

Oxidative Regulation spannungsgesteuerter Natriumkanäle

**Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)**

**vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Mario Kaßmann

geboren am 14.05.1977 in Dresden

Dissertation eingereicht: 13.10.2009

1. Gutachter: Prof. Dr. Stefan H. Heinemann, Friedrich-Schiller-Universität Jena
2. Gutachter: Fr. Prof. Dr. med. Maria Wartenberg, Friedrich-Schiller-Universität Jena
3. Gutachter: Prof. Dr. Heinrich Brinkmeier, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

Datum der Verteidigung: 02.03.2010

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre, dass

- mir die geltende Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist.
- ich die Dissertation selbst angefertigt habe. Textabschnitte von Dritten wurden nicht ohne Kennzeichnung übernommen. Alle benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen sind in der Arbeit angegeben.
- mich bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie der Herstellung des Manuskripts mein Betreuer, Prof. Dr. Stefan H. Heinemann, unterstützt hat.
- die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde. Dritte haben weder mittelbar noch unmittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt dieser Dissertation stehen.
- ich diese Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe.
- ich bei keiner anderen Hochschule eine Dissertation eingereicht habe.

Jena, 13.10.2009, Mario Kaßmann

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	5
1. Einleitung	6
1.1 Das Redoxgleichgewicht in einer Zelle	6
1.1.1 Entstehung und Wirkung oxidierender Substanzen	6
1.1.1.1 Bildung und Funktion reaktiver Substanzen	6
1.1.1.2 Auswirkungen reaktiver Substanzen auf zelluläre Makromoleküle	7
1.1.2 Zelluläre Mechanismen zum Schutz vor reaktiven Substanzen	9
1.1.2.1 Enzymatische und nicht-enzymatische antioxidative Systeme	9
1.1.2.2 Die Bedeutung der Methioninsulfoxidreduktasen	11
1.1.3 Veränderungen des Redoxmilieus bei Erkrankungen und im Alter	13
1.1.3.1 Entstehung und Auswirkungen von oxidativem Stress unter pathophysiologischen Bedingungen	13
1.1.3.2 Oxidative Modifikationen und Alterungsprozesse	14
1.2 Spannungsgesteuerte Natriumkanäle	15
1.2.1 Bedeutung und Vertreter spannungsgesteuerter Natriumkanäle	15
1.2.2 Aufbau und Funktionsweise spannungsgesteuerter Natriumkanäle	17
1.2.3 Oxidative Modifikation spannungsgesteuerter Natriumkanäle	21
1.2.3.1 Bedeutung von Methioninresten bei der oxidativen Modifikation spannungsgesteuerter Natriumkanäle	21
1.2.3.2 Physiologische Konsequenzen der oxidativen Modifikation spannungsgesteuerter Natriumkanäle	22
1.3 Zielstellung dieser Arbeit	24
2. Material und Methoden	25
2.1 Arbeitsmittel	25
2.1.1 Chemikalien	25
2.1.2 Rechnerprogramme	25
2.2 Molekularbiologische Methoden	26
2.2.1 Expressionsplasmide, Ionenkanäle und Mutanten	26
2.2.2 Mutagenese	26
2.3 Biochemische Methoden	28
2.3.1 Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine	28
2.3.2 MSRA-Aktivitätstest	28
2.4 Elektrophysiologische Methoden	29
2.4.1 Zellkultur und Transfektion	29
2.4.2 Elektrophysiologische Messungen	29
2.4.2.1 Patch-Clamp	29
2.4.2.2 Substanzapplikation	32
2.4.2.3 Datenaufnahme und Analyse	33

3. Ergebnisse	39
3.1 Sensitivität der Inaktivierung bei spannungsgesteuerten Natriumkanälen gegenüber Oxidation	39
3.1.1 Einfluss oxidierender Substanzen auf den Skelettmuskelnatriumkanal $Na_v1.4$	39
3.1.1.1 Effekte von Chloramin T auf spannungsgesteuerte Natriumkanäle	39
3.1.1.2 Verlust der schnellen Inaktivierung durch Chloramin T	41
3.1.1.3 Irreversibilität des Inaktivierungsverlustes	43
3.1.1.4 Bedeutung der Chloramingruppe für den Inaktivierungsverlust	44
3.1.2 Einfluss von Chloramin T auf weitere Natriumkanaltypen	45
3.1.3 Identifizierung der oxidationssensitiven Aminosäuren bei $Na_v1.4$	46
3.1.4 Einfluss von Chloramin T auf die Rückkehr von der schnellen Inaktivierung	51
3.1.5 Unterschiede spannungsgesteuerter Natriumkanäle bei Säugern und Insekten	52
3.1.6 Kanalmutanten mit gesteigerter Sensitivität	53
3.1.7 Der Einfluss des Inaktivierungsmotivs bei weiteren Kanälen	54
3.1.8 Analyse der Kinetik des Inaktivierungsverlustes	56
3.1.9 Aktivität von Methioninsulfoxidreduktasen an spannungsgesteuerten Natriumkanälen	58
3.2 Effekt von oxidativem Stress auf den Spitzenstrom spannungsgesteuerter Natriumkanäle	63
3.2.1 Reduktion des Spitzenstroms bei Mutanten von $rNa_v1.4$	63
3.2.2 Strukturelle Ursachen für die Reduktion des Spitzenstroms bei $Na_v1.5$	64
3.2.3 Einfluss von tert-Butylhydroperoxid auf die Stromamplitude	70
3.2.4 Einfluss von oxidativem Stress auf Schalteigenschaften spannungsgesteuerter Natriumkanäle	72
3.2.4.1 Oxidation und Spannungsabhängigkeit der schnellen Inaktivierung	72
3.2.4.2 Einfluss der Haltespannung auf die Reduktion des Spitzenstroms	73
3.2.5 Einfluss von Einzelkanalparametern auf die Reduktion des Spitzenstroms	76
4. Diskussion	78
4.1 Einfluss oxidierender Substanzen auf die schnelle Inaktivierung spannungsgesteuerter Natriumkanäle	78
4.1.1 Identifizierung oxidationssensitiver Aminosäuren mit Einfluss auf die schnelle Inaktivierung	78
4.1.2 Inaktivierungsmotive mit erhöhter Oxidationssensitivität	82
4.1.3 Kinetische Untersuchungen des Inaktivierungsverlustes	83
4.1.4 Effekte weiterer Oxidantien auf die schnelle Inaktivierung spannungsgesteuerter Natriumkanäle	84
4.1.5 Bedeutung von Methioninsulfoxidreduktasen bei der Kontrolle der schnellen Inaktivierung spannungsgesteuerter Natriumkanäle	85

4.2 Reduktion des Spitzenstroms spannungsgesteuerter Natriumkanäle durch Oxidantien	88
4.2.1 Strukturelle Ursachen des Stromverlustes bei spannungsgesteuerten Natriumkanälen durch oxidative Modifikation	88
4.2.2 Mögliche physiologische Funktionen der hohen Oxidationssensitivität der Stromamplitude spannungsgesteuerter Natriumkanäle in der Herzmuskulatur	90
4.3 Wirkungsmechanismen verwendeter Oxidantien	92
4.4 Einfluss der Methionin-Leucin-Mutationen auf Kanaleigenschaften	95
5. Zusammenfassung	97
Summary	99
6. Literatur	101
Anhang	109

Abkürzungen

CaM	Calmodulin
ChT	Chloramin T
DNA	Desoxiribonukleinsäure (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
DTT	DL-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EGTA	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N'-tetraacetat
HEK 293	humane embryonale Nierenzelllinie (<i>human embryonic kidney</i>)
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HPLC	Hochdruck-/Hochleistungsflüssigchromatographie (<i>High Pressure/Performance Liquid Chromatography</i>)
LY	Lucifer Yellow
MetO	Methioninsulfoxid
MSR	Methioninsulfoxidreduktase
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat
Na _v -Kanal	spannungsgesteuerter Natriumkanal
PNS	peripheres Nervensystem
ROS	reaktive Sauerstoffverbindungen (<i>reactive oxygen species</i>)
WT	Wildtyp
ZNS	Zentralnervensystem

1. Einleitung

Spannungsgesteuerte Natriumkanäle sind für die Initiierung von Aktionspotenzialen unerlässliche Membranproteine. Ihre Funktionsparameter können durch oxidierende Substanzen verändert werden. Lebewesen sind ständig Oxidantien ausgesetzt, die zum Teil in den Organismen selbst produziert werden. Die Wirkungen dieser Substanzen sind vielfältig, bei hoher Konzentration vor allem schädlich. Unter bestimmten Bedingungen kann das Gleichgewicht zwischen Produktion und Eliminierung der oxidierenden Substanzen beziehungsweise der Reparatur entstandener Schäden verloren gehen. Auf den folgenden Seiten wird beschrieben, welche Quellen für oxidierende Substanzen im Organismus existieren, wie ihre Konzentration kontrolliert werden kann und welche Wirkung sie im Körper haben. Im Besonderen werden die Veränderungen der Funktion spannungsgesteuerter Natriumkanäle, die Aufklärung der molekularen Ursachen der Sensitivität der Kanäle sowie mögliche Konsequenzen im Fokus dieser Arbeit stehen.

1.1 Das Redoxgleichgewicht in einer Zelle

1.1.1 Entstehung und Wirkung oxidierender Substanzen

1.1.1.1 Bildung und Funktion reaktiver Substanzen

In lebenden Zellen herrscht eine reduzierende Umgebung, welche den Elektronenfluss von oxidierbaren organischen Molekülen hin zu Sauerstoff gewährleistet (Schafer & Buettner 2001). Für den Redoxstatus einer Zelle ist das Gleichgewicht einer Vielzahl von Prozessen zur Bildung und zur Eliminierung oxidierender Substanzen entscheidend (Berlett & Stadtman 1997). Reaktive Sauerstoffverbindungen (*reactive oxygen species*, ROS) entstehen in gewissem Umfang bei normalen Stoffwechselfvorgängen einer Zelle (Hoshi & Heinemann 2001, Weissbach et al. 2002), beispielsweise bei Gärungsprozessen (Falbe & Regitz 1992) oder in der Atmungskette in Mitochondrien (Wolin et al. 2005, Hool 2006).

Durch Lecks in der Elektronentransportkette werden bis zu 4% des Sauerstoffs nicht vollständig reduziert, sondern zu Superoxid ($O_2^{\cdot-}$) umgesetzt (Weissbach et al. 2002). Durch weitere Reaktionen können daraus Wasserstoffperoxid (H_2O_2), verschiedene weitere Radikale (Falbe & Regitz 1992) und Singulett-Sauerstoff (Mao et al. 1995) entstehen. Hydroxylradikale (OH^{\cdot}) werden als die biologisch wichtigsten Folgeprodukte betrachtet

(Vogt 1995). Sie können bei Gegenwart von Übergangsmetallionen auch über die Fenton-Reaktion gebildet werden (Falbe & Regitz 1992). Superoxid kann mit dem von der NO-Synthetase im normalen Argininmetabolismus gebildeten Stickstoffmonoxid ($\text{NO}\cdot$) (Berlett & Stadtman 1997, Kourie 1998) zu Peroxinitrit (ONOO^-) (Vogt 1995) sowie weiteren hochreaktiven Folgeprodukten wie $\text{OH}\cdot$ und $\text{HO}_2\cdot$ (Lipton 1999) reagieren.

Eine weitere Quelle von ROS sind Peroxisomen (Morrison & Schonbaum 1976, Mary et al. 2004, Hool 2006). Biologisch relevante Oxidantien sind dabei neben O_2^- , H_2O_2 und $\text{OH}\cdot$ auch Hypochlorit (OCl^-) und Chloramine. Besondere Bedeutung hat die ROS-Produktion in Peroxisomen bei phagozytotisch aktiven und anderen Zellen, welche an immunologischen Abwehrreaktionen beteiligt sind, da die gebildeten reaktiven Substanzen zur Eliminierung von Krankheitserregern beitragen (Vogt 1995). Die in Neutrophilen, Monozyten und anderen Zelltypen des Immunsystems vorkommenden Myeloperoxidasen (MPOs) nutzen H_2O_2 als Substrat (Lau & Baldus 2006). Sie katalysieren die Reaktion von Chlorid zu HOCl oder zu Cl_2 (Morrison & Schonbaum 1976), welches zu HOCl hydrolysiert (Falbe & Regitz 1990). Hypochlorit kann mit Aminosäuren Chloramine bilden (Morrison & Schonbaum 1976), welche zur Chlorierung und Bildung von Radikalen an Aminogruppen führen (Becker et al. 1999). Aus Cl_2 kann mit H_2O auch HCl und der hochreaktive atomare Sauerstoff entstehen (Falbe & Regitz 1989). Weiterhin bilden MPOs Singulett-Sauerstoff (Kiryu et al. 1999).

Zusätzlich zur Bedeutung bei immunologischen Abwehrreaktionen haben ROS wichtige Funktionen als Botenstoffe bei Signalprozessen (Finkel 2000, Hoshi & Heinemann 2001, Hool 2006). Innerhalb der Zelle trägt die Variation der ROS-Konzentration zur Regulation der Ca^{2+} -Homöostase bei (Suzuki et al. 1997), moduliert K^+ -Kanäle (Ciorba et al. 1997, Hammarström & Gage 2002, Su et al. 2007) und kann Transkriptionsfaktoren aktivieren (Čolak 2008) und damit die Expression von Genen beeinflussen. NAD(P)H-Oxidase zeigt eine Basisproduktion von ROS und ist so wahrscheinlich an Reaktionen auf akute Änderungen des Sauerstoffpartialdruckes beteiligt (Wolin et al. 2005). Weniger reaktive Substanzen wie $\text{NO}\cdot$ können im Körper über größere Distanzen hinweg als Botenstoffe fungieren (Hoshi & Heinemann 2001).

1.1.1.2 Auswirkungen reaktiver Substanzen auf zelluläre Makromoleküle

ROS können alle zellulären Makromoleküle schädigen (Mary et al. 2004). Bei ungesättigten Lipiden kommt es zu Peroxidationsprozessen, die sich über radikalische Kettenreaktionen

fortsetzen können und zur Veränderung der physikalisch-chemischen Eigenschaften, beispielsweise der Verringerung der Hydrophobizität, führen. Die Verringerung der Integrität von Biomembranen kann die Folge sein (Čolak 2008). Oxidative Veränderungen an der DNA können zu Strangbrüchen (Lipton 1999), zur Aktivierung von Genen oder zur Modifikation von Basen (Čolak 2008) und damit zum Ausfall von Struktur- oder Kontrollgenen führen. Mögliche Folgen sind Apoptose (Lipton 1999) oder unkontrolliertes Wachstum (Čolak 2008).

Freie Radikale können bei Proteinen zur Bildung von Carbonylgruppen, zur Fragmentierung (Berlett & Stadtman 1997) oder zur Vernetzung führen (Čolak 2008). ROS-induzierte Modifikationen an Aminosäureseitenketten (Stadtman & Berlett 1998, Lipton 1999) können die Eigenschaften eines Proteins drastisch verändern. Besonders oxidationsempfindlich sind die Seitenketten der schwefelhaltigen Aminosäuren Cystein und Methionin (Berlett & Stadtman 1997). Cysteine können zu Disulfiden, Sulfensäure, Sulfinsäure oder Sulfonsäure reagieren (Finkel 2000, Poole et al 2004). Methionin wird zu Methioninsulfoxid (MetO) und unter stark oxidierenden Bedingungen zu Methioninsulfon (MetO₂) umgesetzt (Shechter et al. 1975, Vogt 1995). Bei MetO tritt durch die pyramidale Struktur am Schwefel Enantiomerie auf, es gibt die zwei Formen Met-R-O und Met-S-O (Falbe & Regitz 1991). Die Seitenkette von MetO ist weniger flexibel (Mary et al. 2004), aber polarer und hydrophiler als die von Methionin. MetO hat einen ähnlichen Hydrophobizitätsindex, wie Asparagin oder das positiv geladene Lysin (Black & Mould 1991).

In Folge oxidativer Modifikationen können Änderungen in der Sekundär- oder Tertiärstruktur, bei der Oberflächenhydrophobizität und damit der Löslichkeit sowie der Ladung der Proteine auftreten (Gao et al. 1998, Anraku et al. 2003, Requena et al. 2004, Stadtman et al. 2005, Čolak 2008). Oxidierte Proteine sind häufig weniger aktiv und stärker hitzelabil (Berlett & Stadtman 1997). Die Oberflächenhydrophobizität korreliert mit der Empfänglichkeit für Proteolyse (Cervera & Levine 1988). Levine et al. (1996) vertreten die Hypothese, dass durch Oxidation verursachte Konformationsänderungen zur Exposition hydrophober Abschnitte führen und das Protein anfällig für proteolytische Degradation machen können.

Redoxprozesse können zur Regulation der Aktivität von Proteinen beitragen. Ionenkanalproteine sind für lebenswichtige Prozesse wie die Erregungsleitung und die Kontrolle intrazellulärer Ionenkonzentrationen und der Membranspannung unerlässlich. T-Typ-Calciumkanäle werden durch Oxidantien inhibiert (Joksovic et al. 2006). An zellulären Signalprozessen beteiligte Proteine, für welche eine Regulation über den Oxidationszustand

von Cysteinresten beschrieben wurde, sind beispielsweise der A-Typ-Kaliumkanal $K_{V1.4}$ (Ruppersberg et al. 1991) bzw. assoziierte β -Untereinheiten (Rettig et al. 1994, Heinemann et al. 1995), BK_{Ca} -Kanäle (Lang & Harvey 2002) oder der NMDA-Rezeptor (Sullivan et al. 1994). Oxidation und Reduktion von Thiolgruppen bestimmter (Schlüssel-) Proteine spielt eine bedeutende Rolle bei Signalprozessen. Möglicherweise stellt die reversible Oxidation von Cystein sogar einen wichtigen zellulären Redoxsensormechanismus bei einigen Proteinen dar (Finkel 2000, Hool 2006).

Auch für Methioninreste wird eine Funktion bei der Regulation der Proteinaktivität angenommen (Vogt 1995, Hoshi & Heinemann 2001, Hansel et al. 2002, Stadtman et al. 2002). Die Oxidation der Methioninseitenkette kann einen Funktionsverlust des Proteins bewirken und zur Degradation führen (Hoshi & Heineman 2001). Zu den Proteinen, welche durch Methioninoxidation an Aktivität verlieren, gehören Calmodulin (CaM) (Yao et al. 1996), Calcium-ATPasen (Squier & Bigelow 2000), Cytochrom C, $\alpha 1$ -Antiproteinase, Lipoxygenase sowie verschiedene Hormone (Stadtman et al. 2002). Ciorba et al. (1997) zeigten für den spannungsgesteuerten Kaliumkanal Shaker C/B die Verlangsamung der Inaktivierung durch Oxidation eines Methionins. Chen et al. (2000) beschrieben die Beschleunigung der Inaktivierung bei einer Shaker-Mutante durch Oxidation eines Methioninrestes, indem der Anteil der langsameren von zwei Komponenten der Inaktivierung verringert wird. Am Beispiel von C5, der fünften Komponente des Komplementsystems, wurde gezeigt, dass ein Enzym durch Methioninoxidation auch aktiviert werden kann (Vogt et al. 1986, Vogt 1995).

1.1.2 Zelluläre Mechanismen zum Schutz vor reaktiven Substanzen

1.1.2.1 Enzymatische und nicht-enzymatische antioxidative Systeme

Die DNA ist durch ihre Lokalisation im Zellkern vor der Wirkung der meisten ROS geschützt. Vor allem Hydroxylradikale spielen jedoch noch eine Rolle bei oxidativen Veränderungen. Um auftretende Schäden an der DNA zu beheben, existieren spezifische Reparatursysteme (Čolak 2008). Die überwiegende Menge der Lipide und Proteine befindet sich außerhalb des Kerns und ist für ROS leichter zugänglich, weshalb Zellen eine Reihe von Mechanismen entwickelt haben, um ROS oder deren Auswirkungen zu neutralisieren. Durch eine Vielfalt enzymatischer und nicht-enzymatischer antioxidativer Prozesse wird unter normalen physiologischen Bedingungen ein Gleichgewicht zwischen Produktion und

Eliminierung der Oxidantien gehalten (Hoshi & Heinemann 2001). Antioxidantien inhibieren die Bildung von ROS oder erleichtern deren Umwandlung in inaktive oder weniger reaktive Verbindungen (Berlett & Stadtman 1997, Mary et al. 2004).

Zu den nicht-enzymatischen Antioxidantien zählen die Vitamine A (β -Carotin), C (Ascorbinsäure in der reduzierten Form) und E (α -Tocopherol) (Berlett & Stadtman 1997), Mannitol, Ubichinon in der reduzierten Form (Lipton 1999) sowie verschiedene Metaboliten wie Bilirubin und Harnsäure. Sie wirken als Radikalfänger (*scavenger*), indem sie ROS eliminieren, bevor Schäden an zellulären Makromolekülen verursacht werden (Berlett & Stadtman 1997).

Enzymatische antioxidative Mechanismen entfalten ihre Wirkung auf verschiedenen Ebenen. Die Oxidation von Cystein wird häufig durch Spuren von Kupfer-, Eisen- und anderen Metallionen befördert. Metallbindeproteine wie Ferritin, Transferrin und Laktoferrin haben Einfluss auf die Konzentration freier Metallionen und damit auf die Bildungsrate von $\text{OH}\cdot$ aus H_2O_2 über die Fenton-Reaktion (Berlett & Stadtman 1997). Superoxiddismutase setzt Superoxid zu H_2O_2 um, welches von Katalase, Glutathionperoxidase und anderen Peroxidasen abgebaut wird (Falbe & Regitz 1992, Berlett & Stadtman 1997). Serumalbumin hat Radikalfänger- und Metallionenbindefunktion (Bourdon et al. 2005).

In biologischen Systemen haben Cystein und Methionin mit ihren schwefelhaltigen Seitenketten besondere Bedeutung (Ciorba et al. 1997). Sie sind die einzigen Aminosäuren, bei denen oxidative Veränderungen an den Seitenketten biologisch reversibel sind (Berlett & Stadtman 1997, Hoshi & Heinemann 2001). Durch das Thioredoxin/Thioredoxinreduktase-System (Arnér et al. 1995) und das Glutaredoxin/Glutathion/Glutathionreduktase-System werden Disulfidbrücken und Sulfensäuren reduziert (Mary et al. 2004).

Für die Reduktion von Methioninsulfoxid (MetO) in freier oder peptidgebundener Form existiert mit den Methioninsulfoxidreduktasen (MSRs) (Ejiri et al. 1979, Brot et al. 1981, Brot & Weissbach 1983) eine weit verbreitete Klasse von Enzymen (Hansel et al. 2005). Methioninsulfon ist enzymatisch nicht reduzierbar, tritt in biologischen Systemen jedoch nur selten auf (Vogt 1995). MSRs nutzen jeweils nur eines der MetO-Stereoisomere als Substrat. Met-S-O wird durch MSRA reduziert (Mary et al. 2004). MSRA hat eine molare Masse von etwa 25 kDa. Es wurde für Bakterien (Moskovitz et al. 1995), Pflanzen (Sadanandom et al. 2000) sowie Säuger (Moskovitz et al. 1996) beschrieben. Besonders stark wird es beim

Menschen in Leber, Niere, Herz und Gehirn exprimiert (Kuschel et al. 1999). Niere und Leber sind als detoxifizierende Organe ständig oxidativem Stress ausgesetzt und haben einen erhöhten Reparaturbedarf oxidativer Schäden (Hoshi & Heinemann 2001). Nach Moskovitz et al. (1996) wird MSRA auch bei Makrophagen und Neutrophilen stark exprimiert, was auf einen ebenfalls erhöhten Reparaturbedarf nach starker ROS-Produktion zur Abwehr von Krankheitserregern zurückgeführt wird. Subzellulär ist MSRA in Abhängigkeit von einer N-terminalen Signalsequenz in den Mitochondrien, wo ROS direkt nach der Entstehung eliminiert werden können, oder im Zytosol lokalisiert (Hansel et al. 2002).

Zur Reduktion von Met-R-O existieren beim Menschen verschiedene MSRB-Enzyme: MSRB1 (Moskovitz et al. 2002) mit einer molaren Masse von 12 kDa, MSRB2 (Jung et al. 2002) mit 20 kDa sowie MSRB3A und MSRB3B (Kim & Gladyshev 2004) mit ebenfalls etwa 20 kDa (Mary et al. 2004). MSRB1 befindet sich im Zellkern und im Zytosol, MSRB3A im Endoplasmatischen Retikulum und MSRB2 und MSRB3B befinden sich in den Mitochondrien (Kim & Gladyshev 2004). MSRB2-mRNA wurde in allen untersuchten Geweben nachgewiesen, mRNA von MSRB1 nur in einem Teil (Jung et al. 2002). Säuger-MSRB1 ist ein Selenoprotein (Moskovitz & Stadtman 2003).

MSRs sind, wie in Abbildung 1.1 dargestellt, über Thioredoxin/Thioredoxinreduktase an das zelluläre Redoxsystem mit NADPH/NADP⁺ gekoppelt und möglicherweise indirekt über die Verfügbarkeit von Thioredoxin regulierbar (Hoshi & Heinemann 2001, Weissbach et al. 2002). Dithiothreitol (DTT) kann *in vitro* als Elektronendonator dienen (Ejiri et al. 1980, Brot et al. 1981).

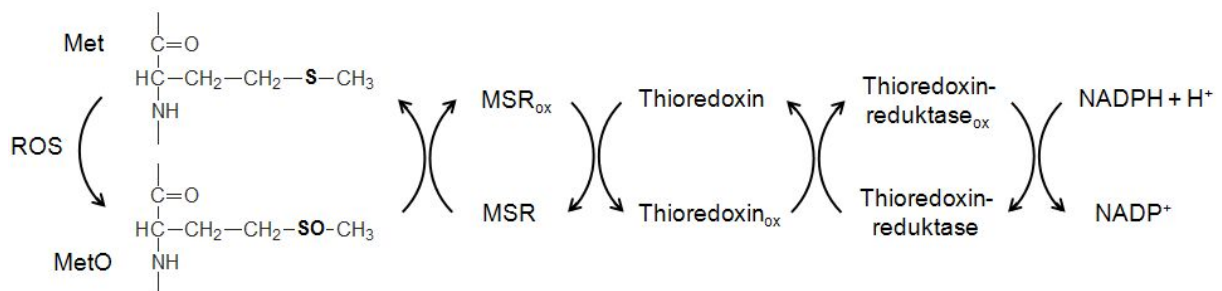


Abbildung 1.1:

Oxidation und enzymatische Reduktion von Methionin (nach Hoshi & Heinemann 2001, verändert)

1.1.2.2 Die Bedeutung der Methioninsulfoxidreduktasen

Für Methioninsulfoxidreduktasen werden drei grundlegende Funktionen diskutiert: die Reparatur oxidierten Proteine durch die Reduktion von MetO, eine Beteiligung an

Radikalfängersystemen und ein Beitrag zur Regulation zellulärer Prozesse (Moskovitz et al. 1998, Levine et al. 2000, Hoshi & Heinemann 2001, Hansel et al. 2005).

Reparaturfunktion von Methioninsulfoxidreduktasen

Inkubation mit MSRA stellt die Aktivität von α 1-Antiproteinase wieder her, die durch Oxidantien in der Atemluft verloren gehen kann (Mohsenin & Gee 1989). MSRA kann die Funktionalität von oxidiertem CaM wieder herstellen (Sun et al. 1999).

Radikalfängersysteme mit Methioninsulfoxidreduktasen

Levine et al. (1996, 1999) beschrieben oberflächenexponierte Methioninreste als endogenes System mit lokaler antioxidativer Kapazität. Durch die Reduktion von MetO durch MSR's würde dieses System katalytisch arbeiten und effizient an der Eliminierung von ROS teilnehmen. Yermolaieva et al. (2004) zeigten, dass bei MSRA-Überexpression die Konzentration von ROS verringert ist und bei Reoxygenierung nach Hypoxie der Anstieg der ROS-Konzentration deutlich geringer ausfällt. Intrazellulär appliziertes MSRA verringert und verzögert den Block des Kaliumkanals hERG1 durch Oxidantien (Su et al. 2007). Bei Kardiomyozyten verringert MSRA-Überexpression den apoptotischen Zelltod nach Ischämie und Reperfusion deutlich (Prentice et al. 2008).

Methioninsulfoxidreduktasen und die Regulation zellulärer Prozesse

Die Existenz von MSR's führt zur Vermutung, dass Met/MetO wie das Cysteinsystem, Phosphorylierung/Dephosphorylierung oder Adenylierung/Deadenylierung zur Regulation genutzt werden könnte. Ein Beleg dafür könnte die sequentielle Oxidation von Methioninresten bei Glutaminsynthetase sein, die in der Wirkung der progressiven Adenylierung vergleichbar ist (Hoshi & Heinemann 2001, Stadtman et al. 2002). Bei α 1-Antiproteinase wird durch Oxidation von Met358 die Aktivität zerstört. Die Mutation M358V ergibt ein voll funktionsfähiges Enzym. Levine et al. (1996) formulierten daraufhin die Vermutung, dass in bestimmten Situationen Proteine durch Oxidation inaktiviert werden sollen. Das entsprechende M358 ist oberflächenexponiert und wäre für Oxidantien und möglicherweise auch für MSR's zugänglich.

Ciorba et al. (1997) vermuteten für MSRA eine Schlüsselfunktion bei zellulären Signaltransduktionskaskaden und, auf Grund der hohen Expression in Neuronen, eine

Beteiligung an der Regulierung der neuronalen Erregbarkeit. Die Autoren entwickelten eine Hypothese, nach der Membrandepolarisationen über Elektrolyse in der intra- oder extrazellulären Lösung ROS produzieren und damit zur Oxidation von Ionenkanälen führen könnten. Die Zeit, welche ein Kanal im oxidierten Zustand verbringt, würde durch MSRA begrenzt. MSRs könnten damit eine Rolle bei der aktivitätsabhängigen Modulation zellulärer Funktionen spielen und beispielsweise Einfluss auf Prozesse wie Lernen und Gedächtnis nehmen. Auch durch die Reparatur von CaM (Sun et al. 1999), welches die Funktion zahlreicher Enzyme kontrolliert, hätten MSRs einen regulativen Einfluss auf Ionenkanäle (Levitan 1999), Pumpen, weitere Signalproteine und letztlich auf alle Ca^{2+} -abhängigen Signalwege (Hoshi & Heinemann 2001).

Die Transkription einiger Gene wird durch ROS modifiziert (Zou et al. 2000). MSRA könnte somit auch indirekt durch Beeinflussung von Genexpressionsmustern wirken. Beispielsweise hat es möglicherweise Einfluss auf die Expression von MSRB (Moskovitz & Stadtman 2003).

1.1.3 Veränderungen des Redoxmilieus bei Erkrankungen und im Alter

1.1.3.1 Entstehung und Auswirkungen von oxidativem Stress unter pathophysiologischen Bedingungen

Bei normalen physiologischen Bedingungen sind die Raten der Produktion und der Eliminierung reaktiver Verbindungen gleich. Die Konzentration der ROS liegt in einem Bereich, den die Zelle tolerieren kann (Lipton 1999). Bei drastischen Ereignissen wie Schlaganfall oder Herzinfarkt kommt es zur stark erhöhten ROS-Produktion in Mitochondrien und durch zahlreiche Oxidasen (Becker et al. 1999, Lipton 1999). Ischämie erhöht die Produktion von NO bei verschiedenen Zellarten, beispielsweise in Kardiomyozyten (Kitakaze et al. 1995). In den ersten Minuten nach Beginn der Reperfusion findet ein weiterer, starker Anstieg der ROS-Produktion statt (Becker et al. 1999, Yermolaieva et al. 2004). Besonders im Gehirn führt der starke oxidative Stress zu Zellschäden und Apoptose (Lipton 1999).

ROS können auch bei Entzündungen im Überschuss vorliegen. Die Oxidantien werden dabei von Neutrophilen und anderen Zellen des Immunsystems gebildet. Auch bei Infarkten spielen möglicherweise Neutrophile und durch sie produzierte ROS eine Rolle (Chan 1996, Lipton 1999, Hoshi & Heinemann 2001). In Skelettmuskulatur und Leber tritt bei hoher physischer Belastung ein Anstieg der ROS-Konzentration auf (Davies et al. 1982).

Oxidativer Stress und zahlreiche pathologische Veränderungen gehen mit der Erhöhung des Anteils oxidiertes Proteine einher. Nachgewiesen wurde eine Akkumulation oxidiertes Proteine beispielsweise bei Morbus Alzheimer (Gabbita et al. 1999), Muskeldystrophie, amyotropher lateraler Sklerose, rheumatoider Arthritis, Progerie (zur Übersicht Berlett & Stadtman 1997), ischämischen Reperfusionläsionen, chronischem Alkoholismus, Diabetes mellitus (zur Übersicht Čolak 2008), Lungenemphysem (Mary et al. 2004) und in der Skelettmuskulatur nach körperlicher Beanspruchung (Reznick et al. 1992, Witt et al. 1992). Auch für Morbus Parkinson (Fahn & Cohen 1992) und Augenlinsenkatarakt (Garland 1991) wurde die Erhöhung des Anteils oxidiertes Zellbestandteile beschrieben. Bei Morbus Alzheimer, Emphysem, Bronchitis und der Parkinsonschen Krankheit konnte eine verringerte Konzentration oder Aktivität von MSRA gezeigt werden (Gabbita et al. 1999, zur Übersicht Stadtman et al. 2005).

Dass Überexpression von MSRA schädliche Effekte abschwächt und das Überleben von Zellen nach Hypoxie erleichtert, verdeutlicht, dass die endogene antioxidative Kapazität einer Zelle nicht ausreicht, um den oxidativen Stress in Extremsituationen wie Ischämie aufzuarbeiten (Yermolaieva et al. 2004).

1.1.3.2 Oxidative Modifikationen und Alterungsprozesse

Biologische Alterung ist ein fundamentaler Prozess, der mit fortschreitender Abnahme zellulärer Funktionen einhergeht (Squier & Bigelow 2000). Auch Alterungsprozesse werden mit oxidativen Schäden in Verbindung gebracht (Ciorba et al. 1997, Fukagawa 1999, Weissbach et al. 2002). Während der Alterung und bei einigen altersbedingten Erkrankungen akkumulieren ebenfalls oxidiertes Proteine (Mary et al. 2004, Stadtman et al. 2005), was beispielsweise für das menschliche Gehirn (Carney et al. 1991), Erythrozyten (Oliver et al. 1987), die Augenlinse (Truscott & Augusteyn 1977, Garner & Spector 1980), das Trabekelwerk des menschlichen Auges (Horstmann et al. 1983) und die Rattenleber (Chao et al. 1997) gezeigt wurde. Starke-Reed & Oliver (1989) maßen bei Hepatozyten alter Ratten eine Verdreifachung des Carbonylgehaltes gegenüber Hepatozyten junger Ratten.

In Tierversuchen wurde nachgewiesen, dass alte Individuen anfälliger für oxidativen Stress sind (Yu et al. 1998). Die Überexpression humanen Thioredoxins bei Mäusen erhöhte die Resistenz gegenüber oxidativem Stress und verlängerte die Lebensspanne (Mitsui et al. 2002).

Bei Wüstenspringmäusen konnte durch Radikalfänger die Menge oxidiertes Proteine im Gehirn reduziert und die Leistung im Labyrinthversuch erhöht werden (Carney et al. 1991).

Das Ausschalten von MSRA führte bei Säugern zu verringerter Resistenz gegenüber oxidativem Stress und zu geringerer Lebenserwartung. Analoge Ergebnisse wurden bei Selenmangel erzielt, der zu einem Mangel an funktionalem MSRB führt (Moskovitz et al. 2001, Moskovitz & Stadtman 2003). Die Überlebensrate von *E.-coli*- und *S.-cerevisiae*-MSRA-null-Mutanten verringerte sich bei Hypoxie und Normoxie (Moskovitz et al. 1995, 1998). Die Überexpression von MSRA in humanen T-Zellen und neuronalen Zellen erhöhte Resistenz und Überlebensrate unter Bedingungen, die oxidativen Stress auslösen (Moskovitz et al. 1998, Yermolaieva et al. 2004). Überexpression von MSRA bei *Drosophila* erhöhte die Resistenz gegenüber oxidativem Stress und die mittlere Lebenserwartung. Die langlebigen Tiere zeigten auch mit deutlich höherem Alter noch eine hohe physische und reproduktive Aktivität (Ruan et al. 2002). Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass oxidative Schäden eine wichtige Determinante der Lebenserwartung sind.

Yu et al. (1998) zeigten eine umgekehrte Korrelation der Lebenserwartung mit der Menge oxidierten Proteins. Die MSRA-Konzentration beeinflusst den Anteil von MetO in der Gesamtproteinmenge. Je mehr MSRA vorhanden ist, desto geringer fällt der MetO-Anteil aus (Moskovitz et al. 1998, Stadtman et al. 2005). Im Alter verringern sich Expression, Konzentration und Aktivität von MSRA, was zur Erhöhung der Proteinoxidationsrate führt (Petropoulos et al. 2001). Es wird ein starker Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Expression von MSRA und MSRB, Langlebigkeit und der Resistenz gegenüber oxidativem Stress deutlich (Mary et al. 2004). Bei Schulz et al. (2007) verhinderten Antioxidantien die Verlängerung der Lebensspanne durch kalorische Restriktion bei *C. elegans*. Ein Mindestmaß an oxidativem Stress scheint demnach für Organismen notwendig zu sein.

1.2 Spannungsgesteuerte Natriumkanäle

1.2.1 Bedeutung und Vertreter spannungsgesteuerter Natriumkanäle

Spannungsgesteuerte Natriumkanäle (Nav-Kanäle) sind für die Generierung von Aktionspotenzialen essentielle membranständige Proteine. Sie tragen wesentlich zur elektrischen Signalübertragung in biologischen Systemen, beispielsweise der Informationsübertragung im Nervensystem, der Muskelkontraktion und der Hormonsekretion,

Membran erfolgt innerhalb weniger Millisekunden die Erholung von der Inaktivierung und der Kanal ist für die Aktivierung wieder verfügbar. Eine schematische Darstellung der Zustandsformen eines spannungsgesteuerten Natriumkanals und der Übergangsmöglichkeiten ist in Abbildung 1.4 gegeben. Die S1- bis S4-Segmente tragen wesentlich zu den Schalteigenschaften eines spannungsgesteuerten Natriumkanals bei. Die S4-Segmente beinhalten sich wiederholende Motive aus jeweils einer positiv geladenen und zwei hydrophoben Aminosäuren und werden als Spannungssensoren bezeichnet. Mit Hilfe der Spannungssensoren reagiert der Kanal auf Änderungen der Membranspannung (Noda et al. 1984, Stühmer et al. 1989, Catterall et al. 2007). Bei Ruhepotenzial erfolgt eine Stabilisierung der S4-Segmente in der Membran durch die negativen Ladungen an der intrazellulären Membranseite sowie durch Interaktion der positiv geladenen Aminosäuren mit negativen Ladungen benachbarter Proteinabschnitte (Catterall 2000).

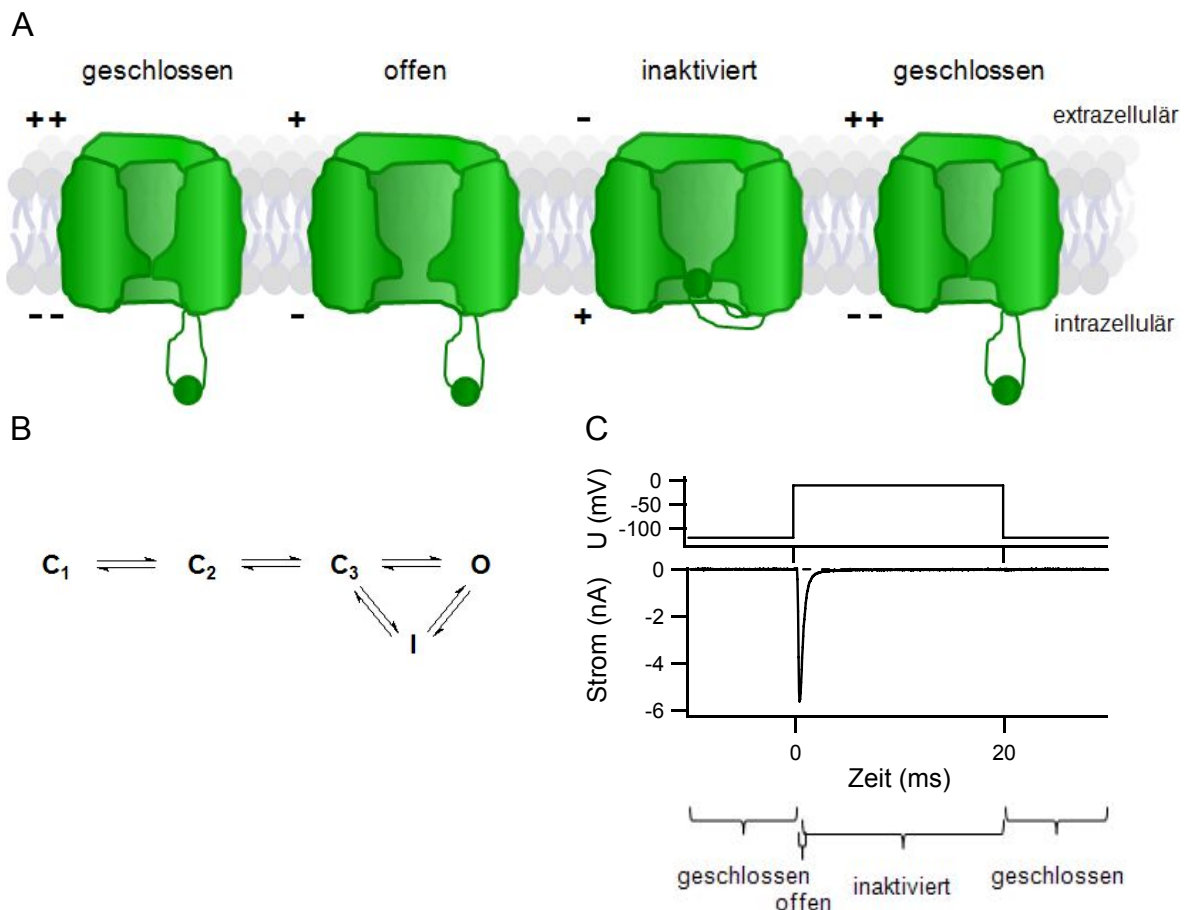


Abbildung 1.4:

Zustandsformen spannungsgesteuerter Natriumkanäle.

A. Schematische Darstellung der Änderung der Zustandsformen eines spannungsgesteuerten Natriumkanals als Antwort auf die Veränderung der Membranspannung nach dem *ball-and-chain*-Modell (nach Armstrong & Bezanilla 1977, verändert). **B.** Kinetisches Modell der Zustandsformen spannungsgesteuerter Natriumkanäle: C₁-C₃: verschiedene geschlossene Zustände, O: offener Zustand, I: inaktivierter Zustand (nach Kellenberger et al. 1996, verändert). **C.** Repräsentation der Zustandsformen bei einer Stromantwort von rNa_v1.4 auf einen depolarisierenden Puls auf -10 mV bei Ganz-Zell-Ableitung.

Eine Membrandepolarisation bewirkt eine partielle Verschiebung der S4-Segmente der Domänen eins bis drei aus der Membran, was über eine Konformationsänderung des Kanalmoleküls zum Öffnen der Pore führt. MacKinnon (2003) schlug für die Bewegung ein Paddel-Modell vor, nach Catterall (2000) erfolgt die Bewegung der S4-Segmente spiralförmig nach außen.

Durch die Inaktivierung wird der Ionenfluss durch den Kanal beendet. Bei der schnellen Inaktivierung bewegt sich das Verbindungsstück zwischen den Domänen drei und vier zur Pore, sodass die Passage der Ionen unterbrochen wird (Vassilev et al. 1988, 1989, Stühmer et al. 1989). Für den Verschluss der Pore wird eine hydrophobe Wechselwirkung zwischen Teilen des D3-D4-Verbindungsstückes und einem Akzeptor innerhalb der Pore angenommen (Armstrong et al. 1973, Eaholtz et al. 1994, Kellenberger et al. 1997). Armstrong & Bezanilla (1977) formulierten dazu das *ball-and-chain*-Modell, welches in Abbildung 1.4 graphisch verdeutlicht ist. Der entscheidende Abschnitt beim D3-D4-Verbindungsstück ist eine Triade hydrophober Aminosäuren, das hochkonservierte IFM-Inaktivierungsmotiv (West et al. 1992, Eaholtz et al. 1994) bzw. nach Rohl et al. (1999) und Kellenberger et al. (1997) das IFMT-Motiv.

Ein Hinweis, dass der Verbindungsabschnitt zwischen den Domänen 3 und 4 die Inaktivierungscharakteristika nicht allein bestimmt, geht aus einem Experiment von Hartmann et al. (1994) hervor, bei dem dieses Stück von Na_v1.2 auf Na_v1.5 übertragen wurde. Die Inaktivierung des Chimärenkanals war weniger schnell als die des Ausgangskanals Na_v1.2. Filatov et al. (1998) vertreten die Hypothese, dass Teile der S4-S5-Verbindungsstücken aller vier Domänen an der Interaktion mit dem Inaktivierungsmotiv beteiligt sind. Mutationen, welche die schnelle Inaktivierung beeinträchtigen, wurden für die S4-S5-Verbindungsstücke von Domäne 2 (Smith & Goldin 1997), Domäne 3 (Yang et al. 1994, Smith & Goldin 1997) und Domäne 4 (Tang et al. 1996, Lerche et al. 1997a, Filatov et al. 1998, McPhee et al. 1998) gezeigt. Hydrophobe Aminosäuren am intrazellulären Ende von D4S6 haben ebenfalls Einfluss auf die Inaktivierung (McPhee et al. 1994, 1995). Die betreffenden Positionen in den S4-S5-Verbindungsstücken der Domänen zwei bis vier sowie bei D4S6 stellen möglicherweise Teile des Akzeptors für das Inaktivierungsmotiv dar. Mantegazza et al. (2001) demonstrierten an Hand von Chimären zwischen Na_v1.2 und Na_v1.5 einen Einfluss des C-Terminus auf die Geschwindigkeit der Inaktivierung.

Die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung geht wahrscheinlich auf die Bewegung des S4-Segmentes der Domäne 4 zurück. Über D4S4 ist die Inaktivierung zumindest teilweise an die Aktivierung gekoppelt (Hoyt 1968, Armstrong 1981, Kontis & Goldin 1997, McPhee et al. 1998, Catterall 2000). Die langsame Inaktivierung kommt zum Tragen, wenn die schnelle Inaktivierung gestört ist. Sie geht auf andere Teile des Kanals zurück und beinhaltet Konformationsänderungen der Pore (Ulbricht 2005).

Wenn das Membranpotenzial bei der Repolarisation einen bestimmten Wert unterschreitet, bewegen sich die Spannungssensoren in die Positionen in der Membran zurück. Es erfolgt erneut eine Konformationsänderung des Kanalproteins, wobei die Pore wieder verschlossen und die Interaktion zwischen dem Inaktivierungsmotiv und dem Akzeptor beendet wird.

Durch die schnelle Inaktivierung wird verhindert, dass der Kanal vor der Repolarisation der Membran erneut öffnet. An erregbaren Membranen entsteht eine Refraktärphase, welche die gerichtete Weiterleitung von Signalen ermöglicht (Ulbricht 2005). Schnelle und vollständige Inaktivierung ist essentiell für viele erregbare Zellen (Catterall 2000). Die Inaktivierungscharakteristika spannungsgesteuerter Natriumkanäle bestimmen entscheidend den Fluss von Na^+ -Ionen durch die Membran und üben damit Einfluss auf die Dauer von Aktionspotenzialen aus. Längere Aktionspotenziale führen zu einer niedrigeren Depolarisationsfrequenz. Damit könnte die zeitliche Koordination der Herzmuskelkontraktion beeinträchtigt oder die Informationsübertragungsrates bei Neuronen verringert werden. Die Modulation des Schaltverhaltens spannungsgesteuerter Natriumkanäle ist ein Mechanismus, der zur Adaptation von Neuronen beiträgt (Sakmann et al. 2000, Bezanilla 2004).

Erbliche Inaktivierungsdefizite des Skelettmuskelnatriumkanals $\text{Nav}1.4$ können über gehäufte Aktionspotenziale zu Myotonie oder durch dauerhafte Depolarisation des Sarkolemma zu Paralyse führen. Zu Grunde liegende Mutationen befinden sich unter Anderem im D3-D4-Verbindungsstück, in D4S6 oder in den S4-S5-Verbindungsstücken der Domänen 2 und 3, also in Teilen des Kanals, für die eine Beteiligung an der schnellen Inaktivierung vermutet wird (Ulbricht 2005).

Nav -Kanäle bilden *in vivo* heteromere Komplexe mit β -Untereinheiten, welche für einen effizienten Zusammenbau des Kanals nötig sind und das Schaltverhalten der Kanäle modulieren (Abb. 1.3) (Isom et al. 1992, 1995, Catterall 2000). Vier β -Untereinheiten, $\beta 1$ - $\beta 4$, sind derzeit bekannt (Hartshorne & Catterall 1984, Morgan et al. 2000, Yu et al. 2003).

1.2.3 Oxidative Modifikation spannungsgesteuerter Natriumkanäle

1.2.3.1 Bedeutung von Methioninresten bei der oxidativen Modifikation spannungsgesteuerter Natriumkanäle

Das milde Oxidationsmittel Chloramin T (ChT) (Schiemann & Novák 1927) verlangsamt die Inaktivierung von Natriumkanälen in myelinisierten Nervenfasern irreversibel und kann sie ganz verhindern (Nosyreva et al. 1988, Quiñonez et al. 1999, Ulbricht 2005). Der Aktivierungsprozess wird dabei nicht modifiziert (Wang 1984). Quiñonez et al. (1999) zeigten, dass ChT die Nicht-Inaktivierung eines großen Teils der Na⁺-Kanäle bei Krötenmuskelfasern bewirkt. Bei den restlichen Kanälen wird die schnelle Inaktivierung verzögert. Wahrscheinlich kommt es in einem zweischrittigen Prozess erst zur Verlangsamung und dann zur kompletten Hemmung der Inaktivierung, weshalb die Autoren die Beteiligung von mindestens zwei zu oxidierenden Zielstellen vermuteten. Die ChT-Effekte sind zeit- und konzentrationsabhängig sowie irreversibel, was auf kovalente Modifikationen am Kanal hinweist. Für die Stromamplitude wurde ein biphasischer Verlauf beobachtet. Die anfängliche Zunahme des Stroms ergibt sich als Konsequenz aus der partiellen Entfernung der schnellen Inaktivierung und kann durch den Hodgkin-Huxley-Formalismus vorhergesagt werden. Die dann folgende Verringerung des Stroms wird darauf zurückgeführt, dass Kanäle geblockt werden.

Nach Ergebnissen von Shechter et al. (1975) werden bei neutralem bis leicht alkalischem pH-Wert durch ChT ausschließlich Methionin und Cystein oxidiert. Die Autoren zeigten zudem eine eindeutige Präferenz für Cystein bei pH 7.5¹. Bei Wang (1984), Lerche et al. (1997a) und Quiñonez et al. (1999) beeinflussten cysteinspezifische Reagenzien die schnelle Inaktivierung höchstens geringfügig. Eine Oxidation von Cysteinen findet also nicht statt oder hat keinen Einfluss auf die Inaktivierung. Es ist davon auszugehen, dass der beobachtete Inaktivierungsverlust auf die Oxidation von Methioninresten zurückgeht. Mit hoher Wahrscheinlichkeit ist das Methionin im IFM-Inaktivierungsmotiv beteiligt, da es die Inaktivierung per hydrophober Wechselwirkung stabilisiert (Rohl et al. 1999). Die Oxidation dieses Methionins würde die Interaktion stören (Hoshi & Heinemann 2001), da MetO weniger hydrophob ist (Black & Mould 1991). Bei Wang & Wang (2002) bleibt die Mutante IFI sensitiv gegenüber ChT, was ein weiterer Hinweis darauf ist, dass mehr als ein Methioninrest zum Inaktivierungsverlust beiträgt.

¹ In der gesamten Arbeit wird der Punkt als Dezimaltrennzeichen verwendet.

1.2.3.2 Physiologische Konsequenzen der oxidativen Modifikation spannungsgesteuerter Natriumkanäle

Beim *long-QT*-Syndrom ist das QT-Intervall im Elektrokardiogramm verlängert (Abb. 1.5). Typ drei des *long-QT*-Syndroms (LQT3) kann durch verschiedene Punktmutationen bei $\text{Nav}1.5$ verursacht werden, welche durch Beeinflussung der Inaktivierung zu erhöhtem persistentem Strom und einem hohen Risiko lebensbedrohender ventrikulärer Arrhythmien führen (Catterall 2000, Hammarström & Gage 2002, Ulbricht 2005). Weitere erbliche Erkrankungen gehen auf beeinträchtigte Natriumkanalinaktivierung, die zu persistentem Natriumstrom führt, zurück, beispielsweise bestimmte Formen von Myotonie (McClatchey et al. 1992, Ptáček et al. 1992) und Periodischer Paralyse (Ptáček et al. 1991, Rojas et al. 1991).

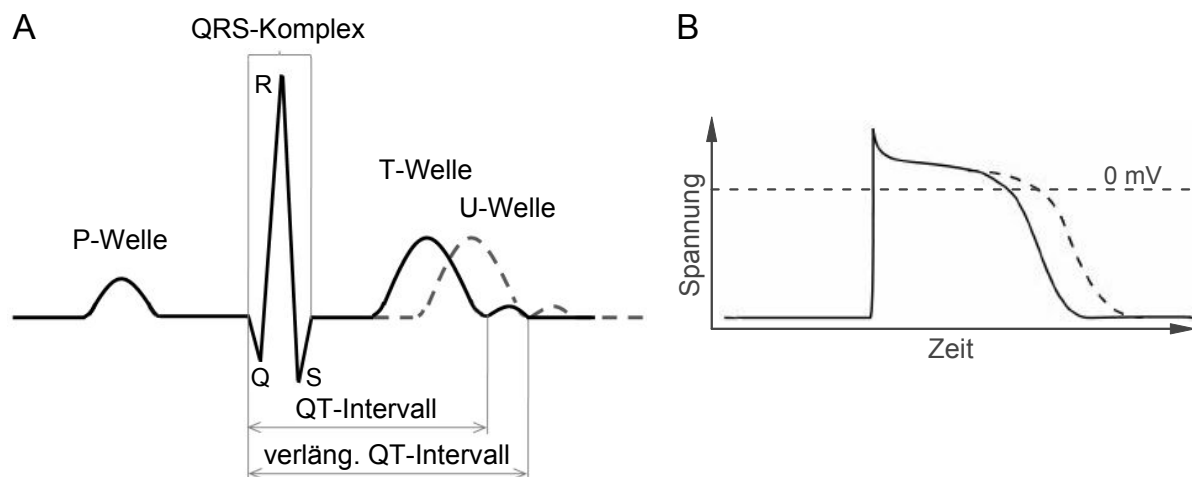


Abbildung 1.5:

Auswirkungen von LQT-Syndrom auf Elektrokardiogramm und Aktionspotenzial.

A. Schematische Darstellung eines Elektrokardiogramms mit Bezeichnung charakteristischer Formen. Bei LQT-Syndrom ist das QT-Intervall verlängert (gestrichelte Linie). **B.** Das verlängerte QT-Intervall geht auf eine verlängerte Plateauphase des ventrikulären Aktionspotenzials zurück (nach Ashcroft 2000, verändert).

In zahlreichen Geweben wurden unter normalen physiologischen Bedingungen geringe persistente, also nicht-inaktivierende Natriumströme beobachtet. Beispiele sind Skelettmuskulatur (Gage et al. 1989), Neurone (French & Gage 1985), Herzmuskulatur (Saint et al. 1992) und speziell humane Kardiomyozyten (Maltsev et al. 1998). Computermodelle legen eine Funktion der endogenen persistenten Natriumströme bei der Ausbreitung von Aktionspotenzialen über die Ventrikelwand nahe. Stärkere persistente Ströme würden die Aktionspotenzialdauer erhöhen und sind wahrscheinlich an der Entstehung früher Nachdepolarisationen beteiligt, welche zu Arrhythmien führen können (Sakmann et al. 2000, Hammarström & Gage 2002). Da Nachdepolarisationen durch spezifische Natriumkanalblocker unterdrückbar sind, wird diese Vorstellung gestützt (Maltsev et al. 1998).

Ju et al. (1996) zeigten bei Kardiomyozyten, Hammarström & Gage (2000) bei Hippocampusneuronen und Hammarström & Gage (2002) beim humanen Skelettmuskelkanal, heterolog exprimiert in der humanen embryonalen Nierenzelllinie HEK 293, dass die endogenen persistenten Ströme durch Hypoxie oder applizierte Oxidantien verstärkt werden.

Nach Cummins et al. (1993) und O'Reilly et al. (1997) können transiente Natriumströme während Hypoxie geringer werden. Yatsunami et al. (2002) berichteten die Inhibierung von Natriumkanälen bei längerer Exposition von Herzzellen gegenüber Radikalen. L-Cystein und DTT haben dabei eine protektive Wirkung, Methionin jedoch nicht, was auf eine Beteiligung von Cysteinresten am Block hinweist. Eine Besonderheit des in der Herzmuskulatur vorkommenden Kanals Nav1.5 gegenüber allen anderen bekannten Natriumkanalproteinen beim Menschen ist ein Cystein in der Pore in Domäne 1 (C373). Wird dieser Kanal heterolog exprimiert und Oxidationsmitteln ausgesetzt, tritt ein Block des Stromes ein (Barrington et al. 1997, Fukuda et al. 2005). Hisatome et al. (2000) zeigten, dass der Stromverlust bei Applikation oxidierender Cysteinreagenzien zu den heterolog exprimierten Hauptuntereinheiten für hNav1.5 viel stärker ist als für hNav1.4. Die Mutation C373Y bei hNav1.5 verringerte den Block. Diese Subtypspezifität deutet auf eine Relevanz der Kanal- α -Untereinheit für die Oxidationssensitivität der Stromamplitude hin.

Die Veränderung des Gesamtstromflusses durch Zunahme des persistenten Stroms einerseits und Block des transienten Stroms andererseits wird unterschiedlich bewertet. Nach Hammarström & Gage (2002) können die zwar kleinen aber langanhaltenden persistenten Ströme zu signifikanten Änderungen der intrazellulären Na⁺-Konzentration und damit zu zahlreichen schädlichen Prozessen führen. Ebenso kann aber auch ein Natriumkanalblock proarrhythmisch wirken (Fukuda et al. 2005). Sowohl der erhöhte persistente Strom als auch der geblockte transiente Strom werden auf oxidativen Stress, beispielsweise durch Ischämie, zurückgeführt. Zahlreiche Antioxidantien wie DTT, Glutathion (Hammarström & Gage 2002) und L-Cystein (Yatsunami et al. 2002) wirken bei Ischämie protektiv. Auch für MSRA wurde eine schützende Funktion bei Ischämie demonstriert (Yermolaieva et al. 2004). Die protektive Wirkung von MSRs bei Ischämie könnte auf Reparatur oder Schutz spannungsgesteuerter Natriumkanäle zurückgehen. Wenn MSRs tatsächlich oxidierte Methionine an Nav-Kanälen reduzieren können, wäre auch eine regulative Feinsteuerung der Kanalfunktion über die Beeinflussung der Inaktivierung denkbar.

1.3 Zielstellung dieser Arbeit

Oxidative Modifikationen spannungsgesteuerter Natriumkanäle stehen wahrscheinlich im Zusammenhang mit einer Reihe lebensbeeinträchtigender oder lebensbedrohender Ereignisse wie Ischämie bei Schlaganfall oder Herzinfarkt, Arrhythmien beim Herzen oder Funktionsstörungen der Skelettmuskulatur. Im Zuge der vorliegenden Arbeit sollte die Charakterisierung der Veränderung von Funktionsparametern von Ionenkanalproteinen bei oxidativem Stress unter den kontrollierten Bedingungen der Expression definierter Klone in einem heterologen Expressionssystem erfolgen. Für zwei der beobachteten Effekte, den Verlust der schnellen Inaktivierung und die Verringerung der Stromamplitude, sollten molekulare Ursachen ermittelt werden. Es gibt Indizien, dass zumindest ein großer Teil des Inaktivierungsverlustes auf die Oxidation von Methioninresten zurückzuführen ist. Es blieb jedoch offen, um welche Reste es sich dabei handelt. Mit einem mutagenesebasierten Ansatz sollten Methionine identifiziert werden, deren Oxidationsstatus Einfluss auf die Inaktivierung hat. Durch kinetische Analysen des Inaktivierungsverlustes bei oxidativer Modifikation sollte der Beitrag dieser Methioninreste quantifiziert und eine mechanistische Annäherung an die Beschreibung des Inaktivierungsverlustes durchgeführt werden. Oxidation und Reduktion von Methionin unter Beteiligung von Methioninsulfoxidreduktasen könnten einen Mechanismus zur Regulation funktioneller Parameter spannungsgesteuerter Natriumkanäle darstellen. Daher sollte weiterhin geklärt werden, ob oxidierte, für die Kanalfunktion kritische Methioninreste durch Methioninsulfoxidreduktasen *in vivo* reduziert werden können oder ob Methioninsulfoxidreduktasen möglicherweise eine Schutzfunktion ausüben. Kanalabschnitte mit Einfluss auf die Stromamplitude sollten mittels eines Chimärenansatzes möglichst weit eingegrenzt werden.

2. Material und Methoden

2.1 Arbeitsmittel

2.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden jeweils in der höchsten Reinheitsstufe erworben. Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser (Millipore-Anlage) angesetzt. Speziell für diese Arbeit wurden folgende Chemikalien verwendet:

para-Toluensulfonsäurechloramid, Natrium-Salz, Trihydrat (Chloramin T, ChT, Riedel-deHaën, Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland)

para-Toluensulfonsäureamid (p-TSA, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)

Wasserstoffperoxid (H₂O₂, 30%-ige wässrige Lösung, Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)

tert-Butylhydroperoxid (t-BHP, 5.5 mM in Dekan, Fluka, Sigma-Aldrich)

Lucifer Yellow (Lucifer Gelb CH Dilithiumsals, LY, Fluka, Sigma-Aldrich)

DL-Dithiothreitol (DTT, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)

Methioninsulfoxidreduktasen (MSRA, MSRB2) sowie *Enhanced Green Fluorescent Protein* (EGFP) (rekombinant mittels *E. coli*, Stamm M15, hergestellt)

Peptid Lysin-Isoleucin-Phenylalanin-Methioninsulfoxid-Lysin (ac-KIFM(O)K-Dnp, Jena Bioscience, Jena oder PSL, Heidelberg)

Tetrodotoxin (TTX, International Clinical Services, München, Deutschland)

2.1.2 Rechnerprogramme

Neben gebräuchlichen MicroSoft-Anwendungen (MS-Word, MS-Excel, MS-PowerPoint) fanden folgende Rechnerprogramme Verwendung:

zur Steuerung elektrophysiologischer Experimente und zur Datenaufzeichnung: PatchMaster (HEKA Elektronik, Lambrecht/Pfalz, Deutschland),

zur Analyse der experimentell gewonnenen Daten: FitMaster, PulseTools (beide HEKA Elektronik) und IGOR PRO (WaveMetrics, Lake Oswego, OR, USA),

zur Vorbereitung und Auswertung molekularbiologischer Arbeiten: Vector NTI (InforMax, Frederick, MD, USA),

zur Steuerung und Auswertung der HPLC-Trennungsläufe: UNICORN 3.21 (Amersham Pharmacia Biotech, GE Healthcare UK Ltd., Buckinghamshire, England, UK)

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Expressionsplasmide, Ionenkanäle und Mutanten

Die folgenden für α -Untereinheiten der Na_v-Kanäle kodierenden Gene wurden für diese Arbeit verwendet: SCN2A (*Rattus norvegicus*, für rNa_v1.2: P04775), SCN4A (*Rattus norvegicus*, für rNa_v1.4: P15390), SCN5A (*Homo sapiens*, für hNa_v1.5: Q14524) und SCN9A (*Homo sapiens*, für hNa_v1.7: NP002968). Das Gen für rNa_v1.2 lag in pciNeo, das für rNa_v1.4 in pcDNA3, das für hNa_v1.5 in pRc/CMV und das für hNa_v1.7 in pBR322 vor.

In die Wildtypkanäle bzw. Kanalchimären wurden Punktmutationen mit dem Ziel eingeführt, Aminosäuren mit höherer oder geringerer Oxidationssensitivität an potenziell kritischen Stellen der Kanäle zu platzieren. Für den Austausch von Methionin zu Leucin wird, basierend auf rNa_v1.4, die in Tabelle 2.1 aufgeführte Nomenklatur verwendet.

Tabelle 2.1:

Für diese Arbeit hergestellte Mutanten von rNa_v1.4 und hNa_v1.5

Bezeichnung	Mutation	Bezeichnung	Mutation
IFL	M1305L	IFL-LL	M1305L+M1469L+M1470L
IFM-L	M1316L	IFM-4L	M442L+M1139L+M1154L+M1316L
IFM-LM	M1469L	IFM-6L	IFM-LL kombiniert mit IFM-4L
IFM-ML	M1470L	IFL-6L	IFL-LL kombiniert mit IFM-4L
IFM-L-LM	M1316L+M1469L	MMM-L	I1303M+F1304M+M1316L
IFM-L-ML	M1316L+M1470L	ICM-L	F1304C+M1316L
IFM-LL	M1469L+M1470L	MFM-LM	MFM kombiniert mit IFM-LM
MFM	I1303M	MFM-ML	MFM kombiniert mit IFM-ML
hNa _v 1.5 IFL	hNa _v 1.5 M1487L	MFM-LL	MFM kombiniert mit IFM-LL

Die Chimären und einige Mutanten waren in der Arbeitsgruppe verfügbar. Selbst erzeugt wurden: 5444 C373Y, hNa_v1.5 IFL und rNa_v1.4 Y401C sowie durch Kombination vorhandener Mutanten: rNa_v1.4 IFM-4L, rNa_v1.4 IFL-6L, rNa_v1.4 IFM-LM, rNa_v1.4 IFM-ML, rNa_v1.4 MFM-LM, rNa_v1.4 MFM-ML, rNa_v1.4 MFM-LL, 5444 IFL, 5444 C373Y IFL, hNa_v1.5 C373Y IFL und rNa_v1.4 Y401C IFL.

2.2.2 Mutagenese

Punktmutationen wurden mittels des QuikChange-Systems (Stratagene, La Jolla, CA, USA) eingeführt. In einigen Fällen wurden die betreffenden Segmente zur einfacheren Handhabung vor der Mutagenese in pGEM-T-Vektoren (pGEM-T Vector System I, Promega, Madison, WI, USA) umgesetzt. Dafür erfolgte eine PCR, bei welcher ein Abschnitt des DNA-Doppelstranges zwischen passenden Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen amplifiziert wurde. Eine Auflistung der verwendeten Primer ist in Tabelle 2.2 gegeben.

Tabelle 2.2:

Übersicht der für Mutagenese und Sequenzierungen verwendeten Primer

Name	Sequenz	Verwendung	Annealing-Temperatur
M442_2568	cca atg atg ctc tgc tct gt	Sequenzier-Primer für den Bereich mit M442 bei rNav1.4	48°C
M1139_2569	agg gcc tgt ttc aag att gt	Sequenzier-Primer für den Bereich mit M1139 und M1154 bei rNav1.4	48°C
Seq_IFM_MM_2587	ctc ctt ctt cac cct caa cc	Sequenzier-Primer für den Bereich vom IFM-Inaktivierungs-Motiv bis zum Doppel-Methionin-Motiv bei rNav1.4	48°C
2733_5444CY_fwd	gct ctc tgg cta act aga gaa ccc act gct	Primer zum Herausamplifizieren von D1 aus 5444, vorwärts	58°C
2734_5444CY_back	ttt cca gag cct ggg cag cct tag	Primer zum Herausamplifizieren von D1 aus 5444, rückwärts	58°C
2735_hH1_BsrGI_fwd	att gta ctg gac caa ggt gaa agt	Primer zum Herausamplifizieren des BsrGI-Fragmentes aus hNav1.5, vorwärts	55°C
2736_hH1_BsrGI_back	gga ccg aat act caa taa act gag	Primer zum Herausamplifizieren des BsrGI-Fragmentes aus hNav1.5, rückwärts	55°C
2737_hH1_IFL_fwd	cag gac atc ttc ttg aca gag gag ca	Mutagenese-Primer für IFL bei hNav1.5, vorwärts	55°C
2738_hH1_IFL_back	tg ctc ctc tgt caa gaa gat gtc ctg	Mutagenese-Primer für IFL bei hNav1.5, rückwärts	55°C
2862_1.4_Y401C_fwd	cat gac gca gga ctg ctg gga gaa c	Mutagenese-Primer für Y401C bei rNav1.4, vorwärts	58°C
2863_1.4_Y401C_back	gtt ctc cca gca gtc ctg cgt cat g	Mutagenese-Primer für Y401C bei rNav1.4, rückwärts	58°C

Der Abschnitt, welcher die mutierte Stelle enthielt, wurde per Sequenzierung vollständig überprüft und dann mittels Restriktion und Ligation in den Expressionsvektor umgesetzt. Restriktionen wurden mit Enzymen von New England Bioscience (NEB, Ipswich, MA, USA) mit den empfohlenen Puffern und Inkubationstemperaturen durchgeführt. Vor der Ligation wurde das Hauptfragment mit bakterieller alkalischer Phosphatase (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) behandelt, um Selbstligation zu verhindern. Die Aufreinigung der Fragmente aus dem Gel erfolgte mit dem QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) oder dem ZymoClean Gel DNA Recovery Kit (ZYMO Research Corporation, Orange, CA, USA). Ligationen wurden mit der T4-Ligase (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) im mitgelieferten Puffer durchgeführt. Zur Ligation der PCR-Fragmente in das pGEM-T-Vektor-System wurde die im Kit enthaltene T4-DNA-Ligase (Promega) verwandt. Die Isolierung der DNA erfolgte je nach Bedarf mit dem Plasmid MiniKit, MidiKit oder MaxiKit endotoxinfrei (Qiagen) nach Protokoll des Herstellers (Qiagen Plasmid Purification Handbook). Sequenzierungen wurden mit dem Cycle Reader Auto DNA Sequencing Kit (Fermentas), einem LI-COR 4000-Sequenzierer sowie den Programmen DataCollectionTM und

BaseImageIRTM (LI-COR, Lincoln, NE, USA) oder von kommerziellen Sequenzierdiensten (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland bzw. Agowa, Gesellschaft für molekularbiologische Technologie mbH, Berlin, Deutschland) durchgeführt.

2.3 Biochemische Methoden

2.3.1 Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine

Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine (MSRA-C74S, EGFP) erfolgten nach dem QIAexpressionist-Protokoll (Qiagen, 06/2003) aus dem *E.coli*-Stamm M15 mit einem 500-ml-Ansatz. Der Zellaufschluss erfolgte durch Behandlung mit Lysozym (1 mg/ml, Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) und Ultraschall. Das Lysat wurde zentrifugiert, der Überstand auf eine Säule mit Ni-Nitrilotriessigsäure-Agarose (Qiagen) gegeben und mit Imidazol (125 mM bzw. 250 mM) eluiert. An Hand eines Proteingels wurden die Fraktionen mit den höchsten Proteingehalten ermittelt. Über Membranfiltersäulchen MWCO (Amicon Ultra-4 Ultracel-5k Regenerated Cellulose 5.000 MWCO, Ausschlussgröße 5 kDa, Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) wurden die Proteine aufgereinigt und konzentriert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit Coomassie Plus - The Better Bradford Assay Reagent (Pierce, Rockford, IL, USA) auf Mikroplatten mit einem Plattenspektrometer (Sunrise, Tecan, Schweiz) nach den Angaben des Herstellers.

2.3.2 MSRA-Aktivitätstest

Der *in vitro* MSRA-Aktivitätstest wurde in Anlehnung an die Anleitung zum JBS MetO Reduction Kit (Jena Bioscience, Jena) durchgeführt. Je nach Zielstellung der Experimente betrug die Konzentration an MSRA wie im Testprotokoll angegeben 100 µg/ml und für DTT 30 mM oder wie bei den elektrophysiologischen Experimenten 15 µg/ml MSRA und 8 mM DTT. Als Puffer wurde der im Kit enthaltene zehnfach-Puffer mit einer entsprechenden Menge destillierten Wassers oder die Pipettenlösung der elektrophysiologischen Messungen verwandt. Als Substrat dienten 5 nM ac-KIFM(O)K-Dnp. Das angekoppelte Dinitrophenol ermöglicht die Detektion bei 365 nm ohne interferierende Signale von Proteinen. Die Inkubation erfolgte für eine Stunde bei 37°C oder bei Raumtemperatur, bevor mit Trifluoressigsäure (TFA) in einer Endkonzentration von 0.1% abgestoppt wurde.

Die Analyse erfolgte per HPLC (Äkta Purifier, Amersham Pharmacia Biotech) auf einer analytischen C₁₅-Säule (Source 15 RPC ST 4.6/100, Amersham Pharmacia Biotech) bei

365 nm. Die Trennung wurde mit einem Zweipuffersystem durchgeführt. Puffer A setzte sich aus 94.9% H₂O, 5% Acetonitril und 0.1% TFA zusammen. Puffer B bestand aus 15.9% H₂O, 84% Acetonitril und 0.1% TFA. Beide Puffer wurden vor dem Einsatz gefiltert und entgast. Der Gradient betrug 100% Puffer A auf 100% Puffer B innerhalb von 8 Säulenvolumen.

2.4 Elektrophysiologische Methoden

2.4.1 Zellkultur und Transfektion

Als heterologes Expressionssystem dienten HEK-293-Zellen (CAMR, Porton Down, Salisbury, UK), welche in *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM, PAA Laboratories, Pasching, Österreich) : Ham's F12-Medium (F12, PAA Laboratories) im Verhältnis 1:1 mit 10% fötalem Kälberserum (FKS, Biowest, Nuaille, Frankreich) in einem Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert und halbwohentlich passagiert wurden. Die Ablösung der Zellen erfolgte teils mechanisch durch Gegenspülen mit frischem Medium, teils über eine Behandlung mit Trypsin (PAA Laboratories). Vor Trypsinierung wurde mit PBS gewaschen. Transiente Transfektionen wurden als Lipofektion mit Roti[®]-Fect (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe) oder SuperFect[®] (Qiagen) nach Protokoll des jeweiligen Herstellers durchgeführt.

Neurone aus Hinterwurzelganglien (*dorsal root ganglia*, DRG) wurden übernommen, nachdem die Ganglien nach der bei Petersen & LaMotte (1991) beschriebenen, auf Mäuse (*Mus musculus*) angepassten Methode seitlich der Wirbelsäule extrahiert, die Zellen vereinzelt und in Petrischalendeckel ausgesät worden waren.

2.4.2 Elektrophysiologische Messungen

2.4.2.1 Patch-Clamp

Die Patch-Clamp-Methode wurde von Neher & Sakmann (1976) aus der Spannungsklemme mit dem Ziel entwickelt, Ströme durch einzelne Kanäle messen zu können. Hamill et al. (1981) präsentierten die Ganz-Zell-Ableitung (*whole-cell*), bei der überlagerte Ströme aller in der Membran der Zelle befindlichen Ionenkanäle gemessen werden (makroskopischer Strom). Eine schematisierte Übersicht der in der Vorverstärkereinheit befindlichen Schaltung ist in Abbildung 2.1 dargestellt. Zur Minimierung störender elektromagnetischer Schwingungen ist der Pipettenhalter mit der Messelektrode direkt am Vorverstärker angebracht und mit diesem

auf einem Mikromanipulator nahe der Stelle am Mikroskop befestigt, an der das Messobjekt platziert wird. Ein Faradaykäfig schirmt von außerhalb kommende elektromagnetische Schwingungen ab. Ein Überblick über wesentliche Komponenten eines Messplatzes ist in Abbildung 2.2 gegeben.

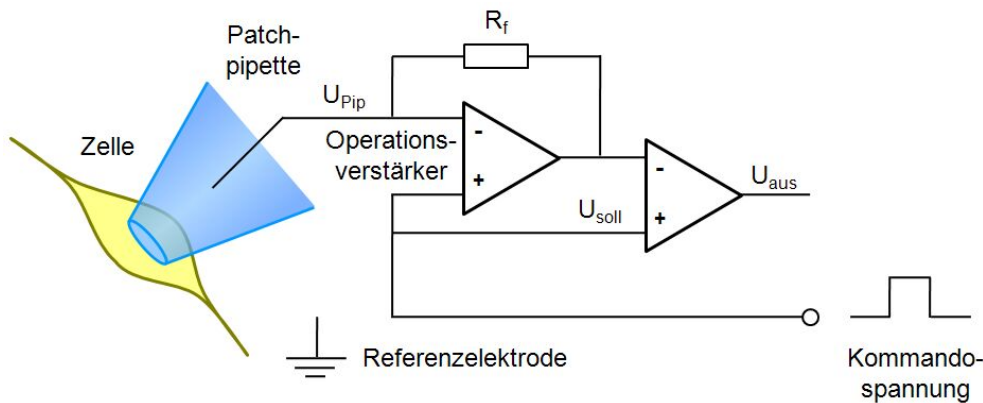


Abbildung 2.1:

Vereinfachte schematisierte Schaltung eines Patch-Clamp-Verstärkers

R_f : Rückkopplungswiderstand, U_{aus} : dem Spannungsunterschied zwischen U_{pip} und U_{soll} proportionale, verstärkte und um U_{soll} korrigierte Ausgangsspannung, U_{pip} : an der Patchpipette anliegende Spannung, U_{soll} : vorgegebene Kommando-Spannung (nach Numberger & Draguhn 1996, modifiziert).

Bei der Ganz-Zell-Konfiguration ist die intrazelluläre Konzentration der betrachteten Ionenart durch die verwendete Pipettenlösung festgelegt. Die Isolation von Strömen durch die gewünschten Ionenkanäle kann auf vielfältige Art und Weise geschehen. In dieser Arbeit wurden für die Messung von Natriumströmen Lösungen und Pulsprotokolle verwendet, welche Einflüsse anderer Kanäle, besonders von Kaliumkanälen, minimieren. Die Messungen an DRG-Neuronen erfolgten mit $1 \mu\text{M}$ Tetrodotoxin (TTX) in der Badlösung, wodurch Ströme von Na_V -Kanälen außer den durch $\text{Na}_V1.8$ und $\text{Na}_V1.9$ hervorgerufenen geblockt wurden.

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse elektrophysiologischer Messungen wurden als Patch-Clamp-Experimente in Ganz-Zell-Konfiguration bei Raumtemperatur gewonnen. Die große Mehrzahl der elektrophysiologischen Experimente wurde an einem Messplatz mit folgender Ausstattung durchgeführt: EPC9-Verstärker (HEKA Elektronik), Mikromanipulatorsystem (Luigs & Neumann Feinmechanik und Elektrotechnik GmbH, Ratingen, Deutschland), Inversmikroskop Zeiss Axiovert 100 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Deutschland). Für die Messungen wurden Pipetten aus Borosilikatglaskapillaren (KIMAX-51, Kimble Products, Vineland, NJ, USA) hergestellt, deren Spitze zu einem Widerstand zwischen 0.7 und $2 \text{ M}\Omega$ ausgezogen und mit einem Polymer (RTV, GE Bayer Silicones, Leverkusen, Deutschland) beschichtet war, was eine Kapazität (*C-fast*) von unter

6 pF ergab. Um Spannungsfehler zu minimieren, wurde der Serienwiderstand nach Etablierung der Ganz-Zell-Konfiguration zu mindestens 70% kompensiert.

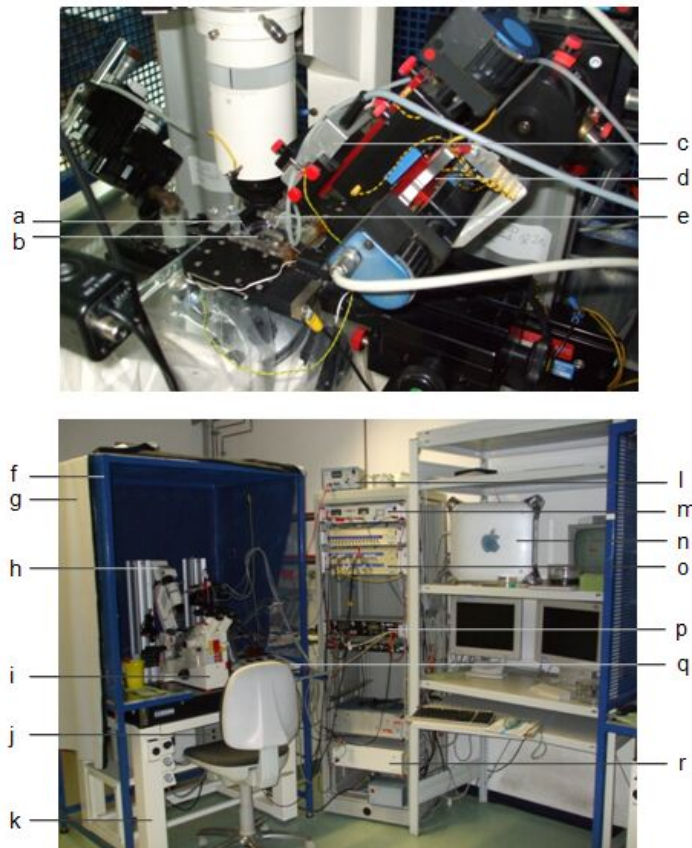


Abbildung 2.2:

Die Komponenten eines Patch-Clamp-Messplatzes („Setup D“, an welchem der überwiegende Teil der elektrophysiologischen Messungen durchgeführt wurde).

a. Agarbrücke zur Referenzelektrode, **b.** Zellen, ausplattiert in den Deckel einer Petrischale, auf dem Mikroskoptisch, **c.** Vorverstärker, **d.** Mikromanipulator zur Positionierung der Patchpipette, **e.** Pipettenhalter mit Patchpipette, **f.** Faradaykäfig, **g.** Abdeckplane zur Verdunklung bei Fluoreszenzexperimenten, **h.** Beleuchtung, **i.** Inversmikroskop, **j.** Fluoreszenzlichtquelle, **k.** Druckluftgepufferter Tisch mit Metallplatte, **l.** Steuereinheit für die Beleuchtung, **m.** Temperaturkontrolleinheit, **n.** Rechner, **o.** Hauptverstärker, **p.** Pumpe zur Steuerung des Drucks am Pipettenhalter und für die Absaugvorrichtung, **q.** Steuerungskonsole für den Mikromanipulator, **r.** Kontrolleinheit für den Mikromanipulator.

Elektrophysiologische Messungen mit HEK-293-Zellen erfolgten 1-4 Tage nach der Transfektion. Verwendet wurden Zellen mit einer Kapazität (*C-slow*) bis maximal ca. 30 pF und einem Abdicht-Widerstand von über 1 GΩ, in Ausnahmefällen, besonders bei Zellen mit viel Strom, auch weniger. Die Membranspannung wurde bei -120 mV gehalten („Haltespannung“), wenn nicht anders angegeben. Messungen wurden durchgeführt, wenn nach der zehnmütigen initialen Wartephase, um möglichst viele Kanäle in den aktivierbaren Zustand zu überführen, der Serienwiderstand nicht über 5 MΩ lag. Bei Messungen mit Applikation oxidierender Substanzen wurde zum Schutz der Badelektrode eine Agarbrücke verwendet. Diese bestand aus einem entsprechend den Gegebenheiten am Messplatz gebogenen Glasröhrchen, welches mit 1.5% Agar in 2 M KCl gefüllt wurde. Im Falle redox-relevanter Substanzen (DTT) in der Pipettenlösung kam eine analoge interne Agarbrücke, bei der an Stelle des Glases dünner Teflonschlauch verwendet wurde, zum Einsatz.

Die Pipettenlösung beinhaltete (in mM): 105 CsF, 35 NaCl, 10 EGTA, 10 HEPES, pH 7.4 (CsOH). Die externe Lösung setzte sich zusammen aus (in mM): 150 NaCl, 2 KCl, 1.5 CaCl₂,

1 MgCl₂, 10 HEPES, pH 7.4 (NaOH). Für die Messung von hNa_v1.5-Wildtyp und -Mutanten kamen teilweise Bad- und Pipettenlösungen zum Einsatz, bei denen NaCl jeweils zur Hälfte durch CsCl ersetzt wurde. Natriumströme bei DRG-Neuronen wurden mit einer Haltespannung von -80 mV, was dem physiologischen Potenzial entspricht (Zimmermann et al. 2007), und Depolarisationen auf -20 mV bzw. -10 mV gemessen.

2.4.2.2 Substanzapplikation

ChT wurde maximal wenige Tage vor der Verwendung eingewogen und in trockenem Zustand bei Raumtemperatur aufbewahrt. Von DTT wurden Stammlösungen angefertigt und aliquotiert bei -20°C gelagert. Direkt vor dem Experiment erfolgte das Lösen in bzw. Verdünnen mit einer entsprechenden Menge der jeweiligen Badlösung. DTT-Aliquots wurden jeweils nur für wenige Messungen verwendet. H₂O₂ und t-BHP wurden direkt aus den kommerziell erhältlichen Lösungen mit Badlösung verdünnt. Die Applikation erfolgte jeweils durch Austausch der gesamten Lösung im Messgefäß mittels Spülen per Pasteurpipette. Dafür wurden während kontinuierlichem Absaugen 5 ml der neuen Lösung zugegeben. Es wurde darauf geachtet, dass sich die Einspülstelle von der zu messenden Zelle aus betrachtet der Absaugung gegenüber befand.

Lucifer Yellow wurde nach der bei Higure et al. (2003) beschriebenen Methode in der Pipettenlösung gelöst und diffundierte nach Etablierung der Ganz-Zell-Konfiguration in die Zelle. Die Radikalbildung erfolgte während des Bestrahlsens mit Licht der Wellenlänge 436 nm aus einer PolyChrome-1-Lichtquelle (XBO-Lampe, TILL Photonics, Gräfelfing, Deutschland) durch ein 40-fach-Luftobjektiv (Zeiss LD Achromplan, numerische Apertur: 0.6).

MSRA, MSRB2 und EGFP wurden bei +4°C gelagert. Jeweils am Messtag wurden entsprechende Verdünnungen mit Pipettenlösung hergestellt und auf Eis aufbewahrt. Proteine in der Pipettenlösung erschweren deutlich das Herstellen einer dichten Verbindung zwischen dem Glas der Pipette und der Zellmembran. Um Bedingungen zu erreichen, bei denen eine Messung möglich ist, wurde zum Füllen der Pipetten ein spezielles Verfahren analog dem bei Ju et al. (1996) für Messungen mit TTX beschriebenen verwandt, bei dem die Pipettenspitze zunächst kurz in Pipettenlösung ohne Zusätze eingetaucht wurde. Pipettenlösung mit Proteinen wurde dann vom Ende der Pipette eingefüllt. Um die Diffusion der Proteine in die Zelle so wenig wie möglich zu behindern, wurden Pipetten mit Widerständen zwischen 0.7 und 1 MΩ, also mit großer Öffnung, verwandt. Die zum Zeitpunkt der Applikation von ChT

in der Zelle vorliegende Konzentration der MSRs $c(t)$ wurde mit Gleichung 2.1 (nach Pusch & Neher 1988) abgeschätzt.

Gleichung 2.1:

$$c(t) = c_0 - (c_0 - c(0)) * e^{\frac{-t}{0.6 * R_S * M^{\frac{1}{2}} * (\frac{C_M}{5.91})^{1.5}}}$$

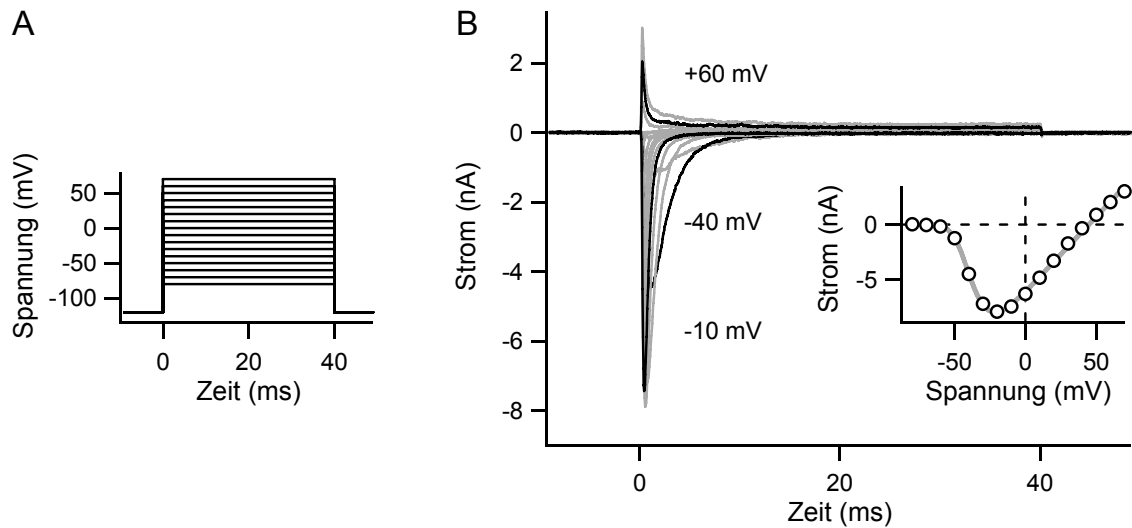
c_0 ist die Enzymkonzentration in der Pipettenlösung, $c(0)$ die Anfangskonzentration in der Zelle, welche gleich null gesetzt wurde. t ist die Zeitspanne vom Etablieren der Ganz-Zell-Konfiguration bis zum Applizieren von ChT, R_S der Serienwiderstand ($M\Omega$), M die molare Masse der Enzyme (Da) und C_M die Kapazität der Zelle (*C-slow* in pF). Der Exponent 1.5 und die empirischen Faktoren (0.6 und 5.91) wurden aus Pusch & Neher (1988) übernommen.

2.4.2.3 Datenaufnahme und Analyse

Zu Beginn jeder Messung wurden, nach Testpulsen zur Bestimmung der Stromamplitude, eine Strom-Spannungskennlinie und die Spannungsabhängigkeit der schnellen Inaktivierung aufgenommen, um die Eignung der Zelle beurteilen zu können. Bei Testpulsen wurde von der Haltespannung für 40 ms auf -10 mV depolarisiert. Mit Zellen, deren Stromamplitude zwischen 1 und maximal 15 nA betrug, wurde weiter gemessen. Die Korrektur von kapazitiven und Leckströmen erfolgte mit p/n-Pulsen ($n=4, 6$ oder 8).

Für die Strom-Spannungskennlinie erfolgte die Aufnahme einer Serie von Spannungsänderungen für 40 ms von der Haltespannung. Die Zielspannung wurde im Bereich zwischen -100 mV und +70 mV in 10-mV-Schritten erhöht. Das Intervall zwischen zwei Spannungspulsen betrug 3 s. Die Ströme wurden mit 5 kHz tiefpassgefiltert und mit einer Rate von 25 kHz aufgenommen. In Abbildung 2.3 sind beispielhaft ein Pulsprotokoll, die resultierende Stromantwort und die Beziehung zwischen Spitzenstrom und depolarisierender Spannung dargestellt.

Die Anpassung der Beziehung zwischen dem Spitzenstrom und der Zielspannung erfolgte nach einem Hodgkin-Huxley-Formalismus mit der Annahme von drei Inaktivierungstoren (Gleichung 2.2). V_m bezeichnet die halbmaximale Spannung der Aktivierung, k_m den zugehörigen Steigungsfaktor, aus dem nach $k_m = k_B * T / q$ mit der Boltzmann-Konstante k_B und der absoluten Temperatur T der apparente Ladungstransfer q berechnet werden kann. Γ ist die maximale Leitfähigkeit aller Kanäle und E_{rev} die Umkehrspannung.

**Abbildung 2.3:**

Bestimmung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung.

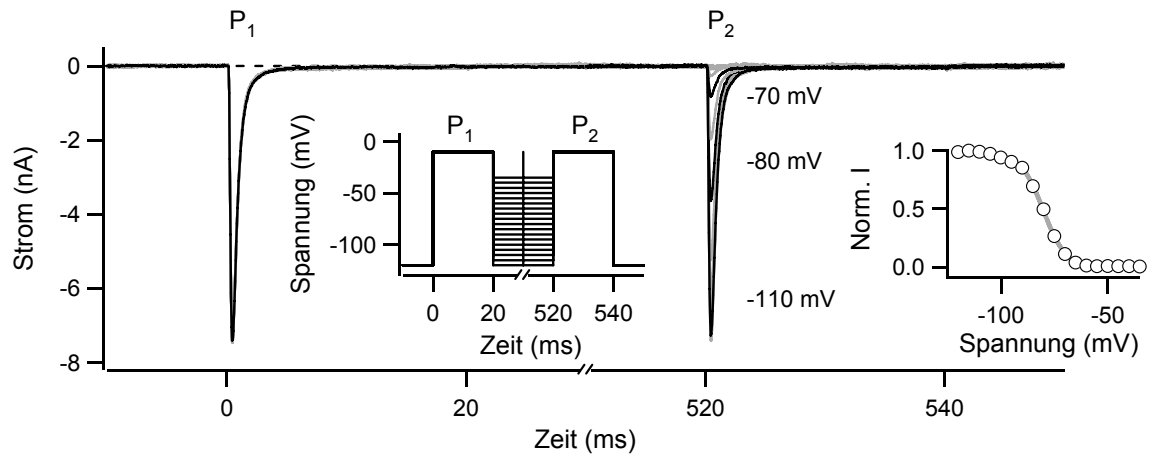
A. Pulsprotokoll. **B.** Stromantwort von rNa_v1.4. Im Nebenbild ist der Spitzenstrom in Abhängigkeit von der Depolarisationsspannung dargestellt. Die durchgezogene graue Kurve stellt eine Anpassung nach Gl. 2.2 dar.

$$I(V) = \Gamma(V - E_{\text{rev}}) \frac{1}{(1 + e^{-(V - V_m)/k_m})^2}$$

Gleichung 2.2:

Zur Bestimmung der Spannungsabhängigkeit der schnellen Inaktivierung wurde die Zelle, von der Haltespannung ausgehend, nach einer 500 ms dauernden Konditionierungsphase einem depolarisierenden Puls von 20 ms auf -10 mV ausgesetzt. Die Spannung während der Konditionierungsphase wurde bei jedem Durchlauf um 5 mV erhöht, der bei der Messung abgedeckte Bereich lag meist zwischen -140 mV und -20 mV und wurde nach Lage der Kurve bei den verschiedenen Kanälen bzw. applizierten Substanzen angepasst. Das Intervall zwischen den Durchläufen betrug 3 s. Die erhaltenen Ströme wurden mit 4 kHz gefiltert und mit einer Abtastrate von 20 kHz aufgezeichnet. In Abbildung 2.4 sind ein repräsentatives Pulsprotokoll, die resultierende Stromantwort und das Verhältnis von normiertem Spitzenstrom und Konditionierungsspannung gezeigt.

Der Spitzenstrom der Depolarisation auf -10 mV wurde auf den Spitzenstrom eines Kontrollpulses vor der Konditionierung normiert, gegen die Konditionierungsspannung aufgetragen und mit einer Boltzmann-Funktion mathematisch beschrieben (Gl. 2.3). V_h ist die halbmaximale Spannung der Inaktivierung, k_h der Faktor für die entsprechende Steigung, aus dem sich nach $k_h = k_B \cdot T / q$ der apparente Ladungstransfer während des Inaktivierungsvorganges berechnen lässt. Amp stellt den Maximalwert des normierten Stroms dar, mit offset wird die unvollständige Inaktivierung nach Applikation von Oxidantien berücksichtigt.

**Abbildung 2.4:**

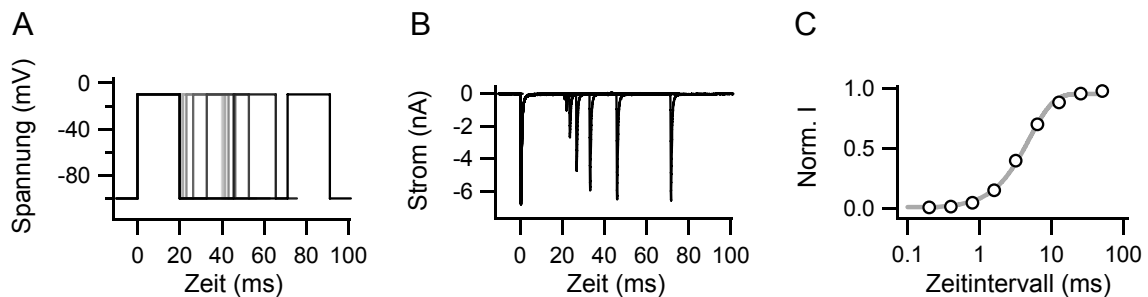
Bestimmung der Spannungsabhängigkeit der schnellen Inaktivierung.

Stromantwort von $rNa_{v1.4}$ auf das im linken Nebenbild dargestellte Pulsprotokoll. P₁: Kontrollpuls, P₂: Puls zur Beurteilung der Spannungsabhängigkeit der schnellen Inaktivierung. Im rechten Nebenbild ist der normierte Maximalstrom in Abhängigkeit von der Konditionierungsspannung dargestellt. Die durchgezogene Kurve ist eine Anpassung nach Gleichung 2.3.

$$\frac{I}{I_{Kon}}(V) = \frac{\text{Amp-offset}}{1 + e^{-(V-V_h)/k_h}} + \text{offset}$$

Gleichung 2.3:

Die Bestimmung der Zeitabhängigkeit der Rückkehr von der schnellen Inaktivierung erfolgte mit einem Doppelpulsprotokoll, wie in Abbildung 2.5 dargestellt.

**Abbildung 2.5:**

Bestimmung der Zeitabhängigkeit der Rückkehr aus der schnellen Inaktivierung.

A. Pulsprotokoll. B. Stromantwort von $rNa_{v1.4}$. C. Verhältnis der beiden Stromamplituden in Abhängigkeit von der Dauer des Intervalls zwischen den beiden depolarisierenden Pulsen. Die durchgezogene Kurve stellt eine Anpassung nach Gleichung 2.4 dar.

Ausgehend von einer Membranspannung von -100 mV wurde der erste Puls auf -10 mV appliziert. Nach einer variablen Zeitspanne bei -100 mV, deren Dauer sich mit jedem Durchlauf erhöhte, wurde eine weitere Depolarisation auf -10 mV durchgeführt. Das Intervall betrug je nach Kanal bis ca. 65 ms. Die Durchläufe erfolgten im Abstand von 2 s oder 3 s. Die Membranspannung von -100 mV wurde als Kompromiss zwischen physiologischen Spannungen an Zellmembranen und einem für das Inaktivierungsverhalten während der

Messungen ausreichend negativem Wert gewählt, um Ergebnisse zu erhalten, welche den tatsächlichen Verhältnissen an der Membran nahe kommen. Die Ströme wurden mit 5 kHz gefiltert und mit einer Rate von 10 kHz aufgenommen. Der Maximalstrom des Pulses nach dem zeitlichen Intervall wurde auf den Maximalstrom des ersten Pulses normiert, gegen die Intervalldauer aufgetragen und mit einer exponentiellen Gleichung (Gl. 2.4) angepasst.

Gleichung 2.4:
$$\frac{I_2}{I_1}(t) = \text{Amp}_0 + \text{Amp}_1(1 - e^{-\frac{t}{\tau}})$$

Amp_0 bezeichnet den Anfangswert, Amp_1 das Maximum des Wertebereichs und τ die Zeitkonstante der Rückkehr aus der Inaktivierung.

Die Messung der Zeitabhängigkeit des Verlustes der schnellen Inaktivierung erfolgte mittels Depolarisationen von der Haltespannung für 20 ms auf -10 mV fortlaufend im 5-s-Intervall. Es wurde mit 4 kHz gefiltert und die Daten mit einer Abtastrate von 20 kHz aufgezeichnet. Die Inaktivierung wurde als das Verhältnis (r) aus dem Mittelwert des Stromes nach 10 ± 1 ms und dem Maximalstrom berechnet. Der Inaktivierungsindex errechnet sich als $1-r(t)$. Der Inaktivierungsindex wurde gegen die Zeit aufgetragen und mit Gleichung 2.5 angepasst.

Gleichung 2.5:
$$1 - r(t) = 1 - r_0 - (r_\infty - r_0)(1 - e^{-(t-t_0)/\tau})^n$$

Dabei ist r_0 die Inaktivierung vor der Applikation von Oxidantien und r_∞ der Endzustand der Inaktivierung, welcher bei der Anpassung stets bei eins gehalten wurde. Der Zeitpunkt des Beginns der Oxidation, t_0 , wurde beim tatsächlichen Zeitpunkt der Substanzzugabe festgehalten. τ ist die Zeitkonstante und n ein Exponent.

Die beschriebene Variante der Ermittlung des Inaktivierungsverlustes ist eine zur Analyse großer Datenmengen optimierte vereinfachte Methode. Alternativ besteht die Möglichkeit, aus den Stromspuren mit Hilfe eines Hodgkin-Huxley-Formalismus detaillierte Informationen zu gewinnen. Gleichung 2.6 bietet eine solche Möglichkeit unter Berücksichtigung von zwei Zeitkonstanten für die Inaktivierung.

Gleichung 2.6:
$$I(t) = I(0) * (1 - e^{-\frac{t-t_0}{\tau_m}})^3 * (\text{hinf} + (1 - \text{hinf}) * (r_{12} * e^{-\frac{t-t_0}{\tau_{h1}}} + (1 - r_{12}) * e^{-\frac{t-t_0}{\tau_{h2}}}))$$

$I(0)$ bezeichnet den potenziellen Maximalstrom, t_0 die Verzögerung vom Zeitpunkt der Änderung der Membranspannung bis zum Öffnen der Kanäle. τ_m ist die Zeitkonstante der

Aktivierung, τ_{h1} und τ_{h2} sind die Zeitkonstanten der Inaktivierung. Der Anteil der schnellen Komponente wird durch r_{12} beschrieben.

Die Inaktivierung bei einem depolarisierenden Puls mit unendlicher Dauer, h_{inf} , wurde bei der Anpassung bei null festgehalten. In Abbildung 2.6 ist die Anpassung für jeweils eine Stromspur mit vollständiger und mit teilweise verlorener Inaktivierung dargestellt.

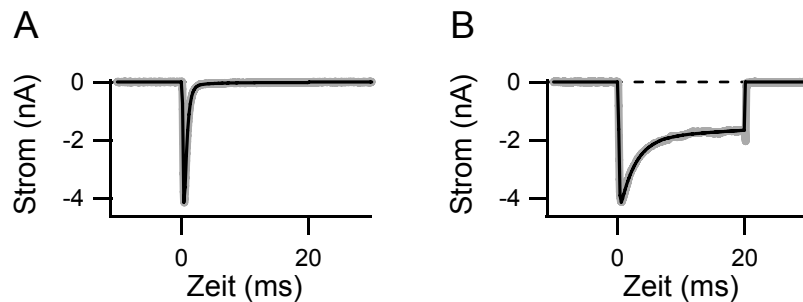


Abbildung 2.6

Anpassung von Stromspuren nach Gleichung 2.6.

A. Stromspur von $rNa_v1.4$ Wildtyp mit vollständiger Inaktivierung. **B.** Stromspur von $rNa_v1.4$ Wildtyp mit teilweise verlorener Inaktivierung 500 s nach Applikation von 200 μ M Chloramin T. Beide Stromspuren (grau) sind Antworten auf depolarisierende Pulse von 20 ms Dauer auf -10 mV. Die schwarz überlagerten Kurven sind Anpassungen nach Gleichung 2.6.

Zur Ermittlung des Reststroms wurden alle Datenpunkte des Spitzenstroms von 25 s vor bis 25 s nach dem angegebenen Zeitpunkt nach der Substanz-Applikation gemittelt und durch das Mittel aller Datenpunkte des Spitzenstroms vor der Applikation geteilt. Der errechnete Wert ging in die Auswertung ein, wenn jeweils mindestens sieben Datenpunkte beinhaltet waren.

Zur Untersuchung des Einflusses oxidativer Modifikationen auf Einzelkanalströme, die Offenwahrscheinlichkeit sowie die Anzahl der verfügbaren Kanäle des betreffenden Typs wurden Messwerte verwandt, welche mit dem in Abb. 2.7A (oben) dargestellten Pulsprotokoll mit jeweils 100 Wiederholungen gewonnen wurden. Die Varianzen und Strommittelwerte für jeden Puls wurden durch nichtstationäre Rauschanalyse (Steffan & Heinemann 1997) ermittelt. Die Analyse der Beziehungen zwischen den errechneten Varianzen und den gemittelten Werten für den Strom, dargestellt in Abbildung 2.7B, erfolgte nach Gleichung 2.7.

$$V(I) = s_B + i_{EK} * I - \frac{I^2}{n_K}$$

Gleichung 2.7:

$V(I)$ bezeichnet die Varianz der gemittelten Stromwerte, s_B die Hintergrundvarianz, i_{EK} den Einzelkanalstrom für die jeweilige Testspannung und n_K die Gesamtanzahl der Kanäle des entsprechenden Typs. Bei der globalen Anpassung (Starkus et al. 2003) wurden die Werte für

die Anzahl der Ionenkanäle und die Hintergrundvarianz für alle Spannungen einer Messung konstant gehalten. In Abbildung 2.7C sind beispielhaft Ergebnisse der Anpassung dargestellt.

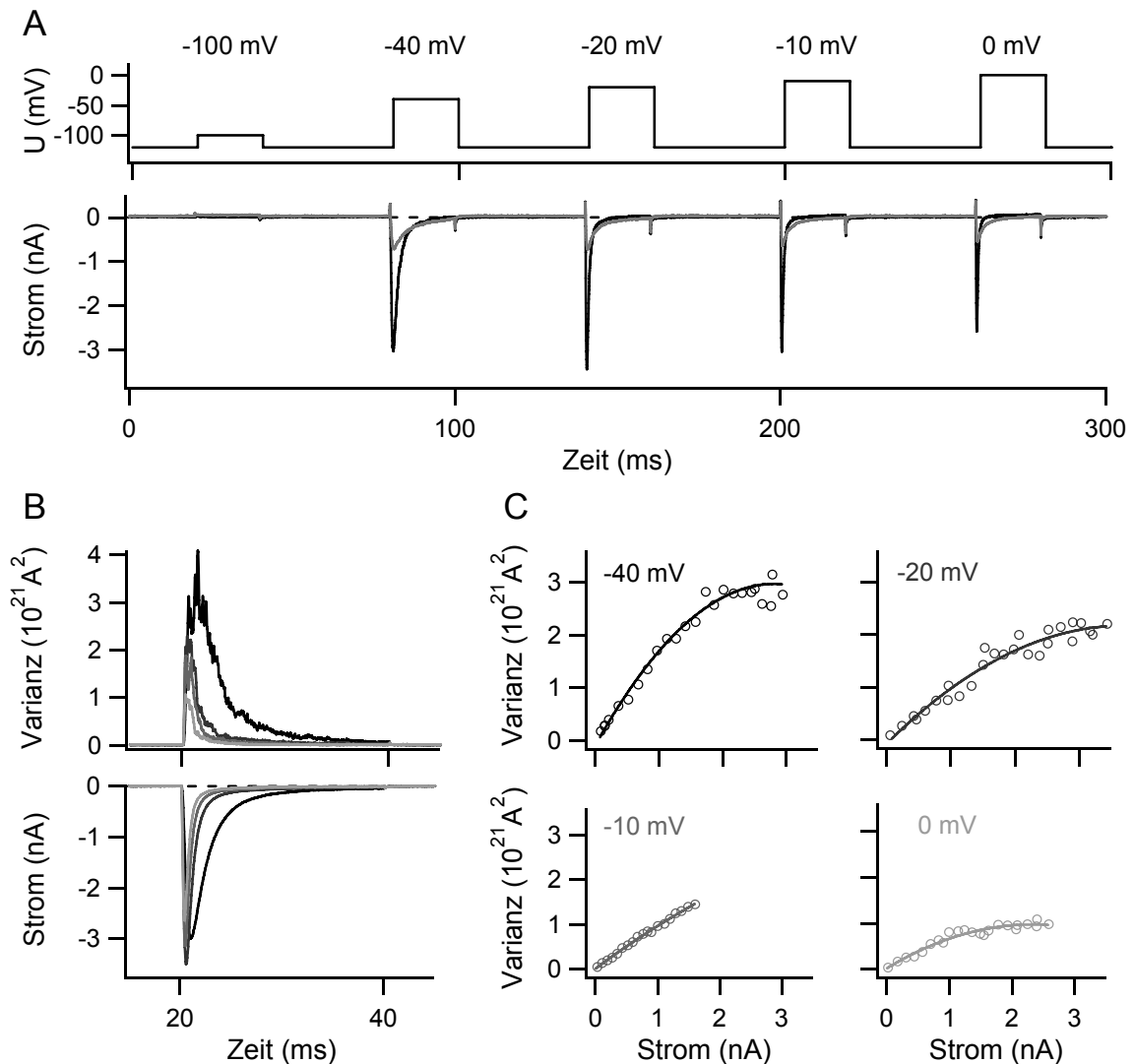


Abbildung 2.7:

Nichtstationäre Rauschanalyse.

A. Pulsprotokoll (oben) und Stromantwort von $rNa_v1.5$ IFL (unten). Das Pulsprotokoll beinhaltet einen Puls für eine interne Leckkorrektur (1. Puls) und 4 depolarisierende Pulse (Pulse 2 bis 5). In einer Serie wurden jeweils 100 Wiederholungen aufgezeichnet. **B.** Mit der nichtstationären Rauschanalyse ermittelte Varianzen (oben) und gemittelte Ströme (unten) für die depolarisierenden Pulse. **C.** Auftrag der Varianzen gegen die gemittelten Ströme (offene Kreise) und globale Anpassung nach Gleichung 2.7 für jede gemessene depolarisierende Spannung. Die Graustufung bei (B) und (C) für die jeweilige Spannung ist identisch.

Die Signifikanz von Abweichungen bei Datengruppen wurde jeweils mit einem zweiseitigen t-Test für zwei Datenreihen mit ungleicher Varianz beurteilt. Abweichungen wurden bei einem Ergebnis des t-Tests von $p < 0.05$ als signifikant betrachtet. Daten, die auf mehrere Einzelmessungen zurückgehen, sind als arithmetisches Mittel, Fehler sind als SEM (*standard error of the mean*, Standardabweichung geteilt durch die Quadratwurzel aus der Anzahl unabhängiger Datenpunkte) angegeben.

3. Ergebnisse

3.1 Sensitivität der Inaktivierung bei spannungsgesteuerten Natriumkanälen gegenüber Oxidation

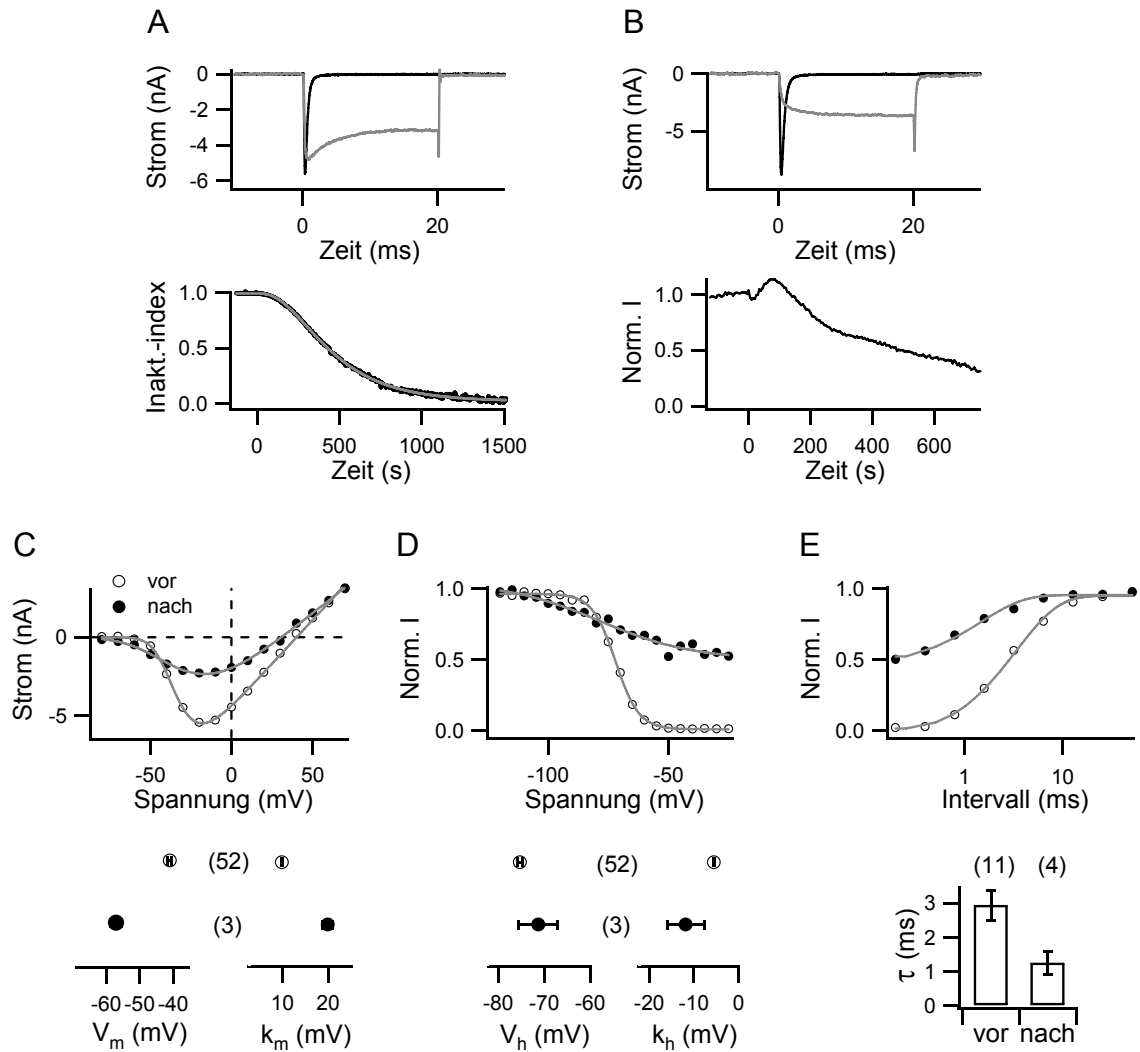
3.1.1 Einfluss oxidierender Substanzen auf den Skelettmuskelnatriumkanal $Na_v1.4$

3.1.1.1 Effekte von Chloramin T auf spannungsgesteuerte Natriumkanäle

Oxidativer Stress ist in der Lage, Funktionsparameter spannungsgesteuerter Natriumkanäle zu beeinflussen. Mit dem Oxidationsmittel Chloramin T (ChT) wurde oxidativer Stress in Zellen experimentell ausgelöst. Spannungsgesteuerte Natriumkanäle (Na_v -Kanäle) wurden in HEK-293-Zellen überexprimiert. Während elektrophysiologischer Messungen in der Ganz-Zell-Konfiguration wurden Natriumströme als Antwort auf Pulse zu -10 mV im 5-s-Intervall aufgezeichnet. Nach der Applikation von ChT trat teilweiser Verlust der schnellen Inaktivierung auf, der Inaktivierungsindex nahm ab. Der Inaktivierungsverlust erhöhte sich mit fortgesetzter Expositionsdauer (Abbildung 3.1A).

Nach längerer Expositionsdauer oder mit höherer Konzentration an ChT trat neben dem Inaktivierungsverlust eine Verringerung des Spitzenstroms auf (Abbildung 3.1B). Bei einigen Kanälen, beispielsweise $hNa_v1.5$ WT, erfolgte der Stromverlust schneller als der Inaktivierungsverlust. Der Stromverlust wird in Abschnitt 3.2 dieser Arbeit thematisiert.

Der Einfluss von ChT auf Schalteigenschaften von Na_v -Kanälen ist in Abbildung 3.1C bis E dargestellt. An der Strom-Spannungskennlinie wird der Stromverlust nach einer Expositionsdauer von 1550 s gegenüber $200 \mu\text{M}$ ChT deutlich. Die halbmaximale Spannung veränderte sich mit ChT um etwa 16 mV in hyperpolarisierender Richtung. Beim Vergleich der Spannungsabhängigkeiten der Inaktivierung vor und nach Applikation wird die unvollständige Inaktivierung mit ChT deutlich. Die halbmaximale Spannung änderte sich nicht signifikant. Die Werte der Steigungsfaktoren für die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung und der Inaktivierung verdoppelten sich ungefähr in einem Zeitraum von etwa 25 bis 27 Minuten nach Applikation von $200 \mu\text{M}$ ChT, was eine Verringerung des apparenten Ladungstransfers beim jeweiligen Schaltvorgang um etwa die Hälfte bedeutet. Die Zeitkonstante für die Rückkehr aus der schnellen Inaktivierung verringerte sich mit ChT, der teilweise Verlust der schnellen Inaktivierung wird ebenfalls deutlich (Abbildung 3.1E).

**Abbildung 3.1:**

Effekte von Chloramin T auf spannungsgesteuerte Natriumkanäle.

A. Verlust der schnellen Inaktivierung. Oben: Stromspuren von rNav_v1.4 vor (schwarz) und 600 s nach Applikation von 200 µM ChT (grau). Unten: Abhängigkeit des Inaktivierungsindex von der Zeit. Die grau überlagerte Kurve ist eine Anpassung nach Gleichung 2.5. **B.** Verlust des Spitzenstroms. Oben: Stromspuren von rNav_v1.4 vor (schwarz) und 600 s nach Applikation von 1 mM ChT (grau). Unten: Abhängigkeit des Spitzenstroms von der Zeit. Die Applikation erfolgte bei (A) und (B) jeweils bei 0 s. **C.** Spannungsabhängigkeit der Aktivierung. Oben: Strom-Spannungskennlinie von rNav_v1.4 vor und 1550 s nach Applikation von 200 µM ChT. Unten: halbmaximale Spannung (V_m) und Steigungsfaktor (k_m) der Aktivierung von rNav_v1.4 vor und 1520-1560 s nach Applikation von 200 µM ChT. **D.** Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung. Oben: auf einen Kontrollpuls normierter Spitzenstrom von rNav_v1.4 in Abhängigkeit von der Konditionierungsspannung vor und 1610 s nach Applikation von 200 µM ChT. Unten: halbmaximale Spannung (V_h) und Steigungsfaktor (k_h) der Inaktivierung von rNav_v1.4 vor und 1560-1610 s nach Applikation von 200 µM ChT. **E.** Rückkehr von der schnellen Inaktivierung. Oben: Abhängigkeit des auf den Kontrollpuls normierten Spitzenstroms von rNav_v1.4 vom Intervall zwischen den beiden Pulsen vor und 600 s nach Applikation von 200 µM ChT. Unten: Zeitkonstanten der Rückkehr von rNav_v1.4 IFM-L von der schnellen Inaktivierung vor und 600 s nach Applikation von 200 µM ChT. Bei (C) bis (E) ist der Zustand vor Applikation jeweils mit weißen, der Zustand nach Applikation mit schwarzen Kreisen verdeutlicht. Auf den unteren Abbildungen ist die Anzahl unabhängiger Experimente jeweils in Klammern angegeben.

Die exakten Parameter der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung sind in den Tabellen A.1 sowie A.21-A.23 angegeben, die für die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung in den

Tabellen A.1 und A.24-A.26 und die für die Rückkehr von der schnellen Inaktivierung in Tabelle A.20 (Anhang).

Der Verlust der schnellen Inaktivierung ist für viele Wildtypkanäle und Mutanten der prominenteste Effekt von ChT. Beschreibt man den Inaktivierungsverlust auf Basis einer Anpassung nach einem Hodgkin-Huxley-Formalismus (Gleichung 2.6), so treten eine schnelle und eine langsame Komponente der Inaktivierung auf, die nach der Applikation von ChT beide langsamer werden. Eine einfach exponentielle Beschreibung spiegelt den Verlauf der Zeitkonstanten für die Inaktivierung nicht adäquat wider, daher wurde die Anpassung nach Gleichung 2.5 durchgeführt. Die Zeitkonstante der schnellen Komponente nahm von einem Ausgangswert von $403 \pm 25 \mu\text{s}$ mit einer Zeitkonstante von $1600 \pm 880 \text{ s}$ bei einem Exponenten von 2.05 ± 0.09 ($n=12$) zu. Die Zeitkonstante der langsamen Komponente wurde von einem Ausgangswert von $6.4 \pm 1.2 \text{ ms}$ mit einer Zeitkonstante von $12050 \pm 6040 \text{ s}$ bei einem Exponenten von 1.82 ± 0.1 ($n=10$) größer. Der Anteil der schnellen Komponente sank von anfangs 0.980 ± 0.009 auf 0.881 ± 0.020 200 s nach Applikation von $200 \mu\text{M}$ ChT ($n=12$) (Abb. 3.2). Zur praktikablen Beschreibung der großen Datenmengen wurde im Weiteren der Inaktivierungsindex verwandt.

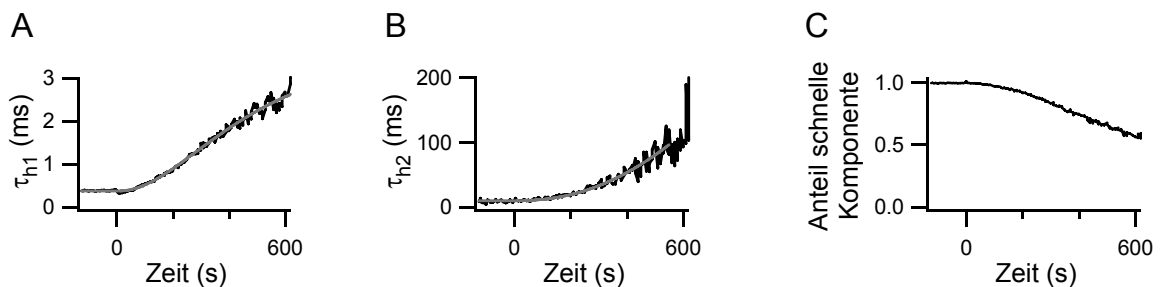


Abbildung 3.2:

Veränderungen von Inaktivierungsparametern nach Anpassung mit Gleichung 2.6 bei $r\text{Na}_v1.4$ nach Applikation von $200 \mu\text{M}$ ChT.

A. Zeitkonstante der schnellen Komponente in Abhängigkeit von der Zeit. **B.** Zeitkonstante der langsamen Komponente in Abhängigkeit von der Zeit. **C.** Anteil der schnellen Komponente in Abhängigkeit von der Zeit. Die Applikation erfolgte zu 0 s. Die grauen überlagerten Kurven bei (A) und (B) sind Anpassungen nach Gleichung 2.5.

3.1.1.2 Verlust der schnellen Inaktivierung durch Chloramin T

Skelettmuskelnatriumkanäle der Ratte ($r\text{Na}_v1.4$) wurden in HEK-293-Zellen überexprimiert. Während elektrophysiologischer Messungen in der Ganz-Zell-Konfiguration, bei denen Na^+ -Ströme als Antwort auf Pulse zu -10 mV im 5-s-Intervall aufgezeichnet wurden, erfolgte die Exposition gegenüber ChT. ChT führte zu einer Verminderung der schnellen Inaktivierung. In

Abbildung 3.3A ist für verschiedene Konzentrationen an ChT die Überlagerung normierter Stromspuren vor Beginn der Oxidation und 200 s nach Applikation von ChT gezeigt. Der Verlust der Inaktivierung nimmt mit steigender Konzentration im dargestellten Konzentrationsbereich zu und konnte in ähnlicher Weise auch bei Depolarisation auf andere Spannungen beobachtet werden.

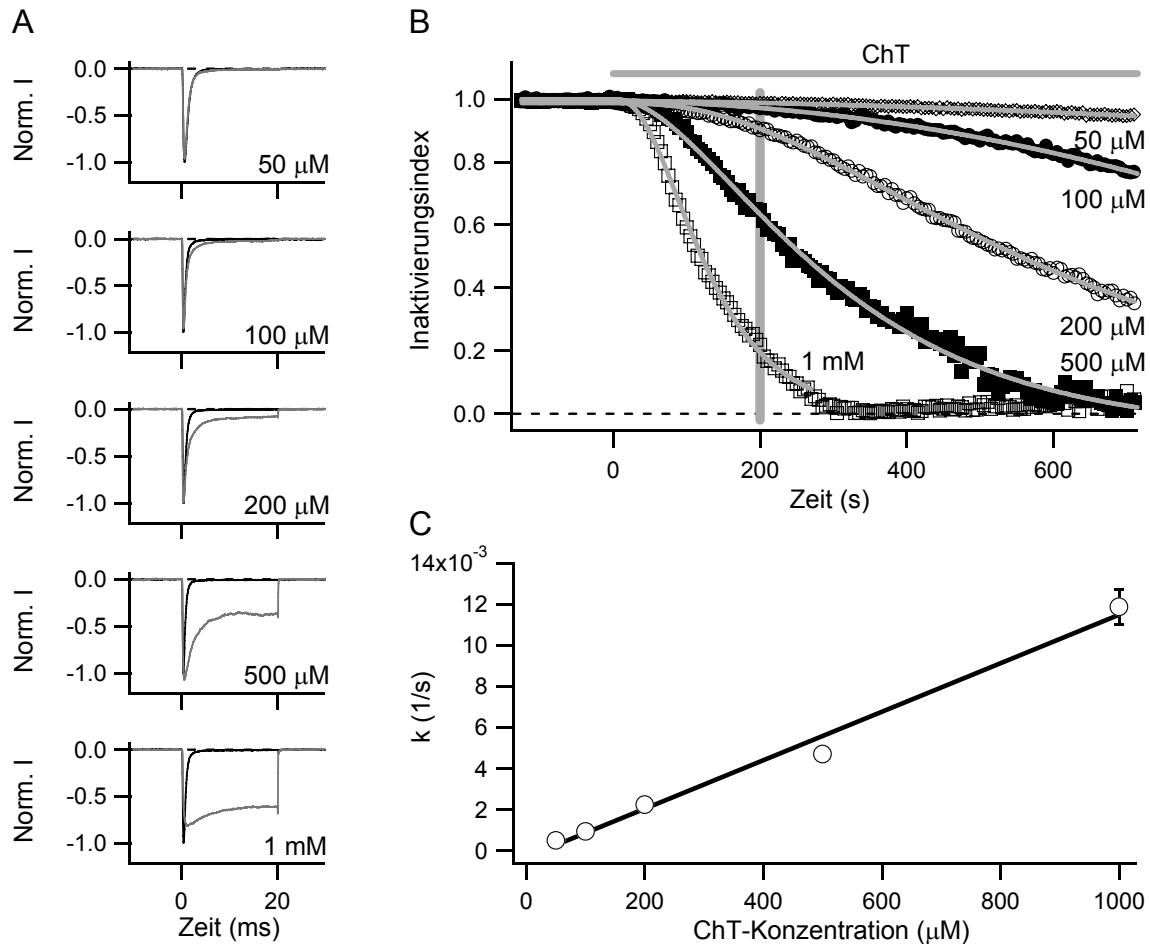


Abbildung 3.3:

Effekt von Chloramin T auf die Inaktivierung von rNa_v1.4-Kanälen.

A. Stromspuren, ausgelöst durch Depolarisationen auf -10 mV vor (schwarz) und 200 s nach Applikation der angegebenen Konzentration ChT (grau). **B.** Zeitverlauf repräsentativer Inaktivierungsindizes für die angegebenen Konzentrationen an ChT in Überlagerung. Die grau dargestellten Kurven sind Ergebnis der Anpassung nach Gleichung 2.5 mit einem bei $n=2$ gehaltenem Exponenten. Die Applikation von ChT erfolgte zu $t=0$ s. Der vertikale graue Balken kennzeichnet den Zeitpunkt von 200 s, von welchem die Stromspuren bei (A) stammen. **C.** Darstellung der aus den Anpassungen bei (B) ermittelten Ratekonstanten ($k=1/\tau$) gegen die ChT-Konzentration ($n=5-12$). Überlagert ist eine lineare Anpassung mit einem Anstieg von 11.8 ± 0.7 (sM)⁻¹ (nach Kassmann et al. 2008, verändert).

Um den Verlauf des Inaktivierungsverlustes zu verdeutlichen, wurde der Inaktivierungsindex gegen die Zeit aufgetragen (Abb. 3.3B). Je länger ChT auf die Kanäle wirkte, desto größer wurde der Verlust an schneller Inaktivierung. Die Steigerung der Konzentration an ChT beschleunigte den Inaktivierungsverlust. Der Inaktivierungsindex zeigte in Gegenwart von

ChT einen sigmoidalen Verlauf, zu dessen Beschreibung sich die angegebene Exponentialgleichung (Gleichung 2.5) mit einem Exponenten (n) als geeignet erwies. Für die Vergleichbarkeit der bei der Anpassung ermittelten Zeitkonstanten wurde der Exponent bei $n=2$ festgehalten, wenn nicht anders angegeben. Die Rate des Inaktivierungsverlustes wurde aus den Zeitkonstanten der in Abb. 3.3B dargestellten Anpassungen ermittelt. Die erhaltenen Ratenkonstanten wurden gegen die ChT-Konzentrationen aufgetragen (Abb. 3.3C). Die Ratenkonstante stieg annähernd linear mit der ChT-Konzentration, was verdeutlicht, dass die Anpassung mit einem bei $n=2$ festgehaltenen Exponenten zu Ratenkonstanten führte, welche die Oxidation nach einer Reaktion 1. Ordnung beschreiben.

3.1.1.3 Irreversibilität des Inaktivierungsverlustes

Um zu prüfen, ob der Verlust der schnellen Inaktivierung auf reversiblen Vorgängen beruht, wurde ChT in Experimenten analog denen in Abschnitt 3.1.1.2 bei Erreichen von etwa 50% Inaktivierungsverlust durch Badlösung mit 1 mM DTT ausgewaschen.

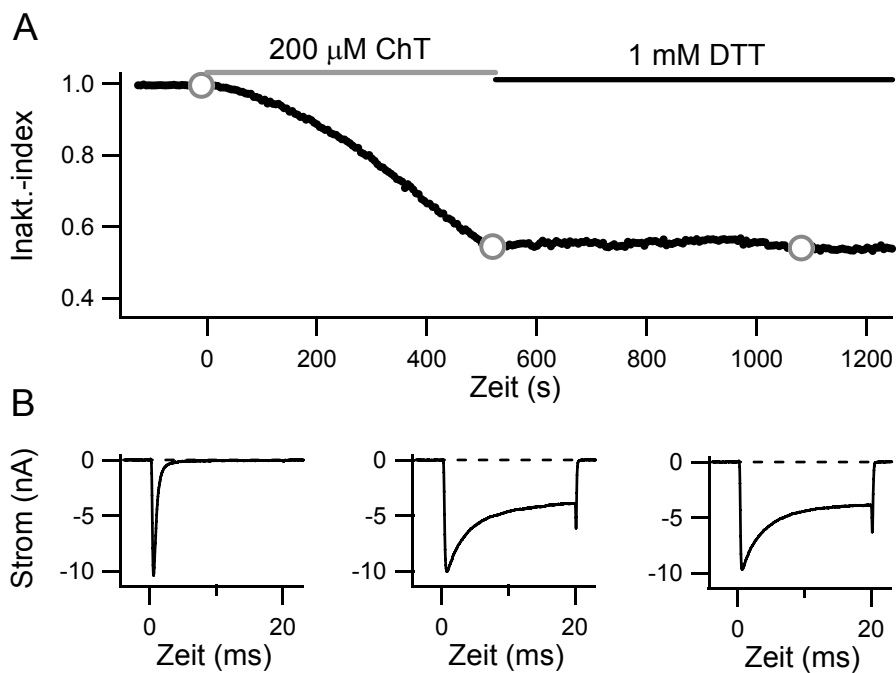


Abbildung 3.4:

Der Verlust der schnellen Inaktivierung durch Oxidation mit Chloramin T ist irreversibel.

A. Inaktivierungsindex von rNav1.4 IFM-L in Abhängigkeit von der Zeit. Die Applikation von ChT und das Waschen mit DTT sind angegeben. **B.** Stromantworten auf Depolarisationen auf -10 mV zu den bei (A) durch weiße Datenpunkte markierten Zeiten (nach Kassmann et al. 2008, verändert).

DTT neutralisiert letzte möglicherweise noch vorhandene Radikale und kann Cysteinreste mit Thiolmodifikationen reduzieren. Wie in Abbildung 3.4A gezeigt, blieb der

Inaktivierungsindex auch für längere Zeit nach dem Auswaschen konstant. Die Stromamplitude ändert sich ebenfalls nicht (Abb. 3.4B). Dieses Verhalten zeigte sich bei jeweils zwei Messungen mit rNav1.4 Wildtyp und IFM-L sowie bei Messungen mit IFM-L und dem intrazellulär applizierten LY. Bei der Oxidation von rNav1.4 mit ChT werden Cysteinreste wahrscheinlich entweder nicht verändert oder die Modifikationen haben keinen Einfluss auf das Inaktivierungsverhalten und die Stromamplitude.

3.1.1.4 Bedeutung der Chloramingruppe für den Inaktivierungsverlust

Für die inhibierende Wirkung von ChT auf die schnelle Inaktivierung der Nav-Kanäle wird ein von der Chloramingruppe ausgehender oxidativer Mechanismus angenommen. Um mögliche Einflüsse anderer Abschnitte des ChT-Moleküls auf den Inaktivierungsverlust beurteilen zu können, wurden analoge Messungen mit para-Toluensulfonsäureamid (p-TSA) durchgeführt. Das sonst strukturgleiche p-TSA besitzt an Stelle der reaktiven N-Cl-Na-Gruppe eine Aminogruppe. In Abbildung 3.5 sind Inaktivierungsverläufe für Experimente, bei denen rNav1.4 IFM-L gegenüber 200 μ M ChT bzw. 2 mM p-TSA exponiert wurde, sowie die Strukturformeln beider Moleküle dargestellt. Drei unabhängige Experimente mit p-TSA, bei denen kein Inaktivierungsverlust auftrat, belegen die Bedeutung der Chloramingruppe von ChT bei der Verursachung des Verlustes der schnellen Inaktivierung der Nav-Kanäle.

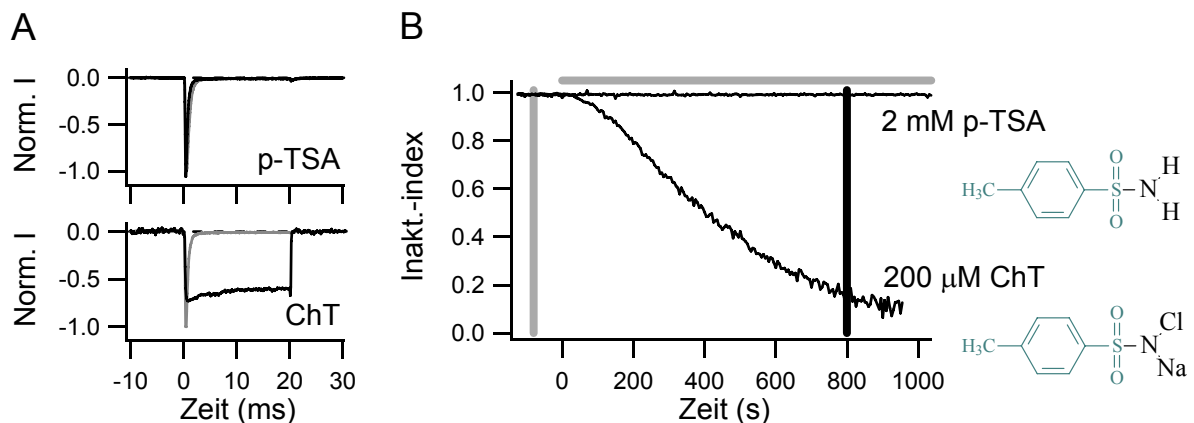


Abbildung 3.5:

Die Chloramingruppe von Chloramin T führt zum Verlust der schnellen Inaktivierung.

A. Stromspuren als Antwort auf Depolarisationen auf -10 mV von rNav1.4 IFM-L vor (grau) und nach Applikation (schwarz) von 2 mM para-Toluensulfonsäureamid (p-TSA) bzw. 200 μ M ChT. **B.** Inaktivierungsindizes mit Applikation von p-TSA bzw. ChT in Abhängigkeit von der Zeit. Die Chloramin- bzw. Aminogruppe ist in den angegebenen Strukturformeln hervorgehoben. Der graue und der schwarze vertikale Balken geben die Zeitpunkte an, von denen die Stromspuren bei (A) stammen. Der horizontale graue Balken kennzeichnet die Gegenwart von ChT bzw. p-TSA.

3.1.2 Einfluss von Chloramin T auf weitere Natriumkanaltypen

Oxidativer Stress spielt in zahlreichen Geweben (Herzmuskulatur, Nervensystem) bei pathophysiologischen Vorgängen eine Rolle. Um die Wirkung von Oxidantien auf Kanäle aus unterschiedlichen Bereichen des Körpers zu vergleichen, wurden die Natriumkanaltypen $rNa_V1.2$ (Zentralnervensystem), $hNa_V1.5$ C373Y (Herzmuskulatur) und $hNa_V1.7$ (peripheres Nervensystem) jeweils analog den bei 3.1.1.2 beschriebenen Messungen untersucht. Im Falle des Herzmuskelkanals wurde die Mutante C373Y verwendet, da bei Wildtypkanälen mit ChT sehr schnell eine Reduktion der Stromamplitude eintrat. Die Inaktivierungseigenschaften der Mutante sind denen des Wildtyps gleich, die Stromamplitude bei C373Y ist jedoch weniger oxidationssensitiv gegenüber ChT. Die Sensitivitäten der Inaktivierung der untersuchten Kanäle auf die Oxidation mit $200 \mu\text{M}$ ChT unterscheiden sich nur geringfügig (Abb. 3.6).

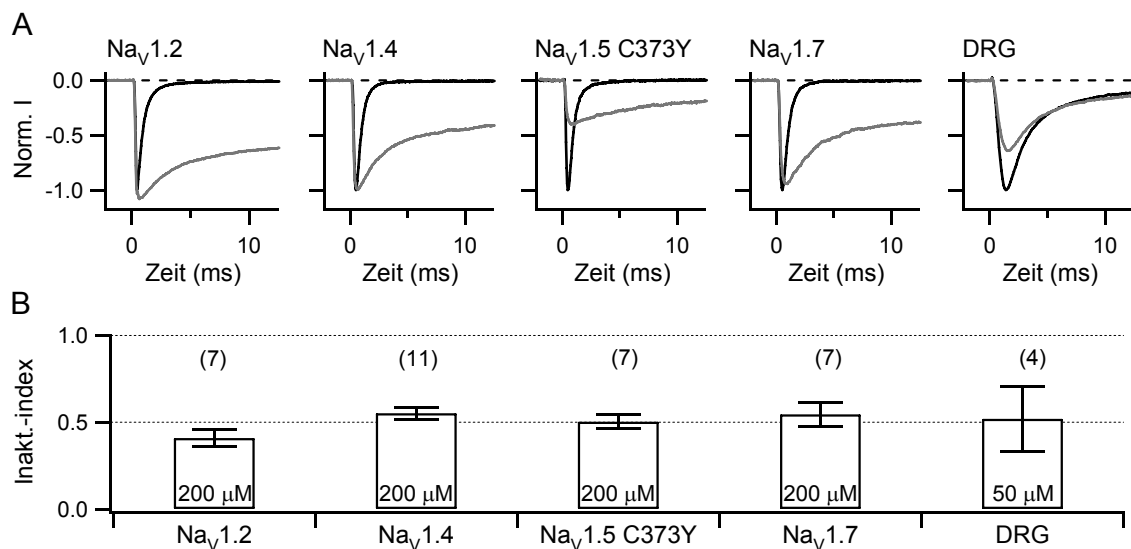


Abbildung 3.6:

Verlust der Inaktivierung bei den Na_V -Kanälen $rNa_V1.2$, $rNa_V1.4$, $hNa_V1.5$ C373Y und $hNa_V1.7$ sowie bei Natriumströmen von DRG-Neuronen.

A. Stromspuren für Depolarisationen von -120 mV auf -10 mV vor (schwarz) und 500 s nach Applikation von $200 \mu\text{M}$ ChT (grau). Die Natriumströme der DRG-Neurone wurden mit Depolarisationen auf -20 mV von einer Haltespannung von -80 mV vor und nach Applikation von $50 \mu\text{M}$ ChT gemessen, die Badlösung enthielt $1 \mu\text{M}$ TTX. **B.** Inaktivierungsindex 500 s nach Applikation (nach Kassmann et al. 2008, verändert). In Klammern ist die Anzahl unabhängiger Experimente angegeben.

Neurone aus Hinterwurzelganglien (*dorsal root ganglia*, DRG) sind wesentlich an der Wahrnehmung von Schmerz (Akopian et al. 1999) und Kälte (Matthews et al. 2006) beteiligt. Als dominierender Na_V -Kanal für TTX-resistente, transiente Ströme bei DRG-Neuronen wird $Na_V1.8$ betrachtet (Wood et al. 2004). Bei einer veränderten Funktion von $Na_V1.8$ können dem Organismus lebenswichtige Schutzmechanismen verloren gehen. $Na_V1.8$ kann in HEK-

293-Zellen nicht zur Expression gebracht werden. Die schnelle Inaktivierung des TTX-resistenten Natriumstroms bei DRG-Neuronen wurde bereits durch 50 μM ChT beeinflusst. Der Inaktivierungsindex 500 s nach Applikation betrug für den DRG-Natriumstrom 0.519 ± 0.185 ($n=4$) gegenüber 0.938 ± 0.025 ($n=5$) bei $r\text{Nav}1.4$. Der Basiswert des Inaktivierungsindex vor der Applikation betrug 0.817 ± 0.056 ($n=7$). Die Natriumströme bei DRG-Neuronen wurden ebenfalls schon durch niedrige Konzentrationen an ChT geblockt (Abbildung 3.6 rechts). Obwohl bei den einzelnen Messungen hohe individuelle Schwankungen auftraten, könnte $\text{Nav}1.8$ gegenüber Oxidantien bezüglich der Inaktivierung und des Maximalstroms deutlich sensitiver sein als $\text{Nav}1.4$.

3.1.3 Identifizierung der oxidationssensitiven Aminosäuren bei $\text{Nav}1.4$

Nach Shechter et al. (1975) werden bei pH-Werten außerhalb des sauren Bereichs durch ChT nur die beiden schwefelhaltigen Aminosäuren Cystein und Methionin oxidiert. Der Inaktivierungsverlust hatte sich bei der Behandlung mit DTT als irreversibel herausgestellt (Abbildung 3.4), was Methioninreste als mögliche Ziele für oxidative Modifikationen mit Einfluss auf das Inaktivierungsverhalten wahrscheinlich macht. In der Sequenz von $r\text{Nav}1.4$ befinden sich 66 Methionine, was eine umfassende mutagenesebasierte Untersuchung unpraktikabel macht. Die quantitativ sehr ähnlichen Effekte von 200 μM ChT auf verschiedene Nav -Kanaltypen ($r\text{Nav}1.2$, $r\text{Nav}1.4$, $h\text{Nav}1.5$ C373Y und $h\text{Nav}1.7$) deuten darauf hin, dass der Effekt auf Strukturen zurück geht, welche zumindest für diese Natriumkanäle konserviert sind. Der Fokus für die weiteren, mutagenesebasierten Untersuchungen wurde dementsprechend auf Methionine gelegt, welche bei allen vier genannten Kanälen auftreten. Stark durch Oxidation beeinflussbare Aminosäuren in der Proteinstruktur, deren Redoxzustand Funktionsparameter eines Kanalproteins beeinflusst, sind ein hohes Risiko für den Organismus, da dieser, beispielsweise bei der Herzkontraktion oder der neuronalen Erregungsleitung, auf die kontrollierte Funktion der Kanäle angewiesen ist. Dass diese Aminosäuren dennoch auftreten, weist auf einen Vorteil hin, der die Risiken überwiegt. Im Fall von Methionin könnte ein solcher Vorteil in der Regulierbarkeit des Redoxzustandes und damit der Kanalfunktion bestehen. Die betreffenden Methionine sollten daher an der intrazellulären Seite des Kanals liegen und für zelluläre Proteine zugänglich sein. Es verblieben im Kernbereich des Kanalproteins (Nummerierung bezogen auf $r\text{Nav}1.4$): M442, M1139, M1154, M1305, M1316, M1469 und M1470 (Abbildung 3.7).

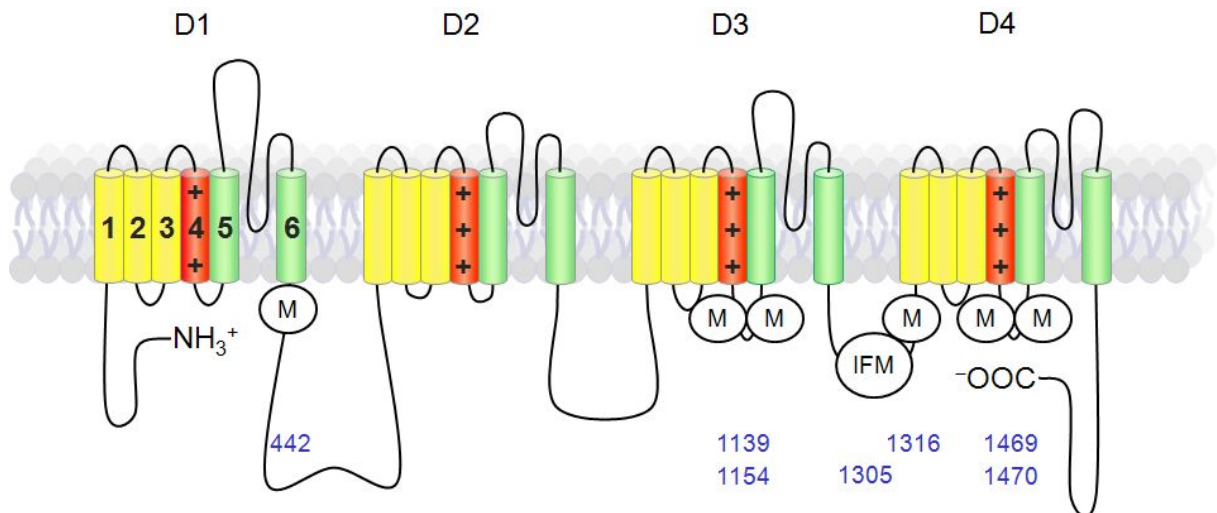


Abbildung 3.7:

Schematische Darstellung eines spannungsgesteuerten Natriumkanals in der Zellmembran.

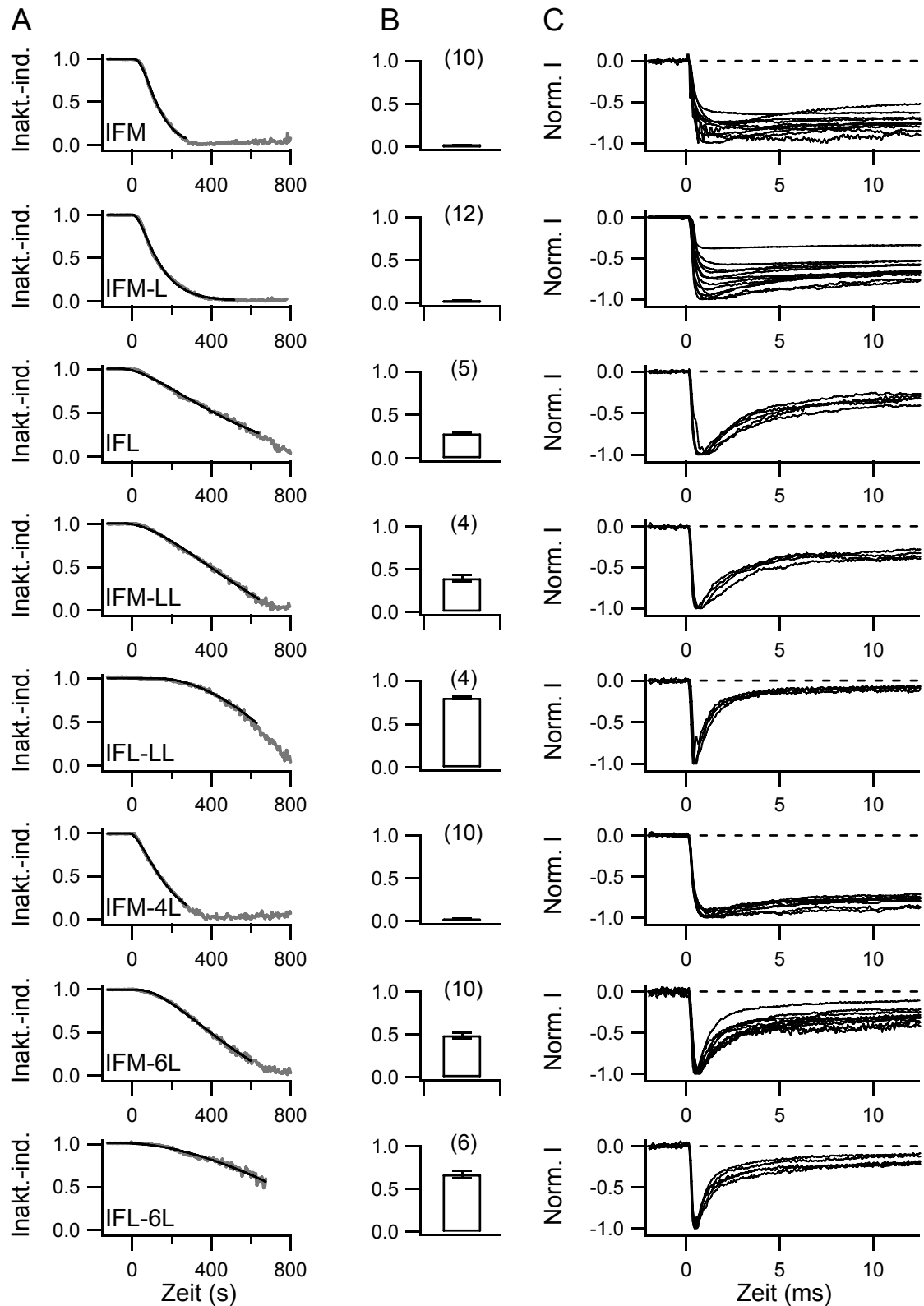
Hervorgehoben sind das IFM-Inaktivierungsmotiv und die weiteren von der intrazellulären Seite zugänglichen, konservierten Methioninreste im Kernbereich des Kanalproteins. Die Zahlen geben die Position der Methioninreste bei rNav1.4 WT an (nach Kassmann et al. 2008, verändert).

Diese Methionine sind auch bei den weiteren bekannten Säugernatriumkanälen mit Ausnahmen bei Nav1.9 (kein M1154) und größeren Abweichungen bei Nav2.1 konserviert. Einige dieser Methioninreste liegen in Abschnitten des Kanals, von denen eine Funktion bei der schnellen Inaktivierung bekannt ist. M1305 ist Bestandteil des IFM-Inaktivierungsmotivs (West et al. 1992, Eaholtz et al. 1994), M1316 liegt unweit davon im Inaktivierungslinker und das Doppel-M-Motiv M1469/M1470 in einem Teil, der als Akzeptor für das IFM-Motiv beim Vorgang der Inaktivierung betrachtet wird (McPhee et al. 1998). Um den Beitrag dieser vier potentiell wichtigen Methioninreste auf die Oxidationssensitivität des Kanals zu untersuchen, wurden sie durch das mit ChT unter physiologischen Bedingungen nicht oxidierbare Leucin ersetzt. Die Mutation M1305L führte zur Mutante IFL, die Mutation von M1316 zu IFM-L und das Ersetzen des Doppel-M-Motivs zu IFM-LL. Um für Vergleiche sowohl mit Kanälen hoher als auch mit solchen niedriger Oxidationssensitivität adäquate Daten zu erhalten, wurden für einige der Kanäle Messungen mit 200 μ M ChT und 1 mM ChT durchgeführt.

Wang & Wang (2002) berichteten, dass das Ersetzen des Methionins im IFM-Motiv durch eine nicht leicht oxidierbare Aminosäure die Oxidationssensitivität unbeeinflusst lässt. In Abb. 3.8 ist gezeigt, dass die entsprechende Mutante IFL in der Tat noch oxidationssensitiv ist, der ChT-induzierte Verlust der Inaktivierung jedoch deutlich langsamer verläuft als beim Wildtypkanal (IFM). Die Zusammenstellung der Stromspuren gemessener Zellen 300 s nach ChT-Applikation zeigt eine geringere Oxidationssensitivität von IFL verglichen mit dem Wildtypkanal (Abb. 3.8C). Ab einer Konzentration von 200 μ M ChT konnte mit rNav1.4 WT

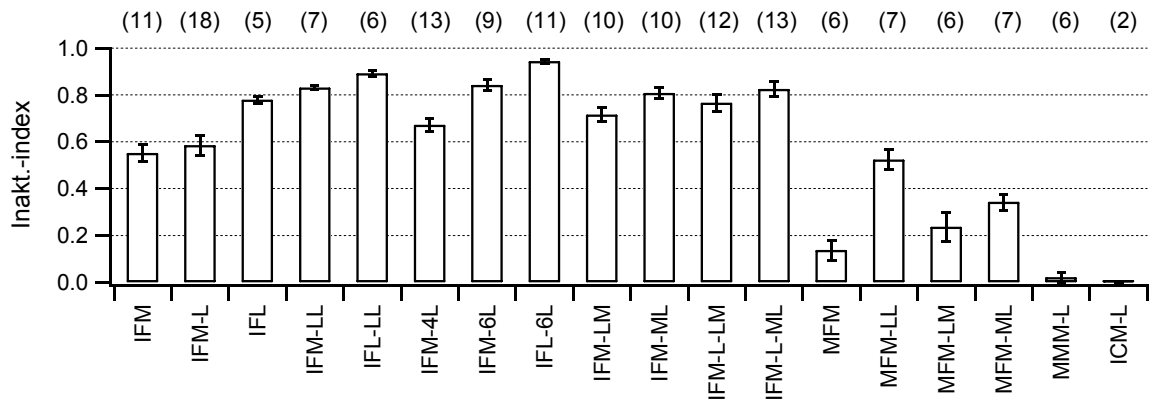
nach ca. 25 min Expositionsdauer ein vollständiger Verlust der schnellen Inaktivierung beobachtet werden. Für die Anpassung der Inaktivierungsverläufe wurde deshalb angenommen, dass bei allen Kanälen letztlich ein vollständiger Verlust der Inaktivierung auftritt. Beispielhafte zeitliche Verläufe des Inaktivierungsindex für jeweils eine Zelle und die Inaktivierungsindizes 500 s nach Beginn der Applikation sind für die Messungen mit 1 mM ChT in Abbildung 3.8A und B gezeigt. Die Inaktivierungsindizes 500 s nach Applikation von 200 μ M ChT sind in Abb. 3.9 dargestellt. Die exakten Werte der Zeitkonstanten und Inaktivierungsindizes wurden in den Tabellen A.2-A.7 (Anhang) für mehrere ChT-Konzentrationen zusammengestellt. Dass die Mutation M1305L die Oxidationssensitivität nicht beseitigt, führte zur Vermutung, dass weitere Methioninreste zur Sensitivität beitragen. Daher wurden die Mutanten IFM-L und IFM-LL untersucht. IFM-L war vom Wildtypkanal bezüglich der Oxidationssensitivität nicht zu unterscheiden. Dies gilt für den gesamten in Abbildung 3.3A dargestellten Bereich (Daten sind für 200 μ M und 1 mM ChT gezeigt). Die Mutante IFM-LL führt quantitativ zu einem vergleichbaren Resultat wie IFL, die Sensitivität der schnellen Inaktivierung gegenüber Oxidation ist ebenfalls nicht vollständig beseitigt.

Aus diesem Grund wurde eine Kombinationsmutante aus IFL und IFM-LL konstruiert: IFL-LL. Die Sensitivität von IFL-LL gegenüber Oxidation mit ChT ist gegenüber IFL und IFM-LL signifikant erhöht (mit 1 mM ChT $p < 0.001$ gegenüber beiden Ausgangsmutanten). Mit IFL-LL tritt selbst bei Applikation von 200 μ M ChT ein Verlust der schnellen Inaktivierung auf (Abb. 3.9), was die Frage nach dem Einfluss der verbleibenden drei Methionin-Reste aufwirft. Um den Beitrag von M442, M1139 und M1154 auf die Oxidationssensitivität von rNav1.4 beurteilen zu können, wurden diese drei Reste im Hintergrund von IFM-L durch Leucin ersetzt, was zur Mutante IFM-4L als Gegenstück zu IFL-LL führte. IFM-4L ist mit 1 mM ChT geringfügig, nicht signifikant weniger sensitiv gegenüber Oxidation mit ChT als der Wildtypkanal, was einen geringen gemeinsamen Einfluss von M442, M1139 und M1154 impliziert. Bestätigt wird dieses Ergebnis durch die Kombinationsmutante aus IFM-4L und IFM-LL, bei welcher alle in Abb. 3.7 dargestellten Methioninreste mit Ausnahme des Methionins im IFM-Motiv durch Leucin ersetzt sind. Diese als IFM-6L bezeichnete Mutante zeigte eine vergleichbare Oxidationssensitivität wie IFM-LL. Die Mutante IFL-6L, bei der alle in Betracht gezogenen Methionine ersetzt sind, zeigte gegenüber IFM-6L eine verringerte Oxidationssensitivität. IFL-6L ist auch im Vergleich mit IFL-LL weniger empfindlich gegenüber ChT. Es tritt jedoch noch immer ein Inaktivierungsverlust auf, was verdeutlicht, dass weitere Mechanismen beteiligt sein müssen.

**Abbildung 3.8:**

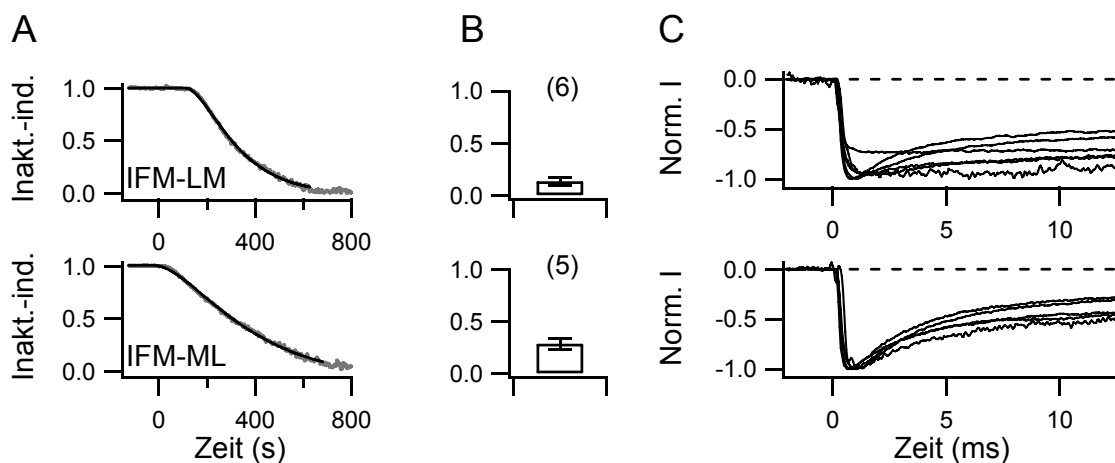
Einfluss von Methioninmutationen auf den Effekt von Chloramin T.

A. Beispiele für den Verlust der Inaktivierung durch 1 mM ChT (grau) und überlagerte Anpassungen nach Gleichung 2.5 (schwarz) für $r\text{Nav}1.4$ Wildtyp und die angegebenen Mutanten. Die Applikation erfolgte jeweils zu $t=0$ s. **B.** Inaktivierungsindex (Mittelwert) 500 s nach Applikation von 1 mM ChT. Die Anzahl unabhängiger Experimente ist jeweils in Klammern angegeben. **C.** Überlagerte Stromspuren verschiedener Zellen 300 s nach Applikation von 1 mM ChT (nach Kassmann et al. 2008, verändert).

**Abbildung 3.9:**

Inaktivierungsindizes von $r\text{Nav}1.4$ und Mutanten 500 s nach Applikation von 200 μM ChT. In Klammern ist die Anzahl unabhängiger Experimente angegeben (nach Kassmann et al. 2008, verändert).

Mit den bisher vorgestellten Mutanten war die Beurteilung des Einzelbeitrages der Methioninreste M1305 und M1316 zur Oxidationssensitivität möglich. Bei den Methioninen M442, M1139 und M1154 hatte sich der gemeinsame Beitrag zum Inaktivierungsverlust bei Oxidation als gering herausgestellt. Offen blieb die Einzelbeurteilung der Methionine im Doppel-M-Motiv des S4-S5-Verbindungsstücks in Domäne 4. Um den individuellen Einfluss von M1469 und M1470 auf die Oxidationssensitivität von $r\text{Nav}1.4$ untersuchen zu können, wurden die entsprechenden Einzelmutanten LM und ML (Filatov et al. 1998) erstellt und in den Hintergrund des Wildtypkanals und von IFM-L eingefügt. Sowohl mit 200 μM als auch mit 1 mM ChT zeigte sich eine geringere Sensitivität von IFM-ML (Abb. 3.9 und 3.10).

**Abbildung 3.10:**

Einfluss weiterer Methioninmutationen auf den Effekt von Chloramin T.

A. Beispiele für den Verlust der Inaktivierung durch 1 mM ChT (grau) und überlagerte Anpassungen nach Gleichung 2.5 (schwarz) für $r\text{Nav}1.4$ Wildtyp und die angegebenen Mutanten. Die Applikation erfolgte jeweils zu $t=0$ s. B. Inaktivierungsindex (Mittelwert) 500 s nach Applikation von 1 mM ChT. Die Anzahl unabhängiger Experimente ist jeweils in Klammern angegeben. C. Überlagerte Stromspuren verschiedener Zellen 300 s nach Applikation von 1 mM ChT (nach Kassmann et al. 2008, verändert).

Bei 200 μM ChT ist der Unterschied zwischen den Werten für IFM-LM und IFM-ML signifikant ($p < 0.05$). IFM-L-ML ist geringfügig, nicht signifikant weniger sensitiv gegenüber 200 μM ChT als IFM-L-LM. Der Einfluss von M1470 auf den oxidativen Verlust der Inaktivierung ist größer als der von M1469.

3.1.4 Einfluss von Chloramin T auf die Rückkehr von der schnellen Inaktivierung

Bei IFM-L nahm die nach Gleichung 2.4 ermittelte Zeitkonstante der Rückkehr von der schnellen Inaktivierung im Verlaufe des Oxidationsprozesses mit 200 μM ChT signifikant ab ($p < 0.05$ nach 300 s), die Rückkehr von der Inaktivierung erfolgte schneller. Dies unterstützt die Vorstellung der Stabilisierung des inaktivierten Zustandes durch hydrophobe Wechselwirkungen, welche durch oxidative Modifikation gestört werden. Bei IFL und IFM-LL trat eine geringe, nicht signifikante Verringerung der Zeitkonstante der Rückkehr aus der Inaktivierung auf (Abb. 3.11A). In Tabelle A.20 (Anhang) sind die Daten zusammengefasst.

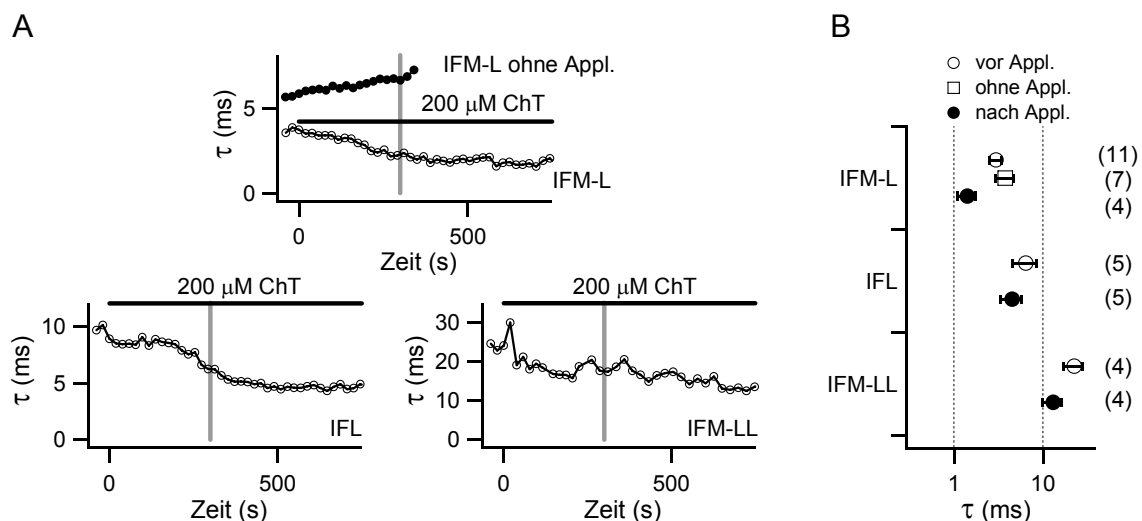


Abbildung 3.11

Einfluss von Chloramin T auf die Rückkehr von der schnellen Inaktivierung bei Mutanten von $r\text{Nav}1.4$.

A. Veränderung der Zeitkonstante der Rückkehr von der schnellen Inaktivierung in Abhängigkeit von der Expositionsdauer für die angegebenen Mutanten. Die Gegenwart von ChT ist durch einen horizontalen schwarzen Balken angezeigt. **B.** Zeitkonstante der Rückkehr von der schnellen Inaktivierung vor (weiße Kreise) und 300 s nach Applikation von 200 μM ChT (schwarze Kreise). Für IFM-L ist zusätzlich der Wert nach 300 s ohne Applikation angegeben (weißes Quadrat). In Klammern steht die Anzahl unabhängiger Experimente. Der Zeitpunkt für die Daten ist bei (A) jeweils durch einen vertikalen grauen Balken angezeigt.

Die Zeitkonstanten von IFL und IFM-LL im unoxidierten Zustand sind höher als die von IFM-L (Abbildung 3.11B). Der Unterschied zwischen IFM-L und IFM-LL ist signifikant ($p < 0.05$). Möglicherweise wird der inaktivierte Zustand durch das hydrophobere Leucin an den betreffenden Stellen stärker stabilisiert als durch Methionin.

3.1.5 Unterschiede spannungsgesteuerter Natriumkanäle bei Säugern und Insekten

Der spannungsgesteuerte Natriumkanal bei Insekten, *para*, beispielsweise bei *Drosophila sp.*, besitzt an Stelle des Doppel-Methionin-Motivs im S4-S5-Verbindungsstück in Domäne 4 die Aminosäuresequenz AM (siehe Abb. 3.12). Bei *para* ist also nur das Methionin konserviert, welches bei Säugerkanälen die höhere Sensitivität vermittelt. Ein weiterer prägnanter Unterschied von *para* zu Säuger-Nav-Kanälen ist das Inaktivierungsmotiv MFM statt IFM (Abb. 3.12). Eine mögliche Kompensation für das fehlende Methionin im Doppel-M-Motiv bei *para* durch das zusätzliche Methionin im Inaktivierungsmotiv ist unwahrscheinlich, da sich herausgestellt hatte, dass bei Säuger-Kanälen M1470 den weitaus größeren Einfluss auf die Oxidationssensitivität hat. Damit könnte *para* im Vergleich zu Säuger-Nav-Kanälen über ein zusätzliches relevantes Methionin verfügen und wäre damit möglicherweise sensitiver gegenüber Oxidation.

Da *para* derzeit einer Expression in Säugerzellen nicht zugänglich ist, wurde die Mutante rNav1.4 I1303M (MFM) erzeugt und außerdem, um die Wechselwirkungen mit dem Akzeptor beurteilen zu können, in den Hintergrund von LM, ML und LL eingebracht. Die Oxidationssensitivität von MFM war gegenüber der des Wildtypkanals deutlich erhöht ($p < 0.001$ für den Inaktivierungsindex 500 s nach Applikation von 200 μM ChT). Das Einbringen von LL kompensiert die erhöhte Sensitivität. MFM-LM hingegen ist signifikant sensitiver als der Wildtyp ($p < 0.05$). Damit besteht die Möglichkeit, dass *para* tatsächlich empfindlicher auf oxidativen Stress reagiert als rNav1.4. Auch mit dem Inaktivierungsmotiv MFM zeigte sich der größere Einfluss von M1470 gegenüber M1469 auf den Verlust der schnellen Inaktivierung (Abb. 3.9).

		rNav1.4: 1298	rNav1.4: 1311	rNav1.4: 1461	rNav1.4: 1478
Nav1.2	<i>Rattus norvegicus</i>	FGGQ D IFM TEEQKK		IRTLFAL MM SLPALFNI	
Nav1.4		FGGK D IFM TEEQKK		IRTLFAL MM SLPALFNI	
Nav1.5	<i>Homo sapiens</i>	LGGQ D IFM TEEQKK		IRTLFAL MM SLPALFNI	
Nav1.7		LGGQ D IFM TEEQKK		IRTLFAL MM SLPALFNI	
<i>para</i>	{	<i>D. melanogaster</i>	AGGSLE MFM TEDQKK	IRTLFAL A MSLPALFNI	
		<i>Musca domestica</i>	AGGSLE MFM TEDQKK	IRTLFAL A MSLPALFNI	
		<i>Culex pipiens</i>	AGGSLE MFM TEDQKK	IRTLFAL A MSLPALFNI	
		<i>Anopheles gambiae</i>	AGGSLE MFM TEDQKK	IRTLFAL A MSLPALFNI	

Abbildung 3.12:

Übersicht der Aminosäuresequenzen spannungsgesteuerter Natriumkanäle im Bereich des IFM-Inaktivierungsmotivs und des Verbindungsstückes zwischen den Segmenten S4 und S5 der Domäne 4. Links sind die Bezeichnungen der Kanäle und die Herkunftsart angegeben. Das IFM-Motiv (mitte) und das Doppel-Methionin-Motiv (rechts) bei Säugerkanälen bzw. das MFM-Motiv und das Alanin-Methionin-Motiv bei Insektenkanälen sind hervorgehoben.

3.1.6 Kanalmutanten mit gesteigerter Sensitivität

Wie in Abb. 3.9 gezeigt, weist die Mutante rNa_v1.4 MFM gegenüber dem Wildtypkanal eine erhöhte Sensitivität des Inaktivierungsverlustes mit 200 µM ChT auf. Mit dem Ziel, zu untersuchen, ob die Sensitivität der Inaktivierung von Na_v-Kanälen gegenüber Oxidantien noch über das Niveau von MFM hinaus gesteigert werden kann, wurden in der Arbeitsgruppe Mutanten mit einer größeren Anzahl leicht oxidierbarer Aminosäuren im Inaktivierungsmotiv erstellt. Der bekannte große Einfluss des IFM-Inaktivierungsmotivs auf die schnelle Inaktivierung prädestinierte diesen Kanalabschnitt für mutagenesebasierte Veränderungen zur Steigerung der Oxidationssensitivität. Modifikationen am IFM-Motiv wirken sich auf die Wechselwirkung mit allen Teilen des Akzeptors aus und können einen starken Effekt auf die Inaktivierung ausüben (Smith & Goldin 1997).

Bei MMM-L befindet sich an allen drei Positionen des Inaktivierungsmotivs Methionin. Der Inaktivierungsindex für rNa_v1.4 MMM-L 500 s nach Applikation von 200 µM ChT war nahe null (Abb. 3.9). Werden Aminosäurereste im Inaktivierungsmotiv durch Cystein ersetzt, können noch oxidationssensitivere Kanäle entstehen. ICM-L hatte 500 s nach Applikation von 200 µM ChT die schnelle Inaktivierung bereits völlig verloren (Abbildung 3.9). Der Inaktivierungsverlust von rNa_v1.4 MMM-L und rNa_v1.4 ICM-L war unter diesen Bedingungen signifikant höher als der von rNa_v1.4 MFM.

Zur besseren Beurteilung der Sensitivität wurden Messungen mit 50 µM ChT durchgeführt. In Abb. 3.13A wird deutlich, dass auch mit dieser geringeren Konzentration an ChT die Inaktivierung bei MMM-L wesentlich schneller verloren ging, als bei rNa_v1.4 WT bzw. der direkten Kontrolle rNa_v1.4 IFM-L. Der Inaktivierungsverlust bei rNa_v1.4 ICM-L erfolgte innerhalb von zwei Minuten. Die Inaktivierung war bereits vor der Applikation von ChT unvollständig. Der Anteil des persistenten Stroms ist in Tabelle A.9 (Anhang) angegeben. Für ICM-L konnte der native persistente Strom mit 1 mM DTT in der Pipettenlösung nicht verringert werden (Abb. 3.13B). Damit kommt die Oxidation des Cysteins im Inaktivierungsmotiv bei einem Teil der Kanäle vor Beginn der Messungen als Ursache nicht in Frage oder ist auf Grund sterischer Gegebenheiten bei den betroffenen Kanälen nicht reversibel.

Für rNa_v1.4 IFC-L, eine weitere Mutante mit Cystein im Inaktivierungsmotiv, wurden Messungen mit H₂O₂ durchgeführt. 500 s nach Applikation von 100 µM H₂O₂ betrug der Inaktivierungsindex 0.959 ± 0.001 (n=4). Bei den Daten mit 1 mM H₂O₂ war eine Anpassung

mit einem festen Exponenten von zwei nicht sinnvoll möglich. Die Anpassung mit variablem Exponenten ergab einen Inaktivierungsindex von 0.783 ± 0.020 ($n=4$), der Exponent lag mit 0.897 ± 0.039 deutlich unter zwei. Der Inaktivierungsverlust war mit DTT reversibel (Abb. 3.13C).

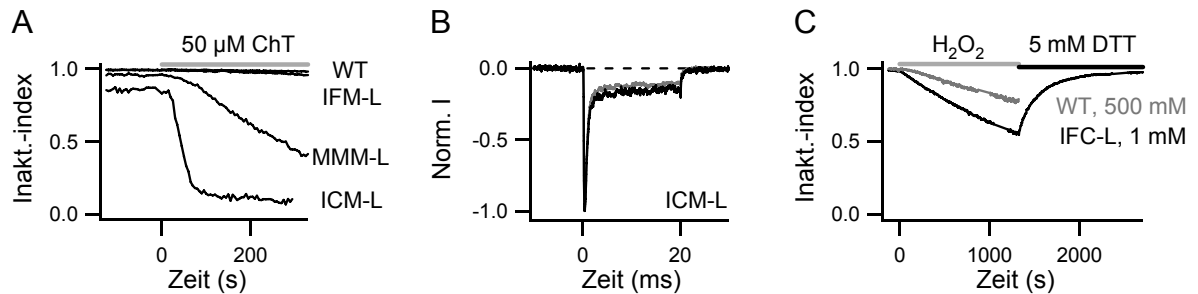


Abbildung 3.13:

Inaktivierungsverlust bei Na_V -Kanalmutanten mit erhöhter Sensitivität.

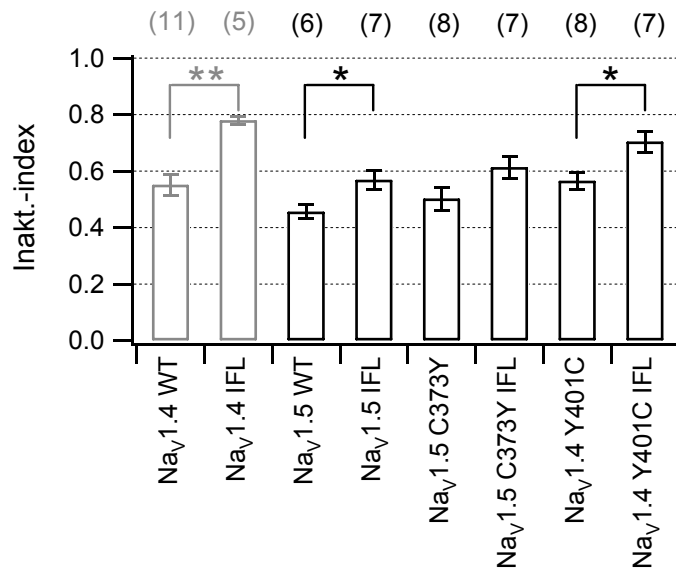
A. Inaktivierungsindizes nach Applikation von $50 \mu\text{M}$ ChT in Abhängigkeit von der Zeit für die angegebenen Kanäle. Der horizontale graue Balken kennzeichnet die Gegenwart von ChT. **B.** Stromspuren von ICM-L als Antwort auf eine Depolarisation auf -10 mV ohne DTT (grau) und in Gegenwart von 1 mM DTT (schwarz) in der Pipettenlösung. **C.** Zeitlicher Verlauf der Inaktivierungsindizes von IFC-L nach Applikation von 1 mM H_2O_2 und von rNav1.4 WT nach Applikation von 500 mM H_2O_2 . Aus der Reversibilität des Inaktivierungsverlustes bei nachfolgender Applikation von DTT kann geschlossen werden, dass der beobachtete Effekt auf das Cystein im IFC-Motiv zurückgeht.

Die Resultate der Oxidationsexperimente mit den Mutanten MMM-L, ICM-L und IFC-L ergaben, dass Kanäle mit einer im Vergleich zum Wildtypkanal und sogar zu MFM deutlich erhöhten Oxidationssensitivität konstruiert werden können. Die Möglichkeit, den Inaktivierungsverlust in Echtzeit sehr präzise zu messen, könnte die Verwendung dieser hochsensitiven Kanäle als ROS-Sensoren ermöglichen.

3.1.7 Der Einfluss des Inaktivierungsmotivs bei weiteren Kanälen

Um zu untersuchen, ob der Einfluss des Methionins im IFM-Motiv auf die Oxidationssensitivität der schnellen Inaktivierung des Kanals eine spezifische Eigenschaft bei rNav1.4 oder eine verbreitete Eigenschaft ist und evtl. sogar universellen Charakter besitzt, wurde die Mutation IFL (M1487L) bei hNav1.5 erzeugt.

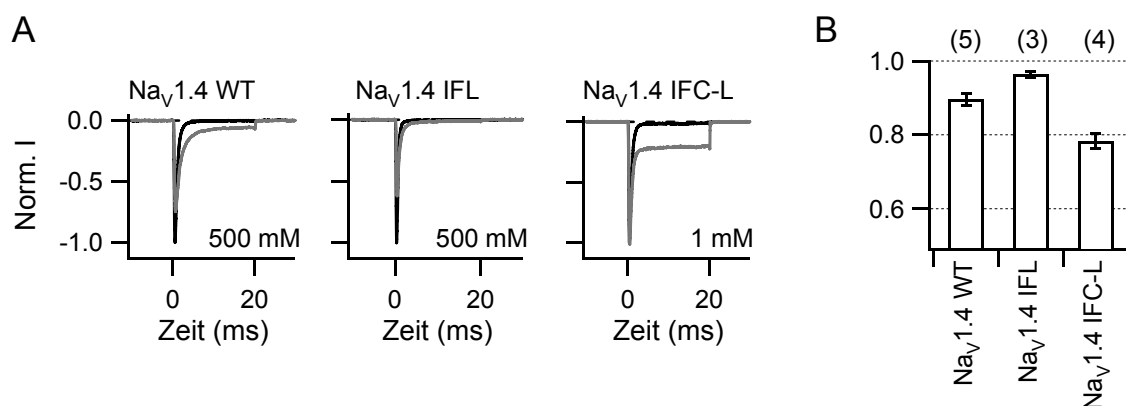
Für spätere Untersuchungen zum Stromverlust durch Oxidantien war es bei weiteren Kanälen nötig, den Verlust der Inaktivierung zu minimieren. Daher wurde die Mutation IFL auch in hNav1.5 C373Y und rNav1.4 Y401C eingebracht. Bei allen vier Kanälen wird durch IFL die Sensitivität des Verlustes an schneller Inaktivierung gegenüber $200 \mu\text{M}$ ChT verringert (Abb. 3.14). Für rNav1.4 , hNav1.5 und rNav1.4 Y401C sind die Unterschiede signifikant.

**Abbildung 3.14:**

Bedeutung der IFL-Mutation bei verschiedenen Na_v-Kanälen und Mutanten.

Dargestellt sind die Inaktivierungsindizes 500 s nach Applikation von 200 μM ChT. Für rNa_v1.4 WT und rNa_v1.4 IFL wurden die Daten zu Beginn als Vergleich in grau eingefügt. Die Signifikanz der Unterschiede ist mit Sternen angegeben: ein Stern: p<0.05, zwei Sterne: p<0.001. Die Anzahl unabhängiger Experimente ist in Klammern angegeben.

Dass der Verlust der schnellen Inaktivierung und der Einfluss des Methionins im Inaktivierungsmotiv auf die Sensitivität der Inaktivierung keine Phänomene sind, welche allein durch ChT vermittelt werden, wurde an Hand elektrophysiologischer Messungen mit Applikation einer weiteren oxidierenden Substanz, Wasserstoffperoxid (H₂O₂), geprüft.

**Abbildung 3.15:**

Einfluss des Inaktivierungsmotivs auf die Sensitivität der Inaktivierung spannungsgesteuerter Natriumkanäle gegenüber Wasserstoffperoxid.

A. Normierte Stromspuren der angegebenen Na_v-Kanäle als Antwort auf depolarisierende Pulse auf -10 mV vor (schwarz) und 500 s nach Applikation der angegebenen Konzentration H₂O₂ (grau). Normiert wurde auf den Spitzenstrom vor Applikation. **B.** Inaktivierungsindizes der Na_v-Kanäle von (A) 500 s nach Applikation von 500 mM (1.5%) bzw. 1 mM H₂O₂. In Klammern ist die Anzahl unabhängiger Experimente angegeben.

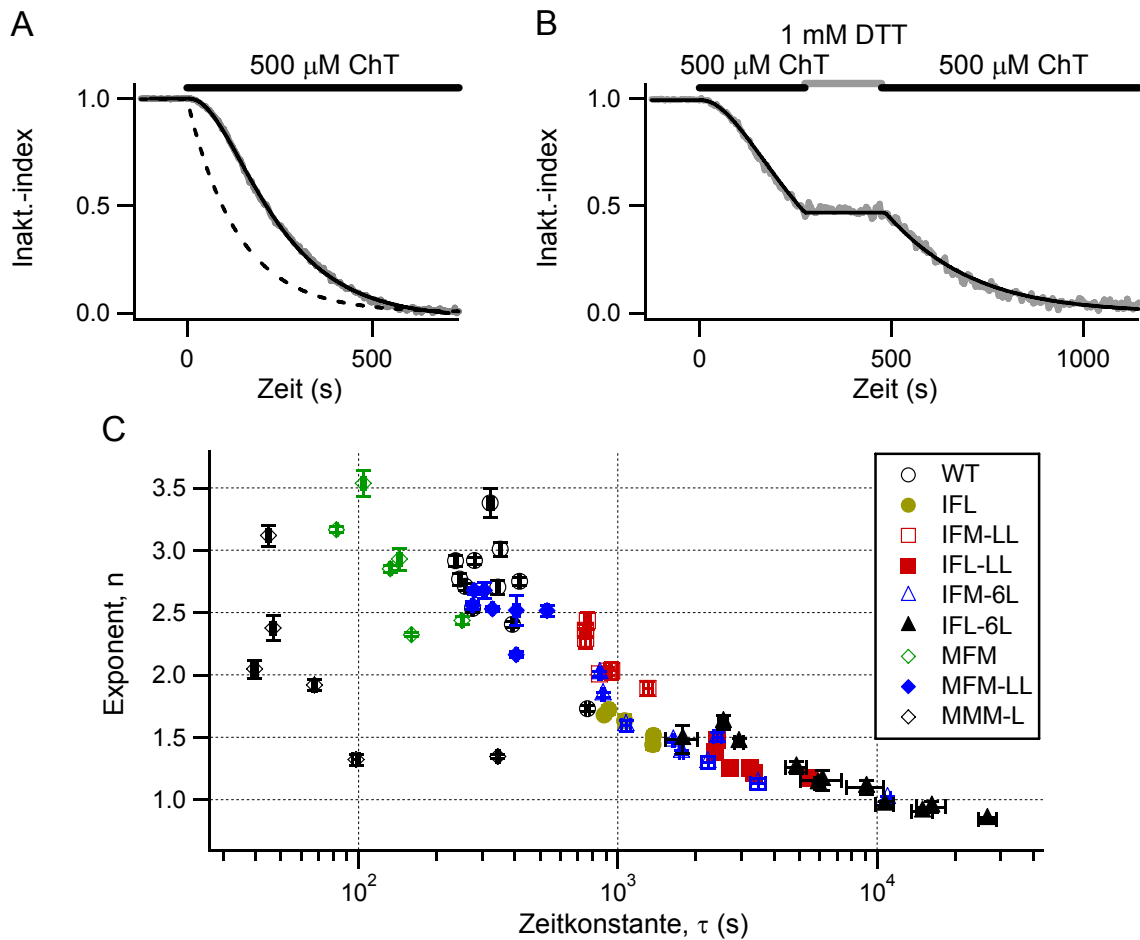
Im Experiment wurden rNa_v1.4 Wildtyp und rNa_v1.4 IFL 1.5% (500 mM) H₂O₂ ausgesetzt. Mit der angegebenen Konzentration H₂O₂ tritt bei den untersuchten Kanälen ein fortschreitender Verlust der schnellen Inaktivierung auf. Trotz der unphysiologisch hohen Konzentration an H₂O₂ erfolgte der Inaktivierungsverlust langsamer als mit 200 μM ChT. Die

Sensitivität von rNav1.4 IFL gegenüber 1.5% H₂O₂ war signifikant geringer als beim Wildtypkanal ($p < 0.05$). Bei der Mutante rNav1.4 IFC-L trat Inaktivierungsverlust bereits mit deutlich niedrigerer H₂O₂-Konzentration auf (Abbildung 3.15).

3.1.8 Analyse der Kinetik des Inaktivierungsverlustes

Bei Oxidationsexperimenten mit ChT zeigte sich ein sigmoidaler Verlauf der Datenpunkte für den Inaktivierungsparameter in Abhängigkeit von der Zeit nach Beginn der Oxidationsphase. ChT, welches bereits mehrere Stunden in externer Lösung gelöst war, zeigte nur eine geringe Abnahme der Aktivität. Mit der Annahme, dass sich die Konzentration der durch ChT gebildeten Radikale während der Dauer der Oxidationsreaktionen nur vernachlässigbar ändert, würde die Reaktionsgeschwindigkeit ausschließlich von den Methioninresten des Kanals, welche Einfluss auf die schnelle Inaktivierung haben, abhängen. Bei einer solchen Reaktion pseudo-erster Ordnung ließe sich der Inaktivierungsindex (als Maß für die Konzentration unoxidiertes Methionine) mit einer einfach-exponentiellen Gleichung beschreiben. In Abbildung 3.16A wird deutlich, dass die Anpassung mit einer solchen Funktion den Datenverlauf nicht adäquat widerspiegelt. Mit der Einführung einer zusätzlichen Variablen, des Exponenten n , was zu Gleichung 2.5 führt, kann der Verlauf des Inaktivierungsindex beschrieben werden.

Ursachen für den sigmoidalen Verlauf des Inaktivierungsverlustes könnten substanzspezifische Faktoren, wie eine Verzögerung bei der Bildung der Radikale oder Diffusionsbarrieren, sein. Dadurch würde die in einem Experiment maximal mögliche Radikalkonzentration direkt an den Kanalproteinen zeitlich verzögert zur Applikation erreicht. Die Sigmoidizität könnte auch als Charakteristikum des Kanalproteins im Mechanismus des Inaktivierungsverlustes, beispielsweise der Notwendigkeit multipler Oxidationsschritte, begründet sein. Zur Unterscheidung zwischen substanz- und kanalspezifischen Ursachen wurde der Oxidationsprozess bei circa 50% Inaktivierungsverlust nach Applikation von ChT durch Spülen mit DTT-haltiger externer Lösung abgestoppt. Nach wenigen Minuten wurde frische ChT-Lösung zugegeben. Der Verlauf des Inaktivierungsindex ist in Abb. 3.16B dargestellt. An Hand einer überlagerten Anpassung nach Gleichung 2.5, welche das Intervall ohne Oxidantien berücksichtigt, lässt sich erkennen, dass die Veränderung des Inaktivierungsindex nach der Pause so weiterläuft, wie sie davor geendet hat. Der Verlauf des Inaktivierungsindex für den zweiten Oxidationsschritt weist, separat betrachtet, keinen sigmoidalen Verlauf auf.

**Abbildung 3.16:**

Sigmoidizität beim Inaktivierungsverlust durch Chloramin T.

A. Zeitlicher Verlauf des Inaktivierungsindex von $r\text{Nav}_{1.4}$ mit $500 \mu\text{M}$ ChT (grau). Die gestrichelte schwarze Linie stellt eine einfach-exponentielle Anpassung dar (Gleichung 2.5 ohne den Exponenten n), die durchgehende schwarze Kurve verdeutlicht eine Anpassung nach Gleichung 2.5. **B.** Zeitlicher Verlauf des Inaktivierungsindex von IFM-L bei unterbrochener Präsenz von $500 \mu\text{M}$ ChT. Zwischen den beiden Oxidationsphasen wurde mit 1 mM DTT gewaschen. Die schwarze Kurve stellt eine Anpassung unter der Annahme dar, dass der Inaktivierungsverlust bei der zweiten Applikation von ChT mit der gleichen Kinetik fortläuft wie zum Ende der ersten oxidativen Phase. Exponent $n = 2.34$, Zeitkonstante $\tau = 192 \text{ s}$. Vergleichbare Ergebnisse wurden in jeweils zwei weiteren Experimenten mit $r\text{Nav}_{1.4}$ IFM-L und $r\text{Nav}_{1.4}$ WT mit $500 \mu\text{M}$ ChT sowie in 9 Experimenten mit $r\text{Nav}_{1.4}$ IFM-L und 1 mM Lucifer Yellow (LY) erzielt. Bei Messungen mit LY, welches in der Pipettenlösung enthalten und daher ständig präsent war, wurden die Phasen mit Oxidation durch Einschalten der Lichtquelle realisiert. In Phasen ohne Oxidation war die Lichtquelle nicht aktiv. **C.** Ergebnisse der zeitlichen Verläufe von Inaktivierungsindizes bei Oxidation mit $200 \mu\text{M}$ ChT sind nach Gleichung 2.5 angepasst und mit ihren individuellen Fehlerwerten dargestellt: Exponent n als Maß für die Sigmoidizität gegen die Zeitkonstante τ (nach Kassmann et al. 2008, verändert).

Bei der Anpassung der Datenpunkte in Abbildung 3.16 wurde der Exponent n , der den Grad an Sigmoidizität beschreibt, nicht festgehalten. Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse aus verschiedenen Messreihen zu ermöglichen, wurde für die Ermittlung der Inaktivierungsindizes bei der Anpassung nach Gleichung 2.5 der Exponent sonst stets bei $n=2$ fixiert, wenn nicht anders angegeben. Die meisten mit $r\text{Nav}_{1.4}$ WT bzw. $r\text{Nav}_{1.4}$ IFM-L mit $200 \mu\text{M}$ ChT gewonnenen Datenreihen ließen sich damit gut beschreiben. Bei höheren ChT-

Konzentrationen und bei anderen Kanälen konnte die Anpassung jedoch deutlich verbessert und die beinhaltete Zeitspanne erhöht werden, wenn der Exponent offen gelassen wurde. Die Anpassung mit $n=2$ war umso schwieriger, je weiter der Exponent bei der freien Anpassung von zwei abwich. Die frei angepassten Exponenten für einzelne Messungen sind in Abbildung 3.16C gegen die zugehörigen Zeitkonstanten (τ) aufgetragen. Die Werte der Zeitkonstanten für den Verlust an schneller Inaktivierung für $rNa_v1.4$ mit $200 \mu\text{M}$ ChT streuen im Wesentlichen zwischen 230 s und 420 s. Wie in den Abschnitten 3.1.3 und 3.1.5 bis 3.1.7 für die Anpassung mit einem bei zwei festgehaltenem Exponenten beschrieben, zeigen sich auch hier für die angegebenen Mutanten, bei denen Methionin durch Leucin ersetzt wurde, in unterschiedlichem Maße höhere Zeitkonstanten. Der Inaktivierungsverlust bei MFM und MMM-L erfolgt schneller, der bei MFM-LL ähnlich schnell wie bei $rNa_v1.4$ -Wildtypkanälen. Für $rNa_v1.4$ WT liegen die meisten Werte für frei angepasste Exponenten zwischen 2.5 und 3. Je mehr relevante Methionine bei einer Mutante durch Leucin ersetzt sind und je weiter sich ihre Sensitivität gegenüber ChT damit verringert, desto mehr nähern sich die Werte für die Exponenten eins an. Eine mögliche Erklärung ist, dass der Exponent n die Anzahl der Stellen am Kanal beschreibt, die zum Verlust der schnellen Inaktivierung verändert werden müssen.

3.1.9 Aktivität von Methioninsulfoxidreduktasen an spannungsgesteuerten Natriumkanälen

In Abschnitt 3.1.3 konnte gezeigt werden, dass die oxidative Modifikation bestimmter Methionine bei $rNa_v1.4$ einen starken Einfluss auf die schnelle Inaktivierung hat. Damit wäre eine Regulation der Kanalfunktion über den Oxidationszustand dieser Methionine denkbar. Eine Bedeutung von Methioninresten für die Enzymregulation wird beispielsweise von Vogt (1995), Kuschel et al. (1999) und Stadtman et al. (2002) vermutet. Methioninsulfoxidreduktasen (MSRs) sind in der Lage, Methioninsulfoxid innerhalb von Proteinen zu Methionin zu reduzieren (Weissbach et al. 2002). Diesen Enzymen würde damit bei einer methioninbasierten Regulation eine Schlüsselrolle zukommen.

Die schnelle Inaktivierung von Na_v -Kanälen ist ein oxidationssensitiver Parameter, der bei elektrophysiologischen Messungen beobachtet werden kann. Um zu untersuchen, ob eine Regulation bei Na_v -Kanälen stattfinden könnte, wurde zunächst mit einem Aktivitätstest abgeklärt, dass MSRA Methioninsulfoxid unter den Bedingungen der elektrophysiologischen Experimente tatsächlich reduziert. Dazu wurden $15 \mu\text{g/ml}$ MSRA und, als Elektronendonator, 8 mM DTT sowie verschiedene Konzentrationen ChT im zehnfach-Puffer des Kits gelöst und

entsprechend dem in Abschnitt 2.3.2 beschriebenen Protokoll behandelt. Die Ergebnisse des MSRA-Aktivitätstests sind in Abb. 3.17 dargestellt.

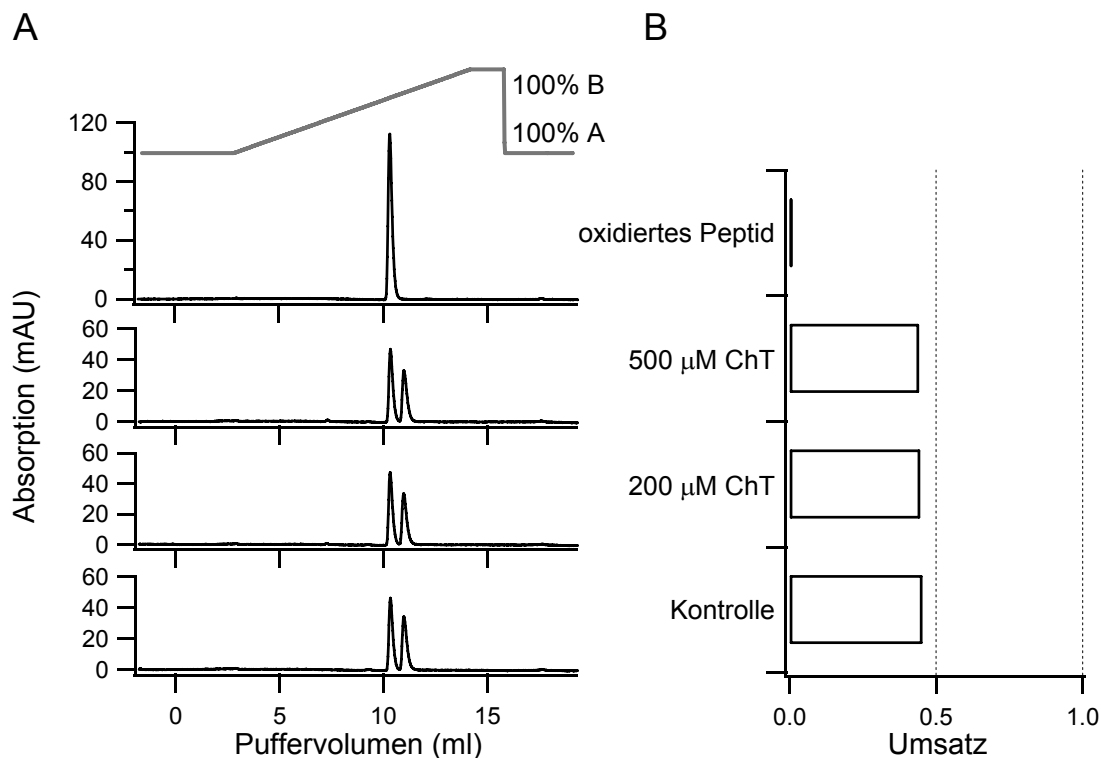


Abbildung 3.17:

MSRA-Aktivitätstest

A. HPLC-Chromatogramme von unbehandeltem oxidiertem Peptid KIFM(O)K sowie nach Inkubation mit 8 mM DTT und 15 µg/ml MSRA sowie der angegebenen Konzentration an ChT (Kontrolle=0 µM ChT). Oben ist der Gradient der zwei Puffer angegeben. **B.** Aus den bei (A) gezeigten HPLC-Läufen ermittelte Umsätze für die Reduktion des oxidierten Peptids.

Die Umsätze liegen mit 44.6% für den Ansatz mit 200 µM ChT und 44.2% für den mit 500 µM ChT dicht hinter der Kontrolle ohne ChT mit 45.4% und nur wenig vom maximal möglichen Umsatz von 50% entfernt. In weiteren Experimenten wurde ermittelt, dass die Inkubation bei Raumtemperatur gegenüber der Inkubation bei 37°C für eine Stunde und die Verwendung von Pipettenlösung an Stelle des im Kit enthaltenen Puffers keinen geringeren Umsatz bewirkt. Die Zeit, welche in den elektrophysiologischen Experimenten nach dem Auswaschen von ChT maximal zur Umkehr des Inaktivierungsverlustes blieb, ist mit ca. 35 Minuten kürzer als die Inkubationsdauer im Aktivitätstest, jedoch sollte nach den Ergebnissen des Tests auch in der kürzeren Zeitspanne ein nachweisbarer Teil der oxidierten Kanäle seine ursprüngliche Funktion zurück erhalten haben. Die Reduktion oxidativ modifizierter Methioninreste an Nav-Kanälen in der Zelle hätte also zumindest dann erfolgen können, wenn die Konzentration des in die Zelle diffundierten MSRA nahe der in der Pipettenlösung liegt.

Die elektrophysiologischen Experimente wurden mit rNa_v1.4 IFM-L wie in Abschnitt 3.1.1.1 beschrieben durchgeführt. Die Pipettenlösung enthielt 15 µg/ml rekombinant hergestelltes MSRA und 8 mM DTT. Die schnelle Inaktivierung wurde mit 500 µM ChT teilweise beseitigt, dann wurde mit Bad-Lösung gespült, welche 1 mM DTT enthielt, um letzte Radikale zu neutralisieren. Im Falle einer Aktivität von MSRA an den Kanalproteinen wäre eine teilweise Wiederherstellung der schnellen Inaktivierung zu beobachten. Der Rückgang würde wegen der Stereoselektivität von MSRA und der Möglichkeit des Entstehens von Methioninsulfon maximal die Hälfte des Inaktivierungsverlustes betragen. Eine Reversibilität des Verlustes an schneller Inaktivierung wurde während der zeitlichen Dauer der elektrophysiologischen Experimente (bis zu etwa 35 min) nicht beobachtet (Abb. 3.18).

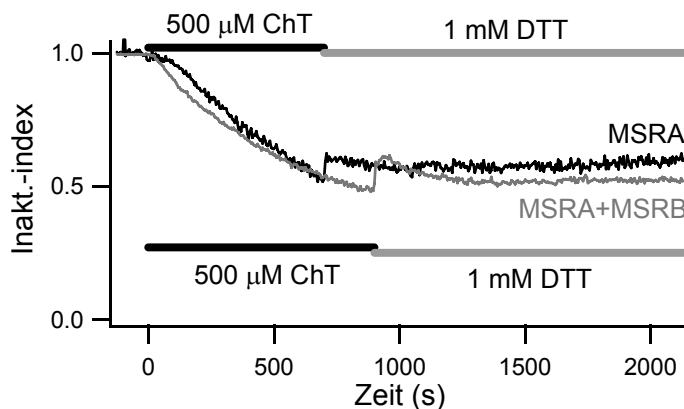


Abbildung 3.18:

Irreversibilität des Inaktivierungsverlustes mit Methioninsulfoxidreduktasen.

Inaktivierungsindizes für rNa_v1.4 IFM-L in Abhängigkeit von der Zeit. Die Pipettenlösungen enthielten wie angegeben 15 µg/ml MSRA bzw. 15 µg/ml MSRA+30 µg/ml MSRB2 und zusätzlich jeweils 8 mM DTT. Die horizontalen Balken verdeutlichen die Applikation von 500 µM ChT (schwarz) und 1 mM DTT (grau).

Bei einem gemeinsamen Einsatz von MSRA und MSRB könnten beide stereoisomeren Methioninsulfoxide reduziert werden. Ein möglicherweise mit MSRA zu geringer Reparaturreffekt auf die Inaktivierung könnte verstärkt und während der Messdauer registriert werden. Daher wurden Experimente mit 15 µg/ml MSRA und 30 µg/ml MSRB2 durchgeführt. Die Kombination der beiden Enzyme führte ebenso wie MSRA allein nicht zu einer eindeutigen Umkehr des Inaktivierungsverlustes (Abb. 3.18).

Bei einigen Experimenten, bei denen MSRA und DTT präsent waren, erfolgte der Inaktivierungsverlust langsamer als bei Experimenten mit Pipettenlösung, sodass eine mögliche Funktion von MSRA als Radikalfänger vermutet wurde. Denkbar ist ebenso, dass MSRs Schäden an anderen Enzymen als den untersuchten Ionenkanälen reparieren und somit als Gegenspieler zu den Radikalen die Verfügbarkeit oxidierbarer Methioninreste beeinflussen. Nachdem eine direkte Umkehrung der oxidativen Modifikationen am Kanal nicht nachgewiesen wurde, könnte die Kontrolle der Radikalkonzentration für die Zelle die Möglichkeit eröffnen, die Wahrscheinlichkeit zu beeinflussen, mit der eine Oxidation der

Kanäle stattfindet. In weiteren Experimenten wurde der Fokus auf die Geschwindigkeit gelegt, mit welcher der Inaktivierungsverlust erfolgt. In Abbildung 3.19A sind aus den Daten für die Anpassung der Inaktivierungsverläufe (Abb. 3.19B) nach Gleichung 2.5 gewonnene Inaktivierungsindizes 500 s nach Applikation von 500 μ M ChT dargestellt. Der Einfluss von 8 mM DTT in der Pipettenlösung war bei diesen Messungen vernachlässigbar. Der signifikante Unterschied der Messungen mit MSRA+DTT zu denen mit DTT ($p < 0.001$) konnte mit MSRA+MSRB+DTT nicht reproduziert werden.

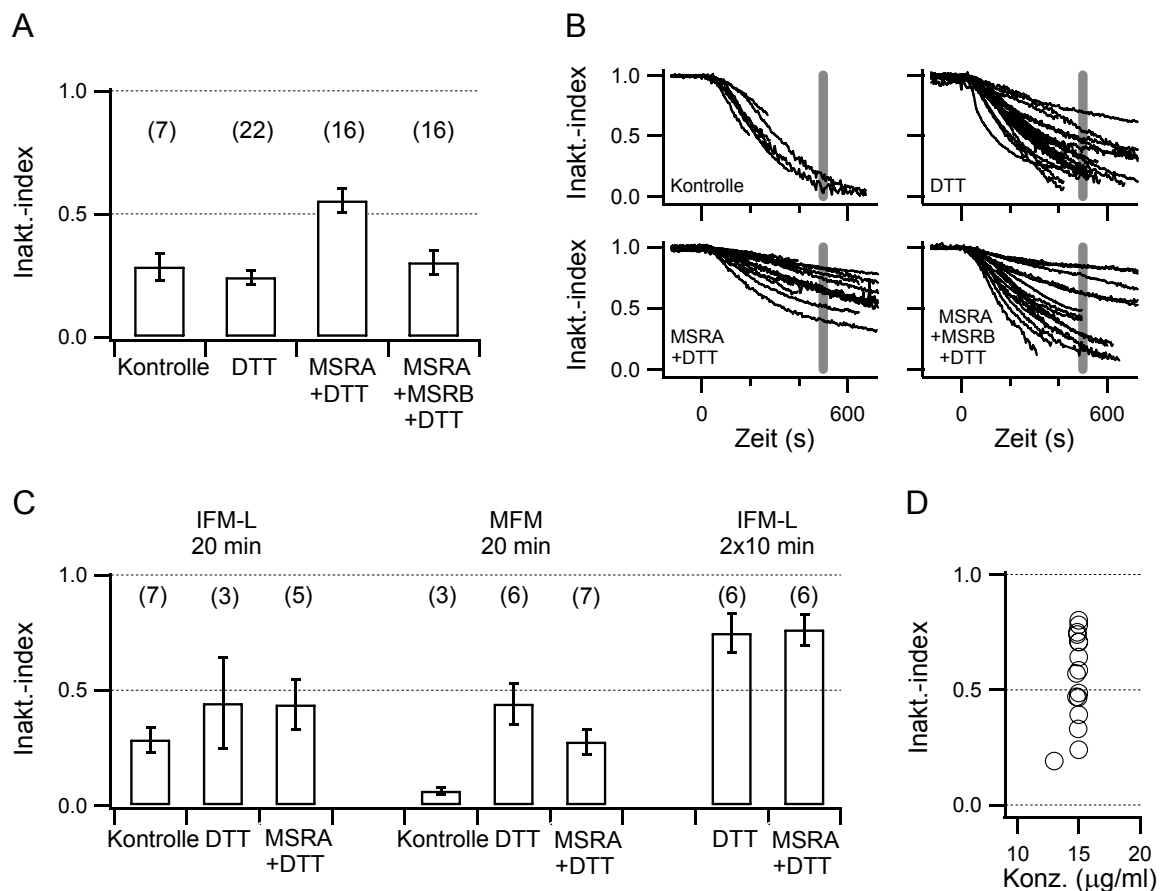


Abbildung 3.19:

Einfluss von Methioninsulfoxidreduktasen auf die Geschwindigkeit des Inaktivierungsverlustes.

A. Inaktivierungsindex für rNaV1.4 IFM-L 500 s nach Applikation von 500 μ M ChT. Die Pipettenlösung enthielt wie angegeben 8 mM DTT, 15 μ g/ml MSRA, 30 μ g/ml MSRB2 oder keine der Substanzen. In Klammern steht die Anzahl unabhängiger Experimente. **B.** Überlagerung der zeitlichen Verläufe der Inaktivierungsindizes, aus denen durch Anpassung nach Gleichung 2.5 die Daten für (A) gewonnen wurden. Der Zeitpunkt von 500 s nach Applikation ist durch graue Balken markiert. **C.** Inaktivierungsindex für rNaV1.4 IFM-L und MFM 500 s nach Applikation von 500 μ M ChT. Die Wartezeiten wurden, wie angegeben, auf entweder 20 min nach oder auf jeweils 10 min vor und nach Etablieren der Ganz-Zell-Konfiguration erweitert. Die Pipettenlösung enthielt wie angegeben 8 mM DTT, 15 μ g/ml MSRA oder keine der Substanzen. **D.** Inaktivierungsindizes der unter (A) zusammengefassten Messungen mit MSRA+DTT in Abhängigkeit der nach Pusch & Neher (1988) berechneten MSRA-Konzentration zum Zeitpunkt der Applikation von ChT.

Bei Erhöhung der Wartezeit zwischen Etablierung der Ganz-Zell-Konfiguration und Beginn der Messungen auf 20 Minuten ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den

Messungen mit MSRA+DTT und denen mit DTT. Neben IFM-L wurde auch die Mutante MFM genutzt, bei der durch die höhere Oxidationssensitivität Effekte auf den Inaktivierungsverlust deutlicher hervortreten könnten (Abb. 3.19C links und Mitte). Nach der bei Ju et al. (1996) beschriebenen Methode wurde die Spitze der Pipette mit proteinfreier Lösung gefüllt. Um die Zeitspanne zu erhöhen, während der MSRA bis an die Zellmembran diffundieren kann, wurde das Warteprotokoll auf jeweils 10 Minuten vor und nach Etablierung der Ganz-Zell-Konfiguration geändert. Dabei trat ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den Messungen mit MSRA+DTT und denen mit DTT auf, der Inaktivierungsverlust war jedoch verglichen mit den Ergebnissen der Messungen bei 20 Minuten Wartezeit deutlich geringer. Der Unterschied für die Messungen mit MSRA war signifikant (Abb. 3.19C rechts).

Aus Abb. 3.19B, in der beispielhaft für die in Abb. 3.19A zusammengefassten Messungen die Inaktivierungsverläufe in Abhängigkeit von der Zeit präsentiert sind, wird deutlich, dass die Einzelmessungen mit DTT und DTT+Proteinen hohe individuelle Schwankungen aufwiesen. Ein Grund für diese Schwankungen könnte sein, dass MSRA und MSRB auf Grund ihrer Größe trotz der Pipetten mit weiter Öffnung bis zur Applikation von ChT in unterschiedlichem Maße in die Zellen diffundiert waren. Nach einer Beispielrechnung nach Gleichung 2.1 (Pusch & Neher 1988) sollte die Konzentration zum Applikationszeitpunkt selbst für Zellen mit einer Membrankapazität von 30 pF und einem Serienwiderstand von 5 M Ω , was den oberen Akzeptanzgrenzen für die Messungen entsprach, für MSRA nicht unter 7.5 $\mu\text{g/ml}$ und für MSRB2 nicht unter 15 $\mu\text{g/ml}$ liegen. Durch Experimente mit EGFP, welches eine vergleichbare Größe wie MSRA besitzt, wurde nachgewiesen, dass das gewünschte Protein mit dem Warteprotokoll mit zwei mal zehn Minuten zum Zeitpunkt der Applikation in der Zelle präsent war, wenn auch möglicherweise nicht in der vollen eingesetzten Konzentration. Für DTT als viel kleineres Molekül (MW=154.25 Da) kann auf der Grundlage der Ergebnisse von Pusch & Neher (1988) angenommen werden, dass zum Zeitpunkt der Applikation die Konzentration in der Zelle praktisch der in der Pipettenlösung entspricht. In Abb. 3.19D sind die Inaktivierungsindizes der unter Abb. 3.19A dargestellten Messungen mit MSRA+DTT den nach Gleichung 2.1 ermittelten, zum Applikationszeitpunkt erreichten MSRA-Konzentrationen gegenübergestellt. Dass die unterschiedlichen Inaktivierungsindizes nicht durch Konzentrationsunterschiede der Proteine oder von DTT bedingt sind, deutet auf den Einfluss weiterer Faktoren, beispielsweise dem unbekanntem Volumen der proteinfreien Lösung in der Pipettenspitze, hin.

3.2 Effekt von oxidativem Stress auf den Spitzenstrom spannungsgesteuerter Natriumkanäle

3.2.1 Reduktion des Spitzenstroms bei Mutanten von rNav1.4

Bei der Untersuchung der Oxidationssensitivität von rNav1.4 Wildtyp und Mutanten, bei denen Methionin durch Leucin ersetzt war, zeigte sich mit zunehmender Expositionsdauer gegenüber ChT ein Verlust an Spitzenstrom, welcher möglicherweise auf den Verlust der Funktion ganzer Kanäle durch oxidative Modifikationen zurückgeht. Für einige Mutanten war die Verringerung der Stromamplitude besonders ausgeprägt. In Abb. 3.20A und B ist beispielhaft der Verlauf des Spitzenstroms mit 1 mM ChT für die Mutante IFL-6L gegenüber dem Wildtypkanal gezeigt. Der Anstieg des Stroms bei rNav1.4 WT zu Beginn der Oxidationsphase geht auf den Verlust an Inaktivierung zurück. In Abb. 3.20C ist eine Übersicht des Reststroms der Methionin-Leucin-Mutanten 200 s nach Applikation von 1 mM ChT gegeben. Das Ersetzen von M1316 (IFM-L), M1469 (IFM-LM) oder M1470 (IFM-ML) bewirkte tendenziell einen geringeren Block des Spitzenstromes als bei Wildtypkanälen. Der Stromverlust geht damit wahrscheinlich nicht allein auf den Verlust an schneller Inaktivierung zurück. Einen starken Block bewirkten M1305 einzeln (IFL), M1469 und M1470 gemeinsam (IFM-LL) sowie M442, M1139 und M1154 gemeinsam (IFM-4L, im Vergleich zu IFM-L). Der Stromverlust wurde durch Kombination dieser Mutationen verstärkt (IFL-LL, IFM-6L und besonders IFL-6L). Werte für den Reststrom 200 s nach Applikation verschiedener ChT-Konzentrationen sind in den Tabellen A.10-A.13 und A.15-A.16 (Anhang) gegeben.

Die dargestellten Kanäle unterscheiden sich teilweise deutlich in der Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung. Bei IFL-6L war die halbmaximale Spannung der Inaktivierung (V_h) so weit zu negativeren Werten verschoben, dass die Haltespannung für die Messungen von -120 mV auf -140 mV verändert wurde. Die V_h -Werte sind in Abb. 3.20D gezeigt und dem Reststrom (Abb. 3.20C) gegenüber gestellt. Eine geringe signifikante Verschiebung von V_h zu negativeren Werten bewirkten M1305L und M1469L. Zu einer deutlichen Verschiebung von V_h zu negativeren Werten führten die Mutationen M1470L einzeln sowie M442L, M1139L und M1154L gemeinsam. Die Mutation M1316L hatte auf V_h keinen signifikanten Einfluss.

Aus Abbildung 3.20E wird deutlich, dass für zahlreiche Mutanten V_h gegenüber dem Wildtypkanal zu negativeren Werten verschoben ist und stärkerer Stromverlust auftritt, wenn

viele Methionine ersetzt sind. Einer möglichen Beziehung zwischen V_h und dem Stromverlust bei verschiedenen Natriumkanälen wird in Abschnitt 3.2.4 weiter nachgegangen.

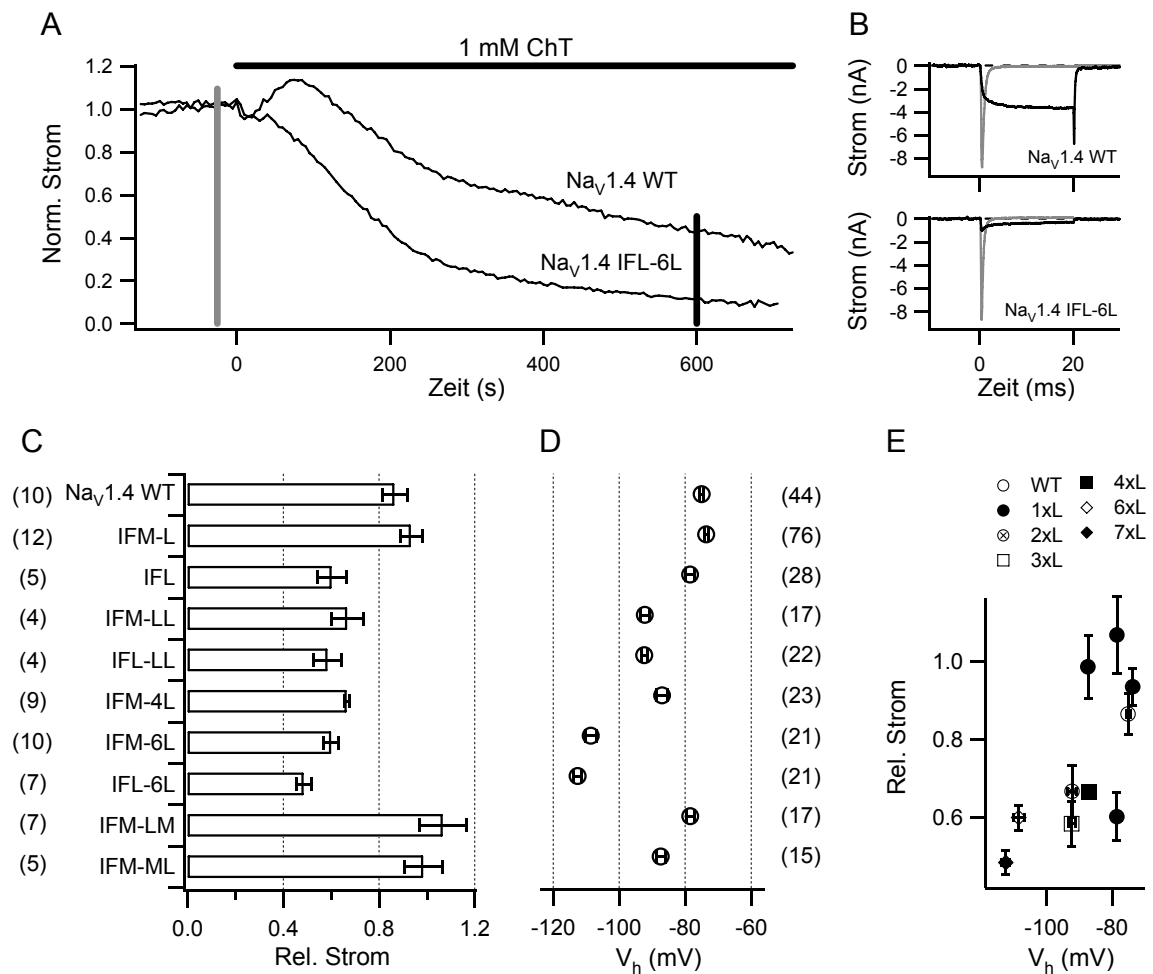


Abbildung 3.20:

Verlust des Spitzenstroms bei $rNa_v1.4$ und Mutanten.

A. Überlagerung der zeitlichen Verläufe des Spitzenstroms (normiert) nach Applikation von 1 mM ChT für $rNa_v1.4$ WT und IFL-6L. Die Gegenwart von ChT ist durch einen horizontalen schwarzen Balken angegeben. **B.** Stromspuren der Kanäle von (A) vor (grau) und 600 s nach Applikation von 1 mM ChT (schwarz). Die Zeiten, bei denen die Stromspuren aufgezeichnet wurden, sind bei (A) durch vertikale Balken verdeutlicht. **C.** Relativer Reststrom 200 s nach Applikation von 1 mM ChT. **D.** Halbmaximale Spannung der Inaktivierung für die Kanäle von (C). Die Anzahl unabhängiger Experimente ist für (C) und (D) jeweils in Klammern angegeben. **E.** Beziehung zwischen Stromverlust und Lage der halbmaximalen Spannung der Inaktivierung für die Kanäle von (C). Die Legende bezeichnet die Anzahl der per Mutagenese ersetzten Methionine.

3.2.2 Strukturelle Ursachen für die Reduktion des Spitzenstroms bei $Na_v1.5$

$Na_v1.5$ ist ein Wildtypkanal mit besonders ausgeprägter Reduktion des Spitzenstroms. Beim Vergleich mehrerer Na_v -Kanaltypen bezüglich ihrer Oxidationssensitivität der schnellen Inaktivierung (Abb. 3.6) wurde die Mutante $hNa_v1.5$ C373Y verwandt. Bei dieser Mutante ist ein Cystein, welches sich in der Bindestelle für Tetrodotoxin in Domäne 1 innerhalb der

Kanalpore befindet, durch das an dieser Stelle beim Skelettmuskelkanal vorhandene Tyrosin ersetzt. In Abb. 3.21 ist der Zeitverlauf des Maximalstroms für rNa_V1.4, hNa_V1.5 und hNa_V1.5 C373Y bei Oxidation mit 200 μM ChT dargestellt. Der Herzmuskelkanalstrom wurde innerhalb weniger Sekunden nach Zugabe des Oxidationsmittels zu über 50% geblockt. Der Reststrom 100 s nach Applikation betrug 0.403 ± 0.010 (n=6). Die Mutation C373Y verringerte den Stromverlust deutlich auf 0.737 ± 0.028 (n=8), ein Wert, der etwa in der Mitte zwischen denen der beiden betrachteten Wildtypkanäle liegt (rNa_V1.4: 1.044 ± 0.019 , n=12).

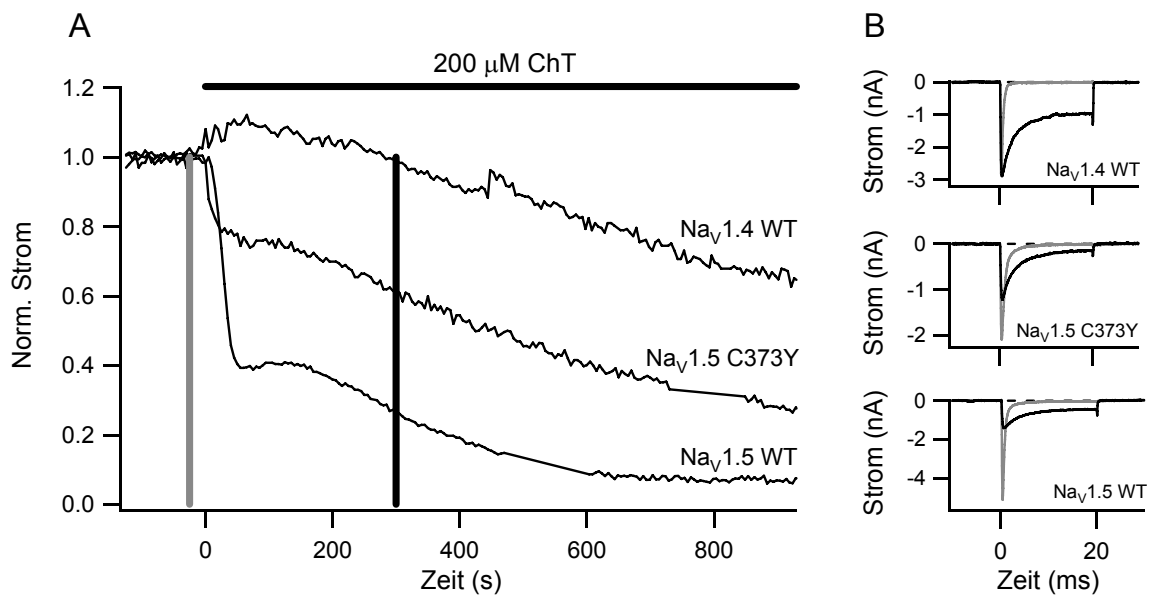


Abbildung 3.21:

Zeitlicher Verlauf des normierten Spitzenstroms von rNa_V1.4 WT, hNa_V1.5 WT und hNa_V1.5 C373Y.

A. Überlagerung ausgewählter zeitlicher Verläufe des Spitzenstroms (normiert) nach Applikation von 200 μM ChT für die angegebenen Kanäle. Die Applikation von ChT erfolgte bei 0 s. **B.** Stromspuren der Kanäle von (A) vor (grau) und 300 s nach Applikation von 200 μM ChT (schwarz). Die Zeitpunkte für die Aufzeichnung der Stromspuren sind bei (A) durch vertikale Balken indiziert.

Neben der Analyse des gemessenen Spitzenstroms wurde bei rNa_V1.4, hNa_V1.5 und hNa_V1.5 C373Y auch der theoretisch maximal mögliche Strom betrachtet. Dafür wurden die einzelnen Stromspuren mit Gleichung 2.6 angepasst und anschließend der Einfluss der Inaktivierung eliminiert. Wie in Abbildung 3.22 gezeigt, unterscheiden sich die Werte für den Stromverlust von denen, die aus den gemessenen Spitzenströmen ermittelt wurden, jeweils etwa um den Faktor 0.5. Der Wert für hNa_V1.5 C373Y liegt ebenfalls etwa in der Mitte der Werte für die beiden Wildtypkanäle (Tabelle A.14, Anhang). Da bei hNa_V1.5 C373Y noch immer ein Stromverlust auftritt, muss es neben dem Porencystein weitere beteiligte Faktoren geben.

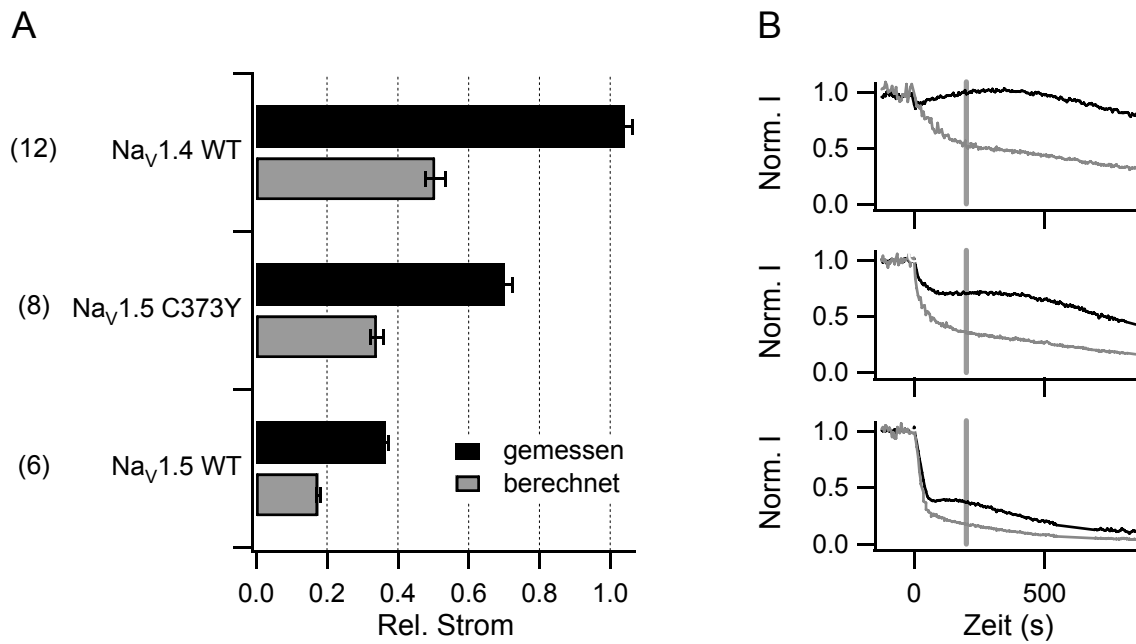
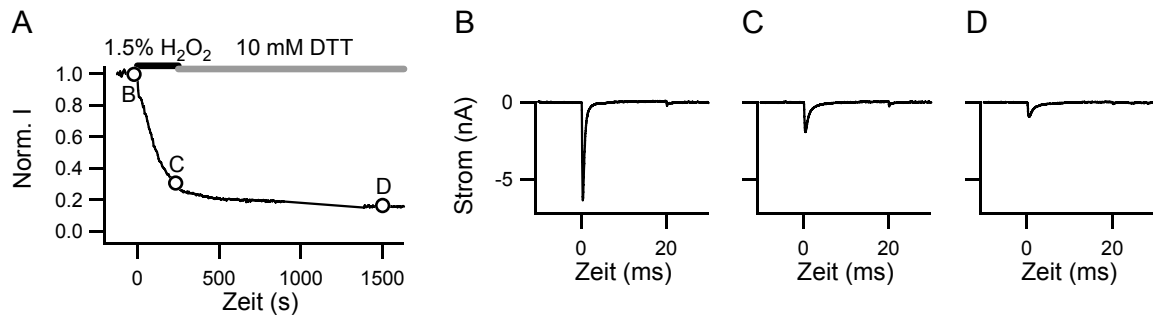


Abbildung 3.22:

Stromverlust bei rNa_v1.4, hNa_v1.5 und hNa_v1.5 C373Y auf der Basis des gemessenen Spitzenstroms und des berechneten theoretisch maximal möglichen Stroms.

A. Relativer Reststrom 200 s nach Applikation von 200 μM ChT. In Klammern ist die Anzahl unabhängiger Experimente angegeben. **B.** Abhängigkeit des gemessenen Spitzenstroms (schwarz) bzw. des maximal möglichen Stroms (grau) von der Zeit (repräsentative Datenspuren). Der Zeitpunkt, dem die Daten bei (A) entstammen, ist durch graue Balken markiert.

Um die Lokalisation weiterer möglicherweise beteiligter Bereiche des Kanals einzugrenzen, wurden Chimären aus rNa_v1.4 und hNa_v1.5 verwendet, bei denen Domänen eines Kanals durch die entsprechenden Domänen des anderen Kanals ersetzt waren. Domänen, welche von rNa_v1.4 stammen, sind dabei durch eine 4, solche, die von hNa_v1.5 stammen durch eine 5 gekennzeichnet. Zur Untersuchung der Oxidationssensitivität der einzelnen Chimären wurde an Stelle des bisher genutzten ChT Wasserstoffperoxid verwendet. H₂O₂ bewirkte im Zeitraum eines elektrophysiologischen Experiments mit einer Konzentration von 1.5% (500 mM) eine Reduktion des Spitzenstroms. Bis zu einer Konzentration von 10 mM H₂O₂ ergab sich bei hNa_v1.5 kein Stromverlust, der von einem reinen Spüleffekt zu unterscheiden war. Mit der Mutante rNa_v1.4 IFC-L wurde nachgewiesen, dass die eingesetzte Konzentration an H₂O₂ hinreicht, um oxidative Effekte an Cystein auszulösen. Bereits 1 mM H₂O₂ bewirkten einen Verlust der schnellen Inaktivierung (siehe Abschnitte 3.1.6 und 3.1.7). Der Effekt war mit DTT vollständig reversibel, was nachweist, dass es sich um eine Modifikation an Cystein und nicht an Methionin handelt (siehe Abb. 3.13C). Der Grund für diesen großen Unterschied in der Sensitivität der beiden Cysteine liegt möglicherweise in der unterschiedlichen Zugänglichkeit für H₂O₂. Der durch H₂O₂ verursachte Stromverlust war bei hNa_v1.5 durch Auswaschen mit 10 mM DTT nicht reversibel (siehe Abbildung 3.23).

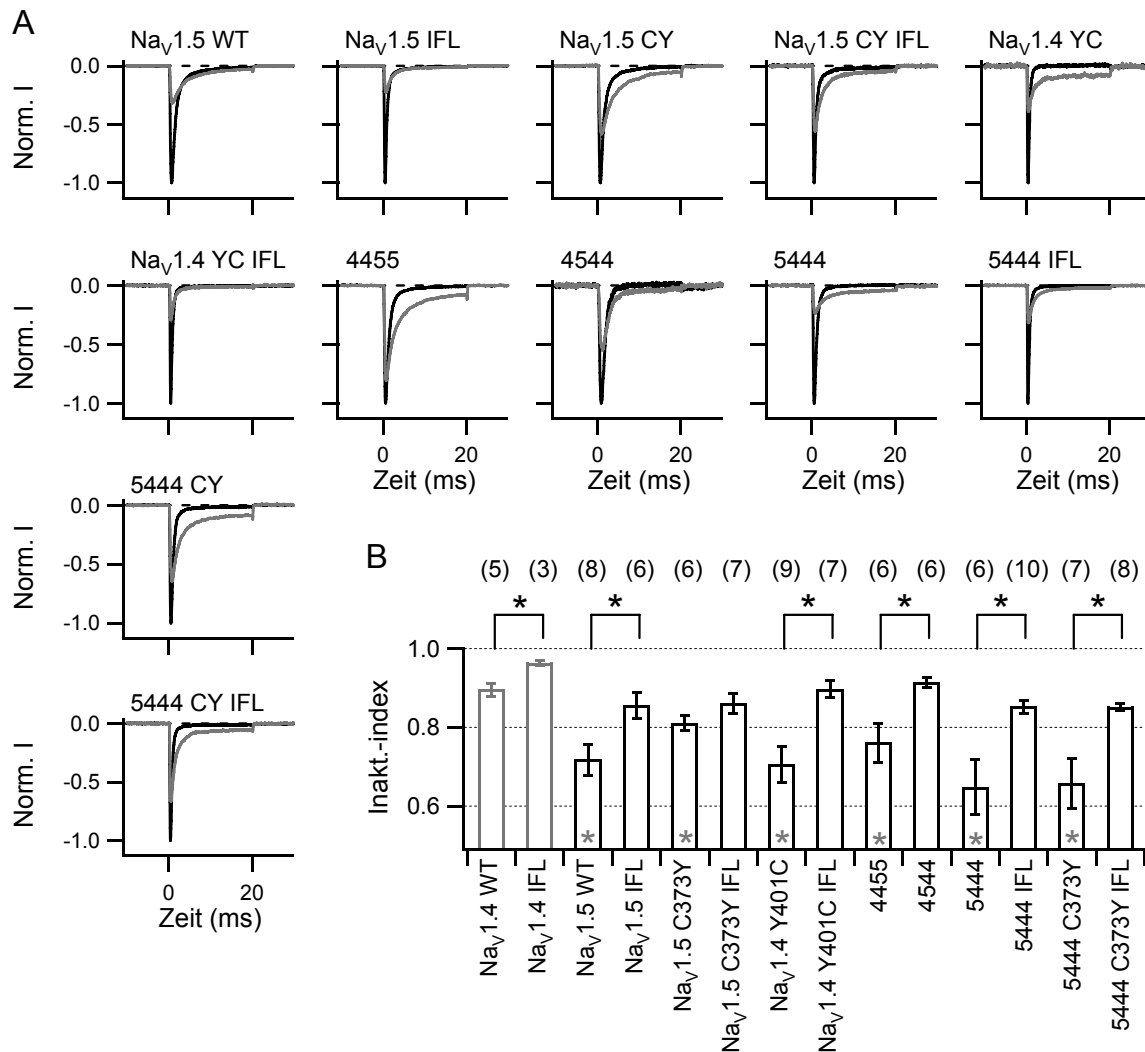
**Abbildung 3.23**

Irreversibilität des Stromverlustes durch Wasserstoffperoxid bei hNav1.5 Wildtypkanälen.

A. Normierter Spitzenstrom in Abhängigkeit von der Zeit. Die Gegenwart von H₂O₂ ist durch einen schwarzen Balken, die von DTT durch einen grauen Balken gekennzeichnet. **B.-D.** Zu den unter (A) angegebenen Zeitpunkten aufgezeichnete Stromspuren.

H₂O₂ bewirkte nicht nur einen Block des Stroms, es führte auch zum Verlust der schnellen Inaktivierung (Abbildung 3.24). Der Inaktivierungsverlust bewirkte eine Zunahme der Stromamplitude. Um den Inaktivierungsverlust zu minimieren, wurde die Mutation hNav1.5 M1487L (IFL) eingeführt. Bei der Chimäre 5444 wurde IFM ebenfalls zu IFL verändert und außerdem die Mutation C373Y eingeführt. Die niedrigste Sensitivität des Inaktivierungsverlustes der untersuchten Kanäle mit IFM-Motiv bestand bei rNav1.4 und der Chimäre 4544, die Sensitivität von hNav1.5 C373Y war nicht signifikant höher. Die Ionenkanäle hNav1.5, rNav1.4 Y401C und 4455 wiesen gegenüber der ersten Gruppe eine höhere Sensitivität auf, der Unterschied zu rNav1.4 war jeweils signifikant. Die höchsten Sensitivitäten wurden für 5444 und 5444 C373Y ermittelt, die Unterschiede gegenüber rNav1.4 sind ebenfalls signifikant. Die Bedeutung des Methionins im IFM-Motiv ließ sich mit H₂O₂ für rNav1.4, hNav1.5, 5444, 5444 C373Y und rNav1.4 Y401C bestätigen. Die Werte für hNav1.5 C373Y und hNav1.5 C373Y IFL unterschieden sich nicht signifikant. In Tabelle A.8 (Anhang) sind die Zeitkonstanten und Inaktivierungsindizes 500 s nach Applikation zusammengestellt.

Sowohl der Verlust der Inaktivierung als auch die Reduktion des Maximalstroms erfolgten trotz der unphysiologisch hohen H₂O₂-Konzentration mit einer langsameren Kinetik als bei 200 µM ChT, sodass zur Auswertung der Stromverlustdaten ein Zeitpunkt von 500 s nach Applikation gewählt wurde. Der Reststrom der betrachteten Kanäle, Chimären und Mutanten ist in Abbildung 3.25A und in Tabelle A.17 (Anhang) in Übersicht dargestellt. Mit 1.5% H₂O₂ zeigte sich ebenso wie mit 200 µM ChT ein deutlicher Unterschied im Stromverlust zwischen rNav1.4 WT und hNav1.5 WT, der Wert für den Reststrom der Mutante hNav1.5 C373Y lag etwa in der Mitte zwischen den Werten der beiden Wild-Typ-Kanäle.

**Abbildung 3.24:**

Einfluss von Wasserstoffperoxid auf die schnelle Inaktivierung spannungsgesteuerter Natriumkanäle.

A. Normierte Stromspuren der angegebenen Na_v-Kanäle als Antwort auf depolarisierende Pulse auf -10 mV vor (schwarz) und 500 s nach Applikation von 1.5% H₂O₂ (grau). Normiert wurde auf den Spitzenstrom vor Applikation. **B.** Inaktivierungsindizes verschiedener Na_v-Kanäle und Mutanten 500 s nach Applikation von 1.5% H₂O₂. In Klammern ist die Anzahl unabhängiger Experimente angegeben. Im oberen Teil sind die Kanäle mit einem schwarzen Stern gekennzeichnet, bei denen sich die IFL-Mutante in der Sensitivität signifikant von der Grundform unterscheidet. Mit einem grauen Stern im unteren Bereich sind die Grundformen gekennzeichnet, welche sich in der Sensitivität signifikant von rNa_v1.4 WT unterscheiden (jeweils p<0.05).

Die Sensitivität der Stromamplitude von hNa_v1.5 IFL gegenüber 1.5% H₂O₂ war deutlich höher als bei rNa_v1.4 IFL. Die Sensitivitäten von hNa_v1.5 C373Y IFL und rNa_v1.4 IFL unterschieden sich nicht signifikant. Der Reststrom der Chimäre 5444 unterschied sich mit 1.5% H₂O₂ nicht vom Reststrom von rNa_v1.4. Der Stromverlust bei 4544 und besonders bei 5444 war deutlich stärker als bei rNa_v1.4. Der Stromverlust von 5444 mit H₂O₂ war stärker als bei hNa_v1.5. Die Mutation 5444 C373Y führte zu einer Sensitivität, die nur wenig unter der von rNa_v1.4 WT lag. Um die vermutete hohe Bedeutung des Porencysteins C373 bei

hNav1.5 bewerten zu können, wurde die Umkehrmutante beim Skelettmuskelkanal konstruiert: rNav1.4 Y401C. Die Oxidationssensitivität der Stromamplitude dieser Mutante unterschied sich nur gering von der von 5444 und war höher als die von hNav1.5. Es gab geringe Unterschiede zwischen den Sensitivitäten von rNav1.4 Y401C IFL, 5444 IFL und hNav1.5 IFL gegenüber H₂O₂. Die Mutation IFL hatte bei rNav1.4, hNav1.5, hNav1.5 C373Y und rNav1.4 Y401C einen deutlichen Einfluss auf den Stromverlust nach Applikation von 1.5% H₂O₂. Bei 5444 und 5444 C373Y zeigte sich mit IFL keine signifikante Veränderung des Stromverlustes.

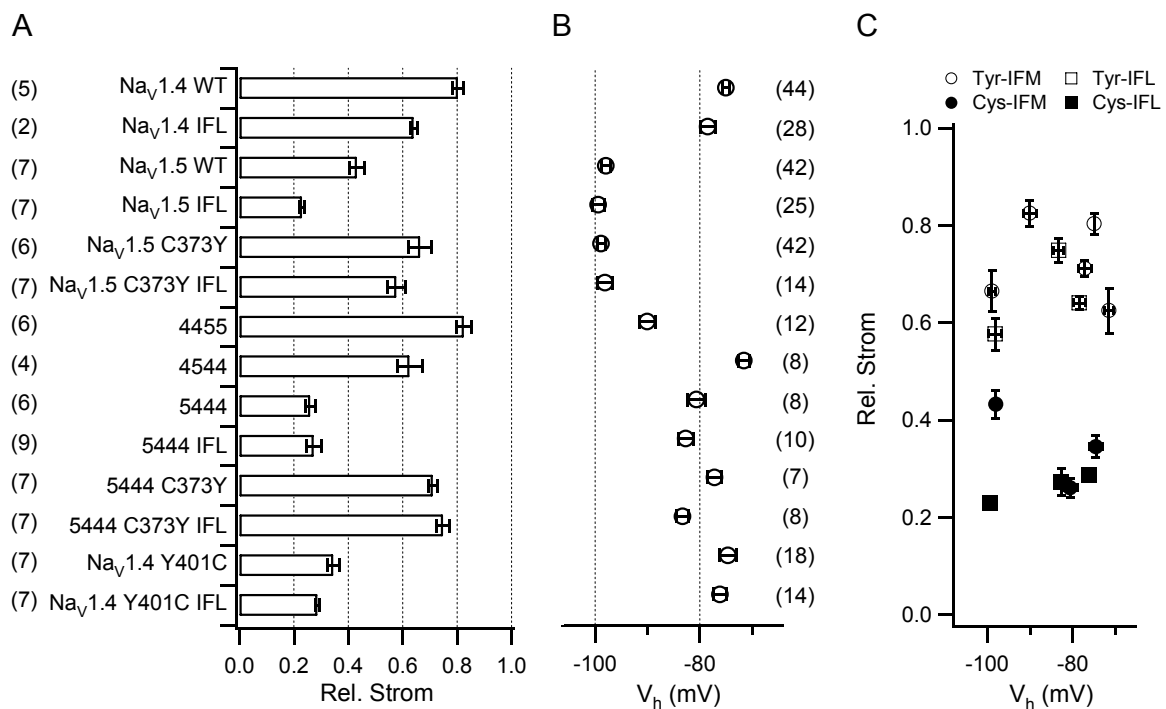


Abbildung 3.25:

Stromverlust bei spannungsgesteuerten Natriumkanälen mit Wasserstoffperoxid.

A. Relativer Strom für die angegebenen WT-Na_v-Kanäle, Chimären und Mutanten 500 s nach Applikation von 1.5% H₂O₂. **B.** Halbmaximale Spannung der Inaktivierung für die unter (A) angegebenen Mutanten. Die Anzahl unabhängiger Experimente steht jeweils in Klammern. **C.** Beziehung zwischen Stromverlust und Lage der halbmaximalen Spannung der Inaktivierung für die Kanäle von (A). Die Legende bezeichnet das Vorhandensein von Cystein oder Tyrosin in der TTX-Bindestelle in der Pore und das Vorhandensein von IFL oder IFM im Inaktivierungsmotiv.

Aus den Ergebnissen der chimärenbasierten Untersuchungen wird deutlich, dass neben C373 auch die Domänen 1 und 2 zum Verlust von Spitzenstrom bei hNav1.5 beitragen könnten. Zumindest für einige Kanäle ist ein Teil des Stromverlustes durch Spüleffekte bedingt. Für hNav1.5 WT wurde ein Reststrom 500 s nach Spülen mit Badlösung von 0.866 ± 0.055 (n=5) und für hNav1.5 IFL von 0.840 ± 0.042 (n=3) gemessen.

Bei vielen der Methionin-Leucin-Mutanten von rNav1.4, bei denen ein hoher Stromverlust auftritt, hatte sich gezeigt, dass die halbmaximale Spannung der Inaktivierung gegenüber dem Wildtypkanal zu negativeren Werten verschoben ist (Abb. 3.20C bis E). In Abbildung 3.25B sind die Werte für V_h den Werten für den Reststrom der angegebenen Kanäle 500 s nach Applikation von 1.5% H_2O_2 gegenüber gestellt. V_h liegt für den Wildtyp und alle hier angegebenen Mutanten von rNav1.4 bei etwa -75 mV. Für den Wildtyp und die untersuchten Mutanten von hNav1.5 wurden V_h -Werte von nahezu -100 mV und damit einer deutlich negativeren Spannung als für rNav1.4 ermittelt. Die halbmaximale Spannung der Inaktivierung für die Chimäre 4544 liegt nahe der von rNav1.4, die von 4455 liegt etwas positiver als die Werte der hNav1.5-Mutanten. Die V_h -Werte für 5444 und die daraus abgeleiteten Mutanten liegen bei etwas negativeren Potenzialen als die der rNav1.4-Mutanten, die Abweichung gegenüber rNav1.4 WT ist für 5444 C373Y signifikant. Wie schon bei rNav1.4 hat die Mutation IFL auch bei hNav1.5, 5444 und rNav1.4 Y401C geringe Auswirkungen auf V_h . Bei 5444 C373Y bewirkt das Einführen von IFL eine signifikante V_h -Verschiebung von -77.2 ± 1.4 mV auf -83.3 ± 1.1 mV. Die Mutationen C373Y bzw. Y401C bewirken in keinem Fall eine signifikante Veränderung von V_h . Die teilweise deutlichen Unterschiede in der Sensitivität des Spitzenstroms der verschiedenen Kanäle korrelieren nicht mit der Lage der halbmaximalen Spannung der Inaktivierung (Abbildung 3.25C).

3.2.3 Einfluss von tert-Butylhydroperoxid auf die Stromamplitude

Die hohe benötigte H_2O_2 -Konzentration führte zur Vermutung, dass eine geringe Durchtrittsrate durch die Zellmembran zu einer geringen effektiven Konzentration an H_2O_2 bzw. H_2O_2 -induzierten Radikalen im Zellinneren führen könnte. Um diesen Umstand zu umgehen, wurde tert-Butylhydroperoxid (t-BHP) eingesetzt. t-BHP ist ein organisches Peroxid, welches die Zellmembran ungehindert passieren kann und ebenso wie H_2O_2 Radikale freisetzt.

Mit 10 mM t-BHP ergab sich für rNav1.4 WT nach 200 s eine Reduktion der Stromamplitude von etwa 50%. Die Stromreduktion war bei hNav1.5 WT mit etwa 40% deutlich geringer. Die Mutation C373Y erhöhte die Sensitivität von hNav1.5 gegenüber t-BHP über das Niveau von rNav1.4. Die Mutation IFL bei rNav1.4 verringerte die Sensitivität für t-BHP unter das Niveau von hNav1.5. Die Chimäre 4455 war weniger sensitiv als hNav1.5 WT. Die Sensitivität von 5544 lag tendenziell, jedoch ohne signifikante Unterschiede, über der der beiden Wildtypkanäle. In Abbildung 3.26A bzw. Tabelle A.18 (Anhang) ist eine Übersicht der Werte für den Reststrom nach Applikation von t-BHP gegeben.

Gegenüber t-BHP war rNa_v1.4 WT sensitiver als hNa_v1.5 WT, während sich bei H₂O₂ und ChT hNa_v1.5 WT sensitiver verhielt. Die Sensitivität von 4455 war für t-BHP und H₂O₂ gering. Im Gegensatz zu Untersuchungen mit ChT und H₂O₂ zeigten sich mit t-BHP eine geringere Sensitivität von rNa_v1.4 IFL und eine höhere Sensitivität von hNa_v1.5 C373Y gegenüber dem jeweiligen Wildtypkanal. Den Ergebnissen der Messungen der Chimären nach könnten strukturelle Ursachen in den Domänen 3 und 4 den Unterschied zwischen rNa_v1.4 und hNa_v1.5 bewirken. Insgesamt deuten die Resultate jedoch darauf hin, dass t-BHP neben oxidativen Modifikationen weitere Effekte verursacht, deren Mechanismus offen bleibt.

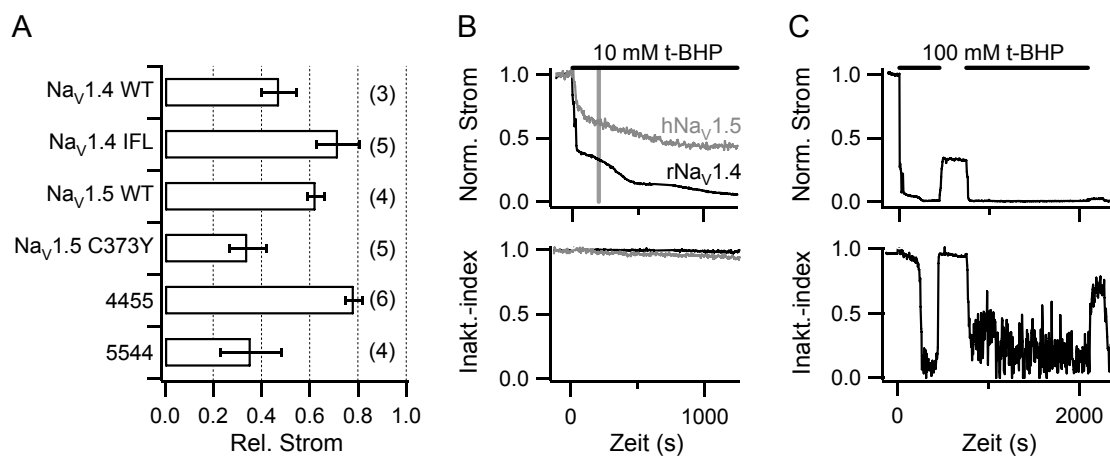


Abbildung 3.26:

Stromverlust bei spannungsgesteuerten Natriumkanälen mit tert-Butylhydroperoxid.

A. Normierter Strom 200 s nach Applikation von 10 mM t-BHP für die angegebenen Na_v-Kanäle. In Klammern steht die Anzahl unabhängiger Messungen. **B.** Spitzenstrom (oben) und Inaktivierung (unten) von rNa_v1.4 WT (schwarz) und hNa_v1.5 WT (grau) in Abhängigkeit von der Zeit nach Applikation von 10 mM t-BHP. **C.** Spitzenstrom (oben) und Inaktivierung (unten) von hNa_v1.5 WT in Abhängigkeit von der Zeit nach Applikation von 100 mM t-BHP. Die Gegenwart von t-BHP ist oben durch schwarze Balken angegeben. t-BHP wurde jeweils mit Badlösung ausgespült.

Der Verlust an schneller Inaktivierung erfolgte mit 10 mM t-BHP sehr langsam (Abb. 3.26B). Für alle untersuchten Kanäle ergaben sich Zeitkonstanten von mehreren Tausend Sekunden, was keine sinnvolle vergleichende Beurteilung der Sensitivitäten ermöglicht. Die Applikation von 100 mM t-BHP führte zum vollständigen Stromverlust bei hNa_v1.5. Der Block war nach der Applikation durch Auswaschen teilweise reversibel (Abb. 3.26C). Ein Verlust an Inaktivierung trat auf, war jedoch nur in Abwesenheit von t-BHP zu analysieren und einer mathematischen Beschreibung unzureichend zugänglich. Offenbar übt t-BHP, wie auch H₂O₂, auf die Inaktivierung erst in hoher Konzentration einen deutlichen Effekt aus. Diffusionshindernisse durch die Zellmembran sind damit unwahrscheinlich. Durch die blockierende Wirkung auf den Strom sind Messungen zum Verlust der schnellen Inaktivierung bei Konzentrationen von mehr als 10 mM t-BHP nicht sinnvoll möglich.

3.2.4 Einfluss von oxidativem Stress auf Schalteigenschaften spannungsgesteuerter Natriumkanäle

3.2.4.1 Oxidation und Spannungsabhängigkeit der schnellen Inaktivierung

Bei zahlreichen Messungen musste der Bereich zur Beschreibung der Spannungsabhängigkeit der schnellen Inaktivierung zwischen den beiden Extremwerten nach Applikation der Oxidantien erweitert werden. Häufig waren immer negativere Spannungen notwendig, um eine vollständige Rückkehr aus der Inaktivierung zu erreichen. In Abbildung 3.27 ist die Veränderung der Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung beispielhaft für einige Kanal-Substanz-Kombinationen dargestellt.

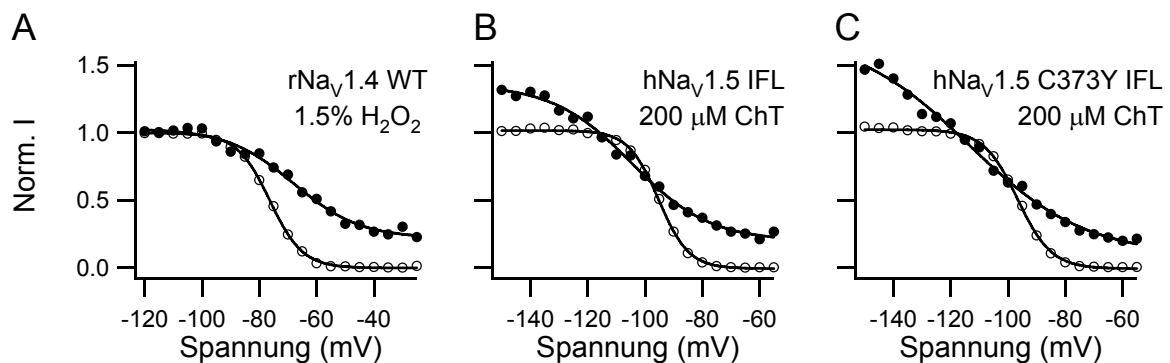


Abbildung 3.27:

Veränderung der Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung mit Oxidantien.

Spannungsabhängigkeit der schnellen Inaktivierung vor (weiße Kreise) und nach Applikation von Oxidantien (schwarze Kreise) beispielhaft an ausgewählten Zellen. **A.** $rNa_V1.4$ WT 2022 s nach Applikation von 1.5% H_2O_2 . **B.** $hNa_V1.5$ IFL 605 s nach Applikation von 200 μM ChT. **C.** $hNa_V1.5$ C373Y IFL 616 s nach Applikation von 200 μM ChT. Normiert wurde jeweils auf den Maximalstrom eines Kontrollpulses. Die durchgezogenen Linien stellen Anpassungen nach Gleichung 2.3 dar.

Ein wichtiger Parameter zur Beschreibung der Spannungsabhängigkeit der schnellen Inaktivierung ist die halbmaximale Spannung (V_h). Innerhalb einer vergleichbaren Zeitspanne nach Applikation gewonnene Daten für V_h mit ausreichender Anzahl sind in Abbildung 3.28 dargestellt. Mit 1.5% H_2O_2 wurde für $rNa_V1.4$ Y401C, 5444 C373Y und 5444 C373Y IFL eine signifikante Verschiebung von V_h zu positiveren Spannungen ermittelt, bei allen anderen dargestellten Kanälen ergab sich für V_h nach der Applikation kein deutlicher Unterschied zum Wert vor der Applikation. Mit 200 μM ChT ergab sich für $rNa_V1.4$ Y401C eine signifikante, für $rNa_V1.4$ Y401C IFL eine tendenzielle Verschiebung von V_h zu positiveren Spannungen, für $hNa_V1.5$ IFL eine tendenzielle Verschiebung zu negativeren Spannungen und für $hNa_V1.5$ C373Y IFL kein deutlicher Unterschied nach der Applikation. Für $hNa_V1.5$ IFL ergab sich auch bei Spülen mit Badlösung ohne zusätzliche Substanzen eine signifikante Verschiebung

von V_h , welche der Verschiebung mit 200 μM ChT vergleichbar ist. Bei Spülen mit Badlösung betrug der Reststrom nach 200 s 0.932 ± 0.010 ($n=3$), mit 200 μM ChT 0.337 ± 0.017 ($n=7$). Für $\text{hNa}_V1.5$ IFL trat mit 1.5% H_2O_2 ein starker Stromverlust auf, ohne dass sich V_h ändert. Die Daten für V_h sind in den Tabellen A.1 und A24-A26 (Anhang) zusammengestellt.

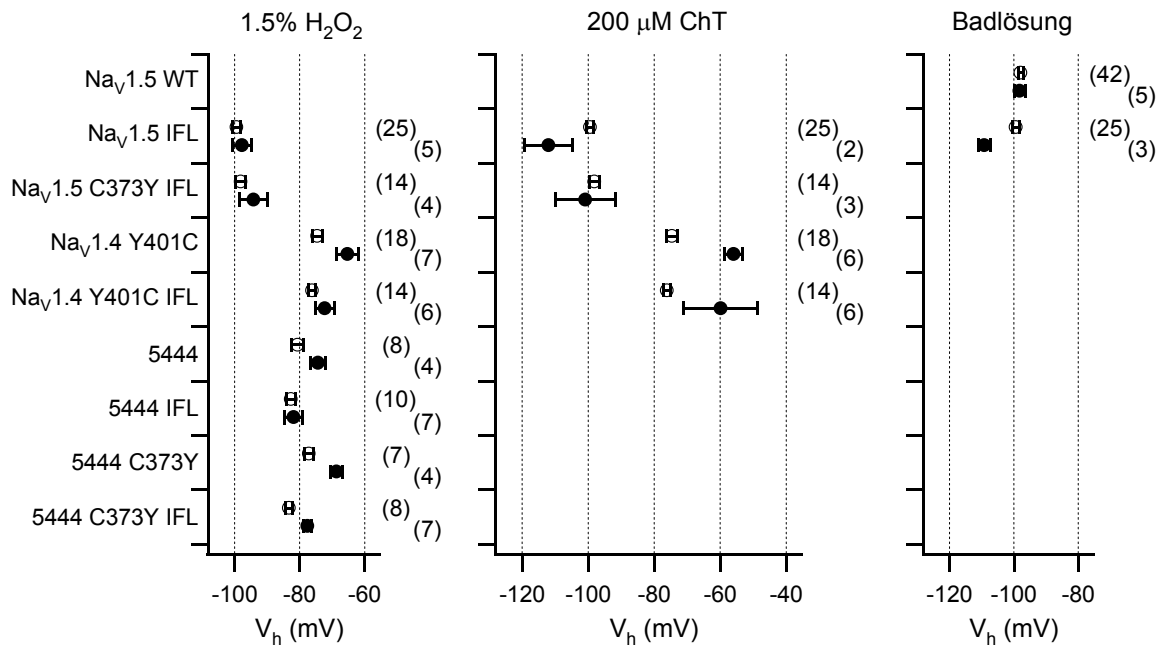


Abbildung 3.28:

Einfluss von Oxidantien auf die halbmaximale Spannung der Inaktivierung.

Halbmaximale Spannung der schnellen Inaktivierung (V_h) vor (weiße Kreise) und nach Applikation (schwarze Kreise) von 1.5% H_2O_2 , 200 μM ChT bzw. bei Spülkontrollen mit Badlösung ohne weitere Substanzen für die angegebenen Kanäle. Die Zeitspanne zwischen Applikation und der Aufzeichnung der Protokolle, aus deren Daten V_h nach Gl. 2.3 berechnet wurde, betrug für die Messungen mit H_2O_2 593-640 s, für ChT 594-627 s und für die Kontrollen 600-627 s.

3.2.4.2 Einfluss der Haltespannung auf die Reduktion des Spitzenstroms

Eine im Verlaufe eines Oxidationsexperimentes auftretende Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung zu einer negativeren Spannung kann die Verminderung des Spitzenstroms bei einer bestimmten Membranhaltenspannung (V_{mem}) bewirken, wenn bei dieser Spannung nach der Oxidation ein geringerer Anteil Kanäle aus der Inaktivierung in den geschlossenen Zustand übergeht als vorher. Die in Abb. 3.28 dargestellten Veränderungen der halbmaximalen Spannung der Inaktivierung verdeutlichen unter Berücksichtigung der tatsächlich bei den jeweiligen Kanälen auftretenden Veränderungen der maximalen Stromamplitude nach Applikation der Oxidantien (Abb. 3.20 und 3.25), dass V_h allein kein geeigneter Parameter zur Beschreibung des Stromverlustes ist. Daher wurde aus den Daten der Anpassungen der Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung der einzelnen Messungen der

relative Strom bei der Haltespannung (-120 mV) nach Gl. 2.3 berechnet. Als Basis dient der maximal mögliche Strom bei einem stark negativen Potenzial. Entscheidend für einen Stromverlust ist das Verhältnis des berechneten Reststroms nach Substanzapplikation zum berechneten Strom vor Applikation. Im Fall des alleinigen Einflusses der Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung auf den Stromverlust würde dieser Wert dem bei der Messung ermittelten Reststrom entsprechen. Analoge Berechnungen wurden für -140 mV sowie -100 mV durchgeführt und sind in Abb. 3.29 präsentiert.

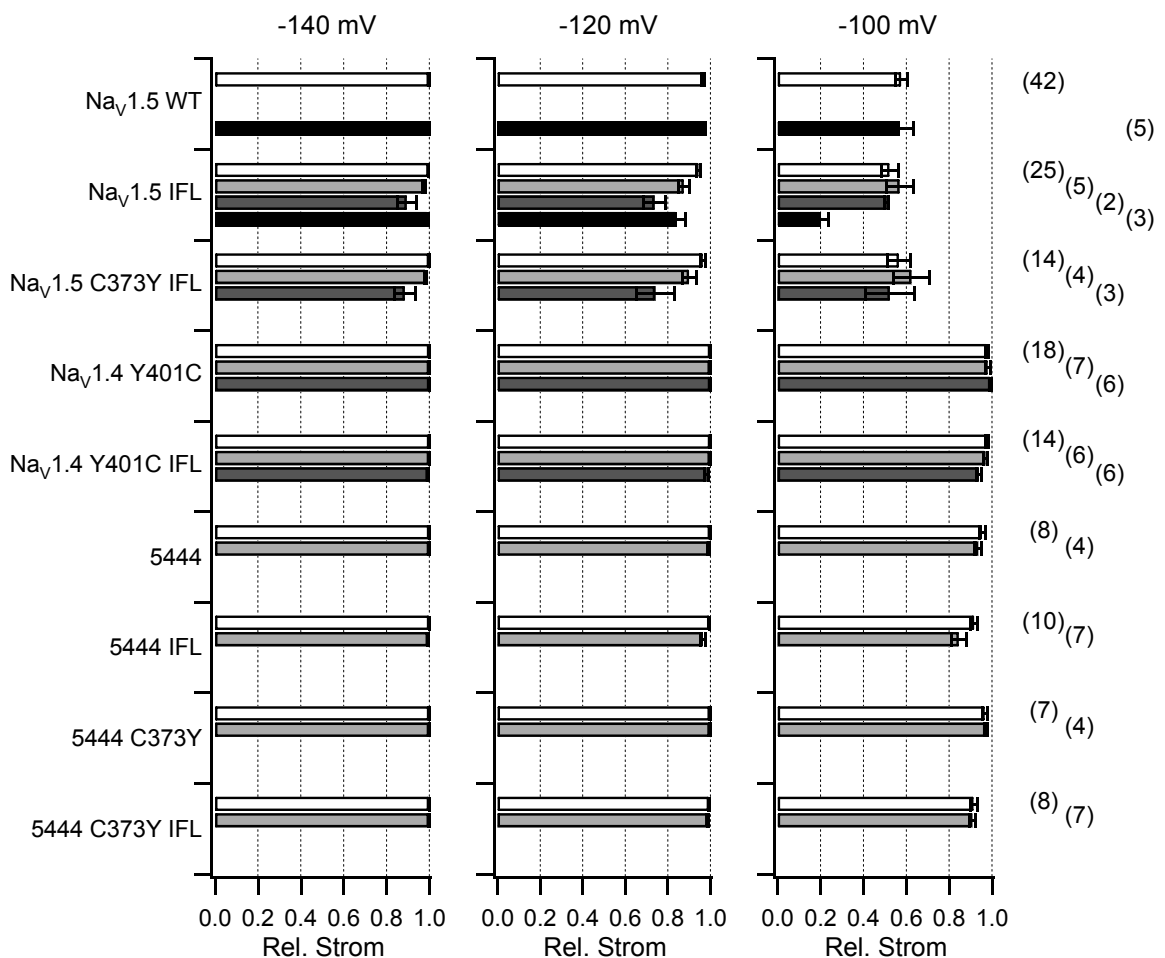


Abbildung 3.29:

Theoretischer Stromverlust durch Veränderung der Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung bei Oxidation. Berechneter relativer Reststrom vor Applikation (weiße Balken), 593-640 s nach Applikation von 1.5% H₂O₂ (hellgraue Balken), 594-627 s nach Applikation von 200 µM ChT (dunkelgraue Balken) und 600-627 s nach Spülen mit Badlösung (schwarze Balken) für die Haltespannungen -140 mV, -120 mV und -100 mV. Die angegebenen Zeitspannen gehen auf die Dauer zwischen der Substanzapplikation und dem Zeitpunkt zurück, zu welchem die Protokolle aufgezeichnet wurden, deren nach Gleichung 2.3 angepasste Daten zur Berechnung der hier gezeigten Restströme genutzt wurden. In Klammern ist jeweils die Anzahl unabhängiger Messungen angegeben, die der Berechnung zu Grunde liegen. Weitere Details zur Berechnung sind im Text beschrieben.

Der Einfluss von 1.5% H₂O₂ auf den theoretischen Reststrom war gering. Deutliche Verringerungen gegenüber dem berechneten Strom vor der Applikation gab es in keinem Fall.

Mit 200 μM ChT trat für hNav_v1.5 IFL und hNav_v1.5 C373Y IFL bei -140 mV und -120 mV jeweils eine tendenzielle Verringerung des berechneten Stroms gegenüber dem Wert vor der Applikation auf. Bei -100 mV war der Strom vor und nach Applikation gegenüber dem theoretischen Maximalwert um den gleichen Anteil verringert. Ein signifikanter Unterschied ($p < 0.05$) ergab sich für rNav_v1.4 Y401C IFL mit 200 μM ChT bei -100 mV Haltepotenzial. Auch die berechneten Stromwerte für das Spülen mit Badlösung bei hNav_v1.5 IFL wiesen einen signifikanten Unterschied auf. Der ermittelte theoretische Strom für hNav_v1.5 IFL und hNav_v1.5 C373Y IFL mit 1.5% H₂O₂ bzw. 200 μM ChT sowie die Werte vor der Substanzapplikation waren jeweils etwa gleich, da sich die Kanäle nur im Porencystein unterscheiden, welches auf die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung keinen Einfluss hat.

Um den Einfluss von V_{mem} auf den Stromverlust an Hand experimenteller Befunde beurteilen zu können, wurden mit hNav_v1.5 IFL und hNav_v1.5 C373Y IFL neben den bisher erfolgten Untersuchungen mit 200 μM ChT bei -120 mV Messungen bei -100 mV und -140 mV Haltespannung durchgeführt. Für die Messungen wurden Mutanten des Herzmuskelkanals ausgewählt, da sich bei diesen Unterschiede im zu erwartenden Reststrom bei verschiedenen Haltespannungen gezeigt hatten. Auf Grund der großen Wichtigkeit einer zeitlich exakt koordinierten Abfolge der Kontraktion des Herzens für den Organismus kommt Kanälen in der Herzmuskulatur eine hohe physiologische Bedeutung zu. Bereits geringe Änderungen im Leitverhalten der an der Herzmuskelkontraktion beteiligten Kanäle können lebensbeeinträchtigende Wirkungen haben (Hammarström & Gage 2002). Die Mutante hNav_v1.5 IFL stellt bezüglich des Stromverlustes durch oxidative Modifikation einen um den Effekt des Inaktivierungsverlustes bereinigten Herzmuskelwildtypkanal dar. Mit hNav_v1.5 C373Y IFL wurden zur Beurteilung des Einflusses des Porencysteins ebenfalls Messungen durchgeführt. Die Werte für den relativen Strom aus den Messungen, bei denen die Haltespannung -140 mV bzw. -100 mV betrug, sind in Abbildung 3.30 dargestellt.

Für hNav_v1.5 C373Y IFL fiel der Stromverlust bei -140 mV moderat, bei -120 mV etwas stärker aus, was mit den Berechnungen (Abb. 3.29) übereinstimmt. Bei hNav_v1.5 IFL war der Stromverlust bei -140 mV und -120 mV jeweils deutlich höher als bei hNav_v1.5 C373Y IFL und höher als die theoretisch zu erwartenden Werte durch die Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung, da der Einfluss des Porencysteins hinzu kam. Beide Kanäle zeigten bei einer Haltespannung von -100 mV einen starken Stromverlust, der bei hNav_v1.5 IFL etwa so hoch war wie bei -120 mV und bei hNav_v1.5 C373Y IFL den

Stromverlust bei -120 mV signifikant überstieg. Die Haltespannung von -100 mV kam physiologischen Bedingungen näher als -140 mV oder -120 mV. Der beobachtete hohe Stromverlust könnte darauf hinweisen, dass Veränderungen der Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung, wie hier beobachtet, bei oxidativem Stress drastische Konsequenzen auf die elektrischen Verhältnisse betroffener Gewebe und damit für den Organismus haben können.

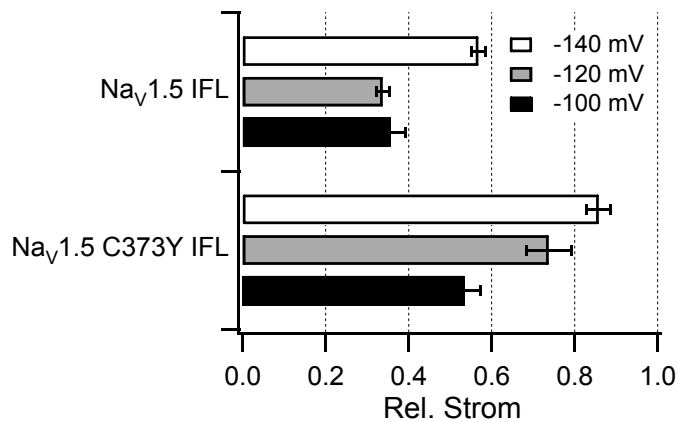


Abbildung 3.30:

- (7) Die Haltespannung beeinflusste den Stromverlust
 (7) Relativer Reststrom 200 s nach Applikation von 200 μ M ChT für die Mutanten hNa_v1.5 IFL und hNa_v1.5 C373Y IFL. Die Haltespannung betrug -140 mV (weiß), -120 mV (grau) bzw. -100 mV (schwarz). Die Anzahl unabhängiger Experimente ist jeweils in Klammern angegeben.

Die Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der schnellen Inaktivierung kann zum Verlust des Spitzenstroms beitragen. Besonders empfindlich für einen inaktivierungsbedingten Stromverlust sind Kanäle, bei denen V_h vor der Substanzapplikation bereits bei vergleichsweise negativen Werten liegt (siehe Abbildung 3.20 und 3.25). Strukturelle Faktoren mit Einfluss auf den Stromverlust, wie das Porencystein C373 oder Komponenten in Domäne 2 bei hNa_v1.5, können ebenfalls zum Stromverlust beitragen und den Effekt der veränderten Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung überlagern.

3.2.5 Einfluss von Einzelkanalparametern auf die Reduktion des Spitzenstroms

Verlust des Spitzenstroms kann auf die Verringerung der Anzahl leitender Kanäle oder des Einzelkanalstroms zurückgehen. Mittels nichtstationärer Rauschanalyse vor und nach Applikation von ChT wurde untersucht, welchen Einfluss oxidativer Stress auf Einzelkanalparameter hat. Durch oxidative Modifikation verringerten sich bei hNa_v1.5 IFL und hNa_v1.5 C373Y IFL der Einzelkanalstrom und die Offenwahrscheinlichkeit (Abb. 3.31 und Tabelle A.19, Anhang). Die Verminderung beider Parameter führt zur Abnahme des makroskopischen Stroms. Aussagen über die Veränderung der Anzahl der Kanäle sind nicht möglich, da dieser Parameter zur Anpassung der nach Applikation von 200 μ M ChT gewonnenen Daten meist festgehalten werden musste. Eine Verminderung der Anzahl funktionaler Kanäle würde ebenfalls eine Verringerung des makroskopischen Spitzenstroms bewirken.

Der auf den Wert vor Applikation normierte Einzelkanalstrom nach Oxidation durch 200 μ M ChT war mit 0.549 ± 0.066 ($n=7$) und 0.518 ± 0.069 ($n=7$) für die Haltespannungen -100 mV und -140 mV für hNav_v1.5 IFL niedriger als für hNav_v1.5 C373Y IFL mit 0.709 ± 0.067 ($n=4$) und 0.821 ± 0.051 ($n=3$). Der Unterschied zu hNav_v1.5 C373Y IFL bei -140 mV war signifikant ($p < 0.05$). Für die Offenwahrscheinlichkeit ergaben sich Verhältnisse bei -100 mV von 0.216 ± 0.025 ($n=7$) für hNav_v1.5 IFL und 0.245 ± 0.038 ($n=4$) für hNav_v1.5 C373Y IFL gegenüber 0.476 ± 0.071 ($n=7$) und 0.661 ± 0.083 ($n=3$) bei -140 mV. Die Unterschiede für beide Kanäle bei -100 mV differierten jeweils signifikant ($p < 0.05$) von denen bei -140 mV.

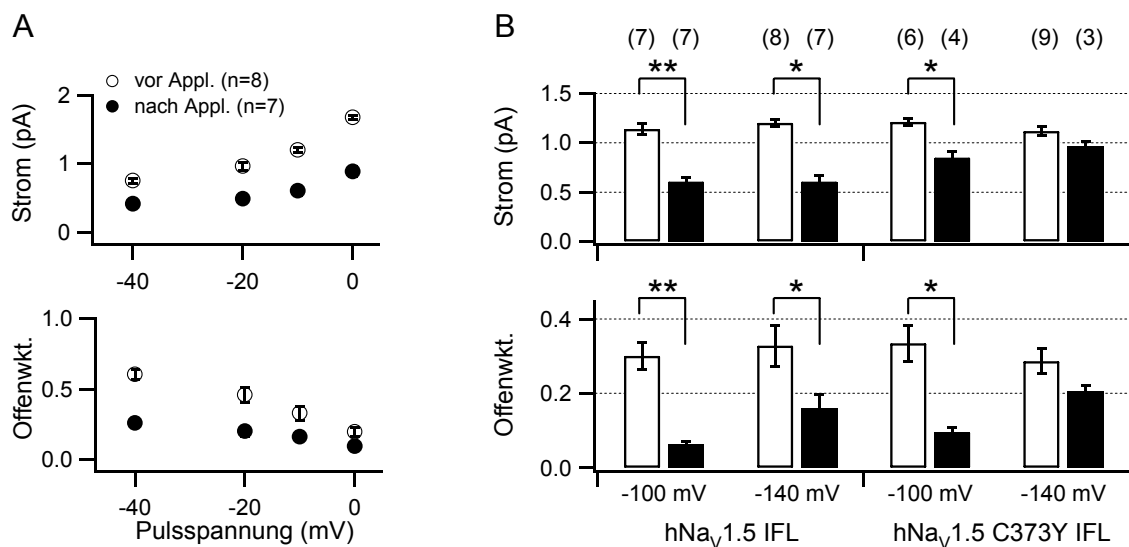


Abbildung 3.31:

Einfluss von Chloramin T auf Einzelkanalparameter

A. Einzelkanalstrom (oben) und Offenwahrscheinlichkeit (unten) für hNav_v1.5 IFL vor (weiße Kreise) und nach Applikation von 200 μ M ChT (schwarze Kreise), ermittelt durch Pulse auf die angegebenen Spannungen. Die Haltespannung während der Oxidationsphase betrug -140 mV. **B.** Einzelkanalstrom (oben) und Offenwahrscheinlichkeit (unten), ermittelt durch Pulse auf -10 mV, vor (weiße Balken) und nach Applikation von 200 μ M ChT (schwarze Balken) für die angegebenen Mutanten und Haltespannungen während der Oxidationsphase. ChT wurde jeweils nach 350 s mit 1 mM DTT in Badlösung ausgewaschen, bevor die Protokolle für die Rauschanalyse nach Oxidation aufgezeichnet wurden. In Klammern steht die Anzahl unabhängiger Experimente. Die Signifikanz der Unterschiede ist mit Sternchen angegeben: ein Stern: $p < 0.05$, zwei Sterne: $p < 0.001$.

Die Ergebnisse der nichtstationären Rauschanalyse belegen die Bedeutung des Cysteins an Position 373 innerhalb der Pore beim Verlust des Spitzenstroms. Da ohne C373 die Effekte abgemildert, aber nicht beseitigt wurden, verdeutlichen sie ebenfalls, dass es weitere Einflussfaktoren gibt. Eine weniger negative Haltespannung bewirkte eine niedrigere Offenwahrscheinlichkeit nach Applikation von ChT. Dieser Effekt könnte in Kardiomyozyten bei physiologischer Membranspannung stark zur Abnahme des transienten Spitzenstroms bei oxidativem Stress beitragen.

4. Diskussion

4.1 Einfluss oxidierender Substanzen auf die schnelle Inaktivierung spannungsgesteuerter Natriumkanäle

4.1.1 Identifizierung oxidationssensitiver Aminosäuren mit Einfluss auf die schnelle Inaktivierung

Reaktive Sauerstoffverbindungen (ROS) werden in lebenden Zellen ständig gebildet. Unter normalen physiologischen Bedingungen wird ihre Konzentration durch antioxidative Schutzmechanismen effektiv kontrolliert, entstandene Schäden werden repariert (Hoshi & Heinemann 2001). Bei zahlreichen krankhaften Veränderungen, besonders in Extremsituationen wie Herzinfarkt und Schlaganfall, die mit Ischämie einhergehen (Lipton 1999), und im Alter ist der antioxidative Schutz unzureichend. Als Folge treten Modifikationen an zellulären Makromolekülen auf (Mary et al. 2004). Eine besondere Rolle spielen die schwefelhaltigen Seitenketten der Aminosäuren Cystein und Methionin, bei denen oxidative Modifikationen biologisch reversibel sind (Berlett & Stadtman 1997). Für spannungsgesteuerte Natriumkanäle (Na_V -Kanäle) als Initiatoren von Aktionspotenzialen ist eine exakt kontrollierte Funktionsweise unerlässlich. ROS können Eigenschaften von Na_V -Kanälen modifizieren (Quiñonez et al. 1999) und damit Einfluss auf essentielle Vorgänge wie die Signalübertragung bei Neuronen und die zeitliche Koordination des Herzschlags nehmen (Catterall et al. 2007).

In der vorliegenden Arbeit wurden Na_V -Kanalgene in HEK-293-Zellen heterolog exprimiert und im Verlauf elektrophysiologischer Messungen durch Applikation des milden Oxidans Chloramin T (ChT) oxidativem Stress ausgesetzt. Es wurden Veränderungen von Kanaleigenschaften ermittelt. Für den Verlust der schnellen Inaktivierung und die Verringerung des Spitzenstroms wurden molekulare Grundlagen identifiziert bzw. eingegrenzt.

Beim Skelettmuskelnatriumkanal $\text{rNa}_V1.4$ wurden eine Vielzahl von Parametern, wie Schalteigenschaften und der Spitzenstrom, beeinflusst. Der prominenteste Effekt mit 200 μM ChT war der Verlust der schnellen Inaktivierung, welcher durch höhere ChT-Konzentration und längere Expositionsdauer verstärkt wurde. Der Inaktivierungsverlust erfolgte bei weiteren Na_V -Wildtypkanälen, $\text{rNa}_V1.2$ aus dem Zentralnervensystem, der Mutante $\text{hNa}_V1.5$ C373Y des Herzmuskelnatriumkanals und $\text{hNa}_V1.7$ aus dem peripheren Nervensystem, ähnlich schnell, was als Hinweis darauf angesehen werden kann, dass die zu Grunde liegenden

Strukturen bei diesen Kanälen konserviert sind. Die Natriumströme bei DRG-Neuronen sind wahrscheinlich deutlich sensitiver gegenüber oxidativem Stress. Nav1.8 ist in HEK-293-Zellen nicht exprimierbar, für die weitere Aufklärung könnte die Expression von Abschnitten des Kanals im Hintergrund eines gut exprimierenden anderen Kanals sinnvoll sein.

Unter physiologischen Bedingungen modifiziert ChT Cystein und Methionin (Shechter et al. 1975). Quiñonez et al. (1999) hatten an Krötenmuskelfasern gezeigt, dass am Inaktivierungsverlust, welcher durch Oxidantien bei den dortigen Natriumkanälen ausgelöst wurde, keine Cysteinreste beteiligt sind. Die Autoren vermuteten Methioninreste als relevante Zielstellen. In der vorliegenden Arbeit war der Inaktivierungsverlust bei rNav1.4 durch Spülen mit DTT-haltiger Badlösung nicht reversibel, was auf kovalente Modifikation von Methioninen hinweist. Im Gegensatz zu Cystein, für das spezifische Reagenzien existieren, kann bei Veränderungen, die auf Methioninreste abzielen, die Modifikation anderer Aminosäuren nicht ausgeschlossen werden. Der Nachweis der Beteiligung bestimmter Methionine an Effekten kann durch mutagenesebasierte Ansätze erbracht werden (Kassmann et al. 2008). Per Punktmutagenese wurden potenziell relevante Methioninreste bei rNav1.4 durch Leucin ersetzt, welches durch ChT unter den Bedingungen der Experimente nicht verändert wird.

Als Methionin mit starkem Einfluss auf die Oxidationssensitivität des Inaktivierungsverlustes wurde M1305 im IFM-Inaktivierungsmotiv identifiziert. Bei rNav1.4 IFL erfolgte der Verlust der schnellen Inaktivierung mit ChT deutlich langsamer als beim Wildtypkanal. Eaholtz et al. (1994) haben mit synthetischen Peptiden gezeigt, dass mit Methioninsulfoxid anstelle von Methionin im IFM-Motiv die Inaktivierung beeinträchtigt ist. Wang & Wang (2002) fanden für die Mutante IFI, bei der Methionin durch das oxidationsresistentere Isoleucin ersetzt wurde, bei Behandlung mit UV-Strahlung oder H₂O₂ keine veränderte Sensitivität gegenüber dem Wildtyp. Der Einfluss des Methionins im IFM-Motiv auf die Sensitivität gegenüber Oxidation durch ChT konnte in der vorliegenden Arbeit für zahlreiche Kanäle und Mutanten gezeigt werden. Das Ersetzen von M1305 durch Leucin verzögerte den Inaktivierungsverlust, verhinderte ihn aber nicht. Daher wurde der mögliche Beitrag weiterer Methionine, welche in Bereichen des Kanalproteins liegen, die als Rezeptor für das IFM-Motiv betrachtet werden, analysiert. M1470 aus dem Doppel-Methionin-Motiv im S4-S5-Verbindungsstück in Domäne 4 trug ebenfalls stark zum Verlust der schnellen Inaktivierung bei oxidativem Stress bei. Deutlich geringeren Einfluss hatten M1469 sowie die weiteren vier untersuchten Methioninreste M442, M1139, M1154 und M1316 (Abb. 4.1). Kombinationsmutanten wie IFL-LL oder IFL-6L, bei denen jeweils mehrere der am Inaktivierungsverlust beteiligten

Methionine durch Leucin ersetzt wurden, führten zur weiteren Verringerung der Oxidations-sensitivität der Inaktivierung gegenüber den Ausgangsmutanten (Kassmann et al. 2008).

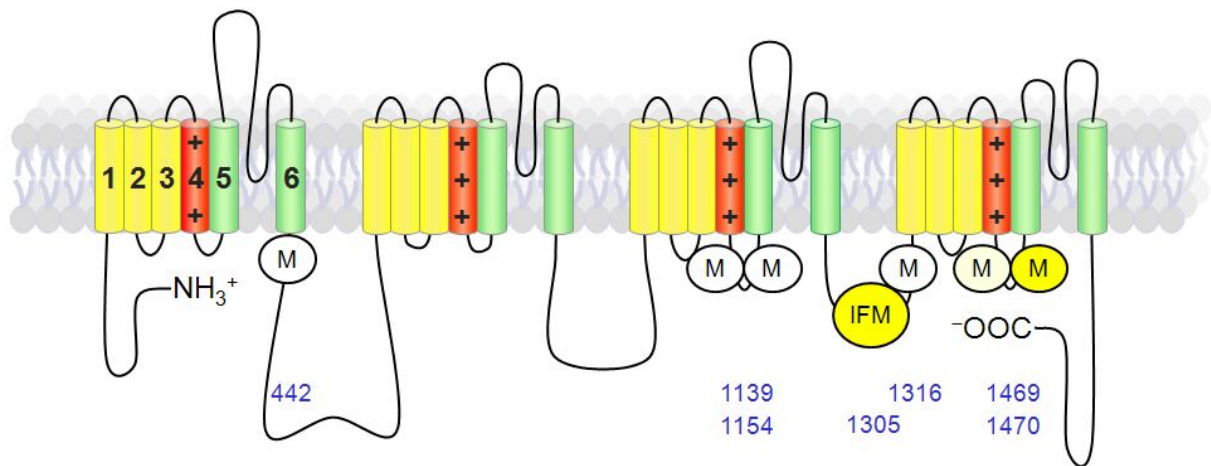


Abbildung 4.1:

Kanal α -Untereinheit von $rNa_v1.4$.

Hervorgehoben sind M1305/das IFM-Inaktivierungsmotiv und M1470, für die jeweils ein großer Beitrag zur Oxidationssensitivität der Inaktivierung ermittelt wurde. Zu einem geringeren Teil trägt M1469 und zu einem noch geringeren Teil tragen M442, M1139, M1154 und M1316 gemeinsam bei.

Nach Smith & Goldin (1997) stört eine Modifikation bei einer der Domänen die Interaktion des Inaktivierungsmotivs mit einer der möglichen Rezeptorstellen, eine Modifikation am Inaktivierungsmotiv hat jedoch Einfluss auf die Interaktion mit allen Rezeptorstellen. Damit ist die große Bedeutung des IFM-Motivs erklärbar. Die hohen Unterschiede im Beitrag der einzelnen Methionine zum Inaktivierungsverlust könnten auch in der unterschiedlichen Oxidationsempfindlichkeit der Methioninreste in einem Protein liegen. Beispielsweise können die Oberflächenexponiertheit und benachbarte Reste modulierend wirken (von Eckardstein et al. 1991). ChT liegt bei pH 7.4 fast ausschließlich dissoziiert vor (Bishop & Jennings 1958) und kommt an hydrophobe Abschnitte eines Proteins weniger gut heran. Dadurch bedingte unterschiedlich lange Diffusionswege könnten für Unterschiede der Oxidationssensitivitäten ebenfalls von Bedeutung sein.

Im Fall des Doppel-Methionin-Motivs M1469/M1470 findet nach den Ergebnissen dieser Arbeit die hydrophobe Interaktion wahrscheinlich vorrangig mit M1470 statt. Die sterische Nähe von M1469 wirkt jedoch im Fall von dessen oxidativer Modifikation möglicherweise störend. Filatov et al. (1998) vertraten die These, dass die beiden Methionine unabhängig voneinander am Inaktivierungsprozess beteiligt sind, da geladene Mutationen an einer der beiden Stellen jeweils die Inaktivierung stark beeinträchtigen. Nach Lerche et al. (1997a) geht der stärkere Effekt auf die vordere Position zurück.

Der Inaktivierungsindex von IFL-6L, der Mutante, bei der alle betrachteten Methionine durch Leucin ersetzt sind und ihr Einfluss auf die Oxidationssensitivität damit ausgeschaltet ist, liegt nahe eins, erreicht eins jedoch nicht. Somit müssen weitere Faktoren zum Verlust der Inaktivierung bei rNav_v1.4 beitragen. Der Anteil der weiteren Faktoren ist gering gegenüber dem der Methionine M1305 und M1470. Ursachen für die verbleibende Sensitivität könnten weitere konservierte Methionine im C-Terminus des Kanalproteins sein. Mutationen an der M1585 bei rNav_v1.4 äquivalenten Position im S6-Segment von Domäne 4 sind dafür bekannt, Hyperkalämische Periodische Paralyse auszulösen (Cannon & Strittmatter 1993). Auch ein Beitrag von Cysteinen kann nicht ausgeschlossen werden, da die Möglichkeit besteht, dass deren potenzielle Beteiligung am Inaktivierungsverlust durch die geringe Größenordnung des Effektes bei Experimenten mit Cysteinmodifikatoren nicht erkennbar wird.

Der bei den dargestellten Oxidationsexperimenten auftretende Inaktivierungsverlust war deutlich stärker und erfolgte schneller, als es in lebenden Zellen der Fall wäre. Als experimentelle Notwendigkeit wurden entsprechend hohe Konzentrationen an Oxidantien eingesetzt, um unterscheidbare Effekte während der Dauer der elektrophysiologischen Messungen auch bei Mutanten mit verringerter Oxidationssensitivität zu erhalten. Unter physiologischen Bedingungen treten derart starke Inaktivierungsverluste nicht auf. Der Anteil des persistenten Stroms beträgt unter normalen Bedingungen bis etwa 1% (Hammarström & Gage 2002). Sakmann et al. (2000) und Hammarström & Gage (2002) beschreiben für Kardiomyozyten und Neurone, dass bereits eine geringfügige Erhöhung persistenter Natriumströme drastische Auswirkungen für das Überleben des Organismus haben kann. Viele der Mutationen, die durch gestörte Inaktivierung von Nav-Kanälen zu muskulären Erkrankungen, wie Hyperkalämischer Periodischer Paralyse oder Paramyotonia Congenita, oder zu LQT3-Syndrom führen, sind dominant (Lerche et al. 1997b, Catterall 2000), da wenige Prozent nicht-inaktivierenden Natriumstroms zur Hypererregbarkeit der Nav-Kanäle führen. Cannon et al. (1993) präsentierten ein Modell, welches beschreibt, wie geringe persistente Ströme zu repetitiven Depolarisationen und Paralyse führen können. Ein Inaktivierungsverlust von 2% durch das Anemone-Toxin ATXII löste Myotonie aus (Cannon & Corey 1993). Weniger als 5% nicht-inaktivierender Natriumkanäle können eine Zelle depolarisieren und zur fortgesetzten Inaktivierung von Nav-Kanälen führen (Rojas et al. 1991). Die schnelle und vollständige Inaktivierung ist offensichtlich absolut notwendig für eine normale physiologische Funktion erregbarer Zellen *in vivo* (Catterall 2000).

4.1.2 Inaktivierungsmotive mit erhöhter Oxidationssensitivität

Der Insektennatriumkanal *para*, beispielweise bei *Drosophila*-Arten vorkommend, besitzt ein Inaktivierungsmotiv der Form MFM statt dem IFM der Säuger- Na_v -Kanäle. Das Konzept des Inaktivierungsverlustes als Störung der hydrophoben Wechselwirkung zwischen dem Inaktivierungsmotiv und dem Rezeptor führte zur Vermutung, dass ein Kanal mit dem MFM-Motiv, welches eine leicht oxidierbare Aminosäure mehr enthält als der Wildtyp, zu einer höheren Oxidationssensitivität des Kanals führen könnte. Diese höhere Sensitivität des Inaktivierungsverlustes bei Applikation von Oxidantien wurde experimentell bestätigt. Als möglichen Ausgleich besitzt *para* anstelle des Doppel-Methionin-Motivs ein Alanin-Methionin-Motiv, also eine leicht oxidierbare Aminosäure im Rezeptor weniger. Die Mutante $\text{rNa}_v1.4$ MFM-LM ist sensitiver als der Wildtyp, direkte Vergleiche zu *para* sind allerdings nur begrenzt möglich, da sich die Kanäle in weiteren Bereichen unterscheiden.

Die erhöhte Oxidationssensitivität von MFM führte zur Hypothese, dass bei Kanälen, deren Inaktivierungsmotiv auch anstelle des Phenylalanins Methionin enthält, der Inaktivierungsverlust noch schneller verläuft. Die Mutante MMM-L erwies sich als signifikant sensitiver gegenüber ChT als MFM. Das Einführen von Cysteinresten in das Inaktivierungsmotiv führte ebenfalls zu hochgradig oxidations sensitiven Kanälen. Der Inaktivierungsverlust bei ICM-L erfolgte nochmals schneller als bei MMM-L. Neben der möglichen leichteren Oxidierbarkeit von Cystein besteht bei ICM-L auch die Option, dass durch das Cystein die Sensitivität des benachbarten Methionins erhöht wird und der Kanal aus diesem Grund sensitiver auf Oxidantien reagiert. Eine Möglichkeit der Unterscheidung zwischen diesen beiden Mechanismen bieten Mutante der Form ICL-L oder IFC-L. IFC-L reagierte hochsensitiv auf H_2O_2 , der Inaktivierungsverlust war mit DTT reversibel. Dies ist ein Indiz dafür, dass die hohe Oxidationssensitivität bei Inaktivierungsmotiven, welche Cystein enthalten, tatsächlich auf Modifikationen am Cystein zurückzuführen ist.

Bei ICM-L trat vor Applikation von ChT persistenter Strom von mehr als 10% des transienten Stroms auf. Deschenes et al. (1999) beschrieben die unvollständige Inaktivierung für CFM und schlussfolgerten, dass neben dem Methionin auch das Isoleucin zur Stabilisierung des inaktivierten Zustands beiträgt. Kellenberger et al. (1997) vermuteten ebenfalls eine Destabilisierung des inaktivierten Zustands und sie zeigten, dass die unvollständige Inaktivierung bei ICM mit einer Veränderung der Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung einhergeht. In der vorliegenden Arbeit sind die Werte der halbmaximalen Spannung der

Inaktivierung für MMM-L, ICM-L und IFC-L etwa 12-17 mV positiver als für IFM-L. Die Werte für die halbmaximale Spannung der Aktivierung unterscheiden sich nur sehr gering.

Von West et al. (1992), Eaholtz et al. (1994) und Kellenberger et al. (1997) wurde die Bedeutung der einzelnen Aminosäurereste im Inaktivierungsmotiv untersucht, indem sie einzeln oder gemeinsam durch andere Aminosäuren, beispielsweise Glutamin, ersetzt wurden. Mit Mutanten, bei welchen Methionin und Cystein in bestimmten Kombinationen im Inaktivierungsmotiv vorhanden sind, wäre die Analyse der Bedeutung oxidativer Modifikationen an jeder einzelnen Position möglich. Auf Grund der teilweise extremen Empfindlichkeit der Inaktivierung derart veränderter Kanäle und der Möglichkeit, den Inaktivierungsverlust bei elektrophysiologischen Experimenten unmittelbar zu bestimmen, könnte sich die vielversprechende Einsatzmöglichkeit als biotechnologisches Instrument zur Detektion von ROS in lebenden Zellen bieten.

4.1.3 Kinetische Untersuchungen des Inaktivierungsverlustes

Der Verlauf des Inaktivierungsindex bei $r\text{Na}_v1.4$ nach Applikation von ChT zeigte eine sigmoidale Form. Bei Experimenten mit unterbrochener Präsenz der Oxidantien konnte gezeigt werden, dass diese Form ein Charakteristikum des Kanalproteins ist. Die mathematische Beschreibung des Zeitverlaufs des Inaktivierungsverlustes mit einer einfachen exponentiellen Funktion war nicht sinnvoll. Die Anpassung konnte durch Einführen eines Exponenten als zusätzliche Variable erfolgreich durchgeführt werden.

Die Beteiligung von mindestens zwei Methioninresten am Verlust der schnellen Inaktivierung bei Muskelfasern der Kröte wurde von Quiñonez et al. (1999) vermutet. Im hier genutzten hochkontrollierten heterologen Expressionssystem stellte sich der Inaktivierungsverlust als mehrschrittiger Prozess dar, bei dem das Methionin im IFM-Motiv und weitere Methionine im Rezeptor, besonders M1470 in Domäne 4, oxidiert werden müssen (Kassman et al. 2008). Bei freier Anpassung des Zeitverlaufs des Inaktivierungsverlustes nach Gleichung 2.5 liegen die Exponenten für den Skelettmuskelwildtypkanal hauptsächlich zwischen 2.5 und 3. Für IFL liegen sie etwa eine Einheit niedriger und für IFL-6L streuen sie um einen Wert von eins.

Eine Erklärung dafür könnte sein, dass für den Inaktivierungsverlust sowohl das Methionin im IFM-Motiv, als auch weitere Methionine im Rezeptor oxidiert werden müssen. Bei Ersetzen dieser Methionine durch das weniger leicht oxidierbare Leucin sinken die Wahrscheinlichkeit für ein Oxidationsereignis und die Oxidationssensitivität des entsprechenden mutierten Kanals

(Kassmann et al. 2008). Der Exponent bei Gleichung 2.5 könnte ein Maß für die Anzahl zu oxidierender Stellen am Kanal sein. Etwa eine Einheit würde auf M1305 entfallen, nahezu eine weitere auf Methioninreste im Rezeptor. Die verbleibende Einheit könnte einen Basiswert für die Oxidationssensitivität der Kanäle darstellen, welcher noch zu charakterisieren ist. Gestützt wird diese Hypothese, da selbst bei der am höchsten substituierten Mutante, IFL-6L, der Inaktivierungsverlust nach längerer Zeit mit 1 mM ChT vollständig zu werden scheint.

Für den Wildtyp und die meisten Methionin-Leucin-Mutanten standen der Exponent von Gleichung 2.5 und die Zeitkonstante des Inaktivierungsverlustes in reziprokem Verhältnis. Je mehr inaktivierungsrelevante Methionine ersetzt wurden, desto niedriger war der Exponent und desto langsamer erfolgte der Inaktivierungsverlust. Ausnahmen bilden MFM und MMM-L. Wahrscheinlich genügt für den Inaktivierungsverlust eine einzelne oxidative Veränderung am Inaktivierungsmotiv, unabhängig davon, welchen der zwei bzw. drei Reste sie betrifft. Dieser Effekt könnte durch die drei nebeneinander liegenden Methionine bei MMM-L mit der größeren Abweichung vom reziproken Bereich stärker ausgeprägt sein, als bei MFM mit dem dazwischenliegenden Phenylalanin. Die Anzahl der für den Inaktivierungsverlust zu modifizierenden Zielstellen wäre bei MFM und MMM-L gegenüber dem Wildtypkanal unverändert, was sich in nur geringfügig verschiedenen Exponenten äußert. Da jedoch eine größere Anzahl potenzieller Oxidationsziele im Inaktivierungsmotiv existierte, verlief der Inaktivierungsverlust schneller, die Zeitkonstante war geringer als bei rNa_v1.4 WT.

4.1.4 Effekte weiterer Oxidantien auf die schnelle Inaktivierung spannungsgesteuerter Natriumkanäle

Entgegen den Ergebnissen von Wang & Wang (2002) wurde mit 1.5% H₂O₂ für fast alle untersuchten Kanäle mit IFL-Motiv eine signifikant geringere Oxidationsempfindlichkeit des Inaktivierungsverlustes gegenüber dem jeweiligen Ausgangskanal ermittelt. Möglicherweise traten bei Wang & Wang (2002) die Unterschiede zwischen der Mutante IFI und dem Wildtypkanal während der zehnminütigen Versuchsdauer noch nicht deutlich genug hervor.

Mit 1.5% H₂O₂ ergaben sich zwischen verschiedenen Kanälen stärkere Unterschiede, als für 200 µM ChT ermittelt wurden. Insbesondere ist der Inaktivierungsverlust des Herzmuskelnatriumkanals hNa_v1.5 sowie der Mutante hNa_v1.5 C373Y signifikant höher als beim Skelettmuskelkanal rNa_v1.4. Obwohl auch der Inaktivierungsindex von rNa_v1.4 Y401C 500 s nach Applikation von 1.5% H₂O₂ signifikant niedriger ist, als der von rNa_v1.4, kann das

Cystein an Position 373 bei hNav_v1.5 nicht die alleinige Ursache für die höhere Oxidationssensitivität sein. Die verhältnismäßig höhere Empfindlichkeit von hNav_v1.5 lässt darauf schließen, dass die oxidative Wirkung von H₂O₂ im Herzen möglicherweise drastischere Folgen hat, als ROS, welche auf Chloramine zurückgehen.

Kassmann et al. (2008) zeigten übereinstimmend mit den in der vorliegenden Arbeit für ChT erhaltenen Ergebnissen mit dem intrazellulär applizierten Oxidationsmittel Lucifer Yellow für IFL, IFM-LL, IFL-LL und IFM-6L eine geringere Oxidationssensitivität als für rNav_v1.4 WT.

4.1.5 Bedeutung von Methioninsulfoxidreduktasen bei der Kontrolle der schnellen Inaktivierung spannungsgesteuerter Natriumkanäle

Für Kaliumkanäle gibt es Hinweise, dass die Inaktivierung durch den Oxidationszustand von Methioninen unter Mitwirkung von Methioninsulfoxidreduktasen (MSRs) beeinflusst wird. Koexpression von Shaker C/B mit MSRA verhinderte den Verlust der schnellen Inaktivierung (Ciorba et al. 1997). Bei Su et al. (2007) verringerte sich die Sensitivität des hERG-Kaliumkanals bei Gegenwart von MSRA in der Pipettenlösung. Mehrere oxidationsempfindliche Methioninreste, wie für Nav-Kanäle identifiziert, würden eine sehr fein abgestufte Steuerung der Inaktivierung ermöglichen. Eine Funktion bei der Feinregulation von Prozessen wie der neuronalen Aktionspotenzialfrequenz oder der Herzkontraktion als Adaptation auf oxidativen Stress wären denkbar (Kassmann et al. 2008). Beispielsweise geht repetitive Aktivität im Zentralnervensystem möglicherweise auf persistenten Natriumstrom zurück (Rybak et al. 2003), dessen Intensität stark kontrolliert werden müsste. Für die in Nervengewebe exprimierten Kaliumkanäle hERG2 und hERG3 wird eine Beteiligung an der zellulären Erregbarkeit vermutet (Schwarz & Bauer 2004), welche im Zusammenspiel mit Nav-Kanälen stattfinden könnte.

Dass MSRA unter den Bedingungen elektrophysiologischer Experimente, speziell bezüglich Konzentration, Temperatur und Gegenwart von ChT, MetO reduzieren kann, wurde mit einem Aktivitätstest gezeigt. Selbst mit der geringeren Dauer der Experimente gegenüber dem Aktivitätstest und einer etwas niedrigeren MSRA-Konzentration wäre die Reduktion eines Teils der Methionine am Kanal und damit eine teilweise Wiederherstellung der Inaktivierung möglich.

Für einen regulatorischen Mechanismus durch Oxidation und Reduktion von Methioninresten wurden verschiedene Bedingungen formuliert. Nach Hoshi & Heinemann (2001) sollten die

betreffenden Methionine deutlichen Einfluss auf die Aktivität des Proteins haben. Diese Forderung ist für M1305 und M1470 bezüglich der Vollständigkeit der schnellen Inaktivierung erfüllt. Nach Hansel et al. (2005) soll das Protein zumindest eine gewisse Zeit gegenüber Degradation resistent, die Oxidationsprozesse auf Methioninreste beschränkt und die oxidierten Methionine für MSRs zugänglich sein. Dass betroffene Kanäle nicht sofort eliminiert werden, scheint durch das länger andauernde Auftreten persistenten Stroms, beispielsweise nach Ischämie, gesichert. Flavinhaltige Monooxygenasen in Leber- und Nierenmikrosomen oxidieren NADPH-abhängig Methioninreste bei Modellpeptiden und bevorzugen dabei jeweils eines der Enantiomere. Die physiologische Bedeutung ist bisher unbekannt, eine regulative Funktion ist wahrscheinlich (Duescher et al. 1994).

Die Wiederherstellung der Inaktivierung durch MSRs trat in keinem der Experimente in dieser Arbeit auf. Yermolaieva et al. (2004) vermuteten, dass ein großer Teil der oxidierbaren Methionine für MSRA funktional unzugänglich sein könnte. Für einige der für die Inaktivierung wichtigen Methionine gibt es Hinweise auf sterische Hinderung. Vedantham & Cannon (1998, 1999) beschrieben für rNav1.4 ICM, dass das Cystein bei hyperpolarisierter Membran für cysteinspezifische Reagenzien zugänglich ist, im inaktivierten Zustand jedoch nicht. Rohl et al. (1999) schlugen eine Struktur vor, bei der das Methionin des IFM-Motivs eine hydrophobe Aggregation mit einer α -Helix aus Aminosäuren, welche C-terminal vom Inaktivierungsmotiv liegen und auch M1316 enthalten, bildet. In diese Struktur könnten die sulfhydrylspezifischen MTS-Reagenzien von Vedantham & Cannon (1999) möglicherweise eindringen. Den wesentlich größeren MSRs, welche zudem das Methionin im IFM-Motiv mit ihrem aktiven Zentrum erreichen müssten, könnte auf Grund der räumlichen Verhältnisse der Zutritt verwehrt bleiben. Filatov et al. (1998) zeigten an Hand von Cysteinmutanten, dass die beiden Reste M1469 und M1470 im Doppel-Methionin-Motiv für Sulfhydrylreagenzien zugänglich sind. Die benachbarten Reste L1468 und S1471 sind jedoch unzugänglich. Die vorgeschlagene α -helikale Sekundärstruktur für diesen Abschnitt des Kanals könnte die Zugänglichkeit der beiden Methionine für MSRs ermöglichen. Nach Filatov et al. (1998) und Lerche et al. (1997a) liegen die beiden Methionine und das Leucin sowie das Serin auf unterschiedlichen Seiten der Helix. Ebenso ist jedoch denkbar, dass MSRs als große Proteine für eine enzymatische Reduktion an beide Reste nicht ausreichend herankommen.

Möglicherweise ist die Aktivität von Methioninsulfoxidreduktasen *in vivo* auf die Reduktion von freiem MetO und besonders gut exponierten oxidierten Methioninen beschränkt. Levine et al. (1996, 1999) haben das Konzept der Funktion bestimmter Methioninreste als endogene

Antioxidantien etabliert. Methionine haben an der Oberfläche von Proteinen zum Teil mit bis zu 100 mM eine sehr hohe lokale Konzentration und stellen effiziente Oxidantienfänger dar. Die Autoren zeigten für die Glutaminsynthetase von *E. coli* und Requena et al. (2004) für ein Prion-Protein, dass oberflächenexponierte, leicht zugängliche und oxidierbare Methioninreste in einer Weise angeordnet sind, dass wahrscheinlich kritische Stellen am Protein vor Oxidantien geschützt werden. Bei α_2 -Makroglobulin wird ein für die Enzymaktivität kritisches Tryptophan durch Methionine geschützt (Reddy et al. 1994). Die Oxidation vieler dieser exponierten Methioninreste hat kaum Einfluss auf die Struktur, Proteolyserate oder Aktivität der Proteine. Die Reduktion dieser Methionine durch MSRs könnte die antioxidative Kapazität erhöhen. Im Gegensatz dazu schlugen Bourdon et al. (2005) vor, dass vor allem Cystein als Radikalfänger dient, während Methionin als Chelator für Metallionen agiert.

Mit den vorliegenden Daten kann eine Reparatur der betrachteten Methioninreste bei rNav1.4 nicht belegt werden. Koexpression des K⁺-Kanals ShC/B mit MSRA und/oder MSRB beschleunigte die Inaktivierung und reduzierte die Variabilität des Inaktivierungsverlaufes, indem das Methionin an Position 3 im reduzierten Zustand gehalten wird. Ein synthetisches Peptid mit der Sequenz des N-Terminus von ShC/B, jedoch mit MetO statt Met an Position drei bewirkte nur nach Vorinkubation mit MSRA eine schnelle Inaktivierung des Kanals (Ciorba et al. 1997, Jung et al. 2002). Die Lage des Methionins bei ShC/B am N-Terminus könnte es für MSRs leicht zugänglich machen. Außerdem könnten MSRs den oxidativen Stress verringern und nicht spezifisch das oxidierte Methionin am Kanal reduzieren. Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten weisen auf eine Radikalfängerfunktion allein schon durch DTT hin. Bei zehnmütiger Wartedauer vor Etablierung der Ganz-Zell-Konfiguration erfolgte der Inaktivierungsverlust durch ChT deutlich langsamer als ohne diese Verzögerung.

Dass in der vorliegenden Arbeit kein Reparatureffekt von MSRs an Nav-Kanälen beobachtet wurde, könnte an einer niedrigen Umsatzrate der Enzyme *in vivo* liegen. Hoshi & Heinemann (2001) postulierten, dass die reversible Oxidation von Methionin einen längerfristigen Modulationsmechanismus bei akuten Ereignissen mit hoher ROS-Belastung darstellen könnte. Die Kurzzeitmodulation bestünde auf der Basis von Cystein, da oxidiertes Cystein reduziert wird, sobald der zelluläre Redoxstatus wieder hergestellt ist. Methionine würden zeitlich verzögert durch MSRs reduziert. Čolak (2008) betrachtete den Methioninoxidationszustand bei langlebigen Proteinen, beispielsweise Matrix- und Strukturproteinen in Augenlinse und extrazellulärer Matrix, als eine Art Gedächtnis für oxidativen Stress.

4.2 Reduktion des Spitzenstroms spannungsgesteuerter Natriumkanäle durch Oxidantien

4.2.1 Strukturelle Ursachen des Stromverlustes bei spannungsgesteuerten Natriumkanälen durch oxidative Modifikation

Zusätzlich zum Verlust der schnellen Inaktivierung trat mit der Reduktion des Spitzenstroms bei rNav1.4 mit 200 μ M ChT ein weiterer Effekt auf, welcher die Funktion des Kanals beeinflusst und durch Applikation von DTT nicht reversibel war. Mit höheren ChT-Konzentrationen erfolgte der Stromverlust schneller. Die Verringerung des Maximalstroms war für einige der Mutanten, bei denen Methioninreste durch Leucin ersetzt wurden, stärker ausgeprägt als für den Wildtyp. Bei Nav-Kanälen mit hoher Sensitivität der Inaktivierung gegenüber Oxidation führte der Inaktivierungsverlust zunächst zu einer Erhöhung der Stromamplitude, was die Stromreduktion kompensierte. Für Mutanten wie IFL und IFM-LL, bei denen hochsensitive Methionine nicht vorhanden sind, entfällt dieser Effekt und nach dem Hodgkin-Huxley-Modell ist ein höherer Stromverlust zu erwarten. Die verhältnismäßig hohe Reduktion des Maximalstroms bei IFM-4L und IFL-6L lässt sich durch die verringerte Oxidationssensitivität der Inaktivierung allein nicht hinreichend erklären, die Beteiligung weiterer Mechanismen ist wahrscheinlich.

Die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung ist entscheidend dafür, welcher Anteil der Kanäle bei einer bestimmten Membranspannung aktivierbar ist. Für einige der Methionin-Leucin-Mutanten zeigte sich eine zunehmende Verschiebung der halbmaximalen Spannung der Inaktivierung (V_h) zu negativeren Werten mit höherer Anzahl und Bedeutung der substituierten Methionine für den Inaktivierungsverlust. Der Effekt von IFL auf V_h war gering, aber signifikant. Eine deutlich stärkere Verschiebung von V_h trat durch M442L, M1139L und M1154L gemeinsam sowie durch Mutation des Doppel-Methionin-Motivs M1469/M1470 und entsprechende Kombinationen der Mutationen auf.

Bei Applikation von 200 μ M ChT oder 1.5% H₂O₂ zeigte hNav1.5 innerhalb weniger Minuten einen starken Stromverlust. Wie bereits von Hisatome et al. (2000) beschrieben, ging ein großer Einzelbeitrag auf das Porencystein C373 in Domäne 1 zurück, obwohl der Stromverlust mit DTT, welches oxidierte Cysteinreste reduzieren kann, nicht reversibel war. Die Reversmutante rNav1.4 Y401C bestätigte den blockierenden Effekt des Cysteins in der Pore. Hisatome et al. (2000) stellten die Hypothese auf, dass C373 mit einem weiteren Cystein in der Pore eine Disulfidbrücke bildet. Im Gegensatz dazu vermuteten Khan et al.

(2006), dass C373 eine Wasserstoffbrücke mit dem Aspartat des Selektivitätsfilters bildet. Bei erniedrigtem pH-Wert wird die Sulfhydrylgruppe wahrscheinlich protoniert und bewirkt einen Block der Pore. Kirsch et al. (1994) zeigten mit positiv geladenen Sulfhydrylreagenzien einen deutlich stärkeren Block von $\text{Na}_V1.5$ als mit negativ geladenen. Bei der Reaktion der Sulfhydrylgruppe zur Sulfensäure (R-SOH) oder zu höher oxidierten Säuren könnte der stärker polare Rest zur Beeinflussung der Passage der Na^+ -Ionen durch Änderung der elektrostatischen Verhältnisse führen. Von der Vorstellung von Hisatome et al. (2000) ausgehend, wären Konformationsänderungen durch das Lösen der Disulfidbrücke, welche zumindest den Bereich der Kanalpore betreffen und die Leitfähigkeit einschränken, denkbar.

Aus den Vergleichen zwischen $\text{rNa}_V1.4$ WT, $\text{hNa}_V1.5$ WT und $\text{hNa}_V1.5$ C373Y wird deutlich, dass weder mit ChT noch mit H_2O_2 der gesamte Stromverlust auf das Cystein zurückzuführen war. Sowohl bei Betrachtung des gemessenen Spitzenstroms, als auch bei Berechnung des maximal möglichen Stroms bei Vernachlässigung der Inaktivierung nach einem Hodgkin-Huxley-Formalismus trat bei $\text{hNa}_V1.5$ C373Y ein Stromverlust auf, der etwa mittig zwischen dem der Wildtypkanäle $\text{rNa}_V1.4$ und $\text{hNa}_V1.5$ lag. Die mit den untersuchten Chimären zwischen diesen beiden Wildtypen durch Oxidation mit 1.5% H_2O_2 gewonnenen Daten deuten darauf hin, dass die Domäne 2 von $\text{hNa}_V1.5$ Einfluss auf den hohen Stromverlust des Herzmuskelkanals haben könnte. Der Austausch eines großen Teils des Kanals bleibt jedoch möglicherweise nicht ohne Auswirkungen auf die Funktion. Die höhere Sensitivität der Stromamplitude bei 5444 gegenüber $\text{hNa}_V1.5$ WT könnte darauf zurückgehen, dass in diesem Fall veränderte Interaktionen zwischen den Domänen stattfinden.

Bei Kanälen mit dem Porencystein wurde bei Oxidation mit 1.5% H_2O_2 der Strom deutlich stärker reduziert als bei Kanälen mit Tyrosin an der entsprechenden Position. Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Ausprägung des Stromverlustes und der halbmaximalen Spannung der Inaktivierung bestand nicht. Aus der Analyse von Schalteigenschaften der Na_V -Kanäle vor und nach oxidativer Einwirkung wird deutlich, dass Veränderungen der Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung, die sich nicht in einer V_h -Verschiebung niederschlagen müssen, stattfanden. Durch Berechnungen mit den Werten der Anpassungen aus nach Applikation von Oxidantien aufgezeichneten Protokollen lässt sich zeigen, dass der Einfluss der Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung auf den Stromverlust bei -100 mV größer sein kann als bei -120 mV, welche zumeist als Haltespannung genutzt wurden. Beim Ruhepotenzial der Herzmuskulatur von -70 mV bis -90 mV (Fedida et al. 2005) könnte der Stromverlust durch oxidative Modifikation noch ausgeprägter sein.

Bei der Beurteilung des Einflusses von Oxidantien auf Einzelkanalparameter durch nichtstationäre Rauschanalyse zeigte sich, im Gegensatz zur Vermutung von Quiñonez et al. (1999), die Verringerung des Einzelkanalstroms nach oxidativer Einwirkung. Auch die Offenwahrscheinlichkeit nahm ab. Der Effekt von ChT auf den Einzelkanalstrom war mit Tyrosin statt Cystein an Position 373 in der Pore geringer, aber nicht beseitigt. Auch hier wird die Beteiligung weiterer Prozesse deutlich. Die Offenwahrscheinlichkeit wurde bei -100 mV stärker als bei -140 mV verringert. Der Effekt könnte bei den in der Herzmuskulatur bestehenden physiologischen Potenzialen noch drastischer ausfallen.

Der Stromverlust bei hNav1.5 als Folge der Wirkung von Oxidantien hat wahrscheinlich zahlreiche Ursachen. Der größte Einzelanteil entfiel auf das Cystein an Position 373 innerhalb der Pore. Es traten Veränderungen bei der Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung sowie die Verringerung des Einzelkanalstroms und der Offenwahrscheinlichkeit auf. Möglicherweise trugen auch Strukturen in Domäne 2 zum Stromverlust bei (Abb. 4.2). Die Modifikation der Schalteigenschaften geht mit hoher Wahrscheinlichkeit auf Methionin- oder Cysteinreste zurück, deren exakte Identifikation weitere Einsicht in die Prozesse, welche die Funktion spannungsgesteuerter Natriumkanäle verändern, bringen würde.

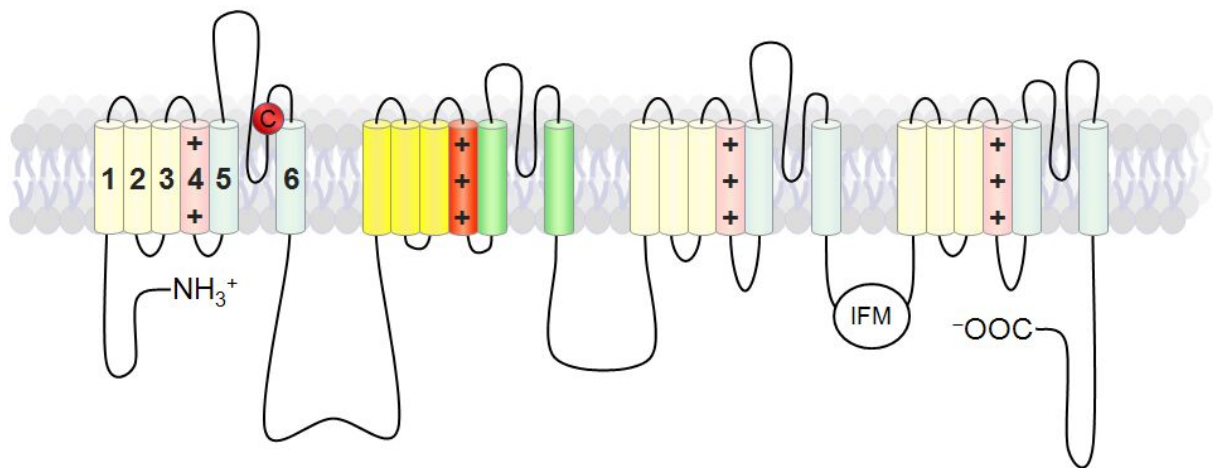


Abbildung 4.2:

Kanal α -Untereinheit von hNav1.5.

Hervorgehoben sind das Cystein an Position 373 und Domäne 2, für welche ein Beitrag zum Stromverlust durch oxidative Modifikation ermittelt wurde.

4.2.2 Mögliche physiologische Funktionen der hohen Oxidationssensitivität der Stromamplitude spannungsgesteuerter Natriumkanäle in der Herzmuskulatur

Beim Herzen ist, neben der Sicherung des Überlebens einzelner Myozyten, die ununterbrochene kontrollierte Kontraktionsfähigkeit für das Überleben des Organismus insgesamt zwingend notwendig. Die exakte zeitliche Abfolge der Herzmuskelkontraktion ist

für die Funktion des Herz-Kreislauf-Systems essentiell. Oxidativer Stress durch ROS, welche im Zuge der Hypoxie bei einem Herzinfarkt verstärkt gebildet werden, kann die Funktion der Ionenkanäle in Herzmuskelzellen beeinflussen, indem die Kanalproteine oder die direkte Umgebung der Kanäle oxidiert werden (Barrington et al. 1997, Fukuda et al. 2005).

Nach Saint (2008) ist der Beitrag persistenter Natriumströme zum Aktionspotenzialplateau normalerweise gering. Diese Ströme können jedoch bei gestörter Repolarisation, beispielsweise bei Block von Kaliumkanälen, zu Arrhythmien führen. Das Kaliumkanalgen hERG1 kodiert für I_{Kr} -Kanäle in Kardiomyozyten, welche eine entscheidende Funktion bei der Repolarisation ventrikulärer Aktionspotenziale und damit der Bestimmung der Dauer des QT-Intervalls haben (Fedida et al. 2005, McPate et al. 2009). Defekte bei hERG1 oder Veränderungen der Kanaleigenschaften können zum erblichen LQT-Syndrom 2 oder zu erworbenen Arrhythmien führen. Die auf hERG1 zurückgehenden Kanäle werden bei oxidativem Stress geblockt (Su et al. 2007). Möglicherweise erfolgt der Stromverlust bei $hNa_v1.5$ und bei hERG1 in wechselseitiger Abhängigkeit, um starken Veränderungen der Form des Aktionspotenzials entgegenzuwirken.

Durch die Hemmung der oxidativen Phosphorylierung sinkt die Konzentration von ATP innerhalb von 1-2 Minuten nach Beginn einer ischämischen Phase auf einen Minimalwert (Lipton 1999). Cummins et al. (1993) sahen den bei Anoxie auftretenden Block des Natriumstroms bei Neokortexneuronen als möglichen Schutzmechanismus, um das Ungleichgewicht zwischen metabolischem Bedarf und verringerter Verfügbarkeit von Sauerstoff auszugleichen. Squier & Bigelow (2000) diskutierten ebenfalls eine mögliche biologische Funktion von oxidationsbedingtem Aktivitätsverlust zur Verringerung des Energieaufwandes erregbarer Zellen und damit der Verbesserung der zellulären Überlebenschancen bei oxidativem Stress.

Einer der ersten Schritte in der durch Hypoxie ausgelösten Kaskade, welche zum Zelltod führt, ist ein abnormer Natriumeinstrom, welcher einen starken Anstieg der intrazellulären Na^+ -Konzentration bewirkt (Lipton 1999). Über Na^+-Ca^{2+} -Austauscher wird die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration erhöht, was zu irreversiblen Zellschäden und im Herzen zu Arrhythmien führen kann (Hammarström & Gage 2002). Die Beteiligung von Na_v -Kanälen am Natriumeinstrom wird kontrovers diskutiert. Xiao & Allen (1999) schrieben, dass in der Herzmuskulatur der Einstrom über TTX-sensitive Na_v -Kanäle die weitaus größte Rolle in der frühen Phase der Ischämie spielt. Demgegenüber stellten Barrington et al. (1997) fest, dass ein Natriumeinstrom durch Na_v -Kanäle in Kardiomyozyten bei oxidativem Stress nicht

stattfindet. Nach Lipton (1999) können die schädlichen Folgen des Na^+ -Einstroms durch Block mit TTX verhindert werden, was auf eine ursächliche Beteiligung von Na_V -Kanälen hinweist. Klasse-I-Antiarrhythmika unterdrücken viele durch kardiale Ischämie induzierte Arrhythmien durch den Block der Na^+ -Ströme (Adamantidis et al. 1986).

Die in dieser Arbeit für $\text{rNa}_V1.4$ identifizierten Methioninreste mit Einfluss auf die schnelle Inaktivierung sind auch bei $\text{hNa}_V1.5$ vorhanden. Es ist wahrscheinlich, dass sie bei Oxidation einen ähnlichen Inaktivierungsverlust bewirken. Für das Methionin im Inaktivierungsmotiv wurde dies gezeigt. Spezifischer Block der nicht-inaktivierenden Na_V -Kanäle kann eine Interventionsmöglichkeit darstellen, um weitere Schäden nach Ischämie im Herzen zu verhindern (Song et al. 2006), wie es von Hale & Kloner (2006) für Ranolazin gezeigt wurde. Die Tatsache, dass die Reduktion des Natriumstroms in Folge von Ischämie erworbenes Brugada-Syndrom mit hohem Risiko für ventrikuläre Arrhythmien und plötzlichen Herztod verursachen kann (Antzelevitch & Viskin 2008), verdeutlicht ebenfalls die hohe Feinabstimmung, welche für die korrekte Herzfunktion notwendig ist.

Bei Ischämie fällt der pH-Wert im Herzgewebe (Saint 2008). Khan et al. (2006) zeigten, dass Na_V -Kanäle bei niedrigem pH-Wert (pH 5) stark geblockt werden. Beim Herzmuskelkanal war der Block, maßgeblich bedingt durch das Porencystein C373, vollständig. Damit wäre weiterhin eine Bedeutung der hohen Sensitivität des Spitzenstroms als regulativer Faktor bei Änderungen des pH-Wertes denkbar.

4.3 Wirkungsmechanismen verwendeter Oxidantien

Der Inaktivierungsindex 500 s nach Substanzapplikation beträgt bei $\text{rNa}_V1.4$ mit 1.5% H_2O_2 , was einer Konzentration von 500 mM entspricht, 0.896 ± 0.016 ($n=5$). Einen vergleichbaren Inaktivierungsindex erreicht man mit ChT bereits bei einer Konzentration von 100 μM (0.861 ± 0.033 , $n=6$). Mit der ohne sofortigen vollständigen Block maximal nutzbaren Konzentration an t-BHP, 10 mM, ergaben sich während der Messdauer nur sehr geringe Inaktivierungsverluste. Die drastischen Konzentrationsunterschiede zwischen ChT und den Peroxiden, um bei Na_V -Kanälen die Inaktivierung in vergleichbarer Größenordnung zu stören, ist möglicherweise ein Hinweis, dass von den Oxidationsmitteln verschiedene Reaktionswege realisiert werden, wie in Abbildung 4.3 dargestellt.

ChT oxidiert bei neutralem bis leicht alkalischem pH-Wert Cystein vier- bis fünfmal schneller als Methionin. Die Oxidation von Methionin zum Sulfon erfolgt nur bei extremem ChT-Überschuss. Im Säuren wird auch Tryptophan oxidiert. Mit anderen Aminosäureseitenketten

findet keine Reaktion statt (Shechter et al. 1975). Allerdings besteht die Möglichkeit, dass Tryptophan, welches sich in einer sauren Mikroumgebung befindet, auch bei sonst höherem pH-Wert durch ChT oxidiert wird (Shechter 1986). Der Skelettmuskelnatriumkanal besitzt mehrere Tryptophanreste in Abschnitten, welche die Pore bilden, jedoch kein einziges in den Verbindungsstücken zwischen den Domänen 3 und 4 oder denen zwischen S4- und S5-Segmenten, für die eine stärkere Beteiligung an der schnellen Inaktivierung bekannt ist. ChT spaltet bei Kontakt mit Wasser langsam Hypochlorit ab (Bishop & Jennings 1958, Fieser & Fieser 1982). In der Folge könnte freigesetzter Sauerstoff zur Oxidation von Methionin zu Methioninsulfoxid führen. Schiemann & Novák (1927) gehen davon aus, dass Hypochlorit nur in alkalischer Lösung gebildet und die oxidative Wirkung auf direkt freigesetztem Sauerstoff beruht. Nach Stief et al. (2001) bildet ChT den hochreaktiven Singulett-Sauerstoff.

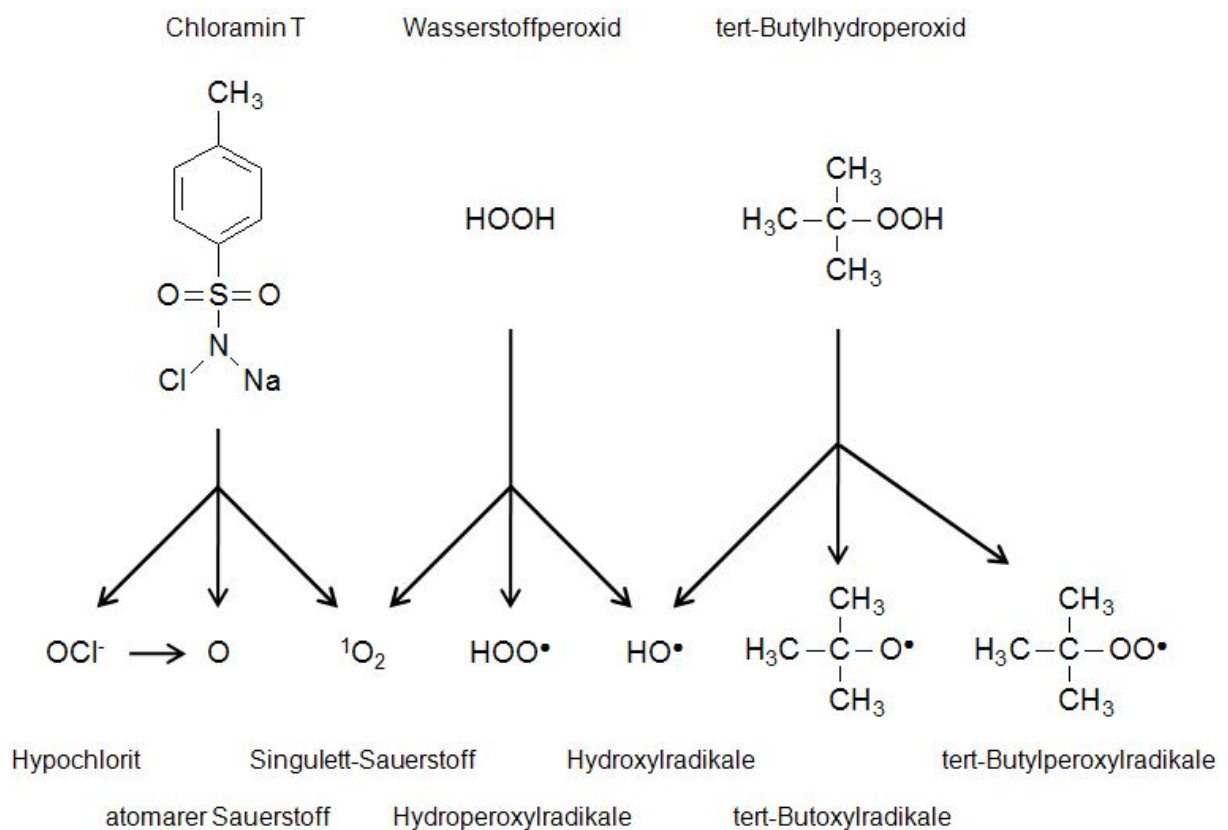


Abbildung 4.3:
Mögliche Reaktionswege der verwendeten Oxidantien.

H₂O₂ wirkt außer gegenüber starken Oxidationsmitteln oxidierend (Falbe & Regitz 1992). Unter milden Bedingungen kann H₂O₂ zahlreiche Seitenketten in Proteinen modifizieren, beispielsweise die Thioethergruppe von Methionin, die Sulfhydryle, Disulfidbrücken, Indole oder Phenole (Shechter et al. 1975). Denkbar wäre ein Reaktionsweg, bei dem aus Wasserstoffperoxid Radikale, wie OH[•] und OOH[•], gebildet werden, welche über die Addition

eines Sauerstoffatoms an den Schwefel Methionin zu Methioninsulfoxid oxidieren. Das Reaktionsspektrum ist möglicherweise breiter als für ChT und der Anteil der Reaktionen mit Methionin daher geringer.

Aus tert-Butylhydroperoxid werden in Gegenwart von Übergangsmetallionen tert-Butylperoxyradikale oder, analog der Fenton-Reaktion für H_2O_2 , tert-Butoxyradikale gebildet (Osipov et al. 1980, 1984).

Der Spitzenstrom wurde durch t-BHP mit 10 mM in deutlich niedrigerer Konzentration geblockt, als durch H_2O_2 mit 500 mM. Barrington et al. (1997) beobachteten mit 15 mM und Fukuda et al. (2005) mit 2 mM eine blockierende Wirkung von t-BHP auf Natriumströme bei Myozyten in einem vergleichbaren Konzentrationsbereich. Das Sensitivitätsmuster, welches für die untersuchten Kanäle mit t-BHP ermittelt wurde, unterscheidet sich von den Sensitivitäten gegenüber H_2O_2 . Die beiden Oxidantien verfügen über eine identische reaktive Gruppe. Die verschiedenen Auswirkungen könnten auf die unterschiedliche Zugänglichkeit der Zielstellen für die gebildeten Radikale, Hydroperoxyradikale bei H_2O_2 gegenüber tert-Butoxyradikalen und tert-Butylperoxyradikalen bei t-BHP, bedingt sein. Nach Keck (1996) oxidiert t-BHP spezifisch oberflächenexponierte Methioninreste, H_2O_2 sowohl exponierte als auch verborgene. Unspezifischer Block des Spitzenstroms durch den tert-Butylrest ist ebenfalls möglich. Shiraishi & Harris (2004) sowie Urban (1993) beschrieben die Inhibierung von Natriumströmen durch verschiedene Kohlenwasserstoffverbindungen ohne Beteiligung radikalischer Prozesse. Der teilweise reversible Charakter des Blocks, welcher während der vorliegenden Arbeit beobachtet wurde, weist darauf hin, dass zumindest nicht der gesamte Effekt auf kovalente Veränderungen zurückzuführen ist. Weiterhin können neben unspezifischen Effekten indirekte Mechanismen durch unterschiedliche Modifikation anderer Aminosäuren als Methionin und Cystein durch die verwendeten Oxidantien nicht ausgeschlossen werden.

Die experimentell mit den hier aufgeführten oxidierenden Substanzen gewonnen Ergebnisse sollten weitgehend auf *in-vivo*-Verhältnisse übertragbar sein, da Oxidantien wie Peroxide, Hydroxylradikale und Hypochlorit in lebenden Zellen ständig gebildet werden (Brot et al. 1981). Chloraminen, als deren Vertreter das experimentell gut handhabbare, hinreichend stabile ChT zur Induktion von oxidativem Stress bei elektrophysiologischen Messungen genutzt wurde, könnte im Herzen eine besondere Bedeutung zukommen. Bei einer Reihe von Zellen des Immunsystems werden durch Myeloperoxidasen (MPOs) bei der Immunabwehr ROS produziert (Lau & Baldus 2006). Nach Ergebnissen von Shappell et al. (1990) und

Hampton et al. (1998) könnten aktivierte polymorphonukleare Leukozyten HOCl lokal bis zu einer Konzentration von 3 μ M bilden. MPOs tragen wahrscheinlich zu kardiovaskulären Erkrankungen bei (Lau & Baldus 2006). Das von ihnen produzierte HOCl bildet mit freiem und proteingebundenem Lysin kurzlebige reaktive Chloraminverbindungen (Weiss et al. 1983), bei deren Zerfall Radikale entstehen (Hawkins & Davies 1998).

Fu et al. (1998) und Woods et al. (2003) haben in atherosklerotischen Plaques eine erhöhte Konzentration oxidierter Makromoleküle beobachtet. Sugiyama et al. (2001, 2004) berichteten eine erhöhte Anzahl MPO-exprimierender Makrophagen in erodierten oder aufgerissenen Plaques, die wahrscheinlich über HOCl akute koronare Syndrome verursachen. Schutz können Antioxidantien wie humanes Serumalbumin (Bourdon et al. 2005) bieten. Die Bedeutung antioxidativer Mechanismen für das kardiale System wird durch erhöhte myokardiale Apoptose, beeinträchtigte Herzfunktion und erhöhte Mortalität nach Herzinfarkt bei MSRA^{-/-}-Mäusen (Erickson et al. 2008) unterstrichen.

4.4 Einfluss der Methionin-Leucin-Mutationen auf Kanaleigenschaften

Nach Levine et al. (1996) hat Methionin, im Gegensatz zu Cystein, keine bekannte Funktion bei katalytischen Abläufen bei Enzymen. Die Option zu regulatorischer Einflussnahme ist eine Möglichkeit, zu erklären, weshalb an kritischen Stellen bei Ionenkanälen dennoch das oxidationsempfindliche Methionin eingebaut wird. Alle in dieser Arbeit untersuchten Mutanten, bei denen Methionine durch Leucin ersetzt wurden, bildeten funktionelle Kanäle. Bezüglich der Schalteigenschaften unterschieden sich die mutierten Kanäle teilweise deutlich vom Wildtyp. Die halbmaximale Spannung der Aktivierung war für IFM-LM ($p < 0.05$) und IFM-4L ($p < 0.001$) signifikant negativer als für rNav1.4 WT. Die halbmaximale Spannung der Inaktivierung lag für IFL und IFM-LM ($p < 0.05$) sowie für IFM-ML und IFM-4L ($p < 0.001$) signifikant negativer als für den Wildtypkanal. Die Zeitkonstante der Rückkehr von der Inaktivierung war für IFL und IFM-LL größer als für IFM-L. Der Unterschied zwischen IFM-LL und IFM-L war signifikant. Leucin hat einen höheren Hydrophobizitätswert als Methionin (Black & Mould 1991) und könnte die hydrophobe Wechselwirkung bei der Inaktivierung stärker stabilisieren. Eine langsamere Rückkehr von der Inaktivierung bewirkt eine höhere Refraktärzeit und eine niedrigere maximale Generationsrate für Aktionspotentiale. Dadurch würde beispielsweise die Informationsübertragungsrate bei Neuronen verringert. Zumindest für einige der untersuchten Positionen könnte die Besetzung mit Methionin die einzige Option sein, um einen Kanal mit den erforderlichen Eigenschaften zu erhalten.

Für einige Methioninreste, besonders die bei der Mutante IFM-4L ersetzten M442, M1139, M1154 und M1316, besteht die Option einer Radikalfängerfunktion, wenngleich der Schutzeffekt auf die für die Inaktivierung wichtigen Methionine gering ist. Mit 200 μ M ChT unterschieden sich IFM-6L und IFM-LL nicht signifikant, IFM-4L ist jedoch weniger sensitiv als der Wildtyp ($p < 0.05$). Mit 1 mM ChT bestehen weder zwischen IFM-6L und IFM-LL, noch zwischen IFM-4L und rNav1.4 WT signifikante Unterschiede. Für niedrige Konzentrationen an Oxidantien, wie sie in lebenden Zellen vorkommen, kann eine Funktion der bei IFM-4L ersetzten Methionine als Radikalfänger nicht völlig ausgeschlossen werden.

Eine weitere mögliche Erklärung der Präsenz von Methioninresten an bestimmten Stellen im Protein könnte die Markierung zur proteolytischen Degradation bei oxidativer Modifikation sein. Wenn die Oxidation dieser Methionine mit einer ähnlichen Rate erfolgt wie die Oxidation der für die Inaktivierung wichtigen Methionine, bestünde ein Mechanismus, mit dem die Proteolyse von Kanälen eingeleitet wird, welche persistenten Strom verursachen. Als solche Markierungsproteine kämen M442, M1139, M1154 oder M1316 in Frage, deren Einfluss auf die Inaktivierung gering ist und deren Effekt auf das Schaltverhalten in weiteren Experimenten einzeln beurteilt werden könnte.

5. Zusammenfassung

Ströme durch spannungsgesteuerte Natriumkanäle (Na_V -Kanäle) initiieren Aktionspotenziale und beeinflussen die Dauer von deren Plateauphase. Beim Menschen sind neun Gene bekannt, welche für funktionale Natriumkanäle in verschiedenen Bereichen des Körpers kodieren ($\text{Na}_V1.1$ - $\text{Na}_V1.9$). Reaktive Sauerstoffverbindungen (ROS) können Na_V -Kanäle modifizieren und ihre Funktion beeinflussen, wenn sie durch antioxidative Systeme nicht effizient eliminiert werden. Kritisch ist die drastisch erhöhte ROS-Konzentration bei extremen Ereignissen wie Schlaganfall und Herzinfarkt sowie die Langzeitwirkung moderat erhöhter ROS-Konzentration bei einer Vielzahl chronischer Erkrankungen und im Alter.

- Bei Skelettmuskelnatriumkanälen ($\text{Na}_V1.4$) trat mit dem Oxidationsmittel Chloramin T (ChT) irreversibler Inaktivierungsverlust auf, welcher mit höherer ChT-Konzentration und Expositionsdauer stärker wurde. Weiterhin erfolgte eine irreversible Reduktion des Spitzenstroms, die Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung zu negativeren Spannungen und die Verringerung der Zeitkonstante für die Rückkehr von der schnellen Inaktivierung. Der Inaktivierungsverlust war für Natriumkanäle aus dem Gehirn ($\text{Na}_V1.2$), der Herzmuskulatur ($\text{Na}_V1.5$) sowie dem peripheren Nervensystem ($\text{Na}_V1.7$) ähnlich dem des Skelettmuskelkanals. $\text{Na}_V1.8$, ein weiterer Na_V -Kanal des peripheren Nervensystems und Hauptkomponente des Natriumstroms in DRG-Neuronen, ist ChT gegenüber möglicherweise deutlich sensitiver.
- An Hand von Mutanten, bei denen Methionin durch das weniger leicht oxidierbare Leucin ersetzt war, wurde gezeigt, dass bei $\text{rNa}_V1.4$ M1305 aus dem IFM-Inaktivierungsmotiv und das dem Akzeptor zugerechnete Doppel-Methionin-Motiv M1469/M1470 wesentlichen Einfluss auf die Oxidationssensitivität der schnellen Inaktivierung haben. Der Einzelbeitrag von M1470 ist deutlich größer als der von M1469. M1316 hat auf den Inaktivierungsverlust keinen Einfluss. Der Beitrag der weiteren untersuchten Methionine, M442, M1139 und M1154, zur Oxidationssensitivität der Inaktivierung ist gering. Die Bedeutung des Methionins im Inaktivierungsmotiv konnte mit weiteren Kanälen sowohl bei Oxidation mit ChT als auch mit H_2O_2 gezeigt werden.

- Kinetische Analysen deuten darauf hin, dass für den Inaktivierungsverlust des Skelettmuskelnatriumkanals mehrere Zielstellen oxidiert werden müssen. Dies ist konform mit den Ergebnissen der Mutageneseexperimente. Außerdem scheint es einen Basiswert der Oxidationssensitivität zu geben, dessen Grundlage weiterer Aufklärung bedarf.
- Es wurde gezeigt, dass durch Einführung zusätzlicher leicht oxidierbarer Aminosäuren in das Inaktivierungsmotiv hochsensitive Kanäle entstehen können, welche möglicherweise eine Anwendung als biotechnologische ROS-Sensoren eröffnen. Cystein erhöhte die Oxidationssensitivität stärker als Methionin.
- Methioninsulfoxidreduktasen (MSRs) könnten als regulativer Faktor auf den Oxidationszustand sensibler Methioninreste Einfluss nehmen und damit die Funktion von Na_V -Kanälen steuern. Mit einem Aktivitätstest wurde demonstriert, dass MSRA unter den Bedingungen elektrophysiologischer Experimente Methioninsulfoxid reduzieren kann. Eine Reparaturfunktion von MSRs an Na_V -Kanälen trat unter diesen Bedingungen nicht auf. Auch eine protektive Wirkung als Radikalfänger ließ sich für MSRs nicht nachweisen. Möglicherweise ist Methionin für einige der untersuchten Positionen des Skelettmuskelkanalproteins die einzig mögliche Aminosäure, da durch Ersetzen mit Leucin Schaltparameter der Kanäle verändert werden.
- Der Wildtypkanal $\text{Na}_V1.5$ aus der Herzmuskulatur hatte sich bezüglich des Spitzenstroms im Vergleich mit dem Skelettmuskelkanal als deutlich oxidationssensibler erwiesen. Eine Besonderheit von $\text{Na}_V1.5$ gegenüber allen anderen Na_V -Kanälen ist ein Cystein in Domäne 1 innerhalb der Pore (Position 373 bei $\text{hNa}_V1.5$). Der Verlust des Spitzenstroms bei $\text{hNa}_V1.5$ als Folge der Wirkung reaktiver Substanzen kann als multifaktoriell bedingter Prozess betrachtet werden, auf den die oxidative Modifikation von C373 als Hauptkomponente, Veränderungen bei der Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung, die Verringerung des Einzelkanalstroms und der Offenwahrscheinlichkeit sowie möglicherweise Veränderungen in Domäne 2 Einfluss haben. Der starke Stromverlust des Herzmuskelkanals und insbesondere das Vorhandensein des Cysteins 373 könnten im Zusammenspiel mit Kaliumkanälen und bei der Sicherung des Energiehaushaltes, wenn durch Sauerstoffmangel die ATP-Bildung über die Elektronentransportkette inhibiert ist, protektive Wirkung haben.

Summary

Current through voltage-gated sodium channels (Na_V channels) initiates action potentials and influences the duration of their plateau phase. In humans nine genes coding for functional sodium channels in different body tissues are known ($\text{Na}_V1.1$ - $\text{Na}_V1.9$). Reactive oxygen species (ROS) may modify Na_V channels and alter their function if they are not efficiently eliminated by antioxidative systems. The drastically increased ROS concentration in extreme situations like stroke and cardiac infarction as well as the long-term effects of moderately increased ROS concentration in a multitude of chronic diseases and in age are critical.

- In skeletal muscle sodium channels ($\text{Na}_V1.4$) an irreversible loss of fast inactivation occurred with the oxidant chloramine-T (ChT). The loss of inactivation increased with higher ChT concentration and prolonged exposure time. Furthermore, irreversible reduction of peak current, shift of the voltage-dependence of activation to more negative potentials and reduction of the time constant of the recovery from fast inactivation occurred. The inactivation loss of sodium channels from brain ($\text{Na}_V1.2$), from cardiac muscle ($\text{Na}_V1.5$), and from peripheral nervous system ($\text{Na}_V1.7$) was comparable to that of the skeletal muscle sodium channels. $\text{Na}_V1.8$, another Na_V channel from peripheral nervous system and main component of the sodium current in DRG neurons, has possibly a higher sensitivity against ChT.
- With mutant channels of $\text{rNa}_V1.4$, which have the less facile oxidizable leucine in the position of methionine, it has been shown that M1305 from the IFM-inactivation motif and the double methionine motif M1469/M1470 from the putative inactivation linker acceptor essentially influence the oxidation sensitivity of the fast inactivation. The contribution of M1470 is more intense than that of M1469. M1316 does not affect the inactivation loss. The contribution of the further investigated methionines, M442, M1139, and M1154, to the oxidation sensitivity of the inactivation is minor. The importance of the methionine in the inactivation motif was shown by oxidizing different channels with ChT as well as with H_2O_2 .
- Kinetic analyses indicate that several targets have to be oxidized to derive loss of fast inactivation with skeletal muscle sodium channels. This is concurring with the results from the mutagenesis experiments. Furthermore, there seems to be a base value of the oxidation sensitivity that requests further investigation.

- It has been shown that by introducing additional facile oxidizable amino acids into the inactivation motif highly sensitive channels can be constructed, which may be used as biotechnological ROS sensors. The increase of the oxidation sensitivity was more severe with cysteine than with methionine.
- Methionine sulfoxide reductases (MSRs) could possibly influence the oxidation state of susceptible methionine residues and therefore may regulate the Na_v channel function. With an activity assay it was demonstrated that MSRA can reduce methionine sulfoxide under the conditions of the electrophysiological experiments. A repairing activity of MSRs at Na_v channels did not take place under these conditions. Also a protective action as radical scavenger has not been observed for MSRs. Maybe for some of the investigated positions at the skeletal muscle sodium channel methionine is the only possible amino acid, since gating parameters of the channels changed, if leucine was replaced for methionine.
- The reduction of peak current due to oxidant action was significantly higher in cardiac muscle wild-type channel $\text{Na}_v1.5$ compared to skeletal muscle channel. A unique feature of $\text{Na}_v1.5$ among all other Na_v channels is a cysteine in domain 1 within the pore (position 373 at h $\text{Na}_v1.5$). The loss of peak current in h $\text{Na}_v1.5$ as a consequence of the action of oxidizing substances goes back to a multitude of causes with oxidative modifications of C373 as the major component. Furthermore changes in the voltage-dependence of the inactivation, the reduction of single channel current and open probability were observed. Modifications in domain 2 possibly also contribute to the current reduction. The intense loss of current and especially the presence of the cysteine at position 373 in the cardiac sodium channel may serve a protective function together with potassium channels and in securing energy metabolism, if the ATP production via the electron transport chain is inhibited by lack of oxygen.

6. Literatur

- Adamantidis M M, Caron J F, Dupuis B A** (1986), Triggered activity induced by combined mild hypoxia and acidosis in guinea-pig Purkinje fibers. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology* 18, 1287-1299.
- Aidley D J & Stanfield P R** (1996), Ion channels. Cambridge University Press, Cambridge.
- Akopian A N, Souslova V, England S, Okuse K, Ogata N, Ure J, Smith A, Kerr B J, McMahon S B, Boyce S, Hill R, Stanfa L C, Dickenson A H, Wood J N** (1999), The tetrodotoxin-resistant sodium channel SNS has a specialized function in pain pathways. *Nature Neuroscience* 2 (6), 541-548.
- Anraku M, Kragh-Hansen U, Kawai K, Maruyama T, Yamasaki Y, Takakura Y, Otagiri M** (2003), Validation of the chloramin-T induced oxidation of human serum albumin as a model for oxidative damage *in vivo*. *Pharmaceutical Research* 20 (4), 684-692.
- Antzelevitch C & Viskin S** (2008), Brugada-Syndrome: Cellular mechanisms and approaches to therapy. In Gussak I & Antzelevitch C (Herausgeber), *Electrical Diseases of the Heart*, Springer-Verlag London.
- Armstrong C M, Bezanilla F, Rojas E** (1973), Destruction of sodium conductance inactivation in squid axons perfused with pronase. *The Journal of General Physiology* 62, 375-391.
- Armstrong C M & Bezanilla F** (1977), Inactivation of the sodium channel *II. Gating current experiments*. *The Journal of General Physiology* 70, 567-590.
- Armstrong C M** (1981), Sodium channels and gating currents. *Physiol. Rev.* 61, 644-682.
- Arnér E S J, Björnstedt M, Holmgren A** (1995), 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene is an irreversible inhibitor of human thioredoxin reductase. *The Journal of Biological Chemistry* 270 (8), 3479-3482.
- Ashcroft F M** (2000), Ion channels and disease. Academic Press, San Diego.
- Auld V J, Goldin A L, Krafte D S, Marshall J, Dunn J M, Catterall W A, Lester H A, Davidson N, Dunn R J** (1988), A rat brain Na⁺ channel α subunit with novel gating properties. *Neuron* 1, 449-461.
- Barrington P L, Martin R L, Zhang K** (1997), Slowly inactivating sodium currents are reduced by exposure to oxidative stress. *J Mol Cell Cardiol* 29, 3251-3265.
- Becker H G, Berger W, Domschke G, Fanghänel E, Faust J, Fischer M, Gentz F, Gewalt K, Gluch R, Mayer R, Müller K, Pavel D, Schmidt H, Schollberg K, Schwetlick K, Seiler E, Zeppenfeld G** (1999), *Organikum*. Wiley-VCH, Weinheim.
- Berlett B S & Stadtman E R** (1997), Protein oxidation in aging, disease and oxidative stress. *The Journal of Biological Chemistry* 272 (33), 20313-20316.
- Bezanilla F** (2004), RNA editing of a human potassium channel modifies its inactivation. *Nature Structural & Molecular Biology* 11 (10), 915-916.
- Bishop E & Jennings V J** (1958), Titrimetric analysis with chloramine-T - I The status of chloramine-T as a titrimetric reagent. *Talanta* 1, 197-212.
- Black S D & Mould D R** (1991), Development of hydrophobicity parameters to analyze proteins which bear post- or cotranslational modifications. *Analytical Biochemistry* 193, 72-82.
- Bourdon E, Loreau N, Lagrost L, Blache D** (2005), Differential effects of cysteine and methionine residues in the antioxidant activity of human serum albumin. *Free Radical Research* 39 (1), 15-20.
- Brot N, Weissbach L, Werth J, Weissbach H** (1981), Enzymatic reduction of protein-bound methionine sulfoxide. *PNAS* 78 (4), 2155-2158.
- Brot N & Weissbach H** (1983), Biochemistry and physiological role of methionine sulfoxide residues in proteins. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 223 (1), 271-281.
- Cannon S C, Brown R H Jr, Corey D P** (1993), Theoretical reconstruction of myotonia and paralysis caused by incomplete inactivation of sodium channels. *Biophysical Journal* 65, 270-288.
- Cannon S C & Corey D P** (1993), Loss of Na⁺ channel inactivation by anemone toxin (ATX II) mimics the myotonic state in hyperkalemic periodic paralysis. *Journal of Physiology* 466, 501-520.
- Cannon S C & Strittmatter S M** (1993), Functional expression of sodium channel mutations identified in families with periodic paralysis. *Neuron* 10, 317-326.
- Carney J M, Starke-Reed P E, Oliver C N, Landum R W, Cheng M S, Wu J F, Floyd R A** (1991), Reversal of age-related increase in brain protein oxidation, decrease in enzyme activity, and loss in temporal and spatial memory by chronic administration of the spin-trapping compound *N-tert-butyl- α -phenylnitron*. *PNAS Neurobiology* 88, 3633-3636.
- 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, Goldin A L, Waxman S G** (2005), International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacol Rev* 57, 397-409.
- Catterall W A, Cestèle S, Yarov-Yarovoy V, Yu F H, Konoki K, Scheuer T** (2007), Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. *Toxicon* 49, 124-141.

- Cervera J & Levine R L** (1988), Modulation of the hydrophobicity of glutamine synthetase by mixed-function oxidation. *FASEB Journal* 2 (10), 2591-2595.
- Chan P H** (1996), Role of oxidants in ischemic brain damage. *Stroke* 27, 1124-1129.
- Chao C-C, Ma Y-S, Stadtman E R** (1997), Modification of protein surface hydrophobicity and methionine oxidation by oxidative systems. *PNAS* 94, 2969-2974.
- Chen J, Avdonin V, Ciorba M A, Heinemann S H, Hoshi T** (2000), Acceleration of P/C-type inactivation in voltage-gated K⁺ channels by methionine oxidation. *Biophysical Journal* 78, 174-187.
- Ciorba M A, Heinemann S H, Weissbach H, Brot N, Hoshi T** (1997), Modulation of potassium channel function by methionine oxidation and reduction. *PNAS* 94 9932-9937
- Conley E C & Brammar W J** (1999), *The Ion Channel FactsBook IV Voltage-gated channels*. Academic Press, San Diego.
- Cummins T R, Jiang C, Haddad G G** (1993), Human neocortical excitability is decreased during anoxia via sodium channel modulation. *J Clin Invest* 91, 608-615.
- Çolak E** (2008), New markers of oxidative damage to macromolecules. *Journal of Medical Biochemistry* 27 (1), 1-16.
- Davies K J A, Quintanilha A T, Brooks G A, Packer L** (1982), Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 107 (4), 1198-1205.
- Deschenes I, Trottier E, Chahine M** (1999), Cysteine scanning analysis of the IFM cluster in the inactivation gate of a human heart sodium channel. *Cardiovasc Res* 42 (2), 521-529.
- Duescher R J, Lawton M P, Philpot R M, Elfarra A A** (1994), Flavin-containing monooxygenase (FMO)-dependent metabolism of methionine and evidence for FMO3 being the major FMO involved in methionine sulfoxidation in rabbit liver and kidney microsomes. *The Journal of Biological Chemistry* 269 (26), 17525-17530.
- Eaholtz G, Scheuer T, Catterall W A** (1994), Restoration of inactivation and block of open sodium channels by an inactivation gate peptide. *Neuron* 12, 1041-1048.
- von Eckardstein A, Walter M, Holz H, Benninghoven A, Assmann G** (1991), Site-specific methionine sulfoxide formation is the structural basis of chromatographic heterogeneity of apolipo-proteins A-I, C-II, and C-III. *Journal of Lipid Research* 32, 1465-1476.
- Ejiri S-I, Weissbach H, Brot N** (1979), Reduction of methionine sulfoxide to methionine by *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 139 (1), 161-164.
- Ejiri S-I, Weissbach H, Brot N** (1980), The purification of methionine sulfoxide reductase from *Escherichia coli*. *Analytical Biochemistry* 102, 393-398.
- Erickson J R, Joiner M A, Guan X, Kutschke W, Yang J, Oddis C V, Bartlett R K, Lowe J S, O'Donnell S E, Aykin-Burns N, Zimmerman M C, Zimmerman K, Ham A-J L, Weiss R M, Spitz D R, Shea M A, Colbran R J, Mohler P J, Anderson M E** (2008), A dynamic pathway for calcium-independent activation of CaMKII by methionine oxidation. *Cell* 133, 462-474.
- Fahn S & Cohen G** (1992), The oxidant stress hypothesis in Parkinson's disease: Evidence supporting it. *Annals of Neurology* 32, 804-812.
- Falbe J & Regitz M** (Herausgeber) (1989), *Römpp Chemie Lexikon Band 1 A-Cl*. Georg Thieme Verlag Stuttgart.
- Falbe J & Regitz M** (Herausgeber) (1990), *Römpp Chemie Lexikon Band 3 H-L*. Georg Thieme Verlag Stuttgart.
- Falbe J & Regitz M** (Herausgeber) (1991), *Römpp Chemie Lexikon Band 5 Pl-S*. Georg Thieme Verlag Stuttgart.
- Falbe J & Regitz M** (Herausgeber) (1992), *Römpp Chemie Lexikon Band 6 T-Z*. Georg Thieme Verlag Stuttgart.
- Fedida D, Orth P M R, Chen J Y C, Lin S, Plouvier B, Jung G, Ezrin A M, Beatch G N** (2005), The mechanism of atrial antiarrhythmic action of RSD1235. *J Cardiovasc Electrophysiol* 16, 1227-1238.
- Fieser L F & Fieser M** (1982), *Organische Chemie*. Verlag Chemie, Weinheim.
- Filatov G N, Nguyen T P, Kraner S D, Barchi R L** (1998), Inactivation and secondary structure in the D4/S4-5 region of the SkM1 sodium channel. *J Gen Physiol* 111, 703-715.
- Finkel T** (2000), Redox-dependent signal transduction. *FEBS Letters* 476, 52-54.
- French C R & Gage P W** (1985), A threshold sodium current in pyramidal cells in rat hippocampus. *Neuroscience Letters* 56, 289-293.
- Fu S, Davies M J, Stocker R, Dean R T** (1998), Evidence for roles of radicals in protein oxidation in advanced human atherosclerotic plaque. *Biochem J* 333, 519-525.
- Fukagawa N K** (1999), Aging: Is oxidative stress a marker or is it causal? *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 222, 293-298.
- Fukuda K, Davies S S, Nakajima T, Ong B-H, Kupersmidt S, Fessel J, Amarnath V, Anderson M E, Boyden P A, Viswanathan P C, Roberts L J II, Balsler J R** (2005), Oxidative mediated lipid peroxidation recapitulates proarrhythmic effects on cardiac sodium channels. *Circulation Research* 97, 1262-1269.

- Gabbita S P, Aksenov M Y, Lovell M A, Markesbery W R** (1999), Decrease in peptide methionine sulfoxide reductase in Alzheimer's disease brain. *Journal of Neurochemistry* 73 (4), 1660-1666.
- Gage P W, Lamb G D, Wakefield B T** (1989), Transient and persistent sodium currents in normal and denervated mammalian skeletal muscle. *Journal of Physiology* 418, 427-439.
- Gao J, Yin D H, Yao Y, Sun H, Qin Z, Schöneich C, Williams T D, Squier T C** (1998), Loss of conformational stability in calmodulin upon methionine oxidation. *Biophysical Journal* 74, 1115-1134.
- Garland D L** (1991), Ascorbic acid and the eye. *Am J Clin Nutr* 54, 1198-1202.
- Garner M H & Spector A** (1980), Selective oxidation of cysteine and methionine in normal and senile cataractous lenses. *PNAS* 77 (3), 1274-1277.
- Goldin A L, Barchi R L, Caldwell J H, Hofman F, Howe J R, Hunter J C, Kallen R G, Mandel G, Meisler M H, Netter Y B, Noda M, Tamkun M M, Waxman S G, Wood J N, Catterall W A** (2000), Nomenclature of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 28, 365-368.
- Goldin A L** (2001), Resurgence of sodium channel research. *Annu Rev Physiol* 63, 871-894.
- Hale S L & Kloner R A** (2006), Ranolazine, an inhibitor of the late sodium channel current, reduces postischemic myocardial dysfunction in the rabbit. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics* 11, 249-255.
- Hamill O P, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth F J** (1981), Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 391, 85-100.
- Hammarström A K M & Gage P W** (2000), Oxygen-sensing persistent sodium channels in rat hippocampus. *The Journal of Physiology* 529, 107-118.
- Hammarström A K M & Gage P W** (2002), Hypoxia and persistent sodium current. *Eur Biophys J* 31, 323-330.
- Hampton M B, Kettle A J, Winterbourn C C** (1998), Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood* 92 (9), 3007-3017.
- Hansel A, Kuschel L, Hehl S, Lemke C, Agricola H-J, Hoshi T, Heinemann S H** (2002), Mitochondrial targeting of the human peptide methionine sulfoxide reductase (MSRA), an enzyme involved in the repair of oxidized proteins. *The FASEB Journal* 16, 911-913.
- Hansel A, Heinemann S H, Hoshi T** (2005), Heterogeneity and function of mammalian MSRs: enzymes for repair, protection and regulation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1703, 239-247.
- Hartmann H A, Tiedemann A A, Chen S F, Brown A M, Kirsch G E** (1994), Effects of III-IV linker mutations on human heart Na⁺ channel inactivation gating. *Circulation Research* 75, 114-122.
- Hartshorne R P & Catterall W A** (1984), The sodium channel from rat brain Purification and subunit composition. *The Journal of Biological Chemistry* 259 (3), 1667-1675.
- Hawkins C L & Davies M J** (1998), Hypochlorite-induced damage to proteins: formation of nitrogen-centred radicals from lysine residues and their role in protein fragmentation. *Biochem J* 332, 617-625.
- Heinemann S H, Terlau H, Stühmer W, Imoto K, Numa S** (1992), Calcium channel characteristics conferred on the sodium channel by single mutations. *Nature* 356, 441-443.
- Heinemann S H, Rettig J, Wunder F, Pongs O** (1995), Molecular and functional characterization of a rat brain K_vβ3 potassium channel subunit. *FEBS Letters* 377, 383-389.
- Higure Y, Katayama Y, Takeuchi K, Ohtubo Y, Yoshii K** (2003), Lucifer Yellow slows voltage-gated Na⁺ current inactivation in a light-dependent manner in mice. *The Journal of Physiology* 550, 159-167.
- Hille B** (1992), Ionic channels of excitable membranes. Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts, Second edition.
- Hisatome I, Kurata Y, Sasaki N, Morisaki T, Morisaki H, Tanaka Y, Urashima T, Yatsushashi T, Tsuboi M, Kitamura F, Miake J, Takeda S, Taniguchi S, Ogino K, Igawa O, Yoshida A, Sato R, Makita N, Shigemasa C** (2000), Block of sodium channels by divalent mercury: Role of specific cysteinyl residues in the P-loop region. *Biophysical Journal* 79, 1336-1345.
- Hool L C** (2006), Reactive Oxygen species in cardiac signaling: From mitochondria to plasma membrane ion channels. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 33, 146-151.
- Horstmann H J, Rohen J W, Sames K** (1983), Age-related changes in the composition of proteins in the trabecular meshwork of the human eye. *Mechanisms of Ageing and Development* 21, 121-136.
- Hoshi T & Heinemann S H** (2001), Regulation of cell function by methionine oxidation and reduction. *The Journal of Physiology* 53, 1-11.
- Hoyt R C** (1968), Sodium inactivation in nerve fibers. *Biophysical Journal* 8, 1074-1097.
- Isom L L, De Jongh K S, Patton D E, Reber B F, Offord, J, Charbonneau H, Walsh K, Goldin A L, Catterall W A** (1992), Primary structure and functional expression of the beta 1 subunit of the rat brain sodium channel. *Science* 256 (5058), 839-842.
- Isom L L, Scheuer T, Brownstein A B, Ragsdale D S, Murphy B J, Catterall W A** (1995), Functional co-expression of the β1 and type IIA α subunits of sodium channels in a mammalian cell line. *The Journal of Biological Chemistry* 270 (7), 3306-3312.

- Jokovic P M, Nelson M T, Jevtovic-Todorovic V, Patel M K, Perez-Reyes E, Campbell K P, Chen C-C, Todorovic S M** (2006), $Ca_v3.2$ is the major molecular substrate for redox regulation of T-type Ca^{2+} channels in the rat and mouse thalamus. *J Physiol* 574.2, 415-430.
- Ju Y-K, Saint D A, Gage P W** (1996), Hypoxia increases persistent sodium current in rat ventricular myocytes. *Journal of Physiology* 497.2, 337-347.
- Jung S, Hansel A, Kasperczyk H, Hoshi T, Heinemann S H** (2002), Activity, tissue distribution and site-directed mutagenesis of a human peptide methionine sulfoxide reductase of type B: hCBS1. *FEBS Letters* 527, 91-94.
- Kassmann M, Hansel A, Leipold E, Birkenbeil J, Lu S-Q, Hoshi T, Heinemann S H** (2008), Oxidation of multiple methionine residues impairs rapid sodium channel inactivation. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 456, 1085-1095.
- Keck R G** (1996), The use of t-butyl hydroperoxide as a probe for methionine oxidation in proteins. *Analytical Biochemistry* 236, 56-62.
- Kellenberger S, Scheuer T, Catterall W A** (1996), Movement of the Na^+ channel gate during inactivation. *The Journal of Biological Chemistry* 271 (48), 30971-30979.
- Kellenberger S, West J W, Scheuer T, Catterall W A** (1997), Molecular analysis of the putative inactivation particle in the inactivation gate of brain type IIA Na^+ channels. *J. Gen. Physiol.* 109, 589-605.
- Khan A, Kyle J W, Hanck D A, Lipkind G M, Fozzard H A** (2006), Isoform-dependent interaction of voltage-gated sodium channels with protons. *J Physiol* 576.2, 493-501.
- Kim H-Y & Gladyshev V N** (2004), Methionine sulfoxide reduction in mammals: Characterization of methionine-R-sulfoxide reductases. *Molecular Biology of the Cell* 15, 1055-1064.
- Kirsch G E, Alam M, Hartmann H A** (1994), Differential effects of Sulfhydryl reagents on saxitoxin and tetrodotoxin block of voltage-dependent Na^+ channels. *Biophysical Journal* 67, 2305-2315.
- Kiryu C, Makiuchi M, Miyazaki J, Fujinaga T, Kakinuma K** (1999), Physiological production of singlet molecular oxygen in the myeloperoxidase- H_2O_2 -chloride system. *FEBS Letters* 443, 154-158.
- Kitakaze M, Node K, Komamura K, Minamino T, Inoue M, Hori M, Kamada T** (1995), Evidence for nitric oxide generation in the cardiomyocytes: its augmentation by hypoxia. *L Mol Cell Cardiol* 27, 2149-2154.
- Kontis K J & Goldin A L** (1997), Sodium channel inactivation is altered by substitution of voltage sensor positive charges. *The Journal of General Physiology* 110, 403-413.
- Kourie J I** (1998), Interaction of reactive oxygen species with ion transport mechanisms. *Am J Physiol* 275 (Cell Physiol 44), C1-C24.
- Kuschel L, Hansel A, Schönherr R, Weissbach H, Brot N, Hoshi T, Heinemann S H** (1999), Molecular cloning and functional expression of a human peptide methionine sulfoxide reductase (hMsra). *FEBS Letters* 456, 17-21.
- Lang R J & Harvey J R** (2002), Thiol reagents and nitric oxide modulate the gating of BK_{Ca} channels from the guinea-pig *Taenia caeci*. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 29, 944-949.
- Lau D & Baldus S** (2006), Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease. *Pharmacology & Therapeutics* 111, 16-26.
- Lerche H, Peter W, Fleischhauer R, Pika-Hartlaub U, Malina T, Mitrovic N, Lehmann-Horn F** (1997a), Role in fast inactivation of the IV/S4-S5 loop of the human muscle Na^+ channel probed by cysteine mutagenesis. *The Journal of Physiology* 505, 345-352.
- Lerche H, Mitrovic N, Lehmann-Horn F** (1997b), Ion channel diseases in neurology. *Fortschr Neurol Psychiatr* 65 (11), 481-488.
- Levine R L, Mosoni L, Berlett B S, Stadtman E R** (1996), Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. *PNAS* 93, 15036-15040.
- Levine R L, Berlett B S, Moskovitz J, Mosoni L, Stadtman E R** (1999), Methionine residues may protect proteins from critical oxidative damage. *Mechanisms of Ageing and Development* 107, 323-332.
- Levine R L, Moskovitz J, Stadtman E R** (2000), Oxidation of methionine in proteins: roles in antioxidant defense and cellular regulation. *IUBMB Life* 50 (4-5), 301-307.
- Levitan I B** (1999), It is calmodulin after all! Mediator of the calcium modulation of multiple ion channels. *Neuron* 22, 645-648.
- Lipton P** (1999), Ischemic cell death in brain neurons. *Physiological Reviews* 79 (4), 1431-1568.
- MacKinnon R** (2003), Potassium channels. *FEBS Letters* 555, 62-65.
- Maltsev V A, Sabbah H N, Higgins R S D, Silverman N, Lesch M, Undrovinas A I** (1998), Novel, ultraslow inactivating sodium current in human ventricular cardiomyocytes. *Circulation* 98, 2545-2552.
- Mantegazza M, Yu F H, Catterall W A, Scheuer T** (2001), Role of the C-terminal domain in inactivation of brain and cardiac sodium channels. *PNAS* 98 (26), 15348-15353.
- Mao Y, Zang L, Shi X** (1995), Singlet oxygen generation in the superoxide reaction. *Biochem Mol Biol Int* 36 (1), 227-232.
- Mary J, Vouquier S, Picot C R, Perichon M, Petropoulos I, Friguet B** (2004), Enzymatic reactions involved in the repair of oxidized proteins. *Experimental Gerontology* 39, 1117-1123.

- Matthews E A, Wood J N, Dickenson A H** (2006), Nav1.8-null mice show stimulus-dependent deficits in spinal neuronal activity. *Molecular Pain* 2 (5).
- McClatchey A I, Van den Bergh P, Pericak-Vance M A, Raskind W, Verellen C, McKenna-Yasek D, Rao K, Haines J L, Bird T, Brown R H Jr, Gusella J F** (1992), Temperature-sensitive mutations in the III-IV cytoplasmic loop region of the skeletal muscle sodium channel gene in paramyotonia congenita. *Cell* 68, 769-774.
- McPate M J, Zhang H, Cordeiro J M, Dempsey C E, Witchel H J, Hancox J C** (2009), hERG1a/1b heteromeric currents exhibit amplified attenuation of inactivation in variant 1 short QT syndrome. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 386, 111-117.
- McPhee J C, Ragsdale D S, Scheuer T, Catterall W A** (1994), A mutation in segment IVS6 disrupts fast inactivation of sodium channels. *PNAS* 91, 12346-12350.
- McPhee J C, Ragsdale D S, Scheuer T, Catterall W A** (1995), A critical role for transmembrane segment IVS6 of the sodium channel α subunit in fast inactivation. *The Journal of Biological Chemistry* 270 (20), 12025-12034.
- McPhee J C, Ragsdale D S, Scheuer T, Catterall W A** (1998), A critical role for the S4-S5 intracellular loop of the sodium channel α subunit in fast inactivation. *The Journal of Biological Chemistry* 270 (20), 1121-1129.
- Mitsui A, Hamuro J, Nakamura H, Kondo N, Hirabayashi Y, Ishizaki-Koizumi S, Hirakawa T, Inoue T, Yodoi J** (2002), Overexpression of human thioredoxin in transgenic mice controls oxidative stress and life span. *Antioxid Redox Signal* 4, 693-696.
- Mohsenin V & Gee J L** (1989), Oxidation of alpha 1 protease inhibitor: role of lipid peroxidation products. *Journal of Applied Physiology* 66, 2211-2215.
- Morgan K, Stevens E B, Shah B, Cox P J, Dixon A K, Lee K, Pinnock R D, Hughes J, Richardson P J, Mizuguchi K, Jackson A P** (2000), beta 3: an additional auxiliary subunit of the voltage-sensitive sodium channel that modulates channel gating with distinct kinetics. *PNAS* 97, 2308-2313.
- Morrison M & Schonbaum G R** (1976), Peroxidase-catalyzed halogenation. *Annu Rev Biochem* 45, 861-888.
- Moskovitz J, Rahman M A, Strassman J, Yancey S O, Kushner S R, Brot N, Weissbach H** (1995), *Escherichia coli* peptide methionine sulfoxide reductase gene: regulation of expression and role in protecting against oxidative damage. *Journal of Bacteriology* 177 (3), 502-507.
- Moskovitz J, Jenkins N A, Gilbert D J, Copeland N G, Jursky F, Weissbach H, Brot N** (1996), Chromosomal localization of the mammalian peptide-methionine sulfoxide reductase gene and its differential expression in various tissues. *PNAS* 93, 3205-3208.
- Moskovitz J, Flescher E, Berlett B S, Azare J, Poston J M, Stadtman E R** (1998), Overexpression of peptide-methionine sulfoxide reductase in *Saccharomyces cerevisiae* and human T cells provides them with high resistance to oxidative stress. *PNAS* 95, 14071-14075.
- Moskovitz J, Bar-Noy S, Williams W M, Requena J, Berlett B S, Stadtman E R** (2001), Methionine sulfoxide reductase (MsrA) is a regulator of antioxidant defense and lifespan in mammals. *PNAS* 98 (23), 12920-12925.
- Moskovitz J, Singh V K, Requena J, Wilkinson B J, Jayaswal R K, Stadtman E R** (2002), Purification and characterization of methionine sulfoxide reductases from mouse and *Staphylococcus aureus* and their substrate stereospecificity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 290, 62-65.
- Moskovitz J & Stadtman E R** (2003), Selenium-deficient diet enhances protein oxidation and affects methionine sulfoxide reductases (MsrB) protein level in certain mouse tissues. *PNAS* 100 (13), 7486-7490.
- Neher E & Sakmann B** (1976), Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibers. *Nature* 260, 799-802.
- Noda M, Shimizu S, Tanabe T, Takai T, Kayano T, Ikeda T, Takahashi H, Nakayama H, Kanaoka Y, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H, Raftery M A, Hirose T, Inayama S, Hayashida H, Miyata T, Numa S** (1984), Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature* 312, 121-127.
- Nosyreva E D, Grishchenko I I, Negulyaev Yu A** (1988), Effects of chloramine-T on activation and inactivation of sodium channels in neuroblastoma cells. *Neurophysiology* 19 (6), 574-579.
- Numberger M & Draguhn A** (1996), Patch-Clamp-Technik. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Oliver C N, Ahn B, Moerman E J, Goldstein S, Stadtman E R** (1987), Age-related changes in oxidized proteins. *The Journal of Biological Chemistry* 262 (12), 5488-5491.
- O'Reilly J P, Cummins T R, Haddad G G** (1997), Oxygen deprivation inhibits Na⁺ current in rat hippocampal neurones via protein kinase C. *Journal of Physiology* 503.3, 479-488.
- Osipov A N, Moravsky A P, Shuvalov V F, Azizova O A, Vladimirov Yu A** (1980), Study of peroxy radicals destruction in lipids. *Biofizika* 25, 234-238.
- Osipov A N, Savov V M, Yachyaev A V, Zubarev V E, Azizova O A, Kagan V E, Vladimirov Yu A** (1984), Spin trapping study of radicals generated in the reaction of organic peroxides with ferrous iron. *Biofizika* 29, 533-536.

- Petersen M & LaMotte R H** (1991), Relationships between capsaicin sensitivity of mammalian sensory neurons, cell size and type of voltage gated Ca-currents. *Brain Research* 561, 20-26.
- Petropoulos I, Mary J, Perichon M, Friguet B** (2001), Rat peptide methionine sulphoxide reductase: cloning of the cDNA, and down-regulation of gene expression and enzyme activity during aging. *Biochem J* 355, 819-825.
- Poole L B, Karplus P A, Claiborne A** (2004), Protein sulfenic acids in redox signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44, 325-347.
- Prentice H M, Moench I A, Rickaway Z T, Dougherty C J, Webster K A, Weissbach H** (2008), MsrA protects cardiac myocytes against hypoxia/reoxygenation induced cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 366, 775-778.
- Ptáček L J, George A L Jr, Griggs R C, Tawil R, Kallen R G, Barchi R L, Robertson M, Leppert M F** (1991), Identification of a mutation in the gene causing hyperkalemic periodic paralysis. *Cell* 67, 1021-1027.
- Ptáček L J, George A L Jr, Barchi R L, Griggs R C, Riggs J E, Robertson M, Leppert M F** (1992), Mutations in an S4 segment of the adult skeletal muscle sodium channel cause paramyotonia congenita. *Neuron* 8, 891-897.
- Pusch M & Neher E** (1988), Rates of diffusional exchange between small cells and a measuring patch pipette. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 411, 204-211.
- Quiñonez M, DiFranco M, González F** (1999), Involvement of Methionine residues in the fast inactivation mechanism of the sodium current from toad skeletal muscle fibers. *Journal of Membrane Biology* 169, 83-90.
- Reddy V Y, Desrochers P E, Pizzo S V, Gonias S L, Sahakian J A, Levine R L, Weiss S J** (1994), Oxidative dissociation of human α_2 -macroglobulin tetramers into dysfunctional dimers. *The Journal of Biological Chemistry* 269 (6), 4683-4691.
- Requena J R, Dimitrova M N, Legname G, Teijeira S, Prusiner S B, Levine R L** (2004), Oxidation of Methionine residues in the prion protein by hydrogen peroxide. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 432, 188-195.
- Rettig J, Heinemann S H, Wunder F, Lorra C, Parcej D N, Dolly J O, Pongs O** (1994), Inactivation properties of voltage-gated K^+ channels altered by presence of β -subunit. *Nature* 369, 289-294.
- Reznick A Z, Witt E, Matsumoto M, Packer L** (1992), Vitamin E inhibits protein oxidation in skeletal muscle of resting and exercised rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 189 (2), 801-806.
- Rohl C A, Boeckman F A, Baker C, Scheuer T, Catterall W A, Klevit R E** (1999), Solution structure of the sodium channel inactivation gate. *Biochemistry* 38 (3), 855-861.
- Rojas C V, Wang J, Schwartz L S, Hoffman E P, Powell B R, Brown R H Jr** (1991), A Met-to Val mutation in the skeletal muscle Na^+ channel α -subunit in hypercalcaemic periodic paralysis. *Nature* 354, 387-389.
- Ruan H, Tang X D, Chen M-L, Joiner M-L A, Sun G, Brot N, Weissbach H, Heinemann S H, Iverson L, Wu C-F, Hoshi T** (2002), High-quality life extension by the enzyme peptide methionine sulfoxide reductase. *PNAS* 99 (5), 2748-2753.
- Ruppersberg J P, Stocker M, Pongs O, Heinemann S H, Frank R, Koenen M** (1991), Regulation of fast inactivation of cloned mammalian $I_{K(A)}$ channels by cysteine oxidation. *Nature* 352, 711-714.
- Rybak I A, Ptak K, Shevtsova N A, McCrimmon D R** (2003), Sodium currents in neurons from the rostroventrolateral medulla of the rat. *J Neurophysiol* 90, 1635-1642.
- Sadanandom A, Poghosyan Z, Fairbairn D J, Murphy D J** (2000), Differential regulation of plastidial and cytosolic isoforms of peptide methionine sulfoxide reductase in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 123, 255-263.
- Saint D A, Ju Y-K, Gage P W** (1992), A persistent sodium current in rat ventricular myocytes. *Journal of Physiology* 453, 219-231.
- Saint D A** (2008), The cardiac persistent sodium current: an appealing therapeutic target? *British Journal of Pharmacology* 153, 1133-1142.
- Sakmann B F A S, Spindler A J, Bryant S M, Linz K W, Noble D** (2000), Distribution of a persistent sodium current across the ventricular wall in guinea pigs. *Circulation Research* 87, 910-914.
- Schafer F Q & Buettner G R** (2001), Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biology & Medicine* 30 (11), 1191-1212.
- Schiemann G & Novák P** (1927), Über die Oxydationswirkung von Chloramin-T. *Zeitschrift für angewandte Chemie* 40, 1032-1033.
- Schlieff T, Schönherr R, Imoto K, Heinemann S H** (1996), Pore properties of rat brain II sodium channels mutated in the selectivity filter domain. *Eur Biophys J* 25, 75-91.
- Schulz T J, Zarse K, Voigt A, Urban N, Birringer M, Ristow M** (2007), Glucose restriction extends *Caenorhabditis elegans* life span by inducing mitochondrial respiration and increasing oxidative stress. *Cell Metabolism* 6 (4), 280-293.
- Schwarz J R & Bauer C K** (2004), Functions of erg K^+ channels in excitable cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 8 (1), 22-30.

- Shappell S B, Toman C, Anderson D C, Taylor A A, Entman M L, Smith C W** (1990), Mac-1 (CD11b/18) mediates adherence-dependent hydrogen peroxide production by human and canine neutrophils. *The Journal of Immunology* 144 (7), 2702–2711.
- Shechter Y, Burstein Y, Patchornik A** (1975), Selective Oxidation of methionine residues in proteins. *Biochemistry* 14 (20), 4497-4503.
- Shechter Y** (1986), Selective Oxidation and reduction of methionine residues in peptides and proteins by oxygen exchange between sulfoxide and sulfide. *The Journal of Biological Chemistry* 261 (1), 66-70.
- Shiraishi M & Harris R A** (2004), Effects of alcohols and anesthetics on recombinant voltage-gated Na⁺ channels. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 309 (3), 987-994.
- Smith M R & Goldin A L** (1997), Interaction between the sodium channel inactivation linker and domain III S4-S5. *Biophysical Journal* 73, 1885-1895.
- Song Y, Shryock J C, Wagner S, Maier L S, Belardinelli L** (2006), Blocking late sodium current reduces hydrogen peroxide-induced arrhythmogenic activity and contractile dysfunction. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 318 (1), 214-222.
- Squier T C & Bigelow D J** (2000), Protein oxidation and age-dependent alterations in calcium homeostasis. *Frontiers in Bioscience* 5, 504-526.
- Stadtman E R & Berlett B S** (1998), Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. In: Gilbert & Colton (1999), *Reactive oxygen species in biological systems*. Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York.
- Stadtman E R, Moskovitz J, Berlett B S, Levine R L** (2002), Cyclic oxidation and reduction of protein methionine residues is an important antioxidant mechanism. *Molecular and Cellular Biochemistry* 234/235, 3-9.
- Stadtman E R, Van Remmen H, Richardson A, Wehr N B, Levine R L** (2005), Methionine oxidation and aging. *Biochimica et Biophysica Acta* 1703, 135-140.
- Starke-Reed P E & Oliver C N** (1989), Protein oxidation and proteolysis during aging and oxidative stress. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 275 (2), 559-567.
- Starkus J G, Varga Z, Schönherr R, Heinemann S H** (2003), Mechanisms of the inhibition of Shaker potassium channels by protons. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 447, 44-54.
- Steffan R & Heinemann S H** (1997), Error estimates for results of nonstationary noise analysis derived with linear least squares methods. *Journal of Neuroscience Methods* 78, 51-63.
- Stief T W, Feek U, Ramaswamy A, Kretschmer V, Renz H, Fareed J** (2001), Singlet oxygen (¹O₂) disrupts platelet aggregates. *Thrombosis Research* 104, 361-370.
- Stühmer W, Conti F, Suzuki H, Wang X, Noda M, Yahagi N, Kubo H, Numa S** (1989), Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel. *Nature* 339, 597-603.
- Su Z, Limberis J, Martin R L, Xu R, Kolbe K, Heinemann S H, Hoshi T, Cox B F, Gintant G A** (2007), Functional consequences of methionine oxidation of hERG potassium channels. *Biochemical Pharmacology* 74, 702-711.
- Sugiyama S, Okada Y, Sukhova G K, Virmani R, Heinecke J W, Libby P** (2001), Macrophage myeloperoxidase regulation by granulocyte macrophage colony-stimulating factor in human atherosclerosis and implications in acute coronary syndromes. *American Journal of Pathology* 158, 879-891.
- Sugiyama S, Kugiyama K, Aikawa M, Nakamura S, Ogawa H, Libby P** (2004), Hypochlorous acid, a macrophage product, induces endothelial apoptosis and tissue factor expression. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 24 (7), 1309-1314.
- Sullivan J M, Traynelis S F, Chen H-S V, Escobar W, Heinemann S F, Lipton S A** (1994), Identification of two cysteine residues that are required for redox modulation of the NMDA subtype of glutamate receptor. *Neuron* 13, 929-936.
- Sun Y-M, Favre I, Schild L, Moczydlowski E** (1997), On the structural basis for size-selective permeation of organic cations through the voltage-gated sodium channel Effect of alanine mutations at the DEKA locus on selectivity Inhibition by Ca²⁺ and H⁺, and molecular sieving. *J Gen Physiol* 110, 693-715.
- Sun H, Gao J, Ferrington D A, Biesiada H, Williams T D, Squier T C** (1999), Repair of oxidized calmodulin by methionine sulfoxide reductase restores ability to activate the plasma membrane CaATPase. *Biochemistry* 38, 105-112.
- Suzuki Y J, Forman H J, Sevanian A** (1997), Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Radical Biology & Medicine* 22 (1/2), 269-285.
- Tang L, Kallen R G, Horn R** (1996), Role of an S4-S5 linker in sodium channel inactivation probed by mutagenesis and a peptide blocker. *J Gen Physiol* 108, 89-104.
- Truscott R J W & Augusteyn R C** (1977), Oxidative changes in human lens proteins during senile nuclear cataract formation. *Biochimica et Biophysica Acta* 492, 43-52.
- Ulbricht W** (2005), Sodium channel inactivation: molecular determinants and modulation. *Physiol Rev* 85, 1271-1301.
- Urban B W** (1993), Differential effects of gaseous and volatile anaesthetics on sodium and potassium channels. *British Journal of Anaesthesia* 71, 25-38.

- Vassilev P M, Scheuer T, Catterall W A** (1988), Identification of an intracellular peptide segment involved in sodium channel inactivation. *Science* 241 (4873), 1658-1661.
- Vassilev P, Scheuer T, Catterall W A** (1989), Inhibition of inactivation of single sodium channels by a site-directed antibody. *PNAS* 86, 8147-8151.
- Vedantham V & Cannon S C** (1998), Slow inactivation does not affect movement of the fast inactivation gate in voltage-gated Na⁺ channels. *J Gen Physiol* 111, 83-93.
- Vedantham V & Cannon S C** (1999), The position of the fast-inactivation gate during lidocaine block of voltage-gated Na⁺ channels. *J Gen Physiol* 113, 7-16.
- Vogt W, von Zabern I, Hesse D, Nolte R, Haller Y** (1986), Generation of an activated form of human C5 (C5b-like C5) by oxygen radicals. *Immunology Letters* 14, 209-215.
- Vogt W** (1995), Oxidation of methionyl residues in proteins: tools, targets, and reversal. *Free Radical Biology & Medicine* 18 (1), 93-105.
- Wang G K** (1984), Modification of sodium channel inactivation in single myelinated nerve fibers by methionine-reactive chemicals. *Biophys J* 46 (1), 121-124.
- Wang G K & Wang S Y** (2002), Modifications of human cardiac sodium channel gating by UVA light. *The Journal of Membrane Biology* 189, 153-165.
- Weiss S J, Lampert M B, Test S T** (1983), Long-lived oxidants generated by human neutrophils: characterization and bioactivity. *Science* 222, 625-628.
- Weissbach H, Etienne F, Hoshi T, Heinemann S H, Lowther W T, Matthews B, John G S, Nathan C, Brot N** (2002), Peptide methionine reductase: structure, mechanism of action, and biological function. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 397 (2), 172-178.
- West J W, Patton D E, Scheuer T, Wang Y, Goldin A L, Catterall W A** (1992), A cluster of hydrophobic amino acid residues required for fast Na⁺-channel inactivation. *PNAS* 89, 10910-10914.
- Witt E H, Reznick A Z, Viguie C A, Starke-Reed P, Packer L** (1992), Exercise, oxidative damage and effects of antioxidant manipulation. *The Journal of Nutrition* 122, 766-773.
- Wolin M S, Ahmad M, Gupte S A** (2005), Oxidant and redox signaling in vascular oxygen sensing mechanisms: basic concepts, current controversies, and potential importance of cytosolic NADPH. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 289, L159-L173.
- Wood J N, Boormann J P, Okuse K, Baker M D** (2004), Voltage-gated sodium channels and pain pathways. *J Neurobiol* 61 (1), 55-71.
- Woods A A, Linton S M, Davies M J** (2003), Detection of HOCl-mediated protein oxidation products in the extracellular matrix of human atherosclerotic plaques. *Biochem J* 370, 729-735.
- Xiao X H & Allen D G** (1999), Role of Na⁺/H⁺ exchanger during ischemia and preconditioning in the isolated rat heart. *Circulation Research* 85, 723-730.
- Yang N, Ji S, Zhou M, Ptáček L J, Barchi R L, Horn R, George A L Jr.** (1994), Sodium channel mutations in paramyotonia congenita exhibit similar biophysical phenotypes *in vitro*. *PNAS* 91, 12785-12789.
- Yao Y, Yin D, Jas G S, Kuczera K, Williams T D, Schöneich C, Squier T C** (1996), Oxidative modification of a carboxyl-terminal vicinal methionine in calmodulin by hydrogen peroxide inhibits calmodulin-dependent activation of the plasma membrane Ca-ATPase. *Biochemistry* 35, 2767-2787.
- Yatsushashi T, Hisatome I, Kurata Y, Sasaki N, Ogura K, Kato M, Kinugasa R, Matsubara K, Yamawaki M, Yamamoto Y, Tanaka Y, Ogino K, Igawa O, Makita N, Shigemasa C** (2002), L-cysteine prevents oxidation-induced block of the cardiac Na⁺ channel via interaction with heart-specific cysteinyl residues in the P-loop region. *Circulation Journal* 66, 846-850.
- Yermolaieva O, Xu R, Schinstock C, Brot N, Weissbach H, Heinemann S H, Hoshi T** (2004), Methionine sulfoxide reductase A protects neuronal cells against brief hypoxia/reoxygenation. *PNAS* 101 (5), 1159-1164.
- Yu B P, Kang C M, Han J S, Kim D S** (1998), Can antioxidant supplementation slow the aging process? *Biofactors* 7 (1-2), 93-101.
- Yu F H, Westenbroek R E, Silos-Santiago I, McCormick K A, Lawson D, Ge P, Ferriera H, Lilly J, DiStefano P S, Catterall W A, Scheuer T, Curtis R** (2003), Sodium channel β_4 , a new disulfide-linked auxiliary subunit with similarity to β_2 . *The Journal of Neuroscience* 23 (20), 7577-7585.
- Zimmermann K, Leffler A, Babes A, Cendan C M, Carr R W, Kobayashi J, Nau C, Wood J N, Reeh P W** (2007), Sensory neuron sodium channel Na_v1.8 is essential for pain at low temperatures. *Nature* 447 (7146), 855-858.
- Zou S, Meadows S, Sharp L, Jan L Y, Jan Y N** (2000), Genome-wide study of aging and oxidative stress response in *Drosophila melanogaster*. *PNAS* 97 (25), 13726-13731.

Anhang

Tabelle A.1.A:

Parameter für die Aktivierung und Inaktivierung spannungsgesteuerter Natriumkanäle.

Die Werte für die Aktivierung wurden durch Anpassung nach Gleichung 2.2, die Werte für die Inaktivierung durch Anpassung nach Gleichung 2.3 der nach den jeweiligen in Abschnitt 2.4.2.3 beschriebenen Messprotokollen erhaltenen Daten gewonnen.

Kanal	Halbmaximale Spannung der Aktivierung (V_m/mV)	Steigungsfaktor der Aktivierung (k_m/mV)	Halbmaximale Spannung der Inaktivierung (V_h/mV)	Steigungsfaktor der Inaktivierung (k_h/mV)	Anzahl unabhängiger Experimente
rNav1.2 WT	-39.6±1.7	11.0±0.7	-73.3±1.0	-5.3±0.3	7
rNav1.4 WT	-41.0±0.6	9.8±0.1	-75.3±0.6	-5.5±0.1	52
rNav1.4 IFM-L	-42.5±0.6	8.5±0.2	-73.6±0.6	-5.8±0.1	76
rNav1.4 IFM-L intern 8 mM DTT	-40.6±1.0	8.4±0.4	-70.3±1.2	-5.6±0.2	22
rNav1.4 IFM-L intern 15 µg/ml MSRA und 8 mM DTT	-38.3±0.7	8.9±0.2	-69.2±0.8	-5.4±0.1	19
rNav1.4 IFM-L intern 15 µg/ml MSRA, 30 µg/ml MSRB und 8 mM DTT	-40.7±1.2	8.1±0.3	-70.6±1.1	-5.3±0.1	16
rNav1.4 IFL	-43.3±1.4	8.7±0.3	-78.5±1.4	-5.6±0.1	28
rNav1.4 IFM-LL	-41.8±1.4	9.3±0.3	-92.3±1.3	-5.6±0.1	17
rNav1.4 IFL-LL	-43.0±1.1	8.3±0.6	-92.4±1.0	-5.4±0.2	22
rNav1.4 IFM-4L	-47.3±1.2	9.1±0.2	-87.0±1.6	-6.8±0.2	23
rNav1.4 IFM-6L	-47.6±1.1	8.7±0.5	-108.6±1.6	-7.8±0.3	21
rNav1.4 IFL-6L	-46.3±0.8	9.7±0.2	-112.6±1.2	-8.9±0.2	21
rNav1.4 IFM-LM	-37.3±1.5	10.8±0.6	-78.5±1.2	-5.5±0.1	17
rNav1.4 IFM-ML	-38.8±1.5	10.7±0.4	-87.4±1.4	-5.4±0.2	15
rNav1.4 IFM-L-LM	-41.0±1.1	9.0±0.3	-79.5±1.5	-5.7±0.2	13
rNav1.4 IFM-L-ML	-41.0±0.8	9.6±0.3	-86.2±1.0	-6.0±0.2	18
rNav1.4 MFM	-40.2±1.3	9.5±0.5	-69.7±1.1	-5.3±0.2	12
rNav1.4 MFM-LL	-40.5±1.2	9.9±0.2	-87.1±1.2	-5.2±0.2	22
rNav1.4 MFM-LM	-41.3±0.7	9.8±0.4	-74.3±0.9	-5.4±0.2	8
rNav1.4 MFM-ML	-39.8±1.9	9.0±0.3	-81.9±2.6	-5.2±0.1	8

Tabelle A.1B:

Parameter für die Aktivierung und Inaktivierung spannungsgesteuerter Natriumkanäle.

Die Werte für die Aktivierung wurden durch Anpassung nach Gleichung 2.2, die Werte für die Inaktivierung durch Anpassung nach Gleichung 2.3 der nach den jeweiligen in Abschnitt 2.4.2.3 beschriebenen Messprotokollen erhaltenen Daten gewonnen.

Kanal	Halbmaximale Spannung der Aktivierung (V_m/mV)	Steigungsfaktor der Aktivierung (k_{ap}/mV)	Halbmaximale Spannung der Inaktivierung (V_h/mV)	Steigungsfaktor der Inaktivierung (k_{ip}/mV)	Anzahl unabhängiger Experimente
rNav1.4 MMM-L	-39.8±0.8	9.6±0.3	-59.1±0.9	-6.9±0.5	14
rNav1.4 IFC-L	-38.7±2.2	8.5±0.3	-61.5±2.4	-5.9±0.2	8
rNav1.4 ICM-L	-40.7±0.8	10.2±0.9	-56.3±1.1	-10.5±1.3	4
rNav1.4 Y401C	-40.5±1.7	9.7±0.3	-74.6±1.6	-5.8±0.2	18
rNav1.4 Y401C IFL	-38.8±1.0	9.7±0.2	-76.2±1.1	-5.9±0.2	14
hNav1.5 WT	-57.4±0.9	10.7±0.3	-98.0±0.8	-6.0±0.1	42
hNav1.5 WT intern 8 mM DTT	-54.7±1.8	10.2±0.4	-94.1±2.8	-5.6±0.2	6
hNav1.5 IFL	-56.4±1.0	10.6±0.2	-99.4±1.1	-6.4±0.2	25
hNav1.5 C373Y	-58.0±0.8	9.7±0.2	-99.1±0.7	-5.8±0.1	27
hNav1.5 C373Y IFL	-55.4±1.3	9.4±0.3	-98.1±1.5	-6.0±0.2	14
4455	-48.6±1.0	11.3±0.6	-90.1±1.5	-6.7±0.4	12
5544	-41.1±0.9	13.1±1.1	-83.5±1.8	-6.1±0.4	8
4544	-30.2±1.1	12.5±0.6	-71.6±1.1	-5.0±0.2	8
5444	-44.2±2.0	10.2±0.3	-80.7±1.8	-5.8±0.0	8
5444 IFL	-42.7±2.0	10.3±0.4	-82.7±1.4	-6.7±0.3	10
5444 C373Y	-42.2±1.2	9.5±0.2	-77.2±1.4	-6.4±0.2	7
5444 C373Y IFL	-45.1±1.5	9.7±0.5	-83.3±1.1	-6.8±0.4	8
hNav1.7 WT	-41.5±3.2	11.4±0.8	-87.1±2.3	-5.6±0.2	7
DRG-Neurone, Maus	-48.0±1.5	5.4±0.8	-49.1±1.5	-5.9±0.6	38 (Akt.)/35 (Inakt.)
r8888c4	-21.8±2.9	19.0±1.3	-57.6±3.2	-6.0±0.6	12
h8888c4	-29.7±5.1	22.0±1.6	-73.1±4.8	-7.8±0.9	8
4844	-21.1±1.7	17.7±0.5	-70.4±1.9	-6.1±0.8	3
4484	-44.3±1.3	11.2±0.5	-72.2±2.5	-8.8±1.5	5

Tabelle A.2:

Ergebnisse der Anpassung des Inaktivierungsverlustes spannungsgesteuerter Natriumkanäle durch Oxidation mit 20 μM ChT nach Gleichung 2.5.

Kanal	Zeitkonstante (s)	Inaktivierungs- index 500 s nach Applikation	Anzahl unabhängiger Experimente
r8888c4	3827 \pm 1022	0.843 \pm 0.045	5
h8888c4	2372 \pm 463	0.882 \pm 0.029	5

Tabelle A.3:

Ergebnisse der Anpassung des Inaktivierungsverlustes spannungsgesteuerter Natriumkanäle durch Oxidation mit 50 μM ChT nach Gleichung 2.5.

Kanal	Zeitkonstante (s)	Inaktivierungs- index 500 s nach Applikation	Anzahl unabhängiger Experimente
rNav1.4 WT	2771 \pm 778	0.938 \pm 0.025	5
rNav1.4 IFM-L	2285 \pm 627	0.937 \pm 0.019	3
rNav1.4 MMM-L	234 \pm 30	0.216 \pm 0.047	7
DRG-Neurone, Maus Pulse auf -20 mV	500 \pm 155	0.519 \pm 0.185	4

Tabelle A.4:

Ergebnisse der Anpassung des Inaktivierungsverlustes spannungsgesteuerter Natriumkanäle durch Oxidation mit 100 μM ChT nach Gleichung 2.5.

Kanal	Zeitkonstante (s)	Inaktivierungs- index 500 s nach Applikation	Anzahl unabhängiger Experimente
rNav1.4 WT	1294 \pm 322	0.861 \pm 0.033	6
rNav1.4 IFM-L	1317 \pm 240	0.875 \pm 0.035	4

Tabelle A.5A:

Ergebnisse der Anpassung des Inaktivierungsverlustes spannungsgesteuerter Natriumkanäle durch Oxidation mit 200 μM ChT nach Gleichung 2.5.

Kanal	Zeitkonstante (s)	Inaktivierungs- index 500 s nach Applikation	Anzahl unabhängiger Experimente
rNav1.2 WT	356 \pm 37	0.409 \pm 0.048	7
rNav1.4 WT	475 \pm 39	0.552 \pm 0.037	11
rNav1.4 IFM-L	554 \pm 61	0.586 \pm 0.043	18
rNav1.4 IFL	813 \pm 35	0.780 \pm 0.020	5
rNav1.4 IFM-LL	966 \pm 44	0.832 \pm 0.010	7
rNav1.4 IFL-LL	1346 \pm 105	0.892 \pm 0.012	6
rNav1.4 IFM-4L	619 \pm 44	0.672 \pm 0.027	13
rNav1.4 IFM-6L	1234 \pm 246	0.842 \pm 0.024	9
rNav1.4 IFL-6L	2240 \pm 179	0.944 \pm 0.008	11
rNav1.4 IFM-LM	688 \pm 53	0.716 \pm 0.030	10
rNav1.4 IFM-ML	929 \pm 82	0.808 \pm 0.024	10
rNav1.4 IFM-L-LM	929 \pm 149	0.766 \pm 0.037	12
rNav1.4 IFM-L-ML	1532 \pm 504	0.825 \pm 0.032	13
rNav1.4 MFM	185 \pm 26	0.138 \pm 0.043	6
rNav1.4 MFM-LL	446 \pm 45	0.524 \pm 0.042	7
rNav1.4 MFM-LM	245 \pm 35	0.237 \pm 0.061	6
rNav1.4 MFM-ML	303 \pm 19	0.344 \pm 0.034	7
rNav1.4 ICM-L	12.4 \pm 0.1	0 \pm 0	2
rNav1.4 MMM-L	77 \pm 23	0.022 \pm 0.022	6
rNav1.4 Y401C	479 \pm 31	0.565 \pm 0.031	8
rNav1.4 Y401C IFL	685 \pm 67	0.705 \pm 0.037	7
hNav1.5 WT	379 \pm 16	0.457 \pm 0.024	6
hNav1.5 IFL	500 \pm 36	0.570 \pm 0.030	7
hNav1.5 IFL bei -100 mV	534 \pm 31	0.606 \pm 0.025	7
hNav1.5 IFL bei -140 mV	645 \pm 40	0.681 \pm 0.025	7
hNav1.5 C373Y	424 \pm 32	0.503 \pm 0.040	8
hNav1.5 C373Y IFL	553 \pm 56	0.614 \pm 0.039	7

Tabelle A.5B:

Ergebnisse der Anpassung des Inaktivierungsverlustes spannungsgesteuerter Natriumkanäle durch Oxidation mit 200 μM ChT nach Gleichung 2.5.

Kanal	Zeitkonstante (s)	Inaktivierungs- index 500 s nach Applikation	Anzahl unabhängiger Experimente
hNav1.5 C373Y IFL bei -100 mV	447 \pm 31	0.525 \pm 0.033	7
hNav1.5 C373Y IFL bei -140 mV	580 \pm 34	0.643 \pm 0.025	9
hNav1.7 WT 4484	513 \pm 90 399 \pm 70	0.545 \pm 0.068 0.447 \pm 0.085	7 4

Tabelle A.6:

Ergebnisse der Anpassung des Inaktivierungsverlustes spannungsgesteuerter Natriumkanäle durch Oxidation mit 500 μM ChT nach Gleichung 2.5.

Kanal	Zeitkonstante (s)	Inaktivierungs- index 500 s nach Applikation	Anzahl unabhängiger Experimente
rNav1.4 WT	221 \pm 14	0.200 \pm 0.027	11
rNav1.4 IFM-L	272 \pm 34	0.285 \pm 0.056	7
rNav1.4 IFL-LL	1019 \pm 124	0.837 \pm 0.028	3
rNav1.4 IFM	144 \pm 11	0.062 \pm 0.015	3

Tabelle A.7:

Ergebnisse der Anpassung des Inaktivierungsverlustes spannungsgesteuerter Natriumkanäle durch Oxidation mit 1 mM ChT nach Gleichung 2.5.

Kanal	Zeitkonstante (s)	Inaktivierungs- index 500 s nach Applikation	Anzahl unabhängiger Experimente
rNav1.4 WT	88 \pm 7	0.014 \pm 0.006	10
rNav1.4 IFM-L	110 \pm 5	0.025 \pm 0.006	12
rNav1.4 IFL	268 \pm 9	0.283 \pm 0.016	5
rNav1.4 IFM-LL	329 \pm 22	0.392 \pm 0.036	4
rNav1.4 IFL-LL	844 \pm 44	0.801 \pm 0.016	4
rNav1.4 IFM-4L	114 \pm 4	0.027 \pm 0.004	10
rNav1.4 IFM-6L	412 \pm 34	0.488 \pm 0.037	10
rNav1.4 IFL-6L	600 \pm 47	0.670 \pm 0.040	6
rNav1.4 IFM-LM	175 \pm 23	0.134 \pm 0.038	6
rNav1.4 IFM-ML	259 \pm 31	0.284 \pm 0.055	5

Tabelle A.8A:

Ergebnisse der Anpassung des Inaktivierungsverlustes spannungsgesteuerter Natriumkanäle durch Oxidation mit 1.5% H_2O_2 nach Gleichung 2.5.

Kanal	Zeitkonstante (s)	Inaktivierungs- index 500 s nach Applikation	Anzahl unabhängiger Experimente
rNav1.4 WT	1409 \pm 136	0.896 \pm 0.016	5
rNav1.4 IFL	2809 \pm 383	0.964 \pm 0.007	3
rNav1.4 Y401C	735 \pm 99	0.706 \pm 0.047	9
rNav1.4 Y401C IFL	1673 \pm 325	0.898 \pm 0.022	7
hNav1.5 WT	788 \pm 79	0.719 \pm 0.039	8
hNav1.5 WT intern 8 mM DTT	812 \pm 80	0.770 \pm 0.028	3
hNav1.5 IFL	1310 \pm 185	0.856 \pm 0.034	6
hNav1.5 C373Y	983 \pm 67	0.811 \pm 0.018	6
hNav1.5 C373Y IFL	1277 \pm 161	0.861 \pm 0.027	7

Tabelle A.8B:

Ergebnisse der Anpassung des Inaktivierungsverlustes spannungsgesteuerter Natriumkanäle durch Oxidation mit 1.5% H₂O₂ nach Gleichung 2.5.

Kanal	Zeitkonstante (s)	Inaktivierungs- index 500 s nach Applikation	Anzahl unabhängiger Experimente
4455	888±120	0.761±0.050	6
4544	1665±148	0.915±0.013	6
5444	640±93	0.649±0.069	6
5444 IFL	1186±88	0.853±0.016	10
5444 C373Y	638±69	0.658±0.063	7
5444 C373Y IFL	1125±38	0.852±0.009	8

Tabelle A.9:

Nicht-inaktivierender Strom bei spannungsgesteuerten Natriumkanälen vor Applikation von Oxidantien.

Kanal	Inaktivierungs- index vor Applikation	Anzahl unabhängiger Experimente
rNav1.4 M/M-L	0.954±0.006	13
rNav1.4 IFC-L	0.975±0.050	8
rNav1.4 ICM-L	0.885±0.020	3
DRG-Neurone, Maus	0.896±0.041	5
Pulse auf -10 mV		
DRG-Neurone, Maus	0.817±0.056	7
Pulse auf -20 mV		
r888c4	0.874±0.033	10
h888c4	0.929±0.013	8
4844	0.945±0.009	3
4484	0.975±0.002	5

Tabelle A.10:

Relativer Reststrom spannungsgesteuerter Natriumkanäle 200 s nach Applikation von 20 µM ChT.

Kanal	relativer Reststrom	Anzahl unabhängiger Experimente
r888c4	0.611±0.058	6
h888c4	0.838±0.050	5

Tabelle A.11:

Relativer Reststrom spannungsgesteuerter Natriumkanäle 200 s nach Applikation von 50 µM ChT.

Kanal	relativer Reststrom	Anzahl unabhängiger Experimente
rNav1.4 WT	0.938±0.041	5
rNav1.4 IFM-L	1.001±0.056	3
rNav1.4 M/M-L	1.095±0.031	7
DRG-Neurone, Maus	0.779±0.411	3
Pulse auf -20 mV		

Tabelle A.12:

Relativer Reststrom spannungsgesteuerter Natriumkanäle 200 s nach Applikation von 100 µM ChT.

Kanal	relativer Reststrom	Anzahl unabhängiger Experimente
rNav1.4 WT	1.015±0.014	6
rNav1.4 IFM-L	0.886±0.061	4
DRG-Neurone, Maus	0.609±0.050	4
Pulse auf -20 mV		

Tabelle A.13A:
Relativer Reststrom spannungsgesteuerter Natriumkanäle
200 s nach Applikation von 200 μ M ChT.

Kanal	relativer Reststrom	Anzahl unabhängiger Experimente
rNav1.2 WT	1.125 \pm 0.067	7
rNav1.4 WT	1.043 \pm 0.021	12
rNav1.4 IFM-L	1.022 \pm 0.018	19
rNav1.4 IFL	0.942 \pm 0.011	6
rNav1.4 IFM-LL	1.000 \pm 0.010	7
rNav1.4 IFL-LL	0.952 \pm 0.008	7
rNav1.4 IFM-4L	0.987 \pm 0.012	13
rNav1.4 IFM-6L	0.923 \pm 0.017	9
rNav1.4 IFL-6L	0.911 \pm 0.026	13
rNav1.4 IFM-LM	1.110 \pm 0.020	10
rNav1.4 IFM-ML	1.068 \pm 0.022	10
rNav1.4 IFM-L-LM	0.982 \pm 0.061	11
rNav1.4 IFM-L-ML	0.966 \pm 0.027	14
rNav1.4 MFM	1.204 \pm 0.039	6
rNav1.4 MFM-LL	1.160 \pm 0.046	7
rNav1.4 MFM-LM	1.318 \pm 0.029	7
rNav1.4 MFM-ML	1.352 \pm 0.034	7
rNav1.4 ICM-L	1.118 \pm 0.076	2
rNav1.4 MFM-L	1.227 \pm 0.038	6
rNav1.4 Y401C	0.523 \pm 0.018	8
rNav1.4 Y401C IFL	0.484 \pm 0.014	7
hNav1.5 WT	0.364 \pm 0.009	6
hNav1.5 IFL	0.337 \pm 0.017	7
hNav1.5 IFL bei -100 mV	0.356 \pm 0.035	7
hNav1.5 IFL bei -140 mV	0.568 \pm 0.017	7
hNav1.5 C373Y	0.702 \pm 0.021	8
hNav1.5 C373Y IFL	0.737 \pm 0.054	7

Tabelle A.13B:
Relativer Reststrom spannungsgesteuerter Natriumkanäle
200 s nach Applikation von 200 μ M ChT.

Kanal	relativer Reststrom	Anzahl unabhängiger Experimente
hNav1.5 C373Y IFL bei -100 mV	0.535 \pm 0.037	7
hNav1.5 C373Y IFL bei -140 mV	0.858 \pm 0.029	9
hNav1.7 WT	1.013 \pm 0.052	7
4484	0.964 \pm 0.103	4

Tabelle A.14:
Relativer Reststrom spannungsgesteuerter Natriumkanäle
200 s nach Applikation von 200 μ M ChT auf der
Grundlage der Berechnung nach dem Hodgkin-Huxley-Modell
(Gleichung 2.6).

Kanal	relativer Reststrom	Anzahl unabhängiger Experimente
rNav1.4 WT	0.506 \pm 0.028	12
hNav1.5 WT	0.175 \pm 0.007	6
hNav1.5 C373Y	0.341 \pm 0.017	8

Tabelle A.15:

Relativer Reststrom spannungsgesteuerter Natriumkanäle
200 s nach Applikation von 500 μ M ChT.

Kanal	relativer Reststrom	Anzahl unabhängiger Experimente
rNav1.4 WT	1.044 \pm 0.041	9
rNav1.4 IFM-L	1.079 \pm 0.032	3
rNav1.4 IFL-LL	0.919 \pm 0.023	3

Tabelle A.16:

Relativer Reststrom spannungsgesteuerter Natriumkanäle
200 s nach Applikation von 1 mM ChT.

Kanal	relativer Reststrom	Anzahl unabhängiger Experimente
rNav1.4 WT	0.864 \pm 0.052	10
rNav1.4 IFM-L	0.934 \pm 0.046	12
rNav1.4 IFL	0.603 \pm 0.062	5
rNav1.4 IFM-LL	0.667 \pm 0.067	4
rNav1.4 IFL-LL	0.585 \pm 0.057	4
rNav1.4 IFM-4L	0.665 \pm 0.011	9
rNav1.4 IFM-6L	0.600 \pm 0.030	10
rNav1.4 IFL-6L	0.485 \pm 0.030	5
rNav1.4 IFM-LM	1.066 \pm 0.097	6
rNav1.4 IFM-ML	0.985 \pm 0.081	5

Tabelle A.17:

Relativer Reststrom spannungsgesteuerter Natriumkanäle
500 s nach Applikation von 1.5% H₂O₂.

Kanal	relativer Reststrom	Anzahl unabhängiger Experimente
rNav1.4 WT	0.803 \pm 0.021	5
rNav1.4 IFL	0.641 \pm 0.013	2
rNav1.4 Y401C	0.345 \pm 0.023	7
rNav1.4 Y401C IFL	0.287 \pm 0.009	7
hNav1.5 WT	0.432 \pm 0.029	7
hNav1.5 IFL	0.230 \pm 0.010	7
hNav1.5 C373Y	0.665 \pm 0.042	6
hNav1.5 C373Y IFL	0.577 \pm 0.033	7
4455	0.825 \pm 0.027	6
4544	0.625 \pm 0.046	4
5444	0.260 \pm 0.020	6
5444 IFL	0.273 \pm 0.027	9
5444 C373Y	0.711 \pm 0.017	7
5444 C373Y IFL	0.749 \pm 0.024	7

Tabelle A.18:

Relativer Reststrom spannungsgesteuerter Natriumkanäle
200 s nach Applikation von 10 mM t-BHP.

Kanal	relativer Reststrom	Anzahl unabhängiger Experimente
rNav1.4 WT	0.745 \pm 0.072	3
rNav1.4 IFL	0.781 \pm 0.089	5
hNav1.5 WT	0.625 \pm 0.035	4
hNav1.5 C373Y	0.342 \pm 0.077	5
4455	0.784 \pm 0.035	6
5544	0.356 \pm 0.127	4

Tabelle A.19:

Durch nichtstationäre Rauschanalyse gewonnene Parameter spannungsgesteuerter Natriumkanäle. Die Oxidation erfolgte durch 200 μM ChT, welches nach jeweils 350 s durch 1 mM DTT in externer Lösung ausgewaschen wurde, bei der angegebenen Haltespannung. Die Werte wurden aus den Daten der Depolarisationen auf -10 mV nach Gleichung 2.7 ermittelt, wie in Abschnitt 2.4.2.3 beschrieben.

Kanal	vor Applikation			nach Applikation		
	Einzelkanalstrom (pA)	Offenwahrscheinlichkeit	Anzahl unabhängiger Experimente	Einzelkanalstrom (pA)	Offenwahrscheinlichkeit	Anzahl unabhängiger Experimente
hNav1.5 IFL bei -100 mV	1.14 \pm 0.06	0.300 \pm 0.035	7	0.61 \pm 0.04	0.063 \pm 0.008	7
hNav1.5 IFL bei -140 mV	1.20 \pm 0.04	0.328 \pm 0.054	8	0.61 \pm 0.07	0.160 \pm 0.036	7
hNav1.5 C373Y IFL bei -100 mV	1.21 \pm 0.03	0.335 \pm 0.049	6	0.85 \pm 0.07	0.096 \pm 0.013	4
hNav1.5 C373Y IFL bei -140 mV	1.12 \pm 0.04	0.286 \pm 0.034	9	0.96 \pm 0.05	0.206 \pm 0.015	3

Tabelle A.20:

Zeitkonstanten der Rückkehr spannungsgesteuerter Natriumkanäle von der schnellen Inaktivierung. Die Werte wurden durch Anpassung der nach dem in Abschnitt 2.4.2.3 beschriebenen Messprotokoll erhaltenen Daten mit Gleichung 2.4 gewonnen.

Kanal	vor Applikation			300 s ohne Applikation			300 s mit 200 μM ChT			600 s mit 200 μM ChT		
	Zeitkonstante (ms)	Anzahl unabhängiger Experimente	Zeitkonstante (ms)	Anzahl unabhängiger Experimente	Zeitkonstante (ms)	Anzahl unabhängiger Experimente	Zeitkonstante (ms)	Anzahl unabhängiger Experimente	Zeitkonstante (ms)	Anzahl unabhängiger Experimente	Zeitkonstante (ms)	Anzahl unabhängiger Experimente
iNav1.4 IFM-L	3.0 \pm 0.4	11	3.8 \pm 0.9	7	1.4 \pm 0.3	4	1.3 \pm 0.3	4	1.3 \pm 0.3	4	1.3 \pm 0.3	4
iNav1.4 IFL	6.4 \pm 1.9	5			4.5 \pm 1.2	5	3.7 \pm 1.2	5	3.7 \pm 1.2	4	3.7 \pm 1.2	4
iNav1.4 IFM-LL	22.5 \pm 5.5	4			13.1 \pm 3.2	4	9.9 \pm 2.5	4	9.9 \pm 2.5	4	9.9 \pm 2.5	4

Tabelle A.21:

Parameter für die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung spannungsgesteuerter Natriumkanäle nach Applikation von 200 μ M ChT.

Bei den Messungen mit -100 mV oder -140 mV Haltespannung wurde nach 350 s mit 1 mM DTT gespült.

Kanal	Halbmaximale Spannung der Aktivierung (V_m/mV)	Steigungsfaktor der Aktivierung (k_m/mV)	Anzahl unabhängiger Experimente	Zeitspanne seit Applikation (s)
rNav1.4 WT	-57.1 \pm 1.6	19.9 \pm 1.2	3	1516-1562
rNav1.4 Y401C	-38.5 \pm 1.4	14.3 \pm 0.3	6	547-550
rNav1.4 Y401C IFL	-38.4 \pm 1.2	18.7 \pm 1.0	7	549-582
hNav1.5 IFL	-54.5 \pm 6.0	49.8 \pm 6.9	7	549-599
hNav1.5 IFL bei -100 mV	-56.8 \pm 1.8	20.8 \pm 1.7	7	475-490
hNav1.5 IFL bei -140 mV	-62.5 \pm 2.5	21.9 \pm 2.7	6	474-482
hNav1.5 C373Y IFL	-61.2 \pm 4.3	17.1 \pm 2.9	5	551-574
hNav1.5 C373Y IFL bei -100 mV	-66.0 \pm 1.7	16.1 \pm 1.7	6	474-478
hNav1.5 C373Y IFL bei -140 mV	-66.0 \pm 1.5	13.2 \pm 0.6	6	474-479
4484	-53.9 \pm 2.5	12.2 \pm 0.9	3	925-1151

Tabelle A.22:

Parameter für die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung spannungsgesteuerter Natriumkanäle nach Applikation von 1.5% H₂O₂.

Kanal	Halbmaximale Spannung der Aktivierung (V_m/mV)	Steigungsfaktor der Aktivierung (k_m/mV)	Anzahl unabhängiger Experimente	Zeitspanne seit Applikation (s)
rNav1.4 Y401C	-34.6 \pm 2.7	20.0 \pm 2.0	7	546-563
rNav1.4 Y401C IFL	-33.7 \pm 1.2	17.3 \pm 0.6	7	548-606
hNav1.5 IFL	-37.8 \pm 2.5	25.9 \pm 1.7	5	548-576
hNav1.5 C373Y IFL	-52.8 \pm 3.2	15.8 \pm 1.1	5	549-599
5444	-34.3 \pm 2.8	23.3 \pm 1.2	5	549-598
5444 IFL	-37.0 \pm 2.1	23.8 \pm 2.4	8	550-605
5444 C373Y	-43.7 \pm 1.4	12.4 \pm 0.3	6	547-551
5444 C373Y IFL	-47.1 \pm 1.6	12.8 \pm 0.3	7	547-550

Tabelle A.23:

Parameter für die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung spannungsgesteuerter Natriumkanäle nach Spülen mit Badlösung.

Kanal	Halbmaximale Spannung der Aktivierung (V_m/mV)	Steigungsfaktor der Aktivierung (k_m/mV)	Anzahl unabhängiger Experimente	Zeitspanne seit Applikation (s)
hNav1.5 WT	-60.7 \pm 2.2	9.8 \pm 0.4	5	547-559
hNav1.5 IFL	-66.6 \pm 2.6	11.0 \pm 1.0	3	550-574

Tabelle A.24:

Parameter für die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung spannungsgesteuerter Natriumkanäle nach Applikation von 200 μ M ChT.

Bei den Messungen mit -100 mV oder -140 mV Haltespannung wurde nach 350 s mit 1 mM DTT gespült.

Kanal	Halbmaximale Spannung der Inaktivierung (V_h/mV)	Steigungsfaktor der Inaktivierung (k_h/mV)	Anzahl unabhängiger Experimente	Zeitspanne seit Applikation (s)
rNav _v 1.4 WT	-71.3 \pm 4.2	-11.8 \pm 4.2	3	1563-1608
rNav _v 1.4 Y401C	-56.0 \pm 2.7	-8.7 \pm 0.6	6	594-596
rNav _v 1.4 Y401C IFL	-59.9 \pm 11.1	-15.5 \pm 4.1	6	595-603
hNav _v 1.5 IFL	-112.0 \pm 7.3	-15.5 \pm 1.8	2	605
hNav _v 1.5 IFL bei -100 mV	-113.4 \pm 2.6	-16.0 \pm 1.8	6	529-544
hNav _v 1.5 IFL bei -140 mV	-106.0 \pm 3.1	-11.7 \pm 0.4	6	527-535
hNav _v 1.5 C373Y IFL bei -100 mV	-100.9 \pm 9.1	-18.0 \pm 1.2	3	607-627
hNav _v 1.5 C373Y IFL bei -140 mV	-129.2 \pm 2.6	-17.6 \pm 1.6	5	530-574
hNav _v 1.5 C373Y IFL bei -140 mV	-111.6 \pm 4.9	-14.4 \pm 0.4	6	527-532
4484	-50.7 \pm 4.8	-8.8 \pm 1.9	3	971-1197

Tabelle A.25:

Parameter für die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung spannungsgesteuerter Natriumkanäle nach Applikation von 1.5% H₂O₂.

Kanal	Halbmaximale Spannung der Inaktivierung (V_h/mV)	Steigungsfaktor der Inaktivierung (k_h/mV)	Anzahl unabhängiger Experimente	Zeitspanne seit Applikation (s)
rNav _v 1.4 Y401C	-65.3 \pm 3.4	-8.4 \pm 1.2	7	593-609
rNav _v 1.4 Y401C IFL	-72.3 \pm 2.9	-8.2 \pm 0.4	6	594-597
hNav _v 1.5 IFL	-97.8 \pm 2.8	-11.2 \pm 0.6	5	600-629
hNav _v 1.5 C373Y IFL	-94.2 \pm 4.4	-11.0 \pm 0.2	4	601-603
5444	-74.4 \pm 2.3	-9.9 \pm 0.1	4	602-640
5444 IFL	-81.9 \pm 2.7	-11.0 \pm 0.5	7	602-618
5444 C373Y	-68.7 \pm 1.9	-9.2 \pm 0.4	4	601-603
5444 C373Y IFL	-77.6 \pm 1.4	-9.8 \pm 0.2	7	599-603

Tabelle A.26:

Parameter für die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung spannungsgesteuerter Natriumkanäle nach Spülen mit Badlösung.

Kanal	Halbmaximale Spannung der Inaktivierung (V_h/mV)	Steigungsfaktor der Inaktivierung (k_h/mV)	Anzahl unabhängiger Experimente	Zeitspanne seit Applikation (s)
hNav _v 1.5 WT	-98.3 \pm 1.7	-6.1 \pm 0.3	5	600-612
hNav _v 1.5 IFL	-109.3 \pm 1.8	-6.3 \pm 0.1	3	603-627

Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle allen danken, die das Gelingen dieser Arbeit ermöglicht haben, allen voran meinem Doktorvater Prof. Dr. Stefan H. Heinemann für das überaus interessante Thema, die Einführung in elektrophysiologische Messtechniken, die wissenschaftliche Betreuung und Weiterbildungsangebote während der gesamten Promotionszeit sowie die Möglichkeit der Teilnahme an Fachtagungen, besonders einem internationalen Kongress.

Prof. Dr. Toshinori Hoshi danke ich für sein Interesse an dieser Arbeit und die Beteiligung an der Konzeption der Experimente.

Dr. Alfred Hansel danke ich für die Hinweise zum MSRA-Aktivitätstest, Dr. Enrico Leipold für die hochwertige Vorlage der Kanalabbildungen, beiden für die Herstellung zahlreicher Mutanten, deren Messung die Grundlage dieser Arbeit bildete.

Dr. Guido Geßner und PD Dr. Roland Schönherr danke ich für die unzähligen fachlichen Hilfestellungen und Steffie Arendt und Angela Roßner für die Unterstützung bei allen praktischen Aspekten der Labortätigkeit.

Christian König danke ich für die Bereitstellung der DRG-Neurone sowie den Einblick in deren Isolation und Kultivierung.

Ich danke allen weiteren derzeitigen und früheren Mitarbeitern der Arbeitsgruppe, besonders Anne, Gudrun, Jana, Katrin, Sophie, Susi, Micha, Nirakar, Rayk, René und Ulf, für das sehr gute und konstruktive Arbeitsklima.

Den Gutachtern danke ich für die Beurteilung dieser Arbeit.

Schließlich möchte ich Familie und Freunden für die unschätzbare Unterstützung während der Promotionszeit danken.

Publikationstätigkeit

Artikel in wissenschaftlichen Fachzeitschriften

Kassmann M, Hansel A, Leipold E, Birkenbeil J, Lu S, Hoshi T, Heinemann, S H (2008), Oxidation of multiple methionine residues impairs rapid sodium channel inactivation. Pflügers Archiv - European Journal of Physiology 456, 1085-1095.

Poster-Präsentationen

Mario Kassmann, Enrico Leipold, Alfred Hansel, Jan Birkenbeil, Songqing Lu, Toshinori Hoshi, Stefan H. Heinemann (2007), Oxidation of multiple methionine residues impairs rapid sodium channel inactivation. 51st Annual Meeting of the Biophysical Society, Baltimore, MD, USA.

Mechthild Schmitt-Jansen, Mario Kaßmann & Rolf Altenburger (2004), Phytotoxicity Assessment of Pharmaceuticals: How can we account for Mode-of-Action information? Arzneimittel in der Umwelt, Berlin.

Kongress-Teilnahmen

international

51st Annual Meeting of the Biophysical Society, 03.-07.03.2007. Baltimore, MD, USA.

national

2nd Meeting of the Collaborative Research Centre Sonderforschungsbereich 604, Signaling Complexes. 20.-22.09.2007, Jena, Germany.

Umweltbundesamt, Arzneimittel in der Umwelt. 29.-30.09.2004, Berlin, Germany.

Während der Tätigkeit beim UFZ KUBUS Schülerlabor wurden verschiedene Werbematerialien (BioCard und Schülerlabor-CD, jeweils mit umfangreichen wissenschaftlichen Informationen auf Abiturstufenniveau) veröffentlicht.

Thesen zur Dissertation

Oxidative Regulation spannungsgesteuerter Natriumkanäle

Spannungsgesteuerte Natriumkanäle (Nav-Kanäle) sind essentiell für die Initiierung von Aktionspotenzialen und damit beispielsweise für die neuronale Signalübertragung und die Muskelkontraktion. Unter oxidativen Stressbedingungen kann die elektrische Signalübertragung gestört werden, die Ursache dafür könnten Veränderungen bei Natriumströmen sein. Bereits bei geringen Modifikationen können lebensbedrohende Ereignisse wie die Apoptose von Neuronen oder Arrhythmien im Herzen eintreten.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Charakterisierung der Veränderung von Natriumströmen bei oxidativem Stress unter den kontrollierten Bedingungen der Expression definierter Klone der Natriumkanalproteine erfolgen. Molekulare Zielstellen für die Oxidationssensitivität sollten ermittelt werden. Es gab Hinweise, dass Methioninreste stark an der Modifikation der Natriumströme beteiligt sind. Daher sollte weiterhin eine mögliche regulative Funktion von Methioninsulfoxidreduktasen (MSRs) an Nav-Kanälen beurteilt werden. Rekombinante Ionenkanäle wurden in einem heterologen System exprimiert und funktionell mit der Patch-Clamp-Methode in der Ganz-Zell-Konfiguration analysiert.

Chloramine können in Folge der Aktivität von Zellen des Immunsystems entstehen. Bei starkem oxidativem Stress können sie zur Pathogenese von Erkrankungen des kardiovaskulären Systems entscheidend beitragen. Das Oxidationsmittel Chloramin T (ChT) modifiziert unter physiologischen Bedingungen selektiv die Seitenketten von Methionin und Cystein. ChT führt durch Oxidation des Schwefels bei Methionin zu Methioninsulfoxid, dessen Eigenschaften sich stark von denen des Methionins unterscheiden, was oft einen Funktionsverlust der Proteine bewirkt. Durch die Applikation von ChT wurden die rekombinanten Natriumkanäle experimentell oxidativem Stress ausgesetzt.

- ChT führte bei Na_V -Kanälen konzentrations- und zeitabhängig zum Verlust der schnellen Inaktivierung. Dieser Effekt wurde bei allen untersuchten Natriumkanälen ($\text{Na}_V1.2$, $\text{Na}_V1.4$, $\text{Na}_V1.5$, $\text{Na}_V1.7$ und $\text{Na}_V1.8$) beobachtet und trat auch mit anderen Oxidantien, beispielsweise mit Wasserstoffperoxid, auf. Der Inaktivierungsverlust geht wahrscheinlich auf eine Störung der hydrophoben Wechselwirkung zwischen dem hochkonservierten Inaktivierungsmotiv und dessen Akzeptor im Kanalprotein und damit auf die Destabilisierung des inaktivierten Zustands zurück. Der resultierende erhöhte persistente Strom bewirkt Hyperaktivität der Kanäle.
- Beim Natriumkanal in der Skelettmuskulatur ($r\text{Na}_V1.4$) ging die Oxidationssensitivität der schnellen Inaktivierung auf das Methionin im Inaktivierungsmotiv (M1305) und, in unterschiedlichem Maße, zwei Methionine in einem intrazellularen Verbindungsstück in Domäne 4 (M1469, M1470) zurück, welches dem Akzeptor zugerechnet wird. Diese Reste sind bei allen humanen Na_V -Kanälen konserviert und bewirken bei diesen Kanälen wahrscheinlich vergleichbare Inaktivierungsverluste. Die oxidative Modifikation weiterer intrazellulär gelegener konservierter Methionine im Kernbereich des Proteins (M442, M1139, M1154 und M1316) bewirkte nur eine geringe Destabilisierung des inaktivierten Zustands.
- Mit kinetischen Untersuchungen wurde bestätigt, dass die Oxidation mehrerer Zielstellen zum Inaktivierungsverlust spannungsgesteuerter Natriumkanäle beiträgt.
- Die Oxidationssensitivität eines Kanals konnte durch Erhöhung der Anzahl leicht oxidierbarer Aminosäuren, besonders Cystein, im Inaktivierungsmotiv gesteigert werden.
- Die Applikation rekombinanter MSRs führte nicht zur Reduktion der für die Inaktivierung relevanten Methioninreste. Möglicherweise sind diese Methionine für die Enzyme nicht zugänglich.
- ChT bewirkte ebenfalls die Reduktion des Spitzenstroms von Na_V -Kanälen. Besonders ausgeprägt war dieser Effekt beim Natriumkanal in der Herzmuskulatur ($h\text{Na}_V1.5$), wozu vor allem ein nur bei diesem Kanaltyp vorhandenes Cystein innerhalb der Pore in Domäne 1 beiträgt. Weitere Komponenten sind möglicherweise Strukturen in Domäne 2 des Kanalproteins. Der Einzelkanalstrom und die Offenwahrscheinlichkeit wurden durch ChT verringert. Ebenfalls traten Veränderungen bei der Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung auf, die bewirkten, dass Kanäle bereits bei niedrigerer Spannung inaktiviert waren und zum Gesamtstrom nicht mehr beitrugen.

Diese Arbeit führt zu einem vertieften Verständnis des Inaktivierungsverlustes spannungsgesteuerter Natriumkanäle durch oxidative Modifikationen, welcher eine Erhöhung des persistenten Stroms bewirkt. Die zu Grunde liegenden Prozesse gehen wahrscheinlich ausschließlich auf Methioninreste zurück und stellen einen Regulationsmechanismus auf der Basis von Methionin dar. Weiterhin wurden Ursachen für die Reduktion des transienten Spitzenstroms durch oxidative Belastung beim Natriumkanal in der Herzmuskulatur ermittelt. Die Erhöhung des persistenten Stroms durch die beeinträchtigte Inaktivierung und die Reduktion des Spitzenstroms könnten als gegenläufige Prozesse kompensatorisch wirken und die physiologische Funktion der Na_V -Kanäle bei oxidativem Stress stabilisieren.