

**Seeanemonotoxine verändern das  
Schaltverhalten neuronaler  
Natriumkanäle - eine Analyse der  
Struktur-Wirkungsbeziehungen**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

HELGE SCHMIDT

Kiel, 2000

# Summary

Sea anemone toxins are a relatively homogenous group of peptides compared with scorpion toxins binding to site 3 of the sodium channel leading to a delay in inactivation. Therefore it is interesting to analyse the effect of similar polypeptides with known amino acid sequences but different influence on inactivation kinetic of the sodium channel.

In order to achieve this goal polypeptide toxins were isolated from the homogenate of tentacle of the sea anemone *Anthopleura elegantissima* and *Anemonia sulcata*. Patch-Clamp experiments were performed in whole-cell and cell-attached patches from the mouse neuroblastoma cell line N1E-115. The neurotoxic activity of the toxins APE 1-1, APE 1-2, APE 2-1 (AP-C), APE 5-3, ATX II of this sea anemones was investigated.

In the presence of TEA the control experiment revealed a fast sodium current. This current was completely inactivated after approximately 10 ms. After external application of 5mg/ml sea anemone toxin the sodium current inactivation was slowed and incomplete. In dependence of the given toxin the persistent current was nearly 20% (APE 1-1, ATX II) or 40% (APE 1-2, APE 2-1, APE 5-3) of the peak current. In single channel experiments all toxins indicated a specific burst behaviour in activity of channel opening at the same depolarizing pulse. After application APE 1-2, APE 2-1, APE 5-3 indicated a longer burst duration than APE 1-1 and ATX II. In single channel analysis (membrane potential 0 mV) this difference in burst duration based on the prolongation of the average opening time from nearly 6 ms up to 7.5 ms.

Sequence analysis yielded the same number of amino acid residues (47 amino acids) for all toxins with differences at position 22 and 36-40. These residues exert a specific area on the surface of the toxins responsible for binding to the sodium channel. Hereby substitutions of hydrophobic amino acids in this area correlate with a decrease in toxicity.

Meinen Eltern

# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. W. Wünnenberg für die Unterstützung dieser Arbeit und für die kritische Durchsicht des Manuskriptes bedanken.

Ein großer Dank geht an Herrn Dr. J. Schmidmayer für die Bereitstellung des Themas und der experimentellen Apparatur. Zudem stand er mir während der gesamten Zeit in allen Fragen mit Rat und Tat zur Seite.

Einen besonderen Dank schulde ich Herrn Prof. Dr. M. Mályusz, der mich nicht nur bei der Beschaffung meiner Stelle am Physiologischen Institut, sondern auch in vielen schwierigen Situationen, sehr unterstützt hat.

Im Rahmen der Zusammenarbeit mit dem Toxikologischen Institut möchte ich mich bei Prof. Dr. L. Béress für die Isolierung und Bereitstellung der Anemonentoxine bedanken und besonders bei Dr. Thomas Bruhn, der mir den Weg in die dritte Dimension ebnete.

Michael Voss danke ich für seine ständige Diskussionsbereitschaft. Zusammen mit Heidrun Ließegang garantierte er des öfteren das Fortlaufen der Zellkultur.

Allen Mitarbeitern des Instituts und besonders meiner Abteilung danke ich weiterhin für das freundliche Arbeitsklima und die stets *erfrischenden* Diskussionsrunden. Didier Gremelle sei für die Anfertigung der Zeichnungen auf den Seiten 6, 7 und 18 gedankt; dem ersten Stock für die stets prompte Erledigung *ganz eiliger Angelegenheiten*.

Herrn Prof. Dr. W. Ulbricht danke ich für seine ständige Diskussionsbereitschaft und der großartigen Versorgung mit Literatur.

Zum Schluß danke ich Marc Damitz für die Lösung statistischer Probleme, Matthias Stallmann für das Korrekturlesen, Christian Undeutsch und Peter Pichol für die Hilfe in letzter Minute und Bodo v. Malottki, der mich *auf ein einziges* stets kritisch unterstützt hat;

Jule für das große Maß an Geduld und ihrem einzigartigen Sinn für freudige Überraschungen.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Molekulare Struktur des Natriumkanals . . . . .	5
1.2	Funktionsweise des Natriumkanals . . . . .	6
1.3	Klassifizierung der Toxine . . . . .	7
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>9</b>
2.1	Toxingewinnung . . . . .	9
2.1.1	Materialbeschaffung . . . . .	9
2.1.2	Isolierung der Toxine . . . . .	10
2.1.3	Sequenzierung und Darstellung der Toxine . . . . .	11
2.2	Zellkultur . . . . .	12
2.2.1	Neuroblastomzellen . . . . .	12
2.2.2	DRG-Neurone . . . . .	14
2.3	Elektrophysiologische Messungen . . . . .	15
2.3.1	Patch-Clamp-Anlage . . . . .	15
2.3.2	Patch-Pipetten und Elektroden . . . . .	19
2.3.3	Testlösungen . . . . .	21
2.3.4	Korrektur der Daten . . . . .	23
2.3.5	Datenanalyse . . . . .	25
2.3.6	Statistische Auswertung . . . . .	28

2.3.7	Versuchsbeschreibung . . . . .	30
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>33</b>
3.1	Ganzzelleableitungen . . . . .	33
3.1.1	Strom-Spannungs Beziehung . . . . .	35
3.1.2	Diphasische Inaktivierung . . . . .	43
3.1.3	Stationäre Inaktivierung . . . . .	45
3.1.4	Aufhebung der Inaktivierung . . . . .	48
3.1.5	Aktivierung . . . . .	49
3.1.6	Giftwirkung auf das Aktionspotential . . . . .	51
3.1.7	Konzentrations-Wirkungs-Beziehung . . . . .	53
3.2	Einzelkanalmessungen . . . . .	55
3.2.1	Kontrollmessung . . . . .	56
3.2.2	Toxinapplikation . . . . .	58
3.2.3	Offenzeit-Histogramme . . . . .	62
3.2.4	Burstverhalten des Einzelkanals . . . . .	65
3.2.5	Aufsummierte Einzelkanalströme . . . . .	72
3.3	Darstellung der Anemonentoxine . . . . .	75
3.3.1	Isolation der aktiven Substanzen . . . . .	75
3.3.2	Determination der Aminosäuresequenzen . . . . .	79
3.3.3	Dreidimensionale Proteinstruktur . . . . .	81
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>84</b>
4.1	Versuche in Ringerlösung . . . . .	85
4.2	Toxinapplikation . . . . .	86
4.3	Modellbetrachtungen . . . . .	90
4.3.1	Berechnung der Übergangskonstanten . . . . .	93
4.3.2	Stationäre Inaktivierung . . . . .	96

4.3.3	Aufhebung der Inaktivierung . . . . .	98
4.3.4	Erweiterte Modelle . . . . .	100
4.4	Struktur-Wirkungsbeziehung . . . . .	102
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>109</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>111</b>
<b>A</b>	<b>Lösungen</b>	<b>127</b>
<b>B</b>	<b>Tabellen</b>	<b>128</b>
<b>C</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>135</b>

# Kapitel 1

## Einleitung

Auffälligstes Kriterium der Seeanemonen, die zu den Hohltieren (Coelenterata) gehören, sind deren farbenprächtige, blumenartige Tentakelkränze. Integraler Bestandteil der Tentakeln sind die Nesselzellen (Cnidocyten). Die Cnidocyten bilden in ihrem Inneren eine der höchstspezialisiertesten Zellorganellen tierischer Zellen, die Nesselkapseln (Cniden), aus. Diese hochwirksamen Instrumente zur Injektion der Nesselgifte (WATSON & HESSINGER, 1989) dienen den Seeanemonen beim Nahrungserwerb (Planktonorganismen, Crustaceen und kleinere Fische) und zur Abschreckung von inter- und intraspezifischen Feinden (AYRE, 1982). Beim Menschen führt der Kontakt mit diesen Tieren zu schmerzhaftem Nesseln bis hin zu Lähmungserscheinungen.

Aufgrund dieser Wirkung ist die Struktur dieser biologisch wirksamen Substanzen seit langem von besonderem Interesse. Als erster versuchte RICHET (1903) die giftigen Polypeptide aus *Anemonia sulcata* (Thalassin, Congesin) zu isolieren. Doch erst die Entwicklung besserer Isolationsmethoden ermöglichte die Aufreinigung reiner Formen dieser Toxine (BÉRESS & BÉRESS, 1971), die mit *ATX I* und *ATX II* bezeichnet wurden. Dadurch konnte eine Vielzahl derartiger Anemonentoxine, wie z.B. das *Anthopleurin A+B* (AP-A, AP-B) aus *Anthopleura xanthogrammica*, sowie das *Anthopleurin C* (AP-C) aus *Anthopleura elegantissima* (NORTON *et*



*al.*, 1976, 1978), isoliert und sogar deren Aminosäuresequenz entschlüsselt werden (TANAKA *et al.*, 1977; NORTON, 1981). Dabei zeigte sich, daß es sich bei den Anemonentoxinen um ein Toxingemisch aus Polypeptiden handelt, die sich in ihrer Aminosäuresequenz meist nur minimal voneinander unterscheiden.

Angriffspunkt dieser Neurotoxine ist die Nervenmembran, speziell deren Natriumkanäle. Natriumkanäle sind im wesentlichen für die Ausbildung von Aktionspotentialen verantwortlich. Die Anbindung der Toxine führt zu Veränderungen im Schließverhalten dieser Kanäle. Genaugenommen verhindern die Toxine nach dem Öffnen der Kanäle zu Beginn einer Erregung deren vollständiges Schließen und somit das Abklingen dieser Erregung. Die Folge ist ein verlängertes Aktionspotential, was zu einer verstärkten Transmitterausschüttung an den Synapsen führt. Dadurch kommt es zu einer anhaltenden Kontraktion bis hin zu spastischen Lähmungserscheinungen an der innervierten Muskulatur.

Aufgrund ihrer reversiblen Anbindung und ihrer Fähigkeit äußerst selektiv mit dem Natriumkanal zu interagieren, sind diese Polypeptide ideale Werkzeuge bei der Analyse dieses Tunnelproteins (HABERMANN & BÉRESS, 1979; BÉRESS *et al.*, 1998; HUCHO *et al.*, 1979; VINCENT *et al.*, 1980; STENGELIN *et al.*, 1981; RACK *et al.*, 1983). Ihr Bindungsort beschränkt sich dabei auf eine ganz bestimmte Region auf der Extrazellulärseite dieses Kanals (NORTON, 1991; HUCHO, 1995; KEM *et al.*, 1996). Obwohl sich die Anemonengifte in ihrer Struktur meist nur um wenige Aminosäuren voneinander unterscheiden (BENZINGER *et al.*, 1997), zeigt das Ausmaß der Giftwirkung auf den Kanal mitunter erhebliche Unterschiede (Benzinger *et al.*, 1997, 1998; Kelso *et al.*, 1996; El-Sherif *et al.*, 1996; Sheets *et al.*, 1995; Dias-Kadambi *et al.*, 1996; Khera *et al.*, 1994, 1995; Gallagher *et al.*, 1992, 1994). Bis heute konnten die verantwortlichen Bereiche innerhalb der Toxine nicht eindeutig identifiziert werden. Wünschenswert wäre es Peptide zu finden, die durch eine einzige Aminosäuresubstitution ganz unterschiedliche Wirkungen auf das Schließverhalten des Natriumkanals zeigen.

In jüngster Zeit ist es gelungen, weitere Polypeptide der Anemone *Anthopleura ele-*

*gantissima* (APE 1-1, APE 1-2, APE 5-3) zu isolieren (BRUHN *et al.*, 2000), deren Strukturen weitgehend bekannt sind. Sie weisen sehr große Sequenzhomologien untereinander auf und unterscheiden sich nur geringfügig von den bereits untersuchten Toxinen *ATX II* und *AP-C*.

In geringen Dosen bewirken diese Toxine einen starken positiv inotropen Effekt am Rattenherzen (RAVENS, 1979; BÉRESS *et al.*, 1982), während die Herzschlagfrequenz und das adrenerge System unbeeinflusst bleiben (Norton, 1981). Am Hundeherzen wird für *AP-A* sogar eine stärkere Wirkung angenommen als das Herzglykosid Digoxin (SCRIABINE *et al.*, 1979; NORTON, 1981). Die Verwendung dieser Neurotoxine für pharmakologisch-medizinische Zwecke erscheint daher durchaus möglich.

Ziel dieser Arbeit war es, die Wirkung dieser z.T. neu isolierten Anemonentoxine auf den Natriumkanal von Neuroblastomzellen mit elektrophysiologischen Methoden zu untersuchen und Struktur-Wirkungsunterschiede zu identifizieren. Dazu wurden in Patch-Clamp-Experimenten Ganzzell- und Einzelkanalableitungen durchgeführt. Von besonderem Interesse war dabei die Frage, ob es innerhalb dieser Toxine Bereiche gibt, die für das *Andocken* an den Kanal und/oder für die Wirkung auf diesen verantwortlich sind. Desweiteren sollte mit Hilfe des Modells von *Chiu* zur Erklärung der Funktionsweise von Kanälen die Kinetik der Konformationsänderung des Natriumkanals weiter aufgeklärt werden.

Die Strukturanalyse der Anemonentoxine soll vor dem Hintergrund der pharmakologischen Effekte, insbesondere der Wirkung auf den Herzmuskel, einen Beitrag zur Entwicklung chemischer Leitstrukturen als Ausgangspunkt einfach-reproduzierbarer, therapeutisch wirksamer Substanzen leisten (HORITA *et al.*, 1997A,B; KALMAN *et al.*, 1998; PONCET *et al.*, 1998A,B; PETTIT *et al.*, 1998). Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen eine der wesentlichen Todesursachen in den westlichen Industrienationen dar (BRAUNWALD, 1997). Bei älteren Patienten (> 65 Jahre) gehen 10 – 25% der Todesfälle auf eine Herzinsuffizienz zurück. Ein pharmakotherapeutischer Ansatz besteht in einer Erhöhung der Kontraktionskraft (positive

Inotropie) des Herzmuskels. Erste Erfolge konnten in der Vergangenheit durch den Einsatz der aus dem Fingerhut gewonnen Digitalis-Glykoside verzeichnet werden. Dennoch besteht nach wie vor Bedarf, neue herzmuskelstärkende Substanzen zu finden (MÜLLER-EHMSEN *et al.*, 1999). In diesem Zusammenhang führten weltweit bestehende Anstrengungen, die Inhaltsstoffe mariner Organismen für therapeutische Zwecke nutzbar zu machen, zu den Nesselgiften der Seeanemonen.

## 1.1 Molekulare Struktur des Natriumkanals

Die Klonierung und Sequenzierung des Natriumkanals gelang erstmals an Rohmaterial aus dem elektrischen Organ des Zitteraals *Electrophorus electricus* (NODA *et al.*, 1984). Anschließende Aufklärungen an  $Na^+$ -Kanalsubtypen anderer Organismen (NODA *et al.*, 1986; SILLS *et al.*, 1989) deuteten daraufhin, daß große Bereiche der Aminosäuresequenzen starke Homologien aufweisen. Offensichtlich handelt es sich beim Natriumkanal um ein weitverbreitetes Glykoprotein mit einer Masse von 260-280 kDa (MILLER *et al.*, 1983). Im wesentlichen besteht der Kanal aus einer  $\alpha$ -Untereinheit, die im Säugetiergehirn mit zwei wesentlich kleineren Einheiten ( $\beta_1$ , 36 kDa;  $\beta_2$ , 33 kDa) und in der entsprechenden Muskulatur mit einer  $\beta$ -Untereinheit (38 kDa) assoziiert ist. Alle Untereinheiten sind integrativer Bestandteil der jeweiligen Membran (Abb. 1.1).

Sequenzanalysen ergaben, daß die  $\alpha$ -Einheit aus vier nahezu identischen, sich wiederholenden Untereinheiten oder auch Domänen (I-IV) zusammengesetzt ist (CATTERALL, 1988), die durch Zusammenlagerung eine Pore bilden (GREENBLATT *et al.*, 1985). Jede Domäne besteht aus sechs hydrophoben Transmembranhelices (S1-S6). Unter diesen Segmenten zeichnet sich besonders das S4-Segment durch seinen großen Anteil positiv geladener Arginin- und Lysinreste aus. Neuere Modellvorstellungen ordnen diesen Resten eine Funktion als Spannungssensoren zu und machen diese für die Potentialabhängigkeit des Kanals verantwortlich (GUY & SEETHARAMULU, 1986; CATTERALL, 1986). Depolarisationen führen demnach zu einer Spiralbewegung von S4, so daß hierdurch positive Ladungen auf die Extrazellulärseite verlagert werden. Durch diese Verlagerung kommt es zu einer Wechselwirkung positiver Reste in den S4-Segmenten mit negativen fixen Ladungen in anderen Segmenten. Dies führt zu Konformationsänderungen, die den Kanal öffnen (BENNDORF, 1989; YANG & HORN, 1995).

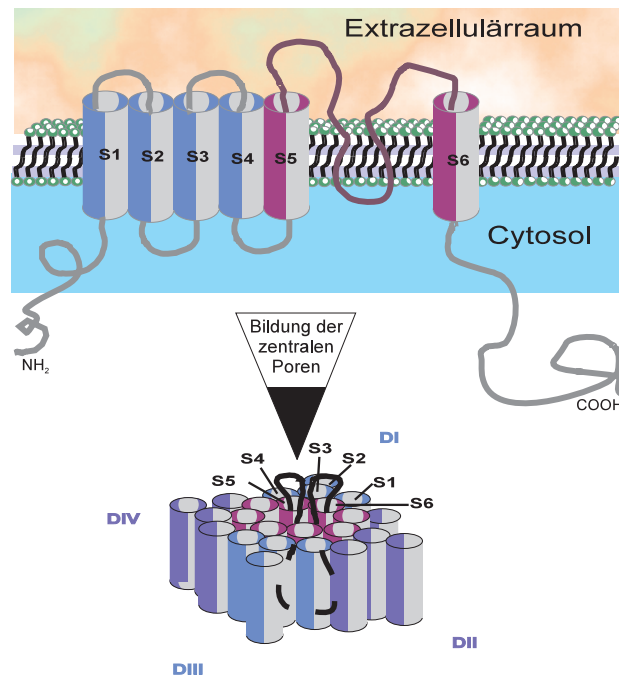


Abbildung 1.1: Molekulare Struktur des Natriumkanals: eine einzelne Polypeptidkette mit vier wiederholenden Einheiten (Domänen: DI-IV) faltet sich zu sechs Transmembranhelices (S1-4). Durch Zusammenlagerung der vier Domänen entsteht die zentrale Pore.

## 1.2 Funktionsweise des Natriumkanals

Für das Permeabilitätsverhalten des Natriumkanals liegt nach der klassischen Vorstellung von HODGKIN & HUXLEY (1952) folgende vereinfachte Modellvorstellung zugrunde: Danach erfolgt die Regulation des Ionenflusses durch dieses porenbildende Protein über zwei unabhängig voneinander agierende Tore, dem Aktivierungstor (*m-Tor*) und dem Inaktivierungstor (*h-Tor*). Experimente mit Pronase zeigten, daß das Inaktivierungstor sich im Gegensatz zum Aktivierungstor auf der cytosolischen Seite befindet (ARMSTRONG *et al.*, 1973). Beide Tore öffnen und schließen auf ganz charakteristische Weise und bringen den Kanal durch dieses Verhalten in drei typische Grundzustände: ruhend, aktiviert, inaktiviert (Abb. 1.2).

Im ruhenden Zustand ist das Inaktivierungstor geöffnet, das Aktivierungstor da-

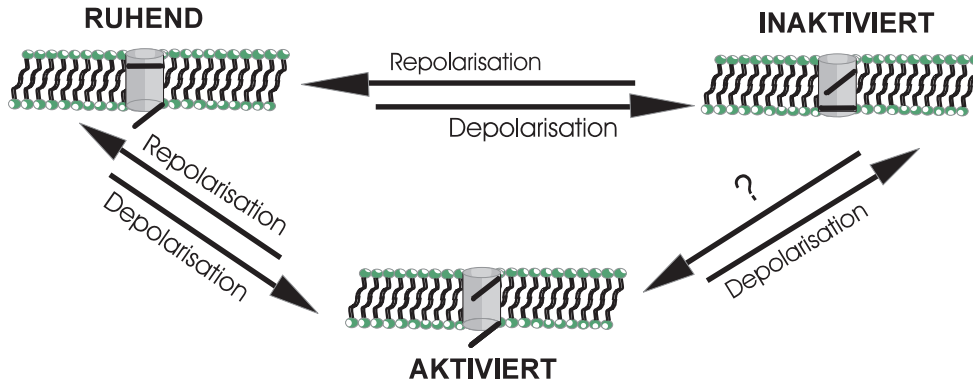


Abbildung 1.2: Schema der Grundzustände des Natriumkanals

gegen geschlossen. Dieser Zustand liegt vor, wenn sich das Potential der Zelle nahe dem Ruhepotential befindet. Bei einer Depolarisation öffnet sich das *m-Tor*, so daß kurzfristig beide Tore geöffnet sind. Der Kanal ist aktiviert und leitfähig. Gleichzeitig schließt sich langsam das Inaktivierungstor bei weiterhin geöffnetem Aktivierungstor und die Inaktivierung beginnt. Ist das *h-Tor* geschlossen, so kann dieser nicht-leitfähige, refraktäre Zustand nur durch eine Repolarisation aufgehoben werden. Bei einer Repolarisation wird der Kanal über eine Hyperpolarisation wieder in den ursprünglichen Zustand (ruhend) zurückgeholt. Durch diesen Mechanismus wird über kontrollierte Spannungsänderungen über der Membran der Natriumfluß durch dieses porenbildende Protein reguliert.

### 1.3 Klassifizierung der Toxine

In der Literatur findet sich keine einheitliche, allgemeingültige Klassifizierung der Neurotoxine, die einen Einfluß auf den Natriumkanal ausüben. Charakterisiert und zugeordnet werden diese auf verschiedenste Weisen. Dabei erfolgt eine Unterscheidung der wirksamen Toxine nach Größe und Aufbau, nach deren Wirkung und nach deren Bindungsstelle am Natriumkanal.

Aufgrund der Selektivität der neuroaktiven Substanzen bei der Bindung an den Kanal konnten bestimmte favorisierte Regionen am Kanalprotein durch Kopplung der Toxine mit Markern immunhistologisch herauskristallisiert und entsprechend topologisiert werden (CATTERALL, 1992). Hierdurch konnten fünf verschiedene Bindungsstellen unterschieden werden. Die in dieser Arbeit untersuchten Toxine gehören nach dieser Klassifizierung zu der Klasse der *Site-3* Toxine. Diese lagern sich, genau wie das  $\alpha$ -Skorpiontoxin (KOPPENHÖFER & SCHMIDT, 1968A,B), an die extrazelluläre Region des Natriumkanals im Bereich zwischen den S5 und S6 Transmembranhelices in der Domäne I an. Tetrodotoxin (TTX), Saxitoxin (STX) (NARAHASHI *et al.*, 1964, 1967B) und  $\mu$ -Conotoxin (KOBAYASHI *et al.*, 1986) beispielsweise gehören zu den *Site-1* Toxinen; Batrachotoxin (BTX), Veratridine u.a. zu den *Site-2* Toxinen usw. (vgl. CATTERALL, 1992).

Eine andere Taxonomie bezieht sich auf die Wirkung der Toxine auf den Natriumkanal (STRICHARTZ *et al.*, 1987). So verschließen z.B. *Blocker* wie TTX und STX den Natriumkanal, *Gate modifier* oder auch *Modulatoren* hingegen beeinflussen die Kinetik der beiden Tore. Seeanemonengifte und das  $\alpha$ -Skorpiongift modulieren das Inaktivierungstor, das  $\beta$ -Skorpiontoxin die Kinetik der Aktivierung, andere sowohl die Aktivierung als auch die Inaktivierung dieses Kanalproteins (BTX, Chloramin-T etc.).

Eine weitere Möglichkeit einer Klassifizierung differenziert Anemontoxine gesondert nach ihrer Größe und ihrem Aufbau. Diese Gruppe toxisch wirkender Polypeptide besteht i.d.R. aus 46-47 Aminosäureresten oder 27-31 Resten. Erstere, wie die in dieser Arbeit betrachteten "langen" Anemontoxine, gehören zum Typ 1 (KEM & DUNN, 1988; KEM *et al.*, 1989), letztere, Toxine von Anemonen aus der Familie der Stichodactylidae, zum Typ 2 (vgl. NORTON, 1991). *Calitoxin* (CLX), ein Polypeptid der Anemone *Calliactis parasitica*, gehört zwar ebenfalls zu den *langen* Toxinen, weicht jedoch von diesen durch eine Reihe von Aminosäuresubstitutionen ab, so daß diese häufig gesondert als Typ 3-Toxine eingestuft werden (NORTON, 1991).

# Kapitel 2

## Material und Methoden

### 2.1 Toxingewinnung

#### 2.1.1 Materialbeschaffung

Gegenstand der Untersuchungen waren neben den Nesselgiften von *Anthopleura sulcata* vornehmlich die Giftstoffe der Anemone *Anthopleura elegantissima* (Abb. 2.1). Diese beiden Vertreter des Stammes der *Cnidaria* (Nesseltiere) gehören der Klasse der *Anthozoa* (Blumenpolypen) an und werden der Ordnung der *Actinaria* zugeordnet. Diese im Tidenbereich des Pazifiks zwischen Alaska und Mexiko (FRANCIS, 1979) vorkommenden Anemonen treten in ihrer Lebensform sowohl in Gruppen als auch solitär auf. Durch den Einsatz ihrer Nesseltoxine sind sie in der Lage, sich sowohl gegen inter- als auch intraspezifische Feinde erfolgreich zu verteidigen (PINEDA & ESCOFET, 1989 ). Sie leben in Symbiose mit Mikroalgen, kleineren Crustaceen und Fischen, die gegen den sonst tödlichen Abwehrmechanismus dieser Nesseltiere durch eine besonders dicke Schleimschicht geschützt sind (SCHLICHTER, 1972; LUBBOCK, 1980). Im Vorfeld dieser Untersuchungen haben SCHALLER & BODENMÜLLER (1981) bereits 11 l konzentrierten Methanol-Rohextrakt aus mehreren Exemplaren von *Anthopleura elegantissima* chromatographisch aufgereinigt.





Abbildung 2.1: *Anthopleura elegantissima* (Brandt).

Für die Aufreinigung der in dieser Arbeit verwendeten Toxine stand eine Menge von 200 kg tiefgefrorener Anemonen von *Anthopleura elegantissima* zur Verfügung, die freundlicherweise durch das Pacific Biomarine Laboratory, Venice C.A. USA gesammelt und in mit Methanol homogenisierten Einheiten von je 10-13 kg aufgeteilt wurden. Dieser Rohextrakt wurde anschließend von Prof. L. Béress<sup>1</sup> aufgereinigt, an Krabben bezüglich der Toxizität vorgetestet und in 0.1 mg Einheiten den weiteren neurophysiologischen Untersuchungen zur Verfügung gestellt.

### 2.1.2 Isolierung der Toxine

Die bei  $-30^{\circ}\text{C}$  gelagerten Proben wurden mit destilliertem Wasser oder mit wasser-mischbaren Lösungsmitteln versetzt und in einem Starmix homogenisiert.  $\text{CaCO}_3$ -haltige Korallen wurden vor dem Homogenisieren 12 Stunden mit 10%-iger Essigsäure behandelt, die festes  $\text{CaCO}_3$  unter  $\text{CO}_2$ -Entwicklung zersetzt. Nach dem Abzentrifugieren der Zellbruchstücke wurde der Extrakt im Vakuum konzentriert

---

<sup>1</sup>Institut für Toxikologie der CAU Kiel

und anschließend die im Konzentrat gelösten organischen Moleküle mittels Gelfiltration an *Sephadex G 50* in 1 M Essigsäure in Molekulargruppen verschiedener Größen aufgetrennt. Nach erneutem Konzentrieren und Gefriertrocknen erhält man so aus dem jeweiligen Ausgangsmaterial zumeist fünf, für biologische Testungen oft bereits geeignete Toxinfraktionen. Da die niedermolekularen Fraktionen meist noch mit Salzanteilen gemischt sind, müssen diese vor einer biologischen Testung durch Gelfiltration an *Sephadex G 10* oder durch Extraktion mit Aceton oder absolutem Ethanol entfernt werden.

Toxine, sowie auch antibiotisch wirksame Fraktionen, ließen sich bereits sehr gut in diesen angereicherten Extrakten durch Toxizitätstest an Krabben nachweisen. Einige der biologisch wirksamen Stoffe entgingen in diesem Reinigungsstadium noch einer Detektion, da sie oft nur in sehr geringen Konzentrationen vorlagen. Zur Feinsolierung mußten daher weitere, vorwiegend chromatographische Verfahren, einschließlich der HPLC angewandt werden. Die Konservierung der Proben geschah in der Regel durch Gefriertrocknen.

### 2.1.3 Sequenzierung und Darstellung der Toxine

#### Sequenzierung der primären Aminosäurestruktur

Die Entschlüsselung der Primärstruktur der reinisolierten, biologisch wirksamen Polypeptide übernahm Dr. E. Wachter, Leiter des Proteinsequenzlaboratoriums im Institut für Physiologische Chemie der Ludwig-Maximilians Universität in München. Sämtliche Methoden zur Sequenzierung von Proteinen basieren auf dem *Edman-Abbau* von Polypeptiden. Bei dieser Reaktion wird von den reinisolierten Fraktionen jeweils die N-terminale Aminosäure spezifisch mit Phenylisothiocyanat umgesetzt und anschließend das Derivat mit Trifluoressigsäure gespalten und über eine HPLC identifiziert (WILSON & KENNETH, 1990). Eine Wiederholung dieser Zyklen ermöglicht die Sequenzierung des Polypeptids vom N-terminalen Ende

her. Für den Abbau der Toxine wurde ein Biosystem-Sequenzierer<sup>2</sup> mit integrierter Micro-cardridge, einem 9 mm Fiberglassfilter mit 1.5 mg Polybrene, verwendet (WUNDERER *et al.*, 1976).

### 3-D Protein-Struktur

Nachdem die Sequenzen der einzelnen Anemonentoxine bekannt waren, konnten diese modelliert und drei-dimensional visualisiert werden. Dies geschah unter der Verwendung des Experimental Swiss-Model Protein Modelling e-mail Servers (PEITSCH & JONGNEEL, 1993; PEITSCH *et al.*, 1995; PEITSCH, 1996). Auf der Brookhaven National Laboratory Protein Data Bank (PDB) können die errechneten und modellierten Proteinstrukturen als *.pdb-files* abgerufen und auf dem PC mit RasMol 2.6B2<sup>3</sup>, einem Visualisierungsprogramm für Moleküle (Version 3.23 für Windows), dargestellt werden.

## 2.2 Zellkultur

### 2.2.1 Neuroblastomzellen

Die Durchführung der Patch-Clamp-Experimente erfolgte sowohl bei den Ganzzell-, als auch bei den Einzelkanalableitungen an Neuroblastomzellen der Linie N1E-115 (AMANO, RICHELSON & NIRENBERG, 1972) aus dem Gehirn- und Rückenmark der adulten Maus. Es handelt sich hierbei um neuronale Zellen, die aufgrund ihrer blastomeren Strukturen durch eine hohe mitotische Aktivität gekennzeichnet und daher leicht zu züchten sind (SPECTOR, 1981). Sie weisen mit anderen differenzierten, erregbaren Geweben vergleichbare Ströme auf (KOSTYUK *et al.*, 1978; MOOLENAAR & SPECTOR, 1978; NAGY, 1983) und eigneten sich daher besonders

---

<sup>2</sup>ABI 477 A

<sup>3</sup>Roger Sayle Biomolecular Structures Group, Glaxo Wellcome Research & Development, Stevenage, Hertfordshire, UK., 1996

gut für die Durchführung der Experimente. Diese Zellen benötigen keinerlei enzymatische Vorbehandlung, welche besonders bei der Herstellung von Primärkulturen häufig zur Schädigung der Membran und zu Veränderungen des kinetischen Verhaltens der Ionenkanäle führt (GONOI & HILLE, 1987; QUANDT, 1988)). Die ursprüngliche Zelllinie bestand aus einer Mischung von Gliazellen ( $\sim 30\%$ ) und Neuronen ( $\sim 70\%$ ). Durch Reklonierung konnte jedoch eine nahezu reine Neuronenkultur hergestellt werden.

Die Zellen wurden bei  $37^\circ\text{C}$  und einer mit  $5\%$   $\text{CO}_2$  begasten Atmosphäre in Plexiglasflaschen<sup>4</sup> mit einer Grundfläche von  $25\text{ cm}^2$  kultiviert. Das Kulturmedium setzt sich aus folgenden Bestandteilen zusammen: Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) als Fertigmedium mit Glucose und L-Glutamin<sup>5</sup>;  $10\%$  Fötale Kälberserum<sup>6</sup>;  $1\%$  Penicillin<sup>7</sup>/Streptomycin<sup>8</sup>. Der pH-Wert betrug  $7.2$ . Die Osmolarität lag zwischen  $320$  und  $340\text{ mosm/l}$ .

Die Aufbewahrung des Kälberserums erfolgte bei ca.  $-18^\circ\text{C}$ . Vor dem Einfrieren wurde es steril filtriert, um eine Kontamination der Zellkultur zu vermeiden. Das Kulturmedium wurde bei  $6-8^\circ\text{C}$  aufbewahrt.

Innerhalb der Kulturflaschen entstand aufgrund der raschen Zellvermehrung nach wenigen Tagen eine dichte Zellpopulation, die sich je nach Entwicklungsgrad in nicht abgesetzte, teilungsfreudige Embryonalzellen und am Boden abgesetzte, reife Zellen untergliederte. Letztere bildeten dort einen dichten Zellrasen. Derartige Monolayerkulturen benötigen für ein zufriedenstellendes Wachstum und zur Vitalitätserhaltung einen regelmäßigen Mediumwechsel, da im Laufe der Zeit die Bestandteile des Mediums und seiner Zusätze von den Zellen metabolisiert werden oder bei  $37^\circ\text{C}$  allmählich zerfallen (LINDL & BAUER, 1989). Aus diesem Grund wurde dreimal pro Woche das verbrauchte Kulturmedium (Flüssigkeitsvolumen ca.  $10\text{ ml}$ )

---

<sup>4</sup>Sarstedt, Best.-Nr.: 83.1810.002

<sup>5</sup>Sigma: Lot 105H2322

<sup>6</sup>Sigma: Lot 48H3376

<sup>7</sup> $10000\text{ U/ml}$

<sup>8</sup> $10000\text{ }\mu\text{g/ml}$

unter sterilen Bedingungen fast vollständig abgesogen und durch frisches ersetzt. Für Versuchszwecke wurden mit Hilfe einer Auslaufpipette<sup>9</sup> die reiferen Zellen vom Flaschenboden abgelöst und in Plexiglas-Petrischälchen<sup>10</sup> ( $\varnothing$  35 mm) überführt. Damit sich diese Zellen in den Schalen ausreichend absetzen konnten, wurden sie anschließend einen Tag im Brutschrank belassen. Um stärkere Ausdifferenzierungen der Zellen innerhalb der Kulturflaschen zu vermeiden, wurden regelmäßig die konfluenten Kulturen subkultiviert.

Sowohl für Einzel- als auch Ganzzellaufbauten wurden aus den Plexiglas-Schälchen Zellen mit einem Durchmesser von ca. 20 bis 30  $\mu\text{m}$  ausgewählt. Diese Zellen sollten eindeutig abgegrenzt, jedoch in unmittelbarer Nähe zu anderen Zellen liegen. Sie zeichneten sich durch einen scharfen Zellrand aus und wiesen eine gleichmäßige Verteilung der Zellkompartimente ohne Anzeichen einer Granulierung auf.

### 2.2.2 DRG-Neurone

Diese Zelllinie entstammte aus den Lumbalganglien 1-5 des Rückenmarks von adulten Ratten und wurde für die jeweiligen Versuchstage als Primärkultur angelegt. Unter einer Primärkultur versteht man *in vitro*-Züchtungen von Zellen, Geweben und Organen, die direkt aus dem Organismus entnommen werden (LINDL & BAUER, 1989). Dabei ist es wichtig, daß das Gewebe bzw. das Organ vollständig dissoziiert. Bei dieser Form der Kultivierung mußten zunächst die Lumbal-Ganglien aus dem Rückenmark der adulten Ratte herauspräpariert und in einem sterilen Puffer/Glucose aufgefangen werden. Unter einer Stereolupe wurden anschließend die Ganglien von überschüssigem Gewebe mechanisch mit einem Skalpell desintegriert, die Zellkörper in frischen Puffer überführt und mehrmals gespült, bevor die Dissoziationslösung auf die Zellen gegeben wurde. Für die Zerlegung des Gewebes in Einzelzellen eignete sich

---

<sup>9</sup>Sarstedt: Lot 81190401

<sup>10</sup>Falcon: 3001

zur enzymatischen Präparation besonders Typ II Collagenase<sup>11</sup>. Nach dreistündiger Inkubationszeit im Brutschrank war die Dissoziation des Gewebes soweit fortgeschritten, daß nach Scherung mit einer Pipette und darauffolgender Zentrifugation<sup>12</sup> das Zellmedium resuspendiert und auf Poly-D-Lysin(PDL) beschichtete Petrischalen gegeben werden konnte. Mit 3 ml Kulturmedium (DMEM ohne Kälberserum) aufgefüllt, überlebten die Zellen mehrere Tage und standen weiteren Versuchen zur Verfügung. Die Zusammensetzung der verschiedenen Lösungen finden sich im Anhang.

## 2.3 Elektrophysiologische Messungen

### 2.3.1 Patch-Clamp-Anlage

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde für die Durchführung der Experimente die inzwischen standardisierte Patch-Clamp-Technik verwandt (HAMILL *et al.*, 1981). Aufgrund dieser Methode lassen sich elektrische Ströme durch einzelne Ionenkanäle eines Membranflecks in der sog. *Spannungsklemme* (Voltage-Clamp) registrieren. Die Empfindlichkeit dieser Meßmethode macht es jedoch erforderlich, den Meßplatz vor Störungen aus der Umgebung zu schützen. Wie die Abbildung 2.2 zeigt, diente zum mechanischen Schutz ein auf Styroporblöcken ruhender, massiver Granitblock<sup>13</sup>, der ein erschütterungsfreies Arbeiten ermöglichte und zur elektrischen Abschirmung ein Faraday-Käfig, der eine Überlagerung der kleinen Meßsignale durch elektrisches Hintergrundrauschen (50 Hz) verhinderte.

Um ein präzises Arbeiten mit den Zellen zu gewährleisten, waren ein Invers-Mikroskop mit Phasenkontrastkondensator<sup>14</sup> und ein Mikromanipulator notwendig. Beide

---

<sup>11</sup>Worthington Biochemical Corporation

<sup>12</sup>1500 U/Min.

<sup>13</sup>Maße: 800 \* 750 \* 130 mm

<sup>14</sup>Nikon: Diaphot-TMD

befanden sich auf dem Granitblock. Die Petrischale mit den zu untersuchenden Zellen konnte in den Mikroskop-Kreuztisch eingelassen werden. Für das präzise Heranführen der Patch-Pipette an die jeweils zu untersuchende Zelle diente ein Mikromanipulator<sup>15</sup>, dessen drei Schrittmotoren über ein außerhalb des Käfigs befindliches Steuergerät<sup>16</sup> mit einem Joystick geregelt wurden. Über eine selbstentwickelte Ergänzung konnte jeder Schritt von  $0.1 \mu\text{m}$  mit einem akustischen Signal kontrolliert werden. An dem Mikromanipulator befand sich wiederum die häufig als Sonde bezeichnete Apparatur, bestehend aus Vorverstärker (sog. *headstage*) und Pipettenhalter. Letzterer ermöglichte nicht nur die elektrische Verbindung der Pipette zum Verstärker, sondern auch das Anlegen eines Über- bzw. Unterdruckes über einen seitlich angeschlossenen Luftschlauch.

Eine Besonderheit der Patch-Clamp-Technik ist der Verstärker, genaugenommen der Vorverstärker. Dieser ist in der Lage, entweder bei variabler Spannung den Strom über der Membran (Voltage-Clamp) oder bei festem Strom die Spannung zu messen (Current-Clamp). Dies geschieht über einen integrierten Operationsverstärker (OPA), der über einen Gegenkopplungswiderstand  $R_f$  den Spannungsunterschied zwischen dem Pipettenpotential und dem Sollpotential auf Null regelt. Hierfür wird der Spannungsunterschied zwischen diesen beiden Potentialen über den OPA solange verstärkt, bis über den Gegenkopplungswiderstand ein Strom gemäß  $I = \frac{U_f}{R_f}$  in die Pipette fließt. Bei Vernachlässigung des Spannungsabfalls über der Pipette erzeugt dieser Strom die gewünschte Membranspannung  $U_{soll}$ . Die Spannung über  $R_f$  ist proportional zum Strom in der Pipette. Damit diese Spannung gegen die Masse gemessen werden kann, wird  $U_{soll}$  mit Hilfe eines zweiten, nachgeschalteten Operationsverstärkers *abgezogen*. Demnach erfüllt dieser Voltage-Clamp-Verstärker zwei Aufgaben: zum einen sorgt er dafür, daß das Potential der Zelle der Pipette und somit  $U_{soll}$  entspricht und zum anderen mißt er den hierfür notwendigen Kompensationsstrom. Daher können die gemessenen Vorgänge an einer Zellmembran auch

---

<sup>15</sup>HS 6/3: Märzhäuser, Wetzlar

<sup>16</sup>MS 13 JS: Märzhäuser, Wetzlar

an einem Oszilloskop dargestellt und ausgewertet werden.

Der Vorverstärker mißt und reguliert die von der Zelle kommenden Stromsignale, konvertiert diese in analoge Spannungen und führt sie dem nachgeschalteten Verstärker, in diesem Fall handelte es sich um einen EPC-7<sup>17</sup>, zu. Dieser EPC-7 verstärkte und filterte das ankommende Signal zusätzlich und stellte die eigentliche Steuereinheit für den Benutzer dar. Ein anschließender Subtraktions- und Differenzverstärker verstärkte das zuvor bereits verarbeitete Signal nochmals (5-fach) und begrenzte die Bandbreite der Daten über einen zusätzlichen Tiefpaß-Filter. Dieser Filter eliminierte Signale und Rauschen oberhalb der Eckfrequenz von 1.66 *kHz*, was besonders bei Einzelkanalmessungen aufgrund der geringen Amplitude sehr bedeutsam war (HEINEMANN, 1995).

Die auf dem Speicher-Oszilloskop und dem PC sichtbaren Signale wurden während der Versuche auf Datenträger (Nicolet<sup>18</sup>, DAT-Recorder<sup>19</sup>) gespeichert und später analysiert.

Als nützliche Zusatzeinrichtung erwies sich eine an den Phototubus des Mikroskops angeschlossene Videokamera<sup>20</sup> mit einem extern des Meßtisches gelegenen Monitor<sup>21</sup>. Dies ermöglichte eine leichtere Zellannäherung mit der Pipette und eine bessere Überwachung der Versuche, ohne in das Mikroskop blicken zu müssen. Unnötige Erschütterungen konnten somit vermieden werden.

---

<sup>17</sup>List-Elektronik, Darmstadt

<sup>18</sup>Nicolet Instrument Corporation, Madison, Wi, USA

<sup>19</sup>JVC: XD-Z505 E/G

<sup>20</sup>Sony: SSC-M370CE

<sup>21</sup>Panasonic: WV-5410



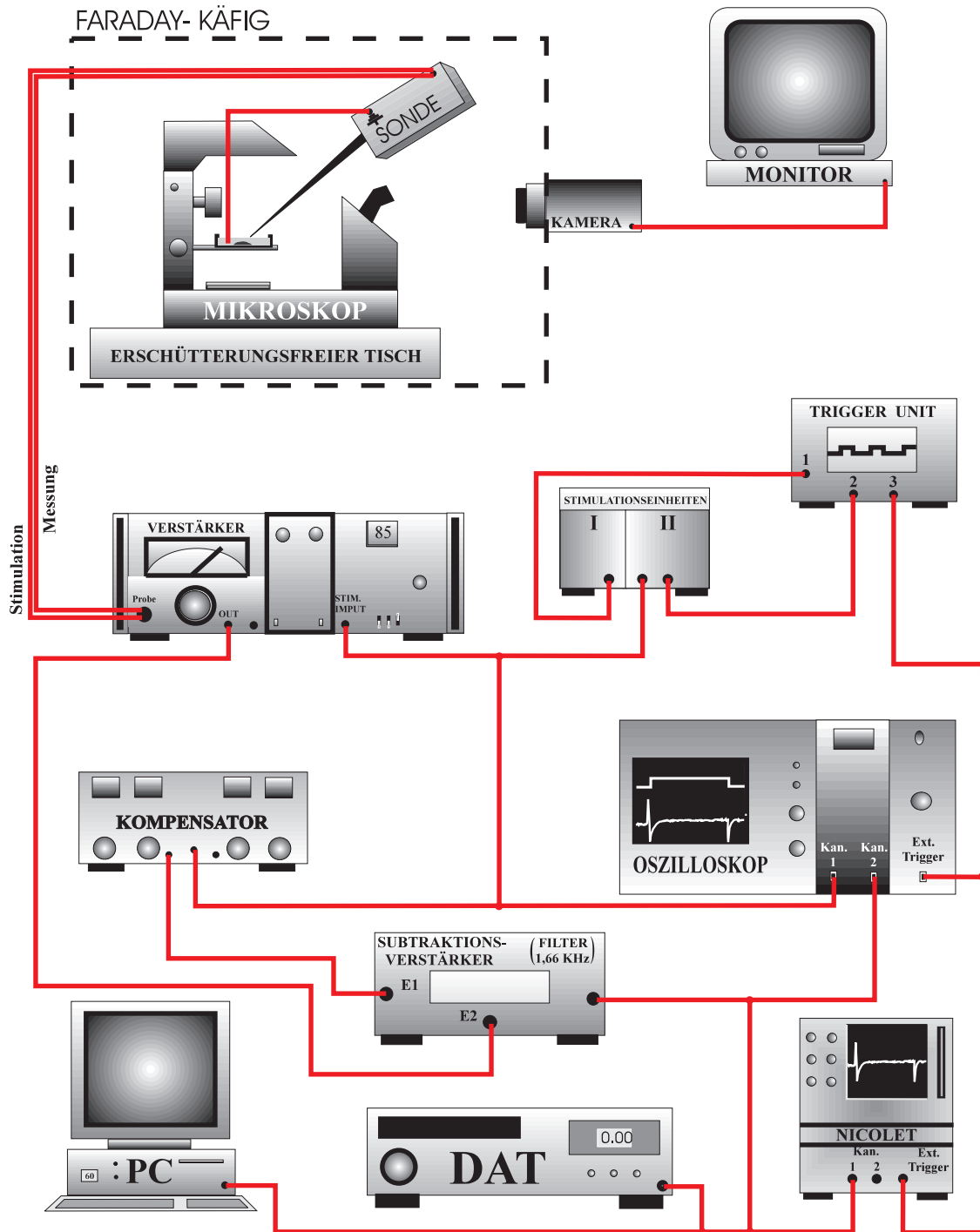


Abbildung 2.2: Schematischer Aufbau der Patch-Clamp-Anlage

## 2.3.2 Patch-Pipetten und Elektroden

### Patch-Pipetten

Als eines der wichtigsten Kriterien für eine gute, rauscharme Registrierung von transmembranen Ionenströmen ist die Bildung einer hochohmigen Verbindung (engl.: *Gigaseal*) zwischen der Glaspipette und der Zelle. Diese Verbindung hängt ganz entscheidend von der Charakteristik der Patch-Pipette ab. Dabei spielen sowohl Geometrie als auch das verwendete Glas zur Herstellung der Pipetten eine wichtige Rolle. Je nach der Form der Zelleableitung war es nötig geeignete Mikropipetten vor jedem Experiment frisch aus Glaskapillaren herzustellen. Als Glasrohlinge dienten hierfür Kapillaren aus Borosilikatglas<sup>22</sup> ( $\varnothing_{\text{außen}} = 1.8 \text{ mm}$ ). Aufgrund seines Schmelzpunktes (700 bis 850°C) gehört dieses Glas zu den mittelharten Gläsern und zeichnet sich durch seine guten elektrischen Eigenschaften (geringes Rauschen) aus (HAMILL *et al.*, 1981). Zwar können aus weichem Glas, wie etwa Sodaglas (700°C), leichter Pipetten hergestellt werden, doch erzeugen diese ein stärkeres Rauschen. Härtere Aluminiumsilikatgläser (ab 900°C) sind im Vergleich zu obigen Gläsern am schwierigsten zu ziehen.

Um die Pipetten herzustellen, mußte der staub- und fettfreie Glasrohling in ein Pipettenziehgerät<sup>23</sup> (sog. *Puller*) vertikal eingespannt und mit Hilfe einer Heizspirale in zwei Heizschritten gezogen werden. Dabei zog der erste Schritt die Kapillare durch Erhitzung um eine Länge von ca. 0.7 bis 1 cm vor und verjüngte das Glas dabei auf einen Durchmesser von etwa 300  $\mu\text{m}$ . Der zweite Heizschritt durchtrennte anschließend das Glas nach Rezentrierung an der verjüngten Stelle. Geregelt wurde die Temperatur der Heizspirale über zwei Sollwertpotentiometer, so daß durch entsprechende Einstellungen unterschiedliche Flanken und Spitzendurchmesser der Pipetten erreicht werden konnten.

Es eigneten sich für die Einzelkanalmessungen in der Regel engere, hochohmige

---

<sup>22</sup>World precision instruments, Sarasota, USA; It.: 1B150f-3

<sup>23</sup>Ochotzki, Homburg/Saar

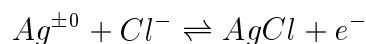
Patch-Pipetten mit einem Widerstand von 8-40  $M\Omega$ , bei Ganzzelleableitungen hingegen lag der Widerstand zwischen 2 bis 8  $M\Omega$  (STANDEN & STANFIELD, 1992). Grundsätzlich bewirkt die Verwendung niederohmiger Pipetten eine Verringerung des Serienwiderstandes und somit des Hintergrundrauschens. Bei dem Serienwiderstand  $R_S$  handelt es sich um den Widerstand zwischen Zellsoma und Silberdraht der Elektrode. Er entspricht im besten Falle dem Pipettenwiderstand, kann jedoch durch Membranbestandteile im Mündungsbereich der Pipette deutlich erhöht sein (NUMBERGER & DRAGUHN, 1996). Niederohmige Pipetten haben häufig den Nachteil, die Sealbildung zu erschweren. Aus diesem Grund wurde der Spitzendurchmesser bei Einzellkanalableitungen verringert und somit etwas hochohmiger Patch-Pipetten verwendet.

Bei Einzelkanalableitungen war es erforderlich, die Pipetten an der Spitze zusätzlich zu polieren, d.h. die Glaskanten zu entschärfen. Auf diese Weise konnten bessere Abdichtwiderstände zwischen Zelle und Pipette erzielt werden. Durchgeführt wurde diese Hitzepolitur mit Hilfe einer Mikroschmiede (sog. *Mikroforge*). Diese bestand aus einem Mikroskop mit Pipettenhalter und Mikromanipulator mit einem fest installierten Glühfilament (Platindraht). Die Pipettenspitze wurde in dieser Mikroforge für wenige Sekunden sehr nah an die Glühwendel herangebracht. Ein Glastropfen auf dem Platindraht verhinderte ein Aufdampfen von für die Zelle schädlichem Platin auf die Pipettenoberfläche.

Auf das zusätzliche Beschichten der Pipettenspitze mit Sylgard, einem farblosen lösungsmittelfreien Silikonelastomer wurde in den Versuchen verzichtet. Dieses sog. *coating* mit hydrophoben Substanzen soll durch eine Vergrößerung des Spitzendurchmessers das kapazitive Rauschen verringern (HAMILL *et al.*, 1981). Ein Vergleich beschichteter mit unbeschichteten Pipetten zeigte jedoch einen relativ geringen Unterschied in der Verminderung des Hintergrundrauschens.

## Elektroden

Für die Messung transmembraner Ionenströme war es erforderlich, einen metallischen Leiter zu verwenden, der den Vorverstärker mit der Pipettenlösung und dem Erdleiter in der Badlösung verband. Eine derartige Verbindung erfolgte über *Elektroden*. Dabei unterscheidet man die Meßelektrode von der Erdelektrode. Beide bestanden aus chloriertem Silberdraht. Unter "Chlorieren" versteht man die reversible Beschichtung des Silberdrahtes mit einer Silberchloridschicht. Dies geschah auf elektrolytischem Wege indem der mit Sandpapier abgeschliffene Silberdraht, mit der Anode einer Batterie verbunden und in eine Chloridlösung (20 – 100 nM) getaucht wurde. Ein zusätzlicher an die Kathode gekoppelter Draht bewirkte nach Anlegen einer Spannung von ca. 1.5 V bei sehr geringem Strom von ca. 1 mA ein "Abziehen" von Elektronen an der Elektrode. Das Reaktionsgleichgewicht verschob sich so nach rechts (s.u.), wodurch Silberchlorid auf dem Draht entstand.



Ein derart chlorierter Silberdraht reduzierte bzw. hielt sog. *Offsetpotentiale* konstant. Offsetpotentiale sind Potentialdifferenzen, die nicht vom biologischen Präparat oder vom Kommandopotential stammen, sondern an Übergängen innerhalb der Meßkette, z.B. Silberdraht - Pipettenlösung oder Badlösung - Erdung, entstehen. Trat dennoch ein Offset während der Messung auf, so konnte dieser nachträglich am Verstärker korrigiert werden (s. 2.3.4).

### 2.3.3 Testlösungen

Grundsätzlich wurde für jedes Experiment das Kulturmedium in der Petrischale gegen eine *externe* Elektrolytlösung ausgetauscht, die in ihrer Zusammensetzung dem extrazellulären Milieu der Zellen entsprach. Diese Badlösung für Zellkulturen besaß im wesentlichen eine hohe Konzentration an  $Na^+$  und  $Cl^-$ -Ionen und wenig  $K^+$ -

Ionen.

Die Pipettenlösung variierte entsprechend der Experimente. Bei Ganzzelleableitungen wurde die Patchpipette mit einer *internen* Lösung gefüllt, die in Anlehnung an die Ionenverhältnisse im Cytoplasma eine höhere  $K^+$ -Konzentration aufwies. Für die Einzellkanalmessungen wurde die *externe* Lösung zum Auffüllen der Pipetten verwendet. Der pH-Wert beider Lösungen wurde mit 1n NaOH auf 7.2 eingestellt. Sämtliche Elektrolytlösungen wurden bei ca. 6°C im Kühlschrank gelagert und alle vier Wochen neu angesetzt. Vor dem Gebrauch wurden die Lösungen zusätzlich sterilfiltriert<sup>24</sup> (Porengröße: 0.2  $\mu m$ ).

Um einen deutlichen Effekt der biologisch aktiven Anemonentoxine auf die Natriumkanäle herauszufinden, war es erforderlich die Kaliumkanäle zu blockieren. Diesem Zweck diente *Tetraethylammonium-Iodid* ( $TEA^+$ ), ein Pharmakon, welches selektiv einen potentialabhängigen, verzögerten Kaliumstrom (*delayed rectifier*,  $I_K$ ) in einer Konzentration von 20 mM zu über 80% (CULL-CANDY *et al.*, 1987) und bei 25 mM vollständig (SEGAL *et al.*, 1984) blockiert. Zusätzlich wurde für die Ganzzelleableitungen Kaliumchlorid gegen Cäsiumchlorid in der *internen* Lösung ausgetauscht, um weiterhin vorhandene Kalium-Leckströme zusätzlich zu unterbinden. Kaliumkanäle sind für Cäsium und andere große, monovalente Kationen impermeabel (SCHOENMAKERS *et al.*, 1992).

Im Rahmen der neurophysiologischen Untersuchungen standen die extrahierten und getrockneten Fraktionen des Giftes *Anthopleurin E* der Seeanemone *Anthopleura elegantissima* und das *ATX II* der Anemone *Anemonia sulcata* in Ampullen mit jeweils 0.1 mg Inhalt zur Verfügung. Diese wasserlöslichen Substanzen wurden für die präparativen Zwecke in *externer* Lösung gelöst und in definierter Konzentration appliziert (0.1, 0.5, 1, 1.5, 2.0 [ $\mu mol/l$ ]). Bei den untersuchten Giftfraktionen handelt es sich um Polypeptidketten bestehend aus ca. 47 Aminosäuren mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von ca. 5000 Dalton (GÖRÖGH *et al.*, 1994; BORNEMANN & HAHN, 1993).

---

<sup>24</sup>Nalgene: 190-2520

Tabelle 2.1: *Externe Lösung*

Substanz	Konzentration [mM]
<i>NaCl</i>	145
<i>KCl</i>	4
<i>CaCl<sub>2</sub></i>	1.8
<i>MgCl<sub>2</sub></i>	0.4
<i>Glucose</i>	5
<i>Hepes</i>	5
<i>TEA</i>	10

Tabelle 2.2: *Interne Lösung*

Substanz	Konzentrationen [mM]
<i>CsCl</i>	130
<i>NaCl</i>	10
<i>Hepes</i>	5
<i>Glucose</i>	10
<i>TEA</i>	10

### 2.3.4 Korrektur der Daten

Bevor die einzelnen Daten analysiert werden konnten, war es wichtig, bereits während der Aufnahme darauf zu achten, eine optimale *Offsetkorrektur* und *Verstärkung* einzustellen, da spätere Korrekturen der aufgezeichneten Werte über die Software nur begrenzt möglich waren. Dementsprechend mußten die Daten bereits *online* gefiltert und gesampelt werden.

### Offsetkorrektur

Eine Offsetkorrektur muß durchgeführt werden, wenn Potentiale entstehen, die nicht vom biologischen Präparat oder vom Kommandopotential herrühren, sondern an Übergängen innerhalb der Meßkette (2.3.2). Damit das Kommandopotential tatsächlich an der Membran der untersuchten Zelle anlag, wurde dieses sog. *Offsetpotential* ( $V_p$ -Offset) kurz vor der eigentlichen Sealbildung am Korrekturmechanismus des Verstärkers im *Search*-Modus auf Null abgeglichen.

### Kapazitätskompensation

Aufgrund der kapazitären Eigenschaften der Zellmembran kommt es bei rechteckigen Änderungen der Kommandospannung zu einer Ladungsumverteilung auf der Membran, was zu einem raschen Anstieg und anschließend abfallenden, exponentiellen Stromverlauf führt. Die dabei entstehenden *Artefakte* unterscheiden sich von Zelle zu Zelle entsprechend der jeweiligen Gesamteingangskapazität ( $C_{in}$ ), die sich proportional zur Größe der Zellmembran verändert ( $C_{in} \sim 4\pi r^2$ ). Bei Untersuchungen können diese *Artefakte* die Meßsignale verzerren und müssen daher kompensiert werden.

Wurden über den Verstärker Spannungssprünge appliziert, so kam es zunächst zur Auf- bzw. Umladung der Membran. Der exponentielle Verlauf der Spannungsänderung wird beschrieben durch die Formel:

$$V(t) = V_{\infty}(1 - e^{-\frac{t}{\tau}}). \quad (2.1)$$

Der Spannungszustand im *Steady-state*  $V_{\infty}$  ist unabhängig von der Kapazität der Membran und wird über den Strom  $I$  und dem Membranwiderstand  $R$  definiert:

$$V_{\infty} = IR. \quad (2.2)$$

Demnach fällt die Spannung während einer Änderung zunächst am Kondensator (Ladungsumverteilung an der Membran) und erst im *Steady-state* am Widerstand

(Ionenkanälen) ab. Daraus ergibt sich folgender Zusammenhang:

$$\Delta V(t) = IR(1 - e^{-\frac{t}{\tau}}). \quad (2.3)$$

$\tau$  ist hierbei die *Zeitkonstante* der Membran und setzt sich aus dem Membranwiderstand und der Kapazität zusammen ( $\tau = RC$ ). Kapazitätskompensationen können, wie aus obiger Gleichung ersichtlich, über Veränderungen der Zeitkonstanten  $\tau$  bzw. über nachgeschaltete Widerstandskorrekturen durchgeführt werden. Diese Funktion erfüllte während der Messungen der zwischen Verstärker und Oszilloskop geschaltete Kompensationskasten. Der Kasten beinhaltete Potentiometer, die manuell die Form des Artefakts verminderten und somit ausgegebene Daten verbesserten.

### 2.3.5 Datenanalyse

#### Analyse der Ganzzellerggebnisse

Während der Ganzzelleableitungen erkannte man am Oszilloskop einen Membranstrom, der bei gleichbleibenden Bedingungen konstant blieb. Die Aufzeichnung der Ganzzelleableitungen benötigte relativ wenig Speicherkapazität, so daß für diesen Zweck eine Nicolet<sup>25</sup>, ein Speicheroszilloskop mit integriertem 5,25“-Diskettenlaufwerk zur Digitalisierung und Aufzeichnung der Reizantworten, ausreichte. An diesem Gerät konnten nachträglich (*offline*) die Stromregistrierungen zur Protokollierung ausgemessen werden. Die protokollierten Daten wurden in das Tabellenkalkulationsprogramm EXCEL 5.0<sup>26</sup> importiert und ausgewertet. Statistische Verfahren wurden mit Hilfe von SPSS 8.0 for Windows<sup>27</sup> durchgeführt.

**Berechnung des Inaktivierungsverhaltens:** Spannungsgesteuerte Natriumkanäle werden durch eine ausreichende Depolarisation aktiviert, öffnen sich und ermöglichen einen transienten Einwärtsstrom an Natriumionen. Dieser Strom nimmt

---

<sup>25</sup>Nicolet Instrument Corporation, Madison, Wi, USA

<sup>26</sup>Microsoft

<sup>27</sup>SPSS Inc., Chicago, Illinois 60606



nach Durchlaufen eines Maximums aufgrund des unmittelbar eintretenden Inaktivierungsmechanismus rasch wieder ab. Dieser abfallende Strom wird durch folgende diphasische Exponentialfunktion in Abhängigkeit von der Zeit beschrieben:

$$I_{Na}(t) = I_0(0)e^{-\frac{t}{\tau_0}} + I_1(0)e^{-\frac{t}{\tau_1}} + I_2. \quad (2.4)$$

$\tau_0$  und  $\tau_1$  entsprechen den Zeitkonstanten,  $I_0$  und  $I_1$  den zugehörigen auf  $t = 0$  extrapolierten schnellen und langsamen Inaktivierungskomponenten.

Der abfallende Stromteil entspricht der Inaktivierung  $h(t)$ . Die Aktivierung  $m(t)$  verläuft sehr viel schneller und ist kurz nach Erreichen des Spitzenstromwertes bereits abgeschlossen.  $I_2$  ist eine konstante Stromkomponente und beschreibt einen u.U. auftretenden, persistierenden Stromanteil. Ermittelt wurden diese fünf kinetischen Inaktivierungsparameter  $I_0(0)$ ,  $I_1(0)$ ,  $I_2$ ,  $\tau_0$  und  $\tau_1$  über eine halblogarithmische Annäherung an die gemessenen Stromkurven.

Um die Ergebnisse miteinander vergleichen und auswerten zu können, mußten die einzelnen Stromanteile des Verlaufs der Inaktivierung normiert werden. Die Normierung wird durch Vereinfachung obiger Formel (2.4) folgendermaßen beschrieben:

$$h(t) = A + Be^{-\frac{t}{\tau_0}} + Ce^{-\frac{t}{\tau_1}}, \quad (2.5)$$

wobei  $A = \frac{I_2}{\sum I(0)}$ ;  $B = \frac{I_0(0)}{\sum I(0)}$ ;  $C = \frac{I_1(0)}{\sum I(0)}$  und  $\sum I = I_0(0) + I_1(0) + I_2$  sind.

### Analyse der Einzelkanaldaten

Anders als die Daten der Ganzzellversuche wurden die Einzelkanaldaten während der Versuche mit Hilfe eines DAT-Rekorders<sup>28</sup> analog auf DAT-Bändern<sup>29</sup> aufgezeichnet und erst zu einem späteren Zeitpunkt sozusagen *offline* analysiert. Dabei erfolgte die Digitalisierung der Daten über ein Interface<sup>30</sup> mit einer Abtastrate von 32 kHz und die Auswertung mittels der dazugehörigen Patch-Clamp-Software von

<sup>28</sup>JVC: XD-Z505 E/G

<sup>29</sup>Hewlett Packard: DDS-2 Data Cartridge

<sup>30</sup>CED 1401

Cambridge Electronic Design Ltd.<sup>31</sup>. Gestartet wurde die Digitalisierung über den ebenfalls auf dem DAT-Band aufgezeichneten Synchronisationsimpuls, der durch einen *Schmitt-Trigger* (TIETZE & SCHENK, 1978) zu einem Impuls mit sehr steiler Flanke verstärkt wurde. Durch diesen Trigger wurden nur die Meßbereiche oberhalb der Triggerschwelle und somit nur die Daten während des 70ms dauernden Impulses, übertragen.

**Open-Time Histogramm:** Vor der Analyse der Zeit- und Amplitudenhistogramme (Open-Time Analyse) der Einzelkanalaufzeichnungen mußten innerhalb der CED-Software sog. *ideale Daten* erstellt werden. Diese Idealisierung geschah zunächst durch ein sog. *Averaging*, indem gemittelte Leeraufnahmen von den Einzelaufzeichnungen subtrahiert wurden. Auf diese Weise konnten noch vorhandene kapazitive Artefakte und Leckströme beseitigt und das Rauschen minimiert werden. Außerdem mußte innerhalb sämtlicher Datenfiles die Grundlinie auf Null gesetzt und die Schwelle der Stromamplitude ( $\hat{I}_{Na}$ ) festgelegt (in der Regel:  $\frac{1}{2}\hat{I}_{NaMax}$ ) werden, so daß das Programm die Kanalöffnungen verzögerungsfrei registrieren konnte. Diese derart ermittelten, *idealisierten* Datenfiles wurden anschließend für die Auswertung im Balkenhistogramm eingelesen. In einem Balkenhistogramm sind die absoluten Häufigkeiten bestimmter Ereignisse in definierten Intervallen dargestellt.

Innerhalb der Histogramme paßt das Programm je nach Bedarf eine monoexponentielle Funktion über die Methode der kleinsten Quadrate nach der Formel:

$$N = N_A e^{-\frac{t}{B}},$$

wobei  $B = \tau_{open}$  ist oder alternativ eine di-exponentielle Funktion nach folgender Formel:

$$N = N_A e^{-\frac{t}{B}} + N_C e^{-\frac{t}{D}}$$

---

<sup>31</sup>Cambridge, UK

an, wobei  $B = \tau_{open1}$  und  $D = \tau_{open2}$  sind.

Die Zeitkonstante  $\tau$  kennzeichnet die mittlere Zeitdauer des betrachteten Ereignisses (z.B. die Kanalöffnungsdauer).

Die statistische Auswertung der Zeitkonstanten sämtlicher Datenfiles erfolgte nach Protokollierung und Übertragung in EXCEL 5.0 und SPSS 8.0 for Windows.

**Addition von Einzelereignissen:** Weder mit pharmakologischen Substanzen noch mit einem rechnerischen Subtraktionsverfahren einzelner Stromkomponenten vom Gesamtstrom ist es möglich, einzelne Kanalpopulationen distinktiv zu identifizieren (CULL-CANDY *et al.*, 1989). Dennoch kann durch Addition der Einzelereignisse der Anteil diskreter Kanäle des Cell-attached-Patches am Gesamtstrom abgeschätzt werden, da es bei gleicher Kinetik und Leitfähigkeit einer Kanalpopulation unerheblich ist, ob zwei Kanäle zweihundert Mal abgeleitet und aufsummiert werden oder vierhundert Kanäle gleichzeitig (Whole-Cell). Aus der Kinetik des resultierenden Stromverlaufes läßt sich die Wahrscheinlichkeit abschätzen, zu welchem Zeitpunkt der Kanal offen ist.

Der Amplitude des Summationsstroms wird die Einzelkanalamplitude des entsprechenden Kanals zugeordnet. Ausgehend von der rechnerischen Ermittlung des Summationsstroms konnte somit für einen Zeitpunkt "t" die Amplitude  $\frac{1}{n}$  aller Summationsereignisse bestimmt werden.

### 2.3.6 Statistische Auswertung

Mittels statistischer Verfahren soll überprüft werden, ob sich die verschiedenen Toxingruppen hinsichtlich ihrer Giftwirkung signifikant voneinander unterscheiden. Die Verfahrensgruppe, die für die Beantwortung dieser komplexen Fragestellung geeignet ist, ist die Varianzanalyse (BORTZ, 1993). Die Varianzanalyse (ANO-

VA<sup>32</sup>) ermöglicht die Unterschiedlichkeit in der Reaktionsweise der Zellen auf eine oder mehrere unabhängige Variablen zurückzuführen. Da hier nur eine unabhängige Variable untersucht werden soll (die Toxingruppe), wird auf eine einfaktorielle ANOVA rekrutiert. Die unabhängige Variable wird auch als Treatmentvariable bezeichnet und ist in dieser Untersuchung fünffach gestuft (*APE 1-1, ..., APE 5-3*). Die abhängige Variable repräsentiert die Giftwirkung auf den Natriumkanal. Den Voraussetzungen der ANOVA entsprechend ist diese abhängige Variable intervallskaliert. Die einfaktorielle ANOVA prüft somit die Nullhypothese ( $H_0$ ), daß sich die verschiedenen Toxingruppen nicht voneinander unterscheiden. Die Alternativhypothese ( $H_1$ ) besagt, daß sich mindestens zwei Toxingruppen in ihrer Giftwirkung voneinander unterscheiden.

Resultiert in einer einfaktoriellen ANOVA ein signifikanter F-Wert, so kann daraus geschlussfolgert werden, daß sich die verglichenen Mittelwerte in irgendeiner Weise signifikant voneinander unterscheiden. Man spricht dann auch von einer "overall"-Signifikanz. Eine differenziertere Interpretation der Gesamtsignifikanz ist nur möglich, wenn bekannt ist, welche Mittelwerte sich von welchen Mittelwerten signifikant unterscheiden. Dabei ist es durchaus möglich, daß sich nur zwei Mittelwerte signifikant unterscheiden, die anderen sich jedoch nicht signifikant voneinander unterscheiden. Einzelvergleiche, die im Anschluss an eine ANOVA gerechnet werden, erlauben eine Aussage darüber, zwischen welchen Treatmentstufen (UV) signifikante Unterschiede bestehen (BORTZ, 1993). Bezogen auf diese Untersuchung ermöglichen Einzelvergleiche somit eine Aussage darüber, welche Toxingruppen sich hinsichtlich der Giftwirkung signifikant voneinander unterscheiden.

Zur Durchführung von Einzelvergleichen sind verschiedene statistische Verfahren entwickelt worden. Die Anwendung einfacher Einzelvergleiche bewirkt jedoch eine  $\alpha$ -Fehlerkumulierung, d.h. eine Erhöhung des  $\alpha$ -Fehlers (Wahrscheinlichkeit einer fälschlichen Entscheidung zugunsten von  $H_1$ ). Eines der am weitesten verbreiteten Verfahren ist der SCHEFFÉ-Test (1963). Der Scheffé-Test bietet den Vorteil ten-

---

<sup>32</sup>Analysis of Variance

denziell konservativ zu entscheiden, d.h. daß eher zugunsten der  $H_0$  entschieden wird ( $H_0$ :“Es bestehen keine Mittelwertsunterschiede“). Der Scheffé-Test garantiert damit, daß die Wahrscheinlichkeit eines  $\alpha$ -Fehlers für jeden durchgeführten Einzelvergleich nicht größer ist als das Signifikanzniveau  $\alpha$  für den Overall-Test der ANOVA. Die Wahrscheinlichkeit einer fälschlichen Annahme der Alternativhypothese  $H_1$  ( $H_1$ :“Es bestehen signifikante Mittelwertsunterschiede“) wird somit nicht erhöht.

### 2.3.7 Versuchsbeschreibung

Nachdem sich die Zellen über mehrere Stunden (24 -48 h) in den Petrischalen absetzen konnten, wurde für Versuchszwecke das Kulturmedium gegen die zuvor auf 37°C erwärmte und filtrierte *externe* Lösung ausgetauscht. Damit sich die Zellen an den Lösungswechsel gewöhnen konnten, wurden diese etwa 15 Minuten auf dem Objektisch stengelassen. In dieser Zeit konnten die Pipetten frisch gezogen und die Lösung zum Füllen der Pipetten vorbereitet werden. Das luftblasenfreie Auffüllen der Pipetten geschah mit einer handelsüblichen 5 ml Spritze. Aufgefüllt und in den Pipettenhalter der Sonde eingesetzt, erfolgte anschließend die Annäherung an die jeweilige Zelle mit Hilfe der Mikromanipulatoren. Während dieses Vorgangs wurde über einen Schlauch ein Überdruck auf die Elektrode erzeugt, der beim Eintauchen der Pipette in die Badlösung und Annähern an die Zelle ein Verstopfen der Pipetenspitze mit Partikeln verhinderte.

Befand sich die Pipette in unmittelbarer Nähe zur Zelle, wurde der Überdruck reduziert und bestehende *Offsetpotentiale* (vgl. 2.3.4) abgeglichen. In dieser Phase war es wichtig, das Stromsignal bei einem konstanten Spannungsimpuls von 10 mV auf dem Oszilloskop zu beobachten, um ein Durchbohren der Zelle mit der Pipetenspitze zu vermeiden. Da sich der Strom durch die Pipettenöffnung umgekehrt proportional zum Widerstand verhält, nimmt die Stromamplitude bei Kontakt mit der Zelle kontinuierlich ab. Durch vorsichtiges Saugen mit einer Spritze und dem da-

mit verbundenen Erzeugen eines Unterdrucks kam es zu einer deutlichen Erhöhung des Gesamtwiderstandes und somit zur Ausbildung eines *Seals*, einer hochohmigen Verbindung (Gigaohm), zwischen Zelle und Pipette. Als wirksame Kräfte dieser *Seal*-Bildung werden Ionen-, Wasserstoffbrücken- und Salzbrückenbindungen sowie van der Waals'sche Kräfte vermutet (COREY & STEVENS, 1983; OPSAHL & WEBB, 1994). Einem *Gigaseal*  $\geq 10 G\Omega$  entspricht ein Abstand zwischen Glas und Membran  $\leq 1 nm$  (COREY & STEVENS, 1983).

War die Pipette mit *externer* Lösung gefüllt, so ließen sich in dieser sog. *Cell-attached* Konfiguration Einzelkanäle unterhalb der Pipettenöffnung aktivieren, vorausgesetzt es waren Kanäle vorhanden. Die Aktivierung erfolgte über eine Spannungsklemme, in der dem Membranausschnitt das extrazelluläre Potential des Verstärkers aufgezwungen wurde. Da das Ruhemembranpotential der unbeschädigten Neuroblastozelle bei ca.  $-30 mV$  liegt, die meisten Natriumkanäle bei diesem Potential jedoch noch inaktiviert sind, muß die Membran hyperpolarisiert werden, um alle Kanäle aktivierbar zu machen. Damit das Zellinnere auf  $-80 mV$  gebracht werden konnte, wurde von außen, also über die Pipette (Elektrode), eine Spannung von ca.  $50 mV$  angelegt. Das Membranpotential ( $U_M$ ) ergab sich somit aus der Differenz zwischen Ruhepotential ( $U_R$ ) und Haltepotential des Verstärkers ( $U_H$ ):

$$U_M = U_R + U_H \quad (2.6)$$

Ausgehend von diesem Haltepotential wurde an der Membran während eines Rechteckimpulses für  $70 ms$  die Kommandospannung auf ein höheres Potential gebracht. Die Stärke dieser Depolarisation war abhängig von der Stärke des Reizpotentials ( $U_I$ ), so daß sich das Membranpotential während des Reizes wie folgt zusammensetzte:

$$U_M = (U_R + U_H) + U_I \quad (2.7)$$

Nachdem die Verstärkung am EPC-7 auf  $50 mV/pA$  stufenweise hochgeregelt wurde, konnten entsprechende Stromantworten auf dem DAT-Rekorder registriert werden. Für die Versuche in der *Whole-Cell* Konfiguration mußte zum Aufbrechen der Mem-

bran nach der *Seal*-Bildung mit einer Spritze ein Unterdruck in der Pipette erzeugt werden. Pipettenlösung und Cytosol bildeten somit eine Einheit. Daher wurden die Pipetten für die *Whole-Cell* Versuche mit *interner* Lösung gefüllt. In dieser Konfiguration mußte entsprechend obiger Gleichung (2.6) für eine ausreichende Hyperpolarisation der Zelle das Haltepotential auf  $-80\text{ mV}$  heruntergeregelt werden. Veränderungen der Kommandospannung erfolgten während  $70\text{ ms}$  dauernder Impulse; aufgezeichnet wurde mit Hilfe der Nicolet.

Die Applikation der Giftfraktionen erfolgte durch vorsichtiges Pipettieren auf die Zellen. Für die Versuche eigneten sich kugelige Zellen mit einer glatten Membranoberfläche, die einen Durchmesser von  $20 - 30\text{ }\mu\text{m}$  besaßen.

Sämtliche Versuche wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

# Kapitel 3

## Ergebnisse

### 3.1 Ganzzelleableitungen

Für die Untersuchungen zur Wirksamkeit verschiedener Anemonentoxine auf spannungssensitive Natriumkanäle wurden zwei verschiedene Zellpopulationen verwendet. Dies waren zum einen Neurone aus dem Rückenmark der Ratte (*DRG-Neurone*), die sich aufgrund ihrer großen Kanaldichte besonders für die Darstellung der Giftwirkung auf das Aktionspotential eigneten; zum anderen Neuroblastomzellen der Linie *N1E-115*, die für sämtliche weiteren Versuche sowohl im Cell-attached als auch im Whole-Cell Modus verwendet wurden. Diese Tumorzelllinie wird weltweit in vielen Labors als Modell der elektrisch erregbaren Nervenzelle verwendet (vgl. 2.2.1) und zeichnet sich durch ihre einfache Kultivierung und das gute Sealverhalten aus.

Ausgehend von einem Haltepotential (i.d.R.  $U_H = -80$  mV) konnten die Natriumkanäle über einen depolarisierenden Rechteckimpuls geöffnet werden, so daß ein transienter  $Na^+$ -Einwärtsstrom durch die Kanäle floß. Einen derartigen Rechteckreiz und den entsprechenden typischen Verlauf einer Ganzzelleableitung in Ringerlösung mit Tetraethylammonium-Iodid ( $TEA^+$ ) beschreibt die Abbildung 3.1. Zugabe von  $TEA^+$  diente der Blockade von Kalium-Kanälen.

Anhand der Stromregistrierung erkennt man zunächst eine rasche Zunahme des



$Na^+$ -Einstromes mit Beginn der Depolarisation (*Aktivierung*), anschließend ein deutliches Abklingen des Stromes nach Durchlaufen eines Maximums. Bereits nach wenigen Millisekunden passierten kaum noch  $Na^+$ -Ionen die Zellmembran. Das Ab-

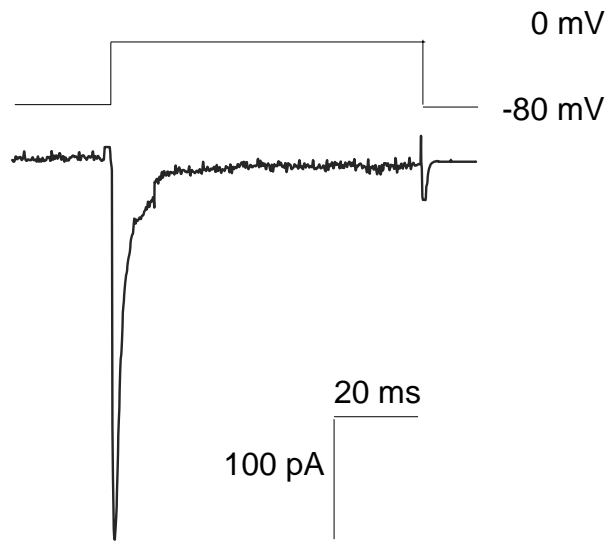


Abbildung 3.1: Ganzzelleableitung einer Neuroblastomzelle des  $Na^+$ -Einwärtsstroms in Ringerlösung während einer Depolarisation des Membranpotentials von  $U_M = -80 \text{ mV}$  auf  $U_M = 0 \text{ mV}$ . Impulsdauer:  $70 \text{ ms}$ ; Kaliumkanäle blockiert durch  $TEA^+$  und  $CsCl$ ; Temperatur  $19^\circ \text{C}$ .

klingen des Stromes bzw. der Verlauf dieser *Inaktivierung* hängt mit dem Schließen der  $Na^+$ -Kanäle durch den Inaktivierungsmechanismus bei anhaltender Depolarisation zusammen. Die Inaktivierung setzt gleichzeitig mit der Aktivierung ein und bewirkt aufgrund ihrer langsameren Kinetik die Abnahme des  $Na^+$ -Stromes. Auf den Verlauf dieses Stromflusses, der durch die Gleichung 2.4 in Kapitel 2.3.5 beschrieben wird und auf dessen Stärke bzw. Amplitude ( $\hat{I}_{Na_{Max}}$ ) unter Einwirkung verschiedener Toxine und in Abhängigkeit vom Membranpotential ( $U_M$ ) soll im folgenden näher eingegangen werden.

### 3.1.1 Strom-Spannungs Beziehung

#### Kontrollversuche

Für die Untersuchung der Potentialabhängigkeit spannungssensitiver Natriumkanäle wurden in dieser Arbeit Ganzzelleableitungen bei sieben verschiedenen Membranpotentialen zwischen  $-30$  und  $+30$   $mV$  an den Neuroblastomzellen vorgenommen. Abbildung 3.2 zeigt exemplarisch an vier Originalregistrierung die Potentialabhängigkeit des  $Na^+$ -Stroms.

An diesen Registrierungen war von besonderem Interesse die Amplitude des Na-

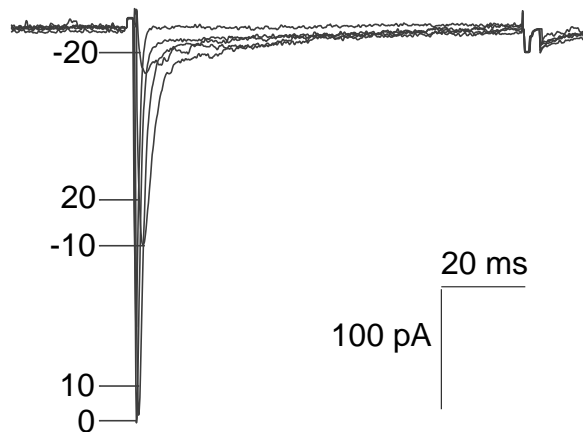


Abbildung 3.2: Potentialabhängigkeit des  $Na^+$ -Stroms einer Neuroblastomzelle. Ganzzelleableitung in Ringerlösung mit  $TEA^+$  bei  $U_M = -20, -10, 0, 10, 20$   $mV$  während eines  $70$   $ms$  dauernden Impulses. Die Positionierung der  $U_M$ -Werte entspricht der Amplitude des jeweiligen Natriumspitzenstromes ( $\hat{I}_{Na_{Max}}$ ).

triumspitzenstroms ( $\hat{I}_{Na_{Max}}$ ), sowie das dazugehörige Membranpotential. Hierbei steigt zunächst mit zunehmender Depolarisation  $\hat{I}_{Na_{Max}}$  bis zu einem Potential von  $U_M = 0$   $mV$  an und fällt bei weiterer Depolarisation wieder ab. Die Spitzenströme einer größeren Stichprobe als Mittelwerte ( $\pm S.E.M.$ ) gegen das entsprechende Potential  $U_M$  aufgetragen, zeigt Abbildung 3.3 einer sog. *Strom-Spannungs-Kurve*. Diese zeigt einen *U-förmigen* Verlauf, deren Maximum im Bereich eines Membranpotentials von  $U_M = 0$   $mV$  liegt. Die Abnahme des  $Na^+$ -Einstroms erfolgt aufgrund der abnehmenden treibenden Kraft gemäß der Beziehung:  $I_{Na} = g_{Na} (E - E_{Na})$ .

Aufgrund der unterschiedlich starken Gesamtströme der untersuchten Zellen wurde bei jeder Zelle der Natriumstrom ins Verhältnis zum jeweiligen Spitzenstrom gesetzt ( $\frac{I_{Na}}{I_{NaMax}}$ ), somit *normiert*, so daß es möglich war, mit diesem Quotienten die entsprechenden Mittelwertsberechnungen durchzuführen.

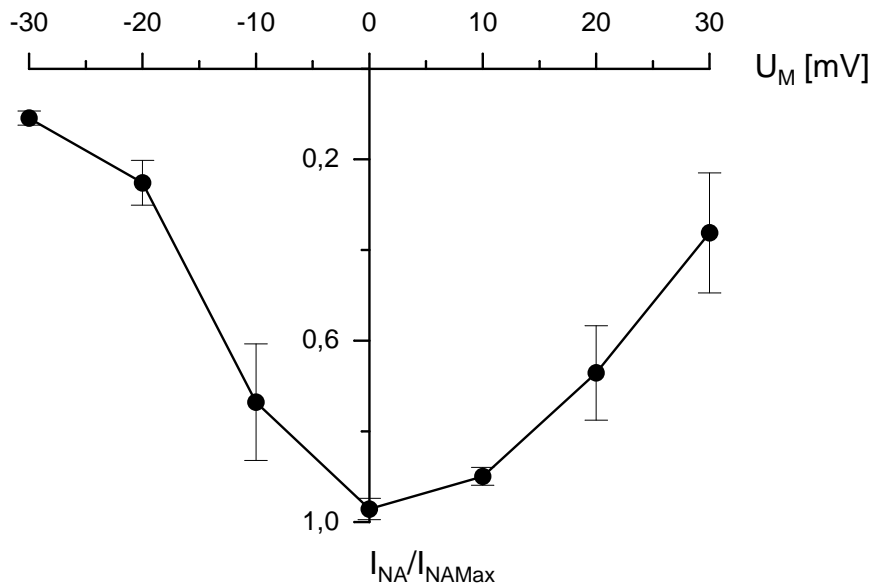


Abbildung 3.3: Strom-Spannungskurve ( $\pm S.E.M.$ ) von Ganzzelleableitungen an Neuroblastomzellen. Dargestellt ist der *normierte*  $Na^+$ -Spitzenstrom ( $I_{Na}/I_{NaMax}$ ) als Funktion des Membranpotentials ( $U_M$ ). Ringerlösung mit  $TEA^+$  ( $n = 5$ ). Die Positionierung der  $U_M$ -Werte entspricht dem jeweiligen Natriumspitzenstrom ( $\hat{I}_{NaMax}$ ).

### Toxinapplikation

Insgesamt konnten fünf verschiedene, sequenzierte Fraktionen der Seeanemonen *Anthopleura elegantissima* (*APE 1-1*, *APE 1-2*, *APE 2-1*, *APE 5-3*) und *Anemonia sulcata* (*ATX II*) an den Neuroblastomzellen getestet werden. Die Applikation der Toxine erfolgte in Anlehnung an frühere Arbeiten (ULBRICHT & SCHMIDTMAYER, 1981; AFRA, 1998) in einer Konzentration von  $5 \mu g/ml$  (vgl. 3.1.7). Abbildung 3.4 verdeutlicht den Unterschied des  $Na^+$ -Stromverlaufs anhand einer Ganzzelleableitung ( $U_M = 0 mV$ ) vor und nach Behandlung mit zwei verschiedenen Toxinen (*APE 1-1*,

*APE 1-2*). Die Modifizierung des Natriumkanals durch die Toxine verändert kaum die Aktivierungskinetik, beeinflusst jedoch deutlich die Inaktivierung. Wie bereits zuvor gezeigt, ist eine vollständige Inaktivierung bei der Kontrollmessung bereits nach ca. 10 *ms* zu erkennen. Toxingabe hingegen bewirkt eine unvollständige Inaktivierung, so daß auch am Ende des Impulses weiterhin ein transienter  $Na^+$ -Strom zu erkennen ist. Bezüglich dieses *persistierenden* Anteils ( $I_{Pers}$ ) bestehen Unterschiede zwischen den jeweiligen Fraktionen. Nach Applikation von *APE 1-2* verdoppelt sich dieser Anteil nahezu im Vergleich zu *APE 1-1*. Bei beiden Toxinen erreicht der  $Na^+$ -Strom erst nach ca. 40 *ms* das stationäre Niveau.

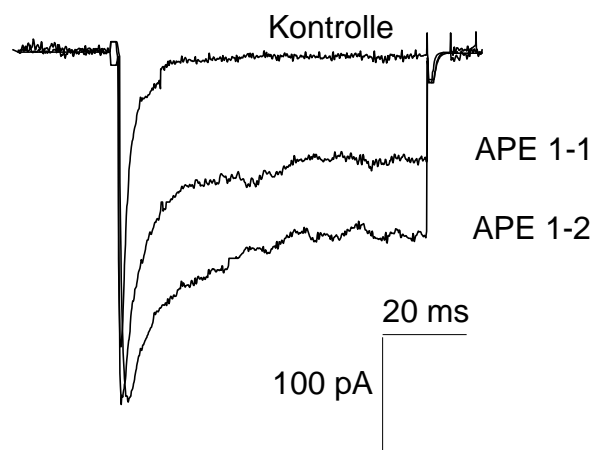


Abbildung 3.4: Verlauf des  $Na^+$ -Stroms vor und nach Behandlung mit Anemonentoxin *APE 1-1* und *APE 1-2* ( $5 \mu g/ml$ ). Ganzzellableitung während eines 70 *ms* Impulses an derselben Zelle in Ringerlösung mit  $TEA^+$  ( $U_M = 0 mV$ ).

Da im weiteren Verlauf dieser Arbeit genauer auf die Wirkung der verschiedenen Toxine auf den Natrium-Spitzenstrom ( $\hat{I}_{Na_{Max}}$ ) und die Inaktivierung bzw. die unvollständige Inaktivierung eingegangen wird, werden diese mit  $I_{Peak}$  (Spitzenstrom) und  $I_{Pers}$  (Persistenz) bezeichnet.

### Potentialabhängigkeit

Das Verhalten des Gesamt-Natriumstroms auf unterschiedliche Membranpotentiale

nach Gabe von Anemonentoxin *APE 5-3* zeigt die Abbildung 3.5. Wie bereits zuvor in Abbildung 3.2 ist eine potentialabhängige Zu- und Abnahme des Spitzenstroms ( $I_{Peak}$ ) zu erkennen. Im Gegensatz zu den Kontrollregistrierungen kommt es jedoch nach Toxinapplikation zu einer unvollständigen Inaktivierung, die in ihrer Potentialabhängigkeit Unterschiede bezüglich des Maximalwertes zum Spitzenstrom aufweist ( $I_{Peak_{Max}} \approx -10 \text{ mV}$ ;  $I_{Pers_{Max}} \approx 10 \text{ mV}$ ).

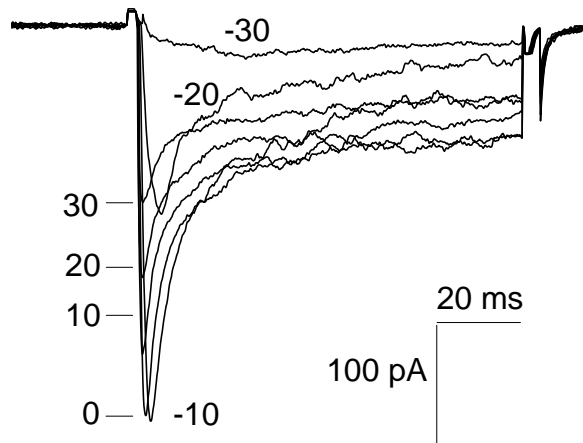


Abbildung 3.5: Potentialabhängigkeit des  $Na^+$ -Stroms einer Neuroblastomzelle nach Applikation von Anemonentoxin *APE 5-3* ( $5 \mu\text{g/ml}$ ). Ganzzellableitung während eines  $70 \text{ ms}$  Impulses an derselben Zelle in Ringerlösung mit  $TEA^+$ .

Diese Unterschiede bezüglich des persistierenden und des Spitzenstromes zeichnen sich deutlicher in der Strom-Spannungskurve (Abb. 3.6) ab, in der die Mittelwerte ( $\pm$  S.E.M.) einer größeren mit *APE 5-3* behandelten Stichprobe bei Membranpotentialen von  $U_M = -30 \text{ mV}$  bis  $U_M = 40 \text{ mV}$  dieser beiden Komponenten gegeneinander aufgezeichnet sind. Dabei durchläuft die Kurve des maximalen  $Na^+$ -Einstroms ( $I_{Peak}$ ) ein Maximum bei  $U_M = 10 - 20 \text{ mV}$ . Für  $I_{Pers}$  hingegen liegt das Maximum erst bei einem Membranpotential von  $U_M \approx 30 \text{ mV}$ . Aufgrund dieser Maximalwertverschiebung zwischen  $I_{Peak}$  und  $I_{Pers}$  kommt es zu einem Überkreuzen zwischen beiden Kurven. Abbildung 3.7 verdeutlicht dieses sog. *crossing over* anhand der Originalregistrierungen bei den Potentialen  $U_M = 10 \text{ mV}$  und  $U_M = 20 \text{ mV}$ . Bei

einem nur geringfügig veränderten  $Na^+$ -Spitzenstrom erfährt der dazugehörige persistierende Strom eine Zunahme von ca. 20% zwischen diesen beiden Potentialen.

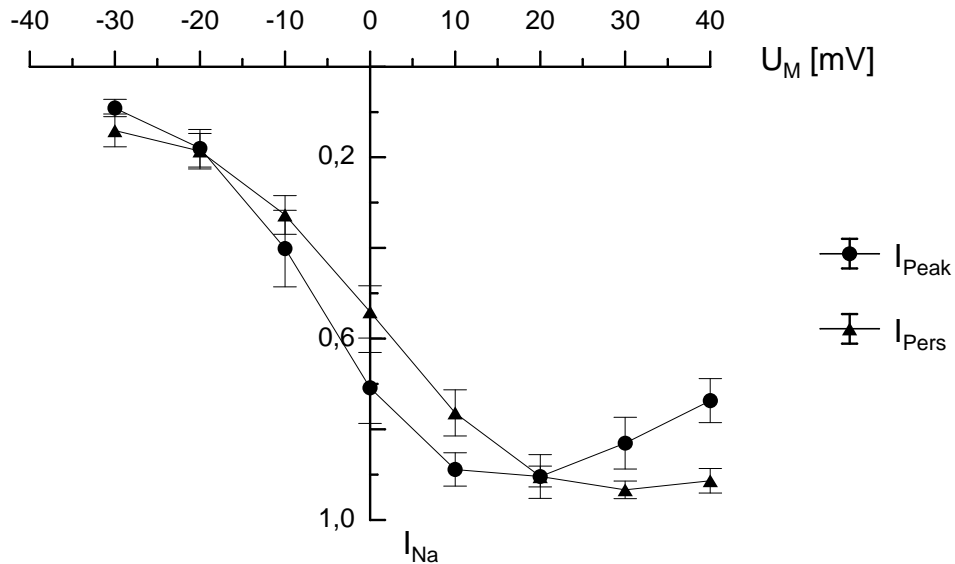


Abbildung 3.6: Strom-Spannungskurve ( $\pm S.E.M.$ ) von Ganzzellableitungen an Neuroblastomzellen nach Applikation von Anemonentoxin *APE 2-1* ( $5 \mu g/ml$ ). Dargestellt ist der *normierte*  $Na^+$ -Spitzenstrom ( $I_{Peak}$ ) und der persistierende Anteil ( $I_{Pers}$ ) als Funktion des Membranpotentials ( $U_M$ ). Ringerlösung mit  $TEA^+$  ( $n = 8$ ).

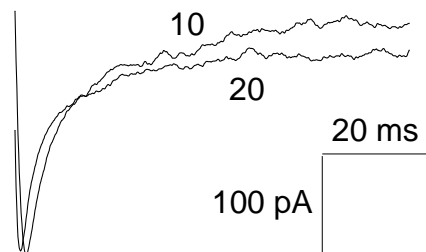


Abbildung 3.7: Darstellung des *crossing overs* am  $Na^+$ -Strom einer Neuroblastomzelle nach Applikation des Anemonentoxins *APE 2-1* ( $5 \mu g/ml$ ) bei Membranpotentialen von  $10 mV$  und  $20 mV$ .

### Maximaler Natriumstrom

Wie bereits erläutert, zeigt der Natrium-Spitzenstrom ( $I_{Peak}$ ) eine starke Abhängigkeit vom vorhandenen Membranpotential ( $U_M$ ). Dabei passieren bei  $U_M = 0 \text{ mV}$  die meisten Natrium-Ionen die unbehandelte Zellmembran (vgl. 3.3). Unter Gifteinwirkung kommt es bei einigen Fraktionen zu einer Verschiebung dieses Maximums. Besonders deutlich ist dies in der Tabelle 3.1.1 an der Fraktion *APE 2-1* zu erkennen, bei der der maximale transiente Stromwert bei  $U_M = 20 \text{ mV}$  liegt. Nach Applikation von *APE 5-3* hingegen kommt es bei einem Membranpotential von  $U_M = -10 \text{ mV}$  zum größten Natriumeinstrom. Die übrigen Fraktionen (*APE 1-1*; *APE 1-2*; *ATX II*) bewirken nur geringe Veränderungen bezüglich der Potentialabhängigkeit des Spitzenstromes zur Kontrolle.

Tabelle 3.1: Normierte Natrium-Spitzenströme ( $\pm S.E.M.$ ) in Abhängigkeit vom Membranpotential ( $U_M$  [mV]) unter Einwirkung verschiedener Anemontoxine ( $5 \mu\text{g/ml}$ ). Ganzzelleableitungen in Ringerlösung.

$U_M$	Kontrolle	APE 1-1	APE 1-2	APE 2-1	ATX II	APE 5-3
-30	$0.11 \pm 0.01$	$0.15 \pm 0.03$	$0.29 \pm 0.05$	$0.09 \pm 0.02$	$0.26 \pm 0.02$	$0.10 \pm 0.04$
-20	$0.25 \pm 0.01$	$0.34 \pm 0.06$	$0.63 \pm 0.05$	$0.18 \pm 0.04$	$0.57 \pm 0.06$	$0.55 \pm 0.04$
-10	$0.74 \pm 0.04$	$0.60 \pm 0.07$	$0.90 \pm 0.03$	$0.40 \pm 0.08$	$0.85 \pm 0.05$	<b><math>0.94 \pm 0.03</math></b>
0	<b><math>0.97 \pm 0.1</math></b>	<b><math>0.90 \pm 0.04</math></b>	<b><math>0.97 \pm 0.01</math></b>	$0.71 \pm 0.04$	<b><math>0.98 \pm 0.01</math></b>	$0.93 \pm 0.03$
10	$0.90 \pm 0.02$	$0.90 \pm 0.03$	$0.81 \pm 0.03$	$0.89 \pm 0.04$	$0.89 \pm 0.05$	$0.66 \pm 0.06$
20	$0.67 \pm 0.02$	$0.70 \pm 0.06$	$0.56 \pm 0.04$	<b><math>0.90 \pm 0.05</math></b>	$0.69 \pm 0.06$	$0.38 \pm 0.09$
30	$0.36 \pm 0.08$	$0.53 \pm 0.06$	$0.44 \pm 0.04$	$0.83 \pm 0.06$	$0.55 \pm 0.08$	$0.26 \pm 0.06$
n	5	15	11	10	6	8

$n$  entspricht der Anzahl der Versuche. Hervorgehoben: Maxima der einzelnen Fraktionen.

### Persistierender Stromanteil

Sämtliche untersuchten Fraktionen veränderten die Kinetik der Natriumströme und verhinderten bei anhaltender Depolarisation eine vollständige Inaktivierung. Der

auftretende persistierende Stromanteil ( $I_{Pers}$ ) wurde ebenfalls wie der Spitzenstrom  $I_{Peak}$  ausgemessen und normiert. Die Tabelle 3.2 zeigt, wie bereits in Abbildung 3.5 zu erkennen ist, daß  $I_{Pers}$  ebenfalls eine Abhängigkeit zum Membranpotential  $U_M$  aufweist. Bei allen Fraktionen konnte anhand der Originalregistrierungen, aufgrund des maximalen, persistenten Natriumstromes bei positiveren Membranpotentialen als  $I_{Peak}$ , ein *crossing over* festgestellt werden.

Bezogen auf das Membranpotential weisen die maximalen Amplituden der beiden Stromkomponenten demnach folgenden Zusammenhang auf:  $U_{I_{PeakMax}} < U_{I_{PersMax}}$ .  $I_{PersMax}$  liegt für *APE 2-1* bei  $U_M = 30 \text{ mV}$ , für *APE 5-3* hingegen bei  $U_M = 0 \text{ mV}$ . Beide Fraktionen bewirken, genauso wie die anderen Fraktionen, eine Maximalwert-Verschiebung zwischen  $I_{Peak}$  und  $I_{Pers}$  von  $\Delta U_M \approx 10 \text{ mV}$  auf, d.h.  $I_{PersMax}$  für *APE 1-1* und *ATX II* liegt bei  $U_M = 10 \text{ mV}$ . Unter dem Einfluß von *APE 1-2* konnte diese Maximalwert-Verschiebung anhand der gemittelten Werte nicht festgestellt werden.

Tabelle 3.2: Normierte, persistente Natriumströme ( $\pm S.E.M.$ ) in Abhängigkeit vom Membranpotential ( $U_M$  [mV]) unter Einwirkung verschiedener Anemonentoxine ( $5 \mu\text{g/ml}$ ). Ganzzelleableitungen in Ringerlösung.

$U_M$	APE 1-1	APE 1-2	APE 2-1	ATX II	APE 5-3
-30	$0.32 \pm 0.07$	$0.40 \pm 0.04$	$0.17 \pm 0.04$	$0.20 \pm 0.05$	$0.08 \pm 0.05$
-20	$0.39 \pm 0.05$	$0.52 \pm 0.02$	$0.22 \pm 0.04$	$0.49 \pm 0.06$	$0.50 \pm 0.06$
-10	$0.53 \pm 0.06$	$0.76 \pm 0.04$	$0.34 \pm 0.04$	$0.70 \pm 0.05$	$0.81 \pm 0.03$
0	$0.68 \pm 0.05$	<b><math>0.93 \pm 0.03</math></b>	$0.54 \pm 0.06$	$0.86 \pm 0.03$	<b><math>0.96 \pm 0.03</math></b>
10	<b><math>0.89 \pm 0.03</math></b>	$0.92 \pm 0.02$	$0.76 \pm 0.05$	<b><math>0.96 \pm 0.03</math></b>	$0.84 \pm 0.06$
20	$0.86 \pm 0.04$	$0.85 \pm 0.04$	$0.90 \pm 0.02$	$0.91 \pm 0.04$	$0.72 \pm 0.1$
30	$0.87 \pm 0.04$	$0.75 \pm 0.04$	<b><math>0.93 \pm 0.02</math></b>	$0.82 \pm 0.03$	$0.59 \pm 0.09$
n	15	11	10	6	8

$n$  entspricht der Anzahl der Versuche.

Hervorgehoben: Maxima der einzelnen Fraktionen.



### Verhältnis $I_{Pers}/I_{Peak}$

Um einen Eindruck über das Ausmaß der Giftwirkung der einzelnen Fraktionen auf den  $Na^+$ -Strom zu gewinnen, werden in diesem Abschnitt der persistierende und der Spitzenstrom ins Verhältnis zueinander gesetzt. Dieser Anteil des persistierenden am maximalen  $Na^+$ -Strom ist ein Maß für die Wirkung der Gifte auf die Inaktivierung. Die Stärke der Giftwirkung ist hierbei direkt proportional zum ermittelten Quotienten. Abbildung 3.8 zeigt das Ausmaß der Wirkung für die einzelnen Fraktionen in Abhängigkeit von  $U_M$ .

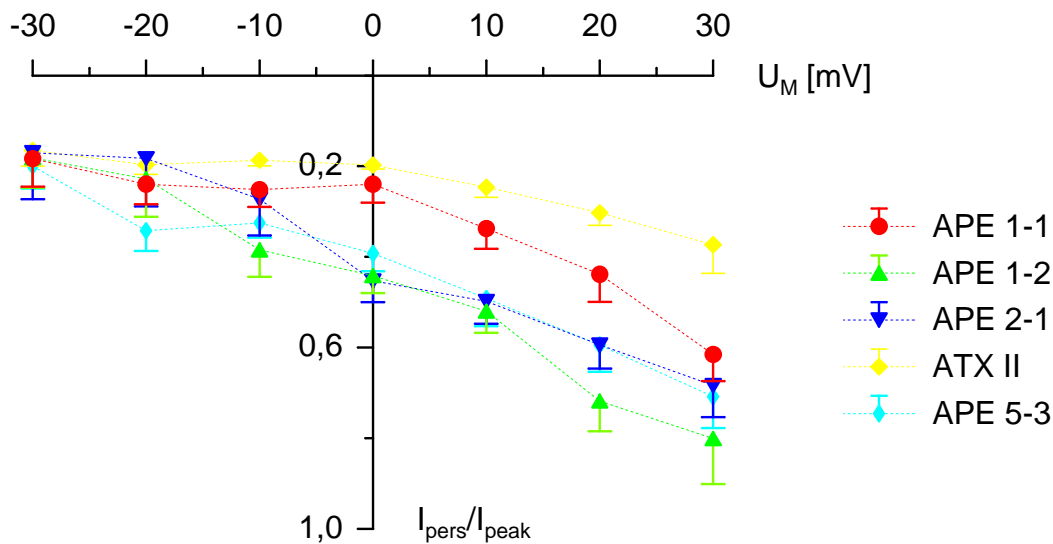


Abbildung 3.8: Verhältnis des persistierenden zum maximalen Natriumstrom ( $I_{Pers}/I_{Peak}$ ) in Abhängigkeit vom Membranpotential ( $U_M$ ) unter Einwirkung verschiedener Anemonentoxine ( $5 \mu g/ml$ ). Ganzzelleableitungen in Ringerlösung; normierte Stromamplituden ( $\pm S.E.M.$ ).

Mit Ausnahme von *ATX II*, bei dem dieser Quotient über einen weiten Spannungsbereich konstant bleibt und es nur zu einem geringen Abfall bei  $U_M \geq 0 \text{ mV}$  kommt, verdoppelt bis verdreifacht sich bei allen Fraktionen das Verhältnis  $I_{Pers}/I_{Peak}$  von  $U_M = -30 \text{ mV}$  auf  $U_M = 30 \text{ mV}$ . Von besonderem Interesse ist der Quotient bei  $U_M = 0 \text{ mV}$ , da in Ringerlösung für den  $Na^+$ -Strom  $I_{Peak} = I_{Peak_{Max}}$  gilt. Innerhalb dieses Potentials zeigen die Fraktionen *APE 1-1* und *ATX II* eine Wirkung von ca. 20%, die übrigen Fraktionen (*APE 1-2*; *APE 2-1*; *APE 5-3*) von ca. 40%. Unter

der Annahme einer Normalverteilung besteht bezüglich dieser Quotienten bei diesem Potential ein signifikanter Unterschied zwischen den Toxingruppen *APE 1-1/ATX II* und *APE 1-2/APE 2-1/APE 5-3* (ANOVA mit anschließendem *Scheffé*-Test,  $p < 0.05$ ).

### 3.1.2 Diphasische Inaktivierung

In Anlehnung an ein Modell von CHIU (1977) zur Berechnung der Inaktivierungskinetik wird der Verlauf der Inaktivierung durch die zweifach exponentielle Funktion 2.4 in Kapitel 2.3.5 wiedergegeben. Dabei dienen die fünf charakteristischen Größen dieser Formel, die beiden Zeitkonstanten  $\tau_0$  und  $\tau_1$ , die auf  $t = 0$  extrapolierten Stromkomponenten  $I_0$  und  $I_1$ , sowie die konstante Stromkomponente  $I_2$  als Parameter der Inaktivierung, wobei  $I_0 + I_1 + I_2 = 1$ . Normalerweise ist  $I_2$  verschwindend gering, unter Gifteinwirkung gewinnt dieser Anteil an Bedeutung und stellt den persistierenden Stromanteil dar. Durch die Anpassung dieser zweifach exponentiellen Funktion an die Stromkomponenten des transienten  $Na^+$ -Einwärtsstromes sollen im folgenden die fünf Parameter des diphasischen Inaktivierungsverlaufes ermittelt werden.

Wie bereits anhand der Abbildung (3.5) zu erkennen ist, bewirkt die Applikation von Anemontoxinen eine Abnahme und Verlangsamung der Inaktivierung des  $Na^+$ -Stroms. Demnach erfolgt eine Veränderung in der Inaktivierungskinetik und somit auch der genannten Parameter.  $\tau_0$  beschreibt die anfängliche, schnelle Abnahme des Maximalstroms;  $\tau_1$  dessen nachfolgende asymptotische Annäherung an das persistierende Stromniveau.  $I_0$  und  $I_1$  beschreiben die entsprechenden Stromanteile für die jeweiligen Konstanten. Die Abbildungen 3.9 und 3.10 zeigen die Abhängigkeit dieser beiden Zeitkonstanten vom Membranpotential in Ringerlösung und unter Gifteinwirkung. Dabei verkürzen sich für die Kontrollversuche mit zunehmender Depolarisation sowohl  $\tau_0$  als auch  $\tau_1$ . Die entsprechenden Stromanteile (vgl. Anhang) verhalten sich reziprok zueinander, d.h. der Anteil für die schnelle Konstante nimmt

ab, der für die langsame zu. Mit durchschnittlich 95% hat  $\tau_0$  dabei den größeren Anteil ( $\tau_1 \approx 5\%$ ). Eine persistierende Komponente ( $I_2$ ) konnte für die Kontrollversuche nicht ermittelt werden.

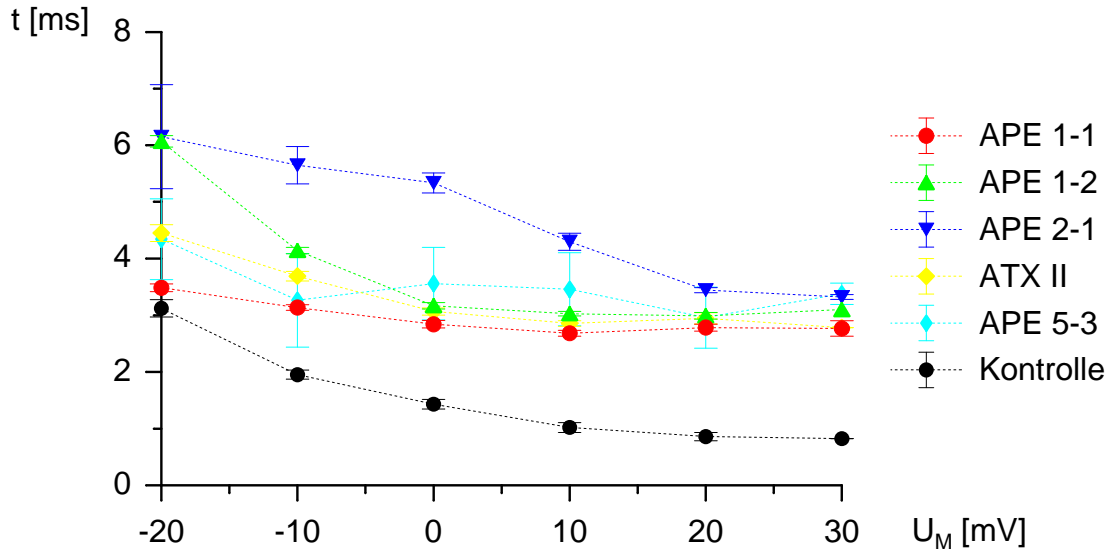


Abbildung 3.9: Abhängigkeit der schnellen Zeitkonstante  $\tau_0$  ( $\pm$  S.E.M.) vom Membranpotential ( $U_M$ ) unter Einwirkung verschiedener Anemonentoxine ( $5 \mu\text{g/ml}$ ). Ganzzellableitungen in Ringerlösung.

Nach Behandlung der Zellen mit Anemonentoxinen verändern sich sämtliche Parameter der Exponentialfunktion. Durch das Auftreten eines persistierenden Stroms, gewinnt dieser Anteil ( $I_2$ ) in Abhängigkeit vom Gift an Bedeutung. Doch auch der Stromanteil der langsamen Zeitkonstante  $\tau_1$  erhöht sich bei sämtlichen Fraktionen ( $\emptyset \approx 15\%$ ), die Anteile der schnellen Konstante  $\tau_0$  hingegen verringern sich bis zu 50% (*APE 2-1*;  $U_M = 30 \text{ mV}$ ). Bei den Fraktionen mit einem persistierenden Anteil von über 30% (*APE 1-2*, *APE 2-1*, *APE 5-3*) nimmt  $I_0$  mit zunehmender Depolarisation ab, die Fraktionen mit einem persistierenden Anteil von ca. 20% (*APE 1-2*, *ATX II*) zeigen diese Tendenz nicht ( $I_0 \approx 65\%$ ). Der Anteil  $I_1$  der langsamen Konstante verhält sich bei fast allen Toxinen über weite Bereiche des Membranpotentials relativ konstant ( $\emptyset 15 - 20\%$ ).

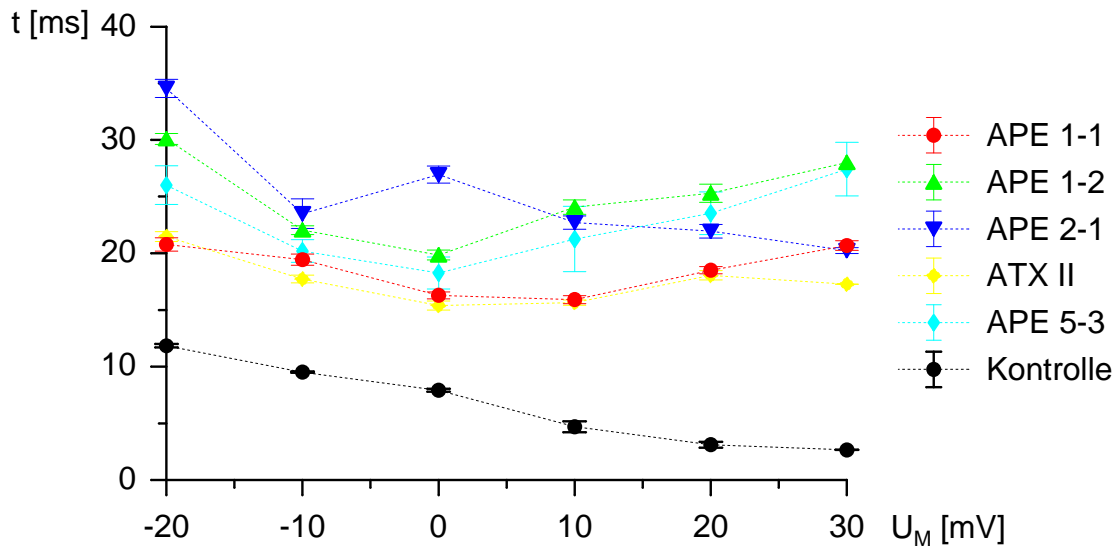


Abbildung 3.10: Abhängigkeit der langsamen Zeitkonstante  $\tau_1$  ( $\pm$  S.E.M.) vom Membranpotential ( $U_M$ ) unter Einwirkung verschiedener Anemonentoxine ( $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ). Ganzzellableitungen in Ringerlösung.

Die Zeitkonstanten  $\tau_0$  und  $\tau_1$  vergrößern sich nach Toxingabe bei allen Fraktionen im Vergleich zur Kontrolle, wobei  $\tau_0$  mit zunehmender Depolarisation abnimmt und nur bei Membranpotentialen von  $U_M \geq 20 \text{ mV}$  bei den Toxinen *APE 1-2* und *APE 5-3* wieder ansteigt.  $\tau_1$  durchläuft bei allen Fraktionen ein Maximum, welches bei *APE 1-2*, *ATX II* und *APE 5-3* bei  $U_M = 0 \text{ mV}$  und für *APE 1-1* und *APE 2-1* bei  $U_M \geq 10 \text{ mV}$  liegt.

### 3.1.3 Stationäre Inaktivierung

Wie im vorausgegangenen Kapitel beschrieben, variieren die Parameter des diphasischen Exponentialverlaufes in Abhängigkeit vom Membranpotential. Sie sind demnach momentane Funktionen von  $U_M$ . Diese Funktion entspricht dem zeitlichen Verlauf der Inaktivierung des  $Na^+$ -Stroms. Die Aktivierung  $m_{(t)}$  (vgl. 3.1.5) verläuft im Vergleich zur Inaktivierung  $h_{(t)}$  sehr viel rascher und ist bald nach Erreichen des

Spitzenstromwertes abgeschlossen. Zum Zeitpunkt des maximalen Natriumstroms sind für jedes Potential eine maximale Anzahl an Kanälen geöffnet. Wird das Membranpotential verändert, stellt sich nach Durchlaufen der Aktivierung und der anschließenden Inaktivierung ein neues Gleichgewicht ein. Um die Kanäle aus diesem inaktivierten Zustand wieder herauszuholen, muß die Inaktivierung durch einen hyperpolarisierenden Impuls aufgehoben werden, so daß  $h_\infty = 1$  ist und sämtliche Kanäle wieder aktivierbar, bzw. nicht-inaktiv, sind. Diese Aufgabe erfüllte im Experiment ein Vorimpuls, der lang genug war, um sämtliche Kanäle wieder aktivierbar zu machen. Der anschließende Testimpuls erzeugte daraufhin wieder den bekannten  $Na^+$ -Stromverlauf mit Aktivierungs- und Inaktivierungsphase. Wird die Höhe des Vorimpulses  $V_{pp}$  (Dauer 50 ms) variiert, kann überprüft werden, wieviele Kanäle nach Ende des Vorimpulses noch aktivierbar, also nicht-inaktiv, sind. Diese Öffnungswahrscheinlichkeit stellt sich über den meßbaren, maximalen Natriumstrom ( $I_{peak}$ ) im Testpotential konstanter Dauer (30 ms) und Stärke ( $V_t = 80 mV$ ) dar. Inaktivierungskurven beschreiben genau diesen Zusammenhang zwischen  $I_{peak}$  und dem systematisch ansteigenden Vorpotential  $V_{pp}$ . Abbildung 3.11 zeigt Inaktivierungskurven von Experimenten in Ringerlösung und nach Toxin-Applikation. Es handelt sich hierbei um normierte Spitzenströme (ohne Einheit), die als Maß für die Potentialabhängigkeit von  $h_\infty$  angesehen werden können ( $h_\infty = \frac{I_t(V_{pp})}{I_t(-80)}$ ). Das Potential von  $h_\infty = 1$  entspricht der zuvor anhand der Strom-Spannungskurve ermittelten maximalen Amplitude  $I_{peak_{Max}}$  bei einem Haltepotential von  $U_H = -80 mV$  (vgl. 3.1.1).

Ausgehend von einer 100%igen Öffnungswahrscheinlichkeit zeigt der Verlauf der gemittelten Meßwerte ( $\pm$  S.E.M.) der Kontrollexperimente eine typische *hyperbolische* Kurve (verbundene Werte). Bei Potentialen  $V_{pp} < -120 mV$  ist die Inaktivierung völlig aufgehoben ( $h_\infty = 1$ ), bei Potentialen  $V_{pp} > 30 mV$  nahezu vollständig ( $h_\infty = 0$ ). Die Kurve durchläuft den  $h_{\infty \frac{1}{2}}$ -Bereich bei  $V_{pp} \approx -75 mV$ . Ganz anders verhalten sich die Inaktivierungskurven nach Toxin-Applikation. Unter Gifteinwirkung kommt es zu keiner vollständigen Inaktivierung ( $h_\infty > 0$ );  $h_\infty$  wird

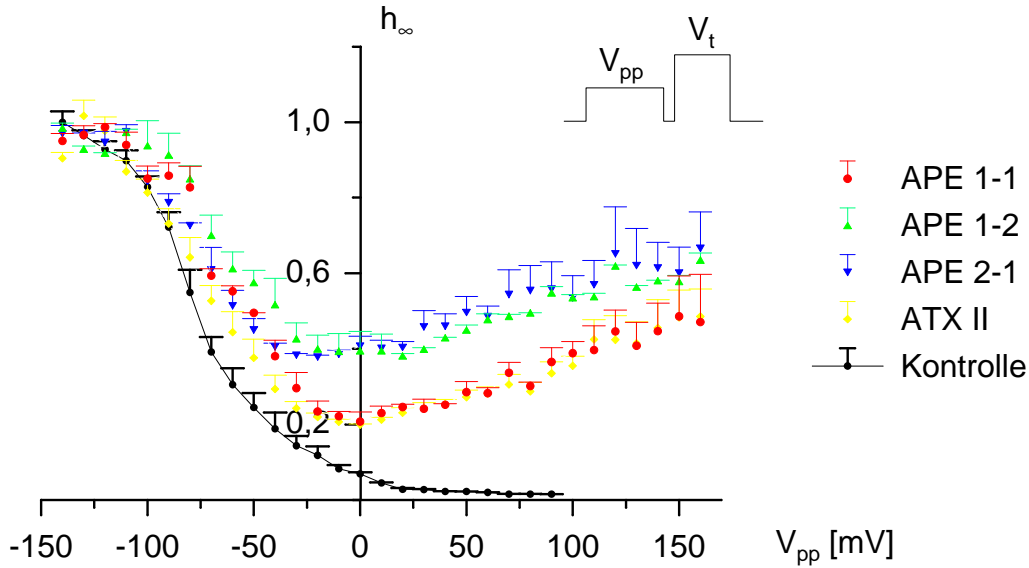


Abbildung 3.11: Inaktivierungskurven in Ringerlösung (schwarz, verbunden) und nach Behandlung mit Anemonentoxinen ( $5 \mu\text{g/ml}$ ). Die Kurven bezeichnen Wahrscheinlichkeiten des offenen Inaktivierungszustandes.  $V_{pp}$ : Vorpotential;  $h$ : normierte Öffnungswahrscheinlichkeiten ( $h_\infty = \frac{I_t(V_{pp})}{I_t(-80)}$ ); Dauer der Impulse:  $V_{pp} = 50 \text{ ms}$ ;  $V_t = 30 \text{ ms}$ ; Zwischenimpuls =  $0.2 \text{ ms}$ . Haltepotential:  $-80 \text{ mV}$ .

sogar mit schrittweiser Depolarisation wieder größer. Der angepaßte Kurvenverlauf weicht vom monotonen, *hyperbolischen* Verlauf der Kontrollkurve ab. Zudem kommt es zu einer Rechtsverschiebung der Kurven zu positiveren Potentialen, so daß  $h_{\infty_{\frac{1}{2}}} > -75 \text{ mV}$  ist.

Die Inaktivierungskurven sämtlicher Fraktionen durchlaufen ein Minimum bei  $V_{pp} \approx 0 \text{ mV}$ , wobei die beiden Fraktionen *APE 1-1* und *ATX II* bei diesem Potential einen  $h_\infty$ -Wert von ca. 20% aufweisen (*APE 1-1*:  $h_{\infty_{0\text{mV}}} = 0.21 \pm 0.03$ ; *ATX II*:  $h_{\infty_{0\text{mV}}} = 0.19 \pm 0.01$ ). Bei den Fraktionen *APE 1-2* und *APE 2-1* hingegen liegt der  $h_\infty$ -Wert bei ca. 40% (*APE 1-2*:  $h_{\infty_{10\text{mV}}} = 0.38 \pm 0.01$ ; *APE 2-1*:  $h_{\infty_{-10\text{mV}}} = 0.37 \pm 0.01$ ).

### 3.1.4 Aufhebung der Inaktivierung

Durch eine genügend starke Hyperpolarisation können, wie in Abschnitt 3.1.3 beschrieben, die  $Na^+$ -Kanäle vom inaktiven in den aktivierbaren Zustand zurückgeholt werden. Diese *Aufhebung der Inaktivierung* sollte, aufgrund der Kinetik der beiden Tore  $h$  und  $m$ , mit der gleichen Geschwindigkeit wie der Verlauf der Inaktivierung ablaufen. Mit Hilfe zweier aufeinanderfolgender Testimpulse gleicher Stärke, unterbrochen durch einen Repolarisationsimpuls variierender Dauer  $\Delta t$ , kann untersucht werden, wieviele  $Na^+$ -Kanäle nach der entsprechenden Aufhebungsdauer wieder aktivierbar bzw. nicht mehr inaktiv sind.

Die Ergebnisse aus einer Kombination dieser Impulse zeigt die Abbildung 3.12. Hierbei wurden die  $Na^+$ -Spitzenströme  $I_{peak_{Max}}$  während des zweiten Testimpulses  $b$  ausgemessen, normiert ( $I_p/I_{p,t \rightarrow \infty}$ ) und gegen die Dauer  $\Delta t$  des variierenden Repolarisationsimpulses aufgetragen. Der erste Testimpuls  $a$  brachte die  $Na^+$ -Kanäle in die Inaktivierung, die durch den hyperpolarisierenden Reiz ( $U_{MR} = -80 \text{ mV}$ ) wieder aufgehoben wurde.  $I_{peak_{Max}}$  des zweiten Testimpulses entsprach demnach der statischen Anzahl erneut aktivierbarer  $Na^+$ -Kanäle. Das Membranpotential während der Testimpulse lag bei  $U_{MT} = 0 \text{ mV}$ . Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf eine Darstellung inklusive der Standardfehler ( $\pm S.E.M.$ ) verzichtet. Sämtliche Daten dieser Abbildung können im Anhang eingesehen werden.

Bezüglich dieser maximalen Aktivierbarkeit können nach einem hyperpolarisierenden Impuls  $\Delta t \geq 40 \text{ ms}$  sowohl in Ringerlösung als auch unter Gifteinwirkung nahezu 100% der  $Na^+$ -Kanäle aus dem inaktiven in den aktivierbaren Zustand gebracht werden ( $I_p/I_{p,t \rightarrow \infty} \geq 90\%$ ). Unterhalb dieses Zeitintervalls sinkt die Anzahl nicht-inaktiver Kanäle in Abhängigkeit vom Hyperpolarisationsintervall je nach Substanz in unterschiedlich großem Maße. Dabei wird der  $I_p/I_{p,t_{\frac{1}{2}}}$  für die Kontrollversuche nach  $\Delta t \leq 10 \text{ ms}$  und für die Anemontoxine nach  $\Delta t \leq 8 \text{ ms}$  erreicht. Entsprechend dieser Unterschiede beschreiben die Werte für die Kontrolle einen weniger steilen Kurvenverlauf als unter Gifteinwirkung. Dieser Unterschied

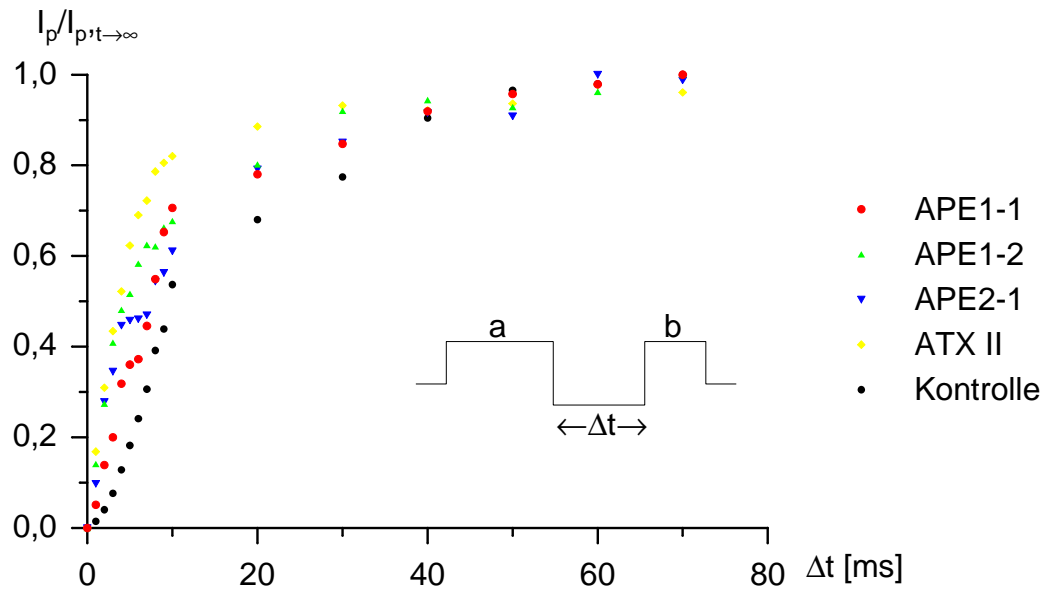


Abbildung 3.12: Aufhebung der Inaktivierung in Ringerlösung (Kontrolle) und nach Behandlung mit Anemonentoxinen ( $5 \mu\text{g/ml}$ ). Die Werte bezeichnen Wahrscheinlichkeiten des aktivierbaren Zustandes (normiert) in Abhängigkeit von der Dauer der Repolarisation ( $\Delta t$ ). Ruhemembranpotential:  $-80 \text{ mV}$ ; Dauer der Impulse:  $a = 40 \text{ ms}$ ,  $b = 20 \text{ ms}$ .

äußert sich besonders bei einem hyperpolarisierenden Impuls von  $\Delta t = 10 \text{ ms}$ , bei dem der Wert für die Kontrolle bei  $I_p/I_{p,t} = 0.54 \pm 0.07$  und für das Toxin *ATX II* bei  $I_p/I_{p,t} = 0.82 \pm 0.02$  liegt. Die übrigen Fraktionen bewirken in diesem Zeitintervall eine Aufhebung der Inaktivierung im Bereich zwischen 61% (*APE 2-1*:  $I_p/I_{p,t} = 0.61 \pm 0.12$ ) und 70% (*APE 1-1*:  $I_p/I_{p,t} = 0.71 \pm 0.08$ ).

### 3.1.5 Aktivierung

Nach vollständiger Aufhebung der Inaktivierung befindet sich das Inaktivierungstor  $h$  im geöffneten und das Aktivierungstor  $m$  im geschlossenen Zustand. Durch einen Spannungsimpuls ausreichender Stärke öffnet sich das Aktivierungstor und es kommt zu einem Einstrom an  $\text{Na}^+$ -Ionen in die Zelle. Dieser Prozeß wird als *Aktivierung* bezeichnet. Etwas verzögert beginnt das Inaktivierungstor sich zu schließen



und die Inaktivierung setzt ein. Die Aktivierung ist zu dem Zeitpunkt noch nicht abgeschlossen, so daß beide Prozesse sich überlagern.

Als Parameter für den Prozeß der Aktivierung wird die Zeit, die vom Beginn des Spannungsreizes bis zum Erreichen des Spitzenstromes ( $I_{peak}$ ) verstreicht, verwendet. Diese sog. *time to peak* oder *mittlere Latenzzeit* wird in Abbildung 3.13 in Ringerlösung und für die einzelnen Anemonentoxine dargestellt. Dabei zeigt sich für die Kontrolle, daß in Abhängigkeit vom Membranpotential es zu einer Abnahme dieser Zeitkonstanten bzw. Zunahme der Aktivierungskinetik kommt ( $U_M = -20\text{ mV}$ ;  $ttp = 2.96 \pm 0.79\text{ ms}$   $\rightarrow$   $U_M = 20\text{ mV}$ ;  $ttp = 0.72 \pm 0.15\text{ ms}$ ).

Bezüglich der Wirkung der Toxine *APE 1-2* und *APE 5-3* weisen die Werte in-

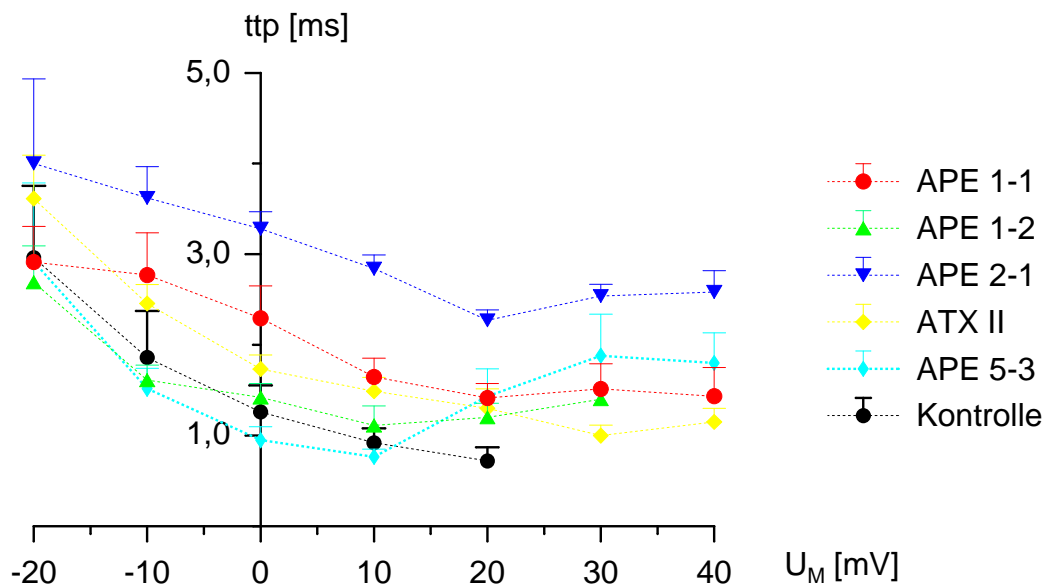


Abbildung 3.13: *Time to peak* ( $ttp$ ) während der Aktivierung von  $Na^+$ -Kanälen vor (*Kontrolle*) und nach Behandlung mit Anemonentoxinen ( $5\text{ }\mu\text{g/ml}$ ) in Abhängigkeit vom Membranpotential ( $U_M$ ). Gemittelte Werte  $\pm$  S.E.M..

nerhalb dieses Potentialbereiches für beide ähnliche Zeitkonstanten wie die Kontrolle auf. Unter der Wirkung von *APE 1-1* und *ATX II* kommt es zu einer Zunahme der Zeitkonstanten um ca.  $0.5 - 1\text{ ms}$  ( $U_M = 0\text{ mV}$  :  $ttp_{(0)APE1-1} = 2.29 \pm 0.36\text{ ms}$ ;  $ttp_{(0)ATXII} = 1.73 \pm 0.16\text{ ms}$ ;  $ttp_{(0)Kontrolle} = 1.26 \pm 0.29\text{ ms}$ ). Für

*APE 2-1* verändert sich dieser Wert um fast  $2\text{ ms}$  auf  $ttp_{(0)APE2-1} = 3.28 \pm 0.19\text{ ms}$ . Übersteigt das Membranpotential Werte von  $U_M \geq 20\text{ mV}$  kommt es bei fast allen Toxinen wieder zu einem Anstieg der Zeitkonstanten. Nach Applikation vom *APE 1-2* und *ATX II* erfolgt dieser Abfall in der Aktivierungskinetik bereits bei  $U_M \geq 10\text{ mV}$ .

Die Daten dieser Abbildung wurden anhand der Versuche gemäß dem Impulsprogramm aus Abschnitt 3.1.1 ermittelt.

### 3.1.6 Giftwirkung auf das Aktionspotential

Im *Current-Clamp Modus* können mit Hilfe des Patch-Clamp Verstärkers intrazelluläre Ableitungen am Präparat durchgeführt und somit auch Aktionspotentiale (AP) gemessen werden. Für derartige Untersuchungen müssen jedoch Zellen zur Verfügung stehen, deren Natriumkanal-Dichte ausreicht um AP's auszulösen. Aus diesem Grund wurden für diese Zwecke kugelige, ca.  $20\text{ }\mu\text{m}$  große Zellen aus dem Rückenmark der Ratte (*DRG-Neurone*) verwendet. Im Gegensatz zu den *DRG*-Zellen waren die Zellen der Kultur *N1E-115*, die ansonsten für sämtliche Versuche zur Verfügung standen, nicht in der Lage AP's zu erzeugen. Die für die Current-Clamp Experimente benötigte Ringerlösung enthielt, anders als bei den Whole-Cell Untersuchungen an den *N1E-115*-Zellen, kein *Tetraethylammonium-Iodid* ( $TEA^+$ ), welches die an der Repolarisation des AP's beteiligten Kalium-Kanäle blockiert hätte. Auf diese Weise war es möglich, zunächst das *unvergiftete* Aktionspotential und anschließend dessen Veränderung nach Zugabe von  $TEA^+$  und Anemontoxin ( $5\text{ }\mu\text{g/ml}$ ) zu registrieren.

Abbildung 3.14 verdeutlicht exemplarisch die Wirkung beider Substanzen auf das AP.

In Ringerlösung kommt es nach Erreichen des Schwellenpotentials ( $U_M \approx -10\text{ mV}$ ) zum Aufstrich, der von einer schnellen Repolarisation mit einem hyperpolarisieren-

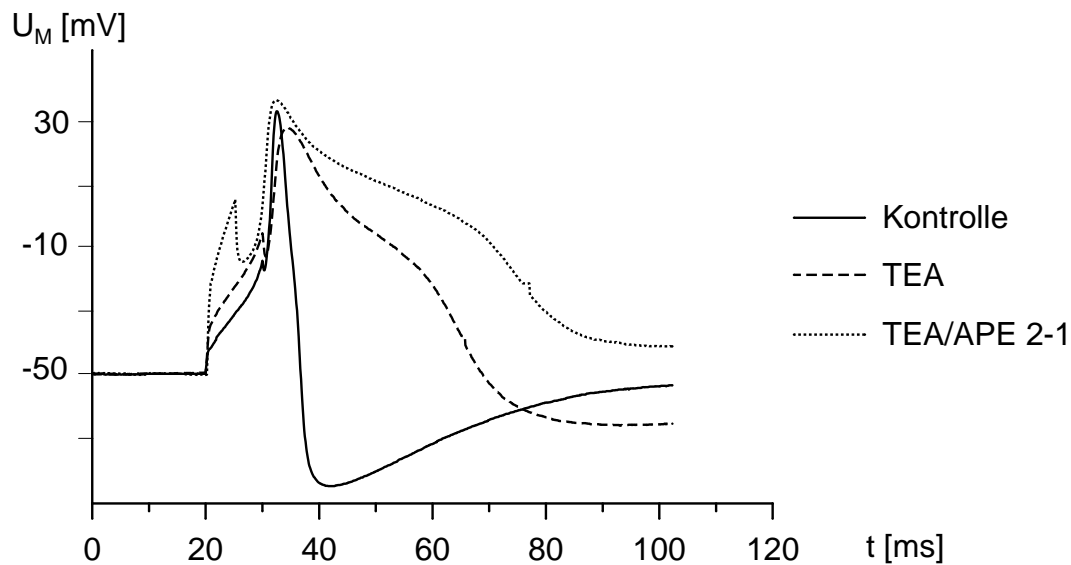


Abbildung 3.14: Verlauf eines Aktionspotentials an einem DRG-Neuron in Ringerlösung, nach Zugabe von Tetraethylammonium-Iodid ( $TEA^+$ : 2 mM) und nach Applikation von Anemonentoxin ( $APE\ 2-1$ : 5  $\mu g/ml$ ).

dem Nachpotential gefolgt wird. Der *Peak* des AP's vom Beginn des Aufstrichs bis zum erneuten Durchlaufen des Schwellenpotentials während der Repolarisation dauert ca. 5 ms. Nach Gabe von  $TEA^+$  kommt es zur Ausbildung eines Plateaus, so daß das Schwellenpotential nach dem Aufstrich erst nach 25 ms wieder erreicht wird. Nach Applikation von  $APE\ 2-1$  (5  $\mu g/ml$ ) verlängert sich die Dauer des Plateaus nochmals um mehr als das Zweifache auf 52 ms. Das Membranpotential der Kontrollmessung sinkt in der Phase des hyperpolarisierenden Nachpotentials auf  $U_M \approx -90\ mV$  ab. Da das Ruhepotential bei  $U_{MR} = -50\ mV$  liegt, unterschreitet das Nachpotential  $U_{MR}$  demnach um 40 mV. In Anwesenheit von  $TEA^+$  liegt diese Differenz bei 10 mV ( $U_M = -60\ mV$ ). Unter dem Einfluß des Anemonentoxins wird das Membranpotential lediglich auf einen Wert von  $U_M = -40\ mV$  repolarisiert und bleibt somit 10 mV oberhalb des Ruhepotentials. Es kommt zu keiner vollständigen Repolarisation.

### 3.1.7 Konzentrations-Wirkungs-Beziehung

In Anlehnung an frühere Arbeiten über die Wirkung von Anemonentoxinen auf den Natriumstrom (ULBRICHT & SCHMIDTMAYER 1981; AFRA 1998) wurde bei den bisherigen Versuchsreihen eine Konzentration von  $5 \mu\text{g/ml}$  ( $1.0 \mu\text{mol/l}$ ) Anemonentoxin als Versuchsdosis gewählt. Dennoch war es wichtig, Dosis-Wirkungskurven der Toxine zu erstellen, um auszuschließen, daß die doppelte Dosis eines schwächeren Toxins die gleiche Wirkung erzielt wie die normale Dosis eines stärkeren Toxins. Zur Ermittlung des maximalen Effektes wurden Konzentrationen von  $0.1$  bis  $2.0 \mu\text{mol/l}$  getestet.

Die Abbildungen 3.15 und 3.16 stellen für zwei derartige Fraktionen an den Zellen der Linie N1E-115 die Wirkung unterschiedlicher Konzentrationen auf den zeitlichen Verlauf des  $\text{Na}^+$ -Einwärtsstromes gegenüber.

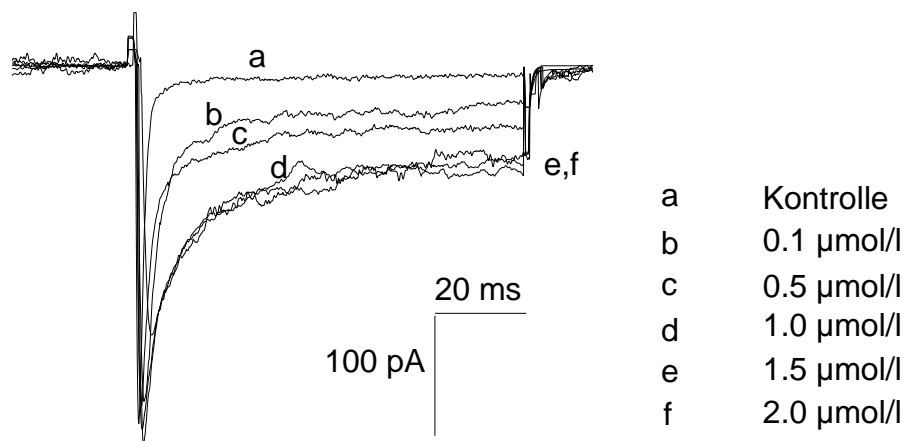


Abbildung 3.15: Verlauf des  $\text{Na}^+$ -Stroms einer Neuroblastomzelle in Abhängigkeit verschiedener Konzentrationen ( $\mu\text{mol/l}$ ) des Anemonentoxins  $\text{APE 1-1}$  während eines  $70 \text{ ms}$  dauernden Testimpulses ( $U_M = 0 \text{ mV}$ ).

Bei gegebenem Membranpotential von  $U_M = 0 \text{ mV}$  kommt es bei den Fraktionen  $\text{APE 1-1}$  und  $\text{APE 1-2}$  nach Applikation von  $0.1/ 0.5/ 1.0/ 1.5$  und  $2.0 \mu\text{mol/l}$  Toxin zu einem Anstieg der persistierenden Komponente, die ab einer Konzentra-

tion von  $1.0 \mu\text{mol/l}$  eine Sättigung erreicht und auch nach Gabe höherer Dosen ( $1.5/2.0 \mu\text{mol/l}$ ) nicht weiter zunimmt.

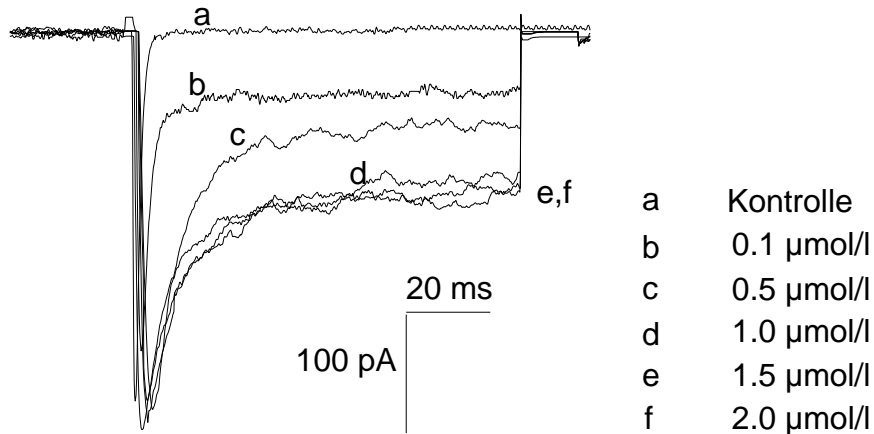


Abbildung 3.16: Verlauf des  $\text{Na}^+$ -Stroms einer Neuroblastomzelle in Abhängigkeit verschiedener Konzentrationen ( $\mu\text{mol/l}$ ) des Anemonentoxins  $\text{APE 1-2}$  während eines  $70 \text{ ms}$  dauernden Testimpulses ( $U_M = 0 \text{ mV}$ ).

Bezüglich des Spitzenstromwertes ( $I_{Peak}$ ) konnte, wie es in früheren Arbeiten beschrieben wurde (ULBRICHT & SCHMIDTMAYER 1981), kein Unterschied für die hier untersuchten Fraktionen registriert werden.

Tabelle 3.1.7 stellt die gemittelten Quotienten aus maximalem Natriumstrom und der persistierenden Komponente ( $\pm \text{S.E.M.}$ ) als Maß für die Wirksamkeit der verschiedenen Toxin-Konzentrationen gegenüber. Wie bereits anhand der Abbildungen 3.15 und 3.16 zu erkennen ist, erreichen alle Fraktionen bei einer Konzentration von  $1.0 \mu\text{mol/l}$  ihre maximale Giftwirkung ( $\frac{I_{Pers.}}{I_{Peak}}$ :  $\text{APE 1-1}$ ,  $\text{ATX II} \approx 20\%$ ;  $\text{APE 1-2}$ ,  $\text{APE 2-1}$ ,  $\text{APE 5-3} \approx 40\%$ ). Selbst Applikation der doppelten Dosis führt bei keinem Toxin zu einer deutlichen Steigerung bezüglich des persistierenden Stromes.

Tabelle 3.3: Verhältnis des persistierenden zum maximalen Natriumstrom ( $I_{Pers}/I_{Peak}$ ) unter Einwirkung verschiedener Konzentrationen ausgewählter Anemonentoxine.

Konzentration	<i>APE 1-1</i>	<i>APE 1-2</i>	<i>APE 2-1</i>	<i>ATX II</i>	<i>APE 5-3</i>
0.1 $\mu\text{mol/l}$	0.09 $\pm$ 0.01 <sub>(3)</sub>	0.11 $\pm$ 0.05 <sub>(3)</sub>	0.19 $\pm$ 0.05 <sub>(3)</sub>	0.11 $\pm$ 0.01 <sub>(3)</sub>	0.13 $\pm$ 0.05 <sub>(4)</sub>
0.5 $\mu\text{mol/l}$	0.19 $\pm$ 0.05 <sub>(3)</sub>	0.29 $\pm$ 0.09 <sub>(5)</sub>	0.26 $\pm$ 0.04 <sub>(4)</sub>	0.18 $\pm$ 0.05 <sub>(3)</sub>	0.24 $\pm$ 0.03 <sub>(5)</sub>
1.0 $\mu\text{mol/l}$	0.21 $\pm$ 0.04 <sub>(3)</sub>	0.42 $\pm$ 0.11 <sub>(4)</sub>	0.38 $\pm$ 0.03 <sub>(3)</sub>	0.24 $\pm$ 0.01 <sub>(3)</sub>	0.35 $\pm$ 0.03 <sub>(3)</sub>
1.5 $\mu\text{mol/l}$	0.20 $\pm$ 0.05 <sub>(3)</sub>	0.37 $\pm$ 0.03 <sub>(3)</sub>	0.35 $\pm$ 0.04 <sub>(3)</sub>	0.22 $\pm$ 0.05 <sub>(4)</sub>	0.34 $\pm$ 0.03 <sub>(3)</sub>
2.0 $\mu\text{mol/l}$	0.23 $\pm$ 0.02 <sub>(5)</sub>	0.35 $\pm$ 0.05 <sub>(6)</sub>	0.39 $\pm$ 0.04 <sub>(4)</sub>	0.26 $\pm$ 0.02 <sub>(4)</sub>	0.41 $\pm$ 0.05 <sub>(5)</sub>

Ganzzellaufnahmen in Ringerlösung ( $U_M = 0 \text{ mV}$ ); normierte und gemittelte Stromamplituden ( $\pm$  S.E.M.); Klammerwert entspricht der Anzahl der Versuche.

## 3.2 Einzelkanalmessungen

Anders als bei den Ganzzellaufnahmen wird bei den Einzelkanalmessungen nach Bildung eines Gigaseals keine Perforation der Zellmembran eingeleitet, sondern der *Cell-attached* Modus beibehalten. Befinden sich unterhalb der Pipettenöffnung einzelne Natriumkanäle, so können deren Öffnungs- und Schließverhalten als nahezu rechteckförmige Antworten registriert werden. Dabei *springt* die Registrierung vom Grundniveau, bei dem kein Strom fließt, auf ein für Natriumkanäle typisches Niveau und kehrt nach kurzer Zeit wieder zurück.

Ausgehend von einem Haltepotential von  $U_M = -80 \text{ mV}$  wurde dieses Kanalverhalten durch eine genügend starke Anhebung des Membranpotentials während eines 70 ms dauernden Impulses initiiert. Innerhalb der Pipetten befand sich entsprechend der Versuchsanordnung *externe* Ringerlösung, in der auch die Toxine in der gewünschten Konzentration gelöst und anschließend appliziert wurden. Sämtliche Versuche zu den Einzelkanalaufnahmen wurden an runden  $\varnothing 20 \mu\text{m}$  großen Neuroblastozellen der Linie *N1E-115* durchgeführt.

### 3.2.1 Kontrollmessung

In toxinfreier Lösung (Abbildung 3.17) öffnen sich die Kanäle unmittelbar nach Impulsbeginn (senkrechte Markierung). Häufig befinden sich unterhalb der Pipet-  
tenöffnung mehrere Kanäle. Öffnen diese Kanäle gleichzeitig, so addieren sich deren  
Stromamplituden. Innerhalb der Einzelkanalregistrierungen können diese anhand  
ihrer verschiedenen Öffnungsniveaus ( $i_{1-3}$ ) unterschieden werden.

Da nach wenigen  $ms$  bei anhaltender Depolarisation ( $U_M = 10 mV$ ) an den Kanälen  
die Inaktivierung einsetzt, kommt es zu einer stufenweisen Reduzierung der Strom-  
amplitude, bis nach ca.  $10 ms$  sämtliche Kanäle inaktiv sind. Diese Inaktivierung  
wird erst durch einen hyperpolarisierenden Impuls wieder aufgehoben.

Das Öffnen und Schließen, sowie die Amplituden der Einzelkanalströme unterlie-  
gen bestimmten Zufallsgesetzen und schwanken gemäß einer Gaußschen Verteilung  
um bestimmte Mittelwerte. Um diese Werte zu ermitteln, müssen zahlreiche, un-  
abhängige Einzelereignisse statistisch ausgewertet werden. Zu diesem Zweck werden  
die Einzelkanalmessungen *idealisiert* oder *gefittet*, d.h. in rechteckförmige Ereignis-  
se umgewandelt (vgl. Abb. 3.22), so daß Öffnungen und Schließungen eindeutig  
voneinander getrennt werden können. Überschreiten die Öffnungen die Schwelle  
der halben Stromamplitude des Öffnungsniveaus von  $i_1$  ( $\approx -1.1 pA$ ) kommt es  
zu einer Registrierung bestimmter Dauer. Entsprechendes gilt für weitere Niveaus.  
Sämtliche nachfolgenden Ergebnisse der Einzelkanalauswertung basieren auf solchen  
*idealisierten* Daten (vgl. 2.3.5).

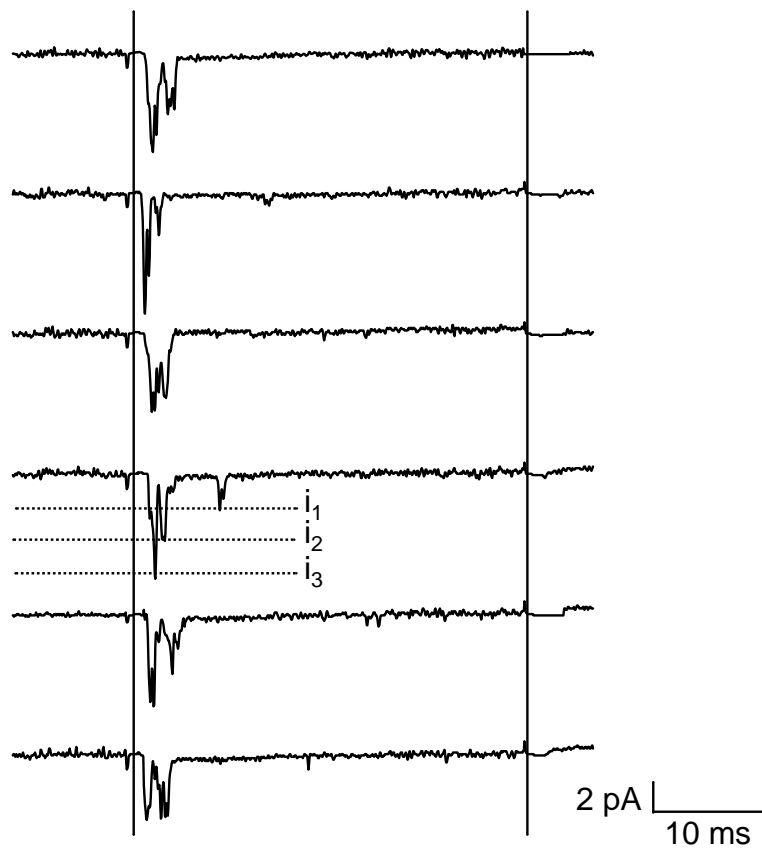


Abbildung 3.17: Einzelkanalaufzeichnungen einer Neuroblastozelle bei einem Membranpotential von  $U_M = 10 \text{ mV}$  während eines  $70 \text{ ms}$  dauernden Testimpulses. Markierung der unterschiedlichen Kanalöffnungsniveaus mit  $i_1$ ,  $i_2$  und  $i_3$ .



### 3.2.2 Toxinapplikation

Wie bereits bei den Ganzzelleableitungen zu erkennen war, verändert die Applikation von Anemontoxinen die Inaktivierungskinetik. In diesem Kapitel soll untersucht werden, wie sich dieser Einfluß auf das Einzelkanalverhalten auswirkt. Genaugenommen soll der Frage nachgegangen werden, ob eine Modifizierung durch die Toxine die Natriumkanäle *häufiger* zum Öffnen bringt oder ob diese *länger* öffnen und es bezüglich dieser Parameter Unterschiede zwischen den Fraktionen gibt.

Abbildung 3.18 zeigt an sechs konsekutiven Originalregistrierungen ( $U_M = 10 \text{ mV}$ ) die Wirkung zweier exemplarischer Toxine (*APE 1-2*, *APE 1-2*) auf einzelne Natriumkanäle. In Anlehnung an die Ergebnisse aus Kapitel 3.1.7 wurden die Kanäle einer Toxinkonzentration von  $5 \mu\text{g/ml}$  ausgesetzt. Dabei bewirkt die Toxinapplikation eine sichtbare Verlängerung der Öffnungsdauer und das zusätzliche Öffnen der Kanäle über die gesamte Depolarisationsdauer ( $70 \text{ ms}$ ). Ein derartiges Verhalten konnte während der Versuche in Ringerlösung (vgl. 3.17) nicht festgestellt werden. Dort waren die Kanäle nach ca.  $10 \text{ ms}$  inaktiv und wiesen kürzere Offenzeiten auf. Desweiteren treten unter Giftwirkung die Öffnungen häufig in Gruppen auf, die Kanäle springen dabei ständig zwischen offenen und geschlossenen Zuständen hin und her. Man bezeichnet dieses Verhalten der Gruppenentladung allgemein als *Burst* (s. Kap. 3.2.4).

Bezüglich der Stromamplitude vor und nach Behandlung mit Toxinen konnte kein Unterschied festgestellt werden. Abbildung 3.19 stellt exemplarisch die Amplitudenhistogramme von idealisierten Einzelkanalregistrierungen vor und nach Behandlung mit dem Anemontoxin *APE 2-1* gegenüber. Hierbei konnten sowohl in Ringerlösung als auch unter Gifteinwirkung bei einem Membranpotential von  $U_M = 0 \text{ mV}$  nahezu gleiche Öffnungsniveaus festgestellt werden. Diese mehrgipfelige Kurve zeigt jeweils im Bereich der Amplitudenwerte  $i_1 \approx -1.1 \text{ pA}$ ,  $i_2 \approx -2.2 \text{ pA}$  und  $i_3 \approx -1.1 \text{ pA}$  (Kontrolle) eine Gaußsche Häufigkeitsverteilung. Somit stehen die einzelnen Niveaus in folgender Beziehung zueinander:  $i_2 \approx 2 * i_1$  und  $i_3 \approx 3 * i_1$ . Die-

ser Zusammenhang bestätigt die von NIEMANN (1991) ermittelten Öffnungsniveaus und spricht bezüglich der Leitfähigkeit für eine starke Homogenität innerhalb dieser Kanalpopulation.

Die mittlere Latenzzeit konnte nicht ermittelt werden, da extreme Signalverstärkung zu einer Zunahme des kapazitiven Artefaktes führte und somit eine Festlegung des Nullpunktes und eine Analyse dieser Zeitkonstanten verhinderte. Die mittlere Latenzzeit gilt als Maß für die Aktivierung und umfaßt die Dauer vom Reizbeginn bis zur ersten Kanalöffnung.

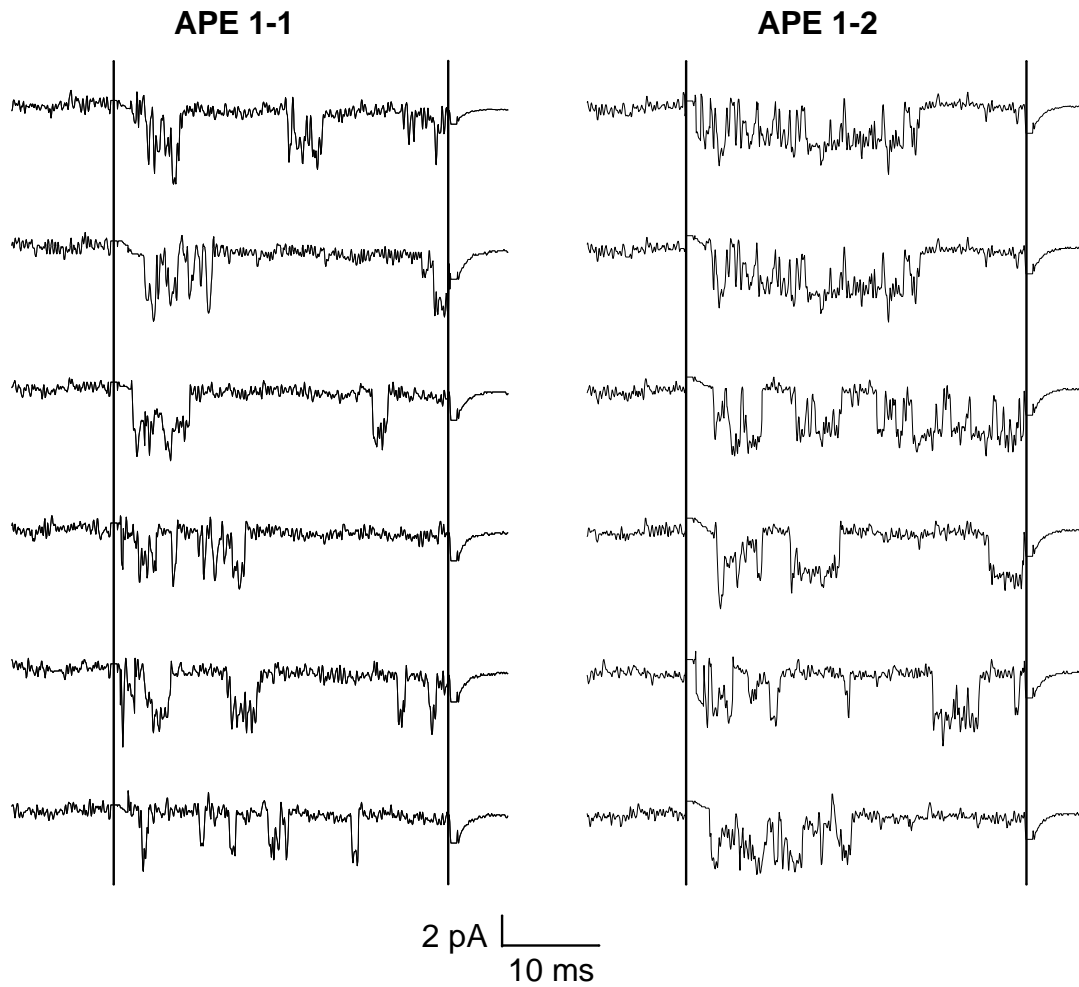


Abbildung 3.18: Einzelkanalaufzeichnungen von Neuroblastomzellen nach Applikation von Anemonotoxin *APE 1-1* und *APE 1-2* ( $5 \mu\text{g/ml}$ ). Membranpotential  $U_M = 10 \text{ mV}$ ; Dauer des Testimpulses:  $70 \text{ ms}$ .

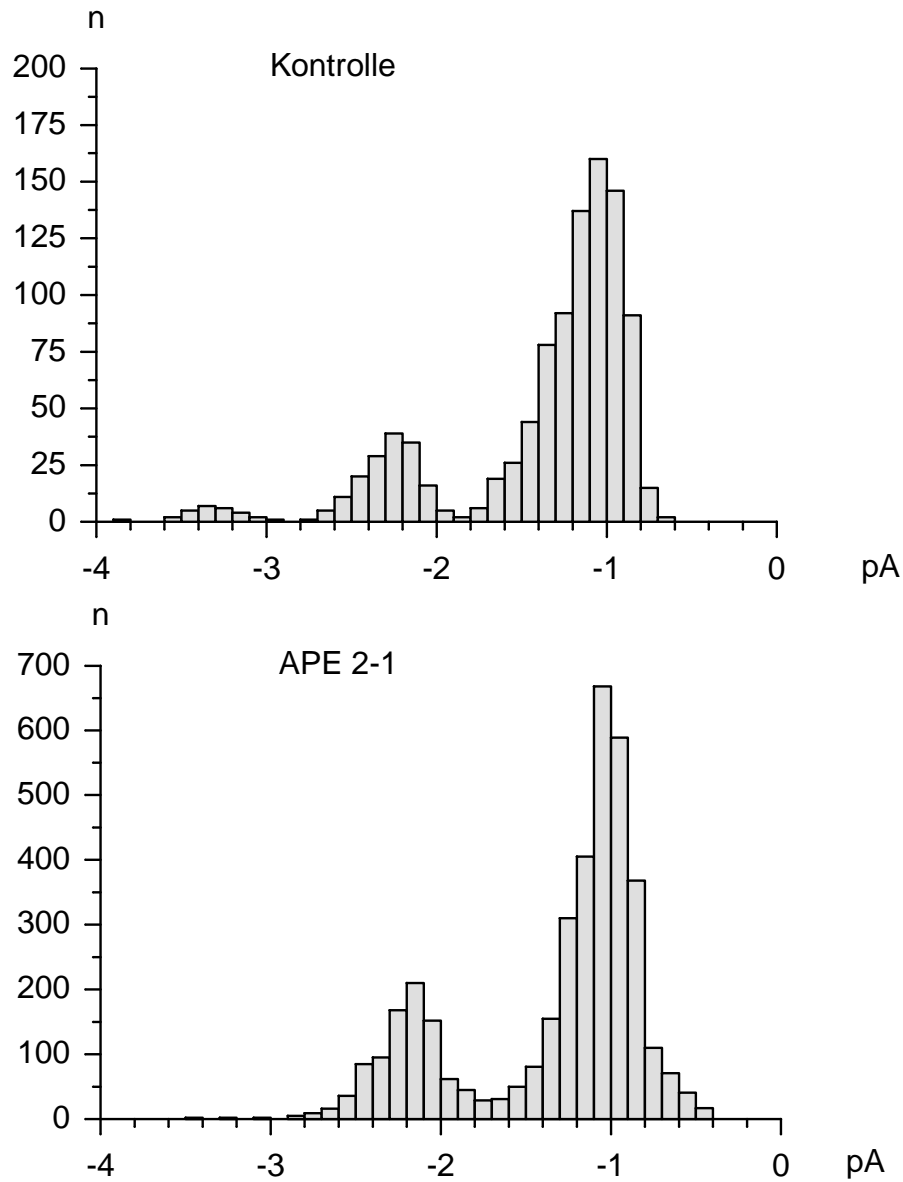


Abbildung 3.19: Amplitudenhistogramme von Einzelkanalregistrierungen in Rin-gerlösung (*Kontrolle*) und nach Toxinapplikation (*APE 2-1*) bei einem Membranpotential von  $U_M = 0 \text{ mV}$ . Klassenbreite  $0.1 \text{ pA}$ .

### 3.2.3 Offenzeit-Histogramme

Aus den *idealisierten* Daten (vgl. 2.3.5) der Einzelkanalaufzeichnungen werden Histogramme erstellt, in denen die Häufigkeiten bestimmter Ereignisse in Intervallen dargestellt sind. Die Intervalle fassen Einzelereignisse vorgegebener Größe zusammen. Bei den Meßgrößen unterscheidet man *Offenzeit-* und *Geschlossenzeithistogramme*.

Durch den Einfluß der Anemontoxine kommt es zu einem vermehrten Öffnen der Natriumkanäle (vgl. 3.18). Das entsprechende *Offenzeithistogramm* von Einzelkanalregistrierungen bei einem Membranpotential von  $U_M = 10 \text{ mV}$  unter der Wirkung eines exemplarischen Toxins (*ATX II*) zeigt die Abbildung 3.20. Dargestellt ist die Anzahl *offener* Ereignisse ( $n$ ) innerhalb eines Intervalls gegen die Intervalldauer (*Klassenbreite* =  $0.13 \text{ ms}$ ). Mit zunehmender Intervalldauer nimmt die Anzahl der

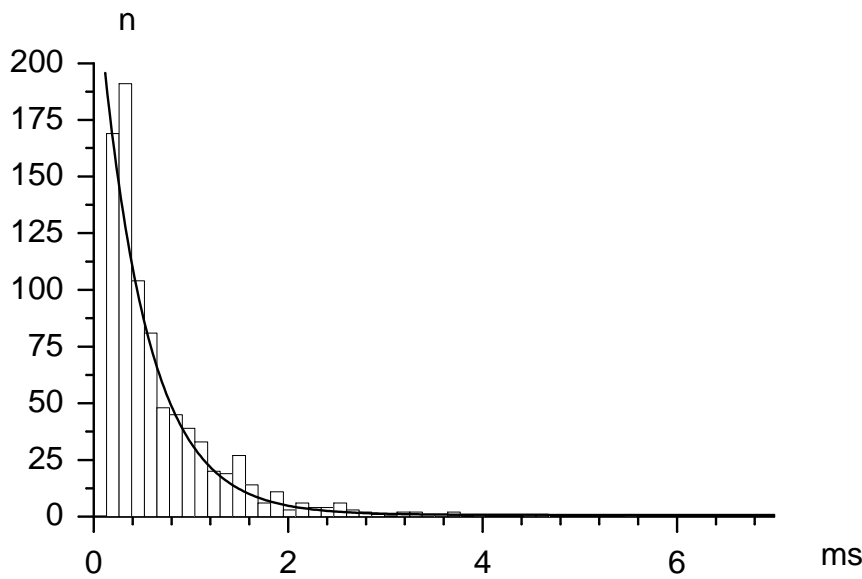


Abbildung 3.20: Offenzeithistogramm einer Einzelkanalaufzeichnung an einer Neuroblastozelle in Ringerlösung ( $U_M = 10 \text{ mV}$ ) unter Einwirkung des Anemontoxins *ATX II* ( $5 \mu\text{g/ml}$ ).  $n$ : Anzahl der Offen-Ereignisse; Klassenbreite =  $0.13 + z * 0.13 \text{ ms}$ , mit  $z = 1, 2, 3, \dots$ . Angepaßte di-exponentielle Funktion mit:  $\tau_{open1} = 0.48 \text{ ms}$ ;  $\tau_{open2} = 9.32 \text{ ms}$ .

Offen-Ereignisse ab. Der Verlauf dieser Abnahme bzw. dieses Histogramms kann an eine di-exponentielle Kurve angepaßt werden, da die Einzelkanalaufzeichnungen und auch die Histogramme auf eine Gruppe mit verlängerten Öffnungszeiten hinweisen, die sich deutlich von den übrigen kürzeren Offen-Ereignissen abheben. Die Kurvenanpassung an entsprechende Histogramme erfolgte daher gemäß der Gleichung:

$$N = N_A e^{-\frac{t}{B}} + N_C e^{-\frac{t}{D}},$$

wobei  $B = \tau_{open1}$  und  $D = \tau_{open2}$  sind.

In dem Histogramm 3.20 nimmt die schnelle Zeitkonstante einen Wert von:  $\tau_{open1} = 0.48 \text{ ms}$  an; die langsame Konstante einen Wert von:  $\tau_{open2} = 9.32 \text{ ms}$ . Die relativen Anteile dieser beiden Zeitkonstanten liegen für die schnelle Konstante bei:  $\frac{N_A}{\sum N} = 0.69\%$ , für die langsame bei:  $\frac{N_C}{\sum N} = 0.31\%$ .

Aus diesen Parametern ergeben sich charakteristische Vergleichsgrößen bei der Analyse der Wirkung der übrigen Toxine auf die Einzelkanäle. Von besonderem Interesse sind hierbei die beiden Zeitkonstanten  $\tau_{open1}$  und  $\tau_{open2}$  und deren Abhängigkeiten vom Membranpotential.  $\tau_{open1}$  steht in diesem Zusammenhang für kurze schnelle,  $\tau_{open2}$  für die langen Öffnungen. Abbildung 3.21 zeigt die Potentialabhängigkeit von  $\tau_{open1}$  und  $\tau_{open2}$  unter dem Einfluß verschiedener Anemonentoxine. Mit ansteigender Kommandospannung nehmen die gemittelten Werte ( $\pm S.E.M.$ ) beider Zeitkonstanten zu. Im Gegensatz zu  $\tau_{open1}$  nimmt jedoch  $\tau_{open2}$  nach Applikation der Toxine *APE 1-2* und *APE 2-1* stärker zu als nach Gabe von *APE 1-1* und *ATX II*. Besonders deutlich zeigt sich dies bei einem Membranpotential von  $U_M > 0 \text{ mV}$  (*APE 1-2/2-1*:  $\tau_{open2(10 \text{ mV})} \approx 16 \text{ ms}$ ; *APE 1-1/ATX II*:  $\tau_{open2(10 \text{ mV})} \approx 13 \text{ ms}$ ; *Kontrolle*:  $\tau_{open2(10 \text{ mV})} \approx 10 \text{ ms}$ ). *APE 1-2* weist über den gesamten Potentialbereich im Vergleich zu *APE 1-1* und *ATX II* größere Werte für  $\tau_{open2}$  auf. Für *APE 2-1* hingegen zeichnet sich dieser Unterschied erst ab  $U_M > 0 \text{ mV}$  ab.  $\tau_{open2_{Max}}$  liegt für *APE 1-1/ATX II* bei ca.  $14 \text{ ms}$ , für *APE 1-2/2-1* bei ca.  $19 \text{ ms}$ . Die relativen Anteile beider Zeitkonstanten bleiben über den gesamten Spannungsbereich nahezu unverändert:  $\frac{N_A}{\sum N} \approx 70\%$ ,  $\frac{N_D}{\sum N} \approx 30\%$  (nicht abgebildet).

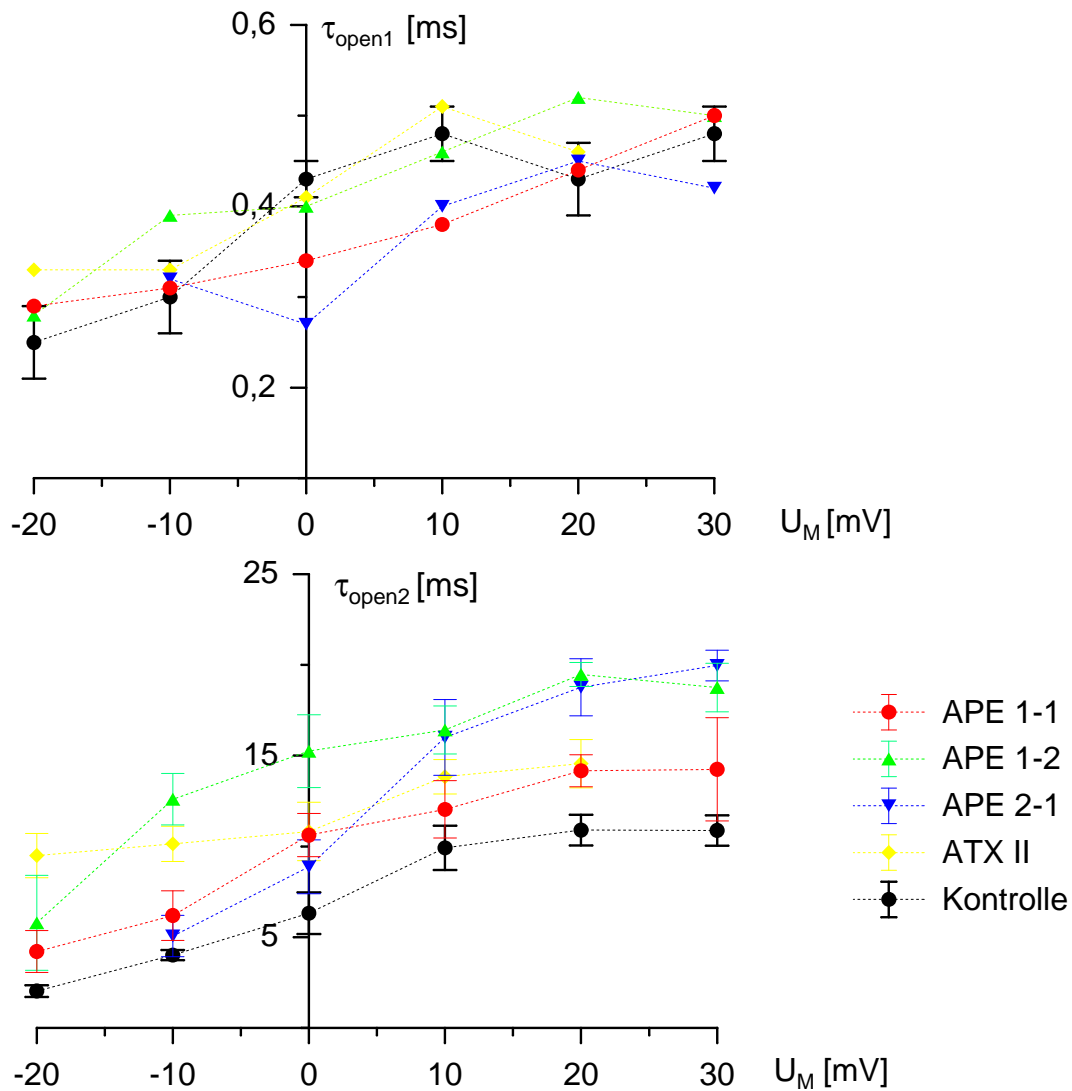


Abbildung 3.21: Gemittelte Zeitkonstanten  $\tau_{open1}$  und  $\tau_{open2}$  ( $\pm$  S.E.M.) nach Anpassung einer di-exponentiellen Funktion an die entsprechenden *Offenzeit-Histogramme* in Abhängigkeit vom Membranpotential ( $U_M$ ) in Ringerlösung (*Kontrolle*) und unter dem Einfluß verschiedener Anemontoxine ( $5 \mu\text{g/ml}$ ). Einzelkanalaufzeichnungen an Neuroblastomzellen; Exponentialfunktion gemäß der Formel:  $N = N_A e^{-\frac{t}{B}} + N_C e^{-\frac{t}{D}}$ , mit  $B = \tau_{open1}$  und  $D = \tau_{open2}$ .

### 3.2.4 Burstverhalten des Einzelkanals

Durch die Gabe von Anemontoxin kommt es zum einen zu einem vermehrten Öffnen der Einzelkanäle, zum anderen zu einer Verlängerung der Öffnungsdauer (3.18). Außerdem treten Öffnungen häufig in Gruppen sog. *Bursts* auf. *Bursts* können daher als lange Öffnungen angesehen werden, die von kurzen Schließungen unterbrochen sind. Die folgenden Kapitel beschäftigen sich mit diesem Burstverhalten der Natriumkanäle. Für das weitere Verständnis sind in der Abbildung 3.22 einige Burst-Termini aufgeführt. Diese Abbildung skizziert anhand einer Originalregistrierung mit Hilfe idealisierter Daten das Burstverhalten eines Einzelkanals auf einen depolarisierenden Impuls.

Das Kanalverhalten läßt sich zunächst zergliedern in die Burstdauer  $B_d$  und die

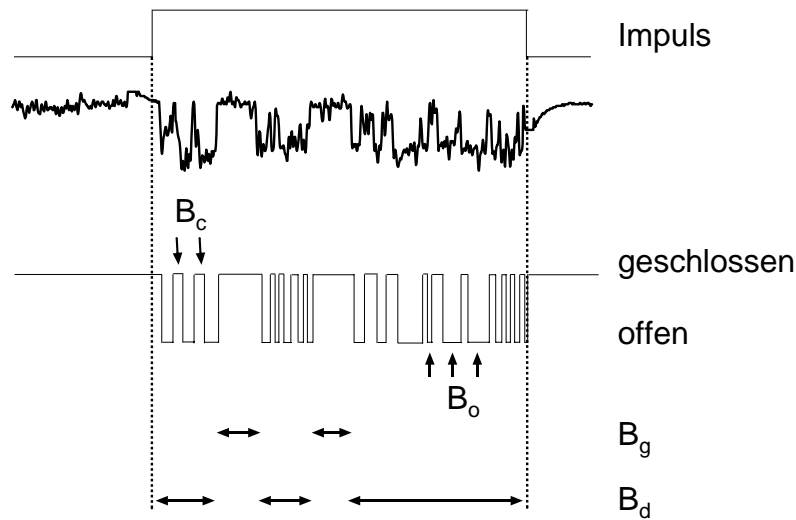


Abbildung 3.22: Datenidealisierung und Burstanalyse der Einzelkanalereignisse anhand einer Originalregistrierung während eines rechteckförmigen Spannungspulses.  $B_d$ : Burstdauer,  $B_g$ : Intervall zwischen den Bursts,  $B_o$ : Öffnungsdauer innerhalb des Bursts,  $B_c$ : Schließzeit innerhalb des Bursts.

Intervalle zwischen den Bursts  $B_g$ , in denen der Kanal geschlossen ist. Weiterhin werden die Öffnungen innerhalb eines Bursts mit  $B_o$  bezeichnet, die Schließdauer innerhalb eines Bursts mit  $B_c$  und die Anzahl der Öffnungen pro Burst, die in der Skizze nicht aufgeführt sind, werden als  $B_n$  definiert. Qualitative Unterschiede der



Toxine auf das Einzelkanalverhalten und letztendlich auf die Kinetik der Inaktivierung stehen offensichtlich im Zusammenhang mit dem Burstverhalten und somit auch mit diesen fünf Burst-Parametern.

In der näheren Burstanalyse wurde auf die Darstellung der Kontrolldaten verzichtet, da es in Ringerlösung nicht zur Ausbildung eines derartigen Burstverhaltens kommt, wie es nach der Modifizierung durch die Toxine der Fall ist (vgl. 3.17).

### Burstdauer

Um die Länge der Bursts bzw. die *Burstdauer* zu ermitteln, muß eine Zeitgrenze definiert werden, die zwischen einem Schließen innerhalb des Bursts und zwischen zwei aufeinanderfolgenden Bursts unterscheidet. Diese Intervallgrenze wurde in Anlehnung an NIEMANN (1989) auf 1.5 *ms* festgelegt; unterhalb dieser Schließdauer wurden alle Ereignisse zu einem Burst zusammengefaßt.

Entsprechend Kapitel 3.2.3 wurden aus den erhaltenen idealisierten Daten die dazugehörigen Offenzeit-Histogramme erstellt. Die Kurvenanpassung an das Histogramm erfolgte mit einer monoexponentiellen Funktion, da innerhalb der Bursts keine besonders langen von kurzen Offen-Ereignissen unterschieden werden konnten. Abbildung 3.23 faßt die gemittelten Zeitkonstanten ( $\pm S.E.M.$ ) dieser Anpassung für die verschiedenen Anemontoxine zusammen. Mit zunehmender Depolarisation verlängert sich bei allen Fraktionen die Burstdauer. Unter dem Einfluß von *ATX II* steigt diese Zeitkonstante im Vergleich zu den anderen Toxinen jedoch nur gering an und scheint relativ unabhängig vom Membranpotential zu sein. Ganz anders verhält sich dies für *APE 2-1*, dessen Einfluß auf die Burstdauer zwischen  $U_M = 0 \text{ mV}$  und  $U_M = 30 \text{ mV}$  eine wesentlich stärkere Potentialabhängigkeit aufweist. Bei Potentialen von  $U_M > 0 \text{ mV}$  liegt die Burstdauer nach Applikation der Fraktionen *APE 1-2* und *APE 2-1* ( $\overline{B_d} \approx 30 \text{ ms}$ ) über der von *APE 1-1* und *ATX II*, die bei  $U_M = 30 \text{ mV}$  Bursts mit einer Dauer von durchschnittlich 20 *ms* hervorrufen.

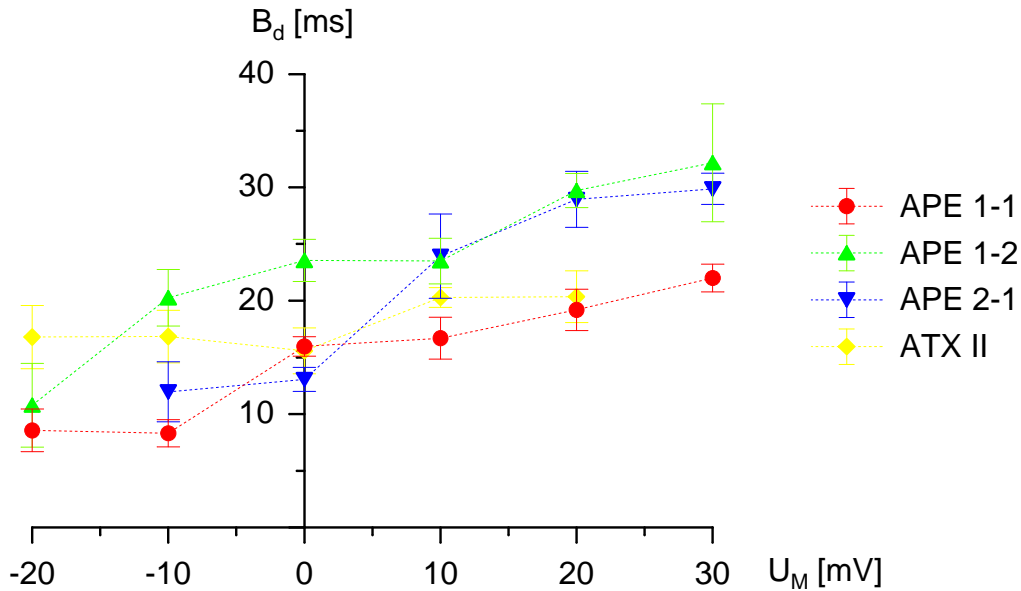


Abbildung 3.23: Gemittelte Burstlängen  $\overline{B_d}$  ( $\pm$  S.E.M.) von Natrium-Einzelkanalableitungen an Neuroblastomzellen in Abhängigkeit vom Membranpotential  $U_M$  unter Einwirkung verschiedener Anemonentoxine. Angepaßte monoexponentielle Funktion der Formel:  $N = N_A e^{-\frac{t}{B_d}}$ , mit  $B_d = \tau_{open}$  an entsprechende Burstdauer-Histogramme.

### Schließzeiten zwischen den Bursts

Reagieren die einzelnen Natriumkanäle nach Applikation von Anemonentoxinen mit Bursts, so treten auch die Bursts häufig in Gruppen auf. Aufeinanderfolgende Bursts werden durch Intervalle bestimmter Dauer  $B_g$  voneinander getrennt. Da es mit zunehmender Kommandospannung zu einer Verlängerung der Burstdauer kommt (s. 3.2.4), stellt sich die Frage, ob sich auch die Schließzeiten zwischen den Bursts verkürzen. Tatsächlich kommt es unabhängig vom gegebenen Toxin zu dieser Verringerung der Intervalldauer (Abb. 3.24), doch bewirkt keine der Fraktionen im Vergleich zu den anderen eine sichtbar stärkere oder schwächere Verkürzung dieser Schließzeiten aufeinanderfolgender Bursts. Sämtliche applizierten Toxine zeigen auf

die Intervalldauer eine ähnliche Wirkung. Dies bedeutet gleichzeitig, daß die Ursache für die Persistenz der Natriumströme in der unterschiedlich starken Ausprägung der Burstdauer innerhalb der Bursts zu finden sein müßte. Dieser Frage wird im folgenden nachgegangen.

Die Mittelwerte der dargestellten Intervalllängen ( $\pm S.E.M.$ ) wurden durch An-

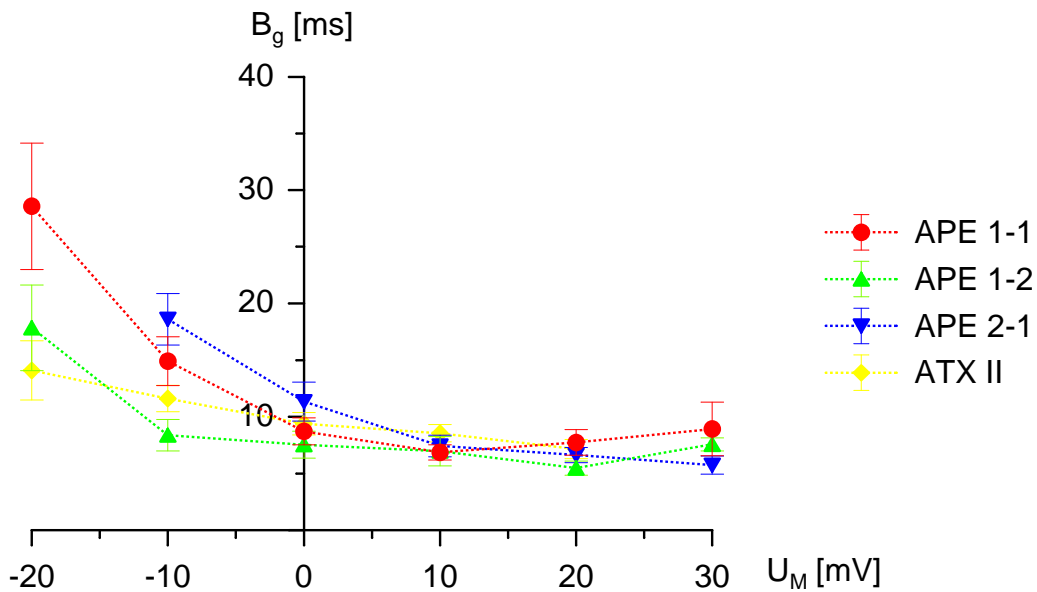


Abbildung 3.24: Gemittelte Schließzeiten zwischen den Bursts  $\overline{B_g}$  ( $\pm S.E.M.$ ) von Natrium-Einzelkanalableitungen an Neuroblastomzellen in Abhängigkeit vom Membranpotential  $U_M$  unter Einwirkung verschiedener Anemonentoxine. Angepaßte monoexponentielle Funktion der Formel:  $N = N_A e^{-\frac{t}{B_d}}$ , mit  $B_d = \tau_{closed}$  an entsprechende Geschlossenzeit-Histogramme.

passen einer einfachen Exponentialfunktion an die entsprechenden Geschlossenzeit-Histogramme erstellt. In diesem Fall entspricht die Zeitkonstante  $\tau_{closed}$  der mittleren Pausendauer  $\overline{B_g}$ . Auf die Gegenüberstellung der Versuche in Ringerlösung wurde verzichtet, da es mit dieser Lösung zu einer vermehrten Abfolge von Bursts, wie es unter dem Einfluß der Anemonentoxine der Fall war, nicht kam.

### Schließzeiten innerhalb der Bursts

Da es in Abhängigkeit vom applizierten Toxin zu einer Verlängerung der Burstdauer kommt und die Schließzeiten zwischen den Bursts unabhängig vom Toxin sind, ist es offensichtlich, daß die Ursache für deren unterschiedliche Wirkung auf die Inaktivierungskinetik der Natriumkanäle innerhalb der Bursts zu finden ist. Innerhalb der Bursts unterscheidet man die *Schließzeiten*  $B_c$ , die *Öffnungszeiten*  $B_o$  und die *Anzahl der Öffnungen* pro Burst  $B_n$ .

Die Ergebnisse der Auswertung des ersten dieser drei Parameter, der Schließzeiten innerhalb der Bursts  $B_c$ , beschreibt die Abbildung 3.25. Nach Veränderung des Membranpotentials kommt es unter der Wirkung der getesteten Toxine zu einer langsamen Abnahme dieser Schließzeiten. Bei Potentialen von  $U_M > 0 \text{ mV}$  weichen die gemittelten Werte zwischen den Fraktionen nur gering voneinander ab und liegen ab  $U_M = 0 \text{ mV}$  bei allen Toxinen unterhalb einer Millisekunde. Demnach zeigt sich

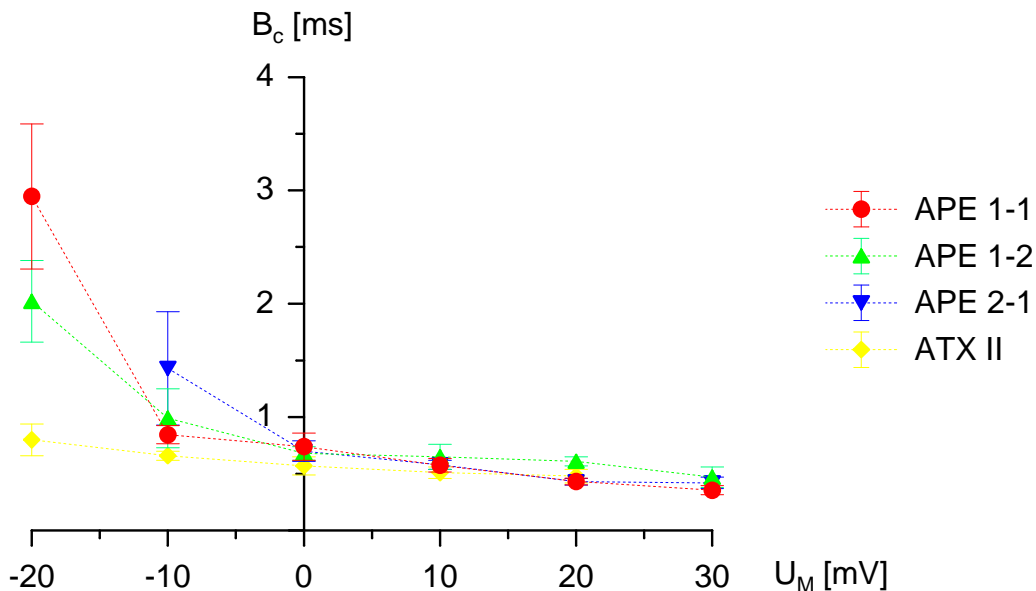


Abbildung 3.25: Gemittelte Schließzeiten innerhalb der Bursts  $\overline{B}_c$  ( $\pm$  S.E.M.) von Natrium-Einzelkanalableitungen an Neuroblastomzellen in Abhängigkeit vom Membranpotential  $U_M$  unter Einwirkung verschiedener Anemonentoxine. Angepaßte monoexponentielle Funktion der Formel:  $N = N_{AE} e^{-\frac{t}{B_c}}$ , mit  $B_c = \tau_{closed}$  an entsprechende Geschlossenzeit-Histogramme.

bezüglich der Wirkung auf die Schließzeiten innerhalb der Bursts kein deutlicher Unterschied zwischen den Toxinen, so daß die Verlängerung der Burstdauer nur im Zusammenhang mit einer Verlängerung der Öffnungszeiten oder einem Anstieg der Anzahl an Öffnungen pro Burst stehen kann.

Die Ergebnisse dieser Auswertung rechtfertigen jedoch die gewählte Mindestzeit zur Unterscheidung der Schließzeiten zwischen den Bursts und innerhalb der Bursts, die auf 1.5 ms festgelegt wurde. Erstellt wurden diese Daten durch Anpassen einer monoexponentiellen Funktion an entsprechende Geschlossenzeit-Histogramme.

### Anzahl der Öffnungen innerhalb der Bursts

Zur Ermittlung der Öffnungshäufigkeit pro Burst  $B_n$  wurden die Bursts eingegrenzt und die Öffnungen ausgezählt. Dabei entstanden Histogramme, in denen die absolute Anzahl der Öffnungen pro Burst ( $B_n, B_{n+1}, B_{n+2}, \dots$ ) gegen die Summe der ausgezählten Ereignisse  $\sum N_{(B_n+i)}$  der Einzelkanalaufzeichnung aufgetragen wurden. Die relativen Öffnungshäufigkeiten ergaben sich dementsprechend aus dem Quotienten:  $\frac{B_{n+i}}{\sum N_{(B_n+i)}}$ . Tabelle 3.2.4 stellt die Ergebnisse dieser Berechnungen für die einzelnen Toxine gegenüber.

Tabelle 3.4: Gemittelte Anzahl der Öffnungen pro Burst  $\overline{B}_n$  ( $\pm$  S.E.M.) von Einzelkanalaufzeichnungen an Neuroblastomzellen unter dem Einfluß verschiedener Anemontoxine in Abhängigkeit vom Membranpotential ( $U_M$  [mV]).

$U_M$	APE 1-1	APE 1-2	APE 2-1	ATX II	Kontrolle
-20	2.33 $\pm$ 0.08 <sub>(6)</sub>	2.44 $\pm$ 0.13 <sub>(5)</sub>		2.63 $\pm$ 0.16 <sub>(6)</sub>	2.67 $\pm$ 0.17 <sub>(3)</sub>
-10	2.43 $\pm$ 0.06 <sub>(7)</sub>	3.09 $\pm$ 0.35 <sub>(8)</sub>	2.22 $\pm$ 0.11 <sub>(7)</sub>	2.65 $\pm$ 0.10 <sub>(7)</sub>	2.37 $\pm$ 0.14 <sub>(6)</sub>
0	2.55 $\pm$ 0.10 <sub>(8)</sub>	3.12 $\pm$ 0.26 <sub>(8)</sub>	2.44 $\pm$ 0.11 <sub>(7)</sub>	2.84 $\pm$ 0.22 <sub>(7)</sub>	2.61 $\pm$ 0.13 <sub>(6)</sub>
10	2.86 $\pm$ 0.10 <sub>(8)</sub>	3.22 $\pm$ 0.33 <sub>(5)</sub>	2.98 $\pm$ 0.16 <sub>(6)</sub>	3.19 $\pm$ 0.15 <sub>(7)</sub>	2.58 $\pm$ 0.07 <sub>(6)</sub>
20	3.63 $\pm$ 0.30 <sub>(8)</sub>	4.00 $\pm$ 0.29 <sub>(6)</sub>	3.17 $\pm$ 0.10 <sub>(6)</sub>	3.98 $\pm$ 0.52 <sub>(4)</sub>	3.05 $\pm$ 0.13 <sub>(6)</sub>
30	4.01 $\pm$ 0.35 <sub>(3)</sub>	3.87 $\pm$ 0.59 <sub>(3)</sub>	4.06 $\pm$ 0.31 <sub>(7)</sub>		2.78 $\pm$ 0.16 <sub>(6)</sub>

Klammerwert entspricht der Anzahl der Versuche.

Über einen Potentialbereich von  $U_M = -20 \text{ mV}$  bis  $U_M = 30 \text{ mV}$  kommt es maximal zu einer Zunahme von einer Öffnung pro Burst ( $B_{n(-10 \text{ mV})} \approx 2 - 3 \Rightarrow B_{n(20 \text{ mV})} \approx 3 - 4$ ). Dies gilt für alle applizierten Giftfraktionen. Unterschiede in der Wirksamkeit auf die Öffnungshäufigkeit zwischen den Toxinen können nicht festgestellt werden. Aus einem Anstieg der Öffnungsfrequenz resultiert sicherlich eine relative Zunahme der Burstdauer, differentielle Anstiege können mit diesem Burst-Parameter jedoch nicht erklärt werden.

### Mittlere Öffnungsdauer innerhalb der Bursts

Die Applikation verschiedener Anemontoxine beeinflusst sowohl die Schließzeiten als auch die Anzahl der Öffnungen innerhalb der Bursts nur geringfügig. Daher kann als letzte Variable für die potentialabhängige Verlängerung der Burstdauer nur noch die *Öffnungsdauer innerhalb der Bursts*  $B_o$  in Frage kommen. Wie lange eine einzelne Öffnung nach Gabe der untersuchten Toxine dauert, verdeutlicht Abbildung 3.26, deren Daten durch Anpassen einer monoexponentiellen Funktion an entsprechende Offenzeit-Histogramme ermittelt wurden.

Besonders bei Potentialen über  $0 \text{ mV}$  dauert nach Applikation der Fraktionen *APE 1-2* und *APE 2-1* ( $\overline{B}_o \approx 7 - 9 \text{ ms}$ ) eine Öffnung  $\emptyset 2 - 3 \text{ ms}$  länger als nach Gabe der Fraktionen *APE 1-1*, *ATX II* ( $\overline{B}_o \approx 5 - 6 \text{ ms}$ ). Die Wirkung von *ATX II* scheint relativ unabhängig vom Membranpotential zu sein und führt bei jedem Potential zu einer Öffnung des Kanals für ca.  $6 \text{ ms}$ ; der Einfluß von *APE 2-1* hingegen ist sehr spannungssensitiv. *APE 2-1* wirkt besonders stark auf den Inaktivierungsmechanismus des Einzelkanals bei Potentialen von  $U_M > 0 \text{ mV}$ . Die Wirkung von *APE 1-1* und *APE 1-2* auf die Öffnungsdauer nimmt nahezu linear mit dem Membranpotential zu, wobei die Werte für *APE 1-2*  $\emptyset 2 \text{ ms}$  größer als für *APE 1-1* sind. Insgesamt zeigen die Verhältnisse für die Dauer der einzelnen Öffnungen innerhalb der Bursts große Ähnlichkeiten in der Potentialabhängigkeit mit denen der mittleren

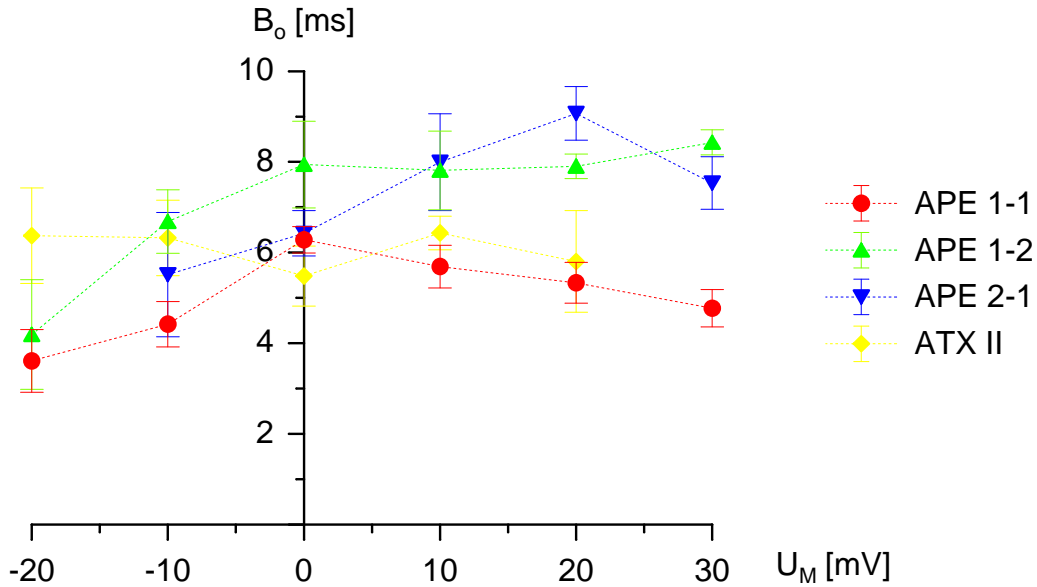


Abbildung 3.26: Gemittelte Öffnungszeiten innerhalb den Bursts  $B_o$  ( $\pm$  S.E.M.) von Natrium-Einzelkanalableitungen an Neuroblastomzellen in Abhängigkeit vom Membranpotential  $U_M$  unter Einwirkung verschiedener Anemonentoxine. Angepaßte monoexponentielle Funktion der Formel:  $N = N_A e^{-\frac{t}{B_o}}$ , mit  $B_o = \tau_{open}$  an entsprechende Offenzeit-Histogramme.

Burstdauer  $\overline{B_d}$  (vgl. 3.23).

Eine ANOVA mit anschließendem Scheffétest ergab einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen *APE 1-2/APE 2-1* und *APE 1-1/ATX II* bezüglich der Öffnungsdauer für Potentiale  $U_M > 10$  mV ( $p < 0.05$ ).

Demnach beruhen die Unterschiede in der potential- und toxinabhängigen Zunahme der Burstdauer und somit der Persistenzen im Gesamtstrombild auf einer unterschiedlichen Verlängerung der mittleren Öffnungsdauer  $\overline{B_o}$  des Einzelkanals innerhalb der Bursts.

### 3.2.5 Aufsummierte Einzelkanalströme

Werden Einzelkanalregistrierungen desselben Versuches in genügender Anzahl aufsummiert, so erhält man einen Stromverlauf, der dem einer Ganzzelleableitung entspricht. Grund dafür ist die Homogenität der Natriumkanäle und daraus resultie-

rend ein einheitliches Verhalten der gesamten Kanalpopulation (3.19). Insofern zeigt sowohl die Summe aller Einzelkanal-Öffnungsereignisse eines Versuches (unter konstanten Bedingungen), als auch der Gesamtstrom aus einer Ganzzelleableitung die zeitabhängige Öffnungswahrscheinlichkeit von Natriumkanälen.

Abbildung 3.27 stellt exemplarisch die aufsummierten Einzelkanalregistrierungen eines Kontrollversuches und zweier Ableitungen nach Applikation der Toxine *APE 1-1* und *APE 1-2* bei gleicher Membranspannung ( $U_M = 10 \text{ mV}$ ) gegenüber. Entsprechend den Stromregistrierungen zu den Ganzzellversuchen folgt auf die schnelle Aktivierung im Kontrollversuch ein vollständiges und unter dem Einfluß der Toxine ein unvollständiges Abklingen des Natriumstroms. Der Zeitverlauf der Inaktivierung kann, wie auch bei den Ganzzellregistrierungen, durch Anpassen einer di-exponentiellen Funktion beschrieben werden. Die jeweiligen Werte für  $\tau_0$ ,  $\tau_1$ ,  $I_0$ ,  $I_1$  und  $I_2$  der dargestellten Aufsummationen sind aus der Graphik zu entnehmen. Für die Aufsummationen wurden mindestens 250 Einzelregistrierungen pro Darstellung verarbeitet. Da es sich hierbei um die Addition einer unterschiedlichen Anzahl statistischer Ereignisse handelt, wurde in der Abbildung auf die Skalierung der Ordinate verzichtet.

Die beiden Zeitkonstanten der angepaßten di-exponentiellen Funktion für die Kontrollregistrierung entsprechen mit  $\tau_0 = 1.02$  und  $\tau_1 = 5.26$  nahezu den berechneten Werten aus den Ganzzellversuchen ( $\tau_0 = 1.02 \pm 0.09$ ,  $\tau_1 = 4.70 \pm 0.46$ ; s. Anhang). Gleiches gilt auch für die Anpassung an die Stromverläufe der aufsummierten Einzelkanalereignisse unter dem Einfluß der beiden Anemontoxine (*APE 1-1*:  $\tau_0 = 3.3$ ,  $\tau_1 = 18.3$ ; *APE 1-2*:  $\tau_0 = 3.89$ ,  $\tau_1 = 31.12$ ).



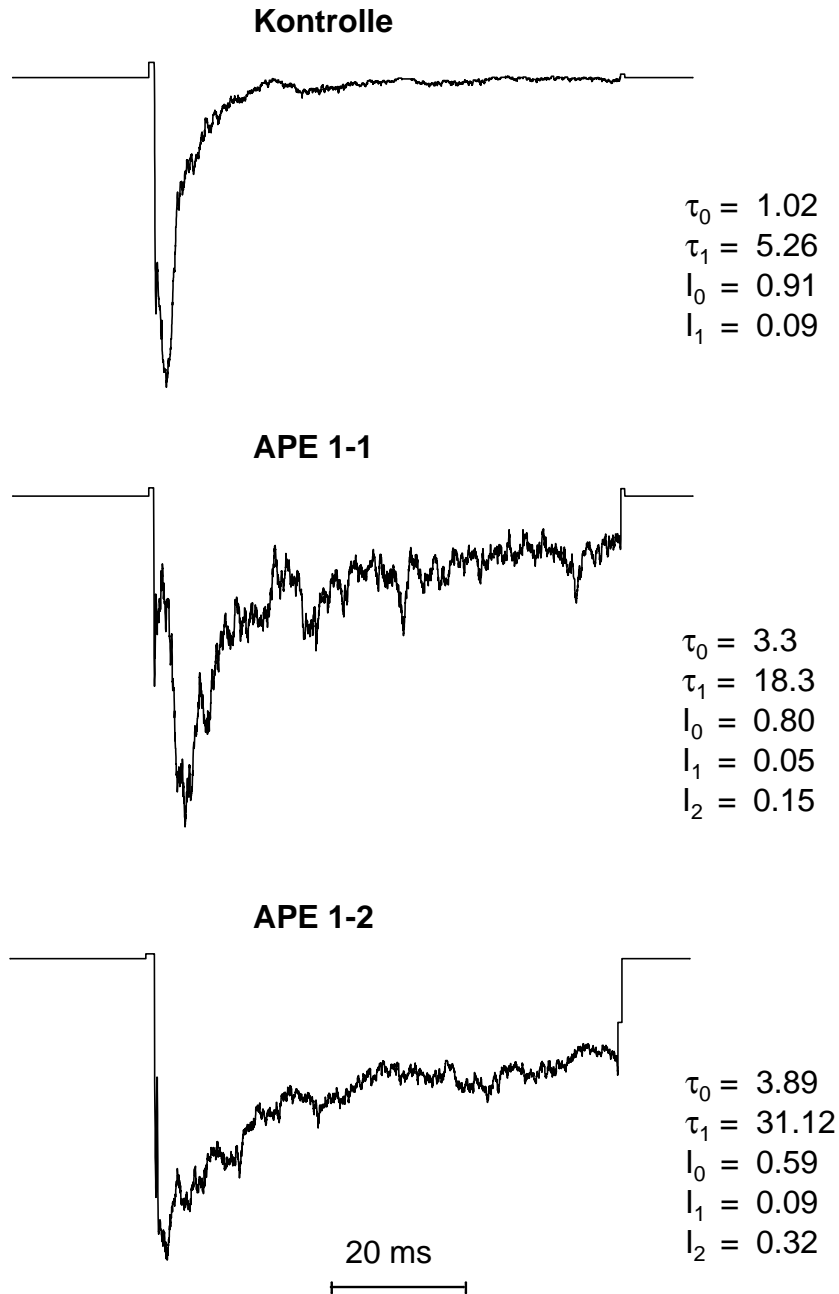


Abbildung 3.27: Vergleich aufsummierter Einzelkanalregistrierungen in Ringerlösung (*Kontrolle*,  $n=411$ ) und nach Applikation der Anemonentoxine *APE 1-1* ( $n=255$ ) und *APE 1-2* ( $n=326$ ). Die zusätzlich dargestellten Inaktivierungsparameter wurden gemäß der Funktion  $I_{Na}(t) = I_0(0)e^{-\frac{t}{\tau_0}} + I_1(0)e^{-\frac{t}{\tau_1}} + I_2$  errechnet. Membranpotential  $U_M = 10 \text{ mV}$ ; Impulsdauer  $70 \text{ ms}$ .

### 3.3 Darstellung der Anemonentoxine

Für eine Erforschung der genauen Struktur-Wirkungsbeziehung ausgesuchter Anemonentoxine müssen selbstverständlich die Fraktionen in ausreichender Menge vorliegen und zusätzlich deren Aminosäuresequenzen für die Strukturanalysen ermittelt werden. In den folgenden Kapiteln werden die Ergebnisse der Toxingewinnung und der Aufschlüsselung näher dargestellt. Gewonnen wurden diese Daten in enger Zusammenarbeit mit Prof. L. Béress und Dr. E. Wachter. Die Abbildungen entstanden mit freundlicher Unterstützung von Dr. T. Bruhn.

#### 3.3.1 Isolation der aktiven Substanzen

Um von den kompletten Seeanemonen *Anthopleura elegantissima* und *Anemonia sulcata* zu den einzelnen Toxinen zu gelangen, mußte das jeweilige Rohmaterial über mehrere Schritte aufgereinigt werden. Da es sich bei den Fraktionen um geringfügig veränderte Polypeptide nahezu gleicher Länge handelt, bietet sich bei der Aufreinigung vornehmlich die Ionenaustauschchromatographie an, da biologische Verbindungen entsprechend ihrer Gesamt-Nettoladung mit dieser Methode besonders gut voneinander getrennt werden können. Ein weiterer Vorteil dieser Methode liegt in dem Einsatz großer Probenvolumina, was den Ertrag der äußerst geringen Toxinmengen aus den Tieren begünstigt. Die Abbildungen 3.28 und 3.29 zeigen zusammenfassend die Ergebnisse der verschiedenen Aufreinigungsschritte.

Die erste Stufe der Aufreinigung erfolgte mit Hilfe des Anionenaustauschers *QAE Sephadex A25* (A). Die gesuchten, toxischen Polypeptide befanden sich hierbei in den ersten Elutionsvolumina (schraffierte Fläche). Anschließende Gelfiltrationen an *Sephadex G50* (B,C) mit jeweils unterschiedlichen Durchflußraten (6 ml/min; 3 ml/min) trennte das Toxingemisch weiter von den übrigen unerwünschten Proteinen ab, so daß eine zusätzliche Anionenaustauschchromatographie an *QAE Sephadex A25* zu einem Fraktionsgemisch führte, welches an der Scherenmuskulatur der Gemeinen Strandkrabbe *Carcinus maenas* getestet, bereits starke Toxizität aufwies.

Diese QAE-Fraktion 1 führte im folgenden Kationenaustauscher *EMD SO<sub>3</sub><sup>-</sup>-650 M* (D) zu einer groben Auftrennung in die Toxinfraktionen *APE 1, 2, 3, 4* und *5*. Die Elution erfolgte mit einem langsam ansteigenden Gradienten eines Ammonium-Acetat Puffers von 0.01 bis 1.0 M. Die fünf toxischen Fraktionen wurden anschließend an *Sephadex G25* entsalzt und gefriergetrocknet (liophilisiert).

Von der insgesamt eingesetzten Menge an Rohmaterial (4 l Wasser-Methanol Rohextrakt) ergab diese Aufreinigung am Ende 40 mg *APE 1*, 100 mg *APE 2*, 10 mg *APE 3*, 20 mg *APE 4* und 50 mg *APE 5-3*. Lediglich die Toxinmengen von *APE 1,2* und *5* reichten mengenmäßig für die neurophysiologischen Untersuchungen aus. Abschließend ergab eine HPLC (*High-performance liquid chromatography*) an C18-Material, daß die Fraktionen *APE 1,2* und *5* aus einem Gemisch sehr ähnlicher Isotoxine bestanden, die nach weiterer Aufreinigung und Entsalzung mit *APE 1-1*, *APE 1-2*, *APE 2-1*, *APE 2-2*, *APE 5-1*, *APE 5-2* und *APE 5-3* bezeichnet wurden. Während sämtlicher Aufreinigungsschritte wurde die Toxizität des eluierten Materials und der letztendlich selektierten Isotoxine an Krabben getestet. Dabei stellte sich nur für die Isotoxine *APE 1-1*, *1-2*, *2-1*, *2-2* und *APE 5-3* eine Giftwirkung ein. Diese Fraktionen standen aufgereinigt und gefriergetrocknet weiteren neurophysiologischen Untersuchungen und Sequenzierungen zur Verfügung.

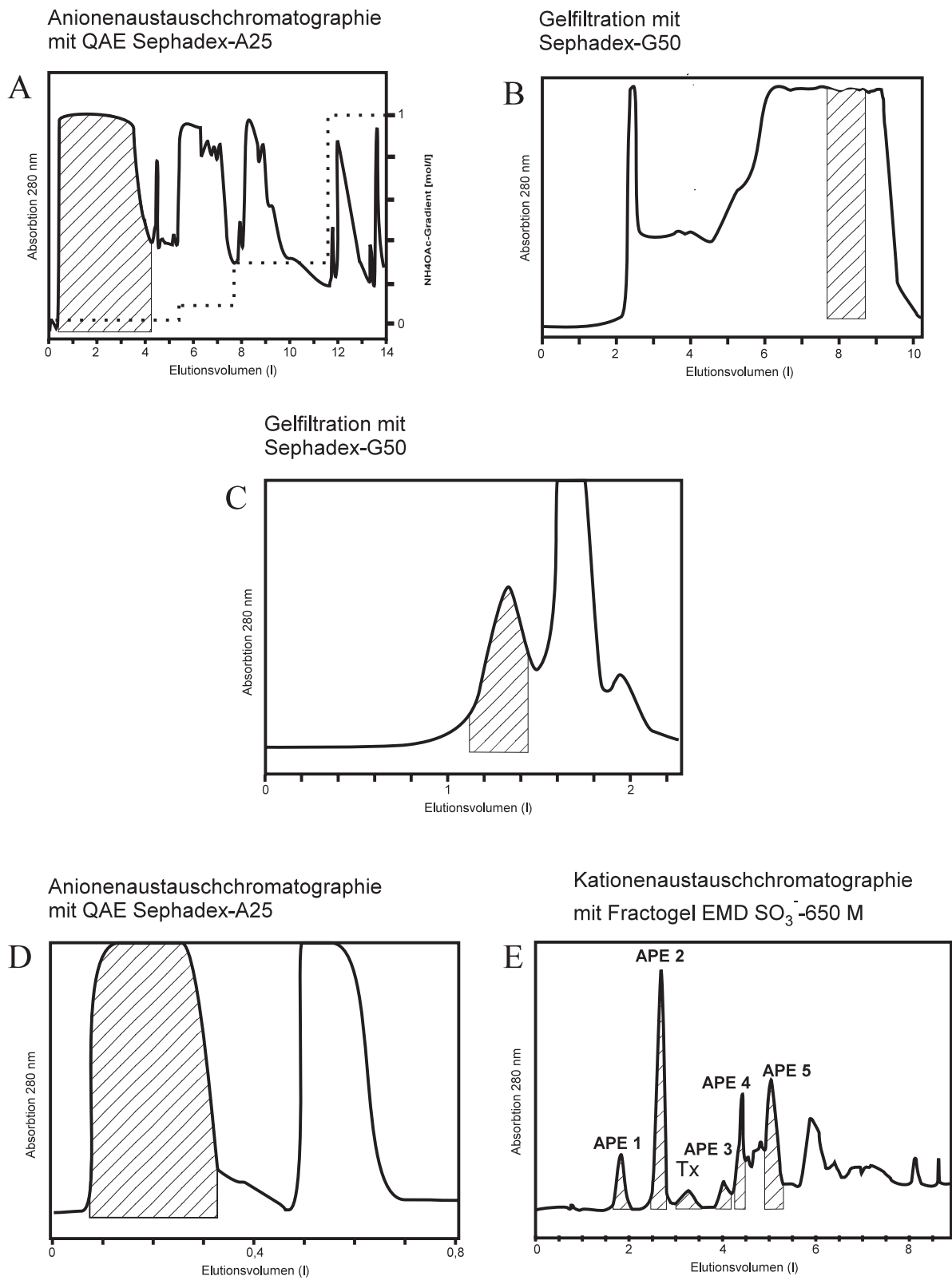


Abbildung 3.28: Isolationschritte zur Trennung toxischer Polypeptide der Seeanemone *Anthopleura elegantissima* (Brandt).

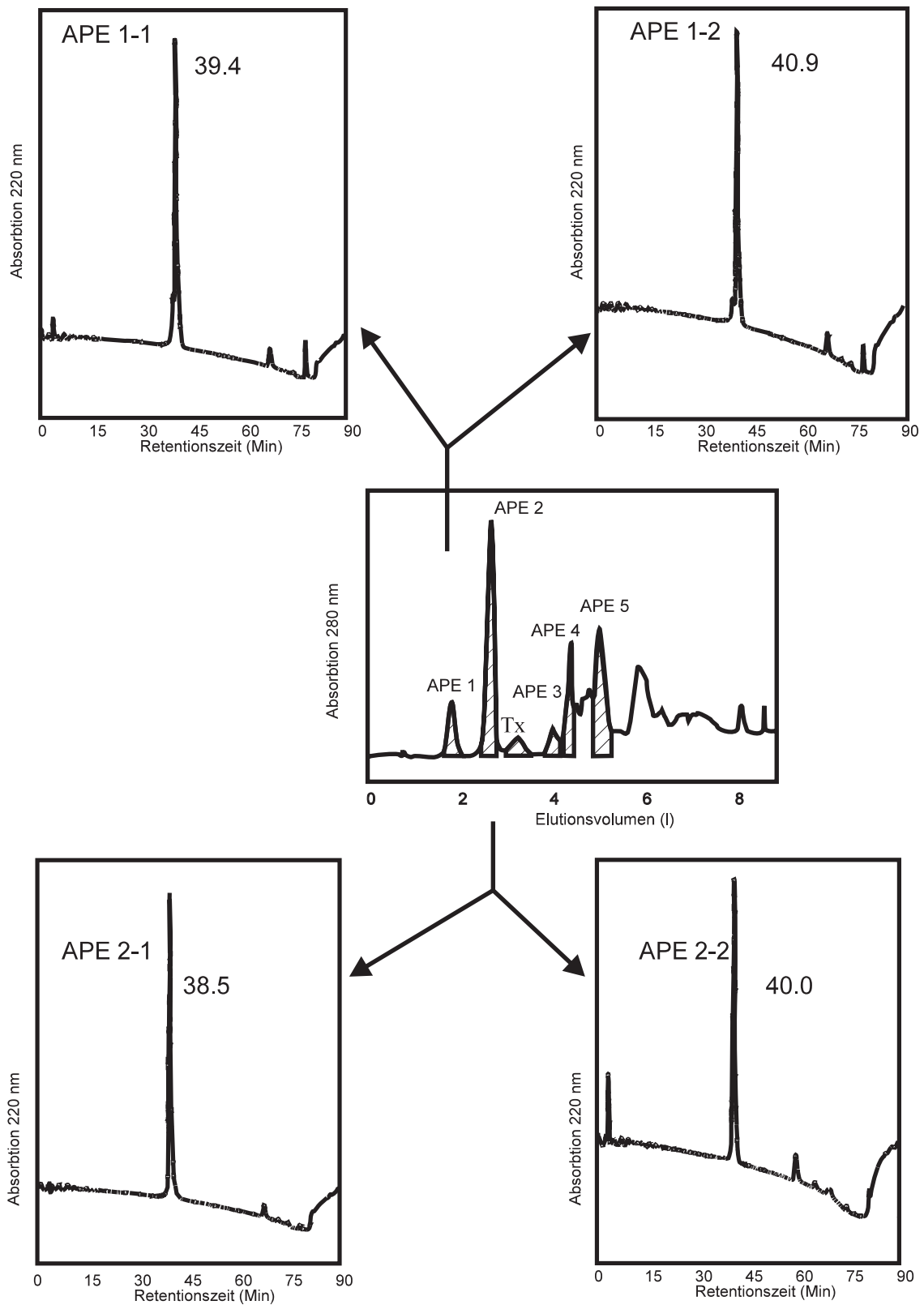


Abbildung 3.29: HPLC-Studien biologisch aktiver Polypeptide der Seeanemone *Anthopleura elegantissima* (Brandt).

### 3.3.2 Determination der Aminosäuresequenzen

Durch klassische Säulenchromatographie ließen sich die Isotoxine nur schwer voneinander trennen. Ursache hierfür sind große Homologien in der Aminosäuresequenz zwischen den Polypeptiden. Um diese Unterschiede herauszufinden, mußte die Primärstruktur der jeweiligen Fraktionen durch Proteinsequenzierung aufgeschlüsselt werden. Dabei bestätigte die Sequenzierung, die sich auf den Edman-Abbau gründet, daß die Isotoxine in Anzahl und Abfolge der Aminosäuren tatsächlich nur geringfügig voneinander abweichen (Abb. 3.30).

Bis auf *ATX Ia*, welches aus 46 Aminosäuren aufgebaut ist, bestehen sämtliche dargestellten Fraktionen aus 47 AS und gehören allesamt mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 5000 Dalton zur Klasse der Typ I Toxine (vgl. 1.3) an (KEM & DUNN, 1988; KEM *et al.*, 1989). Die Toxine mit der Abkürzung *ATX* entstammen dem Rohmaterial der Anemone *Anemonia sulcata*, die mit der Abkürzung *APE* aus *Anthopleura elegantissima*.

	10	20	30	40
<i>ATX Ia</i>	GAACLCKSDGPNTRGNSMSGTIWVFGCPGWNNCEGRA-IIGYCCKQ			
<i>APE 1-1</i>	GIACLCDSDGPSVRGNTLSGTIYWLACPSGWHNCKSSGQLIGACCKQ			
<i>APE 1-2</i>	GVPCLCDSDGPNVRGNTLSGTIYWLACPSGWHNCKSSGPLIGACCKQ			
<i>APE 2-1 (AP-C)</i>	GVPCLCDSDGPSVRGNTLSGIILWLAGCPGWNNCKAHGPTIGWCCKQ			
<i>ATX II</i>	GVPCLCDSDGPSVRGNTLSGIILWLAGCPGWNNCKKHGPTIGWCCKQ			
	10	20	30	40

Abbildung 3.30: Aminosäuresequenzen verschiedener Toxine der Seeanemonen *Anthopleura elegantissima* (*APE*) und *Anemonia sulcata* (*ATX*).

Auffällig bei der Sequenzanalyse sind die zahlreichen homologen Bereiche (grau unterlegt) unter den verschiedenen Toxinen, deren Homologität untereinander bei mindestens 60% liegt. Ohne Einbeziehung der Fraktion *ATX Ia*, deren Sequenz beson-

ders deutlich von der Grundstruktur der übrigen Fraktionen differiert, liegt dieser Anteil sogar bei über 80%. Die beiden Toxine *APE 2-1* und *ATX II* weisen sogar eine Homologie von über 95% auf und unterscheiden sich lediglich an zwei Positionen (Position 12 und 36). *APE 1-1* und *APE 1-2* weichen in vier Positionen voneinander ab (Position 2,3,12,39) und stimmen zu mehr als 90% in ihrer Struktur überein. Ausgesprochen konservativ verhalten sich der carboxyterminale Bereich mit *Cystein-Cystein-Lysin-Glutamin* und die aminoternale Anfangsregion mit Glycin bei allen aufgeführten Peptiden.

Heterogenitäten, die u.U. Auswirkungen auf die Tertiärstruktur haben könnten, finden sich vornehmlich an folgenden Positionen:

- Position 4: Es findet sich beim *APE 1-1* ein Alanin (A) anstelle des Prolins (P), welches in der Architektur von Proteinen i.d.R. eine wesentliche Rolle spielt.
- Position 12: In *APE 1-2* erscheint Asparagin (N) das Amid des sauren Asparats anstelle des hydrophilen Serins (S)
- Position 21: Das hydrophile Threonin (T) bei *APE 1-1* und *APE 1-2* anstatt des hydrophoben Isoleucins (I)
- Position 22: Austausch von Leucin (L) und des ähnlichen Isoleucins (I) gegen das aromatische Tyrosin (Y) bei *APE 1-1* und *APE 1-2*
- Position 36/37: *APE 1-1* und *APE 1-2* besitzen zwei hydrophile Serine (S) anstelle der basischen AS Lysin (H) und Histidin (K)
- Position 39/40: Bei *APE 1-1* tritt anstelle eines Prolins (P) Glutamin (Q) und das hydrophile Threonin wird bei *APE 1-1* und bei *APE 1-2* durch ein Leucin (L) ersetzt.

Beim *ATX Ia* tauchen zusätzlich zu den Veränderungen an den aufgeführten Positionen noch weitere acht Substitutionen auf. Dieses Toxin wurde in die Analyse

mit einbezogen, da es in der Vergangenheit Bestandteil zahlreicher Untersuchungen war und somit bereits ausführlich beschrieben wurde (NORTON 1991). Vorversuche zeigten an den Zellen der Linie *N1E-115* jedoch keine erkennbare Wirkung auf das Verhalten des Natriumkanals.

### 3.3.3 Dreidimensionale Proteinstruktur

Die dreidimensionale Struktur der in Abbildung 3.31 aufgeführten Anemonentoxine konnte mit Hilfe des *Experimental Swiss-Model Protein Modelling E-mail Servers* konstruiert werden. Dabei werden bereits vorhandene NMR Daten (*magnetische Kernresonanzspektroskopie*) von altbekannten Polypeptiden mit neuen Aminosäuresequenzen verglichen und entsprechend neu modifiziert. Wie bereits die Aufschlüsselung der Primärstruktur zeigte, befinden sich innerhalb der Toxine große Bereiche homologer Strukturen, so daß die dreidimensionale Topologie dieser Moleküle ebenfalls große Ähnlichkeiten aufweist. Besonders konservativ verhalten sich hierbei die Cystein-Reste an den Positionen 4,6,27,34,44 und 45 bei allen untersuchten Fraktionen. Durch die Anwesenheit dieser Aminosäuren kommt es innerhalb der Moleküle zur Ausbildung von drei Disulfidbrücken und zwar zwischen den Cystein-Resten 4 ~ 45, 6 ~ 34 und 27 ~ 44. Hierdurch entstehen Polypeptide mit einer stark rotierenden, vier-strängigen, antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt Struktur, die über drei definierte Schleifen miteinander in Verbindung stehen. Cys-4 und Cys-6 gehören zum ersten, Cys-45 (*ATX Ia*: Cys-44) zum dritten und Cys-34 zum vierten Strang des  $\beta$ -Faltblattes. In unmittelbarer Umgebung zu diesen Disulfidbrücken befinden sich hydrophobe Sequenzbereiche, die zur Ausbildung eines hydrophoben Zentrums innerhalb der Toxine führen (FOGH *et al.* 1990, WIDMER *et al.* 1989).

Durch die Sequenzunterschiede treten Veränderungen vornehmlich an der Oberfläche der Moleküle auf, die sich dort auf die räumliche Struktur auswirken. In der Abbildung 3.31 werden diese oberflächlichen Divergenzen nach Rotation der Toxine anhand der unterschiedlichen Abdeckung der Asparaginsäure in Position 7 und 9



(rot) erkennbar. Desweiteren zeichnen sich besonders *APE 2-1* und *ATX II* durch eine höhere Anzahl hydrophober AS in diesem Bereich aus. Auch der höhere Anteil basischer AS an der Oberfläche dieser beiden Toxine führt zu Veränderungen, die besonders *ATX II* im Vergleich zu den Toxinen *APE 1-1* und *APE 1-2* kompakter erscheinen läßt.

In der Abbildung gekennzeichnet ist die AS-Substitution von *APE 1-1* an Position 22 ( $Y_{22}$ ) und 39 ( $Q_{39}$ ), wo bei den Isotoxinen *APE 1-1* und *APE 1-2* die Struktur des aromatischen Tyrosins sichtbar wird. Dieser Austausch verändert im Vergleich zu den anderen beiden Toxinen den hydrophoben Charakter dieser Oberflächenregion zuungunsten dieser zwei Isotoxine. Verstärkt wird dieser Effekt beim *APE 1-1* zusätzlich durch den Austausch von Glutamin gegen Prolin in Position 39, welches sich an der Oberfläche in unmittelbarer Nähe zum Tyrosin 22 befindet. Offensichtlich treffen in dieser Region die beiden großen Schleifen aufeinander, so daß Substitutionen an dieser Stelle zu Veränderungen in der Architektur des Moleküls führen und diesen ansonsten hydrophoben Bereich chemisch modifizieren können.

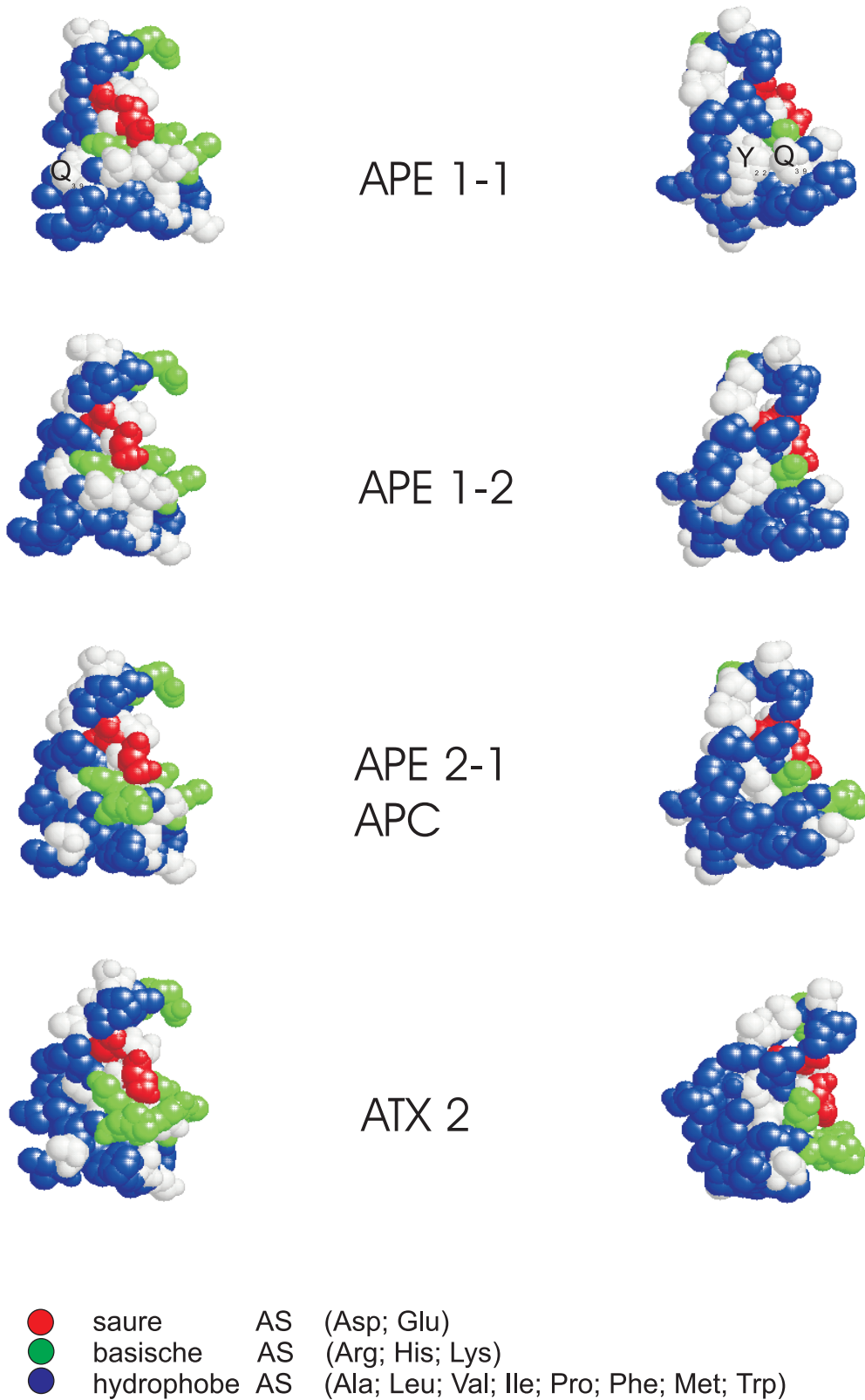


Abbildung 3.31: 3D-Modelle der Proteinstruktur verschiedener Toxine der Seeanemonen *Anthopleura elegantissima* (APE) und *Anemonia sulcata* (ATX).

# Kapitel 4

## Diskussion

Ziel dieser Untersuchungen war es, elektrophysiologisch anhand von Ganzzell- und Einzelkanaluntersuchungen die Wirkung von verschiedenen Isotoxinen der Seeanemonen *Anthopleura elegantissima* und *Anemonia sulcata* an spannungsinduzierbaren Natriumkanälen von Neuroblastomzellen der Linie N1E-115 näher zu untersuchen und Struktur-Wirkungsunterschiede herauszufinden. Ein besonderes Interesse bestand darin, eine Erklärung für Veränderungen des makroskopischen Natriumstromes durch die Analyse des Einzelkanalverhaltens zu finden. Desweiteren stellte sich die Frage, welche Auswirkung minimale Aminosäuresubstitutionen der isolierten Anemonentoxine auf die Steuerung der Natriumkanäle haben.

Bei den verwendeten Toxinen handelte es sich um Polypeptide, die in ihrer Struktur eine Kette aus 46-47 Aminosäuren bilden und intramolekular durch 2-3 Disulfidbrücken stabilisiert sind. In Toxizitätstest im Labor von Prof. L. Béress erwiesen sich im Vorfeld der Untersuchungen Strandkrabben (*Carcinus maenas*) besonders empfindlich gegenüber diesen Toxinen, während die Giftwirkung an Säugerzellen (Herzmuskelzellen) unterschiedlich ausfiel (RAVENS, 1976; RAVENS *et al.*, 1995). Spezifischer Angriffspunkt dieser Toxine sind die Natriumkanäle von Nervenmembranen. Mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik (NEHER & SAKMANN, 1976; HAMILL *et al.*, 1981) ist es möglich, die Auswirkungen auf die Kinetik des transienten Na-

triumstromes zu untersuchen.

Als Untersuchungsobjekt bewährten sich die Säuger-Tumorzellen der Linie N1E-115, da sie einfach zu züchten (SPECTOR, 1981) und ihre Ionenströme vergleichbar mit denen anderer erregbarer Gewebe sind (MOOLENAR & SPECTOR, 1978; ALDRICH *et al.*, 1983).

## 4.1 Versuche in Ringerlösung

Die spannungsabhängigen Natriumkanäle sind verantwortlich für den steilen Anstieg des Aktionspotentials in Nerven- und Muskelzellen. Klassische Voltage-Clamp-Experimente am Tintenfisch-Axon (HODGKIN & HUXLEY, 1952) und anderen erregbaren Membranen (FRANKENHAEUSER, 1960; ULBRICHT & SCHMIDTMAYER, 1981; GONOI & HILLE, 1987), sowie an den hier verwendeten N1E-115 Zellen (MOOLENAR & SPECTOR, 1978; ALDRICH *et al.*, 1983) konnten zeigen, daß die Permeabilität der Membran bei anhaltender Depolarisation ( $U_M \approx 0 \text{ mV}$ ) für Natriumionen zunächst rasch ansteigt und anschließend relativ langsam auf Null zurückgeht. Dabei wird allgemein angenommen, daß die Natriumkanäle zunächst aktiviert werden, was zum Öffnen der Kanäle führt und unmittelbar danach die Inaktivierung einsetzt, die das Schließen der Kanäle bewirkt (ARMSTRONG, 1981; BEZANILLA, 1985; PATLAK, 1991; SIGWORTH, 1983; KEYNES & MEVES, 1993). Der abnehmende Stromverlauf, eingeleitet durch die einsetzende Inaktivierung, kann an eine Exponentialfunktion angepaßt werden, die nach früheren Vorstellungen einen monophasischen (HODGKIN & HUXLEY, 1952; ALDRICH & STEVENS, 1987; QUANDT, 1988), nach heutiger Ansicht jedoch einen diphasischen Verlauf hat (CHIU, 1977; SCHMIDTMAYER, 1989; NIEMANN 1990). Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigten die Diphasizität dieser Inaktivierung sowohl bei den Ganzzell- als auch bei den aufsummierten Einzelkanalströmen. In den Kontrollversuchen nahmen mit ansteigendem Membranpotential die beiden Zeitkonstanten ab, wobei mit  $\emptyset$  95% die Konstante  $\tau_0$ , die den schnellen Anteil der Inaktivierung beschreibt (vgl. NAGY *et*

*al.*, 1983; NIEMANN, 1990), den weitaus größeren Anteil hatte.

Charakteristisch für den Natriumstrom ist seine Abhängigkeit vom Reizpotential  $U_M$ . Meßbare Größe hierfür ist der Natriumspitzenstrom ( $I_{peak}$ ). Dieser steigt mit zunehmendem Potential an, da proportional hierzu die Anzahl der aktivierten Kanäle zunimmt und die auf die Natriumionen wirkende elektromotorische Kraft die Ionen in die Zelle treibt (ECKERT & RANDALL, 1986). Nach Durchlaufen des Maximums in der Strom-Spannungskurve ( $U_M \approx 0 \text{ mV}$ ) nimmt diese treibende Kraft, aufgrund der Annäherung an das  $Na^+$ -Gleichgewichtspotential allmählich ab. Dieser Natriumfluß durch die Membran ist das Ergebnis der *Membranleitfähigkeit*, d.h. der statistischen Anzahl geöffneter Kanäle und der *elektrochemischen Triebkraft* auf dieses Ion (KANDAL, SCHWARTZ & JESSEL, 1996).

Wie die Einzelkanalergebnisse zeigten, besitzen die Natriumkanäle zwei Zustände, einen offenen und einen geschlossenen, wobei jeder Kanal nach der Alles-oder-Nichts-Regel öffnet. Im offenen Zustand fließt durch den Kanal ein pulsartiger Strom mit konstanter Amplitude aber unterschiedlicher Dauer. Die Leitfähigkeit für den Einzelkanal, die sich aus der Strom-Spannungs-Beziehung ergibt, liegt zwischen 10 und 14  $pS$  (NAGY *et al.*, 1983; QUANDT & NARAHASHI, 1982; NIEMANN, 1990). Werden aktivierbare Natriumkanäle über einen Spannungspuls gereizt, öffnen diese unmittelbar, häufig mehrmals hintereinander. Nahezu gleichzeitig setzt jedoch ebenfalls die Inaktivierung ein, so daß es nach ca. 10  $ms$  trotz anhaltender Depolarisation zu keiner weiteren Öffnung kommt. Der Kanal befindet sich im inaktiven, geschlossenen Zustand. Der Verlauf der Inaktivierung ist spannungsabhängig und wird proportional zum ansteigenden Membranpotential schneller.

## 4.2 Toxinapplikation

Die Applikation der Anemiontoxine von *Anthopleura elegantissima* und *Anemonia sulcata* zeigte vor allem Auswirkungen auf die Kinetik der Inaktivierung. Beide Inaktivierungszeitkonstanten waren nach Toxingabe deutlich verlängert, und es bildete

sich zusätzlich eine persistierende Komponente aus. Es kam zu einer teilweisen Aufhebung der Inaktivierung. Offensichtlich unterschieden sich bezüglich der Wirkung auf den Inaktivierungsmechanismus des Natriumkanals zwei Gruppen von Toxinfraktionen, die ein vollständiges Schließen des Kanals mit einer Wahrscheinlichkeit von 20% (*APE 1-1*, *ATX II*) oder 40% (*APE 1-2*, *APE 2-1*, *APE 5-3*) bei einer Toxinkonzentration von  $5\mu\text{g/ml}$  und einer Kommandospannung von  $U_M \approx 0\text{ mV}$  verhinderten. Andere zuvor an N1E-115-Zellen geteste Gifte und chemische Substanzen zeigten auf diesen Kanal-Mechanismus ähnliche Wirkungen: *Chloramin T* (NIEMANN, 1990); *APE 2-2*, *APE 2-1* (AFRA, 1998); *AP-A* (KODOMA *et al.*, 1981; NORTON *et al.*, 1986; SHEETS *et al.*, 1995; WASSERSTROM *et al.* 1993); *AP-B* (NORTON *et al.* 1978, 1981; NORTON *et al.*, 1986; BENZINGER *et al.*, 1998).

Eine Zunahme des Spitzenstromes ( $I_{peak}$ ), wie es nach Gabe von *Chloramin T* der Fall ist (NIEMANN, 1990), konnte nach Applikation der Anemontoxine nicht festgestellt werden, daher kann die These von RUIGT *et al.* (1987), daß *Gate modifier* sog. *stille* Kanäle aktivieren, nicht bestätigt werden. Allerdings kam es unter dem Einfluß der Toxine (*APE 2-1*, *APE 5-3*) zu einer Verschiebung der Strom-Spannungskurve sowohl zu negativeren Potentialen (*APE 5-3*: ca.  $10\text{ mV}$ ) als auch zu positiveren Potentialen (*APE 2-1*: ca.  $20\text{ mV}$ ). Aus diesem Grund könnte es bei der Betrachtung eines einzigen Potentials zu scheinbaren Veränderungen des Natriumspitzenstromes kommen.

Der persistierende Natriumstrom zeigte ebenfalls eine Strom-Spannungsabhängigkeit. Allerdings lag das Maximum für die persistierende Komponente unter dem Einfluß aller applizierten Toxine (Ausnahme *APE 1-1*) im Vergleich zu den entsprechenden Spitzenstrommaxima um  $\Delta U_M \approx 10\text{ mV}$  zu positiveren Potentialen verschoben. Gerade bei diesen höheren Potentialen ( $U_M > 10\text{ mV}$ ) stieg auch die Wirkung der Toxine auf den Inaktivierungsmechanismus, was anhand der relativen Größe des persistenten Natriumstromes erkennbar wurde, wohingegen  $I_{peak}$  zunehmend absank. Durch diese unterschiedliche Potentialabhängigkeit zwischen diesen bei-

den Stromkomponenten kam es innerhalb der Originalregistrierungen zu den beschriebenen *crossing-over*-Erscheinungen, die zuvor bereits von NIEMANN (1990) für die Wirkung von *Chloramin T* beschrieben worden sind. Diese Differenz in der Potentialabhängigkeit dieser beiden Stromkomponenten war besonders anhand des Quotienten persistierender Strom zu Spitzenstrom ( $I_{pers}/I_{peak}$ ) zu erkennen. Mit zunehmendem Potential fiel dabei das Verhältnis zugunsten des Plateaustromes ( $I_{pers}$ ) aus. Die Homogenität der Natriumkanäle erlaubte es, Rückschlüsse diesbezüglich aus der Einzelkanalanalyse zu ziehen. Dabei stellte sich heraus, daß durch die Giftwirkung die Kanäle auch in der Phase der Inaktivierung öffneten und dieses Öffnungsverhalten potentialabhängig war. Die Ausbildung von Gruppenentladungen (*Bursts*) spielte hierbei eine große Rolle. So nahmen unter dem Einfluß der Toxine sowohl die Anzahl als auch die Dauer der einzelnen Öffnungen pro Burst zu, wohingegen die Schließzeiten pro Burst abnahmen. Hieraus resultierten letztendlich die Veränderungen im Gesamtstromverlauf, die sich besonders in dem persistierenden Stromanteil äußerten. Seit längerem ist die Wirkung der Anemontoxine auf die Inaktivierung und auch auf die Aktivierung bekannt (CATTERALL, 1980; NARAHASHI *et al.*, 1969; BERGMAN *et al.*, 1976; ROMÉY *et al.*, 1976; ULBRICHT & SCHMIDTMAYER, 1981). Wie bedeutend die Giftwirkung auf die Aktivierung ist, beschreibt die *mittlere Latenzzeit (time to peak)* von Beginn des Reizes bis Erreichen des Spitzenstromes, die unter dem Toxineinfluß wenn überhaupt nur geringfügig anstieg. Der Einfluß der Anemontoxine beschränkte sich demnach im wesentlichen auf die Inaktivierung. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, inwiefern Aktivierung und Inaktivierung sich gegenseitig beeinflussen oder in irgendeiner Abhängigkeit zueinander stehen.

Vermutlich ist die Aktivierung eng mit den  $S_4$ -Segmenten des Natriumkanals verbunden (vgl. 1.1). Diese Segmente enthalten positiv-geladene Arginin- und Lysinreste, die teilweise über die Membran herausragen und als Spannungssensoren die Potentialabhängigkeit des Kanals bewirken (NODA *et al.*, 1986; GREENBLATT *et al.*, 1985; GUY & CONTI, 1990). Die für die Inaktivierung verantwortlichen Regionen,

die quasi das Aktivierungstor darstellen, werden hingegen eher auf der cytosolischen Seite im Bereich der Schleife zwischen D3 und D4 vermutet (VASSILEV *et al.*, 1988; STÜHMER *et al.*, 1989; PATTON *et al.*, 1992). Versuche mit Pronase, die von der cytosolischen Seite appliziert, die Inaktivierung völlig aufhebt, bestätigten diese Vermutung (ARMSTRONG *et al.*, 1973).

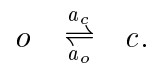
Offensichtlich liegen die für beide Prozesse verantwortlichen Regionen nicht in unmittelbarer Nähe zueinander. Wohl aus diesem Grund konnte bisher eine Kopplung zwischen Aktivierung und Inaktivierung noch nicht eindeutig nachgewiesen werden. Anfangs gingen HODGKIN & HUXLEY (1952) davon aus, daß beide Prozesse unabhängig voneinander seien. ARMSTRONG & BEZANILLA (1977) vertraten die Meinung, die Inaktivierung hängt direkt von der Aktivierung ab. KEYNES (1992) behauptete sogar, daß sich die Inaktivierung auf verschiedenen Aktivierungszuständen gründet. Seitdem gehen die Meinungen diesbezüglich stark auseinander. Zahlreiche Untersuchungen an Natriumkanalmutanten konnten bis dato noch keinen eindeutigen Aufschluß darüber geben, ob eine Kopplung vorliegt oder nicht (O'LEARY *et al.*, 1995; FILATOV *et al.*, 1998). CUMMINS *et al.* (1998) versuchten in jüngster Zeit den Kompromiß einzugehen, daß verschiedene Kanalisformen auch unterschiedliche Kinetiken und Abhängigkeiten auf die Inaktivierung ausprägen.

Insgesamt beschränkt sich die Wirkung der Toxine, wie auch die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, im wesentlichen auf einer Beeinflussung der Inaktivierung. Dieser Befund ist bei der Wahl eines geeigneten stochastischen Modells zur Berechnung simulierter Natriumströme von Bedeutung. Ein derartiges Modell soll einen Zusammenhang zwischen *mikroskopischen* Einzelkanal- und *makroskopischen* Gesamtströmen herstellen und somit die Ergebnisse dieser beiden Analysen vergleichbar machen. Im weiteren Verlauf dieser Diskussion geht es daher um die Wahl eines geeigneten Modells zur Berechnung der diphasischen Inaktivierung.



### 4.3 Modellbetrachtungen

Wie bereits erwähnt, gingen ursprünglich HODGKIN & HUXLEY (1952) von einer Unabhängigkeit der Aktivierung und der Inaktivierung aus. Für das Permeabilitätsverhalten des Natriumkanals lag dabei folgendes klassisches Modell zugrunde: Während eines Stimulus springt der Kanal aus einem ruhenden, aktivierbaren Zustand in den aktivierten, offenen und anschließend in den inaktivierten, geschlossenen Zustand über. Kontrolliert werden diese Zustände durch das unterschiedliche, kinetische Verhalten des Aktivierungs- und des Inaktivierungstores. Die Membranleitfähigkeit  $g_{Na}$  für Natriumionen hängt von der Öffnungswahrscheinlichkeit dieser beiden Tore ab und ist direkt-proportional zu den beiden Parametern  $m$  und  $h$ .  $m$  beschreibt die Wahrscheinlichkeit, daß der Kanal aktiviert ist,  $h$  die Wahrscheinlichkeit, daß der Kanal *nicht* inaktiviert ist, so daß  $g_{Na} = \bar{g}_{Na} m^3 h$  ist.  $\bar{g}_{Na}$  entspricht dabei der theoretisch maximalen Leitfähigkeit.  $m$  und  $h$  sind potentialabhängig und nehmen Werte zwischen 0 und 1 an. Während des Ruhepotentials ist  $h$  nahezu 1 und  $m$  sehr klein, steigt jedoch nach Depolarisation des Membranpotentials schnell an, während  $h$  langsam abnimmt. Bleibt die Membran depolarisiert geht  $h$  langsam gegen 0 und beschreibt in seiner Kinetik den Übergang vom nicht-inaktivierten, geöffneten ( $o$ ) in den inaktivierten, geschlossenen ( $c$ ) Zustand, demnach den Verlauf der Inaktivierung:



$a_o$  und  $a_c$  stellen spannungsabhängige Geschwindigkeitskonstanten dar. Sie bestimmen bei einem gegebenen Potential sowohl die mittlere Aufenthaltsdauer im nicht-inaktivierten Zustand,  $t_0 = \frac{1}{(a_c + a_o)}$ , als auch die Zeitkonstante der Inaktivierung der gesamten Membran ( $\tau_h = t_0$ ), die dem Abfall des Natriumstromes nach Durchlaufen des Spitzenwertes entspricht. Allerdings bedeutet die Existenz lediglich einer Abfallszeitkonstanten ( $\tau_h$ ), daß der Gesamtstromverlauf der Inaktivierung nach Aussage dieses Zwei-Zustand-Modells nur mit einer monophasischen Exponentialfunktion angepaßt werden kann. Eine Anpassung mit nur einer Zeitkonstanten

ist jedoch nach heutiger Ansicht nicht mehr gültig. Vielmehr muß der Verlauf der Inaktivierung genaugenommen als diphasisch betrachtet und somit mit einer di-exponentiellen Funktion, wie es auch im Rahmen dieser Untersuchungen gemacht worden ist, beschrieben werden (CHIU, 1977; SCHMIDTMAYER, 1989; NIEMANN 1989). Die Existenz einer schnellen ( $\tau_0$ ) und einer langsamen ( $\tau_1$ ) Abfallszeitkonstante kann nicht mehr mit dem klassischen Zwei-Zustands-Modell erklärt werden, es sei denn, es gäbe zwei Kanalpopulationen mit unterschiedlicher Kinetik (BENOIT *et al.*, 1985). Doch die erwiesene Homogenität der Natriumkanäle erforderte eine Erweiterung des Hodgkin-Huxley-Modells, in der der Diphasizität Rechnung getragen wird.

CHIU (1977) entwickelte daraufhin ein Modell, in dem er einen zweiten geschlossenen Zustand  $c_2$  an das klassische Modell anfügte. Dieser Zustand  $c_2$  ist absorbierend. Die aus ihm herausführende Geschwindigkeitskonstante ( $a_{32}$ ) geht gegen Null.

$$o \quad \frac{a_{12}}{a_{21}} \quad c_1 \quad \frac{a_{23}}{a_{32}} \quad c_2.$$

Auch für dieses Modell gilt, daß Aktivierung und Inaktivierung unabhängig voneinander sind. Die zuvor mit  $\tau_h$  bezeichnete Inaktivierungszeitkonstante spaltet sich nunmehr in zwei Zeitkonstanten auf, die über die vier, ebenfalls potentialabhängigen Geschwindigkeitskonstanten  $a_{ij}$ , definiert sind:

$$\tau_0 = \frac{2}{[p + (p^2 - 4q)^{\frac{1}{2}}]} \quad (4.1)$$

$$\tau_1 = \frac{2}{[p + (p^2 - 4q)^{\frac{1}{2}}]} \quad (4.2)$$

$$q = a_{21}a_{32} + a_{32}a_{12} + a_{23}a_{12} \quad (4.3)$$

$$p = a_{21} + a_{12} + a_{23} + a_{32}. \quad (4.4)$$

Mit dem *Chiu*-Modell kann sowohl die Diphasizität des Inaktivierungsverlaufes aufgrund zweier Geschlossenzustände erklärt als auch ein Zusammenhang zu den *mikroskopischen* Strömen hergestellt und folgendermaßen beschrieben werden: Ein

hyperpolarisierender Vorimpuls bzw. ein geeignetes Haltepotential hebt die Inaktivierung vollständig auf, bringt sämtliche Natriumkanäle in den nicht-inaktivierten Zustand ( $h_\infty = 1$ ). Zu Beginn einer Potentialerhöhung ( $t = 0$ ) ist das Gleichgewicht ganz nach links verschoben, augenblicklich öffnen die Kanäle und verbleiben kurzfristig im offenen Zustand. Etwa zur gleichen Zeit setzt der Prozeß der Inaktivierung ein und verschiebt das Gleichgewicht nach links in die zwei geschlossenen inaktivierten Zustände. Aus dem Zustand  $c_1$  kann ein Kanal entweder zurück in den offenen Zustand ( $o$ ) oder aber in den absorbierenden ( $c_2$ ) wechseln. Die Verweildauer in einem dieser Zustände ist dabei gleich der reziproken Summe der aus diesen führenden Geschwindigkeitskonstanten ( $a_{ij}$ ). Auch das Burstverhalten des Einzelkanals, wie es sich besonders unter der Toxinwirkung einstellte, kann mit Hilfe dieses Modells erklärt und die in der Burstanalyse (vgl. 3.2.4) definierten Offen- und Schließzeiten formell mit den Übergangsraten wie folgt in einen Zusammenhang gebracht werden:

- $\overline{B}_o = \frac{1}{a_{12}}$ : die mittlere Öffnungsdauer innerhalb der Bursts. Die Übergangskonstante  $a_{12}$  beschreibt die Wahrscheinlichkeit des Kanals, sich in diesem Offenzustand zu befinden
- $\overline{B}_c = \frac{1}{a_{21}+a_{23}}$ : die mittlere Schließzeit innerhalb der Bursts
- $\overline{B}_g = \frac{1}{a_{32}}$ : das Intervall zwischen den Bursts.

Kommt es zu einer vollständigen Inaktivierung, geht die Übergangsrate  $a_{32}$  gegen Null ( $\lim_{a_{32} \rightarrow 0}$ ), d.h. die Wahrscheinlichkeit, zurück zu  $c_1$  zu gelangen, ist sehr gering, das Auftreten von Bursts wird unterdrückt. Dies gilt jedoch nur für das Einzelkanalverhalten in Ringerlösung.

Unter dem Einfluß von Toxinen, wie den Anemonentoxinen, die die Inaktivierung beeinflussen und die Entstehung persistierender Ströme bewirken, müssen sich offensichtlich die Übergangskonstanten verändern. Dabei könnte zum einen  $c_2$  nicht vollständig absorbierend sein,  $a_{32}$  erreicht einen Wert größer Null, so daß es zum vermehrten Auftreten von Bursts kommen kann. Zum anderen könnten die Konstanten,

die in oder aus dem Zustand  $c_1$  führen, verändert sein, was z.B. eine verlängerte, mittlere Öffnungsdauer ( $\overline{B}_o$ ) der Kanäle erklären würde. Aufschluß hierüber soll im folgenden die Berechnung dieser Übergangskonstanten aus den ermittelten Ergebnissen liefern.

### 4.3.1 Berechnung der Übergangskonstanten

Ziel dieser Berechnungen war es, die mikroskopischen und makroskopischen Ergebnisse der Untersuchungen durch ein Modell (Chiu-Modell) miteinander in Einklang zu bringen. Hierbei wurden die Ergebnisse aus der Einzelkanalanalyse zur Berechnung der Übergangswahrscheinlichkeiten verwendet und über ein algorithmisches Rechenverfahren mit dem Gesamtstrom in einen Zusammenhang gebracht.

Dafür wurden zunächst die Übergangskonstanten  $a_{12}$ ,  $a_{21+23}$  und  $a_{32}$  aus den Daten der Einzelkanalanalyse unter der Verwendung von  $\overline{B}_o$ ,  $\overline{B}_c$  und  $\overline{B}_g$  ermittelt. Mit Hilfe des Runge-Kutta-Algorithmus wurde anschließend numerisch die Öffnungswahrscheinlichkeit durch Einsetzen der Geschwindigkeitskonstanten berechnet und die hierdurch simulierte Kurve mit dem Stromverlauf aus den Experimenten, also den Originalregistrierungen, verglichen. Gab es noch größere Abweichungen zwischen diesen beiden Kurvenverläufen, so wurden die entsprechenden Konstanten solange variiert, bis die Verläufe übereinstimmten. Auf diese Weise wurden für die Kontrollregistrierungen bei  $U_M = 0 \text{ mV}$  die folgenden Geschwindigkeitskonstanten ermittelt und der entsprechende Kurvenverlauf simuliert (Abb. 4.1):

$$a_{12} = 0.78 \frac{m}{s}, \quad a_{21} = 0.339 \frac{m}{s}, \quad a_{23} = 0.43 \frac{m}{s}, \quad a_{32} = 0.0 \frac{m}{s}.$$

Zu Beginn der Inaktivierung in Folge eines Spannungsreizes pendelt der Natriumkanal zunächst zwischen dem geöffneten ( $o$ ) und dem ersten geschlossenen ( $c_1$ ) Zustand hin und her und springt anschließend in den zweiten absorbierenden Zustand ( $c_2$ ), wo er ohne Gifteinwirkung verbleibt. Da die Inaktivierung jedoch schnell einsetzt, ist die Wahrscheinlichkeit für den einzelnen Kanal, den offenen Zustand ( $o$ )

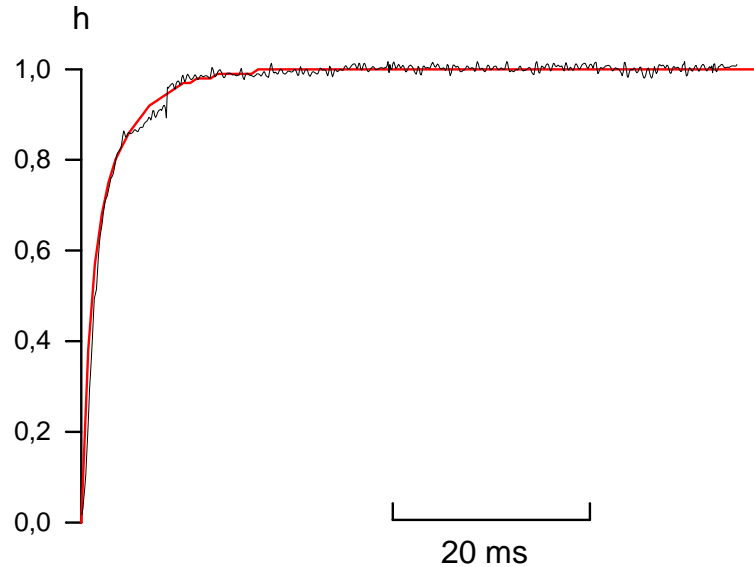


Abbildung 4.1: Ganzzelleableitung des Natriumstromes in Ringerlösung und sein berechneter Kurvenverlauf bei  $U_M = 0 \text{ mV}$  während eines  $70 \text{ ms}$  dauernden Impulses. Die Berechnung erfolgte in Anlehnung an das Drei-Zustands-Modell von *Chiu* unter der Verwendung des Runge-Kutta-Algorithmus. Es wurden folgende Geschwindigkeitskonstanten zugrunde gelegt:  $a_{12} = 0.78 \frac{\text{m}}{\text{s}}$ ,  $a_{21} = 0.339 \frac{\text{m}}{\text{s}}$ ,  $a_{23} = 0.43 \frac{\text{m}}{\text{s}}$ ,  $a_{32} = 0.0 \frac{\text{m}}{\text{s}}$ .  $h$  bezeichnet das absolute Maß der Inaktivierung.

zu verlassen und somit  $a_{12}$ , sehr hoch. Bei einer vollständigen Inaktivierung gehen die Geschwindigkeitskonstanten, die aus dem letzten geschlossenen Zustand  $c_2$  herausführen ( $a_{32}$ ), gegen Null, so daß der Rückweg von  $c_2$  zu  $c_1$  unwahrscheinlich ist. Unter dem Einfluß der Toxine muß sich diese Wahrscheinlichkeit ( $a_{32} > 0$ ) verändern. Auf diese Weise kann der Kanal wieder in den offenen Zustand zurückspringen und erneut zwischen ( $o$ ) und ( $c_1$ ) pendeln. Hierdurch käme es zur Ausbildung von Bursts. Die Geschwindigkeitskonstante  $a_{32}$  würde hierbei als schaltendes Element fungieren und die Entstehung und vielleicht auch die Größe der persistierenden Ströme bestimmen.

Analog zur numerischen Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten in Ringerlösung ergab die Ermittlung der Konstanten unter dem Einfluß der unterschiedlich stark wirkenden Toxine *APE 1-1* und *APE 1-2* ( $U_M = 0 \text{ mV}$ ) folgende Werte und entsprechende simulierte Kurvenverläufe (4.2):

Tabelle 4.1: Übergangswahrscheinlichkeiten für das Drei-Zustands-Modell von *Chiu* unter dem Einfluß der Anemonentoxine *APE 1-2* und *APE 1-2* auf den Natriumkanal.

P	$a_{12} \left[ \frac{m}{s} \right]$	$a_{21} \left[ \frac{m}{s} \right]$	$a_{23} \left[ \frac{m}{s} \right]$	$a_{32} \left[ \frac{m}{s} \right]$
20%	0.20	0.40	0.46	0.10
40%	0.145	0.58	0.46	0.099

P: Persistierender Natrium-Stromanteil.

Durch den Einfluß dieser Toxine verändern sich im Vergleich zur Kontrolle im wesentlichen die Konstanten  $a_{12}$ ,  $a_{21}$  und  $a_{32}$ . Wie bereits angedeutet, hat bei der Ausbildung der Bursts und somit persistierender Ströme die Konstante  $a_{32}$  eine besondere Bedeutung. Funktionell scheint diese Konstante jedoch lediglich eine *schaltende* Rolle einzunehmen, da sowohl unter dem Einfluß von *APE 1-1* als auch *APE 1-2* für  $a_{32}$  nahezu der gleiche Wert ermittelt wurde. Unterschiede in der Wirkung dieser Toxine auf den Natriumkanal erklären sich nicht aus der Übergangswahrscheinlichkeit von  $c_2$  nach  $c_1$ , sondern vor allem durch den Einfluß auf die Kinetik der Konstanten  $a_{12}$ . Je stärker das Toxin auf den Natriumkanal wirkt, umso kleiner wird der Wert dieser Konstanten. Hierdurch steigt die Wahrscheinlichkeit für den Kanal, im offenen Zustand zu verbleiben. Die Ergebnisse aus der Einzelkanalanalyse bestätigen die Ergebnisse aus diesen Berechnungen. Für *APE 1-1* ergab die Analyse eine mittlere Offenzeit bei  $U_M = 0 \text{ mV}$  von  $\overline{B}_o = 6.28 \pm 0.29 \text{ ms}$  und für *APE 1-2* von  $\overline{B}_o = 7.94 \pm 0.96 \text{ ms}$ . Eingesetzt in obige Gleichung zur Berechnung der Übergangsraten ( $\overline{B}_o = \frac{1}{a_{12}}$ ) ergab dies für *APE 1-1* eine Übergangswahrscheinlichkeit von  $a_{12} = 0.16$  und für *APE 1-2* von  $a_{12} = 0.13$ .

Zusammengefaßt eröffnet die Wirkung der Anemonentoxine die Möglichkeit, aus dem eigentlich absorbierenden Zustand  $c_2$  über  $a_{32}$  wieder nach  $c_1$  und  $o$  zurückzuspringen und die Ausbildung persistierender Ströme zu bewirken. Die Größe dieses Stromanteils hängt jedoch nicht von dem Einfluß des jeweiligen Giftes auf die

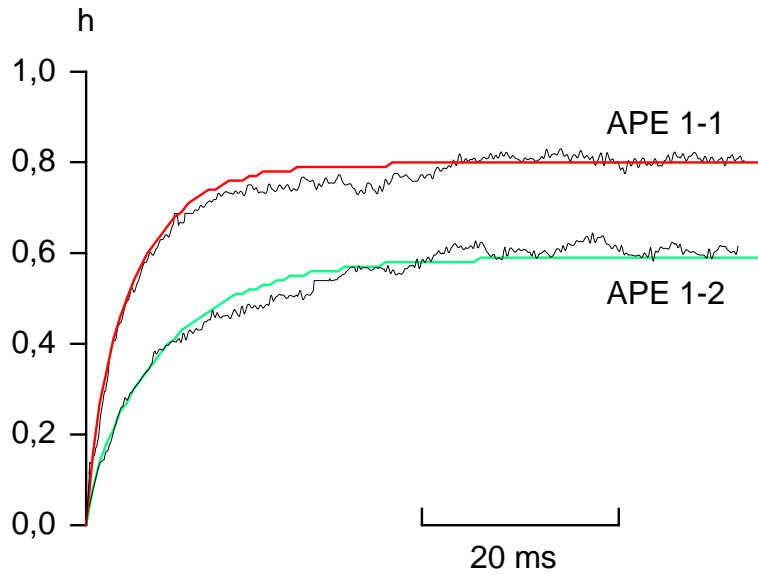


Abbildung 4.2: Ganzzelleableitung des Natriumstromes unter dem Einfluß verschiedener Anemonitoxine und berechnete Kurvenverläufe bei  $U_M = 0 \text{ mV}$  während eines  $70 \text{ ms}$  dauernden Impulses. Die Berechnung erfolgte in Anlehnung an das Drei-Zustands-Modell von *Chiu* unter der Verwendung des Runge-Kutta-Algorithmus. Es wurden folgende Geschwindigkeitskonstanten zugrunde gelegt: APE 1-1:  $a_{12} = 0.20 \frac{\text{m}}{\text{s}}$ ,  $a_{21} = 0.40 \frac{\text{m}}{\text{s}}$ ,  $a_{23} = 0.46 \frac{\text{m}}{\text{s}}$ ,  $a_{32} = 0.10 \frac{\text{m}}{\text{s}}$ ; APE 1-2:  $a_{12} = 0.145 \frac{\text{m}}{\text{s}}$ ,  $a_{21} = 0.58 \frac{\text{m}}{\text{s}}$ ,  $a_{23} = 0.46 \frac{\text{m}}{\text{s}}$ ,  $a_{32} = 0.099 \frac{\text{m}}{\text{s}}$ .  $h$  bezeichnet das absolute Maß der Inaktivierung.

Konstante  $a_{32}$ , sondern vielmehr auf die Konstante  $a_{12}$ , ab.  $a_{32}$  wäre sozusagen der Schalter (qualitativer Effekt),  $a_{12}$  der Regler (quantitativer Effekt) bei der Wirkung von Anemonitoxinen auf den Natriumstrom.

### 4.3.2 Stationäre Inaktivierung

Die Kurve der stationären Inaktivierung beschreibt die Wahrscheinlichkeiten des Natriumkanals, in Abhängigkeit vom Membranpotential sich im offenen Inaktivierungszustand zu befinden. Bezogen auf das *Chiu*-Modell bedeutet dies, daß auch die Übergangswahrscheinlichkeiten zwischen den Inaktivierungszuständen ( $c_1$ ,  $c_2$ ) und somit die Geschwindigkeitskonstanten  $a_{ij}$  in dieser Potentialabhängigkeit stehen. Variiert das Membranpotential ( $U_M$ ), verändern sich die Konstanten, für die sich dann jeweils ein neues Gleichgewicht einstellt. Dieses Gleichgewicht ist nach

Ablauf der Inaktivierung erreicht.

Die Potentialabhängigkeit von  $h_\infty$  wurde im Experiment durch Variation der Stärke des Vorimpulses ( $V_{pp}$ ) initiiert (vgl. 3.1.3). Der anschließende Testimpuls gab Auskunft darüber, wieviele Natriumkanäle nach Ende des Vorimpulses noch aktivierbar, also nicht inaktiviert, waren. In Ringerlösung zeigte sich hierbei, daß die Inaktivierung für  $V_{pp} > 30 \text{ mV}$  vollständig war ( $h_\infty = 0$ ) und für  $V_{pp} < -120 \text{ mV}$  völlig aufgehoben war ( $h_\infty = 1$ ). Transferriert auf das Modell bedeutet dies: Bei stark negativen Potentialen nimmt für den Natriumkanal die Verweildauer im offenen Zustand  $o$  an Bedeutung zu, somit geht die Geschwindigkeitskonstante  $a_{12}$  gegen Null. Bei positiven Potentialen hingegen muß diese Konstante stark ansteigen und  $a_{32}$  entsprechend gegen Null tendieren, so daß die Wahrscheinlichkeit für den Kanal, sich im Zustand  $c_2$  zu befinden, wächst.

Um die potentialabhängige Verschiebung der Geschwindigkeitskonstanten zu berechnen, führte SCHMIDTMAYER (1986) sog. *Korrekturfaktoren* ein, die bei einer Veränderung des Potentials auf alle Übergangskonstanten bezogen werden müssen. Diese Korrekturfaktoren stehen in folgender Beziehung zu den Konstanten  $a_{ij}$ :

$$a_{ij} = s_{ij} e^{(g_{ij} V)} m s^{-1} \quad (4.5)$$

wobei  $s_{ij}$  ( $ms^{-1}$ ) und  $g_{ij}$  ( $ms^{-1}$ ) die jeweiligen Korrekturfaktoren darstellen.  $V$  beschreibt die Abweichung vom Ruhepotential ( $mV$ ).

Die Einführung der Korrekturfaktoren gewinnt vor allem an Bedeutung bei der Erklärung des Kurvenverlaufes der stationären Inaktivierung unter Toxineinfluß. Wie veränderte sich dieser Kurvenverlauf? Durch die Applikation der Anemontoxine wurde die Inaktivierung in Abhängigkeit vom Gift unvollständig, das Inaktivierungstor schloß nicht vollständig,  $h_\infty$  wurde bei keinem Potential null. Im Vergleich zur Kontrollkurve sank die  $h_\infty$ -Kurve nicht bis auf null ab, wurde sogar *nicht-monoton*, d.h. nahm bei weiter ansteigendem Potential ( $V_{pp}$ ) wieder zu. Besonders auffällig war eine Rechtsverschiebung dieser Kurve. Diese Verschiebung darf jedoch nicht als



ein spezifischer Effekt der Anemontoxine angesehen werden, so wurde dieser Effekt auch nach Behandlung mit Chloramin-T beobachtet (NIEMANN, 1989) und scheint allgemein für Inaktivierungs-Modulatoren zu gelten. Ein sog. *shift*-Faktor ( $mV$ ) erklärt nach SCHMIDTMAYER (1986) diese Rechtsverschiebung und bringt diesen in einen formellen Zusammenhang mit den Geschwindigkeitskonstanten. In Anlehnung an die Potentialkorrektur aus Gleichung 4.5 ergibt sich hieraus:

$$a_{ij} = s_{ij} e^{(g_{ij}(V+S))} m s^{-1} \quad (4.6)$$

Liegt eine unvollständige Inaktivierung vor, so gelingt eine Anpassung an das Inaktivierungsmodell unter Verwendung einer *Potential*- und *shift*-Korrektur nur, wenn die Konstante  $a_{32}$  bei keinem Potentialbereich gegen Null geht.

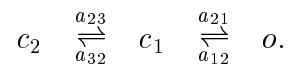
Warum es zu einem Wiederanstieg von  $h_{\infty}$  bei Potentialen  $V_{pp} > 0 \text{ mV}$  kommt, kann an dieser Stelle nicht beantwortet werden. Hinweise über das Auftreten dieses Effektes gibt es bereits aus früheren Untersuchungen (ULBRICHT & SCHMIDTMAYER, 1981; SCHMIDTMAYER *et al.*, 1983; BENZINGER *et al.*, 1998). Doch eine Erklärung, die auch mit möglichen Modellen in Einklang gebracht werden könnte, existiert nicht.

### 4.3.3 Aufhebung der Inaktivierung

Um die Inaktivierung aufzuheben, muß das Reaktionsgleichgewicht des Inaktivierungszustandes wieder nach links in den offenen, bzw. den ruhenden, aktivierbaren Zustand zurückgeholt werden. Grundsätzlich sollte die Aufhebung der Inaktivierung mit denselben Geschwindigkeitskonstanten zu beschreiben sein, die auch die stationäre Inaktivierung bestimmen. Der Unterschied besteht darin, daß der Reaktionsablauf in umgekehrter Richtung von  $c_2$  nach  $o$  verläuft. An dieser Stelle sei nochmals angemerkt, daß im Ruhe- oder aktivierbaren Zustand des Natriumkanals das Inaktivierungstor ( $h$ ) geöffnet und das Aktivierungstor ( $m$ ) geschlossen ist, so daß der Ablauf der Inaktivierungsaufhebung mit dem offenen Zustand des hier be-

trachteten Tores ( $h$ ) abgeschlossen ist.

Experimentell erfolgte die Aufhebung der Inaktivierung durch zwei aufeinanderfolgende Impulse, die von einem hyperpolarisierenden Impuls variierender Dauer getrennt wurden (vgl. 3.1.4). In Abhängigkeit von der Dauer dieses Zwischenimpulses sank oder stieg die Anzahl erneut aktivierbarer Kanäle, die anhand der Stromamplitude des zweiten Impulses ermittelt werden konnten. Dabei stellte sich heraus, daß unter dem Einfluß der Toxine die Erholung beschleunigt wurde. Auch hier bietet das Modell von *Chiu* Erklärungsmöglichkeiten. Aufgrund einer Umkehr der kinetischen Verhältnisse verläuft die Aufhebung der Inaktivierung folgendermaßen:



Findet diese Reaktion ohne Beeinflussung durch Inaktivierungsmodulatoren statt (z.B. Anemontoxine) so durchläuft jeder Kanal, da 100% der Kanäle inaktiviert sind ( $h_\infty = 0$ ), über die Geschwindigkeitskonstanten  $a_{32}$  und  $a_{21}$  die Zustände  $c_2$ ,  $c_1$  und  $o$ . Ganz anders verhält sich dies jedoch nach Applikation der Toxine. Unter diesen Umständen befindet sich, je nachdem um welches Gift es sich handelt, eine bestimmte statistische Anzahl der Kanäle in einem burstenden Zustand, d.h. zwischen  $c_1$  und  $o$ . Setzt unter dieser Voraussetzung die Aufhebung ein, benötigen diese zuvor burstenden Kanäle weniger Zeit, um in den offenen Zustand  $o$  zurückzugelangen. Eine bestimmte Zahl der Kanäle befindet sich demnach nicht im inaktivierten Zustand  $c_2$ . Aus diesem Grund verläuft die Aufhebung der Inaktivierung unter dem Einfluß der Modulatoren schneller.

Unterschiede in der Kinetik der Aufhebung unter dem Einfluß verschiedener Toxine erklären sich daher aus der unterschiedlich starken Wirkung der Fraktionen. Je mehr Kanäle sich im burstenden Zustand befinden, umso schneller findet die Aufhebung der Inaktivierung statt. Für die Fraktionen *APE 1-1*, *APE 1-2* und *APE 2-1* traf dies auch zu. Warum jedoch unter dem Einfluß von *ATX II*, einem Toxin, welches mit einer 20%igen Ausprägung persistierender Ströme eher zu den schwächeren Toxinen gehört, die Kinetik der Aufhebung besonders schnell ablief, kann an dieser

Stelle nicht beantwortet werden. Versuche mit demselben Impulsprogramm, jedoch bei unterschiedlichen Potentialen könnten darüber mehr Klarheit verschaffen.

### 4.3.4 Erweiterte Modelle

Obwohl es in der Vergangenheit Zweifel an der Unabhängigkeit der Inaktivierung von der Aktivierung gab und einige andere kinetische Modelle des Natriumkanals versuchen, das Schaltverhalten unter der Berücksichtigung einer Abhängigkeit dieser beiden Zustände in Einklang zu bringen, wurde in dieser Arbeit das Modell von *Chiu* gewählt. Dies war insofern möglich, da die Anemontoxine als sog. *Site-3*-Toxine keinen Einfluß auf die Aktivierung ausüben, sondern lediglich die Kinetik der Inaktivierung beeinflussen. Aus diesem Grund konnte ein Modell gewählt werden, welches gezielt nur den Verlauf der Inaktivierung versucht zu erklären. Ein erweitertes, ebenfalls nur die Inaktivierung betrachtendes Modell, von SCHMIDT-MAYER (1986) zyklisiert das *Chiu*-Modell und diskutiert die Übergangsmöglichkeit vom zweiten inaktivierten Zustand  $c_2$  zum offenen  $o$ . Das *Schmidtmayer*-Modell konnte insbesondere bei der Aufhebung der Inaktivierung in Abhängigkeit verschiedener Haltepotentiale bessere Anpassungsergebnisse vorweisen. Da jedoch die Geschwindigkeitskonstante zwischen diesen beiden Zuständen ( $c_2 \rightleftharpoons o$ ) bei Potentialen, wie sie in dieser Arbeit betrachtet wurden, gegen Null tendiert, konnte diese Erweiterung außer acht gelassen und das traditionelle *Chiu*-Modell verwendet werden.

Andere Modellbetrachtungen versuchen die Aktivierung miteinzubeziehen. ALDRICH & STEVENS (1987) z.B. erweiterten das *Hodgkin-Huxley*-Modell derart, daß sie für das Schaltverhalten des Natriumkanals von ruhenden Zuständen ausgingen. Aus diesen Zuständen geht der Kanal über den Prozeß der Aktivierung in den offenen und anschließend durch die einsetzende Inaktivierung in den geschlossenen Zustand über. Mit diesem Modell der Form  $R^* \rightleftharpoons c \rightleftharpoons o$  konnten sie den Einfluß der Öffnungswahrscheinlichkeit auf den Stromabfall beschreiben.  $R^*$  stellt hierbei eine Zusammenfassung mehrerer ruhender Zustände dar. Allerdings besteht das

Modell nur aus einem geschlossenen inaktivierten Zustand und kann daher die Ausbildung von Bursts nicht befriedigend erklären. NIEMANN (1990) erweiterte daher dieses Modell um einen zusätzlichen geschlossenen Zustand. Dabei entsprach in diesem Modell der Inaktivierungsverlauf dem von *Chiu* postulierten, bezog jedoch die Aktivierung zusätzlich mit ein. Dies war insofern sinnvoll, da in den Experimenten von NIEMANN die Wirkung von Chloramin-T auf das Schaltverhalten des Natriumkanals untersucht wurde. Chloramin-T beeinflusst sowohl den Verlauf der Aktivierung als auch den der Inaktivierung.

Bei den oben beschriebenen Modellen basieren die Übergangswahrscheinlichkeiten über indirekte Schlußfolgerungen aus den Einzel- und Ganzzellergebnissen. Bei Konformationsänderungen ausgelöst durch Potentialänderungen treten Ladungsverschiebungen (*gating currents*) auf der extrazellulären Seite des Natriumkanals auf (ARMSTRONG & BEZANILLA, 1974; ARMSTRONG, 1981; CONTI & STÜHMER, 1989), die direkt gemessen werden können und als Grundlage für weitere Modellbetrachtungen dienen. KEYNES & ELINDER (1998) fassen die Erkenntnisse dieser Nettoladungsverschiebungen am Kanal in ein weiteres, sehr komplexes Modell zusammen. Mit diesem Modell können zwar Kanalzustände besser erfasst werden, allerdings sind *gating currents* und Einzelkanalströme darin nicht unmittelbar miteinander vergleichbar. Es ist nicht möglich, die Ergebnisse aus Einzel- und Ganzzelleableitungen, wie sie in dieser Arbeit gemessen wurden, mit in dieses Modell einzubeziehen. Zusammenfassend entsprach daher das *Chiu*-Modell völlig ausreichend den Anforderungen, die die Ergebnisse der *mikroskopischen* und *makroskopischen* Natriumströme mit der Kinetik dieses Zustandsmodelles vereinbaren sollten. Voraussetzung hierfür war die Trennbarkeit der Aktivierung von der Inaktivierung, die durch die Verwendung von *Site-3*-Anemomentoxine gewährleistet wurde.

## 4.4 Struktur-Wirkungsbeziehung

Anhand des Modells von *Chiu* wurden Differenzen in der Toxinwirkung auf den Natriumkanal von Neuroblastomzellen unter kinetischen Gesichtspunkten diskutiert. Unterschiede in der Wirkung erklärten sich in diesem Zusammenhang aus Veränderungen der Geschwindigkeitskonstanten in einem linearen Inaktivierungsmodell beim Übergang in die jeweiligen *Offen-* und *Geschlossenzustände*. Die Befunde dieser Arbeit zeigten dabei, daß sich bei stärker wirkenden Anemonentoxinen im wesentlichen die mittlere Öffnungsdauer der Einzelkanäle innerhalb von Bursts verlängert. Besonders ausgeprägt ist dieses Verhalten der Kanäle unter dem Einfluß der Toxine *APE 1-2*, *APE 2-1* und *APE 5-3*. Es stellt sich die Frage, wie es eigentlich zu diesen Unterschieden in der Verhaltensausrprägung des Natriumkanals kommt. Wo und wie binden die Toxine am Kanal, so daß dies zu derartigen Veränderungen in der Inaktivierungskinetik führt?

Wie bereits einleitend beschrieben (1.3), gibt es bei der Klassifizierung der an den Natriumkanal bindenden Toxine zwei mögliche Unterscheidungskriterien: zum einen nach ihrer Molekülgröße, wonach die hier betrachteten Anemonentoxine bestehend aus durchschnittlich 47 Aminosäuren zu den sog. *Typ I-Toxinen* gezählt werden (STRICHARTZ *et al.*, 1987). Zum anderen nach dem extrazellulären Bindungsort am Natriumkanal, der diese Toxine in die Gruppe der sog. *Site-3-Toxine* einordnet (CATTERALL, 1980, 1988). Die in dieser Arbeit untersuchten Toxine gehören entsprechend der jeweiligen Zuordnungskriterien alle in eine Gruppe, da sie zu den *Modulatoren* der Inaktivierung des Natriumkanals zählen und nur geringfügige Unterschiede in ihrer Architektur aufweisen. Differenzen in ihrer Wirkung auf den Natriumkanal können u.U. unmittelbar mit nur geringen Aminosäuresubstitutionen in Zusammenhang gebracht werden. Diese Substitutionen könnten dazu führen, daß die Toxine eine unterschiedliche Affinität zum Kanal aufweisen und/oder nach deren Bindung in unterschiedlichem Maße die Konformationsänderungen dieses Tunnelproteins während des Gatings beeinflussen und somit in Abhängigkeit vom Toxin

die Kinetik des  $h$ -Tores verändert wird.

### Architekturunterschiede

Die Auswertung der Aminosäuresequenzen der getesteten Anemontoxine ergab eine auffällige Homologie unter den Fraktionen. Substitutionen traten vornehmlich in den vier Regionen 12, 21/22, 36/37 und 39/40 auf. Äußerst konservativ verhalten sich im Toxinvergleich die Carboxy- und N-terminalen Bereiche, die sauren Aminosäuren in Position 7 und 9 und besonders die Regionen, die für die Ausbildung der Disulfidbrücken verantwortlich sind. Bei keiner der untersuchten Fraktionen konnte in diesen Regionen eine Substitution festgestellt werden. Das hat zur Folge, daß sich die dreidimensionale Architektur bei allen Toxinen in ihrer Grundstruktur im wesentlichen kaum verändert und die Ausbildung der drei definierten Schleifen gewährleistet bleibt. Die äußerst konservative Struktur der Schleifenbildung wird durch das regelmäßige und unmodifizierte Auftauchen des Glycins in den Positionen Gly-1/-10/-26/-30/-38 unterstützt. Vor allem Gly-10 in Verbindung mit Pro-11, das mit seinem fünfgliedrigen Ring eine Rotation um die  $C_\alpha$ -N-Bindung innerhalb einer Polypeptidkette verhindert, bewirken sowohl ein *Drehen* als auch ein *Kippen* der Peptidkette in dieser Region (NORTON, 1991).

An einigen Positionen kommt es zwar zu einem Aminosäureaustausch, der die räumliche Struktur z.B. durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen der Iso-toxine verändern könnte, z.B. der Austausch hydrophiler gegen neutraler AS oder der Einbau von Prolin, das zu einer Einengung möglicher Konformationen führt. Doch wird bei allen Toxinen die räumliche Struktur nur unwesentlich verändert. Das Grundgerüst bleibt überall erhalten.

Auffälligerweise tritt der dominierende Anteil vieler Substitutionen in einer Region auf, in der es durch die Ausbildung der Disulfidbrücke zwischen dem Cys-6 und dem Cys-34 zu einer Überlagerung der großen und der kleinen Schleife innerhalb der Toxine kommt. Dies betrifft im wesentlichen die AS-Positionen 21/22 und 39/40. Hinzu kommt, daß diese Region in unmittelbarer Nähe zu den sauren Asparaginsäureresten

in Position 7 und 9 steht. Partielle Substitutionen in diesem Bereich führen vornehmlich zu einer chemischen Modifizierung der Oberflächenregion, so daß sich der Grad der Hydrophobizität ändert. Auf die Bedeutung besonders dieser Region und anderer Bereiche für die Toxizität und das Bindungsverhalten am Natriumkanal der Polypeptide soll im folgenden Abschnitt näher eingegangen werden.

### **Essentielle Bereiche der Anemonentoxine**

Wie im vorherigen Abschnitt gezeigt, existieren innerhalb der in dieser Arbeit untersuchten Polypeptide Bereiche, die besonders bei der Ausbildung der dreidimensionalen Struktur eine entscheidende Rolle spielen. Dabei stellte sich heraus, daß gerade diese *strukturellen* Aminosäuren (*Cystein*, *Glycin*, *Prolin*) von Modifikationen größtenteils verschont blieben. Substitutionen sind innerhalb der Toxine in Regionen zu finden, die das *Gesicht* der Moleküle, also deren Oberflächenstruktur, verändern. Genau diese Breiche müssen letztendlich eine Rolle bei der Adhäsion an den Kanal und der toxischen Wirkung auf diesen spielen. Bei der Analyse der essentiellen Bereiche muß daher zwischen den neurotoxisch aktiven und kanalbindenden Regionen unterschieden werden. Rückschlüsse auf die jeweilige, mögliche Funktion bestimmter Bereiche können durch vergleichende Untersuchungen an Kanalmutanten, immunologische Kreuzreaktionen, wo diverse Neurotoxine als Antikörper gegen Natriumkanäle fungieren, sowie mit chemisch modifizierten Anemonentoxinen gemacht werden.

Bisher näher untersucht wurden verschiedene Isotoxine (*AP-A*, *AP-B*) von *Anthopleura xanthogrammica* (TANAKA *et al.*, 1977; NORTON, 1981; BLAIR *et al.*, 1978; SCRIBINE *et al.*, 1979; PALLAGHY *et al.*, 1995), die strukturell den gleichen Aufbau aufweisen, wie die in dieser Arbeit verwendeten Toxine, sich von diesen jedoch durch strukturell unabhängige Substitutionen unterscheiden. Dabei konnte die neurotoxische Wirkung von *AP-A* am Natriumkanal von Neuroblastomzellen durch Reaktion carboxylierter Aminosäuren (Asp-7/-9, C-Terminus) mit Glycinethyl-Ester oder Taurin komplett aufgehoben werden, ohne die Bindungsaffinität zum Natri-

umkanal zu verringern (NEWCOMB *et al.*, 1980). GRUEN & NORTON (1985) bestätigten dies durch Modifikationen an Asp-7 und Asp-9, schränkten die Bedeutung des C-Terminus auf die neurotoxische Aktivität jedoch ein. Die in dieser Arbeit untersuchten toxisch wirksamen Fraktionen zeichnen sich ebenfalls durch den Besitz dieser zwei Asparaginsäuren aus. Nur *ATX Ia* besitzt anstelle des Asp in Position 7 ein Lysin, weist jedoch auch einen Toxizitätsverlust an den N1E-115 Natriumkanälen auf. Eine mögliche Funktion des Aminoterminus als essentieller Bereich sowohl für die Aktivität der Toxine als auch bei der Bindung an den Kanal wird diskutiert (NORTON, 1991). Strittig ist die Bedeutung von Arg-14 in Bezug auf die Aktivität. Auf das Bindungsverhalten scheint diese AS keinen Einfluß auszuüben (NORTON, 1991; PALLAGHY *et al.*, 1995).

Funktionelle Breiche, die für die Bindung der Toxine an den Kanal verantwortlich sind, finden sich in der oben beschriebenen Region, die hauptsächlich durch die Disulfidbrücke Cys-6 Cys-34 zustande kommt. Hierdurch *rücken* Bereiche aller drei Schleifen in unmittelbarer Nähe zueinander und bilden toxinabhängig bestimmte Oberflächenregionen aus. Besonders dominant treten hierbei Substitutionen im Bereich zwischen AS-36 und AS-40 auf. Geeignete Aminosäurereste in der Region 36/37 sind offenbar bei der Bildung einer für die Bindungsaffinität wichtigen Auswölbung des  $\beta$ -Faltblattes verantwortlich (FOGH *et al.*, 1990; PALLAGHY *et al.*, 1995). Durch den Einbau von AS, die zu einer Ausdehnung dieser *Beule* führen (*ATX Ia*), soll diese Affinität reduziert werden (WIDMER *et al.*, 1989). Die Substitution von Gln-39 anstelle des für die räumliche Struktur wichtigen Prolins könnte in diesem Zusammenhang eine Bedeutung für eine Reduzierung der Toxizität von *APE 1-1* im Vergleich zu *APE 1-2* oder *APE 2-1* haben. Zusätzlich besteht die Möglichkeit einer Interaktion des Gln-39 mit dem aromatischen Tyr-22, welches durch die  $\beta$ -Faltblattstruktur der Polypeptide in dessen unmittelbare Nähe rückt. Nach BURLEY & PETSKO (1986) interagiert das  $\pi$ -Elektronensystem von aromatischen Ringen häufig mit den Aminogruppen von Lys, Arg, Asn, Gln und der Imidazolgruppe vom Histidin, so daß potentiell das Gln-39 von *APE 1-1* mit dem Tyr-22



in Wechselwirkung treten könnte. Auf jeden Fall kommt es durch die beschriebenen Substitutionen in dieser Region zu einer Abnahme hydrophober Aminosäurereste im Vergleich zu *ATX II* und *APE 2-1*, so daß gerade hierdurch Differenzen bei der Bindungsaffinität entstehen könnten. Im übrigen wird den AS in den Positionen 23 und 43 eine thermostabilisierende Funktion eingeräumt, die durch die Anwesenheit von Tryptophan oder Tyrosin in diesen Bereichen gewährleistet wird (NORTON *et al.*, 1989; GOOLEY *et al.*, 1988).

Untersuchungen an Kanalchimären mit Isotoxinen der Seeanemone *Anthopleura xanthogrammica* (*APA*, *APB*) räumen neuerdings Substitutionen in Position 12 ebenfalls eine Rolle bei der Bindung der Toxine an den Natriumkanal ein (BENZINGER *et al.*, 1997). Die Substitution von Asn-12 beim *APE 1-2* scheint jedoch aufgrund der starken Toxizität dieser Fraktion unwesentlich zu sein. Entscheidend bei der Ausprägung unterschiedlicher Toxizitäten auf den Natriumkanal scheint daher vornehmlich der Bereich zwischen den AS 36-40 zu sein.

### **Bindungsstellen am Natriumkanal**

Neben den Möglichkeiten unterschiedlichster Modifikationen innerhalb der Toxine, die sich strukturell als auch funktionell sowohl in der neurotoxischen Aktivität als auch in der Bindungsaffinität auf den Natriumkanal ausprägen, bleibt noch die Frage zu klären, welche Alternativen bezüglich der Bindung von Toxinen oder der Wirkung auf Konformationsänderungen am Kanal zu finden sind.

Offensichtlich spielt bei der Anbindung der Anemonentoxine an den Kanal das Membranpotential eine wichtige Rolle (STRICHARTZ & WANG, 1986; WARASHINA *et al.*, 1988B; CATTERALL, 1988), was durch die Ergebnisse der potentialabhängigen Toxizität der in dieser Arbeit untersuchten Giftfraktionen bestätigt werden kann. Lediglich *ATX II* zeigte von allen Toxinen eine weitgehende Unabhängigkeit vom Membranpotential. Spekulativ ist in diesem Zusammenhang eine mögliche Korrelation der stark hydrophoben Oberflächenstruktur dieses Peptids im Bereich der Auswölbung des  $\beta$ -Faltblattes in der Region um AS 36-40 mit einer spannungs-

abhängigen Anbindung. Elektrostatische Kräfte, die für die Dissoziation der Toxine an den Kanal verantwortlich sein sollen, wurden diskutiert (MOZAHAYEVA *et al.*, 1980), wahrscheinlicher für die Bindung ist allerdings der Konformationszustand (aktivierbar/inaktiv), in dem sich der Kanal zum Zeitpunkt der Toxinbindung befindet (CATTERALL, 1988; NORTON, 1991).

Allgemein ging man in der Vergangenheit davon aus, daß die sog. *Site-3*-Toxine die gleiche Bindungsstelle am Natriumkanal besetzen wie auch die  $\alpha$ -Skorpiontoxine (CATTERALL & BERESS, 1978). Diese Stelle umfaßt die extrazelluläre Schleife der Polypeptidkette des Natriumkanals zwischen den transmembranen  $\alpha$ -Helices S5 und S6 der Domäne I (TEJEDOR & CATTERALL, 1988). Es wird jedoch nicht mehr ausgeschlossen, daß auch andere Regionen, wie z.B. die extrazelluläre Schleife zwischen den Segmenten S5/S6 in der Domäne IV (THOMSEN & CATTERALL, 1989), hieran beteiligt sind. Aus diesem Grund steht eine einheitliche Bindungsstelle für die Anemontoxine, wie es aus der Klassifizierung der *Site-3* Toxine hervorgeht, neuerdings zur Diskussion. So erfolgt beispielsweise die Anbindung des Anemontoxins *AP-A* am Natriumkanal an die extrazelluläre Schleife der Domäne IV, jedoch die Bindung des nur durch zwei Aminosäuresubstitutionen differierenden Isotoxins *AP-B* mit großer Sicherheit nicht in dieser Region (BENZINGER *et al.*, 1997).

Diese Befunde unterstreichen die Notwendigkeit einer genaueren Topologisierung der Bindungsstellen von Toxinen am Natriumkanal durch weitere Versuche mit Kanalmutanten und Isotoxinen. Konkurrieren beispielsweise zwei struktur-ähnliche Toxine mit unterschiedlichen Wirkungsspektren um die gleiche Bindungsstelle am Natriumkanal, so könnten Doppelgabe-Experimente Aufschluß über Bindungsaffinitäten geben. Besteht diese Konkurrenz nicht, da beide unterschiedliche Bindungsstellen haben, müßte sich bei gleichzeitiger Gabe beider Toxine der Effekt auf den Natriumkanal noch weiter steigern lassen.

Weiterhin ungeklärt ist die Frage, wie am Natriumkanal Konformationsänderungen mit dem *Offen-* oder *Inaktivierungszustand* assoziiert sind und welche Auswirkungen eine Toxinanbindung auf die Konformationszustände hat. Diese Übergangszustände

könnten durch Analysen von *gating currents* vor und nach Toxinapplikation weiter erschlossen werden.

# Kapitel 5

## Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden vergleichende Untersuchungen über die Wirkung von fünf, z.T. neu-isolierten Nesseltoxinen der Seeanemonen *Anthopleura elegantissima* (Brandt) und *Anemonia sulcata* (Brandt) auf den Natriumkanal durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik elektrophysiologisch Ganzzell- und Einzelkanalableitungen an Neuroblastomzellen der Linie N1E-115 und Neuronen aus Rückenmarksganglien der Ratte vorgenommen.

Die Nesseltoxine binden selektiv an ganz bestimmte Regionen des Natriumkanals und führen dort zu Veränderungen im Schließverhalten dieses Tunnelproteins. Sie verhindern nach dem Öffnen der Kanäle zu Beginn einer Erregung dessen vollständiges Schließen und hemmen somit den Prozeß der Inaktivierung. Hierdurch wird ein persistierender Natriumeinstrom hervorgerufen. Wie Ganzzelleableitungen zeigten, variiert das Ausmaß dieser Persistenz in Abhängigkeit vom applizierten Toxin. So liegt der Anteil des persistierenden Stromes am Spitzenstrom nach Applikation der Fraktionen APE 1-1 und ATX II bei ca. 20%, bei den Fraktionen APE 1-2, APE 2-1 und APE 5 bei ca. 40%.

Einzelkanalanalysen ergaben, daß es unter dem Einfluß der Toxine am Natriumkanal zu der Ausbildung von Gruppenentladungen (Bursts) kam, die am unmodifizierten Kanal nicht auftraten. Dieses Burstverhalten ist Ursache für die Ausbildung

des persistierenden Stromes. Differenzen bezüglich dieses Stromanteils zwischen den Toxinen erklärten sich anhand der Burstanalyse aus unterschiedlich langen Öffnungsdauern innerhalb der Burst ( $B_o$ ). Öffnungs- und somit auch die Burstdauer zeigten eine starke Potentialabhängigkeit (Ausnahme: *ATX II*).

Bei den isolierten Anemontoxinen handelte es sich um Polypeptide (5000 Dalton) mit einer Länge von 46-47 Aminosäuren. Sequenzanalysen ergaben, daß diese Fraktionen Sequenzhomologien von über 80% aufweisen, bei einigen (*APE 1-1*, *APE 1-2*) liegt dieser Anteil sogar bei über 95%. Aminosäuresubstitutionen, die u.U. die Wirkung der Toxine auf den Natriumkanal verändern könnten, fanden sich in einer Region, die wahrscheinlich bei der Adhäsion an den Kanal eine Rolle spielt. Hierbei korrelierte eine geringere Toxizität mit einem Austausch hydrophober Aminosäurereste in diesem Bereich (AS 36-40).

Mit Hilfe des Drei-Zustands-Modells der Form  $o \rightleftharpoons c_1 \rightleftharpoons c_2$  von *Chiu* konnte rechnerisch eine Verbindung zwischen den Ergebnissen der Ganzzell- und der Einzelkanalableitungen hergestellt und entsprechende Kurvenverläufe simuliert werden. Ohne Toxineinfluß handelt es sich bei dem Zustand  $c_2$  um einen absorbierenden, die Konstante  $a_{32}$  geht gegen Null. Nach Applikation der Toxine wird  $a_{32} > 0$ , so daß ein Zurückspringen in die anderen Zustände ermöglicht wird.  $a_{32}$  fungiert dabei als *Schalter* für die Entstehung eines persistierenden Natriumstromes, die Konstante  $a_{12}$  als *Regler* zur Regulation der Größe des persistierenden Stromes. Die Konstante  $a_{12}$  steht im Chiu-Modell für die Öffnungsdauer innerhalb der Bursts ( $B_o$ ). Simulierte ( $a_{12}$ ) und gemessene ( $B_o$ ) Werte stimmten nahezu überein und bestätigten somit die Ergebnisse aus der Einzelkanalanalyse.

# Literaturverzeichnis

- [1] AFRA, A. (1998). Die neurotoxische Wirkung verschiedener Giftkomponenten der Seeanemone *Anthopleura elegantissima* (Brandt). *Inauguraldissertation, Medizinische Fakultät der CAU, Kiel.*
- [2] ALDRICH, R. W., D. P. COREY AND C. F. STEVENS(1983). A reinterpretation of mammalian sodium channel gating based on single channel recording. *Nature* 306: 436-441.
- [3] ALDRICH, R. W. AND C. F. STEVENS (1987). Voltage-dependent gating of single sodium channels from mammalian neuroblastoma cells. *J. Neurosci.* 7: 418-431.
- [4] AMANO, T., E. RICHELSON AND M. NIRENBERG (1972). Neurotransmitter synthesis by neuroblastoma clones (neuroblast differentiation-cell culture-choline acetyltransferase-acetylcholinesterase-tyrosine hydroxylase-axons-dendrites). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 69: 258-263.
- [5] ARMSTRONG, C. M. (1981). Sodium channels and gating currents. *Physiol. Rev.* 61: 644-683.
- [6] ARMSTRONG, C. M. AND F. BEZANILLA (1974). Charge movement associated with the opening and closing of the activation gates of the Na-channels. *J. Gen. Physiol.* 63: 533-552.
- [7] ARMSTRONG, C. M. AND F. BEZANILLA (1977). Inactivation of the sodium channel. II. Gating current experiments. *J. Gen. Physiol.* 70: 567-590.

- [8] ARMSTRONG, C. M., F. BEZANILLA AND E. ROJAS (1973). Destruction of sodium conductance inactivation in squid axons perfused with pronase. *J. Gen. Physiol.* 62: 375-391.
- [9] AYRE, D. J. (1982). Inter-genotype aggression in the solitary sea anemone *Actina tenebrosa*. *Mar. Biol.* 68: 199-205.
- [10] BENNDORF, K. (1989). A reinterpretation of Na-channel gating and permeation in terms of a phase transition between a transmembrane S4 alpha-helix and a channel helix. A theoretical study. *Eur. Biophys. J.* 17: 257-271.
- [11] BENOIT, B., A. CORBIER AND J.-M. DUBOIS (1985). Evidence for two transient sodium currents in the frog node of Ranvier. *J. Physiol.* 361: 339-360.
- [12] BENZINGER, G. R., C. L. DRUM, L. Q. CHEN, R. G. KALLEN, D. A. HANCK AND D. HANCK (1997). Differences in the binding sites of two site-3 sodium channel toxins. *Pflügers Arch.* 434: 742-749.
- [13] BENZINGER, G. R., J. W. KYLE, K. M. BLUMENTHAL AND D. A. HANCK (1998). A specific interaction between the cardiac sodium channel and site-3 toxin anthopleurin B. *J. Biol. Chem.* 273: 80-84.
- [14] BÉRESS, L., T. BRUHN, J. SÁNCHEZ-RODRIGUEZ, E. WACHTER AND H. SCHWEITZ (1998). Acting on Na-channels and K-channels - the Past 30 Years on their Isolation and on their Investigation. In: H. Rochat, M.-F. Martin-Eauclaire (Eds.): *Animal Toxins. Tools in Cell Biology*. Chapman & Hall, submitted .
- [15] BÉRESS, L., R. RITTER AND U. RAVENS (1982). The influence of the rate of electrical stimulation on the effects of the *Anemonia sulcata* Toxin ATX II in guinea pig papillary muscle. *Eur. J. Pharmacol.* 79: 265-272.
- [16] BERGMAN, C., J.-M. DUBOIS, E. ROJAS AND W. RATHMAYER (1976). Decreased rate of sodium conductance inactivation in the node of Ranvier induced by a polypeptide toxin from sea anemone. *Biochim. Biophys. Acta.* 455: 173-184.
- [17] BEZANILLA, F. (1985). Single sodium channels from the squid giant axon. *J. Membrane Biol.* 88: 97-111.

- [18] BÉRESS, L. AND R. BÉRESS (1971). Reinigung zweier krabbenlähmender Toxine aus der Seeanemone *Anemonia sulcata*. *Meeresforsch.* 27: 117-127.
- [19] BLAIR, R. W., D. F. PETERSON AND V. S. BISHOP (1978). The effects of anthopleurin-A on cardiac dynamics in conscious dogs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 207: 271-276.
- [20] BORNEMANN, J. AND R. HAHN (1993). Purification of protein toxins from *Leiurus qiunquestriatus hebraeus* that modify Na-channels. *Toxicon* 31: 1019-1038.
- [21] BORTZ, J. (1993). Statistik für Sozialwissenschaftler. *Spektrum-Verlag, Berlin*.
- [22] BRUHN, T., C. SCHALLER, C. SCHULZE, J. SANCHEZ-RODRIGUEZ, C. DANNMEIER, U. RAVENS, F. HEUBACH, K. ECKHARDT, J. SCHMIDTMAYER, H. SCHMIDT, A. ANEIROS, E. WACHTER AND L. BÉRESS (2000). Isolation and characterization of 5 neurotoxic and cardiotoxic polypeptides from the sea anemone *Anthopleura elegantissima*. *Toxicon* (eingereicht).
- [23] BURLEY, S. K. AND G. A. PETSKO (1986). Amino-aromatic interactions in proteins. *FEBS Lett.* 203: 139-143.
- [24] CATTERALL, W. A. (1988). Molecular properties of voltage-sensitive sodium and calcium channels. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 21: 1129-1144.
- [25] CATTERALL, W. A. (1992). Cellular and molecular biology of voltage-gated sodium channels. *Physiol. Rev.* 72: S15-48.
- [26] CATTERALL, W. A. AND D. A. BENESKI (1980). Interaction of polypeptide neurotoxins with a receptor site associated with voltage-sensitive sodium channels. *J. Supramol. Struct.* 14: 295-303.
- [27] CATTERALL, W. A. AND L. BÉRESS (1978). Sea anemone toxin and scorpion toxin share a common receptor site associated with the action potential sodium ionophore. *J. Biol. Chem.* 253: 7393-7396.
- [28] CATTERALL, W. A. AND P. N. EPSTEIN (1992). Ion channels. *Diabetologia* 35 Suppl 2: S23-33.



- [29] CATTERALL, W. A., J. W. SCHMIDT, D. J. MESSNER AND D. J. FELLER (1986). Structure and biosynthesis of neuronal sodium channels. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 479: 186-203.
- [30] CHIU, S. Y. (1977). Inactivation of sodium channels: second order kinetics in myelinated nerve. *Biophys. J.* 42: 151-157.
- [31] CONTI, F. AND W. STÜHMER (1989). Quantal charge redistributions accompanying the structural transitions of sodium channels. *Eur. Biophys. J.* 17: 53-59.
- [32] COREY, D. P. AND C. F. STEVENS (1983). Science and technology of patch-recording electrodes. In: B. Sakmann & E. Neher (Eds.): Single channel recording. *Plenum Press, N. Y.* 53-68.
- [33] CULL-CANDY, S. G., C. G. MARSHALL AND D. C. OGDEN (1987). A transient outward potassium current in rat cerebellar cell explants. *J. Physiol.* 392: 34 P.
- [34] CULL-CANDY, S. G. AND M. M. USOWICZ (1989). On the multiple-conductance single channels activated by excitatory amino acids in large cerebellar neurones of the rat. *J. Physiol. (Lond)* 415: 555-582.
- [35] CUMMINS, T. R., J. R. HOWE AND S. G. WAXMAN (1998). Slow closed-state inactivation: a novel mechanism underlying ramp currents in cells expressing the hNE/PN1 sodium channel. *J. Neurosci.* 18: 9607-9619.
- [36] DIAS KADAMBI, B. L., K. A. COMBS, C. L. DRUM, D. A. HANCK AND K. M. BLUMENTHAL (1996). The role of exposed tryptophan residues in the activity of the cardiotoxic polypeptide anthopleurin B. *J. Biol. Chem.* 271: 23828-23835.
- [37] ECKERT, R. AND D. RANDALL (1986). Tierphysiologie. *Thieme Verlag, Stuttgart, New York.*
- [38] EL SHERIF, N., E. B. CAREF, H. YIN AND M. RESTIVO (1996). The electrophysiological mechanism of ventricular arrhythmias in the long QT syndrome. Tridimensional mapping of activation and recovery patterns. *Circ. Res.* 79: 474-492.

- [39] FILATOV, G. N., T. P. NGUYEN, S. D. KRANER AND R. L. BARCHI (1998). Inactivation and secondary structure in the D4/S4-5 region of the SkM1 sodium channel. *J. Gen. Physiol.* 111: 703-715.
- [40] FOGH, R. H., W. R. KEM AND R. S. NORTON (1990). Solution structure of neurotoxin I from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. A nuclear magnetic resonance, distance geometry and restrained molecular dynamics study. *J. Biol. Chem.* 265: 13016-13028.
- [41] FRANCIS, L. (1979). Contrast between solitary and clonal lifestyles in the sea anemone *Anthopleura elegantissima*. *J. Amer. Zool.* 19: 669-681.
- [42] FRANKENHAEUSER, B. (1960). Quantitative description of sodium currents in myelinated nerve fibres of *Xenopus laevis*. *J. Physiol.* 151: 491-501.
- [43] GALLAGHER, M. J. AND K. M. BLUMENTHAL (1992). Cloning and expression of wild-type and mutant forms of the cardiotoxic polypeptide anthopleurin B. *J. Biol. Chem.* 267: 13958-13963.
- [44] GALLAGHER, M. J. AND K. M. BLUMENTHAL (1994). Importance of the unique cationic residues arginine 12 and lysine 49 in the activity of cardiotoxic polypeptide anthopleurin B. *J. Biol. Chem.* 269: 254-259.
- [45] GONOI, T. AND B. HILLE (1987). Gating of Na-channels. Inactivation modifiers discriminate among models. *J. Gen. Physiol.* 89: 253-274.
- [46] GOOLEY, P. R., J. W. BLUNT, L. BÉRESS AND R. S. NORTON (1988). Effects of pH and temperature on cardioactive polypeptides from sea anemones: a  $^1H - NMR$  study. *Biopolymers* 27: 1143-1157.
- [47] GÖRÖGH, T., T. BRUHN, E. DRAUS AND L. BÉRESS (1994). Isolation of crab paralyzing polypeptides from the venom of the scorpion *Leiurus quinquestriatus hebraeus*. Program and abstract of the 11th World Congress on animal, plant and microbial toxins. *Tel Aviv, Israel, October 2-7* 122.

- [48] GREENBLATT, R. E., Y. BLATT AND M. MONTAL (1985). The structure of the voltage-sensitive sodium channel. Inference derived from computer-aided analysis of the *Electrophorus electricus* channel primary structure. *FEBS Lett.* 193: 125-134.
- [49] GRUEN, L. C. AND R. S. NORTON (1985). Role of aspartate residues in the cardiac stimulatory activity of anthopleurin-A. *Biochem. Intl.* 11: 69-76.
- [50] GUY, H. R. AND F. CONTI (1990). Pursuing the structure and function of voltage-gated channels. *TINS* 13: 201-206.
- [51] GUY, H. R. AND P. SEETHARAMULU (1986). Molecular model of the action potential sodium channel. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 83: 508-520.
- [52] HABERMANN, E. AND L. BÉRESS (1979). Iodine labelling of sea anemone toxin II and binding to normal and denervated diaphragm. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 309: 165-170.
- [53] HAMILL, O. P., A. MARTY, E. NEHER, B. SAKMANN AND F. J. SIGWORTH (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.* 391: 85-100.
- [54] HEINEMANN, S. (1995). Guide to data Acquisition and analysis. In: Sakman, B. & Neher, E. (Eds.): Single-channel recording. *Spektrum Akad. Verl., Heidelberg, Berlin, Oxford* 53-90.
- [55] HODGKIN, A. L. AND A. F. HUXLEY (1952). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol. Lond.* 117: 500-544.
- [56] HORITA, K., M. NAGASAWA, S. I. HACHIYA, Y. SAKURAI, T. YAMAZAKI, J. UENISHI AND O. YONEMITSU (1997). Synthetic studies of halichondrin B, an antitumor polyether macrolide isolated from a marine sponge: 8. Synthesis of the lactone part (C1-C36) via Horner-Emmons coupling between C1-C15 and C16-C36 fragments and Yamaguchi lactonization. *Tetrahedron Letters* 38: 8965-8968.

- [57] HORITA, K., Y. SAKURAI, M. NAGASAWA AND O. YONEMITSU (1997). Synthetic studies of halichondrin B, an antitumor polyether macrolide isolated from a marine sponge: 7. Synthesis of two C27-C36 units via construction of the F ring and completely stereoselective C-glycosylation using mixed Lewis acids. *Chem. Pharmaceut. Bull. Tokyo* 45: 1558-1572.
- [58] HUCHO, F. (1979). Photoaffinity derivatives of alpha-bungarotoxin and alpha-*Naja naja siamensis* toxin. *FEBS Lett.* 103: 27-32.
- [59] HUCHO, F. (1995). Toxins as tools in neurochemistry. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 34: 39-50.
- [60] KALMAN, K., M. W. PENNINGTON, M. D. LANIGAN, A. NGUYEN, H. RAUER, V. MAHNIR, K. PASCHETTO, W. R. KEM, S. GRISSMER, G. A. GUTMAN, E. P. CHRISTIAN, M. D. CAHALAN, R. S. NORTON AND K. G. CHANDY (1998). ShK-Dap22, a potent Kv1.3-specific immunosuppressive polypeptide. *J. Biol. Chem.* 273: 32697-32707.
- [61] KANDAL, E. R., J. H. SCHWARTZ AND T. M. JESSEL (1996). Neurowissenschaften. Eine Einführung. *Spektrum Akad. Verl., Heidelberg, Berlin, Oxford*.
- [62] KELSO, G. J., C. L. DRUM, D. A. HANCK AND K. M. BLUMENTHAL (1996). Role for Pro-13 in directing high-affinity binding of anthopleurin B to the voltage-sensitive sodium channel. *Biochemistry* 35: 14157-14164.
- [63] KEM, W. R. AND B. M. DUNN (1988). Separation and characterization of four different amino acid sequence variants of a sea anemone (*Stichodactyla helianthus*) protein cytolyisin. *Toxicon* 26: 997-1008.
- [64] KEM, W. R., B. PARTEN, M. W. PENNINGTON, D. A. PRICE AND B. M. DUNN (1989). Isolation, characterization and amino acid sequence of a polypeptide neurotoxin occurring in the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Biochemistry* 28: 3483-3489.
- [65] KEM, W. R., M. W. PENNINGTON, D. S. KRAFTE AND R. J. HILL (1996). Sea anemone toxins affecting sodium channels: are the similarities greater than the diffe-

- rences? In: P. Lazarovici, M.E. Spira, E. Zlotkin (Eds.): *Biochemical Aspects of Marine Pharmacology, 1st edition. Fort Collins, Colorado: Alaken, Inc.* 98-120.
- [66] KEYNES, R. D. (1992). A new look at the mechanism of activation and inactivation of voltage-gated ion channels. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 249: 107-112.
- [67] KEYNES, R. D. AND F. ELINDER (1998). Modelling the activation, opening, inactivation and reopening of the voltage-gated sodium channel. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 265: 263-270.
- [68] KEYNES, R. D. AND H. MEVES (1993). Properties of the voltage sensor for the opening and closing of the sodium channels in the squid giant axon. *Proc. R. Soc. Lond. B253*: 61-68.
- [69] KHERA, P. K., G. R. BENZINGER, G. LIPKIND, C. L. DRUM, D. A. HANCK AND K. M. BLUMENTHAL (1995). Multiple cationic residues of anthopleurin B that determine high affinity and channel isoform discrimination. *Biochemistry* 34: 8533-8541.
- [70] KHERA, P. K. AND K. M. BLUMENTHAL (1994). Role of the cationic residues arginine 14 and lysine 48 in the function of the cardiotoxic polypeptide anthopleurin B. *J. Biol. Chem.* 269: 921-925.
- [71] KOBAYASHI, M., C. H. WU, M. YOSHII, T. NARAHASHI, H. NAKAMURA, J. KOBAYASHI AND Y. OHIZUMI (1986). Preferential block of skeletal muscle sodium channels by geographutoxin II, a new peptide toxin from *Conus geographus*. *Pflügers Arch.* 407: 241-243.
- [72] KODOMA, I., S. SHIBATA, K. TOYAMA AND K. YAMADA (1981). Electromechanical effects of anthopleurin-A (AP-A) on rabbit ventricular muscle: influence of driving frequency, calcium antagonists, tetrodotoxin, lidocaine and ryanodine. *Brit. J. Pharmacol.* 74: 29-37.
- [73] KOPPENHÖFER, E. AND H. SCHMIDT (1968). Die Wirkung von Skorpiongift auf die Ionenströme des Ranvierschen Schnürrings. I. Die Permeabilitäten  $P_{Na}$  und  $P_K$ . *Pflügers Arch.* 303: 133-149.

- [74] KOPPENHÖFER, E. AND H. SCHMIDT (1968). Die Wirkung von Skorpiongift auf die Ionenströme des Ranvierschen Schnürrings. II. Unvollständige Natrium-Inaktivierung. *Pflügers Arch.* 303: 150-161.
- [75] KOSTYUK, P. G., O. A. KRISTHAL, V. I. PIDOBLICHKO AND N. S. VESELOVSKY (1978). Ionic currents in the neuroblastoma cell membrane. *Neuroscience* 3: 327-332.
- [76] LINDL, T. AND J. BAUER (1989). Zell- und Gewebekultur: Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen. *Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York* p. 75-90.
- [77] LUBBOCK, R. (1980). Why are clownfish not stung by sea anemone? *Pro. R. Soc. London B* 207: 35.
- [78] MENZLER, S., J. A. BIKKER AND D. C. HORWELL (1998). Synthesis of a non-peptide analogue of omega-conotoxin MVIIA. *Tetrahedron Letters* 39: 7619-1622.
- [79] MILLER, J. A., W. S. AGNEW AND S. R. LEVINSON (1983). Principal glycopeptide of the tetrodotoxin/saxotoxin binding protein from *Electrophorus electricus*: isolation and partial chemical and physical characterization. *Biochemistry* 22: 462-470.
- [80] MOOLENAAR, W. H. AND I. SPECTOR (1978). Ionic currents in cultured mouse neuroblastoma cells under voltage-clamp conditions. *J. Physiol.* 278: 265-286.
- [81] MOZAHAYEVA, G. N., A. P. NAUMOV, E. D. NOSYREVA AND E. V. GRISHIN (1980). Potential-dependent interaction of toxin from venom of the scorpion *Buthus eupeus* with sodium channels in myelinated fiber. *Biochim. Biophys. Acta.* 597: 587-602.
- [82] MÜLLER-EHMSSEN, J., M. NÄBAUER AND R. H. G. SCHWINGER (1999). Na-channel modulating effect of the inotropic compound S(-)BDF 9196 in human myocardium. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 359: 60-64.
- [83] NAGY, K., T. KISS AND D. HOF (1983). Single Na-channels in mouse neuroblastoma cell membrane. Indications for two open states. *Pflügers Arch.* 339: 302-308.

- [84] NARAHASHI, T., H. G. HAAS AND E. F. THERRIEN (1967). Saxitoxin and tetrodotoxin: comparison of nerve blocking mechanism. *Science* 157: 1441-1442.
- [85] NARAHASHI, T., J. W. MOORE AND W. R. SCOTT (1964). Tetrodotoxin blockage of sodium conductance increase in lobster giant axons. *J. Gen. Physiol.* 47: 965-974.
- [86] NARAHASHI, T., J. W. MOORE AND B. I. SHAPIRO (1969). Condylactis toxin: interaction with nerve membrane ionic conductances. *Science* 163: 680-681.
- [87] NEHER, E. AND B. SAKMANN (1976). Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260: 799-802.
- [88] NEWCOMB, R., D. G. SERIGUCHI, T. R. NORTON AND K. T. YASUNOBU (1980). Effects of chemical modification of anothopleurin-A, a peptide heart stimulant. In: *Frontiers in Protein Chemistry* (Liu, D.T., Mamiya, G. and Yasunobu, K.T., Eds.). *Elsevier Press, Amsterdam* 539-550.
- [89] NIEMANN, P. (1989). Das Inaktivierungsverhalten des Natriumkanals vor und nach Behandlung mit Chloramin-T. *Dissertation, Zoologisches Institut der CAU, Kiel.*
- [90] NIEMANN, P., J. SCHMIDTMAYER AND W. ULBRICHT (1991). Chloramine-T effect on sodium conductance of neuroblastoma cells as studied by whole-cell clamp and single-channel analysis. *Pflügers Arch.* 418: 129-136.
- [91] NODA, M., T. IKEDA, T. KAYANO, H. SUZUKI, H. TAKESHIMA, M. KURASAKI, H. TAKAHASHI AND S. NUMA (1986). Existence of distinct sodium channel messenger RNAs in rat brain. *Nature* 320: 188-192.
- [92] NODA, M., S. SHIMIZU, T. TANABE, T. TAKAI, T. KAYANO, T. IKEDA, H. TAKAHASHI, H. NAKAYAMA, Y. KANAOKA AND N. MINAMINO (1984). Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature* 312: 121-127.
- [93] NORTON, R. S. (1991). Structure and structure-function relationships of sea anemone proteins that interact with the sodium channel. *Toxicon* 29: 1051-1084.

- [94] NORTON, R. S., L. BÉRESS, S. STOB, R. BOELEN AND R. KAPTEIN (1986). Photochemically induced dynamic nuclear polarisation NMR study of the aromatic residues of sea-anemone polypeptide cardiac stimulants. *Eur. J. Biochem.* 157: 343-346.
- [95] NORTON, R. S., A. I. COSSINS AND W. R. KEM (1989).  $^1H$  - NMR study of the solution properties of the polypeptide neurotoxins I from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Biochemistry* 28: 1820-1826.
- [96] NORTON, T. R. (1981). Cardiotonic polypeptides from *Anthopleura xanthogrammica* (Brandt) and *A. elegantissima* (Brandt). *Fed. Proc.* 40: 21-25.
- [97] NORTON, T. R., S. SHIBATA AND M. KASHIWAGI (1978). Anthopleurin A, B and C cardiotonic polypeptides from the sea anemones *Anthopleura xanthogrammica* (Brandt) and *Anthopleura elegantissima* (Brandt). In: Drugs and foods from sea, myth or reality? (Kaul, P.N., Sindermann, C.J., eds.). *University of Oklahoma Press* 37-50.
- [98] NORTON, T. R., S. SHIBATA, M. KASHIWAGI AND I. BENTLEY (1976). Isolation and characterization of the cardiotonic polypeptide anthopleurin-A from the tentacles of the sea anemone *Anthopleura xanthogrammica*. *J. Pharm. Sci.* 65: 1368-1374.
- [99] NUMBERGER, M. AND A. DRAGUHN (1996). Patch-Clamp-Technik. *Spektrum, Akad. Verl., Heidelberg, Berlin, Oxford*.
- [100] O'LEARY, M. E., L. Q. CHEN, R. G. KALLEN AND R. HORN (1995). A molecular link between activation and inactivation of sodium channels. *J. Gen. Physiol.* 106: 641-658.
- [101] OPSAHL, L. R. AND W. W. WEBB (1994). Lipid-glass adhesion in giga-sealed patch-clamped membranes. *Biophys. J.* 66: 75-79.
- [102] PALLAGHY, P. K., M. J. SCANLON, S. A. MONKS AND R. S. NORTON (1995). Three-dimensional structure in solution of the polypeptide cardiac stimulant anthopleurin-A. *Biochemistry* 34: 3782-3794.
- [103] PATLAK, J. (1991). Molecular kinetics of voltage dependent Na-channels. *Physiol. Rev.* 71: 1047-1080.



- [104] PATTON, D. E., J. W. WEST, W. A. CATTERALL AND A. L. GOLDIN (1992). Amino acid residues required for fast Na(+)-channel inactivation: charge neutralizations and deletions in the III-IV linker. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89: 10905-10909.
- [105] PEITSCH, M. C. (1996). ProMod and Swiss-Model: Internet-based tools for automated comparative protein modelling. *Biochem. Soc. Trans.* 24: 274-279.
- [106] PEITSCH, M. C. AND C. V. JONGENEEL (1993). A 3-D model for the CD40 ligand predicts that it is a compact trimer similar to the tumor necrosis factors. *Int. Immunol.* 5: 233-238.
- [107] PEITSCH, M. C., T. N. WELLS, D. R. STAMPF AND J. L. SUSSMAN (1995). The Swiss-3DImage collection and PDB-Browser on the World-Wide Web. *Trends. Biochem. Sci.* 20: 82-84.
- [108] PETTIT, G. R., E. J. FLAIVE, M. R. BOYD, R. BAI, E. HAMEL, R. K. PETTIT AND J. M. SCHMIDT (1998). Antineoplastic agents 360. Synthesis and cancer cell growth inhibitory studies of dolastatin 15 structural modifications. *Anti Cancer Drug Design* 13: 47-66.
- [109] PINEDA, J. AND A. ESCOFET (1989). Selective effects of disturbance on populations of sea anemones from northern Baja California, México. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 55: 55-62.
- [110] PONCET, J., M. BUSQUET, F. ROUX, A. PIERRE, G. ATASSI AND P. JOUIN (1998). Synthesis and biological activity of chimeric structures derived from the cytotoxic natural compounds dolastatin 10 and dolastatin 15. *J. Med. Chem.* 41: 1524-1530.
- [111] PONCET, J., L. HORTALA, M. BUSQUET, F. GUERITTE-VOEGELEIN, S. THORET, A. PIERRE, G. ATASSI AND P. JOUIN (1998). Synthesis and antiproliferative activity of a cyclic analog of dolastatin 10. *Bioorg. Med. Chem. Letters* 8: 2855-2858.
- [112] QUANDT, F. N. (1988). Modification of slow inactivation of single sodium channels by phenytoin in neuroblastoma cells. *Molec. Pharmacol.* 34: 557-565.
- [113] QUANDT, F. N. AND T. NARAHASHI (1982). Modification of single Na-channels by batrachotoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79: 6732-6736.

- [114] RACK, M., H. MEVES, L. BÉRESS AND H. H. GRUNHAGEN (1983). Preparation and properties of fluorescence labeled neuro- and cardiotoxin II from the sea anemone *Anemonia sulcata*. *Toxicon* 21: 231-237.
- [115] RAVENS, U. (1976). Electromechanical studies of an *Anemonia sulcata* toxin in mammalian cardiac muscle. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 296: 73-78.
- [116] RAVENS, U., G. J. AMOS, T. EHRING AND G. HEUSCH (1995). A sodium channel modulator with positive inotropic action. *Cardiovasc. Drug Rev.* 13: 260-274.
- [117] RICHET, C. (1903). Des poisons contenue dans les tentacles des actinies (Congetine et Thalassine). *Compt. Rend. Soc. Biol.* 55: 701-707.
- [118] ROMÉY, G., J. P. ABITA, H. SCHWEITZ, G. WUNDERER AND M. LAZDUNSKI (1976). Sea anemone toxin: a tool to study molecular mechanisms of nerve conduction and excitation-secretion coupling. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 73: 4055-4059.
- [119] RUIGT, G. S. F., H. C. NEYT, J. M. VAN DER ZALM AND J. VAN DEN BERCKEN (1987). Increase of sodium current after pyrethroid insecticides in mouse neuroblastoma cells. *Brain Res.* 437: 309-322.
- [120] SCHALLER, C. H. AND H. BODENMÜLLER (1981). Isolation and amino acid sequence of a morphogenetic peptide from hydra. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 7000-7004.
- [121] SCHEFFÉ, H. (1963). The analysis of variance. *New York: Wiley.*
- [122] SCHLICHTER, D. (1972). Chemische Tarnung. Die stoffliche Grundlage der Anpassung von Anemonenfischen an Riffanemonen. *Mar. Biol.* 12: 354-362.
- [123] SCHMIDTMAYER, J. (1986). Die Potential- und Temperaturabhängigkeit der normalen und der modifizierten Inaktivierung von Natrium-Kanälen. Quantitative Beschreibung durch ein zyklisches Drei-Zustands-Modell. *Habilitationsschrift, Physiologisches Institut der CAU, Kiel.*
- [124] SCHMIDTMAYER, J. (1989). Voltage and temperature dependence of normal and chemically modified inactivation of sodium channels. Quantitative description by a cyclic three-state model. *Pflügers Arch.* 414: 273-281.

- [125] SCHMIDTMAYER, J., M. STOYE-HERZOG AND W. ULBRICHT (1983). Combined action of intraaxonal iodate and external sea anemone toxin ATX II on sodium channel inactivation of frog nerve fibres. *Pflügers Arch.* 398: 204-209.
- [126] SCHOENMAKERS, T. J., G. J. VISSER, G. FLIK AND A. P. THEUVENET (1992). CHELATOR: an improved method for computing metal ion concentrations in physiological solutions. *Biotechniques* 12: 870-4, 876-9.
- [127] SCRIABINE, A., C. G. VAN ARMAN, G. MORGAN, A. A. MORRIS, C. D. BENNET AND N. R. BOHIDAR (1979). Cardiotonic effect of anthopleurin-A, a polypeptide from a sea anemone. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1: 571-583.
- [128] SEGAL, M., M. A. ROGAWSKI AND J. L. BARKER (1984). A transient potassium conductance regulates the excitability of cultured hippocampal and spinal neurones. *J. Neurosci.* 4: 602-609.
- [129] SHEETS, M. F. AND D. A. HANCK (1995). Voltage-dependent open-state inactivation of cardiac sodium channels: gating current studies with anthopleurin-A toxin. *J. Gen. Physiol.* 106: 617-640.
- [130] SIGWORTH, F. J. (1983). Electronic design of patch-clamp. In: B. Sakman & E. Neher (Eds.): Single-Channel Recording. *Plenum Press, New York* 3-35.
- [131] SILLS, M. N., Y. C. XU, E. BARACCHINI, R. H. GOODMAN, S. S. COOPERMAN, G. MANDEL AND K. R. CHIEN (1989). Expression of diverse  $Na^+$ -channel messenger RNAs in rat myocardium. Evidence for a cardiac-specific  $Na^+$ -channel. *J. Clin. Invest.* 84: 339-358.
- [132] SPECTOR, I. (1981). Electrophysiology of clonal nerve cell lines. In: P.G. Nelson & M. Lieberman (Eds.): Excitable cells in tissue culture. *Plenum Press, New York* 247-274.
- [133] STANDEN, N. B. AND P. R. STANFIELD (1992). Patch-clamp methods for single channel and whole cell recording. In: Stamford, J.A. (Ed.): Monitoring neuronal activity. A practical approach. *IRL, Oxford, New York, Tokyo* 59-84.

- [134] STENGELIN, S., W. RATHMAYER, G. WUNDERER, L. BÉRESS AND F. HUCHO (1981). Radioactive labeling of toxin II from *Anemonia sulcata*. *Anal. Biochem.* 113: 277-285.
- [135] STRICHARTZ, G., T. RANDO AND G. K. WANG (1987). An integrated view of the molecular toxinology of sodium channel gating in excitable cells. *Annu. Rev. Neurosci.* 10: 237-267.
- [136] STRICHARTZ, G. R. AND G. K. WANG (1986). Rapid voltage-dependent dissociation of scorpion  $\alpha$ -toxins coupled to  $Na^+$ -channel inactivation in amphibian myelinated nerves. *J. Gen. Physiol.* 88: 413-435.
- [137] STUHMER, W., F. CONTI, H. SUZUKI, X. D. WANG, M. NODA, N. YAHAGI, H. KUBO AND S. NUMA (1989). Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel. *Nature* 339: 597-603.
- [138] TANAKA, M., M. HANIU, K. T. YASUNOBU AND T. R. NORTON (1977). Amino acid sequence of the *Anthopleura xanthogrammica* heart stimulant, anthopleurin A. *Biochemistry* 16: 204.
- [139] TEJEDOR, F. J. AND W. A. CATTERALL (1988). Site of covalent attachment of alpha-scorpion toxin derivatives in domain I of the sodium channel alpha subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85: 8742-8746.
- [140] THOMSEN, W. J. AND W. A. CATTERALL (1989). Localization of the receptor site for alpha-scorpion toxins by antibody mapping: implications for sodium channel topology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86: 10161-10165.
- [141] TIETZE, U. AND C. SCHENK (1978). Halbleiter-Schaltungstechnik. *Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York* p. 133-135.
- [142] ULBRICHT, W. AND J. SCHMIDTMAYER (1981). Modification of sodium channels in myelinated nerve by *Anemonia sulcata* toxin II. *J. Physiol. (Paris)* 77: 1103-1111.
- [143] VASSILEV, P. M., T. SCHEUER AND W. A. CATTERALL (1988). Identification of an intracellular peptide segment involved in sodium channel inactivation. *Science* 241: 1658-1661.

- [144] VINCENT, J. P., M. BALERNA, J. BARHANIN, M. FOSSET AND M. LAZDUNSKI (1980). Binding of sea anemone toxin to receptor sites associated within gating system of sodium channel in synaptic nerve endings in vitro. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 77: 1646-1650.
- [145] WARASHINA, A., T. OGURA AND S. FUJITA (1988). Binding properties of sea anemone toxins to sodium channels in the crayfish giant axon. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 90: 351-359.
- [146] WASSERSTROM, J. A., J. E. KELLY AND K. N. LIBERTY (1993). Modification of cardiac  $Na^+$ -channels by anthopleurin-A: effects on gating and kinetics. *Pflügers Arch.* 424: 15-24.
- [147] WATSON, G. M. AND D. A. HESSINGER (1989). Cnidocyte mechanoreceptors are tuned to the movements of swimming prey by chemoreceptors. *Science* 243: 1589-1591.
- [148] WIDMER, H., M. BILLETTER AND K. WÜTHRICH (1989). The three-dimensional structure of the neurotoxin ATX Ia from *Anemonia sulcata* in aqueous solution determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Proteins* 6: 357-371.
- [149] WILSON, K. AND H. KENNETH (1990). Methoden der Biochemie. *Thieme Verlag, Stuttgart, New York* p. 211-215.
- [150] WUNDERER, G., W. MACHLEIDT AND E. WACHTER (1976). Toxin II from *Anemonia sulcata* - the first sequence of a coelenterate toxin. *Hoppe Seylers. Z. Physiol. Chem.* 357: 239-240.
- [151] YANG, N. AND R. HORN (1995). Evidence for voltage-dependent S4 movement in sodium channels. *Neuron* 15: 213-218.

# Anhang A

## Lösungen

### Lösungen zur Herstellung der DRG-Neurone:

#### Puffer/Glucose (PBS: 0.1 Mol; pH 7.4):

0.2 g	<i>KCl</i>	
0.2 g	<i>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></i>	
2.16 g	<i>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></i>	
8.0 g	<i>NaCl</i>	auf 1l Aqua dest.

600 mg Glucose + 100 ml Puffer + 1 ml Penicillin/Streptomycin (1%)

#### Dissoziationslösung:

- DMEM als FertigmEDIUM mit Glucose und L-Glutamin<sup>1</sup>
- 1% Streptomycin/Penicillin
- 0.125% Collagenase<sup>2</sup> (ca. 3.75 mg / 3 ml)

#### Medium:

- DMEM
- 1% Penicillin/Streptomycin

#### PDL-Beschichtung (Poly-D-Lysin<sup>3</sup>):

- eine 0.02% Stammlösung, in Aqua dest., herstellen
- zum Gebrauch 1:10 verdünnen
- ca. 150  $\mu$ l in die Mitte der Kulturschale leicht verteilen
- 2 h inkubieren, 4x mit Aqua dest. (steril!) spülen und 1 h lufttrocknen.

---

<sup>1</sup>Sigma: Lot 105H2322

<sup>2</sup>Sigma: C 5138, Typ IV

<sup>3</sup>Sigma: P0899, Hydrobromid

# Anhang B

## Tabellen

Tabelle B.1: Gemittelte Parameter ( $\pm$  S.E.M.) der diphasischen Inaktivierung in Abhängigkeit vom Membranpotentials unter dem Einfluß verschiedener Anemontoxine gemäß der Funktion:  $I_{Na}(t) = I_0(0)e^{-\frac{t}{\tau_0}} + I_1(0)e^{-\frac{t}{\tau_1}} + I_2$ . Ganzzelleableitungen an Neuroblastomzellen.

Fraktion	P	Membranpotential [mV]						n
		-20	-10	0	10	20	30	
APE 1-1	$\tau_0$	3.49 $\pm$ 0.07	3.14 $\pm$ 0.05	2.84 $\pm$ 0.06	2.68 $\pm$ 0.05	2.78 $\pm$ 0.06	2.77 $\pm$ 0.12	15
	$\tau_1$	20.77 $\pm$ 0.59	19.43 $\pm$ 0.50	16.29 $\pm$ 0.31	15.91 $\pm$ 0.35	18.50 $\pm$ 0.31	20.68 $\pm$ 0.42	15
	$I_0$	0.75 $\pm$ 0.06	0.73 $\pm$ 0.05	0.70 $\pm$ 0.05	0.65 $\pm$ 0.04	0.65 $\pm$ 0.04	0.65 $\pm$ 0.06	15
	$I_1$	0.14 $\pm$ 0.02	0.15 $\pm$ 0.01	0.15 $\pm$ 0.01	0.15 $\pm$ 0.02	0.15 $\pm$ 0.02	0.12 $\pm$ 0.02	15
	$I_2$	0.10 $\pm$ 0.02	0.12 $\pm$ 0.02	0.15 $\pm$ 0.02	0.21 $\pm$ 0.02	0.20 $\pm$ 0.02	0.23 $\pm$ 0.03	15
APE 1-2	$\tau_0$	6.07 $\pm$ 0.10	4.14 $\pm$ 0.06	3.17 $\pm$ 0.06	3.03 $\pm$ 0.04	2.99 $\pm$ 0.06	3.10 $\pm$ 0.05	11
	$\tau_1$	30.08 $\pm$ 0.48	22.04 $\pm$ 0.39	19.84 $\pm$ 0.44	24.06 $\pm$ 0.64	25.28 $\pm$ 0.80	28.00 $\pm$ 0.68	11
	$I_0$	0.71 $\pm$ 0.02	0.64 $\pm$ 0.03	0.56 $\pm$ 0.03	0.54 $\pm$ 0.02	0.55 $\pm$ 0.03	0.45 $\pm$ 0.02	11
	$I_1$	0.13 $\pm$ 0.01	0.14 $\pm$ 0.01	0.14 $\pm$ 0.01	0.13 $\pm$ 0.01	0.12 $\pm$ 0.01	0.08 $\pm$ 0.01	11
	$I_2$	0.15 $\pm$ 0.01	0.21 $\pm$ 0.02	0.30 $\pm$ 0.01	0.32 $\pm$ 0.01	0.34 $\pm$ 0.02	0.46 $\pm$ 0.03	11
APE 2-1	$\tau_0$	6.15 $\pm$ 0.91	5.65 $\pm$ 0.33	5.33 $\pm$ 0.18	4.30 $\pm$ 0.15	3.44 $\pm$ 0.05	3.32 $\pm$ 0.04	10
	$\tau_1$	34.57 $\pm$ 0.80	23.49 $\pm$ 1.30	26.93 $\pm$ 0.75	22.71 $\pm$ 0.59	21.94 $\pm$ 0.60	20.24 $\pm$ 0.25	10
	$I_0$	0.70 $\pm$ 0.16	0.66 $\pm$ 0.09	0.65 $\pm$ 0.03	0.57 $\pm$ 0.03	0.48 $\pm$ 0.03	0.46 $\pm$ 0.02	10
	$I_1$	0.15 $\pm$ 0.02	0.17 $\pm$ 0.03	0.16 $\pm$ 0.01	0.18 $\pm$ 0.01	0.16 $\pm$ 0.01	0.16 $\pm$ 0.01	10
	$I_2$	0.14 $\pm$ 0.01	0.16 $\pm$ 0.05	0.19 $\pm$ 0.02	0.26 $\pm$ 0.02	0.35 $\pm$ 0.03	0.38 $\pm$ 0.02	10
ATX II	$\tau_0$	4.45 $\pm$ 0.15	3.69 $\pm$ 0.08	3.07 $\pm$ 0.07	2.86 $\pm$ 0.05	2.94 $\pm$ 0.10	2.78 $\pm$ 0.08	6
	$\tau_1$	21.47 $\pm$ 0.43	17.72 $\pm$ 0.34	15.39 $\pm$ 0.41	15.64 $\pm$ 0.23	18.06 $\pm$ 0.41	17.27 $\pm$ 0.33	6
	$I_0$	0.68 $\pm$ 0.04	0.64 $\pm$ 0.03	0.59 $\pm$ 0.04	0.61 $\pm$ 0.04	0.63 $\pm$ 0.02	0.62 $\pm$ 0.02	6
	$I_1$	0.20 $\pm$ 0.02	0.17 $\pm$ 0.01	0.18 $\pm$ 0.02	0.15 $\pm$ 0.01	0.13 $\pm$ 0.01	0.07 $\pm$ 0.01	6
	$I_2$	0.19 $\pm$ 0.01	0.22 $\pm$ 0.01	0.24 $\pm$ 0.01	0.24 $\pm$ 0.02	0.25 $\pm$ 0.02	0.23 $\pm$ 0.02	6
APE 5-3	$\tau_0$	4.34 $\pm$ 0.71	3.69 $\pm$ 0.83	3.56 $\pm$ 0.64	3.46 $\pm$ 0.64	2.96 $\pm$ 0.54	3.37 $\pm$ 0.19	8
	$\tau_1$	25.99 $\pm$ 1.71	20.19 $\pm$ 0.99	18.26 $\pm$ 1.41	21.26 $\pm$ 2.87	23.53 $\pm$ 1.88	27.42 $\pm$ 2.36	8
	$I_0$	0.62 $\pm$ 0.05	0.66 $\pm$ 0.04	0.60 $\pm$ 0.04	0.55 $\pm$ 0.05	0.64 $\pm$ 0.06	0.47 $\pm$ 0.08	8
	$I_1$	0.19 $\pm$ 0.02	0.17 $\pm$ 0.02	0.17 $\pm$ 0.02	0.16 $\pm$ 0.03	0.06 $\pm$ 0.02	0.13 $\pm$ 0.04	8
	$I_2$	0.19 $\pm$ 0.03	0.17 $\pm$ 0.04	0.18 $\pm$ 0.03	0.29 $\pm$ 0.04	0.30 $\pm$ 0.04	0.39 $\pm$ 0.04	8
Kontrolle	$\tau_0$	3.12 $\pm$ 0.15	1.95 $\pm$ 0.08	1.43 $\pm$ 0.08	1.02 $\pm$ 0.09	0.86 $\pm$ 0.07	0.79 $\pm$ 0.08	5
	$\tau_1$	11.84 $\pm$ 0.15	9.52 $\pm$ 0.07	7.92 $\pm$ 0.13	4.70 $\pm$ 0.46	3.12 $\pm$ 0.26	2.65 $\pm$ 0.19	5
	$I_0$	0.93 $\pm$ 0.11	0.95 $\pm$ 0.25	0.95 $\pm$ 0.36	0.91 $\pm$ 0.39	0.94 $\pm$ 0.16	0.92 $\pm$ 0.21	5
	$I_1$	0.07 $\pm$ 0.01	0.05 $\pm$ 0.01	0.05 $\pm$ 0.02	0.09 $\pm$ 0.05	0.07 $\pm$ 0.02	0.07 $\pm$ 0.01	5

$P$  steht für die Parameter der Exponentialfunktion;  $\tau_0$  und  $\tau_1$  sind die entsprechenden Zeitkonstanten,  $I_0$  und  $I_1$  die dazugehörigen auf  $t = 0$  extrapolierten schnellen und langsamen Inaktivierungskomponenten.  $I_2$  ist die persistierende Stromkomponente.

$n$  bedeutet die Anzahl der Versuche.



Tabelle B.2: Aufhebung der Inaktivierung ( $\pm$  S.E.M.) in Ringerlösung (Kontrolle) und unter Einwirkung verschiedener Anemonentoxine ( $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ). Normierte Wahrscheinlichkeiten des aktivierbaren Zustandes ( $\pm$  S.E.M.).

$\Delta t$ [ms]	Kontrolle	APE 1-1	APE 1-2	APE 2-1	ATX II
0	0	0	0	0	0
1	$0.01 \pm 0.02$	$0.05 \pm 0.03$	$0.14 \pm 0.03$	$0.10 \pm 0.01$	$0.17 \pm 0.04$
2	$0.04 \pm 0.01$	$0.14 \pm 0.07$	$0.27 \pm 0.06$	$0.28 \pm 0.11$	$0.31 \pm 0.06$
3	$0.08 \pm 0.01$	$0.20 \pm 0.09$	$0.41 \pm 0.09$	$0.35 \pm 0.11$	$0.43 \pm 0.05$
4	$0.13 \pm 0.03$	$0.32 \pm 0.11$	$0.48 \pm 0.09$	$0.47 \pm 0.13$	$0.52 \pm 0.03$
5	$0.18 \pm 0.04$	$0.36 \pm 0.09$	$0.52 \pm 0.09$	$0.46 \pm 0.12$	$0.62 \pm 0.02$
6	$0.24 \pm 0.07$	$0.37 \pm 0.09$	$0.58 \pm 0.09$	$0.46 \pm 0.12$	$0.69 \pm 0.02$
7	$0.31 \pm 0.06$	$0.45 \pm 0.10$	$0.62 \pm 0.08$	$0.47 \pm 0.11$	$0.72 \pm 0.02$
8	$0.39 \pm 0.05$	$0.55 \pm 0.12$	$0.62 \pm 0.09$	$0.54 \pm 0.12$	$0.79 \pm 0.02$
9	$0.44 \pm 0.05$	$0.65 \pm 0.10$	$0.66 \pm 0.10$	$0.56 \pm 0.11$	$0.81 \pm 0.01$
10	$0.54 \pm 0.07$	$0.71 \pm 0.07$	$0.68 \pm 0.08$	$0.61 \pm 0.13$	$0.82 \pm 0.02$
20	$0.67 \pm 0.08$	$0.78 \pm 0.08$	$0.80 \pm 0.07$	$0.79 \pm 0.13$	$0.89 \pm 0.03$
30	$0.77 \pm 0.07$	$0.85 \pm 0.05$	$0.92 \pm 0.03$	$0.85 \pm 0.05$	$0.93 \pm 0.01$
40	$0.90 \pm 0.04$	$0.92 \pm 0.05$	$0.94 \pm 0.02$	$0.92 \pm 0.04$	$0.92 \pm 0.03$
50	$0.97 \pm 0.04$	$0.96 \pm 0.02$	$0.93 \pm 0.04$	$0.91 \pm 0.06$	$0.94 \pm 0.02$
60	$0.98 \pm 0.03$	$0.98 \pm 0.01$	$0.96 \pm 0.03$	$0.99 \pm 0.01$	$0.98 \pm 0.01$
70	$0.99 \pm 0.01$	$0.99 \pm 0.01$	$0.99 \pm 0.01$	$0.99 \pm 0.01$	$0.97 \pm 0.03$
$n$	3	4	5	3	4

$\Delta t$  entspricht dem Repolarisationsintervall;  $n$ : Anzahl der Versuche;

Testimpulse: 40 und 20 ms ( $U_M = 0 \text{ mV}$ ); Haltepotential: -80 mV.

Tabelle B.3: *Time to peak* ( $t_{tp}$ ) während der Aktivierung von  $Na^+$ -Kanälen vor (*Kontrolle*) und nach Behandlung mit Anemonotoxinen ( $5 \mu g/ml$ ) in Abhängigkeit vom Membranpotential ( $U_M$ ).

$U_M$	APE 1-1	APE 1-2	APE 2-1	ATX 2	APE 5-3	Kontrolle
-20	2.91±0.39	2.68±0.40	4.0±0.93	3.61±0.48	2.96±0.79	2.92±0.87
-10	2.77±0.47	1.61±0.17	3.62±0.34	2.46±0.21	1.86±0.51	1.52±0.23
0	2.29±0.36	1.42±0.15	3.28±0.19	1.73±0.16	1.26±0.29	0.95±0.15
10	1.65±0.21	1.11±0.22	2.84±0.15	1.49±0.15	0.92±0.16	0.77±0.08
20	1.41±0.16	1.2±0.16	2.27±0.12	1.3±0.21	0.72±0.15	1.43±0.30
30	1.51±0.28	1.4±0.19	2.54±0.13	1.0±0.12	0.74±0.21	1.88±0.46
40	1.43±0.32		2.58±0.23	1.15±0.15		1.79±0.33
$n$	15	11	10	6	8	5

$U_M$ : Membranpotential [mV]; Gemittelte Werte  $\pm$  S.E.M;  $n$ : Anzahl der Versuche.

Tabelle B.4: Gemittelte Offenzeiten ( $\pm$  S.E.M.) von Einzelkanalaufzeichnungen an Neuroblastomzellen unter dem Einfluß verschiedener Anemonentoxine in Abhängigkeit vom Membranpotential ( $U_M$  [mV]) gemäß der Funktion:  $N = N_A e^{-\frac{t}{B}} + N_C e^{-\frac{t}{D}}$ , mit  $B = \tau_{open1}$  und  $D = \tau_{open2}$ .

P	$U_M$	APE 1-1	APE 1-2	APE 2-1	ATX II	Kontrolle
$\tau_{open1}$	-20	0.29 $\pm$ 0.04 <sub>(6)</sub>	0.28 $\pm$ 0.04 <sub>(5)</sub>		0.33 $\pm$ 0.03 <sub>(6)</sub>	0.25 $\pm$ 0.10 <sub>(3)</sub>
	-10	0.31 $\pm$ 0.04 <sub>(7)</sub>	0.39 $\pm$ 0.03 <sub>(8)</sub>	0.32 $\pm$ 0.03 <sub>(7)</sub>	0.33 $\pm$ 0.03 <sub>(7)</sub>	0.30 $\pm$ 0.05 <sub>(5)</sub>
	0	0.34 $\pm$ 0.02 <sub>(8)</sub>	0.40 $\pm$ 0.04 <sub>(8)</sub>	0.27 $\pm$ 0.05 <sub>(7)</sub>	0.41 $\pm$ 0.02 <sub>(7)</sub>	0.43 $\pm$ 0.04 <sub>(6)</sub>
	10	0.38 $\pm$ 0.03 <sub>(8)</sub>	0.46 $\pm$ 0.04 <sub>(5)</sub>	0.40 $\pm$ 0.05 <sub>(6)</sub>	0.51 $\pm$ 0.06 <sub>(7)</sub>	0.48 $\pm$ 0.02 <sub>(5)</sub>
	20	0.44 $\pm$ 0.04 <sub>(8)</sub>	0.52 $\pm$ 0.06 <sub>(6)</sub>	0.45 $\pm$ 0.08 <sub>(6)</sub>	0.46 $\pm$ 0.03 <sub>(4)</sub>	0.43 $\pm$ 0.04 <sub>(5)</sub>
	30	0.50 $\pm$ 0.03 <sub>(3)</sub>	0.50 $\pm$ 0.13 <sub>(3)</sub>	0.42 $\pm$ 0.05 <sub>(7)</sub>		0.48 $\pm$ 0.11 <sub>(3)</sub>
$\tau_{open2}$	-20	4.21 $\pm$ 1.16 <sub>(6)</sub>	5.79 $\pm$ 2.61 <sub>(5)</sub>		9.50 $\pm$ 1.22 <sub>(6)</sub>	2.03 $\pm$ 0.32 <sub>(3)</sub>
	-10	6.19 $\pm$ 1.37 <sub>(7)</sub>	12.60 $\pm$ 1.42 <sub>(8)</sub>	5.06 $\pm$ 1.14 <sub>(7)</sub>	10.14 $\pm$ 0.97 <sub>(7)</sub>	4.01 $\pm$ 0.28 <sub>(5)</sub>
	0	10.62 $\pm$ 1.19 <sub>(8)</sub>	15.25 $\pm$ 2.01 <sub>(8)</sub>	8.88 $\pm$ 1.48 <sub>(7)</sub>	10.82 $\pm$ 1.61 <sub>(7)</sub>	6.32 $\pm$ 1.14 <sub>(6)</sub>
	10	12.04 $\pm$ 1.58 <sub>(8)</sub>	16.42 $\pm$ 1.32 <sub>(5)</sub>	16.01 $\pm$ 2.09 <sub>(6)</sub>	13.84 $\pm$ 0.95 <sub>(7)</sub>	9.92 $\pm$ 1.22 <sub>(5)</sub>
	20	14.17 $\pm$ 0.88 <sub>(8)</sub>	19.48 $\pm$ 0.66 <sub>(6)</sub>	18.77 $\pm$ 1.57 <sub>(6)</sub>	14.56 $\pm$ 1.33 <sub>(4)</sub>	10.90 $\pm$ 0.84 <sub>(5)</sub>
	30	14.25 $\pm$ 2.85 <sub>(3)</sub>	18.76 $\pm$ 1.34 <sub>(3)</sub>	19.97 $\pm$ 0.84 <sub>(7)</sub>		10.88 $\pm$ 0.84 <sub>(3)</sub>

$P$ : Parameter der Exponentialfunktion;  $\tau_{open1}$  und  $\tau_{open2}$  sind die entsprechenden Zeitkonstanten.

Klammerwert entspricht der Anzahl der Versuche.

Tabelle B.5: Gemittelte Burstlängen  $\overline{B_d}$  ( $\pm$  S.E.M.) von Einzelkanalaufzeichnungen an Neuroblastomzellen unter dem Einfluß verschiedener Anemonentoxine in Abhängigkeit vom Membranpotential ( $U_M$  [mV]) gemäß der Funktion:  $N = N_A e^{\frac{-t}{B_d}}$ , mit  $B_d = \tau_{open}$ .

P	$U_M$	APE 1-1	APE 1-2	APE 2-1	ATX II	Kontrolle
$\tau_{open}$	-20	8.56 $\pm$ 1.88 <sub>(6)</sub>	10.78 $\pm$ 3.69 <sub>(5)</sub>		16.79 $\pm$ 2.78 <sub>(6)</sub>	4.69 $\pm$ 1.06 <sub>(3)</sub>
	-10	8.31 $\pm$ 1.19 <sub>(7)</sub>	20.25 $\pm$ 2.49 <sub>(8)</sub>	11.96 $\pm$ 2.65 <sub>(7)</sub>	16.84 $\pm$ 2.31 <sub>(7)</sub>	7.90 $\pm$ 1.94 <sub>(5)</sub>
	0	15.97 $\pm$ 0.86 <sub>(8)</sub>	23.54 $\pm$ 1.86 <sub>(8)</sub>	13.06 $\pm$ 1.05 <sub>(7)</sub>	15.58 $\pm$ 2.03 <sub>(7)</sub>	11.35 $\pm$ 2.13 <sub>(6)</sub>
	10	16.69 $\pm$ 1.84 <sub>(8)</sub>	23.50 $\pm$ 2.01 <sub>(5)</sub>	23.92 $\pm$ 3.72 <sub>(6)</sub>	20.28 $\pm$ 0.88 <sub>(7)</sub>	12.52 $\pm$ 1.75 <sub>(5)</sub>
	20	19.19 $\pm$ 1.82 <sub>(8)</sub>	29.71 $\pm$ 1.51 <sub>(6)</sub>	28.94 $\pm$ 2.47 <sub>(6)</sub>	20.35 $\pm$ 2.29 <sub>(4)</sub>	13.59 $\pm$ 0.74 <sub>(5)</sub>
	30	22.00 $\pm$ 1.23 <sub>(3)</sub>	32.16 $\pm$ 5.21 <sub>(3)</sub>	29.86 $\pm$ 1.38 <sub>(7)</sub>		13.33 $\pm$ 0.88 <sub>(3)</sub>

P: Parameter der Exponentialfunktion; Klammerwert entspricht der Anzahl der Versuche.

Tabelle B.6: Gemittelte Schließzeiten zwischen den Bursts  $\overline{B_g}$  ( $\pm$  S.E.M.) von Einzelkanalaufzeichnungen an Neuroblastomzellen unter dem Einfluß verschiedener Anemonentoxine in Abhängigkeit vom Membranpotential ( $U_M$  [mV]) gemäß der Funktion:  $N = N_A e^{\frac{-t}{B_g}}$ , mit  $B_g = \tau_{closed}$ .

P	$U_M$	APE 1-1	APE 1-2	APE 2-1	ATX II
$\tau_{closed}$	-20	28.57 $\pm$ 5.58 <sub>(6)</sub>	17.85 $\pm$ 3.78 <sub>(5)</sub>		14.09 $\pm$ 2.61 <sub>(6)</sub>
	-10	14.91 $\pm$ 2.15 <sub>(7)</sub>	8.38 $\pm$ 1.39 <sub>(8)</sub>	14.60 $\pm$ 2.26 <sub>(7)</sub>	11.61 $\pm$ 1.16 <sub>(7)</sub>
	0	8.72 $\pm$ 1.18 <sub>(8)</sub>	7.54 $\pm$ 1.19 <sub>(8)</sub>	9.34 $\pm$ 1.72 <sub>(7)</sub>	9.40 $\pm$ 0.99 <sub>(7)</sub>
	10	6.87 $\pm$ 0.67 <sub>(8)</sub>	6.97 $\pm$ 1.30 <sub>(5)</sub>	7.43 $\pm$ 0.95 <sub>(6)</sub>	8.55 $\pm$ 0.76 <sub>(7)</sub>
	20	7.74 $\pm$ 1.13 <sub>(8)</sub>	5.48 $\pm$ 0.63 <sub>(6)</sub>	6.63 $\pm$ 0.68 <sub>(6)</sub>	7.15 $\pm$ 0.85 <sub>(4)</sub>
	30	8.93 $\pm$ 2.37 <sub>(3)</sub>	7.57 $\pm$ 0.57 <sub>(3)</sub>	5.74 $\pm$ 0.80 <sub>(7)</sub>	

P: Parameter der Exponentialfunktion;

Klammerwert entspricht der Anzahl der Versuche.

Tabelle B.7: Gemittelte Öffnungszeiten innerhalb der Bursts  $\overline{B}_o$  ( $\pm$  S.E.M.) von Einzelkanalaufzeichnungen an Neuroblastomzellen unter dem Einfluß verschiedener Anemonentoxine in Abhängigkeit vom Membranpotential ( $U_M$  [mV]).

$U_M$	APE 1-1	APE 1-2	APE 2-1	ATX II	Kontrolle
-20	$3.61 \pm 0.69_{(6)}$	$4.19 \pm 1.11_{(5)}$		$6.37 \pm 1.05_{(6)}$	$1.74 \pm 0.25_{(3)}$
-10	$4.42 \pm 0.49_{(7)}$	$6.68 \pm 0.70_{(8)}$	$5.51 \pm 1.17_{(7)}$	$6.32 \pm 0.83_{(7)}$	$3.25 \pm 0.59_{(6)}$
0	$6.28 \pm 0.29_{(8)}$	$7.94 \pm 0.96_{(8)}$	$6.42 \pm 0.50_{(7)}$	$5.48 \pm 0.66_{(7)}$	$4.30 \pm 0.67_{(6)}$
10	$5.67 \pm 0.47_{(8)}$	$7.51 \pm 0.87_{(5)}$	$7.99 \pm 1.07_{(6)}$	$6.43 \pm 0.37_{(7)}$	$5.61 \pm 0.49_{(6)}$
20	$5.33 \pm 0.45_{(8)}$	$7.81 \pm 0.27_{(6)}$	$9.07 \pm 0.59_{(6)}$	$5.80 \pm 1.12_{(4)}$	$5.46 \pm 0.18_{(6)}$
30	$4.77 \pm 0.41_{(3)}$	$8.90 \pm 0.28_{(3)}$	$7.53 \pm 0.58_{(7)}$		$4.84 \pm 0.75_{(6)}$

Klammerwert entspricht der Anzahl der Versuche.

# Anhang C

## Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
$\alpha$	Alpha
ANOVA	Analysis of Variance (Varianzanalyse)
AP	Aktionspotential
AP-A	Giftfraktionen der Seeanemone <i>Anthopleura xanthogrammica</i>
APE, AP-C	Giftfraktionen der Seeanemone <i>Anthopleura elegantissima</i>
AS	Aminosäure
ATX	Giftfraktionen der Seeanemone <i>Anemonia sulcata</i>
$a_{ij}$	Übergangswahrscheinlichkeit
$B_c$	Schließzeit innerhalb der Bursts
$B_d$	Burstdauer
$B_g$	Intervall zwischen den Bursts
$B_n$	Anzahl der Öffnungen pro Burst
$B_o$	Öffnungszeit innerhalb der Bursts
C	Kapazität
c	closed (engl.): geschlossen, Zustand des Natriumkanals
Da	Dalton
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DRG	Dorsal root ganglia (engl.): dorsales Rückenmarksganglion
e	exponential
$g_{Na}$	Ionenleitfähigkeit eines Kanals (hier: Natriumkanal)
h	Inaktivierungstor
Hepes	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
I	Strom
$I_{Na}$	Natriumstrom
$\widehat{I}_{Na}$	Natriumspitzenstrom
kHz	Kilohertz
m	Aktivierungstor

MΩ	Megaohm
μg	Mikrogramm
μmol/l	Konzentration in Mikromol/l
mosmol/l	Osmolarität in Milliosmol/l
1n	1 normale Lösung
o	open (engl.): offen, Zustand des Natriumkanals
OPA	Operationsverstärker
pS	Pikosiemens
PDL	Poly-D-Lysin
R	Widerstand
SEM	Standard error mean (engl.): Standardfehler
t	time (engl.): Zeit
τ	Tau (gr.), Zeitkonstante
TEA	Tetraethylammonium
ttp	time to peak (engl.), Zeit bis zum Erreichen des Natriumspitzenstromes
U	Spannung
$U_M$	Membranpotential
V	Volt
$\bar{X}$	Mittelwert
∅	durchschnittlich

## chemische Strukturen:

$Ag^+$	Silber-Ion
AgCl	Silberchlorid
$CaCl_2$	Calciumchlorid
$CaCO_3$	Calciumcarbonat
$Cl^-$	Chlorid-Ion
$CO_2$	Kohlendioxid
CsCl	Cäsiumchlorid
$K^+$	Kalium-Ion
KCl	Kaliumchlorid
$KH_2PO_4$	Kaliumdihydrogenphosphat
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
$Na^+$	Natrium-Ion
NaCl	Natriumchlorid
$Na_2HPO_4$	Dinatriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid

# Lebenslauf

Geburtstag	25.03.1970
Geburtsort	Flensburg
Staats- angehörigkeit	deutsch
Eltern	Karl-Heinz Schmidt, Zollbeamter Irmtraud Schmidt, Hausfrau
1976 - 1980	Besuch der Grundschule in Harrislee
1980 - 1989	Besuch des Alten Gymnasiums in Flensburg
1989 - 1991	Zivildienst bei der Johanniter-Unfall-Hilfe Flensburg
1990 - 1992	Grundstudium der Biologie an der Christian-Albrechts- Universität Kiel
1992 - 1996	Hauptstudium der Biologie an der CAU Kiel
1996 - 1997	Diplomarbeit am Zoologischen Institut der CAU Kiel
seit 1997	Doktorand am Physiologischen Institut der CAU Kiel



# Veröffentlichungen

SCHMIDT, H., J. SCHMIDTMAYER, L. BÉRESS, M. MÁLYUSZ AND M. VOSS (1999). The neurotoxic activity of different toxins from sea anemone *Anthopleura elegantissima* (Brandt) on sodium currents of neuroblastoma cells. *27th Göttingen Neurobiology Conference* Vol. II, P711.

GIERKE, T., H. SCHMIDT, J. SCHMIDTMAYER, H. WIESE AND M. ILLERT (2000). Basic functions of ionic channels - a computer based teaching program using patch clamp recordings. *Pflügers Arch* Supplement to Volume 439 (6), P37-3.

BRUHN, T., C. SCHALLER, C. SCHULZE, J. SANCHEZ-RODRIGUEZ, C. DANNMEIER, U. RAVENS, F. HEUBACH, K. ECKHARDT, J. SCHMIDTMAYER, H. SCHMIDT, A. ANEIRO, E. WACHTER AND L. BÉRESS (2000). Isolation and characterization of 5 neurotoxic and cardiotoxic polypeptides from the sea anemone *Anthopleura elegantissima*. *Toxicon* (eingereicht).

# Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Dissertation selbständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Diese Ausarbeitung hat noch keiner anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen. Ergebnisse dieser Arbeit sind zum Teil bereits veröffentlicht worden.

Kiel, den 24. Juli 2000

(Helge Schmidt)

Referent/in: Prof. W. Wünnenberg

Korreferent/in: Dr. J. Schmidtmayer

Tag der mündlichen Prüfung: 11. Juli 2000

Zum Druck genehmigt: Kiel, den.....

Der Dekan