^{2+}]_a$ (rote Linien), skaliert und überlagert. Lösungskombination F. Testspannung +100 mV.

3.3.5 Einfluss der Porenstruktur auf die Amplitudenmodulation durch $[Ca^{2+}]_a$

Wie die Experimente unter 3.3.1, 3.3.2, und 3.3.3 zeigten, reagierten die Kanäle hNav_v1.5, rNav_v1.4 und rNav_v1.2 unterschiedlich auf $[Ca^{2+}]_a$ -Änderungen. Während der Strom durch hNav_v1.5 einer starken Regulation durch $[Ca^{2+}]_a$ unterlag, blieb rNav_v1.2 davon weitgehend unbeeinflusst. Die Ursache für diese Regulationsunterschiede muss auf molekularer Ebene gesucht werden, z. B. in der für die Permeationseigenschaften sehr wichtigen Porenstruktur. Sie weist zwischen hNav_v1.5 und rNav_v1.2 wenige Unterschiede in der Aminosäuresequenz auf. Diese können durch Mutation beseitigt werden. So kann eine Mutante von rNav_v1.2 konstruiert werden, die in DI dieselbe Aminosäureabfolge in der Porenregion wie hNav_v1.5 hat (Heinemann et al. 1992a, vergleiche auch 1.3.4). Sollte nun diese Mutante (rNav_v1.2_F385C•N388R) genauso empfindlich auf Änderungen von $[Ca^{2+}]_a$ wie hNav_v1.5 reagieren, so wäre dies ein starker Hinweis darauf, dass die Kalziumionen mit der Porenregion interagieren, und so die Auswärtsstromamplitude beeinflussen.

Um die Reaktion des Auswärtsstroms auf Änderungen von $[Ca^{2+}]_a$ der Na-Kanäle hNav_v1.5, rNav_v1.2 und rNav_v1.2_F385C•N388R zu vergleichen, wurde deren RNS zur Expression in Oozyten injiziert und mit der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme untersucht.

Der Experimentablauf wurde wie bei den Messungen an HEK293-Zellen unter 3.3.1 gestaltet. Die Oozyten wurden nacheinander den verschiedenen $[Ca^{2+}]_a$ ausgesetzt (Lösungskombination F, CsCl mit variiertem $[Ca^{2+}]_a$, vergleiche Tabelle 7-3 im Anhang). Es war ein Auswärtsstrom durch die exprimierten Kanäle messbar, der durch intrazelluläre Ionen wie Na⁺ oder K⁺ vermittelt wurde. Jede Messung bei X mM $[Ca^{2+}]_a$ wurde von zwei Messungen bei

2 mM $[Ca^{2+}]_a$ umrahmt, und aus der Amplitudenhöhe wurde ein Quotient gebildet (relative Änderung des Auswärtsstroms bei X mM $[Ca^{2+}]_a = I_{xmM}/I_{2mM}$).

Da Ergebnisse von Experimenten an Oozyten nur bedingt mit solchen von Säugerzellen vergleichbar sind, wurde zuerst an den unmutierten Kanälen hNav1.5 und rNav1.2 der Einfluss von $[Ca^{2+}]_a$ auf die Auswärtsstromamplitude untersucht.

Hierbei zeigte der Auswärtsstrom des in Oozyten exprimierten Na-Kanals hNav1.5 eine Regulation durch extrazelluläres $[Ca^{2+}]_a$, wenn auch in geringerem Ausmaß als bei den Untersuchungen in HEK293-Zellen (Abbildung 3-28 A).

Messungen an Oozyten, die rNav1.2 exprimierten, zeigten wenig Beeinflussung des Auswärtsstroms durch $[Ca^{2+}]_a$ (Abbildung 3-28 B). Diese Ergebnisse sind konform mit den Messungen an HEK293-Zellen, die im untersuchten Konzentrationsbereich eine ausgeprägte Regulation des hNav1.5, nicht aber des rNav1.2 ergaben (siehe Abbildung 3-14, S.56 für hNav1.5 und Abbildung 3-26, S.67 für rNav1.2, bitte unterschiedliche Skalierung der y-Achse beachten).

Experimente mit der Doppelmutante rNav1.4_F385C•N388R zeigten eine geringe Beeinflussbarkeit des Auswärtsstroms durch $[Ca^{2+}]_a$ (Abbildung 3-28 C); sie verhält sich ähnlich wie rNav1.2. In Abbildung 3-28 D sind die Ergebnisse aller drei an Oozyten gemessenen Kanäle zusammengefasst und als Mittelwerte dargestellt.

Es fällt die ähnliche Regulation der Mutante rNav1.2_F385C•N388R und rNav1.2 durch $[Ca^{2+}]_a$ auf. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die mutierte Porenregion für den Einfluss von $[Ca^{2+}]_a$ auf den Auswärtsstrom weniger bedeutsam ist. Die Ca^{2+} -Ionenkanal-Interaktion scheint über andere Strukturen des Kanalproteins vermittelt zu werden.

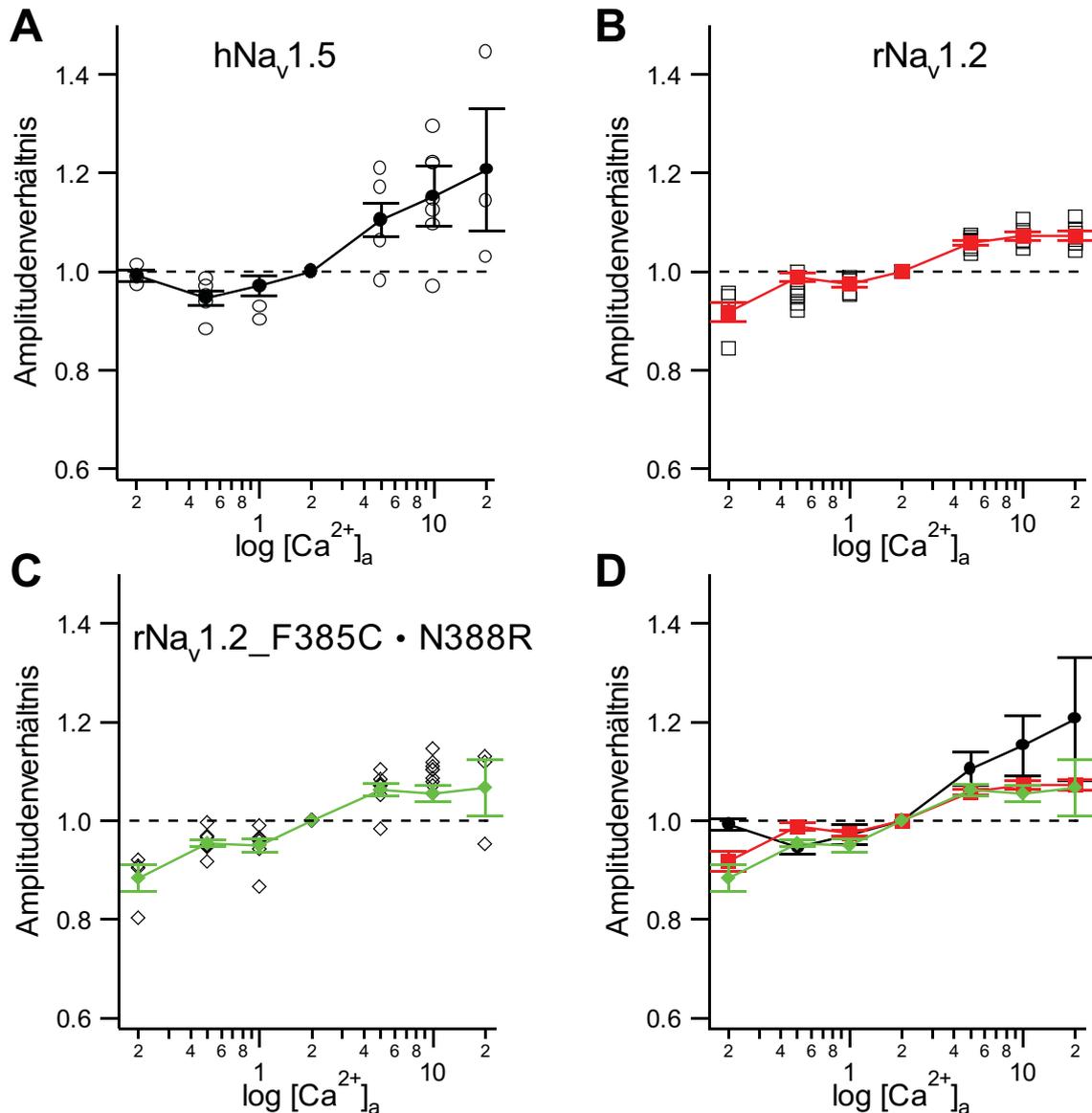


Abbildung 3-28. Na-Kanäle exprimiert in Oozyten, relative Auswärtsamplitude bei verschiedenen $[Ca^{2+}]_a$: **A:** $hNa_v1.5$, $n=7$. **B:** $rNa_v1.2$, $n=7$. **C:** $rNa_v1.2_F385C \cdot N388R$, $n=10$. **D:** Mittelwerte der Messungen von $hNa_v1.5$ (schwarze Kreise), $rNa_v1.2$ (rote Vierecke) und $rNa_v1.2_F385C \cdot N388R$ (grüne Rauten).

Offene Symbole stehen für Einzelmessungen, gefüllte Symbole für den Mittelwert (mit geraden Linien verbunden), Fehlerbalken stellen den SEM dar, Lösungskombination F extrazellulär.

3.3.6 Nichtinaktivierende Stromkomponente

Der Strom durch die Na-Kanäle bei den Messungen zur Regulation des Auswärtsstroms durch $[Ca^{2+}]_a$ und $[Mg^{2+}]_a$ schien, wie bereits oben erwähnt, nicht vollständig zu inaktivieren. Besonders bei hohen Potentialen zeigte der in HEK293-Zellen gemessene Auswärtsstrom eine signifikante nichtinaktivierende Stromkomponente. Dies konnte sowohl in Oozyten als auch in HEK293-Zellen beobachtet werden. Abbildung 3-29 A zeigt beispielhaft eine Stromantwort auf einen Testpuls auf +100 mV einer $hNa_v1.5_HEK293$ -Zelle bei 2 mM $[Ca^{2+}]_a$. Man kann erkennen, dass nach mehreren Millisekunden immer noch ein deutlicher Strom messbar war.

Die untere Stromaufzeichnung in Abbildung 3-29 A zeigt den Leckstrom, mit dem der obere Stromverlauf bereits korrigiert wurde.

Der nichtinaktivierende Strom unterlag von Zelle zu Zelle einer großen Variabilität. Abbildung 3-29 B zeigt beispielhaft den maximalen Auswärtsstrom (offene Kreise) von acht Zellen bei 2 mM $[Ca^{2+}]_a$, normiert auf den Wert der Amplitude bei +100 mV. Relativ zu diesem Wert sind die nichtinaktivierenden Stromkomponenten der acht Zellen dargestellt (gefüllte Kreise). Es ist eine hohe Variabilität der Stromgröße und des Potentials, ab welchem die Komponente auftritt, zu erkennen. In einigen Zellen inaktivierte der Strom bereits bei -5 mV nicht mehr vollständig, in anderen geschah dies erst ab einer Membranspannung von +70 mV.

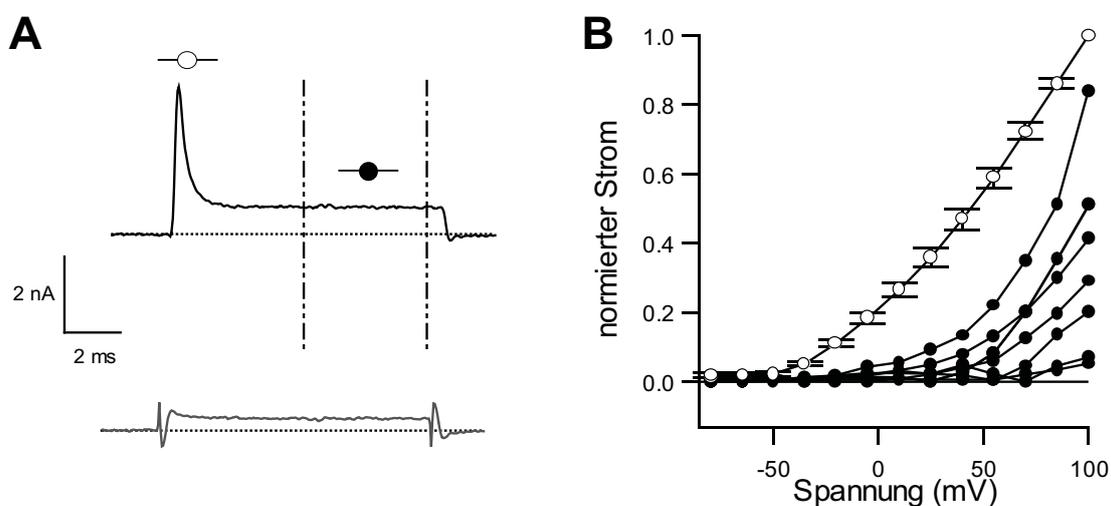


Abbildung 3-29. hNav1.5: **A:** Beispiel eines Stromverlaufes bei +100 mV und 2 mM $[Ca^{2+}]_a$, unten ist der Leckstrom dargestellt. **B:** gefüllte Kreise stehen für den mittleren nichtinaktivierenden Strom innerhalb des in A markierten Bereiches, Beispiele für acht Zellen, auf den maximalen Auswärtsstrom bei +100 mV normiert. Die offenen Kreise symbolisieren die Mittelwerte der Auswärtsströme der acht Zellen bei 2 mM $[Ca^{2+}]_a$ mit SEM, ebenfalls auf +100 mV normiert. Lösungskombination F.

3.3.6.1 Abhängigkeit von $[Ca^{2+}]_a$

Durch Änderungen von $[Ca^{2+}]_a$ lässt sich die Höhe des bestehen bleibenden Stroms beeinflussen. Der mittlere nichtinaktivierende Strom bei einer Kalziumionenkonzentration von X mM wurde mit demjenigen bei 2 mM $[Ca^{2+}]_a$ ins Verhältnis gesetzt. Daraus ergab sich die in Abbildung 3-30 dargestellte Abhängigkeit für acht HEK293_hNav1.5- und sieben HEK293_rNav1.4-Zellen. Die Regulation erfolgte invers zu derjenigen des Maximalstroms durch $[Ca^{2+}]_a$, d. h. je höher $[Ca^{2+}]_a$, desto geringer war die nichtinaktivierende Komponente. Erkennbar war die Regulation vor allem bei hohen $[Ca^{2+}]_a$.

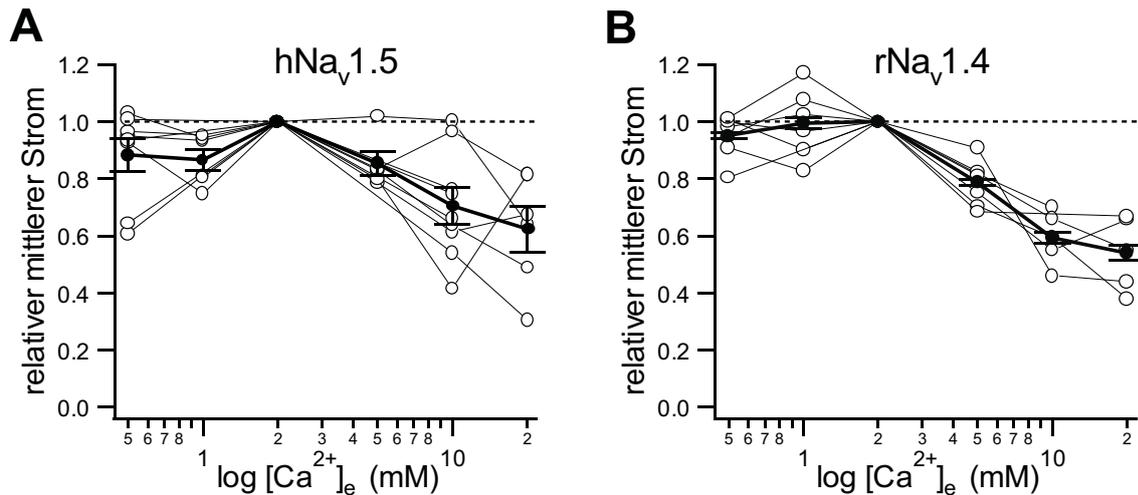


Abbildung 3-30. Mittlerer nichtinaktivierender Strom relativ zu demjenigen bei 2 mM $[Ca^{2+}]_a$. Messergebnisse (offene Kreise) mit Mittelwert (gefüllte Kreise) und SEM. **A:** hNa_v1.5, acht Zellen. **B:** rNa_v1.4, sieben Zellen. Lösungskombination F.

3.3.6.2 Zeitabhängigkeit

Die Dauer der Experimente hatte einen Einfluss auf die Veränderung des Maximalstroms durch $[Ca^{2+}]_a$. Auch die nichtinaktivierende Stromkomponente unterlag einer zeitlichen Veränderung. Dies war von Zelle zu Zelle unterschiedlich, wie in Abbildung 3-31 beispielhaft an jeweils fünf Zellen für hNa_v1.5 und rNa_v1.4 dargestellt wird. Es wurde die Amplitude des nichtinaktivierenden Stroms bei +100 mV und 2 mM $[Ca^{2+}]_a$ im Abstand von 5 Minuten gemessen. Zum Zeitpunkt 0 Minuten wurde die Membran unter der Pipettenöffnung durchbrochen und der Zugang zum Zellinneren hergestellt. Der gemessene nichtinaktivierende Strom der meisten hier dargestellten Zellen nahm mehrere Minuten nach Membrandurchbruch ab.

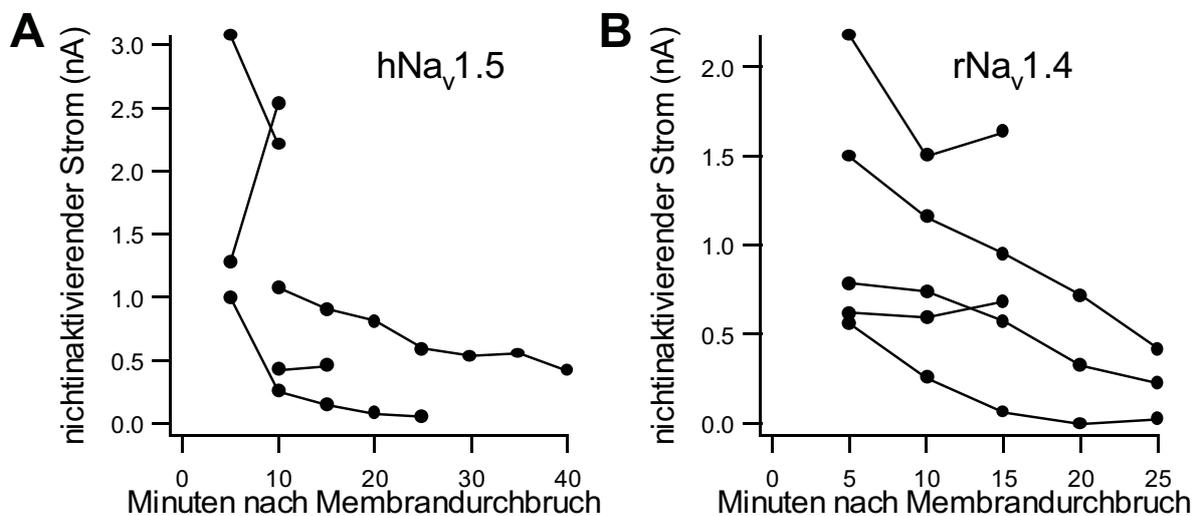


Abbildung 3-31. Nichtinaktivierende Stromkomponente relativ zum maximalen Auswärtsstrom zum jeweiligen Zeitpunkt nach Durchbrechen der Membran unter der Pipette. Lösungskombination F. **A:** hNa_v1.5. **B:** rNa_v1.4. Jeweils fünf Zellen.

3.3.6.3 Wirkung von TTX

TTX ist ein hochselektiver Na-Kanalblocker, der den Strom durch rNa_v1.4 in nanomolaren Konzentrationen effektiv unterdrückt. Das Toxin wurde mit einer Applikationspipette an die Zellen gebracht. Applikation von 100 µM dieses Toxins bewirkte keine wesentliche Änderung des nichtinaktivierenden Stroms, während der Maximalstrom deutlich abnahm.

Abbildung 3-32 zeigt beispielhaft zwei Stromaufnahmen von rNa_v1.4 mit sehr unterschiedlich großen nichtinaktivierenden Komponenten. Nach Applikation von 100 µM TTX ist der maximale Auswärtsstrom fast verschwunden, die nichtinaktivierende Stromkomponente wird hingegen nur wenig reduziert. Eine Übersicht über die TTX-Beeinflussbarkeit von sechs Zellen gibt Tabelle 3-1. Dargestellt ist der nichtinaktivierende Strom in nA vor und nach Toxinapplikation und die relative Veränderung in Prozent. Zum Vergleich wurde die Abnahme des maximalen Auswärtsstroms (um die nichtinaktivierende Komponente korrigiert) in gleicher Weise dargestellt. Die ersten beiden Experimente zeigen kaum eine Änderung des nichtinaktivierenden Stroms, wobei die maximale Amplitude um 95% bzw. 100% abnahm. In den Experimenten 4, 5 und 6 konnte eine Abnahme der relativ kleinen nichtinaktivierenden Stromkomponente gemessen werden. Diese Reduktion war jedoch mindestens um 29% kleiner als die des maximalen Auswärtsstroms.

Die beobachtete Abnahme des nichtinaktivierenden Stroms ist nicht mit der starken Blockierbarkeit des maximalen Auswärtsstroms zu vergleichen und es handelt sich daher mit hoher Wahrscheinlichkeit um einen Strom, der nicht durch Na-Kanäle fließt.

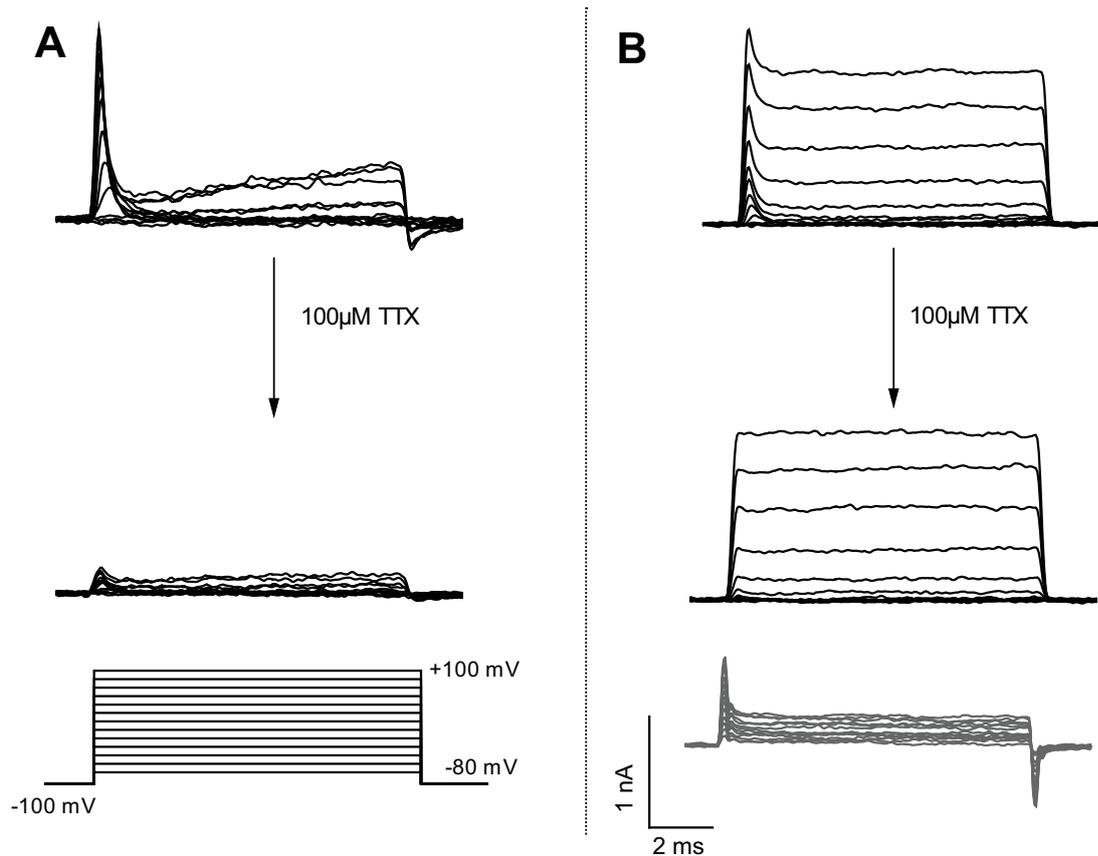


Abbildung 3-32. $r\text{Na}_v1.4$: Applikation von $100 \mu\text{M}$ TTX auf zwei Zellen (**A** und **B**) mit unterschiedlich großer nichtinaktivierender Stromkomponente. In **B** sind die zugehörigen Leckpulse vor Toxinapplikation dargestellt (graue Linien). Lösungskombination F. Strom- und Zeitbalken sowie das Spannungsprotokoll gelten für **A** und **B**.

Experiment-nummer	nichtinaktivierender Strom (nA) vor (li) und nach (re) Toxinapplikation		Veränderung in % nach Toxinapplikation	maximaler Auswärtsstrom (nA) vor (li) und nach (re) Toxinapplikation		Veränderung in % nach Toxinapplikation
	li	re		li	re	
1	0.76	0.65	-14	1.54	0.07	-95
2	0.83	0.77	-7	0.97	0	-100
3	1.38	1.49	+8	0.35	0	-100
4	0.45	0.18	-60	1.26	0.05	-95
5	0.25	0.14	-45	1.15	0.03	-97
6	0.09	0.04	-56	0.73	0.10	-85

Tabelle 3-1. $r\text{Na}_v1.4$: Darstellung des absoluten nichtinaktivierenden Stroms und der dazugehörigen maximalen Amplitude bei $+100 \text{ mV}$ und $2 \text{ mM } [\text{Ca}^{2+}]_a$ vor und nach Toxinapplikation ($100 \mu\text{M}$ TTX), und deren relative Veränderung in Prozent. Die Werte sind Mittelwerte von jeweils drei Messungen vor und nach Toxinapplikation. Vom Maximalstrom wurde die nichtinaktivierende Stromkomponente abgezogen.

4 Diskussion

4.1 Slip-Mode-Permeation

Die Veröffentlichung von Santana et al. 1998 löste eine umfangreiche wissenschaftliche Debatte aus, da sie mit einem Dogma der Na-Kanal-Forschung brach: Es wurde darin festgestellt, dass der Na-Kanal des Herzens nach sympathischer Stimulation seine Ionenselektivität ändern kann.

Na-Kanäle unterscheiden streng zwischen Kationen. Vor allem die Diskriminierung zwischen Na^+ und Ca^{2+} ist in diesem Zusammenhang bekannt und die molekularen Ursachen dafür wurden detailliert untersucht (Hille 1971; Heinemann et al. 1992b; Hille 1992; Schlieff et al. 1993; Heinemann et al. 1994; Favre et al. 1996; Schlieff et al. 1996; Pérez-García et al. 1997). Eine erhöhte Kalziumionenpermeabilität nach Kanalphosphorylierung, wie vorgeschlagen, wirft neue Fragen für eine molekulare Regulierbarkeit des genau bekannten Selektivitätsfilters auf, unter anderem, da Ca^{2+} als effektive Na-Kanalblocker bekannt sind (Woodhull 1973; Nilius 1988).

Die Kalziumionenpermeation durch Na-Kanäle nach sympathischer Stimulation, von Santana et al. Slip-Mode-Permeation genannt, wurde zuerst in Rattenherzzellen beobachtet.

Elektrophysiologische Messungen von Na^+ -Strömen an Herzzellen bringen aufgrund der Zellgröße technische Schwierigkeiten mit sich, da beispielsweise die Spannung über der großen Zellmembran nur schwer zu kontrollieren ist. Auch gibt es in diesen Zellen sehr viele mögliche Einflussfaktoren, die den Kanal, andere Kanäle oder Transporter zu vermehrtem Kalziumioneneinstrom veranlassen können. β -adrenerge Stimulation hat in Herzzellen viele Wirkungen, nicht nur auf Na-Kanäle. So ist zum Beispiel die Reaktion des Herzens auf Ca-Kanalblocker, wie dem von Santana *et al.* teilweise verwendeten Nifedipin, nach sympathischer Stimulation umgekehrt wie erwartet, d. h. sie aktivieren den Kalziumioneneinstrom anstatt ihn zu blockieren (Legssyer et al. 1997).

Um die oben genannten vielfältigen Probleme zu verringern und die molekularen Ursachen für die Selektivitätsänderung nach sympathischer Stimulation herausfinden zu können, wurde für die vorliegende Arbeit $\text{hNa}_v1.5$ heterolog in HEK293-Zellen exprimiert und durch Messungen des Umkehrpotentials auf Kalziumionenpermeabilität untersucht. Mit alleiniger Expression der α -Untereinheit ließ sich nach Forskolinexposition ein leicht zu negativen Spannungen verschobenes Umkehrpotential messen (von $0,8 \text{ mV} \pm 0,75 \text{ mV}$ auf $0,32 \text{ mV} \pm 0,42 \text{ mV}$ bei $2 \text{ mM } [\text{Ca}^{2+}]_a$). Bei einer auf 1 mV genauen Bestimmung des Umkehrpotentials, waren die

Abweichungen von 0 mV nicht signifikant. Eine sehr konservative Abschätzung der maximal möglichen Permeabilität P_{Ca}/P_{Na} nach sympathischer Stimulation bei 2 mM $[Ca^{2+}]_a$ innerhalb des errechneten Fehlers ergab 0,08. Dieses Ergebnis lässt keine Rückschlüsse auf vermehrte Ca^{2+} -Permeabilität unter den genannten Bedingungen zu.

In einer Reaktion auf die Veröffentlichung von Santana et al. 1998 erschienen zwei Untersuchungen zur Slip-Mode-Permeation in heterologen Expressionssystemen: Nuss und Marban 1999 exprimierten hNav1.5 in CHO-Zellen und Balke et al. 1999 in HEK293-Zellen. Beide konnten keine erhöhte Kalziumpermeation nach β -adrenerger Stimulation beobachten. Nav1.5 ist im Herzen mit der β 1-Untereinheit assoziiert und als Antwort auf die beiden genannten Veröffentlichungen versuchten Cruz et al. 1999 Slip-Mode-Permeation in HEK293-Zellen nachzuweisen. Dies gelang ihnen, allerdings nur, wenn α - und β 1-Untereinheit des Na-Kanals koexprimiert wurden. Sie konnten dabei nach adrenerger Stimulation einen Permeabilitätskoeffizienten P_{Ca}/P_{Na} von 0,79 bestimmen, der allerdings kleiner war, als der ursprünglich in Herzzellen gemessene von bis zu 1,42.

Wie die vorliegende Arbeit verdeutlicht, sind die Ergebnisse von Santana *et al.* unter den hier beschriebenen Bedingungen nicht reproduzierbar. Die Selektivität des hNav1.5 wurde unter ähnlichen Ionenkonzentrationen gemessen wie bei Cruz et al. 1999 und es wurde ebenfalls die β 1-Untereinheit in HEK293-Zellen koexprimiert. Das Umkehrpotential war für alle Messungen der heterodimeren Kanäle nicht signifikant von 0 mV verschieden. Die maximale relative Permeabilität für Ca^{2+} nach sympathischer Stimulation ergab bei 2 mM $[Ca^{2+}]_a$ innerhalb der errechneten Fehlergrenzen für die mit der β 1-Untereinheit koexprimierten Kanäle $P_{Ca}/P_{Na} = 0,03$. Dies ist eine sehr geringe Kalziumpermeation. Es zeigte sich, wie bei der Untersuchung der α -Untereinheit alleine, eine nicht-signifikante negative Verschiebung des Umkehrpotentials, ein Ergebnis, welches nicht durch Slip-Mode-Permeation erklärbar wäre.

Chandra et al. 1999 führten ähnliche Experimente durch und beobachteten ebenfalls eine negative Verschiebung des Umkehrpotentials nach sympathischer Stimulation. Die relative Permeabilität P_{Ca}/P_{Na} dieser Untersuchung betrug 0,017. Messungen an Meerschweinherzzellen von DelPrincipe et al. 2000 zeigten, dass Nav1.5 nach Phosphorylierung Kalziumionen im Verhältnis 0.04:1 permeieren lässt, eine Zahl, welche die kleinen Permeabilitäten der vorliegenden Arbeit und von Chandra et al. 1999 bestätigt.

Die Idee, dass Ca^{2+} durch Na-Kanäle permeiert ist nicht ganz neu. Leblanc und Hume 1990 konnten in Herzmuskelzellen eine kalziumioneninduzierte Kalziumionenfreisetzung (calcium-induced calcium release, CICR) durch einen Na^+ -Strom auslösen. Dafür war es nötig, dass die extrazelluläre Lösung Ca^{2+} enthielt; hier wurde diskutiert, dass die Kalziumionen über den

Na/Ca-Austauscher in die Herzzelle eintreten. Nach Stimulation mit ANP (atrio-natrioretic peptide) beobachteten Sorbera und Morad 1990 einen TTX-sensiblen Kalziumioneneinstrom.

Lemaire et al. 1995 berichteten über einen Ca^{2+} -Strom in menschlichen Vorhofzellen, der durch TTX blockiert werden kann. Die Kinetik dieses Stroms war ähnlich schnell wie der Strom durch Na-Kanäle. Er war nicht durch Ni^{2+} und La^{3+} blockierbar, d.h. es handelt sich nicht um T-Typ Ca-Kanäle. Lemaire et al. 1995 scheinen einen neuen TTX-sensiblen Kalziumionenstrom im Herzen entdeckt zu haben, der entweder durch Kanäle fließt, die den klassischen Na-Kanälen verwendet sind, oder tatsächlich durch Na-Kanäle mit veränderter Selektivität, eventuell durch Slip-Mode-Permeation. Um den TTX-sensiblen Ca^{2+} -Strom beobachten zu können, war es nötig, Na^+ -freie extrazelluläre Lösungen zu verwenden.

Über eine neue Na^+ -Stromkomponente im Herzventrikel der Ratte haben auch Aggarwal et al. 1997 berichtet. Sowohl in seiner Kinetik, dem aktivierenden Spannungsbereich, als auch in den Permeabilitätseigenschaften war dieser Strom vom klassischen Na^+ -Strom des Herzens verschieden. Aggarwal et al. 1997 scheinen einen neuen TTX-sensiblen Kalziumionenstrom entdeckt zu haben, der nicht durch die T- oder L-Typ Ca-Kanäle und nicht durch die klassischen Na-Kanäle des Herzens fließt. Auch bei diesen Untersuchungen war $[\text{Na}^+]_a = 0 \text{ mM}$. Zu fast dem gleichen Ergebnis kommen Leblanc et al. 1996 und Cole et al. 1997 mit Untersuchungen an Herzzellen des Meerschweinchens. Bemerkenswerterweise ist in Na^+ -freier extrazellulärer Lösung ein TTX-sensibler Kalziumioneneinstrom messbar.

Die fehlenden extrazellulären Na^+ -Ionen und die TTX-Abhängigkeit in all diesen Arbeiten führten Guatimosim et al. 2001 zu der Annahme, dass es sich hier um eine weitere Eigenschaft des Na-Kanals handelt, die sie $I_{\text{Na}(\text{null})}$ nannten. Die Fähigkeit, Kalziumionen permeieren zu lassen, wenn $[\text{Na}^+]_a = 0 \text{ mM}$, sei von der Slip-Mode-Permeation verschieden, die mit steigender $[\text{Na}^+]_a$ eher zunimmt (Cruz et al. 1999).

Dem wurde durch Chen-Izu et al. 2001 widersprochen, die den TTX-sensiblen Ca^{2+} -Strom in Rattenherzzellen auch in Lösungen mit $[\text{Na}^+]_a$ ungleich 0 mM messen konnten. In mit $\text{Na}_v1.5$ transfizierten HEK293-Zellen konnte dieser Strom nicht beobachtet werden, woraus Chen-Izu et al. 2001 schlossen, dass es sich um zwei verschiedene Na-Kanal-Populationen handelte.

In der Interaktion mit dem Na-Kanal des Herzens wird den extrazellulären Kalziumionen eine dreifache Rolle zugeschrieben: Blockierung des Ionenstroms, Verschiebung der Aktivierung (Hille 1972; Woodhull 1973; Nilius 1988; Hille 1992) und unter bestimmten Bedingungen permeierendes Ion ($I_{\text{Na}(\text{null})}$: Guatimosim et al. 2001 bzw. $I_{\text{Ca}(\text{TTX})}$: Chen-Izu et al. 2001, eventuell Slip-Mode: Santana et al. 1998).

Unter den hier beschriebenen Bedingungen konnte in dieser Arbeit, wie u.a. in Untersuchungen von Nuss und Marban 1999, Balke et al. 1999, Chandra et al. 1999 und DelPrincipe et al. 2000 kein Hinweis für die Existenz des Phänomens der Slip-Mode-Permeation gefunden werden.

4.2 Amplitudenreduktion nach mechanischer Stimulation von rNa_v1.4

Mechanische Stimulation durch das für den Lösungswechsel verwendete Perfusionssystem führte zu einer Reduktion der Einwärtsstromamplitude durch rNa_v1.4 und hNa_v1.5.

Die Ausprägung der rNa_v1.4-Stromreduktion war nicht konstant, sondern unterlag über einen Zeitraum von vier Monaten hinweg Schwankungen. Diese können, trotz gleichbleibender Behandlung, durch Einflüsse in der Zellkultur hervorgerufen sein. Beispielsweise kann das Zellmedium leicht veränderte Einzelbestandteile gehabt haben, evtl. im zugegebenen Kalbsserum. Die ersten elf Experimente wurden mit der Lösungskombination B2 gemessen. Durch die geringe [Na⁺]_a lag der maximale Strom dieser Experimente nicht über 2,25 nA. Die Amplitudenreduktion nach Einschalten des Perfusionssystems war mit dieser Ionenkonzentrationen etwas stärker ausgeprägt, als mit Lösungskombination C. Kleinere Ströme unterlagen tendenziell einer größeren Reduktion als die höheren Stromamplituden (Abbildung 3-5, S.44).

HEK293-Zellen können endogen Na-Kanäle exprimieren (Ströme bis 100-200 pA, Ukomadu et al. 1992). Diese werden physiologisch in die Membran eingebaut, mit Untereinheiten assoziiert (Moran et al. 2000) und mit dem Zytoskelett verbunden. Werden Na-Kanäle heterolog überexprimiert, so ist unklar, ob sie in der selben Weise behandelt werden wie die endogenen Kanäle. Die Stromhöhe vor mechanischer Stimulation wurde als Marker für den Grad der Kanalexpression der einzelnen Zellen untersucht. Tendenziell wurde eine umso geringere Abnahme gemessen, je größer die Amplitude vor Anschalten des Perfusionssystems war. Dieses Ergebnis kann für eine zelluläre Regulation sprechen, die ausgeprägter ist, wenn weniger Kanäle vorhanden sind. Es ist denkbar, dass die vorhandenen endogenen Proteine, die normalerweise mit den Kanälen in Verbindung stehen, wie beispielsweise die β-Untereinheiten, nicht ausreichen, um mit allen exprimierten Kanalproteinen zu interagieren. Wenn die Assoziation mit einem weiteren zelleigenem Protein Voraussetzung für eine Stromänderung nach mechanischer Stimulation ist, kann nur ein kleiner Teil der Kanäle reagieren. Ist die Menge dieses zelleigenen Proteins limitierend, wird der relative Teil der stimulierbaren Kanäle kleiner und ebenso die untersuchte relative Stromabnahme.

Die Zellen wurden zwei bis fünf Tage nach dem Ausplattieren, einem Vorgang der teilsynchronisierend wirkt, gemessen. Die Amplitudenreduktion war am fünften bzw. (unter Berücksichtigung der ersten elf Experimente) vierten Tag am stärksten ausgeprägt. Der Zellzyklus und die Dauer der Zellkultur scheint Einfluss auf die Amplitudenregulation durch mechanische Stimulation zu haben. Zur weitergehenden Untersuchung könnten Chemikalien

eingesetzt werden, welche die Zellen in bestimmten Zyklusstadien festhalten. Es ist auch denkbar, dass die Zellen mit steigender Zelldichte mehr, weniger bzw. andere Zytokine produzieren, die sich auf die zelluläre Stromregulation auswirken. Es wurden immer nur einzelne Zellen, ohne direkten Kontakt zu Nachbarzellen, untersucht. An den einmal auf Messschalen verteilten Zellen wurde kein Mediumwechsel durchgeführt. Auch die sich ändernde Nährstoffzusammensetzung kann einen Einfluss auf die Reaktion des Na^+ -Stroms auf mechanische Stimulation haben.

Die bisher genannten Messergebnisse weisen darauf hin, dass das Ausmaß der Amplitudenreduktion nach mechanischer Stimulation einer zellulären Regulation unterliegt. Gut bekannte und beeinflussbare Signalwege, die auch für die Beeinflussung von Na-Kanälen eine Rolle spielen, verlaufen über G-Proteine. Durch den Einsatz von $\text{GTP}\gamma\text{S}$ und PTX konnte gezeigt werden, dass G-Proteine (G_i -, G_s -, G_o - bzw. monomere G-Proteine, wie z.B. die Ras-Familie) in diesem Versuchsaufbau scheinbar keinen Einfluss auf die beobachtete Amplitudenänderung haben.

Na-Kanäle stehen mit dem Zytoskelett in Verbindung (Srinivasan et al. 1988; Davis et al. 1996; Hibino et al. 1999; Johnson 1999; Mironov und Richter 1999). Zwei neuere Untersuchungen konnten eine Regulation der Schaltvorgänge des $\text{hNa}_v1.4$ und $\text{rNa}_v1.4$ durch Unterdruck an der Patch-Pipette nachweisen (Tabarean et al. 1999; Shcherbatko et al. 1999). Shcherbatko et al. zeigten an Oozyten-Patch-Untersuchungen, dass Unterdruck zu einer beschleunigten schnellen Inaktivierung führt. Pharmakologische Zerstörung der Mikrotubuli, die dem Zytoskelett zugerechnet werden, führte zum selben Ergebnis. Die Autoren berichteten über eine Zunahme der Stromamplitude während der Änderung des Inaktivierungsmodus. Da das Zytoskelett auf Verformungen der Zelloberfläche reagieren kann, ist eine Beeinflussung der Kanäle nach mechanischer Stimulation der Zellen über dieses System möglich.

Hemmung der Aktinpolymerisierung durch Cytochalasin D führte zu einer Reduktion des Ganzzell- Na^+ -Stroms in Rattenventrikelzellen, die Inaktivierung war verlangsamt und die Aktivierung war zu positiveren Potentialen verschoben (Undrovins et al. 1995; Maltsev und Undrovins 1997). Der Na-Kanal wechselte in einen Schaltmodus, in dem er eine niedrigere maximale Offenwahrscheinlichkeit und eine größere nichtinaktivierende Aktivität zeigte. Durch Stabilisierung der Mikrotubuli mit Taxol wurde das Gegenteil erreicht, die Aktivierung wurde zu negativeren Potentialen verschoben. Maltsev und Undrovins zeigten in ihrer Untersuchung, dass über das F-actin- oder Mikrotubuli-gestützte Zytoskelett Einfluss auf die maximale Stromhöhe der Na-Kanäle im Herzen genommen werden kann. In der vorliegenden Arbeit wurden keine Stoffe eingesetzt, die direkt auf das Zytoskelett wirken. Eine Beeinflussung der

Amplitudenabnahme nach mechanischer Stimulation über das Zytoskelett könnte jedoch so überprüft werden.

Mechanische Dehnung isolierter Kardiomyozyten führte sowohl beim Meerschweinchen als auch beim Frosch zu einer Verkürzung des Aktionspotentials. Die Amplitude in den Zellen des Frosches nahm ab (Cazorla et al. 1998), was auf eine Verringerung der Aktivität des Na-Kanals infolge der Dehnung hindeutet.

Änderungen der Schaltvorgänge, gleich ob indirekt durch das Zytoskelett oder direkt über das Kanalprotein vermittelt, können zu einer Stromabnahme führen. Sollte nach mechanischer Stimulation die Aktivierung bzw. Inaktivierung der Kanäle schneller bzw. langsamer werden, so würde sich dies auf die Inaktivierungskonstante auswirken, die in der vorliegenden Arbeit vor und nach Anschalten des Perfusionssystems gemessen wurde. Es zeigte sich dabei jedoch allenfalls eine leichte Zunahme, die eher eine Amplitudenerhöhung erklären könnte. Die Regulation der Amplitudenabnahme nach mechanischer Stimulation scheint weder auf veränderte Schaltvorgänge durch direkte mechanische Kanalmodulation, noch auf die oben beschriebene Interaktion zwischen Na-Kanal und Zytoskelett (Shcherbatko et al. 1999), welche die mechanische Stimulation an das Kanalprotein weiterleiten und zu Schalmodusänderungen führen kann, zurückzuführen zu sein.

Weder durch Regulation der Schaltvorgänge noch durch Interaktion mit den Signalwegen der G-Proteine konnte mit unseren Methoden die Amplitudenreduktion nach mechanischer Stimulation erklärt werden.

Ein weiterer Erklärungsansatz für die beobachtete Amplitudenreduktion entsteht aus der Überlegung, dass die Kanäle von den Zellen in verschiedene Kompartimente, wie beispielsweise Kaveolen, transportiert werden könnten.

Kaveolen sind kleine Membraneinstülpungen mit einem Durchmesser von 50-100 nm, die am häufigsten in Endothelzellen vorkommen (für eine Übersicht vergleiche Anderson 1998). Sie sind über einen kurzen Hals mit der Zellmembran verbunden oder sitzen abgeschnürt direkt unter der Membran (Rothberg et al. 1992). Funktionell sind sie am zellulären Transport und der Signaltransduktion beteiligt. Sie tragen ein Markerprotein namens Kaveolin, welches je nach Zelltyp 21-24 kDa schwer ist und für die Krümmung des Halses verantwortlich ist (Kurzchalia et al. 1992; Kurzchalia und Parton 1999). Kaveolin-1 kommt in glatter Muskulatur, aber auch im Herzmuskel vor (Li et al. 2001), wobei Kaveolin-3 hauptsächlich im Herz- und Skelettmuskel gefunden werden kann. Zellen können bis zu vier verschiedene Unterarten exprimieren (von Kaveolin-1 gibt es eine α - und β -Unterform, Kogo und Fujimoto 2000), die zu Oligomerisierung neigen (für eine Übersicht vergleiche Parton 1996). Kaveolin fungiert als Bindeprotein

(„scaffolding protein“) für verschiedene Lipide und lipid-veränderbare Signaltransduktionsmoleküle (Sargiacomo et al. 1993) und interagiert mit G α -Proteinen (Li et al. 1995; Song et al. 1996).

Kaveolen verfügen über Transportproteine, die zum Abschnüren der Membraneinstülpungen nötig sind, und es gibt Untersuchungen die ein G-Protein-vermitteltes Abtauchen der Kaveolen nachweisen konnten (Parton et al. 1994; Schnitzer et al. 1995a; Schnitzer et al. 1996). Der genaue Stimulus, der zum Abschnüren führt, ist noch unbekannt, auch mechanischer Stress kommt in Frage. Parton et al. 1994 konnten durch Zerstörung des Zytoskeletts mit Cytochalasin D oder mit dem Kinaseinhibitor Staurosporin die Internalisierung der Kaveolen unterbinden. Da das Zytoskelett Verformungen der Zelloberfläche an andere Strukturen weiterleiten kann, ist es möglich, dass es die Internalisierung der Kaveolen nach mechanischer Stimulation initialisiert.

Würden Na-Kanäle von den Zellen in die Membran der Kaveolen eingelagert, so würden sie beim Abtauchen von der Zelloberfläche verschwinden und nicht mehr zum Gesamtstrom der Zelle beitragen. Dies führte zu einer Amplitudenreduktion und könnte die Beobachtungen nach mechanischer Stimulation erklären. Mit dieser Theorie ließe sich auch die unveränderte Kinetik der Kanäle nach Stromreduktion erklären.

Die Amplitudenabnahme nach mechanischer Stimulation ist am fünften Tag am größten. Dies kann darauf hindeuten, dass Zelldichte und Zytokinkonzentrationen eine Rolle spielen könnten. Auch Kaveolen unterliegen zellulärer Regulation. Die Abschnürung der Membransäckchen würde allerdings nicht durch G-Proteine aktiviert oder reguliert werden, da in den beschriebenen Experimenten mit PTX und GTP γ S keine Änderung der Amplitudenabnahme nachgewiesen werden konnte (vergleiche Abschnitt 3.2.1, S.40).

Aus aufgereinigten Kaveolen konnten von den spannungsgesteuerten Kanälen der K-Kanal K_v1.5 in Kaveolen nachgewiesen werden (Martens et al. 2001). Ellisman und Levinson 1982 konnten mit der Peroxidase-Antiperoxidase-Technik und der damaligen Elektronenmikroskopie erste Hinweise darauf finden, dass Na-Kanäle des *E. electricus* in Kaveolen lokalisiert sind.

Zur Überprüfung der Hypothese der kaveolenvermittelten Regulation der Verfügbarkeit der Na-Kanäle wurden elektronenmikroskopische Bilder von Herz- und HEK293-Zellen angefertigt. Dabei konnten frühere Arbeiten bestätigt werden, die in beiden Zelltypen Kaveolen nachweisen konnten (Abbildung 3-6 und Abbildung 3-7, S.47f, Masson-Pevet et al. 1980).

Die kaveolenreichen Membranabschnitte wurden mit TritonX100 aus den Zellen herausgelöst, eine Methode, die kritisiert wurde, da sie auch Teile der Membran herauslöst, die

den Kaveolen benachbart sind bzw. kein Kaveolin enthalten (sog. „rafts“, Schnitzer et al. 1995b). Um Kaveolen noch spezifischer aufzureinigen, wurde mit Anti-Kaveolin-1 gegen das Markerprotein Kaveolin-1 eine Immunopräzipitation aus Zellysaten mit TritonX100 behandelter Zellen durchgeführt. Man geht davon aus, dass die vom Kaveolin umschlossenen Membranbereiche zusammen mit dem Antikörperkomplex isoliert werden können.

In einem Westernblot der Präzipitate konnte mit dem Antikörper gegen Kaveolin-1 aus HEK293-Zellen und aus dem Lysat von Herzzellen eine Bande mit relevanter Größe bei ca. 45 kDa detektiert werden, welche dem Dimer des Kaveolins entsprechen kann (Größe des Monomers 21 kDa). Dies kann darauf hinweisen, dass die Präzipitate Kaveolin enthalten. Allerdings wird meist davon ausgegangen, dass nicht-kovalente Bindungen durch den SDS-Puffer gelöst werden.

Es treten auch unspezifische Hintergrundbanden auf (z. B. am Gelende), die zeigen, dass der Antikörper in diesem Experiment keine hohe Stringenz aufwies. Da der zweite Antikörper gegen das Kaninchenimmunglobulin gerichtet ist, ist es möglich, dass er den Präzipitationsantikörper erkannte (lange Kette bei 50 kDa, kurze Kette bei 25 kDa) und die entsprechenden Banden auf diese Interaktion zurück zuführen sind.

Eine Immunodetektion der Präzipitate mit dem Antikörper SP19, der gegen das hochkonservierte Inaktivierungsmotiv IFM der Na-Kanäle gerichtet ist, konnte eine Bande bei 260 kDa nachweisen. Dies entspricht der gesuchten Kanalgröße (Catterall 1992). Die Detektion einer Bande bei 260 kDa mit dem Na-Kanal spezifischen Antikörper in den Präzipitaten der rNav1.4_HEK293-Zellen und der Herzzellen spricht für eine Kolokalisation des Na-Kanals mit Kaveolen.

Auch in diesem Westernblot zeigten sich unspezifische Hintergrundbanden und die Detektion des Immunopräzipitationsantikörpers.

In Herzzellen findet sich der Na-Kanal mit den Kaveolen assoziiert, wie diese Ergebnisse vermuten lassen. Da Herzzellen sehr viele Na-Kanäle exprimieren, nicht nur in Kaveolen, konnte der Kanal auch im Kontrollpräzipitat detektiert werden.

In den Präzipitaten der hNav1.5-Zellen konnte auch nach mehreren Stunden Belichtungszeit keine Bande detektiert werden. Die Kanalexpression dieser Zellen war nicht so gut wie die von rNav1.4, so dass eventuell zu wenig Protein vorhanden war.

Der Hinweis aus der Immunopräzipitation, dass der Na-Kanal in den untersuchten Zellen in Kaveolen lokalisiert sein kann, sollte mit elektronenmikroskopischen Immunogoldmarkierungen überprüft werden. Dabei zeigte sich eine Anreicherung von drei bis vier

Goldkörnchen in Kaveolen, bei relativ geringer Hintergrundmarkierung (vergleiche Abbildung 3-9). Dieses Ergebnis ist ein weiterer Hinweis darauf, dass Na-Kanäle in Kaveolen vorhanden sind, und eventuell nach mechanischer Stimulation mit den Kaveolen von der Zelloberfläche abgeschnürt werden.

Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Yarbrough et al. 2002 die in isolierten Kaveolen mit dem Antikörper SP-19 Na-Kanäle durch Immunogoldmarkierungen nachweisen konnten. Zugabe von Isoproterenol bei Ganzzell-Patch-Clamp-Versuchen an Rattenherzzellen bewirkte eine Na^+ -Einwärtsstromzunahme, auch in Gegenwart eines Proteinkinase A Inhibitors. Durch einen Antikörper gegen Kaveolin-3 in der Pipettenlösung konnte die Stromzunahme unterbunden werden. Die Autoren schlossen daraus, dass Kaveolin-3 eine wesentliche Rolle im direkt vermittelten Stromanstieg durch Isoproterenol spielt und dass die Verfügbarkeit der Kanäle über Kaveolen vermittelt sein kann, was die in dieser Arbeit propagierte These der kaveolenvermittelten Na-Kanal-Regulation stützt.

4.3 Regulation der Auswärtsstromamplitude durch hNa_v1.5, rNa_v1.4 und rNa_v1.2 durch extrazelluläre divalente Kationen

Der Auswärtsstrom durch hNa_v1.5 erhöhte sich mit steigender [Ca²⁺]_a. Wie Woodhull 1973 bereits in Tintenfischaxonen bemerkte, ohne es näher zu untersuchen, ist dies nur bei sehr hohen Membranpotentialen zu beobachten. Wurde die [Ca²⁺]_a in der vorliegenden Arbeit von 0,1 mM auf 20 mM vergrößert, so nahm der Auswärtsstrom im Mittel um 293% zu (vergleiche Tabelle 6-4 und Tabelle 7-5 im Anhang). Dieses überraschende Ergebnis steht im Widerspruch zu der seit Jahrzehnten bekannten Blockierbarkeit des Na-Kanals durch extrazelluläre divalente Ionen (Woodhull 1973; Sheets et al. 1987; Nilius 1988). Auch die Verschiebung der Kanalöffnung zu positiven Potentialen spricht gegen den hier beobachteten Effekt einer Aktivitätssteigerung durch [Ca²⁺]_a.

Die detailliertere Untersuchung zeigte eine Abhängigkeit des hNa_v1.5-Auswärtsstroms von [Ca²⁺]_a, die sich mit der Michaelis-Menten-Gleichung beschreiben ließ. Die Amplituden wurden relativ zum Auswärtsstrom bei 2 mM [Ca²⁺]_a betrachtet. Mit der Annahme, dass bei 0 mM [Ca²⁺]_a ein minimaler Strom vorhanden ist (V_{\min}), ergab die Näherung mit der modifizierten Michaelis-Menten-Gleichung Werte, welche die Messdaten gut beschrieben. Die berechnete maximale relative Stromamplitude von $1,87 \pm 0,12$ deutet darauf hin, dass der Auswärtsstrom bei 2 mM [Ca²⁺]_a allein durch Erhöhung von [Ca²⁺]_a nahezu verdoppelt werden kann. Die halbmaximale Konzentration $K_d = 3,55 \pm 0,69$ zeigt den für die Amplitudenregulation besonders empfindlichen Konzentrationsbereich an. Er liegt relativ nahe an der physiologischen Serumkonzentration von 2,4 mM, (Schmidt und Thews 1997). V_{\min} beträgt $0,5 \pm 0,04$ und passt gut zu den bis 0,1 mM [Ca²⁺]_a gemessenen Daten.

Entfernte man alle divalenten Ionen aus der extrazellulären Lösung, so konnte kein Strom mehr gemessen werden, obwohl kurz vor und nach dieser Messung dieselbe Zelle bei 20 mM einen deutlichen Auswärtsstrom aufwies (vergleiche Abbildung 3-15, S.57). Für die Michaelis-Menten-Näherung lagen keine Messwerte für Konzentrationen kleiner 0,1 mM [Ca²⁺]_a vor, da mit diesen geringen Mengen divalenter Kationen in der Badlösung keine systematische Messungen möglich waren. Da aber bei 0 mM [Ca²⁺]_a kein Strom mehr detektierbar war, bezeichnet der Wert für V_{\min} möglicherweise ein Minimum; und bei sehr geringen Konzentrationen strebt der y-Wert der Näherungskurve dennoch gegen Null. Messungen, die dies untersuchen, müssen an Systemen erfolgen, die gegenüber sehr geringen extrazellulären divalenten Konzentrationen unempfindlicher als HEK293-Zellen reagieren (z.B. Tintenfischaxone).

Um die kalziumionenabhängige Regulation des Auswärtsstroms im untersuchten Konzentrationsbereich genauer zu analysieren, wurden Rauschanalysen in Ganzzell-Patch-Clamp-Konfiguration durchgeführt. Es wurde darauf geachtet, dass der Widerstand der Zell-Pipetten-Abdichtung während des ganzen Experiments im Gigaohmbereich und die Kompensation des Zugangswiderstandes über 70% lag. Auf diese Weise wurden das Hintergrundrauschen und kapazitive Artefakte beim Wechsel der Membranspannung möglichst gering gehalten. Da der Na-Kanal sehr schnell öffnet und inaktiviert (innerhalb von 3-5 ms) sind die genannten technischen Vorkehrungen wichtig, um das Rauschen während der Kanalöffnung möglichst artefaktfrei messen zu können.

Mit der Rauschanalyse konnte ein Anstieg der Offenwahrscheinlichkeit des $hNa_v1.5$ von 26% bei 2 mM auf 60% bei 20 mM $[Ca^{2+}]_a$ gemessen werden. Dieses Ergebnis könnte durch einen stabilisierenden Effekt der Kalziumionen auf die Kanalproteinkonformation erklärt werden.

Dieser Anstieg ging einher mit einer Abnahme der Einzelkanalamplitude (von 406 fA bei 2 mM auf 280fA bei 20 mM $[Ca^{2+}]_a$), was auf die Blockierungseigenschaften des Kalziumions zurückzuführen ist (Cukierman und Krueger 1990). Die Anzahl n der Kanäle war auch bei Messungen an einer Zelle sehr variabel und führte zu keiner eindeutigen Aussage über deren Veränderbarkeit durch $[Ca^{2+}]_a$.

Unter dem Aspekt, dass Ca^{2+} auch als permeierendes Ion in Erwägung gezogen wird (vergleiche 4.1, Santana et al. 1998), erscheint die beobachtete Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit bemerkenswert, da durch Erhöhung der treibenden Kraft für einen Einwärtsstrom, der Ionenfluss nach außen größer wird.

Die Effekte von Ca^{2+} auf erregbare Membranen wurden bisher vor allem als erregungshemmend beschrieben. Dies ist zum einen auf die Blockierung des Na-Kanals zurückzuführen, zum anderen auf die Verschiebung der Aktivierung zu positiveren Potentialen, so dass höhere Spannungen nötig sind, um den Na-Kanal zu aktivieren und ein Aktionspotential generieren zu können. Diese beiden Effekte sind vor allem bei niedrigeren Membranpotentialen relevant. In dieser Arbeit wird über einen aktivitätssteigernden Effekt berichtet, der bei hohen Membranpotentialen, hohen $[Ca^{2+}]_a$ sowie einem Na^+ -Auswärtsstrom zu einer erhöhten Offenwahrscheinlichkeit der Na-Kanäle führt.

Die bekannten hemmenden Effekte von $[Ca^{2+}]_a$ lassen sich durch Veränderungen des Oberflächenpotentials (Verschiebung der Aktivierung) bzw. direkte Interaktion mit dem Kanalprotein (Blockierung; nach der Theorie von Armstrong auch die Verschiebung der

Aktivierung, wenn Ca^{2+} am S4 bindet und es so in seiner Beweglichkeit behindert, Hille 1992) hinreichend erklären.

Für den beobachteten aktivierenden Effekt scheint das Oberflächenpotential eher eine untergeordnete Rolle zu spielen, da bei hohen Spannungen von einer Abstoßung der Ca^{2+} von der Zellmembran auszugehen ist. Außerdem können sie das membraninterne Feld nicht mehr wesentlich gegen eine Potentialdifferenz von beispielsweise +100 mV beeinflussen. Es ist also eher von einem Effekt direkt am Kanal auszugehen.

In einer Untersuchung von Townsend et al. 1997 wurde der Auswärtsstrom durch $\text{hNa}_v1.5$ exprimiert in Säugerzellen (tsA201-Zellen) untersucht. Bei hohen Membranpotentialen wurde $[\text{Na}^+]_a$ erhöht. Dies führte, analog zu den vorliegenden Experimenten mit $[\text{Ca}^{2+}]_a$, zu einer Auswärtsstromerhöhung. Die Autoren konnten, ähnlich wie in der vorliegenden Arbeit, als Ursache für die Stromerhöhung eine größere Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle messen. Sie vermuteten eine direkte Ca^{2+} -Kanal-Interaktion. Bei hohen positiven Potentialen und geringen Ionenkonzentrationen wird das vermutlich im Porenbereich gebundene Ion durch elektrische Anziehungs- bzw. Abstoßungskräfte eher vom Kanal entfernt. Da ein Kanal ohne gebundenes permeables Ion nach der Hypothese von Townsend et al. eine geringere Offenwahrscheinlichkeit hat, sinkt bei hohen Membranpotentialen und geringer $[\text{Na}^+]_a$ der messbare Strom. Es ist denkbar, dass auch Ca^{2+} an den Kanal bindet, ihn stabilisiert, bei hohen Spannungen vom Kanalprotein entfernt wird und dadurch p_o abnimmt, was die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Stromregulation erklären könnte.

Armstrong 1999 untersuchte an Tintenfischaxonen den Einfluss von $[\text{Ca}^{2+}]_a$ auf die Aktivierung des Na-Kanals. Ihre Ergebnisse legen nahe, dass die Kanäle nur schließen können, wenn sie ein Ca^{2+} gebunden haben, anderenfalls wechseln sie in eine nichtfunktionsfähige Konformation. Die Messungen bei 0 mM $[\text{Ca}^{2+}]_a$ der vorliegenden Arbeit stützen diese Annahme; auch hier war kein $\text{hNa}_v1.5$ -Auswärtsstrom messbar, da eventuell ein Großteil der Kanäle nicht mehr funktionsfähig war.

Mg^{2+} , ein weiteres physiologisch vorkommendes divalentes Ion, ist auch als Na-Kanal-Blocker bekannt (Sheets und Hanck 1992). Daher wurde in dieser Studie der Einfluss von $[\text{Mg}^{2+}]_a$ auf die gemessenen Parameter untersucht.

Um ungefähr die gleiche Höhe des $\text{hNa}_v1.5$ -Auswärtsstroms zu erreichen, musste eine fünfmal höhere Magnesium- als Kalziumionenkonzentration eingesetzt werden. Sollten divalente Ionen einen konformationsstabilisierenden Effekt haben, so ist Mg^{2+} darin nicht so effektiv wie

Ca^{2+} . Es zeigte sich eine ähnliche Regulation der Auswärtsstromamplitude durch $[\text{Mg}^{2+}]_a$ wie durch $[\text{Ca}^{2+}]_a$. Für geringere Konzentrationen ist die Regulation durch $[\text{Mg}^{2+}]_a$ sehr ausgeprägt, bei 1 mM beträgt der relative Auswärtsstrom im Mittel nur 25% desjenigen bei 10 mM. Die Daten ließen sich gut mit der modifizierten Michaelis-Menten-Gleichung abschätzen, mit der sich eine relative maximale Auswärtsstromamplitude von $1,62 \pm 0,03$ errechnen lässt (der Auswärtsstrom bei 10 mM $[\text{Mg}^{2+}]_a$ wurde als Referenz gewählt). Der minimale relative Strom beträgt nach dieser Abschätzung $0,32 \pm 0,03$. Auch hier kann es sich um ein Minimum handeln. Es fällt ein Hill-Koeffizient nahe 2 auf ($1,95 \pm 0,16$). Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Interaktion zwischen Kanal und Ion vermutlich nicht im Verhältnis 1:1 stattfindet. Da das Na-Kanalprotein aus vier verschiedenen Domänen besteht, ist es wahrscheinlich, dass bei der Ion-Kanal-Bindung Kooperativität vorliegt, man also nicht von einem Bindungsverhältnis von 1 : ~2 ausgehen kann, wie es der Hillkoeffizienten vermuten lassen könnte.

Neben $\text{hNa}_v1.5$ wurden auch $\text{rNa}_v1.4$ und $\text{rNa}_v1.2$ untersucht. $[\text{Ca}^{2+}]_a$ hatte einen geringeren Einfluss auf den Skelettmuskelkanal als auf den Herzmuskelkanal. Der relative Auswärtsstrom erreicht bei $\text{rNa}_v1.4$ maximal $1,02 \pm 0,02$ und minimal $0,41 \pm 0,57$, dies ist eine wesentlich kleinere Spanne als bei $\text{hNa}_v1.5$ ($V_{\max} = 1,87 \pm 0,12$, $V_{\min} = 0,50 \pm 0,04$ für $\text{hNa}_v1.5$; die Werte ergeben sich aus der modifizierten Michaelis-Menten-Gleichung). Für $[\text{Mg}^{2+}]_a$ zeigte sich eine schwächere Änderung der relativen $\text{rNa}_v1.4$ -Auswärtsstromamplitude als für $[\text{Ca}^{2+}]_a$ (maximal $1,11 \pm 0,06$, minimal $0,75 \pm 0,18$), die auch kleiner ist als für $\text{hNa}_v1.5$ (für eine Übersicht vergleiche Tabelle 7-5 im Anhang). Es zeigte sich für die Mg^{2+} - $\text{rNa}_v1.4$ -Interaktion ebenfalls ein Hillkoeffizient ungleich 1. Dies deutet darauf hin, dass zwar Ca^{2+} (Hillkoeffizient = 1) eher mit einer Stöchiometrie von 1:1 mit dem Kanal interagiert, Mg^{2+} hingegen mit mehreren Ionen pro Kanal interagieren könnte. Die Interpretation ist bei der Mg^{2+} - $\text{rNa}_v1.4$ -Interaktion sehr vorsichtig zu bewerten, da der Hillkoeffizient hier stark fehlerbehaftet ist. Um genauere Daten zu erhalten, müsste beispielsweise die Anzahl der Messungen erhöht werden.

$\text{rNa}_v1.2$ war fast gar nicht durch $[\text{Ca}^{2+}]_a$ regulierbar, so dass bei diesem Kanal nicht von der an $\text{hNa}_v1.5$ gemessenen Zunahme der Offenwahrscheinlichkeit ausgegangen werden kann. Cukierman und Krueger 1990 beobachteten an Rattengehirnkanälen in künstlichen Lipiddoppelschichten sogar eine Abnahme der Offenwahrscheinlichkeit, wenn extrazelluläre Bariumionen als einzige divalente Ionen der Lösung der extrazellulären Seite zugegeben wurden.

In drei der überexprimierenden Zellen zeigten die Kanäle $\text{rNa}_v1.4$ und $\text{rNa}_v1.2$ ein ähnliches Verhalten wie $\text{hNa}_v1.5$. Sie wurden als Ausreißer betrachtet und nicht in die

Berechnung des Mittelwertes miteinbezogen. Eventuell sind diese Zellen in einem Zustand, der sie besonders empfindlich für Veränderungen der extrazellulären divalenten Ionenkonzentration macht. Die beiden genannten Kanäle haben eine sehr lange intrazelluläre Verbindungsschleife zwischen der ersten und zweiten Domäne, die viele Phosphorylierungsstellen aufweist (vergleiche Abb. 1-2 in der Einleitung). Es ist denkbar, dass sie durch Proteinkinasen in einen Zustand gebracht wurden, der sie für extrazelluläre Ionen unempfindlicher macht als hNav1.5, der weniger Phosphorylierungsstellen aufweist.

Da es sich bei der Amplitudenregulation durch extrazelluläre divalente Ionen nicht um eine allgemeine Na-Kanaleigenschaft handelt, muss sie auf den unterschiedlichen Aminosäuresequenzen der drei untersuchten Kanäle beruhen. Es ist bekannt, dass Na-Kanäle unterschiedlich stark durch TTX blockiert werden. rNav1.2 ist durch geringe Mengen TTX blockierbar und war während der Experimente der vorliegenden Arbeit von Änderungen von $[Ca^{2+}]_a$ weitgehend unbeeinflusst. Die Porenregion der ersten Domäne dieses Kanals beherbergt eine TTX-Bindungsstelle und unterscheidet sich nur durch zwei Aminosäuren von derjenigen des TTX-unsensiblen hNav1.5. Die Mutante rNav1.2_F385C•N388R hat in der Porenregion der ersten Domäne die gleiche Aminosäureabfolge wie hNav1.5 (Heinemann et al. 1992a). Dadurch hat die Mutante dieselbe TTX-Empfindlichkeit wie hNav1.5 und ist durch Ca^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} und Zn^{2+} ähnlich blockierbar.

Um die genannten Kanäle und die Mutante zu untersuchen wurde die jeweilige mRNS in Oozyten injiziert und der exprimierte Kanal mit der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme untersucht. Die Versuche zeigten, dass auch in diesem Expressionssystem die Auswärtsstromamplitude durch hNav1.5 durch $[Ca^{2+}]_a$ reguliert werden konnte. Die zeitliche Auflösung des gemessenen Stroms in Oozyten ist wegen der großen Zellen relativ gering. Es wurden daher nur die Amplitude und keine Schaltvorgänge untersucht. Die Expression der Kanalproteine war gut, es entstanden große Ströme (bis 35 μA), so dass die endogenen Komponenten weitgehend vernachlässigt werden konnten.

rNav1.2 und rNav1.2_F385C•N388R waren beide im Vergleich mit hNav1.5 im Oozyten-Expressionssystem nur sehr schwach durch $[Ca^{2+}]_a$ regulierbar. Dies deutet darauf hin, dass die Regulation der Auswärtsstromamplitude der Na-Kanäle durch $[Ca^{2+}]_a$ zumindest nicht auf der mutierten Porenregion beruht, sondern vermutlich durch das restliche Kanalprotein vermittelt ist.

Die beschriebene Regulationsmöglichkeit der Na-Kanäle in Oozyten oder HEK293-Zellen ist nur unter relativ unphysiologischen Experimentalbedingungen messbar. Der Na^+ -Strom ist bei Potentialen nahe 0 mV unter physiologischen Bedingungen ein Einwärtsstrom und durch $[Ca^{2+}]_a$

blockierbar. Um die Steigerung der Aktivität der Na-Kanäle durch divalente Kationen beobachten zu können, müssen die beschriebenen, relativ unphysiologischen Messbedingungen gewählt werden (Auswärtsstrom und hohe Membranpotentiale), da sie sonst von den anderen Effekten der genannten Ionen überlagert werden.

Mit der Dauer der Experimente nahm die Auswirkung der Änderungen der divalenten Ionenkonzentration auf die Auswärtsstromamplitude zu. Je länger die Messung dauerte, desto mehr zelluläre Enzyme wurden durch die Pipettenlösung aus der Zelle ausgewaschen und desto länger konnte CsF mit zellulären Bestandteilen interagieren. Es ist also möglich, dass der untersuchte Effekt einer zellulären Inhibition unterliegt, die durch Einwirken der Pipettenlösung langsam unterdrückt wird.

Die Zunahme der Auswärtsstromamplitude bei steigender $[Ca^{2+}]_a$ ist nicht auf veränderte schnelle Schaltvorgänge zurückzuführen, da eine Überlagerung und Skalierung der Stromkurven bei 2 und 20 mM $[Ca^{2+}]_a$ keinerlei Unterschiede erkennen lässt. Dies ist nur erklärbar, wenn die schnellen Schaltvorgänge gleich bleiben oder Aktivierung und Inaktivierung in exakt dem gleichen Ausmaße verändert werden würden, was unwahrscheinlich erscheint.

Die Überlagerung der Stromkurven kann allerdings keine Aussage über die langsame Inaktivierung machen, die in Zeiträumen von Minuten abläuft. Das Haltepotential bei -100 mV liegt bereits in einem Bereich, in dem leichte Verschiebungen der langsamen Inaktivierung von $hNa_v1.5$ zu deutlichen Veränderungen der maximalen Stromamplitude führen können (Richmond 1998). Es ist bekannt, dass erhöhte $[Na^+]_a$ die langsame Inaktivierung vermindert (Townsend und Horn 1997). Wenn auch $[Ca^{2+}]_a$ einen vergleichbaren Effekt hat, wie von Woodhull 1973 vorgeschlagen, so kann dies die beobachteten Auswirkungen auf den Maximalstrom teilweise erklären. Die Zellen wurden vor jeder Messung einer Strom-Spannungskurve ca. 6-10 Sekunden lang der neuen $[Ca^{2+}]_a$ ausgesetzt, während Testpulse appliziert wurden. Sollte dies bereits ausgereicht haben, die langsame Inaktivierung zu verschieben, ließe sich daraus die größere Auswärtsstromamplitude bei erhöhtem $[Ca^{2+}]_a$ erklären. Diese Regulation ist bei $Na_v1.5$ nicht so stark ausgeprägt wie bei $Na_v1.4$ (Richmond 1998), wodurch die unterschiedlichen Ergebnisse für $hNa_v1.5$ und $rNa_v1.4$ dieser Arbeit verständlich werden könnten. Untersuchungen von Khodorov et al. 1974 und Zilberter et al. 1991 konnten in Rattenherzzellen eine Erhöhung des maximalen Anteils der Na-Kanäle im Zustand der langsamen Inaktivierung bei erniedrigtem $[Ca^{2+}]_a$ zeigen. Eine neuere Arbeit von Furue et al. 1998 wies hingegen in Froschmyozyten keinen Einfluss von $[Ca^{2+}]_a$ auf die langsame Inaktivierung nach.

Die Na-Kanäle des Herzens reagieren auf Änderungen von $[Ca^{2+}]_a$ in annähernd physiologischen Konzentrationsbereichen empfindlicher als die des Skelettmuskels bzw. Gehirns.

Eventuell liegt hier ein Gleichgewicht der erregenden und hemmenden Wirkungen von $[Ca^{2+}]_a$ vor, welches vor allem im Herzen sehr genau austariert ist. Die in dieser Arbeit beschriebene Aktivitätssteigerung durch $[Ca^{2+}]_a$, vermutlich durch direkte Ca^{2+} -Kanal-Interaktion hervorgerufen, wirkt der Blockierung und verminderten Aktivierbarkeit des Na-Kanals entgegen, die eher auf Änderungen des Oberflächenpotentials beruht.

Diese Regulation ist im Herzen von großer Wichtigkeit, da ein Ausfall der Skelettmuskulatur für den Organismus eher zu verkräften ist, als ein Sistieren des Herzschlags. Es könnte sich hier also um einen Protektionsmechanismus des Herzens handeln.

4.3.1 Nichtinaktivierende Stromkomponente

Die in dieser Arbeit unter 3.3 gemessenen Ströme zeigten bei hohen Potentialen und ohne extrazelluläre Na^+ -Ionen eine nichtinaktivierende Stromkomponente, die in HEK293-Zellen stärker als in Oozyten sowie von Zelle zu Zelle sehr variabel war und trotz funktionierender Leckkompensation auftrat. Der reine Auswärtsstrom, der teilweise während der 10 ms dauernden Testpotentiale zunahm, konnte durch $[Ca^{2+}]_a$ blockiert werden. Da keine TTX-Sensitivität vorlag, handelt es sich nicht um eine Na^+ -Stromkomponente. Es ist möglich, dass es sich hier um einen endogenen Strom handelt, der inkonstant in HEK293-Zellen exprimiert wird.

Ein ähnlicher nichtinaktivierender Strom konnte in unserem Labor in der Melanomzelllinie IGR-1 gemessen werden. Dieser ist durch Cs^+ getragen und hat eine ähnliche Kinetik. Allerdings trat er unter anderen Bedingungen auf (andere Konzentrationen von Cs^+ und Ca^{2+} , Beeinflussbarkeit durch Zellschwellung, Oxana Gawrilowa-Ruch, persönliche Mitteilung).

Ein Hinweis darauf, dass bei Ganzzell-Patch-Clamp-Messungen in HEK293-Zellen eine weitere nichtinaktivierende Stromkomponente auftreten kann, gibt die Anmerkung in der Veröffentlichung von Mignen und Shuttleworth 2000. Sie beobachteten gelegentlich einen spontan aktivierenden Strom, der eine lineare Strom-Spannungs-Kurve mit einem Umkehrpotential nahe 0 mV aufwies. Sie vermuteten einen nichtselektiven Kationenstrom. Dieser ist allerdings unterschiedlich von dem in unserem Labor beobachteten, da wir keinen Einwärtsstrom messen konnten.

Es ist auch denkbar, dass die in dieser Arbeit beobachtete Stromkomponente auf einem Artefakt beruht, der nicht mit der Leckkorrektur kompensiert werden kann. Eventuell handelt es

sich um einen Leckstrom, der nur bei hohen Potentialen auftritt. Die Zell-Pipetten-Abdichtung könnte bei hohen Potentialen eventuell undicht werden. Da sie durch $[Ca^{2+}]_a$ stabilisiert wird, können hohe $[Ca^{2+}]_a$ diesen Strom möglicherweise unterdrücken; dies könnte die Abnahme bei hohen $[Ca^{2+}]_a$ erklären.

In beiden Fällen, endogener nichtselektiver Kanal oder Artefakt, wäre der Strom keine Komponente des Na-Stroms und wurde daher von den Daten vor der Auswertung subtrahiert.

5 Schlussfolgerungen

Ca^{2+} hat am Na-Kanal, wie in dieser Diskussion dargestellt, vielfältige Funktionen. Es ist ein effektiver Blocker des Einwärtsstroms (Woodhull 1973; Nilius 1988). Durch Verschiebung der Aktivierung nimmt es von der Außenseite Einfluss auf Schaltvorgänge (Hille et al. 1975; Pusch 1990). Eine aktuelle Untersuchung zeigt, dass Ca^{2+} mit Calmodulin an der zellulären Seite des Kanals binden kann, und damit die langsame Inaktivierung verstärkt (Tan et al. 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurden die rekombinanten Na-Kanäle $\text{hNa}_v1.5$, $\text{rNa}_v1.4$ und $\text{rNa}_v1.2$ in heterologen Expressionssystemen (HEK293-Zellen, Oozyten) untersucht.

Es fanden sich Hinweise auf eine mechanische Beeinflussbarkeit des Einwärtsstroms, die möglicherweise mit der subzellulären Lokalisation der Na-Kanäle in Caveolen im Zusammenhang steht.

Extrazelluläre divalente Kationen (Ca^{2+} und Mg^{2+}) regulieren über Beeinflussung der Offenwahrscheinlichkeit (für Ca^{2+} untersucht) die Aktivität von $\text{hNa}_v1.5$, nicht aber von $\text{rNa}_v1.2$ und in geringerem Ausmaße von $\text{rNa}_v1.4$. Für diesen Regulationsmechanismus ist nicht die Porenregion der Domäne I verantwortlich, sondern andere Strukturen des Kanalproteins.

Untersuchungen zur Slip-Mode-Permeation führten in mehreren Forschungseinrichtungen zu kontroversen Ergebnissen. Es ist denkbar, dass andere Komponenten in Herzzellen einen Ca^{2+} Eintritt ermöglichen, die Na-Kanälen ähnlich sind. Es gibt z.B. Hinweise auf TTX-sensible Ca^{2+} -Ströme (Guatimosim et al. 2001; Chen-Izu et al. 2001).

Mit dem in dieser Arbeit verwendeten rekombinanten Expressionssystem konnte mit und ohne $\beta 1$ -Untereinheit an $\text{hNa}_v1.5$ kein Ca^{2+} -Einstrom im Sinne einer Slip-Mode-Permeation beobachtet werden.

6 Literatur

- Aggarwal, R., S. R. Shorofsky, L. Goldman and C. W. Balke (1997). "Tetrodotoxin-blockable calcium currents in rat ventricular myocytes: a third type of cardiac cell sodium current." Journal of Physiology **505**(2): 353-369.
- Aldrich, R. W., D. P. Corey and C. F. Stevens (1983). "A reinterpretation of mammalian sodium channel gating based on single channel recording." Nature **306**: 436-441.
- An, R. H., X. L. Wang, B. Kerem, J. Benhorin, A. Medina, M. Goldmit and R. S. Kass (1998). "Novel LQT-3 mutation affects Na channel activity through interactions between alpha- and beta1-subunits." Circulation Research **83**: 141-146.
- Anderson, R. G. W. (1998). "The caveolae membrane system." Annu. Rev. Biochem. **67**: 199-225.
- Armstrong, C. M. (1999). "Distinguishing surface effects of calcium ion from pore-occupancy effects in Na channels." PNAS **96**: 4158-4163.
- Armstrong, C. M. and F. Bezanilla (1974). "Charge movement associated with the opening and closing of the activation gates of the Na channels." Journal of General Physiology **63**: 533-552.
- Armstrong, C. M. and F. Bezanilla (1977). "Inactivation of the sodium channel. II. Gating current experiments." Journal of General Physiology **70**: 567-590.
- Backx, P. H., D. T. Yue, J. H. Lawrence, E. Marban and G. F. Tornaselli (1992). "Molecular localization of an ion-binding site within the pore of mammalian sodium channels." Science **257**: 248-251.
- Balke, C. W., L. Goldman, R. Aggarwal and S. R. Shorofsky (1999). "Whether "slip-mode conductance" occurs." Science **284**: 711-711a.
- Balser, J. R. (1999). "Structure and function of the cardiac sodium channels." Cardiovascular Research **42**: 327-338.
- Barchi, R. L., J. C. Tanaka and R. E. Furman (1984). "Molecular characteristics and functional reconstitution of muscle voltage-sensitive sodium channels." Journal of Cellular Biochemistry **26**: 135-146.
- Begenisich, T. (1992). Ion channel selectivity, permeation, and block. Methods in Enzymology, Academic Press. **207**: 92-100.
- Bennett, P. B., K. Yazawa, N. Makita and A. L. J. George (1995). "Molecular mechanism for an inherited cardiac arrhythmia." Nature **376**: 683-685.
- Catterall, W. A. (1992). "Cellular and molecular biology of voltage-gated sodium channels." Physiological Reviews **72**(4): S15-S48.
- Catterall, W. A. (2000). "From ionic currents to molecular mechanisms: The structure and function of voltage-gated sodium channels." Neuron **26**: 13-25.
- Catterall, W. A. (2001). "A 3D view of sodium channels." Nature **409**: 988-991.
- Cazorla, O., C. Pascarel, F. Brette and J.-Y. Guennec, Le (1998). "Modulation of ion channels and membrane receptors activities by mechanical interventions in cardiomyocytes: possible mechanisms for mechanosensitivity." Progress in Biophysics & Molecular Biology **71**: 29-58.
- Cha, A., P. C. Ruben, A. L. George, Jr., E. Rujimoto and F. Bezanilla (1999). "Voltage sensors in domains III and IV, but not I and II, are immobilized by Na⁺ channel fast inactivation." Neuron **22**: 73-87.
- Chahine, M., I. Deschene, L.-Q. Chen and R. G. Kallen (1996). "Electrophysiological characteristics of cloned skeletal and cardiac muscle sodium channels." American Journal of Physiology **271**: H498-506.

- Chahine, M., A. L. George, M. Zhou, S. Ji, W. Sun, R. L. Barchi and R. Horn (1994). "Sodium channel mutations in paramyotonia congenita uncouple inactivation from activation." Neuron **12**(February): 281-294.
- Chandler, W. K. and H. Meves (1970). "Evidence for two types of sodium conductance in axons perfused with sodium fluoride solution." Journal of Physiology **211**: 653-678.
- Chandra, R., V. S. Chauhan, C. F. Starmer and A. O. Grant (1999). " β -adrenergic action on wild-type and KPQ mutant human cardiac Na^+ channels: shift in gating but no change in $\text{Ca}^{2+}:\text{Na}^+$ selectivity." Cardiovascular Research **42**: 490-502.
- Chen, H., D. Gordon and S. H. Heinemann (2000). "Modulation of cloned skeletal muscle sodium channels by the scorpion toxins Lqh II, Lqh III, and Lqh α IT." European Journal of Physiology **439**: 423-432.
- Chen, H. and S. H. Heinemann (2001). "Interaction of scorpion alpha-toxins with cardiac sodium channels: binding properties and enhancement of slow inactivation." Journal of General Physiology **117**(6): 505-518.
- Chen, J., M. DeVivo, J. Dingus, A. Harry, J. Li, J. Sui, D. J. Carty, J. L. Blank, J. H. Exton, R. H. Stoffel, J. Inglese, R. J. Lewkowitz, D. E. Logothetis, J. D. Hildebrandt and R. Iyengar (1995). "A region of adenylyl cyclase 2 critical for regulation by G protein $\beta\gamma$ subunits." Science **268**: 1166-1169.
- Chen, L.-Q., V. Santarelli, R. Horn and R. G. Kallen (1996). "A unique role for the S4 segment of domain 4 in the inactivation of sodium channels." Journal of General Physiology **108**: 549-556.
- Chen-Izu, Y., Q. Sha, S. R. Shorofsky, S. W. Robinson, W. G. Wier, L. Goldman and C. W. Balke (2001). "I(CA(TTX) channels are distinct from those generating the classical cardiac Na^+ current." Biophysical Journal **81**(5): 2647-2659.
- Chiamvimonvat, N., M. T. Pérez-García, G. F. Tomaselli and E. Marban (1996a). "Control of ion flux and selectivity by negatively charged residues in the outer mouth of rat sodium channels." Journal of Physiology **491**(1): 51-59.
- Chiamvimonvat, N., M. T. Pérez-García, R. Ranjan, E. Marban and G. F. Tomaselli (1996b). "Depth asymmetries of the pore-lining segments of the Na^+ channel revealed by cysteine mutagenesis." Neuron **16**: 1037-1047.
- Cohen, S. A. and L. K. Levitt (1993). "Partial characterization of the rH1 sodium channel protein from rat heart using subtype-specific antibodies." Circulation Research **73**: 735-742.
- Cole, W. C., D. Chartier, M. Martin and N. Leblanc (1997). " Ca^{2+} permeation through Na^+ channels in guinea pig ventricular myocytes." American Journal of Physiology **273**: H128-H137.
- Conley, E. C. and W. J. Brammar (1999). The Ion Channel Facts Book - Voltage-gated Channels. San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto, Academic Press.
- Correa, A. M. and F. Bezanilla (1994). "Gating of the squid sodium channel at positive potentials." Biophysical Journal **66**: 1853-1863.
- Cruz, J., dos Santos, L. F. Santana, C. A. Frederick, L. L. Isom, J. D. Malhotra, L. N. Mattei, R. S. Kass, J. Xia, R.-H. An and W. J. Lederer (1999). "Whether "slip-mode conductance" occurs." Science **284**: 711-711a.
- Cukierman, S. (1996). "Regulation of voltage-dependent sodium channels." Journal of Membrane Biology **151**: 203-214.
- Cukierman, S. and B. K. Krueger (1990). "Modulation of sodium channel gating by external divalent cations: differential effects on opening and closing rates." European Journal of Physiology **416**: 360-367.
- Cummins, T. R., J. Zhou, F. J. Sigworth, C. Ukomadu, M. Stephan, L. J. Ptáček and W. S. Agnew (1993). "Functional consequences of a Na^+ channel mutation causing hyperkalemic periodic paralysis." Neuron **10**: 667-678.

- Daaka, Y., L. M. Luttrell and R. J. Lefkowitz (1997). "Switching of the coupling of the β_2 -adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A." Nature **390**: 88-91.
- Davis, J. Q., S. Lambert and V. Bennett (1996). "Molecular composition of the node of Ranvier: Identification of ankyrin-binding cell adhesion molecules neurofascin (mucin+/third FNIII domain-) and NrCAM at nodal axon segments." Journal of Cell Biology **135**(5): 1355-1367.
- DelPrincipe, F., M. Egger and E. Niggli (2000). "L-type Ca^{2+} current as the predominant pathway of Ca^{2+} entry during I_{Na} activation in β -stimulated cardiac myocytes." Journal of Physiology **527**(3): 455-466.
- Ellisman, M. H. and S. R. Levinson (1982). "Immunocytochemical localization of sodium channel distribution in the excitable membranes of *Electrophorus electricus*." PNAS **79**(21): 6707-6711.
- Fatt, P. and B. L. Ginsborg (1958). "The ionic requirements for the production of action potentials in crustacean muscle fibres." Journal of Physiology **142**: 516-543.
- Favre, I., E. Moczydlowski and L. Schild (1996). "On the structural basis for ionic selectivity among Na^+ , K^+ and Ca^{2+} in the voltage-gated sodium channel." Biophysical Journal **71**: 3110-3125.
- Fozzard, H. A. and D. A. Hanck (1996). "Structure and function of voltage-dependent sodium channels: comparison of brain II and cardiac isoforms." Physiological Reviews **76**(3): 887-926.
- Frank, O. (1895). "Zur Dynamik des Herzmuskels." Zeitschrift für Biologie **32**: 370-447.
- Freedman, N. J., S. B. Liggett, D. E. Drachman, G. Pei, M. G. Caron and R. J. Lefkowitz (1995). "Phosphorylation and desensitization of the human β_1 -adrenergic receptor." The Journal of Biological Chemistry **270**(30): 17953-17961.
- Frelin, C., C. Cognard, P. Vigne and M. Lazdunski (1986). "Tetrodotoxin-sensitive and tetrodotoxin-resistant Na^+ channels differ in their sensitivity to Cd^{2+} and Zn^{2+} ." European Journal of Pharmacology **122**: 245-250.
- Frohnwieser, B., L.-Q. Chen, W. Schreibmayer and R. G. Kallen (1997). "Modulation of the human cardiac sodium channel α -subunit by cAMP-dependent protein kinase and the responsible sequence domain." Journal of Physiology **498**(2): 309-318.
- Fujimoto, K. (1997). "SDS-digested freeze-fracture replica labeling electron microscopy to study the two-dimensional distribution of integral membrane proteins and phospholipids in biomembranes: practical procedure, interpretation and application." Histochemistry and Cell Biology **107**: 87-96.
- Furue, T., M. Yakehiro, K. Yamaoka, K. Sumii and I. Seyama (1998). "Characteristics of two slow inactivation mechanisms and their influence on the sodium channel activity of frog ventricular myocytes." European Journal of Physiology **436**: 631-638.
- Gellens, M. E., A. L. George, Jr., L. Chen, M. Cahine, R. Horn, R. L. Barchi and R. G. Kallen (1992). "Primary structure and functional expression of the human cardiac tetrodotoxin-insensitive voltage-dependent sodium channel." Proc Natl Acad Sci USA **89**: 554-558.
- Gershon, E., L. Weigl, I. Lotan, W. Schreibmayer and N. Dascal (1992). "Protein kinase A reduces voltage-dependent Na^+ current in *Xenopus* oocytes." The Journal of Neuroscience **12**(10): 3743-3752.
- Goldin, A. L., R. L. Barchi, J. H. Caldwell, F. Hofmann, J. R. Howe, J. C. Hunter, R. G. Kallen, M. H. Meisler, Y. B. Netter, M. Noda, M. M. Tamkun, S. G. Waxman, J. N. Wood and W. A. Catterall (2000). "Nomenclature of voltage-gated sodium channels." Neuron **28**: 365-368.
- Gordon, D. (1988). "Biochemical properties of sodium channels in a wide range of excitable tissues studied with site-directed antibodies." Biochemistry **27**(18): 7032-7038.

- Guatimosim, S., E. A. Sobie, J. Cruz, dos Santos and W. J. Lederer (2001). "Molecular identification of a TTX-sensitive Ca^{2+} current." American Journal of Physiology Cell Physiology **280**: C1327-C1339.
- Guy, H. R. and P. Seetharamulu (1986). "Molecular model of the action potential sodium channel." Proc Natl Acad Sci USA **83**: 508-512.
- Hamill, O. P., A. Marty, E. Neher, B. Sakmann and F. Sigworth (1981). "Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membranes patches." European Journal of Physiology **391**: 85-100.
- Hayward, L. J., G. M. Sandoval and S. C. Cannon (1999). "Defective slow inactivation of sodium channels contributes to familial periodic paralysis." Neurology **52**: 1447-1453.
- Heinemann, S. H. (1995). Guide to data acquisition and analysis. Single Channel Recording. E. Neher and B. Sakmann. New York, Plenum Press: 53-91.
- Heinemann, S. H. (1997). "Pore structure of voltage-gated ion channels." Progress in Cell Research **6**.
- Heinemann, S. H. and F. Conti (1992). Nonstationary noise analysis and application to patch clamp recordings. Methods of Enzymology. **207**: 137-148.
- Heinemann, S. H., T. Schlieff, Y. Mori and K. Imoto (1994). "Molecular pore structure of voltage-gated sodium and calcium channel." Brazilian J. Med. Biol. Res. **27**: 2781-2802.
- Heinemann, S. H., H. Terlau and K. Imoto (1992a). "Molecular basis for pharmacological differences between brain and cardiac sodium channels." Pflügers Arch **422**: 90-92.
- Heinemann, S. H., H. Terlau, W. Stühmer, K. Imoto and S. Numa (1992b). "Calcium channel characteristics conferred on the sodium channel by single mutations." Nature **356**: 441-443.
- Henley, J. R., E. W. A. Krueger, B. J. Oswald and M. A. McNiven (1998). "Dynamin-mediated internalization of caveolae." Journal of Cell Biology **141**(1): 85-99.
- Hibino, H., A. Terzic, A. Inanobe, Y. Horio and Y. Kurachi (1999). "Regulation of ion channels by membrane proteins." Current Topics in Membranes **46**: 243-272.
- Hille, B. (1971). "The permeability of the sodium channel to organic cations in myelinated nerve." Journal of General Physiology **58**: 599-619.
- Hille, B. (1972). "The permeability of the sodium channel to metal cations in myelinated nerve." Journal of General Physiology **59**: 637-658.
- Hille, B. (1992). Ionic Channels of Excitable Membranes. Sunderland, Massachusetts, Sinauer Associates INC.
- Hille, B., A. M. Woodhull and B. I. Shapiro (1975). "Negative surface charge near sodium channels of nerve: divalent ions, monovalent ions, and pH." Phil Trans R Soc Lond B **270**: 301-318.
- Hobai, I. A., F. C. Howarth, V. K. Pabbathi, G. R. Dalton, J. C. Hancox, J.-Q. Zhu, S. E. Howlett, G. R. Ferrier and A. J. Levi (1997). ""Voltage-activated Ca release" in rabbit, rat and guinea-pig cardiac myocytes, and modulation by internal cAMP." European Journal of Physiology **435**: 164-173.
- Hodgkin, A. L. and A. F. Huxley (1952). "A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve." Journal of Physiology **117**: 500 - 544.
- Hoischen, C., C. Fritsche, J. Gumpert, M. Westermann, K. Gura and B. Fahnert (2002). "Novel bacterial membrane surface display system using cell wall-less L-forms of *Proteus mirabilis* and *Escherichia coli*." Applied and Environmental Microbiology **68**(2): 525-531.
- Isom, L. L., K. S. DeJongh and W. A. Catterall (1994). "Auxiliary subunits of voltage-gated ion channels." Neuron **12**: 1183-1194.

- Isom, L. L., K. S. Jongh, De, D. E. Patton, B. F. X. Reber, J. Offord, H. Charbonneau, K. Walsh, A. L. Goldin and W. A. Catterall (1992). "Primary structure and functional expression of the β_1 subunit of the rat brain sodium channel." Science **256**: 839-842.
- Isom, L. L., D. S. Ragsdale, K. S. Jongh, De, R. E. Westenbroek, B. F. X. Reber, T. Scheuer and W. A. Catterall (1995). "Structure and function of the β_2 subunit of brain sodium channels, a transmembrane glycoprotein with a CAM motif." Cell **83**(3): 433-442.
- Johnson, B. D. (1999). "The company they keep: Ion channels and their intracellular regulatory partners." Advances in Second Messenger and Phosphoprotein Research **33**: 203-228.
- Jurman, M. E., L. M. Boland, Y. Liu and G. Yellen (1994). "Visual identification of individual transfected cells for electrophysiology using antibody-coated beads." BioTechniques **17**: 876-881.
- Khodorov, B. I., L. D. Shishkova and E. M. Peganov (1974). "Effect of procaine and calcium ions on slow sodium inactivation in the frog Ranvier node membrane." Bull Exp Biol Med **77**(3): 226-229.
- Kogo, H. and T. Fujimoto (2000). "Caveolin-1 isoforms are encoded by distinct mRNAs - Identification of mouse caveolin-1 mRNA variants caused by alternative transcription initiation and splicing." FEBS Letters **465**: 119-123.
- Kontis, K. J., A. Rounaghi and A. L. Goldin (1997). "Sodium channel activation gating is affected by substitutions of voltage sensor positive charges in all four domains." Journal of General Physiology **110**(4): 391 - 401.
- Kopf, G. S. and M. J. Woolkalis (1991). "ADP-Ribosylation of G Proteins with Pertussis Toxin." Methods in Enzymology **195**: 257-266.
- Korsgaard, M. P. G., P. Christophersen, P. K. Ahring and S.-P. Olesen (2001). "Identification of a novel voltage-gated Na^+ channel $\text{rNav}1.5\text{a}$ in the rat hippocampal progenitor stem cell line HiB5." European Journal of Physiology **443**: 18-30.
- Kurzchalia, T. V., P. Dupree, R. G. Parton, R. Kellner, H. Virta, M. Lehnert and K. Simons (1992). "VIP21, a 21-kD membrane protein is an integral component of trans-Golgi-network-derived transport vesicles." Journal of Cell Biology **1992**(118): 5.
- Kurzchalia, T. V. and R. Parton (1999). "Membrane microdomains and caveolae." Current Opinion in Cell Biology **11**: 424-431.
- Kusaka, S., N. Kapousta-Bruneau, D. G. Green and D. G. Puro (1998). "Serum-induced changes in the physiology of mammalian retinal glial cells: role of lysophosphatidic acid." Journal of Physiology **506**(2): 445-458.
- Laemmli, U. K., J. R. Paulson and V. Hitchins (1974). "Maturation of the head of bacteriophage T4. V. A possible DNA packaging mechanism: in vitro cleavage of the head proteins and the structure of the core of the polyhead." Journal of Supramolecular Structure **2**(2-4): 276-301.
- Leblanc, N., D. Chartier, M. Martin and W. C. Cole (1996). " Ca^{2+} permeation through Na^+ channels in guinea-pig ventricular myocytes." Biophysical Journal **70**: A279.
- Leblanc, N. and J. R. Hume (1990). "Sodium current-induced release of calcium from cardiac sarcoplasmic reticulum." Science **248**: 372-376.
- Legssyer, A., L. Hove-Madsen, J. Hoerter and R. Fischmeister (1997). "Sympathetic modulation of the effect of nifedipine on myocardial contraction and Ca current in the rat." Journal of Molecular and Cellular Cardiology **29**(2): 579-591.
- Lemaire, S., C. Piot, J. Seguin, J. Nargeot and S. Richard (1995). "Tetrodotoxin-sensitive Ca^{2+} and Ba^{2+} currents in human atrial cells." Receptors and Channels **3**: 71-81.
- Levi, A. J., I. A. Hobai, G. R. Dalton, F. C. Howarth, V. Pabbathi, J. C. Hancox and G. R. Ferrier (1997). "Sarcoplasmic reticulum Ca release activated by membrane depolarisation, in the absence of Ca^{2+} entry, in heart cells from rabbit, rat and guinea-pig." Biophysical Journal **72**(2): A161.

- Lewis, C. A. (1979). "Ion concentration dependence of the reversal potential and the single channel conductance." Journal of Physiology **286**: 417-445.
- Li, M., J. W. West, Y. Lai, T. Scheuer and W. A. Catterall (1992). "Functional modulation of brain sodium channels by cAMP-dependent phosphorylation." Neuron **8**: 1151-1159.
- Li, M., J. W. West, R. Numann, B. J. Murphy, T. Scheuer and W. A. Catterall (1993). "Convergent regulation of sodium channels by protein kinase C and cAMP-dependent protein kinase." Science **261**(September): 1439-1442.
- Li, S., T. Okamoto, M. Chun, M. Sargiacomo, J. E. Casanova, S. H. Hansen, I. Nishimoto and M. P. Lisanti (1995). "Evidence for a regulated interaction between heterotrimeric G proteins and caveolin." Journal of Biological Chemistry **270**(26): 15693-15701.
- Li, W.-P., P. Liu, B. K. Pilcher and R. G. W. Anderson (2001). "Cell-specific targeting of caveolin-1 to caveolae, secretory vesicles, cytoplasm or mitochondria." Journal of Cell Science **114**: 1397-1408.
- Lipp, P. and E. Niggli (1994). "Sodium current-induced calcium signals in isolated guinea-pig ventricular myocytes." Journal of Physiology **474**(3): 439-446.
- Lisanti, M. P., P. E. Scherer, J. Vidugiriene, Z. Tang, A. Hermanowski-Vosatka, Y.-H. Tu, R. F. Cook and M. Sargiacomo (1994). "Characterization of caveolin-rich membrane domains isolated from an endothelial-rich source: Implications for human disease." The Journal of Cell Biology **126**(1): 111-126.
- Liu, P., Y. Ying, Y.-G. Ko and R. G. W. Anderson (1996). "Localization of platelet-derived growth factor-stimulated phosphorylation cascade to caveolae." Journal of Biological Chemistry **271**(17): 10299-10303.
- Lu, T., H.-C. Lee, J. A. Kabatand and E. F. Shibata (1999). "Modulation of rat cardiac sodium channel by the stimulatory G protein α subunit." Journal of Physiology **518**(2): 371-384.
- Ma, J. Y., W. A. Catterall and T. Scheuer (1997). "Persistent sodium currents through brain sodium channels induced by G protein $\beta\gamma$ subunits." Neuron **19**: 443 - 452.
- Ma, J. Y., M. Li, W. A. Catterall and T. Scheuer (1994). "Modulation of brain Na^+ channels by a G-Protein coupled pathway." PNAS **91**: 12351-12355.
- Makielski, J. C., J. Limberis, Z. Fan and J. W. Kyle (1999). "Intrinsic lidocaine affinity for Na^+ channels expressed in *Xenopus* oocytes depends on α (hH1 vs. rSkM1) and $\beta 1$ subunits." Cardiovascular Research **42**: 503-509.
- Makita, N., P. B. Bennett, Jr. and A. L. George, Jr. (1994). "Voltage-gated Na^+ channel β subunit mRNA expressed in adult human skeletal muscle, heart, and brain is encoded by a single gene." The Journal of Biological Chemistry **269**(10): 7571-7578.
- Maltsev, V. A. and A. I. Undrovinas (1997). "Cytoskeleton modulates coupling between availability and activation of cardiac channel." American Journal of Physiology **273**: H1832-H1840.
- Marban, E., T. Yamagishi and G. F. Tomaselli (1998). "Topical Review - Structure and function of voltage-gated sodium channels." Journal of Physiology **508**(3): 647-657.
- Martens, J. R., N. Sakamoto, S. A. Sullivan, T. D. Grobaski and M. M. Tamkun (2001). "Isoform-specific localization of voltage-gated K^+ channels to distinct lipid raft populations - Targeting of $\text{K}_v1.5$ to caveolae." Journal of Biological Chemistry **276**(11): 8409-8414.
- Masson-Pevet, M., D. Gros and E. Besselsen (1980). "The caveolae in rabbit sinus node and atrium." Cell Tissue Res **208**(2): 183-96.
- Matsuda, J. J., H. Lee and E. F. Shibata (1992). "Enhancement of rabbit cardiac sodium channels by β -adrenergic stimulation." Circulation Research **70**: 199-207.
- McClatchey, A. I., S. C. Cannon, S. A. Slaugenhaupt and J. F. Gusella (1993). "The cloning and expression of a sodium channel $\beta 1$ - subunit cDNA from human brain." Human Molecular Genetics **2**: 745-749.

- McPhee, J. C., D. S. Ragsdale, T. Scheuer and W. A. Catterall (1995). "A critical role for transmembrane segment IVS6 of the sodium channel α subunit in fast inactivation." Journal of Biological Chemistry **270**(20): 12025-12034.
- McPhee, J. C., D. S. Ragsdale, T. Scheuer and W. A. Catterall (1998). "A critical role for the S4-S5 intracellular loop in domain IV of the sodium channel α -subunit in fast inactivation." Journal of Biological Chemistry **273**(2): 1121-1129.
- Mignen, O. and T. J. Shuttleworth (2000). "I_{ARC}, a novel arachidonate-regulated, noncapacitative Ca²⁺ entry channel." The Journal of Biological Chemistry **275**(13): 9114-9119.
- Mironov, S. L. and D. W. Richter (1999). "Cytoskeleton mediates inhibition of the fast Na⁺ current in respiratory brainstem neurons during hypoxia." European Journal of Neuroscience **11**: 1831-1834.
- Moorman, J. R., G. E. Kirsch, A. M. Brown and R. H. Joho (1990). "Changes in sodium channel gating produced by point mutations in a cytoplasmic linker." Science **254**: 688-690.
- Moran, O., M. Nizzari and F. Conti (2000). "Endogenous expression of the β 1A sodium channel subunit in HEK-293 cells." FEBS Letters **473**: 132-134.
- Morgan, K., E. B. Stevens, B. Shah, P. J. Cox, A. K. Dixon, K. Lee, R. D. Pinnock, J. Hughes, P. J. Richardson, K. Mizuguchi and A. P. Jackson (2000). " β 3: An additional auxiliary subunit of the voltage-sensitive sodium channel that modulates channel gating with distinct kinetics." PNAS **97**(5): 2308-2313.
- Murphy, B. J., J. Rogers, A. P. Perdichizzi, A. A. Colvin and W. A. Catterall (1996). "cAMP-dependent phosphorylation of two sites in the α subunit of the cardiac sodium channel." The Journal of Biological Chemistry **271**(46): 28837-28843.
- Neher, E., B. Sakmann and J. H. Steinbach (1978). "The extracellular patch clamp: a method for resolving currents through individual open channels in biological membranes." European Journal of Physiology **375**: 219-228.
- Nilius, B. (1988). "Calcium block of guinea-pig heart sodium channels with and without modification by the piperazinyldole." Journal of Physiology **399**: 537-558.
- Noda, M., T. Ikeda, T. Kayano, H. Suzuki, H. Takeshima, M. Kurasaki, H. Takahashi and S. Numa (1986). "Existence of distinct sodium channel messenger RNAs in rat brain." Nature **320**(6058): 188-192.
- Noda, M., S. Shimizu, T. Tanabe, T. Takai, T. Kayano, T. Ikeda, H. Takahashi, H. Nakayama, Y. Kanaoka, N. Minamino, K. Kangawa, H. Matsuo, M. A. Raftery, T. Hirose, S. Inayama, H. Hayashida, T. Miyata and S. Numa (1984). "Primary structure of electrophorus electricus sodium channel deduced from cDNA sequence." Nature **312**: 121-127.
- Noda, M., H. Suzuki, S. Numa and S. W. (1989). "A single point mutation confers tetrodotoxin and saxitoxin insensitivity on the sodium channel II." FEBS Letters **259**(1): 213-216.
- Nuss, H. B., N. Chiamimonvat, M. T. Perez-Garcia, G. F. Tomaselli and E. Marban (1995). "Functional association of the beta(1) subunit with human cardiac (hh1) and rat skeletal muscle (mu1) sodium channel alpha subunits expressed in xenopus oocytes." Journal of General Physiology **106**: 1171-1191.
- Nuss, H. B. and E. Marban (1999). "Whether "slip-mode conductance" occurs." Science **284**: 711-711a.
- Ono, K., H. A. Fozzard and D. A. Hanck (1993). "Mechanism of cAMP-dependent modulation of cardiac sodium channel current kinetics." Circulation Research **72**: 807-815.
- Ono, K., T. Kiyosue and M. Arita (1989). "Isoproterenol, DBcAMP, and forskolin inhibit cardiac sodium current." American Journal of Physiology **256**: C1131-C1137.
- Parton, R. G. (1996). "Caveolae and caveolins." Current Opinion in Cell Biology **8**: 542-548.
- Parton, R. G., B. Joggerst and K. Simons (1994). "Regulated internalization of caveolae." The Journal of Cell Biology **127**(5).

- Patlak, J. B. (1996). "Mutations, molecules, and myotonia." Journal of General Physiology **107**: 555-557.
- Patton, D. E., J. W. West, W. A. Catterall and A. L. Goldin (1992). "Amino acid residues required for fast Na⁺-channel inactivation: Charge neutralizations and deletions in the III-IV linker." Proc Natl Acad Sci USA **89**: 10905-10909.
- Pérez-García, M. T., N. Chiamimonvat, R. Ranjan, J. R. Balsler, G. F. Tomaselli and E. Marban (1997). "Mechanisms of Sodium/Calcium Selectivity in Sodium Channels Probed by Cysteine Mutagenesis and Sulfhydryl Modification." Biophysical Journal **72**: 989 - 996.
- Plummer, N. W. and M. H. Meisler (1999). "Evolution and diversity of mammalian sodium channel genes." Genomics **57**: 323-331.
- Pusch, M. (1990). "Divalent cations as probes for structure-function relationships of cloned voltage-dependent sodium channels." European Biophysical Journal **18**: 327-333.
- Pusch, M., M. Noda, W. Stühmer, S. Numa and F. Conti (1991). "Single point mutations of the sodium channel drastically reduce the pore permeability without preventing its gating." European Biophysical Journal **20**: 127-133.
- Qu, Y., L. L. Isom, J. C. Westenbroek, J. C. Rogers, T. N. Tanada, K. A. McCormick, T. Scheuer and W. A. Catterall (1995). "Modulation of cardiac Na⁺ channel expression in *Xenopus* oocytes by β 1 subunits." The Journal of Biological Chemistry **270**(43): 25696-25701.
- Richmond, J. E., D.E. Featherstone, H.A. Hartmann, and P.C. Ruben (1998). "Slow inactivation in human cardiac sodium channels." Biophysical Journal **74**: 2945-2952.
- Rizzo, V., A. S. Sung, P. Oh and J. E. Schnitzer (1998). "Rapid mechanotransduction in situ at the luminal cell surface of vascular endothelium and its caveolae." Journal of Biological Chemistry **273**(41): 26323-26329.
- Roche, K. W., R. J. O'Brien, A. L. Mammen, J. Bernhardt and R. L. Huganir (1996). "Characterization of multiple phosphorylation sites on the AMPA Receptor GluR1 subunit." Neuron **16**: 1179-1188.
- Rossie, S. (1999). "Regulation of voltage-sensitive sodium and calcium channels by phosphorylation." Advances in Second Messenger and Phosphoprotein Research **33**: 23-48.
- Rothberg, K. G., J. E. Heuser, W. C. Donzell, Y.-S. Ying, J. R. Glenney and R. G. W. Anderson (1992). "Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats." Cell **68**: 673-682.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis (1989). Molecular Cloning, A Laboratory Manual. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Santana, L. F., A. M. Gomez and W. J. Lederer (1998). "Ca²⁺ flux through promiscuous cardiac Na⁺ channels: slip-mode conductance." Science **279**: 1027-1033.
- Sargiacomo, M., M. Sudol, Z. Tang and M. P. Lisanti (1993). "Signal transducing molecules and glycosyl-phosphatidylinositol-linked proteins form a caveolin-rich insoluble complex in MDCK cells." Journal of Cell Biology **122**(4): 789-807.
- Satin, J., J. W. Kyle, M. Chen, P. Bell, L. L. Cribbs, H. A. Fozzard and R. B. Rogart (1992). "A mutant of TTX-resistant cardiac sodium channels with TTX-sensitive properties." Science **256**: 1202-1205.
- Sato, C., M. Sato, A. Iwasaki, D. Takeshi and A. Engel (1998). "The sodium channel has four domains surrounding a central pore." Journal of Structural biology **121**: 314-325.
- Sato, C., Y. Ueno, K. Asai, K. Takahashi, M. Sato, A. Engel and Y. Fujiyoshi (2001). "The voltage-sensitive sodium channel is a bell-shaped molecule with several cavities." Nature **409**: 1047-1051.
- Schlief, T., K. Imoto and H. S. H. (1993). "Single channel properties of rat brain II sodium channel mutated at the selectivity filter." European Journal of Physiology **422**: R 24.

- Schlieff, T., R. Schönherr, K. Imoto and S. H. Heinemann (1996). "Pore properties of rat brain II sodium channels mutated in the selectivity filter domain." European Biophysical Journal **25**: 75-91.
- Schmidt, R. F. and G. Thews (1997). Physiologie des Menschen. Berlin, Heidelberg, New York, Paris, London, Tokyo, Barcelona, Budapest, Springer Verlag.
- Schnitzer, J. E., J. Liu and P. Oh (1995a). "Endothelial caveolae have the molecular transport machinery for vesicle budding, docking, and fusion including VAMP, NSF, SNAP, Annexins and GTPases." Journal of Biological Chemistry **270**(24): 14399-14404.
- Schnitzer, J. E., D. P. McIntosh, A. M. Dvorak, J. Liu and P. Oh (1995b). "Separation of caveolae from associated microdomains of GPI-anchored proteins." Science **269**: 1435-1439.
- Schnitzer, J. E., P. Oh and D. P. McIntosh (1996). "Role of GTP Hydrolysis in Fission of caveolae directly from Plasma Membranes." Science **274**: 239-242.
- Schreibmayer, W., B. Frohnwieser, N. Dascal, D. Platzer, B. Spreitzer, R. Zechner, R. G. Kallen and H. A. Lester (1994). " β -adrenergic modulation of currents produced by rat cardiac Na^+ channels expressed in *Xenopus laevis* oocytes." Receptors and Channels **2**: 339-350.
- Schubert, B., A. M. J. VanDongen, G. E. Kirsch and A. M. Brown (1989). " β adrenergic inhibition of cardiac sodium channels by dual G-protein pathways." Science **245**: 516-519.
- Schubert, B., A. M. J. VanDongen, G. E. Kirsch and A. M. Brown (1990). "Inhibition of cardiac Na^+ currents by isoproterenol." American Journal of Physiology **258**(4 Pt 2): H977-H982.
- Shah, B. S., E. B. Stevens, R. D. Pinnock, A. K. Dixon and K. Lee (2001). "Developmental expression of the novel voltage-gated sodium channel auxiliary subunit β_3 , in rat CNS." Journal of Physiology **534**(3): 763-776.
- Shcherbatko, A., F. Ono, G. Mandel and P. Brehm (1999). "Voltage-dependent sodium channel function is regulated through membrane mechanics." Biophysical Journal **77**: 1945-1959.
- Sheets, M. F. and D. A. Hanck (1992). "Mechanisms of extracellular divalent and trivalent cation block of the sodium current in canine cardiac Purkinje cells." Journal of Physiology **454**: 299-320.
- Sheets, M. F., B. E. Scanley, D. A. Hanck, J. C. Makielski and H. A. Fozzard (1987). "Open channel properties of single canine cardiac Purkinje cells." Biophysical Journal **52**(1): 13-22.
- Sigworth, F. J. (1980). "The variance of sodium current fluctuations at the node of ranvier." Journal of Physiology **307**: 97-129.
- Smith, M. R. and A. L. Goldin (1997). "Interaction between the sodium channel inactivation linker and domain III S4-S5." Biophysical Journal **73**: 1885-1889.
- Smith, R. D. and A. L. Goldin (1992). "Protein kinase A phosphorylation enhances sodium channel currents in *Xenopus* oocytes." American Journal of Physiology **263**(6): C660-666.
- Smith, R. D. and A. L. Goldin (1996). "Phosphorylation of brain sodium channels in the I-II linker modulates channel function in *Xenopus* oocytes." The Journal of Neuroscience **16**(6): 1965-1974.
- Song, K. S., S. Li, T. Okamoto, L. A. Quilliam, M. Sargiacomo and M. P. Lisanti (1996). "Co-purification and direct interaction of Ras with caveolin, an integral membrane protein of caveolae microdomains." The Journal of Biological Chemistry **271**(16).
- Sorbera, L. A. and M. Morad (1990). "Atrionatriuretic peptide transforms cardiac sodium channels into calcium-conducting channels." Science **247**: 969-973.
- Srinivasan, Y., L. Elmer, J. Davis, V. Bennett and K. Angelides (1988). "Ankyrin and sprctrin associate with voltage-dependent sodium channels in brain." Nature **333**: 177-180.
- Stühmer, W. (1992). Electrophysiological recording from *Xenopus* oocytes. Methods of Enzymology. **207**: 319-339.

- Stühmer, W., F. Conti, H. Suzuki, X. Wang, M. Noda, N. Yahagi, H. Kubo and S. Numa (1989). "Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel." Nature **339**(6226): 597-603.
- Stühmer, W., C. Methfessel, B. Sakmann, M. Noda and S. Numa (1987). "Patch clamp characterization of sodium channels expressed from rat brain cDNA." European Biophysical Journal **14**: 131-138.
- Stühmer, W., H. Terlau and S. H. Heinemann (1992). "*Xenopus* oocytes for two-electrode and patch clamp recording." Pract. Elect. Meth.: 121-125.
- Sunami, A., Z. Fan, F. Nakamura, M. Naka, T. Tanaka, T. Sawanobori and M. Hiraoka (1991). "The catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase directly inhibits sodium channel activities in guinea-pig ventricular myocytes." Pflügers Arch **419**(3-4): 415-417.
- Sutkowski, E. M. and W. A. Catterall (1990). "Beta 1 subunit of sodium channels. Studies with subunit-specific antibodies." Journal of Biological Chemistry **265**(21): 12393-12399.
- Tabarean, I. V., P. Juranka and C. E. Morris (1999). "Membrane stretch affects gating modes of a skeletal muscle sodium channel." Biophysical Journal **77**: 758-774.
- Tan, H. L., S. Kupersmidt, G. Zhang, S. Stepanovic, D. M. Roden, A. A. M. Wilde, M. E. Anderson and J. R. Balsler (2002). "A calcium sensor in the sodium channel modulates cardiac excitability." Nature **415**: 442-447.
- Tang, L., N. Chehab, S. J. Wieland and R. G. Kallen (1998). "Glutamine substitution at Alanin¹⁶⁴⁹ in the S4-S5 cytoplasmic loop of domain 4 removes the voltage sensitivity of fast inactivation in the human heart sodium channel." Journal of General Physiology **111**: 639-652.
- Tang, Z. L., R. G. Kallen and R. Horn (1996). "Role of an S4-S5 linker in sodium channel inactivation probed by mutagenesis and peptide blocker." Journal of General Physiology **108**: 89-104.
- Terlau, H., S. H. Heinemann, W. Stühmer, M. Pusch, F. Conti, K. Imoto and S. Numa (1991). "Mapping the site of block by tetrodotoxin and saxitoxin of sodium channel II." **293**(1,2): 93-96.
- Thomsen, W. J. and W. A. Catterall (1989). "Localization of the receptor site for α -scorpion toxins by antibody mapping: Implications for sodium channel topology." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **86**: 10161-10165.
- Tomaselli, G. F., N. Chiamvimonvat, H. B. Nuss, J. R. Balsler, M. T. Pérez-García, R. H. Xu, D. W. Orias, P. H. Backx and E. Marban (1995). "A mutation in the pore of the sodium channel alters gating." Biophysical Journal **68**: 1814-1827.
- Toselli, M., V. Taglietti, V. Parente, S. Flati, A. Pavan, F. Guzzi and M. Parenti (2001). "Attenuation of G-Protein-mediated inhibition of N-type calcium currents by expression of caveolins in mammalian NG108-15 cells." Journal of Physiology **536**(2): 361-373.
- Townsend, C., H. A. Hartmann and R. Horn (1997). "Anomalous Effect of permeant ion concentration on peak open probability of cardiac Na channels." Journal of General Physiology **110**(July): 11-21.
- Townsend, C. and R. Horn (1997). "Effect of alkali metal cations on slow inactivation of cardiac Na⁺ channels." Journal of General Physiology **110**: 23-33.
- Trimmer, J. S., S. A. Cooperman, S. A. Tomiko, J. Zhou, S. M. Crean, M. B. Boyle, R. G. Kallen, Z. H. Sheng, R. L. Barchi and F. J. Sigworth (1989). "Primary structure and functional expression of a mammalian skeletal muscle sodium channel." Neuron **3**: 33-49.
- Ukomadu, C., J. Zhou, F. J. Sigworth and W. S. Agnew (1992). " μ l Na⁺ channels expressed transiently in human embryonic kidney cells: biochemical and biophysical properties." Neuron **8**: 663-676.

- Undrovinas, A. I., G. S. Shander and J. C. Marielski (1995). "Cytoskeleton modulates gating of voltage-dependent sodium channel in heart." American Journal of Physiology **269**: H203-H214.
- Vandenberg, C. A. and R. Horn (1984). "Inactivation viewed through single sodium channels." Journal of General Physiology **84**: 535-564.
- Vassilev, P., T. Scheuer and W. A. Catterall (1989). "Inhibition of inactivation of single sodium channel by a site-directed antibody." PNAS **86**: 8147-8151.
- Vassilev, P. M., T. Scheuer and W. A. Catterall (1988). "Identification of an intracellular peptide segment involved in sodium channel inactivation." Science **241**: 1658-1661.
- Vilin, Y. Y., N. Makita, A. L. George, Jr. and P. C. Ruben (1999). "Structural determinants of slow inactivation in human cardiac and skeletal muscle sodium channels." Biophysical Journal **77**: 1384-1393.
- Wasserstrom, J. A. and A.-M. Vites (1996). "The role of Na^+ - Ca^{2+} exchange in activation of excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes." Journal of Physiology **493**(2): 529-542.
- West, J. W., D. E. Patton, T. Scheuer, Y. Wang, A. L. Goldin and W. A. Catterall (1992). "A cluster of hydrophobic amino acid residues required for fast Na^+ -channel inactivation." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **89**: 10910-10914.
- Westermann, M., H. Leutbecher and H. W. Meyer (1999). "Membrane structure of caveolae and isolated caveolin-rich vesicles." Histochem Cell Biol **111**: 71-81.
- Whitaker, W. R. J., J. J. Clare and P. C. Emson (1999). "Differential distribution of voltage-gated sodium channel α - and β -subunits in human brain." Annals of the New York Academy of Sciences **868**: 88-92.
- Wickman, K. and D. E. Clapham (1995). "Ion channel regulation by G proteins." Physiological Reviews **75**(4): 865-885.
- Woodhull, A. M. (1973). "Ionic blockage of sodium channels in nerve." Journal of General Physiology **61**: 687-708.
- Wright, S., S. Y. Wang, Y. F. Xiao and G. K. Wang (1999). "State-dependent cocaine block of sodium channel isoforms, chimeras and chells coexpressed with the β 1 subunit." Biophysical Journal **76**: 233-245.
- Yang, N., A. L. George and R. Horn (1996). "Molecular basis of charge movement in voltage-gated sodium channels." Neuron **16**: 113-122.
- Yang, N. and R. Horn (1995). "Evidence for voltage-dependent S4 movement in sodium channels." Neuron **15**: 213-218.
- Yarbrough, T. L., T. Lu, H.-C. Lee and E. F. Shibata (2002). "Localisation of cardiac sodium channels in caveolin-rich membrane domains - Regulation of sodium current amplitude." Circulation Research **90**(443-449): 443-449.
- Zhou, J., J. Yi, N. Hu, A. L. George and K. T. Murray (2000). "Activation of protein kinase A modulates trafficking of the human cardiac sodium channel in *Xenopus* Oocytes." Circulation Research **87**: 33-38.
- Zilberter, Y., L. Motin, S. Sokolova, A. Papin and B. I. Khodorov (1991). "Ca-sensitive slow inactivation and lidocaine-induced block of sodium channels in rat cardiac cells." J. Mol. Cell Cardiol. **23**(Suppl 1): 61-72.
- Zimmer, T., C. Biskup, C. Bollensdorff and K. Benndorf (2002). "The β 1 subunit but not the β 2 subunit colocalizes with the human heart Na^+ channel (hH1) already within the endoplasmic reticulum." Journal of Membrane Biology **186**(1): 13-21.
- Zlotkin, E. (1999). "The insect voltage-gated sodium channel as target of insecticides." Annu. Rev. Entomol. **44**: 429-455.

7 Anhang

Table 7-1. Übersicht über Effekte sympathischer Stimulation auf $Na_v1.5$ (Herz).

Literatur	Expressionssystem	Kanal	Stimulation	Amplitude	Kinetik
Schubert et al. 1989 Schubert et al. 1990	neonatale Rattenherzzellen		ISO, 8brcAMP, GTP γ S	\downarrow $i\downarrow$	Inaktivierung zu neg. Potentialen verschoben
Matsuda et al. 1992	Rattenherzzellen		ISO, Forskolin, cAMP, PKA	\uparrow	Inaktivierungsrate erhöht
Santana et al. 1998	Rattenherzzellen		ISO	\uparrow	nicht untersucht
Lu et al. 1999	Rattenherzzellen		ISO, G $s\alpha$ 27-42	\uparrow n \uparrow	keine Änderung
Balke et al. 1999	Rattenherzzellen		ISO	\uparrow	Inaktivierungskonstante unverändert
Ono et al. 1989	Meerschweinherzzellen		ISO, DBcAMP, Forskolin	\downarrow	Inaktivierung zu neg. Potentialen verschoben
Sunami et al. 1991	Meerschweinherzzellen		PKA	\downarrow p $_o\downarrow$ $i \leftrightarrow$	Inaktivierung Aktivierung zu neg. Potentialen verschoben
DelPrincipe et al. 2000	Meerschweinherzzellen		ISO, cAMP	\leftrightarrow	Änderungen unklar
Ono et al. 1993	Hunde-, Hasen-, Schweineherzzellen		ISO, cAMP	$i \leftrightarrow$	Inaktivierung Aktivierung zu neg. Potentialen verschoben
Schreibmayer et al. 1994	Oozyten	rNa $_v$ 1.5 + β 2Rezeptor	ISO, cAMP, PKA	\uparrow	keine Änderung
Frohnwieser et al. 1997	Oozyten	hNa $_v$ 1.5	cAMP, S $_P$ -cAMPS	\uparrow	keine Änderung
Zhou et al. 2000	Oozyten	hNa $_v$ 1.5 + β 1 Untereinheit	8cptcAMP IBMX Forskolin	\uparrow	Inaktivierung Aktivierung zu neg. Potentialen verschoben

Literatur	Expressionssystem	Kanal	Stimulation	Amplitude	Kinetik
Nuss und Marban 1999	CHO-Zellen	hNav _v 1.5, rNav _v 1.5, hNav _v 1.5 + r oder hβ1 Untereinheit	ISO, dbcAMP	↑	nicht untersucht
Chandra et al. 1999	HEK293-Zellen	hNav _v 1.5	ISO, 8brcAMP	↓	Inaktivierung Aktivierung zu neg. Potentialen verschoben
Cruz et al. 1999	HEK293-Zellen	hNav _v 1.5	dbcAMP	↑	

Tabelle 7-2. Übersicht über Effekte sympathischer Stimulation auf Nav_v1.2 (Gehirn).

Literatur	Expressionssystem	Kanal	Stimulation	Amplitude	Kinetik
Li et al. 1992	Rattengehirnzellen		PKA	↓ p _o ↓	keine Änderung
Ma et al. 1994	Rattenhippokampuszellen		GTPγS	↑	Inaktivierung Aktivierung zu neg. Potentialen verschoben
Smith und Goldin 1992	Oozyten	rNav _v 1.2 + β-Rezeptor	8brcAMP	↑	keine Änderung
Gershon et al. 1992	Oozyten	rNav _v 1.2	cAMP, PKA, Forskolin	↓	keine Änderung
Smith und Goldin 1996	Oozyten	rNav _v 1.2	ISO	↓ p _o ↓	keine Änderung
Li et al. 1993	CHO-Zellen	rNav _v 1.2	8brcAMP	↑	keine Änderung
Ma et al. 1994	CHO-Zellen	rNav _v 1.2	GTPγS	↑	Inaktivierung Aktivierung zu neg. Potentialen verschoben

Tabelle 7-3. Verwendete Lösungskombinationen, Angaben in mM, soweit nicht anders angegeben. Der pH-Wert wurde je nach vorherrschendem monovalenten Ion mit NaOH, CsOH oder KOH auf 7,4 eingestellt. Jede Lösung enthielt 10 mM Hepes.

Lösungskombination	NaCl	KCl	CsCl	CsF	K- Glutamat	CaCl ₂	MgCl ₂	EGTA	Zusätze
A Pipette	12	155							
Bad	145	4				2/10			
B Pipette	10		110				5	10	
Bad	10		130			0,2/2/10			10 μ M/ 50 μ M Forsk
B2 Pipette	10		110				5	10	
Bad	10		130			2			
C Pipette	10		110				5	10	
Bad	140					2			5 Gluc
D Pipette	20				135		4		0,5 ATP, 400 μ M GTP γ S bzw. 20 μ M PTX
Pipette (für Kontrollen)	10	120					2	10	
Bad	140					2			5 Gluc
E Pipette	12	155							
Bad			150			2/10			
F Pipette	20			120				10	
Bad			150			0/0,2/0,5/ 1/2/5/10			
			135			20			
			100			50			
G Pipette	20			120				10	
Bad			150				1/2/5/10		
			135				20		
			100				50		

Tabelle 7-4. Übersicht über die Mittelwerte der Amplitudenverhältnisse aus Kapitel 3.3 ab S.51 bei den angegebenen Konzentrationen der divalenten Ionen (in mM).

Konz.	$[\text{Ca}^{2+}]_a$			Konz.	$[\text{Mg}^{2+}]_a$	
	hNav1.5	rNav1.4	rNav1.2		hNav1.5	rNav1.4
0,1	0,59	0,85	-	1	0,25	0,95
0,2	0,58	0,74	0,84	2	0,50	0,62
0,5	0,60	0,78	0,98	5	0,52	0,90
1	0,72	0,86	0,85	10	1	1
2	1	1	1	20	1,32	1,21
5	1,22	0,97	0,86	50	1,58	1,10
10	1,53	1,09	0,88			
20	1,73	1,07	0,86			

Tabelle 7-5. Übersicht über das Ergebnis der modifizierten Michaelis-Menten-Abschätzung für die angegebenen Kanäle und extrazellulären Ionen (aus Kapitel 3.3, ab S.51).

		Ca^{2+}	Mg^{2+}
hNav1.5	Vmax	$1,87 \pm 0,12$	$1,62 \pm 0,03$
	Kd (mM)	$3,55 \pm 0,69$	$9,98 \pm 0,36$
	Hill	1	$1,95 \pm 0,16$
	Vmin	$0,50 \pm 0,04$	$0,32 \pm 0,03$
rNav1.4	Vmax	$1,02 \pm 0,02$	$1,11 \pm 0,06$
	Kd (mM)	$0,14 \pm 0,19$	$7,01 \pm 5,65$
	Hill	1	$2,50 \pm 4,61$
	Vmin	$0,41 \pm 0,57$	$0,75 \pm 0,18$

Lebenslauf

Angelika Lampert

10. Oktober 1975 geboren in Nürnberg
- 1982 – 1984 Gebrüder - Grimm - Grundschule in Nürnberg
- 1984 – 1986 Sillenbacher - Grundschule Stuttgart
- 1986 – 1995 Evangelisches Heidehof - Gymnasium Stuttgart
- 1995 Abitur am 21. Juni
- Oktober 1995 bis Oktober 2001 **Studium der Humanmedizin**
Friedrich - Schiller - Universität Jena und
Université Louis - Pasteur de Strasbourg, Frankreich
30. 03. – 09 .04. 1998 Elektrophysiologisches und molekularbiologisches Praktikum
Max - Planck - Institut für Molekulare und Zelluläre Biophysik
Jena, Prof. Dr. Stefan H. Heinemann
Promotionsarbeit ebendort daran anschließend
19. 09. 1997 Ärztliche Vorprüfung
18. 09. 1998 Ärztliche Prüfung, erster Abschnitt
13. 09. 2000 Ärztliche Prüfung, zweiter Abschnitt
23. 10. 2000 bis 05. 06. 2001 Praktisches Jahr an der Université Louis - Pasteur
Strasbourg, Frankreich
Innere Medizin (Immunologie), Prof. Dr. Jean-Louis Pasquali
Neurologie (Epilepsie), Prof. Dr. Edouard Hirsch
09. 10. 2001 Ärztliche Prüfung, dritter Abschnitt
- Seit 01. 02. 2002 Tätigkeit als **Ärztin – im – Praktikum**
im Physiologischen Institut I, Prof. Dr. Florian Lang
Eberhard - Karls - Universität Tübingen

Tübingen, im Januar 2003

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: vornehmlich Professor Dr. Stefan H. Heinemann, sowie Dr. Martin Westermann, Dr. Wolf Oehrl und Dr. Hajiun Chen,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Tübingen, Mai 2002

Wissenschaftliche Veröffentlichungen

Lampert, A., Chen, H. and Heinemann, S.H. (2000). "Extracellular Ca²⁺ increases the activity of human cardiac sodium channels." *European Journal of Physiology* 439(6): R355. (Posterpräsentation)

Hartung, R., Lampert, A., Fünfstück, R. und Stein, G. (1999). Nierenfunktionsmessung: Methoden für die tägliche Praxis und für die klinische Forschung. *Colloquium nephrologicum jenense*, Jena. (Vortrag)