

Aus der Abteilung Pädiatrie III
mit Schwerpunkt Pädiatrische Kardiologie und Intensivmedizin
(Prof. Dr. med. Th. Paul)

Im Zentrum Kinderheilkunde und Jugendmedizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Expression spannungsabhängiger Hirntyp-Natriumkanäle im sich
entwickelnden Myokard der Ratte**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Christian Thomas Alflen
aus
Mainz

Göttingen 2013

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Th. Paul

II. Berichterstatter: PD Dr. med. S. Sossalla

Tag der mündlichen Prüfung: 06.11.2013

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| Inhaltsverzeichnis..... | I |
| Abkürzungsverzeichnis..... | V |
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1. Grundlagen | 1 |
| 1.1.1. Zellmembran und Ruhepotential | 1 |
| 1.1.2. Aktionspotentiale | 2 |
| 1.1.3. Erregungsbildung und –leitung im Herzen..... | 3 |
| 1.2. Spannungsabhängige Natriumkanäle..... | 7 |
| 1.2.1. Vorkommen und Bedeutung..... | 7 |
| 1.2.2. Aufbau und Funktion..... | 9 |
| 1.2.3. Unterschiede zwischen Hirn- und Herztyp-Natriumkanälen | 12 |
| 1.3. Ionenkanalerkrankungen und assoziierte Erkrankungen..... | 12 |
| 1.3.1. Long-QT-Syndrom (LQTS3) | 12 |
| 1.3.2. Brugada-Syndrom..... | 13 |
| 1.3.3. Sick-Sinus-Syndrom | 14 |
| 1.3.4. Sudden infant death syndrome (SIDS) – Plötzlicher Säuglingsstod | 14 |
| 1.3.5. Dravet-Syndrom | 15 |
| 1.4. Fragestellung | 16 |
| 2. Material und Methoden | 17 |
| 2.1. Materialgewinnung | 17 |
| 2.1.1. Embryonalstadium | 17 |
| 2.1.2. 1 und 7 Tage alte Ratten | 18 |
| 2.1.3. 21 Tage und 6 Wochen alte Ratten..... | 18 |
| 2.2. Real-Time-PCR | 18 |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|--------|--|----|
| 2.2.1. | Erstellung der RNA-Proben | 18 |
| 2.2.2. | Messung der RNA-Konzentration..... | 19 |
| 2.2.3. | Umschreibung der RNA in cDNA | 19 |
| 2.2.4. | Real-Time-PCR | 19 |
| 2.2.5. | Eingesetzte Primer | 20 |
| 2.2.6. | PCR-Bedingungen | 21 |
| 2.3. | Proteinmessungen..... | 21 |
| 2.3.1. | Erstellung der Proteinproben..... | 21 |
| 2.3.2. | Membranaufreinigung | 21 |
| 2.3.3. | Messung der Proteinkonzentration | 22 |
| 2.3.4. | SDS-Gelelektrophorese | 22 |
| 2.3.5. | Western-Blot | 23 |
| 2.3.6. | Antikörpereinsatz | 23 |
| 2.3.7. | Etablierung der Messung | 23 |
| 2.4. | Statistische Methoden..... | 24 |
| 2.4.1. | RNA-Messungen | 24 |
| 2.4.2. | Proteinmessungen..... | 25 |
| 2.5. | Färbungen..... | 25 |
| 2.5.1. | Erstellung der Schnitte | 25 |
| 2.5.2. | Histologische Färbungen | 26 |
| 2.5.3. | Auswahl der Schnitte für die Immunhistochemie..... | 27 |
| 2.5.4. | Immunhistochemie | 28 |
| 2.6. | Verwendete Materialien | 31 |
| 2.6.1. | Chemikalien | 31 |
| 2.6.2. | Angesetzte Puffer und Lösungen | 32 |
| 2.6.3. | Primer und Antikörper | 33 |

| | | |
|--------|---|----|
| 2.6.4. | Einwegartikel | 34 |
| 2.6.5. | Geräte | 34 |
| 2.6.6. | Verwendete Computerprogramme | 35 |
| 2.6.7. | Kits für die Molekularbiologie | 36 |
| 3. | Ergebnisse | 37 |
| 3.1. | RNA-Messungen | 37 |
| 3.1.1. | SCN1A (Na _v 1.1) | 37 |
| 3.1.2. | SCN5A (Na _v 1.5) | 38 |
| 3.1.3. | SCN8A (Na _v 1.6) | 39 |
| 3.2. | Proteinmessungen | 40 |
| 3.2.1. | SCN1A (Na _v 1.1) | 40 |
| 3.2.2. | SCN5A (Na _v 1.5) | 42 |
| 3.2.3. | SCN8A (Na _v 1.6) | 44 |
| 3.3. | Färbungen | 45 |
| 3.3.1. | SCN1A (Na _v 1.1) | 45 |
| 3.3.2. | SCN5A (Na _v 1.5) | 46 |
| 3.3.3. | SCN8A (Na _v 1.6) | 48 |
| 4. | Diskussion | 52 |
| 4.1. | SCN1A (Na _v 1.1) | 52 |
| 4.2. | SCN5A (Na _v 1.5) | 53 |
| 4.3. | SCN8A (Na _v 1.6) | 54 |
| 4.4. | Bedeutung während der Ontogenese | 55 |
| 4.5. | Regulation der Expression spannungsabhängiger Natriumkanäle | 55 |
| 4.5.1. | Regulation auf Ebene der Transkription | 55 |
| 4.5.2. | Regulation der Translation mittels microRNA | 56 |
| 4.5.3. | Regulation durch posttranslationale Modifikation | 57 |

| | |
|--|----|
| 4.6. Fetales Verteilungsmuster und dessen mögliche Gefahren..... | 58 |
| 5. Zusammenfassung..... | 60 |
| 6. Anhang..... | 61 |
| 6.1. Tabellenverzeichnis..... | 61 |
| 6.2. Abbildungsverzeichnis | 62 |
| 7. Literaturverzeichnis..... | 63 |
| 8. Veröffentlichung..... | 72 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------------|--|
| AK | Antikörper |
| ANOVA | <i>Analysis of variance</i> |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BCA | <i>Bicinchoninic acid assay</i> |
| cDNA | <i>Complementary DNA</i> |
| DAB | 3,3'-Diaminobenzidin |
| ddH ₂ O | Bidestilliertes Wasser |
| DNA | <i>Deoxyribonucleic acid</i> |
| dNTP | Desoxyribonukleosidtriphosphat |
| DTT | Dithiothreitol |
| E17 | Embryonale Entwicklungsstufe E17 = 17. Tag der Schwangerschaft |
| EKG | Elektrokardiogramm |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase |
| HCl | Chlorwasserstoffsäure (Salzsäure) |
| HE | Hämatoxylin-Eosin |
| HEPES | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure |
| IgG | Immunglobulin G |
| LQTS | Long-QT-Syndrom |
| mRNA | <i>Messenger RNA</i> |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NaF | Natriumfluorid |
| NRSF | <i>Neuron-Restrictive Silencer Factor</i> |
| PBS | <i>phosphate buffered saline</i> |
| PKA | Proteinkinase A |
| PKC | Proteinkinase C |
| REST | <i>RE-1 silencing transcription factor</i> |
| RNA | <i>Ribonucleic acid</i> |
| RT-PCR | <i>Real-time polymerase chain reaction</i> |
| SD | <i>Standard deviation</i> |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------|-------------------------------------|
| SDS | <i>Sodium dodecyl sulfate</i> |
| SIDS | <i>Sudden infant death syndrome</i> |
| SSS | <i>Sick sinus syndrome</i> |
| TBS | <i>Tris-buffered saline</i> |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin |
| TierSchG | Tierschutzgesetz |
| TRIS | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan |
| TTBS | <i>Tris-Tween-buffered saline</i> |
| Upm | Umdrehungen pro Minute |
| UTR | <i>Untranslated region</i> |
| ZNS | Zentrales Nervensystem |

1. Einleitung

1.1. Grundlagen

1.1.1. Zellmembran und Ruhepotential

Alle Zellen des menschlichen Körpers sind von einer Zellmembran umgeben. Durch diese, aus einer Lipiddoppelschicht bestehende Membran, wird das Zellinnere vom Extrazellularraum getrennt. Damit ist eine Abdichtung nach außen hin gegeben, welche die Zelle vor schädigenden Einflüssen von außen schützt und die intrazelluläre Homöostase gewährleistet. Hierdurch wird der unkontrollierte Verlust intrazellulärer Bestandteile verhindert. Andererseits müssen aber für eine regelgerechte Funktion der Zelle sowohl als Einzelne als auch im Zellverband weiterhin der Stoffaustausch und die Kommunikation mit dem Extrazellularraum und benachbarten Zellen gewährleistet bleiben. Zu diesem Zweck besteht die Membran nicht nur aus den Phospholipiden, welche die Lipiddoppelschicht bilden, sondern ist auch mit speziellen Transportproteinen ausgestattet (Hille 2001).

So ist es geladenen Teilchen wie Na^+ - und K^+ -Ionen nur möglich, die hydrophobe Zellmembran über spezielle Kanäle und Transporter zu passieren. Über die Regulation dieser Proteine, welche zum einen durch eine differentielle Genexpression und zum anderen durch Modifikation der Funktion, z.B. über Phosphorylierung und Dephosphorylierung erfolgt, ist die Zelle in der Lage, den Fluss verschiedener Substrate zu steuern.

In den beiden Kompartimenten Intrazellularraum und Extrazellularraum herrschen unterschiedliche Konzentrationen von Elektrolyten. Während die K^+ -Konzentration in der Zelle bei ca. 155 mmol/l liegt, ist sie außerhalb der Zelle mit ca. 4 mmol/l deutlich geringer. Entgegengesetzt dazu verhält sich die Na^+ -Konzentration mit ca. 12 mmol/l innerhalb und ca. 145 mmol/l außerhalb der Zelle (Hille 2001).

Diese Konzentrationsgradienten werden im Wesentlichen durch die Aktivität der Na^+/K^+ -Pumpe, die unter Verbrauch von je einem Molekül Adenosintriphosphat (ATP) 3 Na^+ -Ionen aus der Zelle heraus und 2 K^+ -Ionen in die Zelle hinein transportiert, aufrecht erhalten. Da die Zellmembran in Ruhe eine höhere Leitfähigkeit für Kaliumionen als für andere Ionen besitzt, strömen entlang des Konzentrationsgradienten daher permanent einfach positiv geladene K^+ -Ionen aus der Zelle. Der Intrazellularraum wird damit gegenüber dem

Extrazellularraum negativ geladen. Diese als Diffusionspotential bezeichnete elektrische Spannung steht dem Konzentrationsgradienten der Ionen entgegen und verhindert zusätzlich den Ausgleich der Konzentrationsunterschiede.

Sind diese beiden, entgegengesetzt wirkenden Kräfte gleich groß, sistiert der Ionenfluss über die Zellmembran. Das Membranpotential, bei welchem für ein gegebenes Ion kein Ionenfluss über eine semipermeable Membran stattfindet, wird als Gleichgewichtspotential bezeichnet. Mit Hilfe der Nernst-Gleichung¹ ergibt sich für Kalium ein Gleichgewichtspotential von ca. -98 mV, für Natrium von etwa +67 mV (Hille 2001). Da die Leitfähigkeit der Zellmembran in Ruhe für Kaliumionen deutlich höher ist als für Natriumionen, liegt das Ruhemembranpotential der Zelle nahe dem Gleichgewichtspotential für Kalium, auf Grund der aber dennoch offenen Natrium- und Kalziumkanäle etwas positiver, bei ca. -70 bis -90 mV (Schmidt et al. 2010).

1.1.2. Aktionspotentiale

Elektrisch erregbare Zellen zeichnen sich dadurch aus, dass sie Aktionspotentiale erzeugen und hierdurch Informationen innerhalb der Zelle, aber auch von Zelle zu Zelle weiterleiten können. Neben Nervenzellen sind auch Skelettmuskel- und Herzmuskelzellen elektrisch erregbar (Hille 2001).

Auf einen adäquaten Reiz hin depolarisiert die Zellmembran und erzeugt eine kurz andauernde, überschießende Änderung des Membranpotentials: das Aktionspotential. Überschießend bedeutet in diesem Zusammenhang eine Depolarisation der Zellmembran in den Bereich positiver Spannungswerte. Die Entstehung und der Ablauf eines Aktionspotentials folgen dabei dem „Alles-oder-Nichts-Prinzip“: kommt es nach einem adäquaten Reiz zur Entstehung eines Aktionspotentials, läuft dieses immer stereotyp ab. Form und Amplitude eines Aktionspotentials bzw. die Frequenz aufeinanderfolgender Aktionspotentiale hängen von der Ionenkanalverteilung in der jeweiligen Zellmembran ab und sind somit zellspezifisch. Auch das sog. Schwellenpotential, d.h. das Membranpotential,

¹ Nernst-Gleichung für das Ion „X“: $E_x = \frac{R \cdot T}{F \cdot z_x} * \ln \frac{X_i}{X_a}$

E: Elektrodenpotential, R: Allgemeine Gaskonstante, T: Absolute Temperatur, F: Faradaykonstante, z_x : Ladungszahl des Ions „X“, X_i : Konzentration des Ions „X“ innen, X_a : Konzentration des Ions „X“ außen

bei dem es zur Generierung eines Aktionspotentials kommt, ist für jeden Zelltyp charakteristisch (Hille 2001).

Zu Beginn des Aktionspotentials öffnen sich in den meisten Zellen spannungsabhängige Natriumkanäle und ermöglichen so den schnellen Einstrom von Natrium-Ionen. Durch den Einstrom positiver Ladungsträger kommt es dann zur Depolarisation der Zellmembran. In den Zellen des Erregungsbildungs- und -leitungssystems des Herzens erfolgt diese Depolarisation nicht durch Natriumkanäle, sondern durch spezielle Kalziumkanäle. Dieser sogenannten Aufstrichphase folgt die Repolarisationsphase (bzw. die Plateauphase im Herzen). In der Repolarisationsphase inaktivieren die Natrium- und Kalziumkanäle und es kommt zur Öffnung von Kaliumkanälen. Die Plateauphase des Arbeitsmyokards zeichnet sich durch einen langsamen Ionenstrom durch spezielle Kalziumkanäle aus, dadurch hält die Zelle für diese Zeit eine relativ konstante Spannung. Durch die jetzt hohe Kaliumleitfähigkeit der Zellmembran strömen K^+ -Ionen aus der Zelle. Durch den nun dominierenden Ausstrom positiver Ladungsträger kommt es zur Repolarisation der Zellmembran.

Am Ende dieser beiden Phasen nähert sich das Membranpotential wieder dem Ruhemembranpotential an. Dabei kann es durch überschießenden Ausstrom von K^+ -Ionen zu einem so genannten hyperpolarisierenden Nachpotential kommen. Während dieser Zeit ist die Zelle in der Refraktärphase, das heißt aktuell nicht (absolute Refraktärphase) oder nur mit geringerer Amplitude des entstehenden Aktionspotentials (relative Refraktärphase) erregbar. Zudem ist während der relativen Refraktärphase eine höhere Reizstärke zur Auslösung eines Aktionspotentials notwendig. Dieser Phase liegt die noch bestehende Inaktivierung der Natrium- und Kalziumkanäle zu Grunde, die eine erneute Depolarisation zu diesem Zeitpunkt verhindert.

1.1.3. Erregungsbildung und -leitung im Herzen

1.1.3.1. Anatomie

Im Herzen wird die Erregungsbildung und -leitung von spezialisierten Herzmuskelzellen übernommen. Sie zeichnen sich unter anderem durch eine geringere Ausstattung mit kontraktilen Elementen aus und haben kein stabiles Ruhemembranpotential. Stattdessen zeigen sie eine Spontandepolarisation bis hin zur Schwelle für die Auslösung eines Aktionspotentials und sind damit essentiell für die Aufrechterhaltung einer regelmäßigen

Herzaktion. Vermittelt wird die spontane diastolische Depolarisation hauptsächlich durch den unselektiven Einstrom von Kationen, dem sog. *funny current* (I_f). Dieser Strom wird primär durch den Kanal HCN4 getragen, der bei einer Hyperpolarisation der Membran aktiviert wird, ein Fakt, der dem Strom den Namen *funny* verschafft hat (Brown et al. 1979) und dessen Gen hauptsächlich im Bereich des Erregungsbildungs- und -leitungssystems exprimiert wird (Shi et al. 1999).

Im Bereich der Vorhöfe liegt der Sinusknoten (Nodus sinuatrialis), der aus einigen hundert Zellen besteht und im rechten Vorhof im Bereich der Mündung der oberen Hohlvene lokalisiert ist. Dieser Zellverband ist der primäre, da schnellste Schrittmacher des Herzens. Ohne neuronale oder humorale Einflüsse generieren diese Zellen bei einem erwachsenen Menschen eine Frequenz von ca. 60-80/min (Schmidt et al. 2010).

Die im Sinusknoten entstandene elektrische Erregung wird durch das Arbeitsmyokard der Atrien geleitet. Diese Fortleitung geschieht hier – wie im gesamten Reizleitungssystem – durch so genannte *gap junctions*, die aus Connexonen aufgebaut, kleine Kanäle zwischen den Zellen ausbilden. Über diese Kanäle erfolgt die elektrische Kopplung der Herzmuskelzellen untereinander.

Am Übergang zwischen den Vorhöfen und den Kammern, auf der rechten Seite des Septum interatriale, liegt der AV-Knoten (Atrioventrikularknoten, Nodus atrioventricularis). Auch dieser Zellverband produziert eine Eigenfrequenz, da sie mit ca. 40-50/min aber langsamer als die des Sinusknoten ist, erreicht die Erregung des Sinusknotens den AV-Knoten normalerweise, bevor dieser ein eigenes Aktionspotential initiieren kann.

Vom kompakten AV-Knoten ausgehend entspringt das His-Bündel (Truncus fasciculi atrioventricularis), das die Erregung auf die Ventrikel überleitet. Nimmt man diese Verbindung aus, so sind die Vorhöfe und Kammern elektrisch vollständig über die bindegewebige Ventilebene (AV-Klappenebene) voneinander getrennt. Die Erregung breitet sich nach dem His-Bündel über den rechten und linken Kammerschenkel (Tawara-Schenkel) weiter über die Purkinje-Fasern in den Kammern aus. Wie Sinusknoten und AV-Knoten sind diese Abschnitte des spezifischen Erregungsbildungs- und -leitungssystems zur spontanen diastolischen Depolarisation fähig, die aber mit einer Frequenz von 30-40/min noch einmal langsamer ausfällt. Somit kommt dem AV-Knoten sowie dem spezifischen

Reizleitungssystem der Ventrikel bei regelgerechter Sinusknotenfunktion eine Bedeutung als sekundäres bzw. tertiäres Schrittmacherzentrum zu.

In den Ventrikeln breitet sich die Erregung in den Zellen des Arbeitsmyokards der Kammern analog zu der Ausbreitung in den Atrien und des Reizleitungssystems, d.h. von Myokardzelle zu Myokardzelle, durch *gap junctions* aus.

1.1.3.2. Aktionspotentiale

Betrachtet man die Aktionspotentiale der Herzmuskelzellen, so muss man zunächst zwischen Zellen des Erregungsbildungs- und -leitungssystems und Zellen des Arbeitsmyokards unterscheiden.

In den Zellen des Erregungsbildungs- und -leitungssystems beginnt das Aktionspotential durch den Einstrom von Ca^{2+} -Ionen durch spezielle Kalziumkanäle, wenn die spontane diastolische Depolarisation das Schwellenpotential von ca. -40 mV erreicht oder die Zelle durch *gap junctions* von einer Nachbarzelle depolarisiert wird. Im Verlauf steigt die Leitfähigkeit für K^+ -Ionen stark an, was dann zur Rückkehr auf das Ausgangspotential (maximal diastolisches Potential) führt.

Das Aktionspotential in Zellen des Arbeitsmyokards beginnt, analog zu den allgemeinen Ausführungen in Abschnitt 1.1.2, bei Erreichen des Schwellenwerts von ca. -70 mV mit dem Einstrom von Na^+ -Ionen durch Natriumkanäle. Die Hauptrolle spielt dabei im Herzen der Kanal $\text{Na}_v1.5$ (Gen: SCN5A) (Rogart et al. 1989).

Diese Natriumkanäle werden spannungsabhängig jedoch ab einer Spannung von ca. -40 mV wieder inaktiviert und sind in diesem Zustand für Ionen impermeabel. Da jedoch nicht alle Kanäle bei exakt der gleichen Spannung inaktivieren, erreicht das Membranpotential Werte bis zu +20 mV (der so genannte „Overshoot“), gefolgt davon setzt die Repolarisation ein. Für diese Phase sind ein Kaliumausstrom sowie ein Einstrom von Cl^- -Ionen verantwortlich (Schmidt et al. 2010).

Als Besonderheit der Herzmuskelzellen des Arbeitsmyokards folgt nun eine ausgeprägte Plateauphase (siehe Abbildung 1), für die ein langsamer Einstrom von Ca^{2+} -Ionen durch L-Typ-Kalziumkanäle verantwortlich ist (Schmidt et al. 2010). Diese Kanäle öffnen sich bei ca. -40 mV und bleiben die Plateauphase über (200-400 ms) geöffnet. Dabei erfüllt diese

Phase eine sehr wichtige Aufgabe im Myokard. In der Zeit des Plateaus bleiben die schnellen Natriumkanäle auf Grund der Spannung inaktiviert, es kann also nicht zur Ausbildung eines weiteren Aktionspotentials kommen. Die Zelle ist absolut refraktär. Dies ist wichtig, damit sich die Erregung nur in eine Richtung ausbreiten und nicht wieder zurücklaufen kann, da sich sonst kreisende Erregungen im Herzen ausbilden und tachykarde Herzrhythmusstörungen entstehen können, die im Bereich der Ventrikel oftmals lebensbedrohlich sind und einen funktionellen Herzstillstand bedeuten können.

Sobald sich die L-Typ-Kalziumkanäle schließen, beginnt die vollständige Repolarisation der Zelle. Diese Phase wird wiederum von Kaliumkanälen getragen.

Erreicht das Membranpotential Werte von ca. -40 mV werden die schnellen Natriumkanäle nach und nach wieder aktivierbar. Sie sind nun wieder geschlossen und sind in der Lage, auf eine erneute Depolarisation mit Öffnen der Membranpore zu reagieren. Da in dieser Phase noch nicht alle schnellen Natriumkanäle dazu in der Lage sind, ist eine höhere Reizstärke für die Auslösung eines Aktionspotentials notwendig. In dieser Phase ausgelöste Aktionspotentiale weisen eine geringere Amplitude auf. Dies bezeichnet man als relative Refraktärphase.

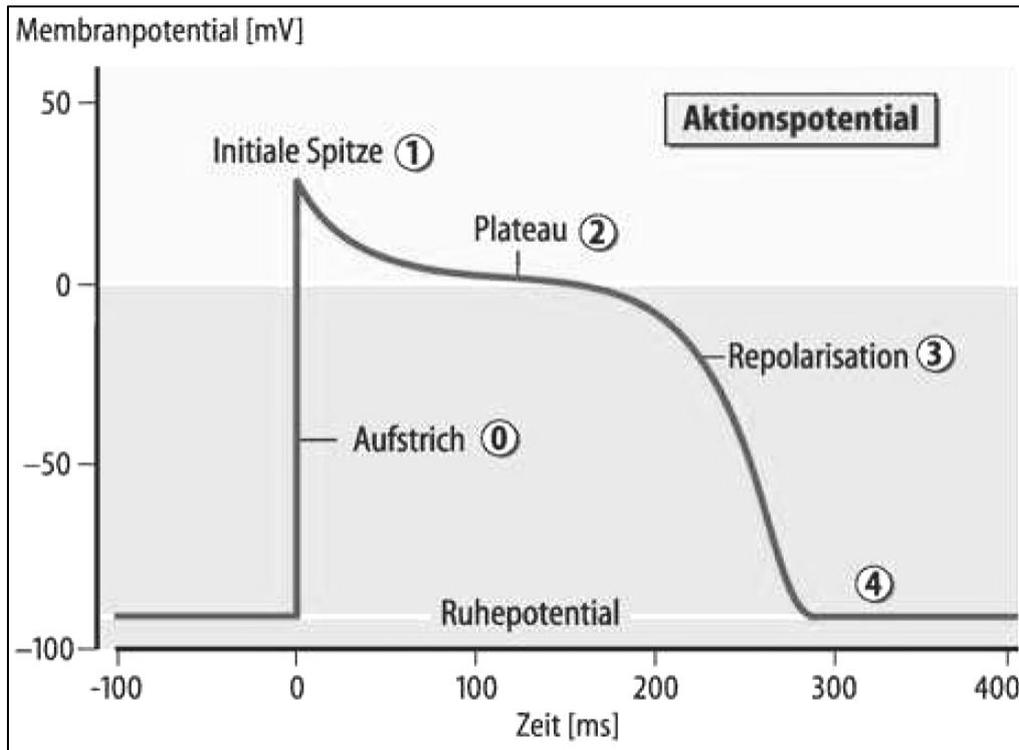


Abbildung 1 - Aktionspotential im Arbeitsmyokard

Das Aktionspotential lässt sich in fünf Abschnitte einteilen. Phase 0 ist eine schnelle Depolarisation (Aufstrich). Eine teilweise Repolarisation nach dem Aufstrich bestimmt die folgende Phase 1 (initiale Spitze), die in Phase 2 (Plateau) übergeht. Die endgültige Repolarisation (Phase 3) führt zum Ruhemembranpotential (Phase 4).

Aus Schmidt et al. (2010), S. 519

1.2. Spannungsabhängige Natriumkanäle

1.2.1. Vorkommen und Bedeutung

Spannungsabhängige Natriumkanäle spielen, wie in den vorangegangenen Abschnitten gezeigt, eine wichtige Rolle bei der Generierung und Weiterleitung von Aktionspotentialen. Sie haben die Eigenschaft, sich spannungsabhängig innerhalb von Millisekunden zu öffnen und wieder zu verschließen und in dieser Zeit selektiv Na^+ -Ionen passieren zu lassen.

Bisher sind beim Menschen 9 verschiedene funktionelle Natriumkanäle ($\text{Na}_v1.1$ – $\text{Na}_v1.9$) bekannt. Außerdem findet sich ein weiteres Gen (SCN7A), das für ein ähnliches Produkt kodiert und als Na_x oder $\text{Na}_v2.1$ bezeichnet wird (Catterall et al. 2005). Dieses Protein wird jedoch nicht spannungsabhängig aktiviert, sondern ist ein Sensor für die extrazelluläre Natrium-Konzentration (Hiyama et al. 2002). Die verschiedenen Typen zeigen unterschiedliche Verteilungsmuster in den einzelnen Geweben (siehe hierzu Tabelle 1).

Während die Typen Na_v1.1, Na_v1.2, Na_v1.3, sowie Na_v1.6 hauptsächlich im Zentralen Nervensystem (ZNS) vorkommen, ist der Kanal Na_v1.4 typisch für den Skelettmuskel und der Kanal Na_v1.5 der in Herzmuskelzellen typischerweise vorkommende spannungsabhängige Natriumkanal (Goldin 2001; Catterall et al. 2005).

Tabelle 1 - Spannungsabhängige Natriumkanäle

Erstellt nach Goldin (2001) und Catterall et al. (2005), ohne Na_x. In dieser Arbeit untersuchte Kanäle sind hervorgehoben.

| Protein | Gen | Hauptexpressionsort |
|--------------------------|---------------|--|
| Na_v1.1 | SCN1A | Zentrales Nervensystem (ZNS), Kardiomyozyten |
| Na _v 1.2 | SCN2A | ZNS |
| Na_v1.3 | SCN3A | ZNS, Kardiomyozyten |
| Na _v 1.4 | SCN4A | Skelettmuskulatur |
| Na_v1.5 | SCN5A | Kardiomyozyten, denervierte Skelettmuskulatur |
| Na_v1.6 | SCN8A | ZNS und Peripheres Nervensystem (PNS) |
| Na _v 1.7 | SCN9A | PNS |
| Na _v 1.8 | SCN10A | PNS |
| Na_v1.9 | SCN11A | PNS |

Aber nicht nur in Zellen des Nervensystems und in Muskelzellen spielen spannungsabhängige Natriumkanäle eine wichtige Rolle. Schon Mitte der 1990er Jahre konnte an Prostatakrebszellen gezeigt werden, dass spannungsabhängige Natriumkanäle in diesen Krebszelllinien exprimiert werden und wesentlich zu der Invasivität dieser Zellen beitragen (Grimes et al. 1995; Laniado et al. 1997). Neuere Studien zeigten diese Expression auch in Brustkrebszellen. Auch dort konnte eine höhere Metastasierungsrate bei erhöhter Expression der Natriumkanäle gezeigt werden (Fraser et al. 2005).

Es konnte außerdem nachgewiesen werden, dass die Expression der spannungsabhängigen Natriumkanäle alleine eine höhere Invasivität einzelner Krebszelllinien ausmachen kann, was zusätzlich deren Bedeutung im Prozess der Kanzerogenese unterstreicht (Bennett ES et al. 2004).

Neuere Studien konnten zeigen, dass auch die, auf Grund ihres Hauptexpressionsorts, als Hirntyp-Natriumkanäle bezeichneten Proteine wichtige Funktionen im Myokard

übernehmen. So sind die Kanäle $Na_v1.1$, $Na_v1.3$ und $Na_v1.6$ in den T-Tubuli der Kardiomyozyten exprimiert und spielen eine wichtige Rolle bei der elektromechanischen Kopplung, das heißt, der Übertragung der elektrischen Erregung in die Kontraktion der Zelle (Maier et al. 2002).

Weiterführende Studien konnten ebenfalls eine elementare Beteiligung der Hirntyp-Natriumkanäle an der Entstehung der ordnungsgemäßen Herzfrequenz im Sinusknoten zeigen. Während es nicht gelang, den herztypischen Natriumkanal $Na_v1.5$ im Zentrum des Sinusknotens nachzuweisen, gelang dies für $Na_v1.1$ und $Na_v1.3$ (Maier et al. 2003).

In einer nachfolgenden Arbeit konnte dann aber auch gezeigt werden, dass sowohl Hirntyp-Natriumkanäle (hauptsächlich $Na_v1.1$) als auch Herztyp-Natriumkanäle ($Na_v1.5$) für die Schrittmacherfunktion des Sinusknotens wichtig sind. Dabei scheint $Na_v1.5$ die Funktion der Erregungsweiterleitung aus dem Sinusknoten auf die Zellen des Vorhofmyokards zuzukommen, was auch seine vermehrte Expression in der Umgebung des Sinusknotens nahe legt (Lei et al. 2004).

Über die differentielle Expression dieser Natriumkanäle im sich entwickelnden Myokard ist bisher wenig bekannt, in anderen Organsystemen konnte die wichtige Rolle der Kanäle bei der Entwicklung jedoch belegt werden.

So konnte in einer Arbeit an spinalen Motoneuronen junger Mäuse gezeigt werden, dass der Hirntyp-Natriumkanal $Na_v1.6$ (Gen: SCN8A) an der postnatalen Steigerung des Natriumstroms essentiell beteiligt ist. Motoneurone aus SCN8A-defizienten Mäusen zeigten keinen Anstieg des Natriumstroms im Vergleich zum Tag der Geburt, zudem traten bei diesen Tieren progressive Muskelstörungen auf, die 3-4 Wochen nach der Geburt zum Tod der Tiere führten. Mäuse ohne diese Mutation zeigten jedoch einen deutlichen Anstieg des Natriumstroms, so dass gezeigt werden kann, dass die postnatale Expressionssteigerung des Gens SCN8A und damit der vermehrte Einbau des Kanalproteins $Na_v1.6$ in die Zellmembran zu der Steigerung des Natriumstroms führt (García et al. 1998).

1.2.2. Aufbau und Funktion

Zentraler Bestandteil eines spannungsabhängigen Natriumkanals ist die porenbildende α -Untereinheit, die mit 1 bis 2 β -Untereinheiten assoziiert den voll funktionsfähigen Ionenkanal bildet (Hartshorne und Catterall 1981).

Die α -Untereinheit besteht wiederum aus vier gleich aufgebauten Transmembran-Domänen (D1-D4), die auf der Membrannenseite verbunden sind. Die 4 Domänen setzen sich jeweils aus 6 Transmembransegmenten zusammen, die sich als hydrophobe Anteile gut in das hydrophobe Milieu der Zellmembran einlagern können. Dem Segment S4 kommt eine besondere Rolle zu. Da in diesem Bereich viele positiv geladene Aminosäuren vorkommen, ist dieser Abschnitt bei physiologischem pH-Wert positiv geladen und dient dem Kanal als Spannungssensor (Noda et al. 1984; Stühmer et al. 1989). Die Segmente S5 und S6 jeder Domäne bilden zusammen die eigentliche Pore des Proteins. Bei den spannungsabhängigen Natriumkanälen handelt es sich um hoch-selektive Kanäle, da im äußeren Bereich der Pore ein so genannter Selektivitätsfilter vorhanden ist (Noda et al. 1984). Das Verbindungsstück zwischen Domäne 3 und 4 enthält die Aminosäuren Isoleucin, Phenylalanin und Methionin (IFM-Partikel). Für diesen Abschnitt konnte gezeigt werden, dass er von entscheidender Bedeutung für die schnelle Inaktivierung des Natriumkanals ist (West et al. 1992). Die Struktur eines spannungsabhängigen Natriumkanals zeigt Abbildung 2.

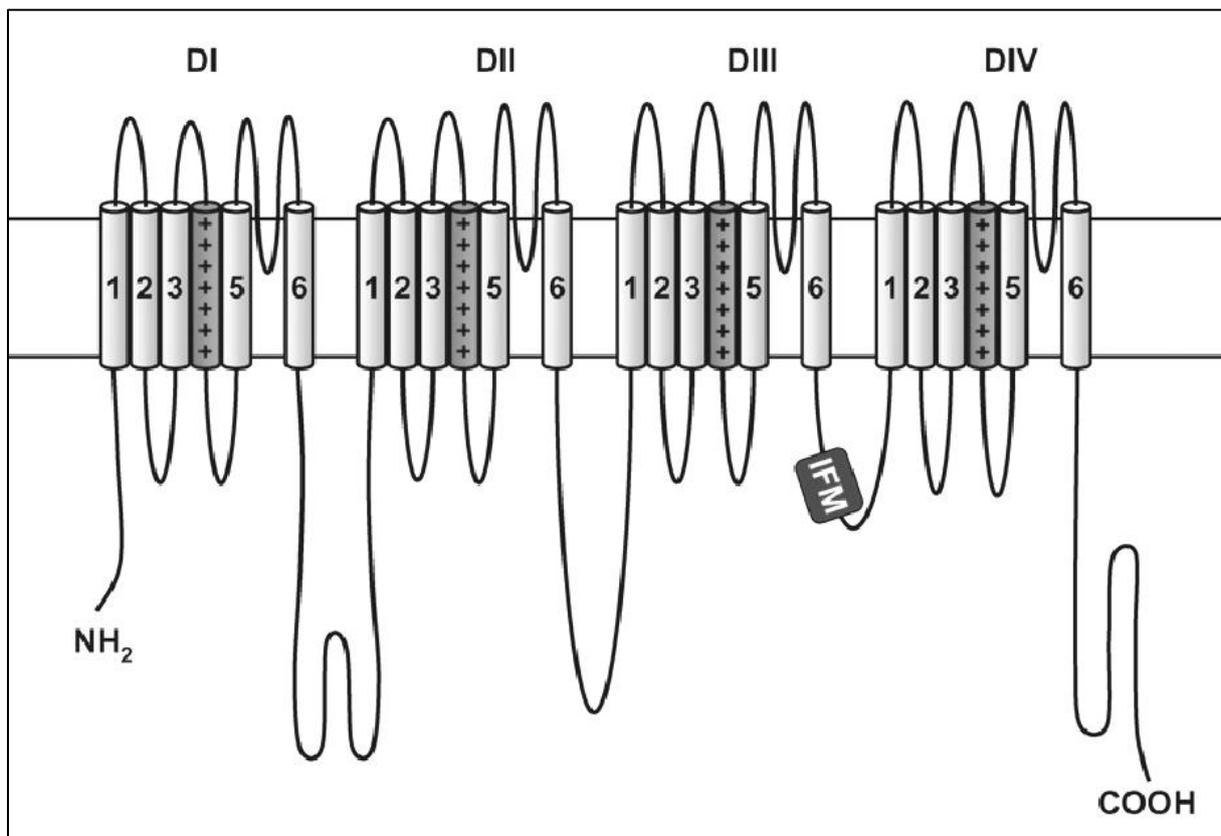


Abbildung 2 - Struktur eines spannungsabhängigen Natriumkanals (α -Untereinheit)

Zu beachten ist insbesondere das als Spannungssensor dienende Segment S4 (mit +++ -markiert), sowie das IFM-Partikel zwischen Domäne 3 und 4. Abbildung modifiziert nach Abriel (2007), S. 382.

Kommt es zu einer Membrandepolarisation, so verschiebt sich das S4 Segment, was über eine daraus resultierende Konformationsänderung des Proteins zu einer Öffnung der Kanalpore führt (Catterall 1986). Charakteristisch für die spannungsabhängigen Natriumkanäle ist die schnelle Inaktivierung und damit das schnelle Sistieren des Natriumeinstroms. Die Inaktivierung erfolgt durch die ebenfalls spannungsabhängige Bewegung des IFM-Partikels des Verbindungsstücks zwischen Domäne 3 und 4 in die Pore hinein (Vassilev et al. 1988).

Veranschaulicht ist dieses auch als *ball-and-chain* bezeichnete Modell in Abbildung 3 (Armstrong und Bezanilla 1977).

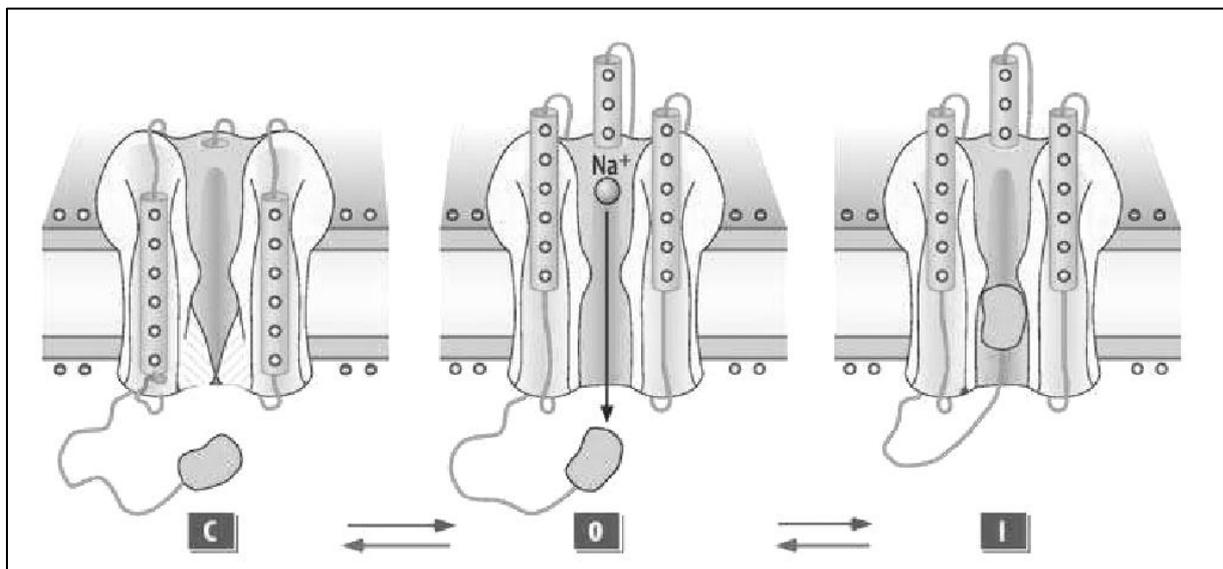


Abbildung 3 – Ionenkanalzustände

Die Abbildungen zeigen den Kanal in seinen drei Hauptzuständen: aktivierbar, geschlossen (C), im offenen Zustand (O) und im inaktivierten Zustand (I). Dabei ist die Blockierung der Pore zu sehen.

Aus Schmidt et al. (2010), S. 57

Die schnelle Inaktivierung ist wichtig, um Erregungen in eine distinkte Richtung weiterzuleiten. Da jeder Kanal nur für kurze Zeit öffnet und anschließend für eine relativ längere Zeit inaktiviert bleibt, breitet sich die Erregung nur in eine Richtung aus und kann nicht in die andere Richtung zurücklaufen.

Repolarisiert die Zelle, kommt es zur Beendigung der Inaktivierung und schließlich befindet sich der Kanal über eine Konformationsänderung wieder im aktivierbaren, geschlossenen Zustand.

1.2.3. Unterschiede zwischen Hirn- und Herztyp-Natriumkanälen

Obwohl sich die einzelnen Isoformen der spannungsabhängigen Natriumkanäle strukturell nicht wesentlich voneinander unterscheiden, wie dieses beispielsweise bei den Kalium- oder Kalzium-Kanälen der Fall ist, so weisen sie doch funktionell z.T. bedeutende Unterschiede zueinander auf (Goldin 2001).

So konnte gezeigt werden, dass der herztypische $Na_v1.5$ Kanal bereits bei einem um 20 mV geringeren Membranpotential aktiviert als der Hirntyp-Kanal $Na_v1.2$ (Mantegazza et al. 2001). Für die Hirntyp-Kanäle $Na_v1.1$ und $Na_v1.2$ wiederum konnte eine ähnliche Aktivierungskinetik nachgewiesen werden (Smith und Goldin 1998), sodass die Untersuchungsergebnisse von Mantegazza et al. (2001) auch bei diesem Kanal angewendet werden dürfen.

Ein weiterer elektrophysiologischer Unterschied zwischen dem herzspezifischen Natrium-Kanal $Na_v1.5$ und den Hirntyp-Kanälen ist seine bereits bei negativeren Spannungen einsetzende Inaktivierung (Goldin 1999).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sich die Hirntyp-Kanäle bei den im Vergleich zu Zellen des Arbeitsmyokards etwas höher liegenden Membranpotentialen in den Zellen des Sinusknotens zu einer größeren Anzahl in einem aktivierbarem Zustand befinden. $Na_v1.5$ -Kanäle sind hingegen bei diesen Membranpotentialen bereits weitestgehend inaktiviert.

1.3. Ionenkanalerkrankungen und assoziierte Erkrankungen

Wie in den vorangehenden Abschnitten gezeigt, sind Ionenkanäle für viele Funktionen von entscheidender Bedeutung. Ist die Funktion jedoch z.B. durch Mutationen der verantwortlichen Gene gestört oder aufgehoben, treten distinkte, spezifische Erkrankungen auf. Einige dieser Mutationen führen zu Erkrankungen, welche sich im Kindesalter in Form maligner, lebensbedrohlicher Herzrhythmusstörungen oder aber als Epilepsiesyndrome manifestieren.

1.3.1. Long-QT-Syndrom (LQTS3)

Ein Long-QT-Syndrom zeichnet sich durch ein verlängertes QT-Intervall im Elektrokardiogramm (EKG) aus. Als Folge dieser EKG-Veränderung können maligne, lebensbedrohliche ventrikuläre Tachyarrhythmien auftreten. Die symptomatischen

Patienten präsentieren sich mit rezidivierenden Synkopen bis hin zum plötzlichen Herztod (Haverkamp et al. 1997).

Dem angeborenen Long-QT-Syndrom konnten inzwischen mehrere Mutationen in verschiedenen Bereichen des Genoms zugerechnet werden, nach denen das Syndrom in verschiedene Typen eingeteilt wird. Alle diese Mutationen betreffen Regionen, die für Ionenkanäle oder assoziierte Proteine kodieren und an der Repolarisation der Zellmembran beteiligt sind (Morita et al. 2008).

Während die meisten Patienten mit einem Long-QT-Syndrom Mutationen in Kaliumkanalgenen aufweisen (LQTS1, LQTS2 und LQTS7), ist bei dem Typ LQTS3 der Natriumkanal $\text{Na}_v1.5$ (Gen: SCN5A) betroffen (Ackerman und Mohler 2010). Diese Mutationen machen bis zu 13% der gesamten LQT-Syndrom-Fälle aus (Kapplinger et al. 2009). Die vom LQTS3 betroffenen Patienten weisen ein hohes Risiko für das Auftreten lebensbedrohlicher ventrikulärer Tachykardien und ein schlechteres Ansprechen auf die Therapie mit β -Blockern auf (Morita et al. 2008).

Die meisten Mutationen, die den Kanal $\text{Na}_v1.5$ betreffen, sind Missense-Mutationen und führen hauptsächlich zu einem nicht-inaktivierenden Natriumeinstrom (sog. *gain-of-function*-Mutation), der die Verlängerung des Aktionspotentials und damit des QT-Intervalls erklärt (Bennett PB et al. 1995). Folgerichtig liegen die meisten Mutationen in Bereichen, die für die schnelle Inaktivierung von Bedeutung sind. Beispielhaft seien hier die zytosolische Verbindung zwischen den Domänen 3 und 4 (IFM-Partikel) sowie das Segment 4 (Spannungssensor) genannt (Amin et al. 2010).

1.3.2. Brugada-Syndrom

Im Gegensatz zum Long-QT-Syndrom 3 kommt es beim Brugada-Syndrom nicht zu einer erhöhten Offenwahrscheinlichkeit von (und damit nicht zu einem größeren Natriumstrom über den Kanal) $\text{Na}_v1.5$. Durch mehr als 80 unterschiedliche SCN5A-Mutationen kommt es beim Brugada-Syndrom zu einer verminderten Offenwahrscheinlichkeit der $\text{Na}_v1.5$ -Kanalpore. Wie die *gain-of-function*-Mutation beim LQTS3 resultieren die *loss-of-function*-Mutationen bei Patienten mit Brugada-Syndrom in einem erhöhten Risiko für das Auftreten maligner ventrikulärer Tachyarrhythmien und damit dem erhöhten Risiko für das Erleiden eines plötzlichen Herztodes (Antzelevitch et al. 2005). Nur bei etwa 30% der Patienten, die

klinisch die Kriterien eines Brugada-Syndroms erfüllen, lassen sich Mutationen im Gen SCN5A nachweisen (Amin et al. 2010).

Welche Rolle die Natriumkanäle bei dieser Erkrankung haben, zeigt sich auch bei dem zur Diagnostik des Brugada-Syndroms eingesetzten „Ajmalin“-Test. Dabei wird das Klasse-1A-Antiarrhythmikum Ajmalin, welches zur Natriumkanalblockade führt, benutzt, um die typischen EKG-Veränderungen (wie die typische ST-Streckenhebungen rechts präkordial) zu demaskieren (Brugada und Brugada 1997).

1.3.3. Sick-Sinus-Syndrom

Unter dem Begriff Sick-Sinus-Syndrom (SSS) werden mehrere Arrhythmiesyndrome, die mit der Fehlfunktion des Sinusknotens vergesellschaftet sind, zusammengefasst. Diese beinhalten u.a. die Sinusbradykardie, den Sinusarrest und das Tachykardie-Bradykardie-Syndrom, also wechselnd zu hohe und zu niedrige Herzfrequenzen (Adán und Crown 2003).

Während das SSS häufig bei älteren Menschen mit kardialen Risikofaktoren wie arterieller Hypertonie vorkommt, gibt es auch eine angeborene Form. Diese ist stark mit Mutationen im Gen SCN5A assoziiert und zeichnet sich durch einen ausgeprägten Phänotyp bereits in jungen Jahren aus (Benson et al. 2003).

In den meisten Fällen kommt es durch die Mutationen zu einem Funktionsverlust des $Na_v1.5$ -Kanals, was auch erklärt, wieso andere Ionenkanalerkrankungen, die mit einem Funktionsverlust von $Na_v1.5$ einhergehen (wie das Brugada-Syndrom), kombiniert mit dem SSS auftreten können (Amin et al. 2010).

Es konnte gezeigt werden, dass der Kanal $Na_v1.5$ einerseits eine Rolle bei der Weiterleitung von spontanen Depolarisationen im Sinusknoten spielt, zum anderen aber auch an der Weiterleitung der Erregung an die, an den Sinusknoten grenzenden, Herzmuskelzellen beteiligt ist (Lei et al. 2005).

1.3.4. Sudden infant death syndrome (SIDS) – Plötzlicher Säuglingsstod

Von einem *Sudden infant death syndrome* (SIDS), auch plötzlicher Säuglingstod genannt, spricht man, wenn ein Säugling (Kleinkind < 1 Jahr) plötzlich und unerwartet verstirbt und trotz intensiver Suche keine Ursache für das plötzliche Versterben festgestellt werden kann. Zur Diagnosestellung ist die Erhebung der ausführlichen Anamnese, inkl. Schwangerschafts- und Familienanamnese, die Begutachtung des Auffindeorts und die komplette Autopsie

erforderlich (Bajanowski und Poets 2004), in Deutschland werden aber nur ca. 50% der plötzlich und aus ungeklärter Ursache verstorbenen Säuglinge obduziert, sodass nicht in allen Fällen alle Kriterien für die Diagnostikstellung SIDS erfüllt werden (Krous et al. 2004).

In den letzten Jahrzehnten wurden einige exogene Faktoren gefunden, die SIDS begünstigen und deren Vermeidung in Folge intensiver Aufklärung der Eltern zu einer Reduktion von SIDS-Fällen geführt hat, insbesondere sei hier das Schlafen in Bauchlage erwähnt (Bajanowski und Poets 2004).

Dennoch konnte auch gezeigt werden, dass in bis zu 9,5% der als SIDS erkannten Fälle Mutationen, die typischerweise bei einem Long-QT-Syndrom gefunden werden, nachgewiesen werden können (Arnestad et al. 2007). Von diesen wiederum gehen überproportional viele auf Mutationen im SCN5A-Gen zurück, deren elektrophysiologische Relevanz gezeigt werden konnte (Wang DW et al. 2007).

1.3.5. Dravet-Syndrom

Als ein Beispiel für Ionenkanalerkrankungen, welche die Hirntyp-Natriumkanäle betreffen, sei hier auf das Dravet-Syndrom hingewiesen. In 70-80% der Fälle dieser schweren Epilepsieerkrankung findet sich eine Mutation des Gens SCN1A, das für den Kanal Na_v1.1 kodiert (Marini et al. 2011).

Fast alle Mutationen führen zu einem Funktionsverlust der Na_v1.1 Kanäle. Es wird angenommen, dass durch den Funktionsverlust insbesondere inhibitorische Neurone des GABAergen Systems in ihrer Aktivität gehindert werden und über diesen Mechanismus Epilepsien entstehen (Escayg und Goldin 2010).

Neueste Untersuchungen konnten zudem zeigen, dass Patienten, die unter einem Dravet-Syndrom leiden, eine eingeschränkte Herzfrequenzvariabilität aufweisen. Dies legt den Verdacht nahe, dass die Mutationen im SCN1A-Gen auch die normale kardiale Erregungsbildung und Erregungsleitung beeinträchtigen und unterstreicht die Rolle des Hirntyp-Kanals Na_v1.1 für die regelgerechte Herzaktion (Delogu et al. 2011).

1.4. Fragestellung

Viele Ionenkanal- und assoziierte Erkrankungen manifestieren sich bereits im Kindes- und Jugendalter.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass sowohl Herztyp- als auch Hirntyp-Natriumkanäle für eine regelgerechte Herzfunktion essentiell sind, stellt sich die Frage, ob bestimmte Formen von Herzrhythmusstörungen und Ionenkanalerkrankungen mit dem zu einem bestimmten Entwicklungszeitpunkt bestehenden Verteilungsmuster dieser Ionenkanaltypen assoziiert sind. Zunächst gilt es jedoch, die differentielle Expression dieser Ionenkanäle während der physiologischen, gesunden Entwicklung zu analysieren.

So wäre es denkbar, dass bestimmte Erkrankungen sich gehäuft dann manifestieren, wenn die Bedeutung und Expression des jeweiligen Kanals am höchsten ist, d.h. evtl. sein Anteil an der Zusammensetzung verschiedener Natriumkanäle am höchsten ist.

Bisher ist nur wenig über das Expressionsmuster der Hirntyp-Natriumkanäle während der Ontogenese bekannt. Die bis dato vorliegenden Studien beschränkten sich meist auf die Analyse der Transkription der entsprechenden Gene ohne einen Nachweis auf Proteinebene zu führen.

Ziel dieser Arbeit war es daher, das genaue Verteilungsmuster der 2 Hirntyp-Natriumkanäle $Na_v1.1$ und $Na_v1.6$ mit dem entsprechenden Muster des Herztyp-Kanals $Na_v1.5$ im sich entwickelnden Myokard zu vergleichen. Dabei sollte nicht nur die Transkription des Gens, sondern auch die Expression des entsprechenden Proteins überprüft werden.

2. Material und Methoden

2.1. Materialgewinnung

Zur Materialgewinnung wurden Wistar-Ratten unterschiedlicher Altersstufen getötet und deren Herzen und teilweise Gehirne entnommen. Es erfolgte eine ordnungsgemäße Meldung an den Tierschutzbeauftragten der Universität Göttingen nach § 4 Abs. 3 (Töten zu wissenschaftlichen Zwecken) des Tierschutzgesetzes (TierSchG).

Im Anschluss an die Entnahme wurden die Herzen der 21 Tage und 6 Wochen alten Tiere in Vorhof- und Kammerteil zerlegt. Aufgrund der geringen Größe und der daher nicht sicher durchführbaren Auftrennung in Vorhof- und Ventrikelanteil wurde dieser Schritt bei den jüngeren Tieren nicht durchgeführt.

Nach Abschluss der Zerteilung bzw. der Entnahme und dem Tiefgefrieren in flüssigem Stickstoff wurden die Herzen und Gehirne für die molekularbiologischen Untersuchungen bei -70 °C aufbewahrt. Die Präparate für die Färbungen wurden bei Raumtemperatur in Formalin eingelegt und unter kontinuierlicher Bewegung auf einem Schüttler mehrere Tage fixiert.

2.1.1. Embryonalstadium

Für die Ratten aus dem Embryonalstadium (E17) wurden weibliche Muttertiere gezielt verpaart und per Abstrichuntersuchung der 1. Tag der Schwangerschaft festgestellt.

Nach 17 Tagen wurden die Muttertiere mittels CO₂ narkotisiert und durch Genickbruch getötet, unmittelbar danach wurden den Tieren beide Uterushörner entnommen und mit der Präparation der Embryonen begonnen.

Unter einem Auflichtmikroskop erfolgte dann die Entnahme des Herzens und des Gehirns aus den Embryonen (siehe Abbildung 4). Diese Organe wurden für die molekularbiologischen Untersuchungen direkt in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und anschließend bis zur weiteren Analyse bei einer Temperatur von -70 °C aufbewahrt. Die für die Färbungen vorgesehenen Herzen wurden bei Raumtemperatur in Formalin eingelegt.

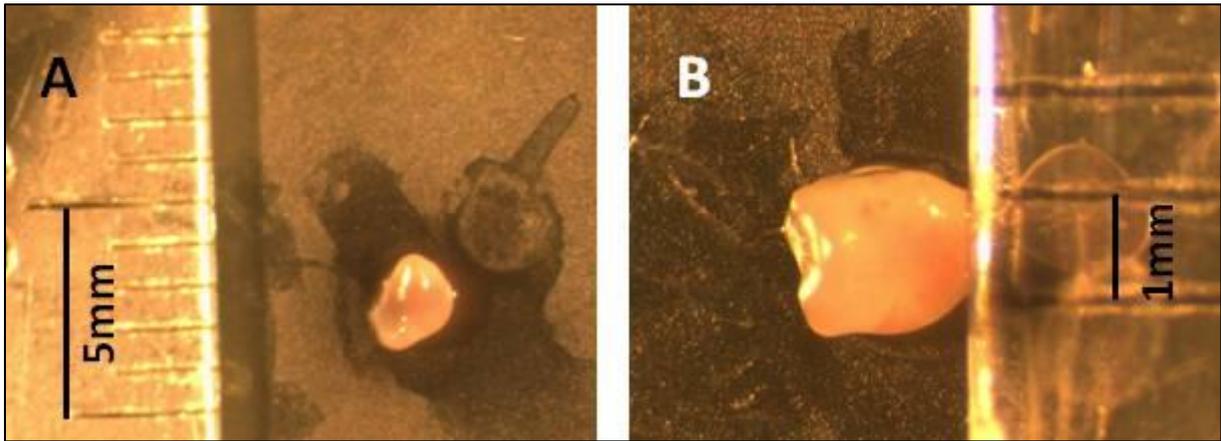


Abbildung 4 - Entnahme Herz E17 Embryo
Entnommenes Herz unter dem Auflichtmikroskop. (A) 5mm Maßstab, (B) 1mm Maßstab

2.1.2. 1 und 7 Tage alte Ratten

Die 1 und 7 Tage alten Ratten wurden mittels Dekapitation getötet, im Anschluss wurden Herz und Gehirn entnommen. Bei den 7 Tage alten Tieren wurde nun die Aorta mittels Spritze kräftig mit PBS (für die molekularbiologischen Proben) bzw. Formalin (für die Färbungen) gespült. Hierdurch wurden Blutreste aus den Herzen entfernt.

Anschließend erfolgte analog zu den Tieren aus dem Embryonalstadium das Tiefgefrieren bzw. die Formalinfixierung.

2.1.3. 21 Tage und 6 Wochen alte Ratten

Ratten im Alter von 21 Tagen bzw. 6 Wochen wurden mittels CO₂ narkotisiert und durch Genickbruch getötet. Die Entnahme der Herzen (inkl. Spülung) und der Gehirne sowie die weitere Aufbereitung erfolgte analog zu den 1 und 7 Tage alten Tieren.

2.2. Real-Time-PCR

2.2.1. Erstellung der RNA-Proben

Die im ersten Schritt tiefgefrorenen Herzen wurden erneut in flüssigem Stickstoff gekühlt, anschließend in einen Mörser gegeben und unter Zugabe von flüssigem Stickstoff zerkleinert.

Das entstehende feine Pulver wurde vorsichtig in ein vorbereitetes Gefäß mit 1000 µl RNA – Aufreinigungsreagenz gegeben. Nach gutem Durchmischen der Proben und einem Zentrifugationsschritt (12.000 upm für 10 Minuten bei 4 °C) zum Abtrennen von

Zelltrümmern wurden dem Überstand 200 µl Chloroform zugegeben und erneut gemischt. Die entstehende milchige Mischung wurde nun 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte eine erneute Zentrifugation (12.000 upm für 15 Minuten bei 4 °C). In dem Gefäß trennte sich nun eine obere klare Phase (wässrige Phase mit RNA) gegen eine rötliche untere Phase (organische Phase mit Proteinen) ab. Als Trennschicht war weißlich die DNA zu erkennen.

Für die weitere Aufbereitung wurde nun die obere wässrige Phase inkl. der RNA mit 1 Volumenanteil Isopropanol (99,8%) gemischt. Es folgten mehrere Reinigungsschritte (mit Hilfe des RNeasy Kits), bei denen die RNA jeweils innerhalb der Säule der Reaktionsgefäße gehalten wurde. Außerdem wurde mit Hilfe des DNase-Reagenz des Kits die in der Probe möglicherweise noch vorhandene DNA entfernt.

Zum Abschluss dieser Schritte wurde die RNA aus der Säule mit Hilfe von RNase freiem Wasser gelöst.

2.2.2. Messung der RNA-Konzentration

Zur Messung der RNA-Konzentration wurden die Proben im Verhältnis 1:20 mit 10 mM TRIS-Puffer vorverdünnt. Die Messung erfolgte als Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm in einem Fotometer.

2.2.3. Umschreibung der RNA in cDNA

Die Umschreibung erfolgte mit 1 µg RNA in 10 µl RNase-freiem Wasser. Diese Verdünnung wurde mit 1 µl Random-Primern, sowie 1 µl Nukleotiden (dNTP, je 10 mM) versetzt und für 5 Minuten bei 65 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 4 µl Reaktionspuffer (5x aus dem Kit der Fa. Invitrogen), 2 µl DTT (0,1M) sowie von 1 µl RNase-Inhibitor. Nach erneuter Inkubation für 2 Minuten bei 42 °C wurde 1 µl der Reversen Transkriptase hinzugegeben und nun bei 42 °C für 50 Minuten die Umschreibung durchgeführt. Die entstandene cDNA wurde nun bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.4. Real-Time-PCR

Die Real-Time-PCR erfolgte zur Detektion spezifischer Expressionsunterschiede verschiedener Gene mit Hilfe eines auf SYBR-Green basierenden Reaktionspuffers. Dazu wurde neben 12,5 µl dieses Puffers je 0,5 µl Sense- bzw. Anti-Sense-Primer sowie 6,5 µl

Ampuwa pro Probe zu einem Master-Mix zusammengefügt. In jeder Reaktionskammer folgte nun die Zugabe von 5 µl Probe (1:20 mit Ampuwa verdünnte cDNA) zu 20 µl des beschriebenen Master-Mix.

Um die erforderliche Verdünnung der cDNA zu bestimmen, wurden zunächst Standardkurven für verschiedene Verdünnungen etabliert. Der Verdünnungsbereich, in dem sich ein C_t-Wert zwischen 20-30 einstellte, wurde als optimal betrachtet und für die weiteren Messungen verwendet. Die Messung erfolgte in 96-Well-Platten in einem ThermoCycler für die RT-PCR .

2.2.5. Eingesetzte Primer

Tabelle 2 - SCN1A Primer

| | |
|-------------------|-------------------------------------|
| Sense | 5' CCC ACC ACT CAG AAT CTC ATA C 3' |
| Anti-Sense | 5' GGC TAT ACA TTG AAC GTC ATC C 3' |

Tabelle 3 - SCN5A Primer

| | |
|-------------------|---------------------------------|
| Sense | 5' AGC CAC CAG TGA TAA CCT C 3' |
| Anti-Sense | 5' CTG CAT AAG GTT CGT CAG G 3' |

Tabelle 4 - SCN8A Primer

| | |
|-------------------|-----------------------------------|
| Sense | 5' AAC TTC CGA ATC TCA CGG ATG 3' |
| Anti-Sense | 5' GTG TGG AAC ATG CAG TAA CCG 3' |

Tabelle 5 - Adiponectin-Rezeptor Primer

| | |
|-------------------|-------------------------------------|
| Sense | 5' ATC CTG GTC ACA ATG GGA TAC C 3' |
| Anti-Sense | 5' CCT ACG CTG AAT GCT GAG TGA T 3' |

2.2.6. PCR-Bedingungen

Ein Zyklus umfasste 30 s bei 94 °C, 30 s bei 58 °C und anschließend 30 s bei 72 °C. Insgesamt wurden 40 Zyklen durchgeführt.

2.3. Proteinmessungen

2.3.1. Erstellung der Proteinproben

Analog zur Erstellung der RNA-Proben wurden die gefrorenen Gewebe in flüssigem Stickstoff gekühlt, anschließend in einen Mörser gegeben und unter Zugabe von flüssigem Stickstoff zerkleinert. Nach dem Zermahlen der Herzen wurde das entstandene Pulver sorgfältig in ein Probengefäß überführt und mit Lysispuffer durchmischt. Um die Effizienz der Zerkleinerung noch zu erhöhen, kam nun ein Ultraschallhomogenisator zum Einsatz. Im Anschluss daran wurden die Proben bei 3.000 upm zentrifugiert, um Zelltrümmer abzutrennen. Der Überstand wurde abgenommen, in ein neues Probengefäß überführt und bei -20 °C aufbewahrt.

2.3.2. Membranaufreinigung

Für einige Proben wurde zur Proteinmessung eine Membranaufreinigung durchgeführt. Hierzu wurde zum einen ein Protokoll des Antikörperherstellers Alomone Labs und zum anderen ein Kit der Firma BioVision verwendet.

2.3.2.1. Membranaufreinigung nach Alomone Labs

Nach der Entnahme der Gewebe wurden diese analog zur gewöhnlichen Aufreinigung in flüssigem Stickstoff gefroren und anschließend in einem Mörser zerkleinert. Anschließend wurde das Pulver in einem Glashomogenisator mit dem Lysispuffer n. Alomone durchmischt. Es folgten 2 Zentrifugationsschritte bei 2.000 g für 10 Minuten zum Abtrennen der Zelltrümmer. Die Überstände wurden dann bei 100.000 g in einer Ultrazentrifuge für eine Stunde zentrifugiert. Das entstehende Pellet wurde mit dem beschriebenen Lysispuffer resuspendiert und bei -70 °C aufbewahrt.

2.3.2.2. Membranaufreinigung mit Kit

Im Gegensatz zu den anderen Aufreinigungen wurden die Proben nach der Entnahme nicht tiefgefroren sondern direkt weiterverwendet. Nach der Entnahme wurden die Proben mit dem im Kit enthaltenen Lysispuffer und Proteaseinhibitoren versetzt. Nun wurden die Proben im Glashomogenisator solange aufgeschlossen, bis unter dem Mikroskop eine ausreichende Zahl an aufgeschlossenen Zellen erkennbar war. Nach mehreren Behandlungen mit trennenden Lösungen wurde das die Plasmamembran enthaltende Pellet im gewohnten Lysispuffer gelöst und bei -70 °C zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

2.3.3. Messung der Proteinkonzentration

Die Messung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe eines BCA Protein Assay Kits. Dazu wurden die Proteinproben 1 : 10 vorverdünnt und anschließend zusammen mit dem BCA-Reagenz bei 37 °C für 30 Minuten im Thermomixer inkubiert (125 µl BCA-Reagenz, 6,25 µl Probe). Darauf wurde die Extinktion bei 562 nm in einem Fotometer bestimmt. Durch im Gerät hinterlegte Standards konnte daraus der Proteingehalt bestimmt werden.

2.3.4. SDS-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der Proben in einem Gelsystem kam das System nach Laemmli (1970) zum Einsatz. Hierfür wurde ein Gel bestehend aus einem Trenngel und einem Sammelgel in einer Gelgießkammer gegossen.

Für die Natriumkanäle mit einem relativ hohen Molekulargewicht (~ 250 kDa) wurden 6% Trenngelen mit 4% Sammelgelen verwendet. Die Auftrennung für die Kontrollproben mit GAPDH erfolgte mit 14% Trenngelen und 4% Sammelgelen. Es wurde 50 µg (Na_v1.5), 120 µg (Na_v1.1 und Na_v1.6) bzw. 30 µg (GAPDH) Gesamtprotein eingesetzt und im Verhältnis 3:1 mit dem Auftragspuffer vermischt. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 37 °C für 30 Minuten in einem Thermoblock.

Die Elektrophorese erfolgte zunächst für 30 Minuten bei 90 V, bis das Sammelgel durchlaufen war. Es folgte die weitere Elektrophorese für 120 Minuten bei 110 V (Natriumkanäle) bzw. für 60 Minuten bei 120 V (GAPDH).

Anhand des Auftragsmarkers konnte eine gute Auftrennung der Banden kontrolliert werden.

2.3.5. Western-Blot

Der Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran erfolgte für den Kanal Na_v1.5 sowie GAPDH bei 350 mA für 4 Stunden. Die geringere Expression der Hirntypkanäle Na_v1.1 und Na_v1.6 erforderte einen langsameren Transfer bei konstanter Spannung (100 V für 22 Stunden), um Artefakte zu vermeiden und einen vollständigen Transfer zu gewährleisten.

In beiden Fällen erfolgte der Transfer bei 4 °C auf Eis.

2.3.6. Antikörpereinsatz

Nach dem Transfer wurden die Membranen 20 Minuten in Ponceau-Rot inkubiert. Dabei wurden die Proteine auf der Membran fixiert und angefärbt. Im Anschluss wurden die Membranen gründlich gespült und die Beladung der Membran als Foto dokumentiert. Nach weiterem Waschen mit TBS folgte die Blockierung freier Bindungsstellen auf der Membran mit gefilterter 5% Milchpulverlösung bei GAPDH für 1 Stunde, bei den Natriumkanälen für 2 Stunden bei Raumtemperatur unter kontinuierlicher Bewegung auf einem Schüttler.

Der nächste Schritt umfasste die Inkubation mit dem Primärantikörper (1:200 Anti-Na_v1.1 / Anti-Na_v1.5 / Anti-Na_v1.6; 1:2.000 Anti-GAPDH) in 0,5% Milchpulverlösung bei 4 °C über Nacht auf einem Schüttler. Am nächsten Tag erfolgten drei 15-minütige Waschschriffe mit TTBS, gefolgt von der zweistündigen Sekundärantikörperinkubation bei Raumtemperatur (Anti-Rabbit) in der Konzentration 1:2000 (Natriumkanäle) bzw. 1:10.000 (GAPDH) erneut mit der 0,5% Milchpulverlösung inkl. Tween 20. Im Anschluss daran erfolgten wiederum drei 15-minütige Waschschriffe mit TTBS, nun gefolgt von der 5-minütigen Inkubation in der Chemilumineszenzlösung ohne Schütteln.

Die Darstellung der Banden erfolgte in einem Entwicklungsgerät der Firma Fujifilm, die Auswertung der Banden mit dem Programm ImageJ.

2.3.7. Etablierung der Messung

Da insbesondere bei größeren Proteinen (mit einem hohen Molekulargewicht) die Bindung des Antikörpers nicht immer spezifisch sein muss, erfolgte eine Etablierung der Messung mit membranaufgereinigten Proben. Dazu wurden nebeneinander Membran- und Zytosolfractionen aus den o.g. Membranaufreinigungen aufgetragen. Da es sich bei den untersuchten Natrium-Kanälen um Membranproteine handelt, sollte eine zu diesen

Proteinen gehörende Bande in der Membranfraktion stärker hervortreten als in der Zytosolfraction. Durch dieses Vorgehen und das Auftragen eines genauen Markers gelang die Identifikation der „richtigen“, d.h. zu dem Protein gehörenden Bande (siehe dazu Abbildung 5).

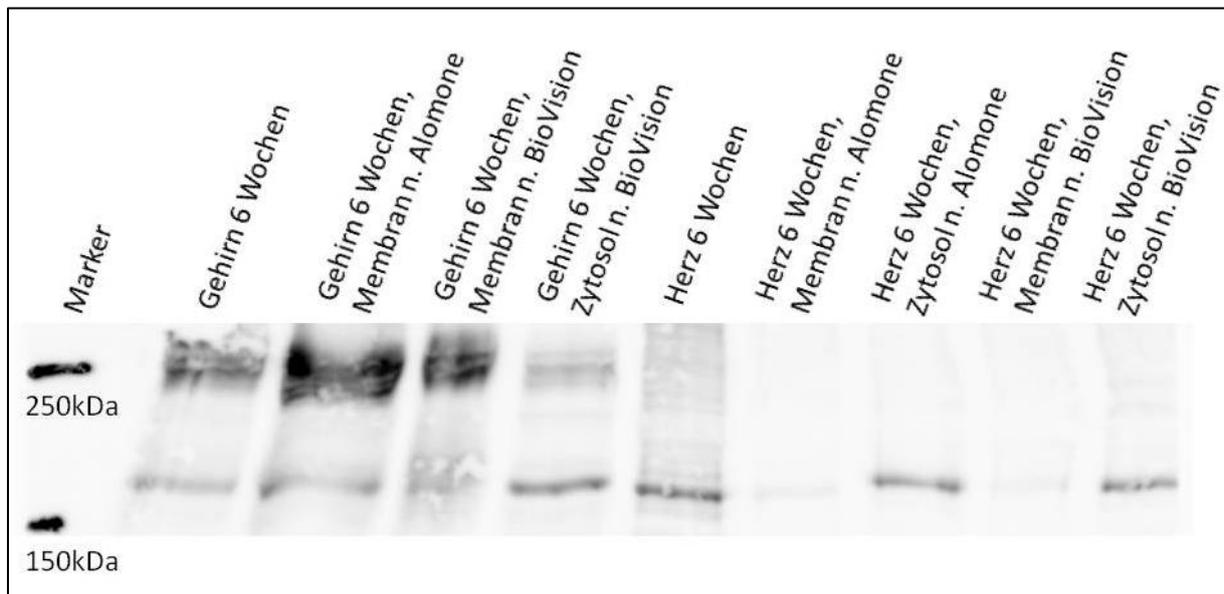


Abbildung 5 - Etablierung Western-Blot (Beispiel Na_v1.6)

Zu sehen ist der deutliche Nachweis des Natriumkanals Na_v1.6 in den Hirnproben bei der erwarteten Größe von ca. 250 kDa. Auch gelingt der Nachweis, dass der Kanal sich in der Membranaufreinigung im Gegensatz zu der Zytosolfraction anreichert (Bande 2 und 3 sind stärker als Bande 1 und deutlich stärker als Bande 4 mit der Zytosolfraction).

In den Herzproben hingegen ist der Kanal nicht nachzuweisen. Eine unspezifische Fehlbande (knapp über 150 kDa) kann durch die Membranaufreinigung (sowohl im Protokoll nach Alomone als auch durch Benutzung des BioVision-Kits) als eindeutig zytosolische Fehlbande erkannt werden.

2.4. Statistische Methoden

2.4.1. RNA-Messungen

Von den gemessenen C_t-Werten wurden die jeweiligen Kontrollwerte (C_t-Werte des Adiponectin-Rezeptors) subtrahiert. Aus diesen Werten wurde der Mittelwert sowie die Standardabweichung errechnet, die als *Standard deviation* (SD) angegeben wird. Die Messwerte wurden anschließend zu dem Messwert der Altersstufe E17 ins Verhältnis gesetzt und prozentual zu diesem Wert angegeben.

Die statistische Auswertung umfasste zunächst einen ANOVA (*analysis of variance*) gefolgt von einem Tukey-Test. Dabei wurden die einzelnen Altersstufen gegeneinander getestet. P-Werte < 0,05 wurden als signifikant angesehen.

2.4.2. Proteinmessungen

Die gemessenen Dichtewerte wurden zur Altersstufe E17 ins Verhältnis gesetzt und prozentual angegeben.

Die statistische Auswertung umfasste auch hier zunächst einen ANOVA gefolgt von einem Tukey-Test. Dabei wurden die einzelnen Altersstufen gegeneinander getestet. P-Werte < 0,05 wurden als signifikant angesehen.

2.5. Färbungen

2.5.1. Erstellung der Schnitte

Nach der Entnahme der Herzen (Embryonen wurden als ganzes Präparat verwendet) wurden diese zunächst in Formalin eingelegt und für 24 Stunden auf einem Schüttler kontinuierlich bewegt. Anschließend wurden die Präparate in der gewünschten Schnittrichtung mit einem scharfen Messer durchtrennt und erneut 24 Stunden in Formalin auf einem Schüttler inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Proben in einem Einbettautomaten nach u.g. Protokoll (siehe Tabelle 6) weiter behandelt.

Tabelle 6 - Protokoll Einbettautomat

| Anzahl | Substanz | Zeit |
|---------------|-----------------|--------------|
| 1x | Ethanol 60% | 3:00 Stunden |
| 1x | Ethanol 70% | 1:00 Stunde |
| 1x | Ethanol 80% | 1:00 Stunde |
| 1x | Ethanol 96% | 1:00 Stunde |
| 3x | Ethanol 100% | 1:00 Stunde |

| | | |
|-----------|----------|--------------|
| 2x | Xylol | 1:30 Stunden |
| 2x | Paraffin | 1:00 Stunde |
| 1x | Paraffin | 3:00 Stunden |

Am Ende dieser Prozedur wurden die Proben in Paraffineinbettformen ausgegossen. So entstand ein Paraffinblock mit dem eingelegten Herz. Dieser konnte nun nach einer Kühlphase mittels eines Mikrotoms geschnitten werden. Die entstehenden 3 µm-Schnitte wurden nun im warmen Wasserbad auf Objektträger gezogen und getrocknet. Damit standen sie für die weitere Verwendung für die verschiedenen Färbungen zur Verfügung.

2.5.2. Histologische Färbungen

Für die histologischen Färbungen wurden die getrockneten Paraffinschnitte zunächst in Xylol entparaffiniert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe (siehe Tabelle 7) rehydriert.

Tabelle 7 - Entparaffinierung / Rehydrierung

| Anzahl | Substanz | Zeit |
|---------------|--------------------------|--------------|
| 3x | Xylol | je 8 Minuten |
| 2x | 100% Ethanol | je 8 Minuten |
| 1x | 96% Ethanol | 8 Minuten |
| 1x | 70% | 8 Minuten |
| 1x | 50% | 8 Minuten |
| 1x | 30% | 8 Minuten |
| 1x | ention. H ₂ O | 5 Minuten |

Bei der Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) wurde nun eine Färbung mit Hämalaun und Eosin mit anschließender Eindeckung der Schnitte nach folgendem Protokoll (Tabelle 8) durchgeführt:

Tabelle 8 - HE-Färbung

| Anzahl | Substanz | Zeit |
|--------|---------------------------|--------------|
| 3x | Hämalaun | je 3 Minuten |
| 1x | fließendes Leitungswasser | 6 Minuten |
| 1x | ention. H ₂ O | 2 Minuten |
| 2x | Eosin | je 2 Minuten |
| 1x | ention. H ₂ O | spülen |
| 1x | 96% Ethanol | 1 Minute |
| 2x | 100% Ethanol | je 2 Minuten |
| 3x | Xylol | je 2 Minuten |

Nach dem Eindecken in Entellan waren die Schnitte nun zur mikroskopischen Auswertung bereit.

2.5.3. Auswahl der Schnitte für die Immunhistochemie

Anhand der HE-angefärbten Präparate wurden die besten Schnitte ausgewählt, in deren Folge dann die Schnitte für die Immunhistochemie erstellt wurden. Beispielhaft wird hier das Bild eines längs geschnittenen Embryos der Altersstufe E17 gezeigt (Abbildung 6).



Abbildung 6 - HE-Färbung E17-Embryo
Das Herz als Leitstruktur ist mit „*“ markiert.

2.5.4. Immunhistochemie

Für die immunhistologischen Färbungen wurden die getrockneten Paraffinschnitte zunächst analog zu den histologischen Färbungen entparaffiniert und rehydriert (siehe Tabelle 7). Anschließend wurden die Schnitte im Dampfkochtopf für 20 Minuten bei 90 °C mit einem Target-Retrieval-Puffer (high pH) behandelt. Nach fünfmaligem Waschen mit TTBS (jeweils 5 Minuten) erfolgte das Blockieren der Peroxidase in den Geweben mit DAKO Peroxidase Blocking Reagent für 17 Minuten bei Raumtemperatur. Erneut wurde nun fünf Mal mit TTBS für je 5 Minuten gewaschen, um Verunreinigungen durch endogene Ratten-IgGs zu reduzieren. Danach erfolgte die Blockierung der Ratten-IgGs mit Rodent Block R für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Nach erneutem Waschen (5x 5 Minuten) mit TTBS wurden der Primärantikörper bzw. die Substitutionskontrolle aufgetragen und die Schnitte über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Substitutionskontrolle enthielt dabei die gleiche Menge an Protein wie der Antikörper in der eingesetzten Konzentration (siehe Tabelle 9).

Tabelle 9 - Konzentrationen Immunhistochemie

| Name | Substanz | Konzentration |
|---------------------------------------|---------------------------------------|---|
| Na_v1.1 | Anti-Na _v 1.1 + AK-Diluent | 1:200 |
| Na_v1.5 | Anti-Na _v 1.5 + AK-Diluent | 1:400 |
| Na_v1.6 | Anti-Na _v 1.6 + AK-Diluent | 1:600 |
| Substitution Na_v1.1 | Neg. Control Rabbit IgG + AK-Diluent | Entsprechend der Proteinkonzentration Na _v 1.1 |
| Substitution Na_v1.5 | Neg. Control Rabbit IgG + AK-Diluent | Entsprechend der Proteinkonzentration Na _v 1.5 |
| Substitution Na_v1.6 | Neg. Control Rabbit IgG + AK-Diluent | Entsprechend der Proteinkonzentration Na _v 1.6 |

Am nächsten Tag erfolgte nach fünfmaligem Waschen in TTBS (je 2 Minuten) die Inkubation mit dem Sekundärantikörper bei Raumtemperatur (siehe Tabelle 10). Dieser wurde in der Konzentration 76:1 mit XR Factor für 30 Minuten bei Raumtemperatur vorinkubiert, um die unspezifische Hintergrundfärbung weiter zu reduzieren.

Tabelle 10 - Sekundärantikörper Immunhistochemie

| Antikörper für | Substanz | Inkubationszeit |
|--|---|-----------------|
| Na_v1.1 / Na_v1.5 / Na_v1.6 | Rabbit on Rodent HRP + XR Factor (76:1, 30min vorinkubiert) | 30 Minuten |

Auf die nun anstehenden Waschschritte (5 x 2 Minuten TTBS) folgte die Inkubation mit einem DAB Substrat-Chromogensystem. Anschließend erfolgten 5 Waschzyklen mit destilliertem Wasser (4x 1 Minute, 1x 5 Minuten), direkt darauf folgte die Gegenfärbung mit Hämalaun für 20 Sekunden. Der nächste Arbeitsschritt beinhaltete die siebenminütige

Inkubation im fließenden lauwarmen Leitungswasser. Die folgende Entwässerung erfolgte nach dem in Tabelle 11 angegebenen Schema.

Tabelle 11 - Entwässerung

| Anzahl | Substanz | Zeit |
|---------------|-----------------|--------------|
| 1x | 96% Ethanol | 1 Minute |
| 2x | 100% Ethanol | je 2 Minuten |
| 3x | Xylol | je 5 Minuten |

Anschließend erfolgte die Eindeckung mit einem Eindeckglas und Entellan. Nach diesem letzten Schritt standen die Schnitte nach einer kurzen Trocknungsphase zur Auswertung bereit.

2.6. Verwendete Materialien

2.6.1. Chemikalien

Tabelle 12 - Chemikalien

| | |
|----------------------|---|
| Acrylamidlösung | Rotiphorese Gel 40%, Fa. Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| Auftragsmarker | Precision Plus Protein [®] Kaleidoscope [®] Standards (10- 250 kDa), Fa. Bio-Rad Laboratories GmbH, München |
| DTT | Fa. Invitrogen, Paisley, UK |
| Ethanol | Fa. GeReSo mbH, Einbeck |
| Formalin | Roti [®] - Histofix 4% / 10%, Fa. Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| Glycin | Fa. Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| HCl | Fa. Merck, Darmstadt |
| HEPES | Fa. Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| Isopropanol | Fa. Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| Mercaptoethanol | Fa. Merck, Darmstadt |
| Methanol | Fa. Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| Milchpulver | Fa. Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| NaCl | Fa. Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| NaF | Fa. Sigma, Deisenhofen |
| Na-Pyrophosphat | Fa. Sigma, Deisenhofen |
| Phosphataseinhibitor | Cocktail I, Fa. Sigma, Deisenhofen |
| Ponceau-Rot | Fa. Carl Roth GmbH, Karlsruhe |

| | |
|-------------------|-------------------------------------|
| Proteaseinhibitor | Cocktail II, Fa. Sigma, Deisenhofen |
| SDS ultra pure | Fa. Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| Sucrose | Fa. Sigma, Deisenhofen |
| TEMED | Fa. Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| TRIS | Fa. Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| Triton X100 | Fa. Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| Tween 20 | Fa. Carl Roth GmbH, Karlsruhe |

2.6.2. Angesetzte Puffer und Lösungen

Tabelle 13 - Angesetzte Puffer und Lösungen

| | |
|------------------------|--|
| Auftragspuffer | 2,5ml 0,5M TRIS, 5ml Glycerol, 2ml 20% SDS-Lösung, 0,2ml 1% Bromphenolblau, frisch dazu 15µl Mercaptoethanol |
| Blotpuffer | 6g TRIS, 28,8g Glycin, 200 / 400ml Methanol, ph 8,4-8,6 ad 2000ml ddH ₂ O |
| Laufpuffer (1x) | 400ml Laufpuffer (5x), 1600ml ddH ₂ O |
| Laufpuffer (5x) | 30,2g TRIS, 144g Glycin, 10g SDS, ad 2000ml ddH ₂ O |
| Lysispuffer | 20mM TRIS, 50mM NaCl, 50mM NaF, 4mM Na-Pyrophosphat, 0,25M Sucrose, ph7,4 ad 500ml ddH ₂ O |
| Lysispuffer n. Alomone | 4mM HEPES, ph 7,0, 320mM Sucrose, Proteaseinhibitor Cocktail II |
| Milchpulverlösung 0,5% | 10ml Milchpulverlösung 5%, 90ml TBS, 50µl Tween 20 |
| Milchpulverlösung 5% | 2,5g Milchpulver, 50ml TBS, anschließend gefiltert |
| Sammelgel 4% | 600µl Acrylamidlösung, 760µl Sammelgelpuffer, 4,6ml ddH ₂ O, 30µl 20% SDS-Lösung, 30µl APS, 6µl TEMED |

| | |
|--------------------------|--|
| Sammelgelpuffer | 0,5M TRIS |
| TBS (10x) Puffer | 121,14g TRIS, 175,32g NaCl, ph 7,6 ad 2000ml ddH ₂ O |
| TBS (1x) Puffer | 200ml TBS (10x), 1800ml ddH ₂ O |
| Trenngel 14% | 7ml Acrylamidlösung, 7,4ml Trenngelpuffer, 5,5ml ddH ₂ O, 100µl 20% SDS-Lösung, 100µl APS, 10µl TEMED |
| Trenngel 6% | 3ml Acrylamidlösung, 7,4ml Trenngelpuffer, 9,5ml ddH ₂ O, 100µl 20% SDS-Lösung, 100µl APS, 10µl TEMED |
| Trenngelpuffer | 1,5M TRIS |
| RNA-Aufreinigungsreagenz | peqGOLD TriFast, PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen |
| TTBS (1x) Puffer | 200ml TBS (10x), 1800ml ddH ₂ O, 2ml Tween 20 |

2.6.3. Primer und Antikörper

Tabelle 14 - Primer und Antikörper

| | |
|---|--|
| Anti-GAPDH | Monoklonal Rabbit, #2118, Fa. CellSignaling Technology, Danvers, USA |
| Anti-Rabbit (HRP konjugiert) für den Western-Blot | Polyklonal Goat, 554021, BD Pharmingen, San Diego, USA |
| Anti-Rabbit (HRP konjugiert) für die Immunhistochemie | Polymerverstärkung Rabbit on Rodent Biocare RMR 662 |
| Anti-Na _v 1.1 | Polyklonal Rabbit, ASC-001, Fa. Alomone Labs, Jerusalem, Israel |
| Anti-Na _v 1.5 | Polyklonal Rabbit, ASC-005, Fa. Alomone Labs, Jerusalem, Israel |
| Anti-Na _v 1.6 | Polyklonal Rabbit, ASC-009, Fa. Alomone Labs, Jerusalem, Israel |
| SCN1A Primer | Biomers.net GmbH, Ulm |

| | |
|--------------------------------|-------------------------------|
| SCN5A Primer | Biomers.net GmbH, Ulm |
| SCN5A Primer | Biomers.net GmbH, Ulm |
| Adiponectin-Rezeptor Primer | Fa. Carl Roth GmbH, Karlsruhe |

2.6.4. Einwegartikel

Tabelle 15 - Einwegartikel

| | |
|-----------------------------------|---|
| 96-Well-Platten | PCR Microplatte, 96 Well, Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich |
| Filter | Faltenfilter Ø 150mm, Fa. Whatman GmbH, Dassel |
| Filterpapier für Western- Blot | Rotilabo® Blottingpapier, Fa. Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| Nitrozellulosemembran | Protran® Nitrocellulose Transfer Membrane, Fa. Whatman GmbH, Dassel |
| Röhrchen (15ml und 50 ml) | Cellstar®, Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich |

2.6.5. Geräte

Tabelle 16 - Geräte

| | |
|----------------------|---|
| Elektrophoresekammer | Mini-Protean®, Fa. Bio-Rad Laboratories GmbH, München |
| Entwicklungsgerät | LAS 4000 mini, ehemals Fujifilm, jetzt GE Healthcare, Buckinghamshire, UK |
| Fotometer | BioPhotometer®, Fa. Eppendorf AG, Hamburg |
| Gelgießkammer | Mini-Protean®, Fa. Bio-Rad Laboratories GmbH, München |
| Glashomogenisator | Schütt Labortechnik GmbH, Göttingen |
| Kamera | E995, Nikon GmbH, Düsseldorf |

| | |
|--------------------------|---|
| Magnetrührer | MR3001K, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach |
| Mikroliterzentrifuge | Biofuge fresco, ehemals Fa. Heraeus Instruments GmbH, jetzt Fa. Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA |
| Mikrotom | RM 2165, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar |
| Mischgerät (rotierend) | Rotamax 120, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach |
| Mischgerät (taumelnd) | Polymax 1040, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach |
| pH-Messgerät | inoLab pH Level 1, WTW GmbH, Weilheim |
| Spannungsquelle | PowerPac 300, Fa. Bio-Rad Laboratories GmbH, München |
| Thermoblock | UNO-Thermoblock, Biometra GmbH, Göttingen |
| Thermomixer | ThermoCell Mixing Block MB-102, Bioer Technology, Hangzhou, China |
| ThermoCycler für RT-PCR | iCycler®, Fa. Bio-Rad Laboratories GmbH, München |
| Ultraschallhomogenisator | UP50H, Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow |
| Ultrazentrifuge | Ultra Pro 80, ehemals Sorvall Inc., jetzt Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA |
| Vortex | REAX top, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach |
| Waage | Basic BA3100, Sartorius AG, Göttingen |

2.6.6. Verwendete Computerprogramme

Tabelle 17 - Verwendete Computerprogramme

| | |
|-----------------|---|
| ImageJ | Version 1.45, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, USA (Schneider et al. 2012) |
| Graph Pad Prism | Version 4.00 für Windows, GraphPad Software, La Jolla California, USA |

2.6.7. Kits für die Molekularbiologie

Tabelle 18 - Kits für die Molekularbiologie

| | |
|-------------------|--|
| Chemilumineszenz | SuperSignal [®] West Femto Maximum Sensivity Substrate, Fa. Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA |
| Membranextraktion | Plasma Membrane Protein Extraction Kit, BioVision, Mountain View, USA |
| Proteinbestimmung | BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA |
| RNA Aufreinigung | Rneasy [®] Mini Kit, Fa. Qiagen, Hilden |

3. Ergebnisse

3.1. RNA-Messungen

3.1.1. SCN1A (Na_v1.1)

Die Quantifizierung der mRNA mittels Realtime-PCR-Messung für den Hirntyp-Natriumkanal SCN1A zeigte verglichen mit dem Expressionslevel während der Embryonalzeit (E17 = 17. Tag der Schwangerschaft) eine statistisch signifikante Zunahme (auf 645±13% am 1., bzw. 602±22% am 7. postnatalen Tag, $p < 0,001$, $n = 5$) in der ersten Woche nach der Geburt. Zwischen dem 7. und 21. Lebenstag kam es dann zu einer signifikanten Abnahme der Expression (271±14% im Kammermyokard an Tag 21 vs. 602±22% an Tag 7), die aber dennoch über dem Wert der Embryonalzeit blieb. Im weiteren Verlauf der Ontogenese waren ebenfalls höhere Expressionen des Gens verglichen mit E17 nachweisbar. Die Auftrennung der Gewebe in Kammer- bzw. Vorhofmyokard gab zusätzlich am 21. Lebenstag bzw. nach 6 Wochen den Anhaltspunkt, dass im Ventrikelmyokard eine höhere Expression des SCN1A-Gens vorlag als im Vorhofmyokard. War dieser Unterschied im Alter von 21 Tagen noch nicht signifikant (271±14% Ventrikel vs. 167±32% Vorhof, $n = 4$), so wurde dieser Unterschied im Alter von 6 Wochen signifikant. Hier standen 356±40% im Ventrikel 169±43% im Vorhof gegenüber ($p < 0,01$, $n = 5$; siehe Abbildung 7).

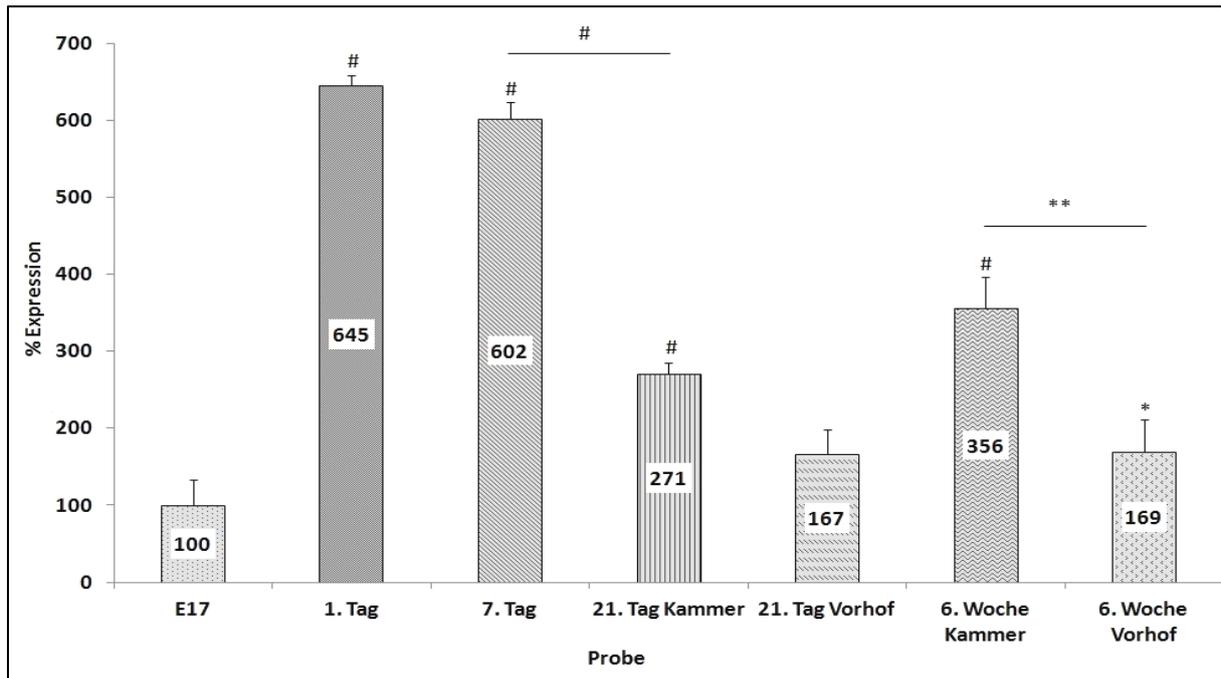


Abbildung 7 - mRNA-Messung SCN1A

Signifikanz: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; # $p < 0,001$

Die Expression des Natriumkanals SCN1A nahm postnatal signifikant zu (1. Tag: $645 \pm 13\%$, $n = 5$, $p < 0,001$), zwischen dem 7. und 21. Tag war ein signifikanter Abfall zu sehen. Auch der Unterschied zwischen der Expression in der Kammer und dem Vorhof im 6 Wochen alten Herz war signifikant ($356 \pm 40\%$ in der Kammer vs. $169 \pm 43\%$ im Vorhof, $n = 5$, $p < 0,01$).

3.1.2. SCN5A ($Na_v1.5$)

Ähnlich wie bei dem Hirntyp-Natriumkanal SCN1A ($Na_v1.1$) zeigte sich bei dem herztypischen Natriumkanal SCN5A ($Na_v1.5$) ein signifikanter postnataler Anstieg der Expression verglichen mit dem Embryonalstadium. Am 1. postnatalen Tag stieg die Expression auf $201 \pm 21\%$, am 7. Tag auf $257 \pm 30\%$ bis hin zu $353 \pm 25\%$ in der Kammer im Alter von 21 Tagen. Im Kammermyokard der 6 Wochen alten Tiere fiel die Expression leicht auf $289 \pm 16\%$ ab, blieb aber deutlich über dem Niveau des Embryonalstadiums ($p < 0,001$, $n = 5$).

Es zeigte sich auch hier eine vermehrte Expression des SCN5A-Gens im Kammermyokard verglichen mit dem Myokard des Vorhofs (21. Tag $353 \pm 25\%$ vs. $287 \pm 11\%$, 6 Wochen $289 \pm 16\%$ vs. $196 \pm 34\%$), doch dieser Unterschied war nicht signifikant (siehe Abbildung 8).

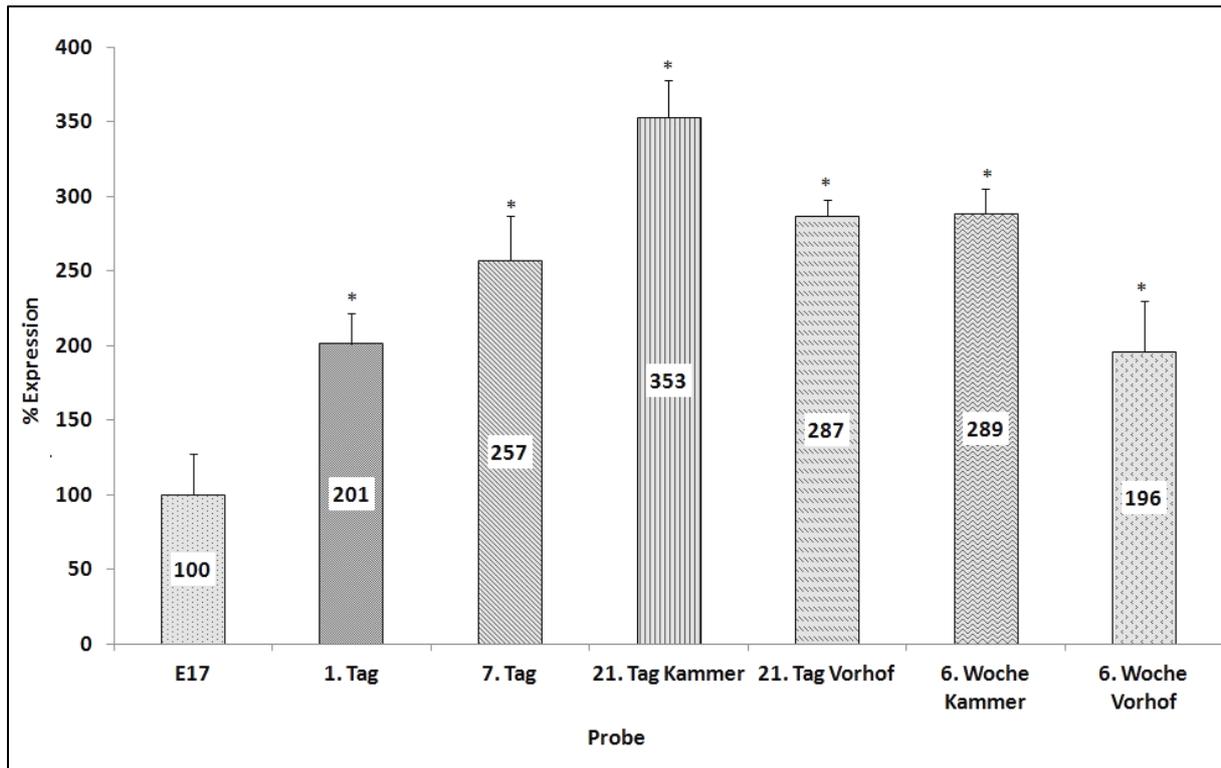


Abbildung 8 - mRNA-Messung SCN5A

Signifikanz: * $p < 0,001$

Die Expression des Natriumkanals SCN5A nahm postnatal signifikant zu. Am 1. Tag auf $201 \pm 21\%$, am 7. Tag auf $257 \pm 30\%$ bis hin zu $353 \pm 25\%$ in der Kammer im Alter von 21 Tagen. Nach 6 Wochen ist in der Kammer eine Expression von $289 \pm 16\%$ zu verzeichnen (für alle $n = 5$, $p < 0,001$). Auch gibt es einen Unterschied zwischen der Expression in der Kammer und dem Vorhof (21. Tag $353 \pm 25\%$ vs. $287 \pm 11\%$, 6 Wochen $289 \pm 16\%$ vs. $196 \pm 34\%$), dieser ist jedoch nicht signifikant ($n = 5$, außer $n = 4$ für Vorhof 21. Tag).

3.1.3. SCN8A ($Na_v1.6$)

Im Gegensatz zu den Untersuchungsergebnissen zur Expression der Kanäle $Na_v1.1$ und $Na_v1.5$ zeigte der Natriumkanal SCN8A ($Na_v1.6$, Hirntyp) eine signifikante postnatale Abnahme der Expression verglichen mit dem Embryonalstadium. Am 1. Tag zeigte sich eine Expression von $34 \pm 23\%$, am 7. Tag eine Expression von $27 \pm 15\%$ und am 21. Tag in der Kammer von $11 \pm 20\%$. Die niedrigste Expression war in den Herzen der ältesten Tiere ($8 \pm 21\%$ im Kammermyokard der 6 Wochen alten Ratten) zu finden (für alle $p < 0,001$, $n = 5$).

Im Unterschied zu den beiden vorgenannten Kanälen fand sich hier eine höhere Expression im Vorhofmyokard verglichen mit dem Myokard der Kammer ($23 \pm 11\%$ Vorhofmyokard vs. $11 \pm 20\%$ Kammermyokard bei den 21 Tage alten Ratten ($p < 0,001$, $n = 4$) bzw. $12 \pm 37\%$

Vorhofmyokard vs. $8\pm 21\%$ Kammermyokard im Alter von 6 Wochen ($p < 0,05$, $n = 4$), siehe Abbildung 9.

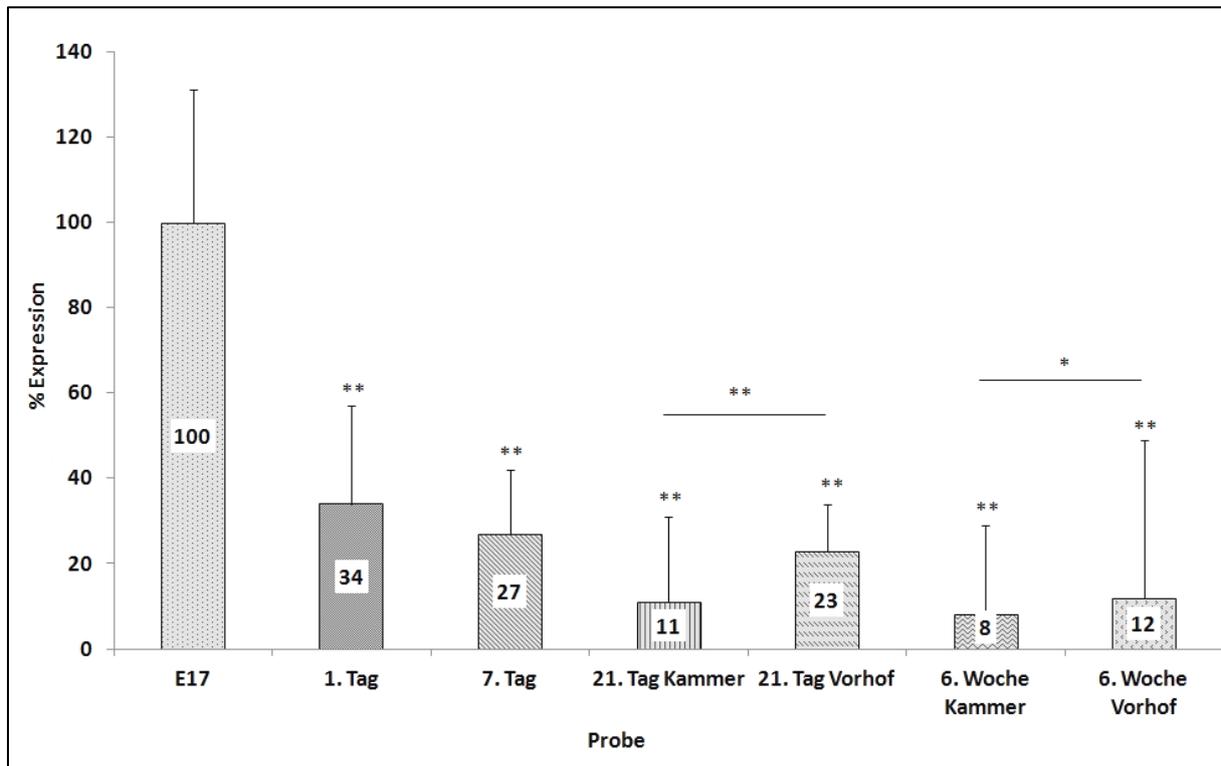


Abbildung 9 - mRNA-Messung SCN8A

Signifikanz: * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$

Die Expression des Natriumkanals SCN8A nahm postnatal signifikant ab (1. Tag: $34\pm 23\%$, $n = 5$, $p < 0,001$). Auch der Unterschied zwischen der Expression in der Kammer und im Vorhof im 21 Tage ($11\pm 20\%$ in der Kammer vs. $23\pm 11\%$ im Vorhof, $n = 4$, $p < 0,01$) bzw. 6 Wochen ($8\pm 21\%$ in der Kammer vs. $12\pm 37\%$ im Vorhof, $n = 4$, $p < 0,05$) alten Herz war signifikant.

3.2. Proteinmessungen

3.2.1. SCN1A ($Na_v1.1$)

Der Proteinnachweis mittels Western-Blot-Analyse des Natriumkanals $Na_v1.1$ zeigte einen anderen Verlauf als die Expression des zugehörigen Gens SCN1A (siehe dazu Abbildung 12).

Im Gegensatz zu der PCR-Analyse der Genexpression fiel die relative Proteinmenge beginnend mit dem Embryonalstadium (E17) ab. An Tag 1 fiel sie bis auf $91\pm 47\%$ und am 7. Tag auf $65\pm 43\%$, diese Unterschiede waren jedoch nicht signifikant. Nach 21 Tagen zeigte sich eine signifikante Abnahme auf $56\pm 38\%$ in der Kammer und $57\pm 39\%$ im Vorhof ($p < 0,05$, $n = 3$). Die 6 Wochen alten Tiere zeigten eine relative Proteinmenge von $51\pm 35\%$ ($p < 0,01$, $n = 3$) in der Kammer bzw. $43\pm 29\%$ ($p < 0,001$, $n = 3$) im Vorhof (siehe Abbildung 10).

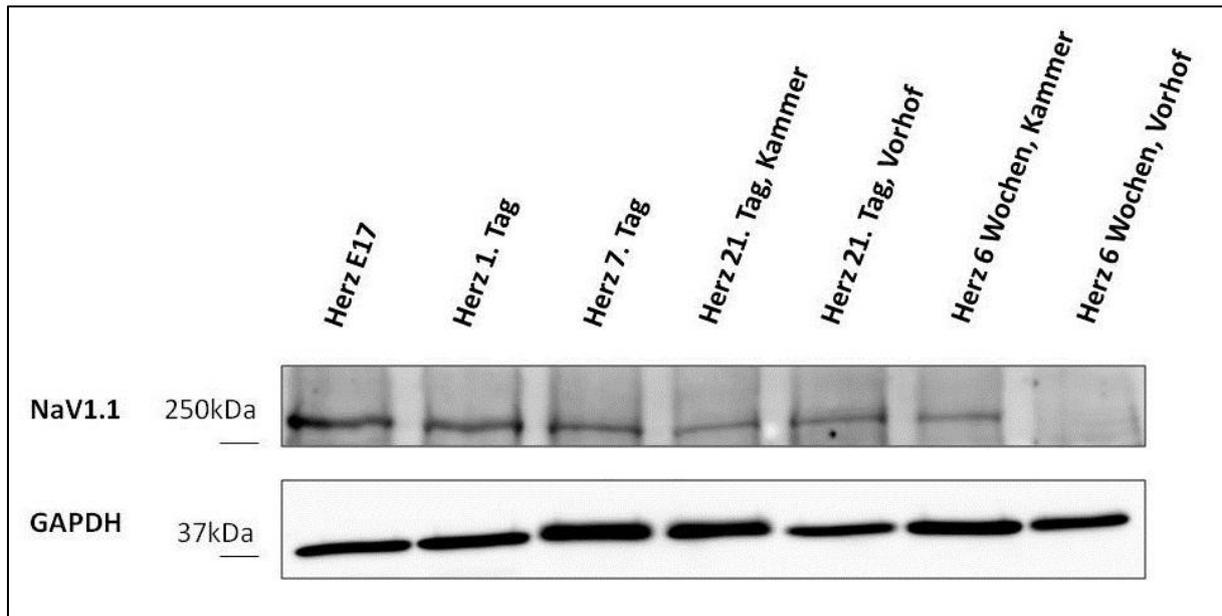


Abbildung 10 – Western-Blot für Na_v1.1, inkl. GAPDH

Zu sehen ist ein repräsentatives Ergebnis des Western-Blots für den Natriumkanal Na_v1.1 mit dazugehöriger Beladungskontrolle der gleichen Proben mittels GAPDH. Deutlich ist die Abnahme der Proteinkonzentration im Lauf der Ontogenese zu verfolgen. Die Beladungskontrolle zeigt keine derartige Tendenz und zeigt eine nahezu identischen Proteinbeladung der einzelnen Geltaschen an.

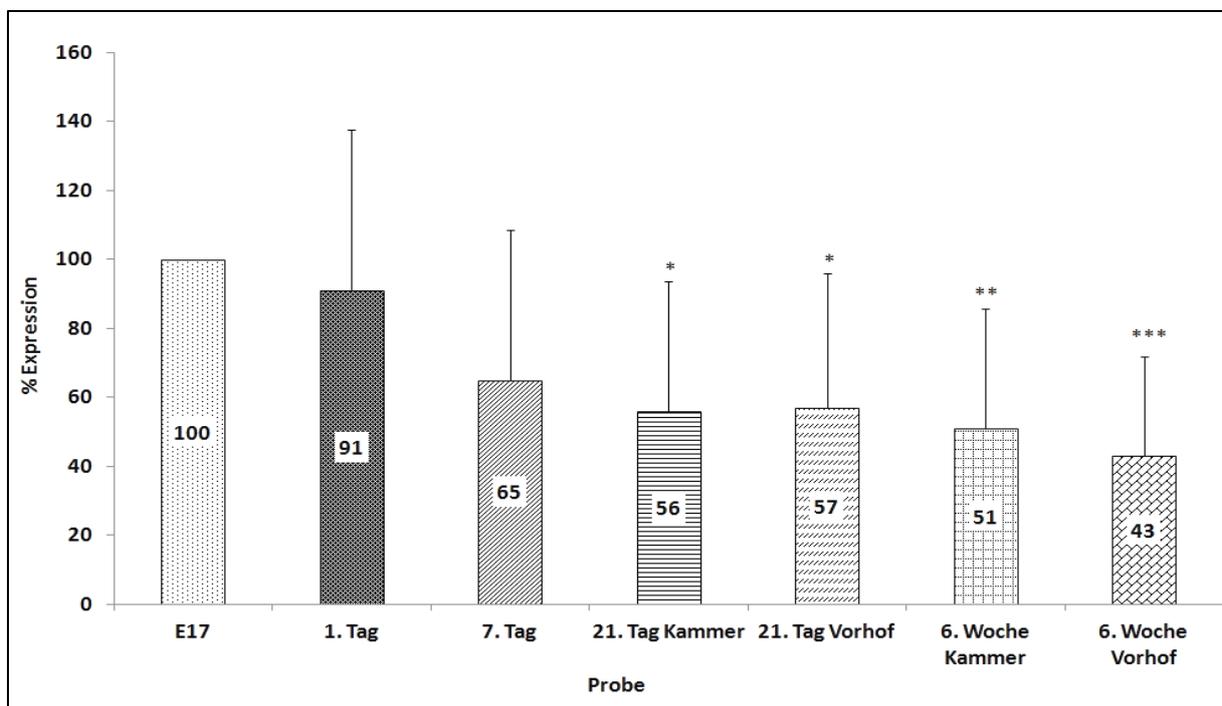


Abbildung 11 - Western-Blot Na_v1.1

Signifikanz: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001

Die relative Proteinmenge des Natriumkanals Na_v1.1 nahm postnatal ab (1. Tag: 91±47%, n = 3). Diese Entwicklung war ab Tag 21 signifikant (56±38% in der Kammer, n = 3, p < 0,05) und blieb im Verlauf auch bei den älteren Tieren signifikant. Ein signifikanter Unterschied zwischen der Expression in der Kammer und dem Vorhof war nicht vorhanden.

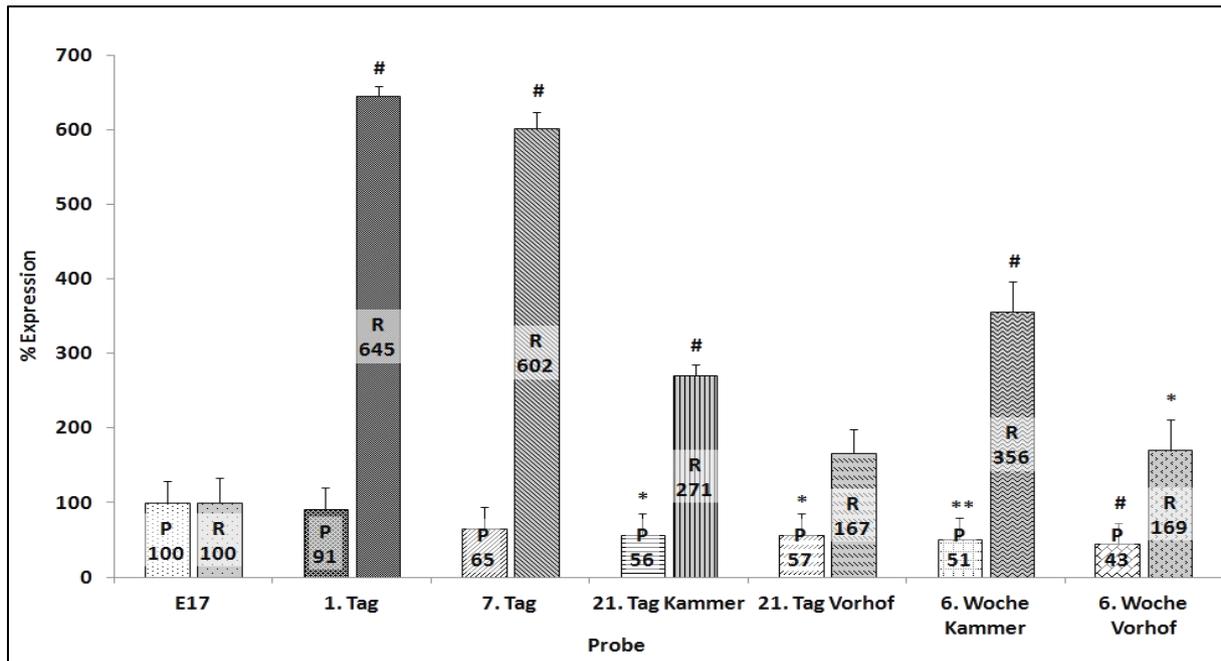


Abbildung 12 - Protein / RNA SCN1A

P = Proteinmessung; R = RNA-Messung; Signifikanz: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; # $p < 0,001$

Während die RNA-Messung einen signifikanten postnatalen Anstieg zeigte, nahm die Proteinkonzentration signifikant und kontinuierlich ab.

3.2.2. SCN5A ($Na_v1.5$)

Anders als beim Natriumkanal $Na_v1.1$ folgte die im Western-Blot bestimmte relative Proteinmenge bei dem eher herztypischen Natriumkanal $Na_v1.5$ den Ergebnissen der Expressionsanalyse des zugehörigen Gens SCN5A (siehe dazu Abbildung 15).

Die relative Proteinmenge stieg vom Embryonalstadium (E17) am 1. Lebenstag auf $188 \pm 127\%$ und am 7. Tag auf $202 \pm 160\%$. Am 21. Tag stieg sie weiter auf $284 \pm 140\%$ in der Kammer bzw. $102 \pm 66\%$ im Vorhof. Danach fiel die relative Proteinmenge der 6 Wochen alten Tiere analog zur Genexpression leicht auf $232 \pm 81\%$ in der Kammer ab. Die relative Proteinmenge im Vorhof blieb auch nach 6 Wochen nahezu konstant bei $109 \pm 58\%$ (siehe Abbildung 13 und Abbildung 14).

Im Gegensatz zur Genexpressionsanalyse mittels PCR waren die quantitativen Unterschiede der Proteinexpression nicht signifikant.

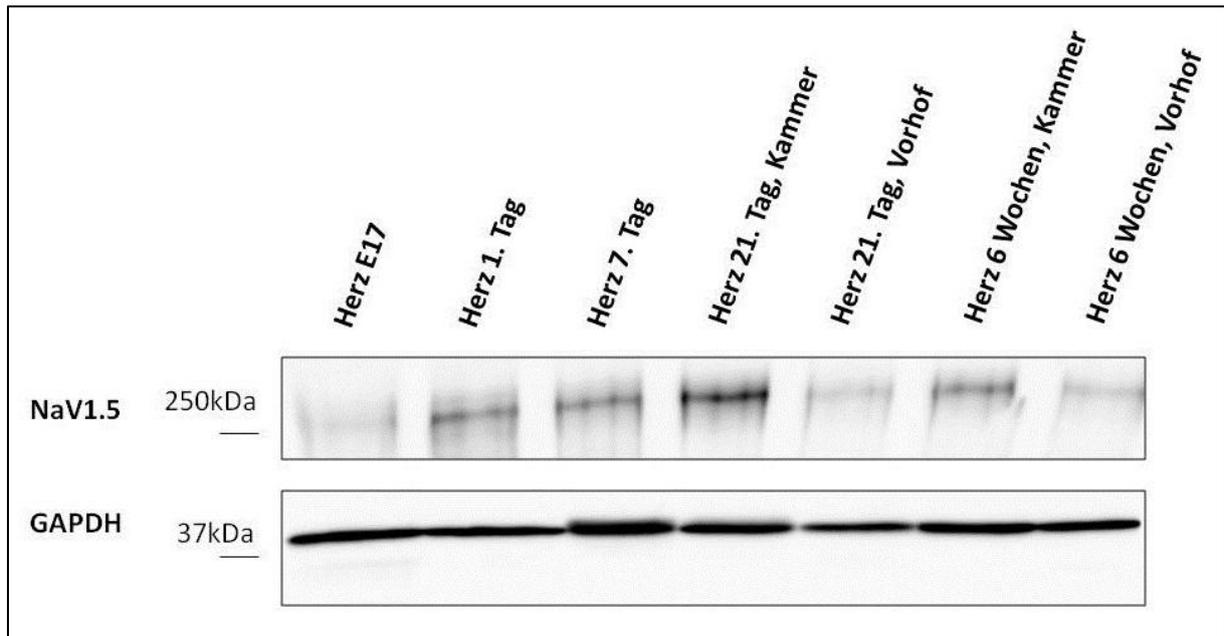


Abbildung 13 – Western-Blot für Na_v1.5, inkl. GAPDH

Postnatal erfolgte eine Expressionszunahme für den Kanal Na_v1.5. Das Ventrikelmuskard zeigte eine höhere Expression als das Vorhofmuskard. Die Beladungskontrolle mittels GAPDH zeigte nahezu identische Proteinbeladungen.

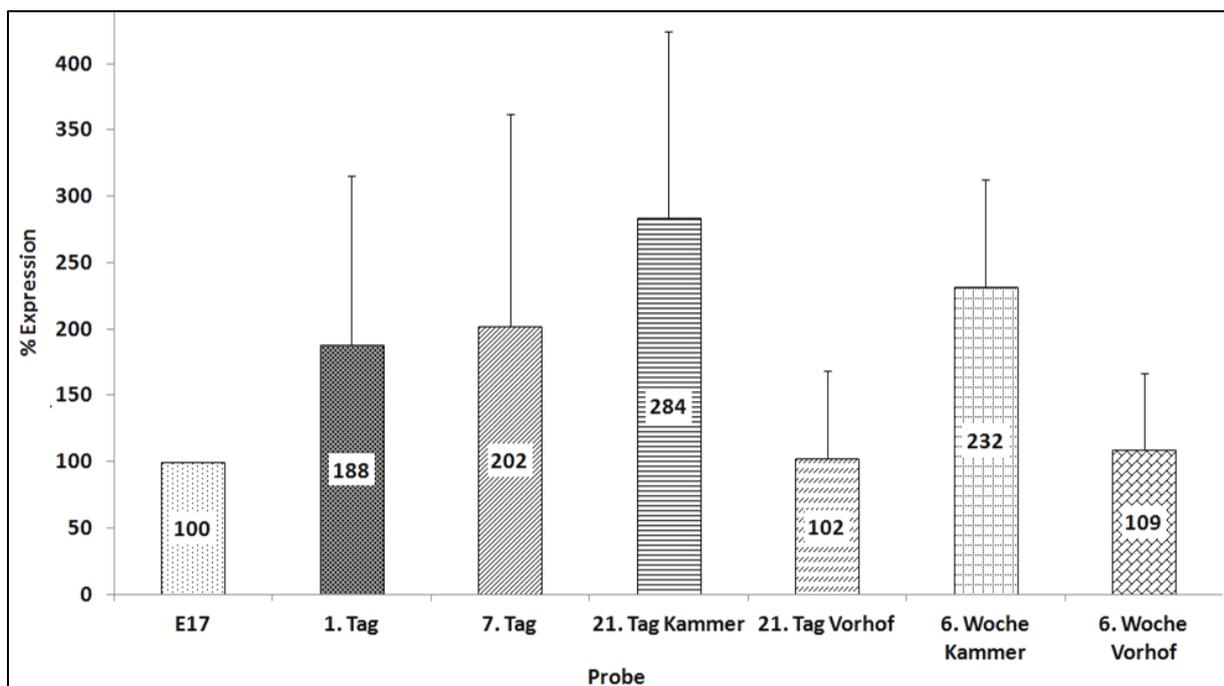


Abbildung 14 - Western-Blot Na_v1.5

Die relative Proteinmenge des Natriumkanals Na_v1.5 nahm postnatal analog zur Genexpression zu. Zwar zeigte sich auch in der Proteinmessung ein deutlicher Unterschied zwischen der Expression im Vorhof zur Kammer, ein signifikanter Unterschied zwischen der Expression in der Kammer und dem Vorhof war jedoch nicht vorhanden.

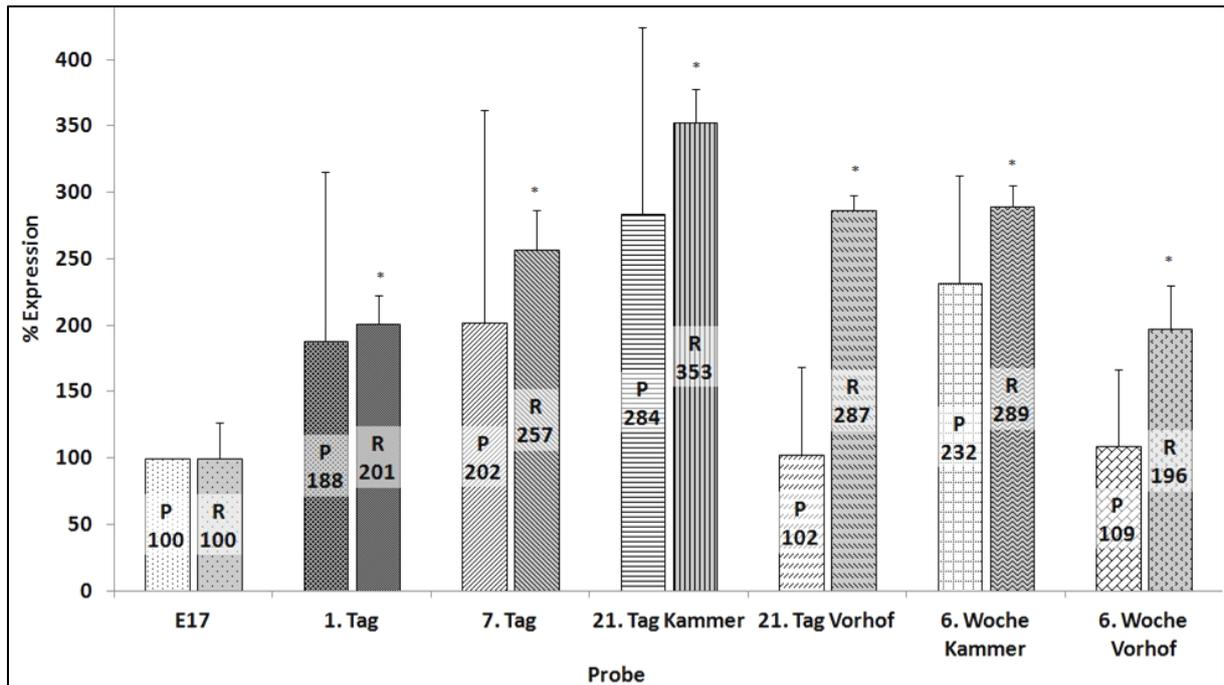


Abbildung 15 - Protein / RNA SCN5A

P = Proteinmessung; R = RNA-Messung; Signifikanz: * $p < 0,001$

Es zeigte sich ein paralleler Verlauf der RNA- und Proteinmessung für den Kanal $Na_v1.5$ mit dem Gen SCN5A. Der Unterschied zwischen der Expression im Vorhof und in der Kammer fiel auf Proteinebene deutlicher aus, auch wenn dieses Ergebnis nicht Signifikanzniveau erreichte. Die restlichen Ergebnisse für die RNA-Messung waren signifikant ($p < 0,001$), die der Proteinmessung jedoch nicht.

3.2.3. SCN8A ($Na_v1.6$)

Der Nachweis einer messbaren Proteinmenge der α -Untereinheit des Kanals $Na_v1.6$ mittels Western-Blot in den Herzproben gelang nicht. Zum Ausschluss eines Methodenfehlers wurde mittels des bei den kardialen Proben angewandten Versuchsprotokolls $Na_v1.6$ -Protein in Hirnproben der Ratten nachgewiesen. Siehe hierzu Abbildung 16.

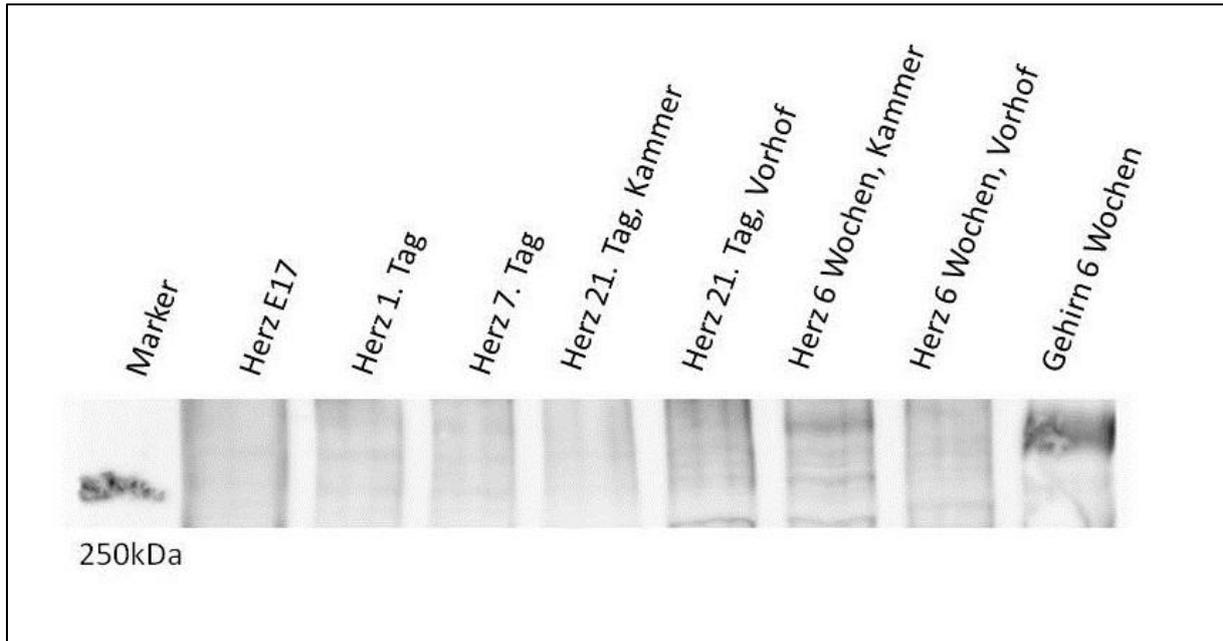


Abbildung 16 - Western-Blot $\text{Na}_v1.6$

Es gelang der Nachweis des Kanals in der Hirnprobe beim erwarteten Molekulargewicht von knapp über 250 kDa. In den Herzproben war dieser Nachweis nicht zu führen.

3.3. Färbungen

3.3.1. SCN1A ($\text{Na}_v1.1$)

Es gelang nicht, den Hirntyp-Kanal $\text{Na}_v1.1$ in der Immunhistochemie der Herzschnitte eindeutig zu identifizieren. Zum Ausschluss eines Versagens der Methode wurde zur Validierung die Färbung von Großhirnschnitten durchgeführt (siehe Abbildung 17). Dort ließ sich $\text{Na}_v1.1$ -Protein sicher und reproduzierbar nachweisen.

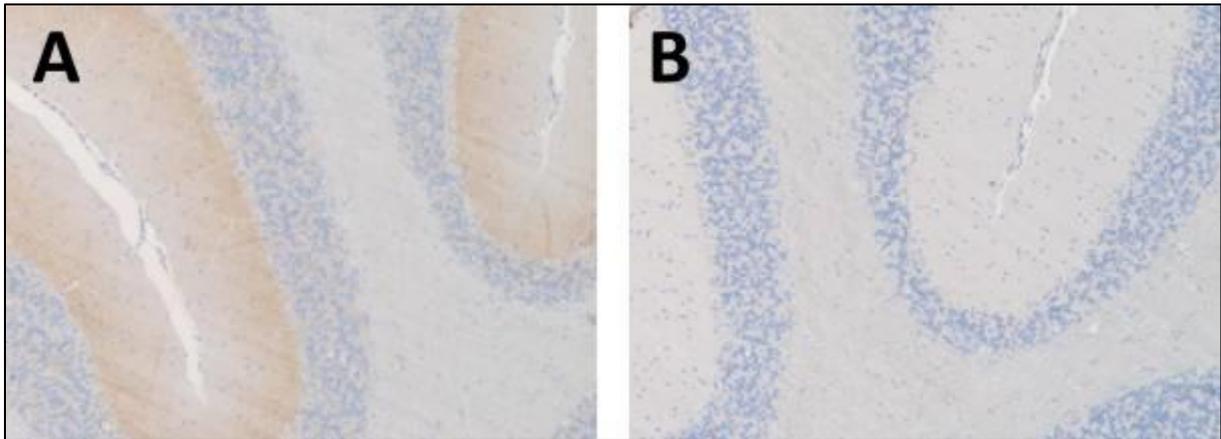


Abbildung 17 - Na_v1.1 an Gehirnprobe

(A) Die linke Abbildung zeigt die immunhistochemische Reaktion (braune Färbung) der Nervenzellen aus dem Gehirn erwachsener Ratten, die Na_v1.1 exprimieren. (B) Die Substitutionskontrolle blieb ohne Anfärbung.

3.3.2. SCN5A (Na_v1.5)

Der Kanal Na_v1.5 ließ sich in allen untersuchten Altersstufen immunhistochemisch eindeutig nachweisen. Siehe dazu die Abbildung 18 bis Abbildung 22. Die Randbereiche der untersuchten Schnitte waren stets intensiver gefärbt als die zentral gelegenen Anteile. Sämtliche Substitutionskontrollen der hier gezeigten Aufnahmen blieben ohne immunhistochemische Reaktion.

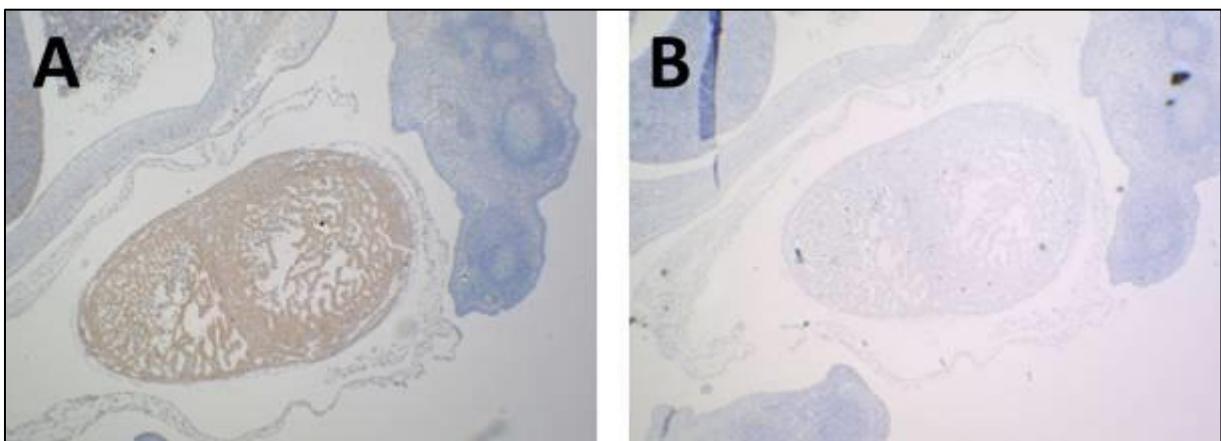


Abbildung 18 - Nav1.5 (40x), Altersstufe E17

(A) Braun angefärbt ist das Herz in einem Totalschnitt durch einen Rattenembryo der Altersstufe E17, das umliegende Gewebe ist frei von Na_v1.5. (B) Die Substitutionskontrolle blieb ohne immunhistochemische Reaktion.

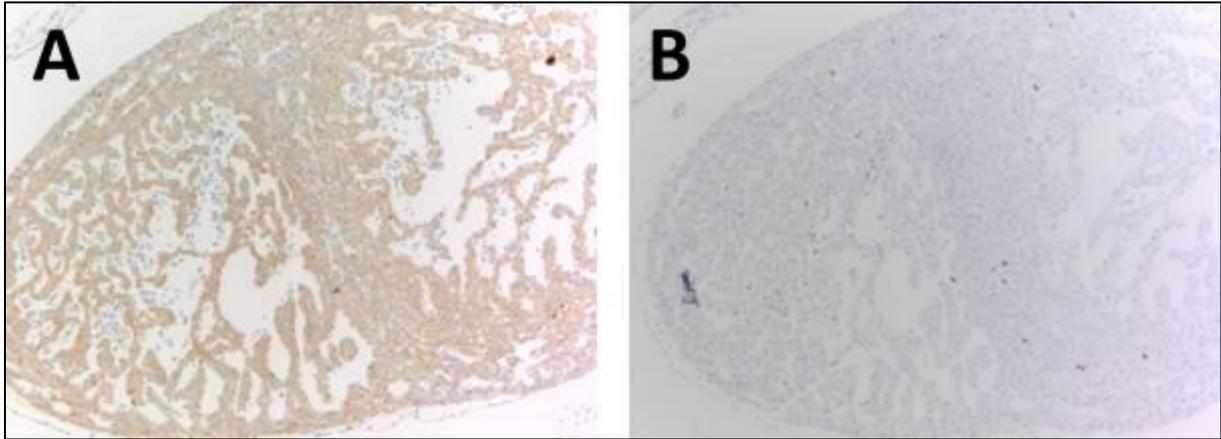


Abbildung 19 - $Na_v1.5$ (100x), Altersstufe E17

(A) Vergrößerter Abschnitt aus Abbildung 18

Abbildung 18 - $Nav1.5$ (40x), Altersstufe E17

Zu sehen ist die gleichmäßige Anfärbung in beiden Kammern und dem Septum. Kleine, blau angefärbte Zellen sind hauptsächlich Erythrozyten.

(B) Die Substitutionskontrolle blieb ohne immunhistochemische Reaktion.

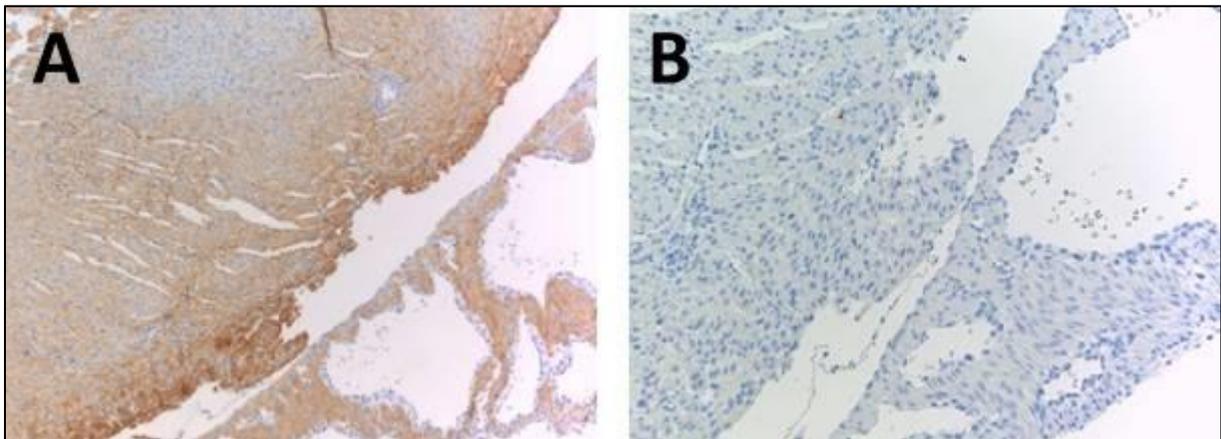


Abbildung 20 - $Na_v1.5$ (200x), Altersstufe 1. Tag

(A) Stärkere Anfärbung im Randbereich der Herzen von einem Tag alten Ratten, sonst zeigte sich auch hier ein homogenes Bild. (B) Die Substitutionskontrolle blieb auch hier ohne immunhistochemische Reaktion.

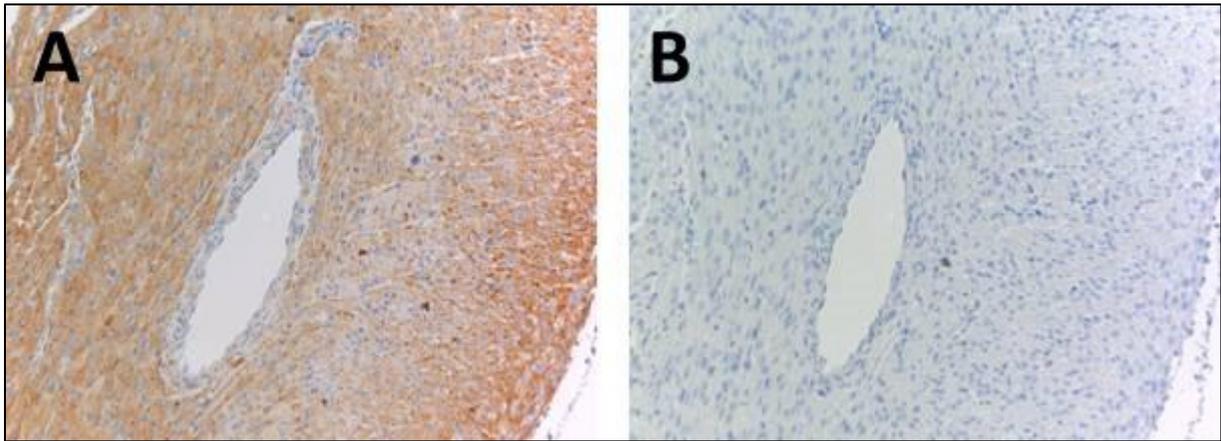


Abbildung 21 - Na_v1.5 (200x), Altersstufe 7. Tag

(A) Schnitt rund um ein Gefäß in einem Herz eines 7 Tage alten Tiers, dessen Endothel sich nahezu frei von Na_v1.5 zeigte. Auch hier ist eine stärkere Reaktion der Färbung zum Randbereich hin zu erkennen. **(B)** Die Substitutionskontrolle blieb ohne immunhistochemische Reaktion.

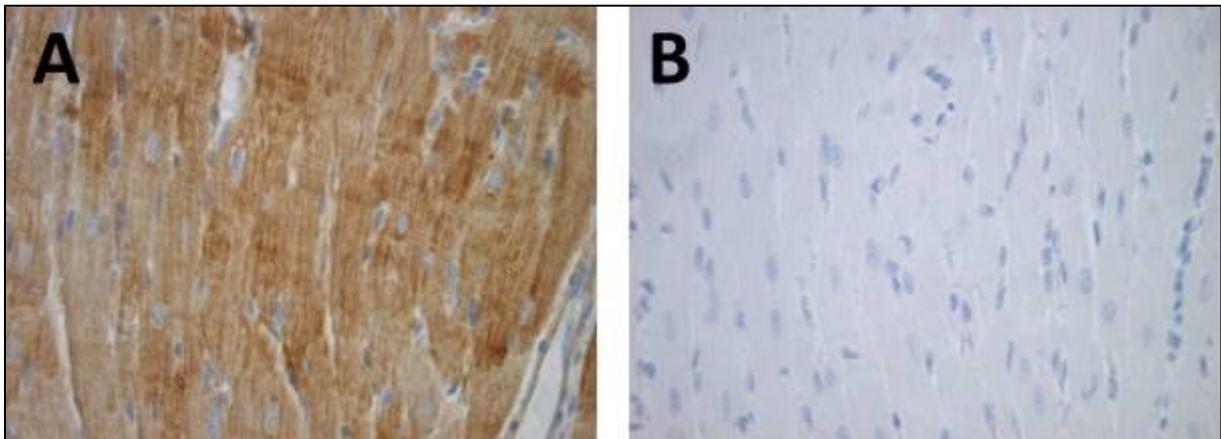


Abbildung 22 - Na_v1.5 (400x), Altersstufe 6 Wochen

(A) Zu sehen ist hier die deutliche Anfärbung der Kardiomyozyten in den Herzen 6 Wochen alter Ratten, zu erkennen ist auch die herztypische Musterung des Gewebes. **(B)** In der Substitutionskontrolle zeigte sich keine Färbung.

3.3.3. SCN8A (Na_v1.6)

Auch der Kanal Na_v1.6 ließ sich in allen untersuchten Altersstufen immunhistochemisch nachweisen, auch wenn die Intensität der Färbung deutlich geringer ausfiel als bei der Färbung der Na_v1.5 Kanäle (siehe Abbildung 23 bis Abbildung 27). Im Unterschied zu dieser Färbung zeigte sich hier in den Präparaten der 6 Wochen alten Tiere eine veränderte Lokalisierung der Na_v1.6 Kanalproteine. Bei den jüngeren Tieren war eine eher homogene Anfärbung zu sehen, während sich bei den 6 Wochen alten Tieren streifenförmige Anreicherungen der Proteine zeigten (siehe Abbildung 27). Zudem war eine intensivere Anfärbung im Vorhofmyokard als im Kammermyokard bei den 21 Tage alten Ratten zu sehen

(siehe dazu Abbildung 28). Sämtliche Substitutionskontrollen der hier gezeigten Aufnahmen blieben ohne immunhistochemische Reaktion.

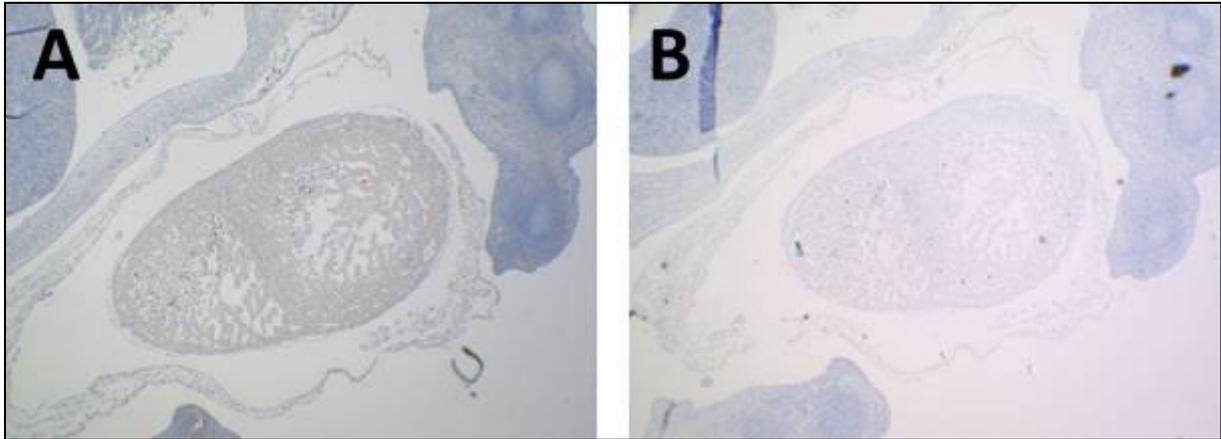


Abbildung 23 - Na_v1.6 (40x), Altersstufe E17

(A) Leichte Anfärbung des gesamten Myokards des embryonalen Herzens, das umliegende Gewebe zeigte sich frei von Na_v1.6. (B) Die Substitutionskontrolle blieb ohne immunhistochemische Reaktion.

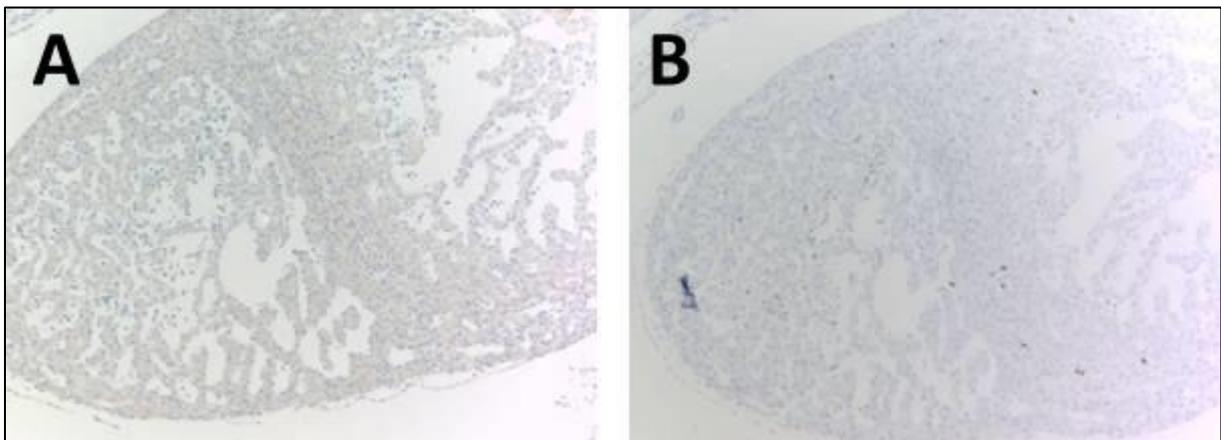


Abbildung 24 - Na_v1.6 (100x), Altersstufe E17

(A) Auch in der höheren Vergrößerung der embryonalen Herzen zeigte sich die leichte, homogene Anfärbung des Myokards. (B) Substitutionskontrolle ebenfalls ohne Anfärbung.

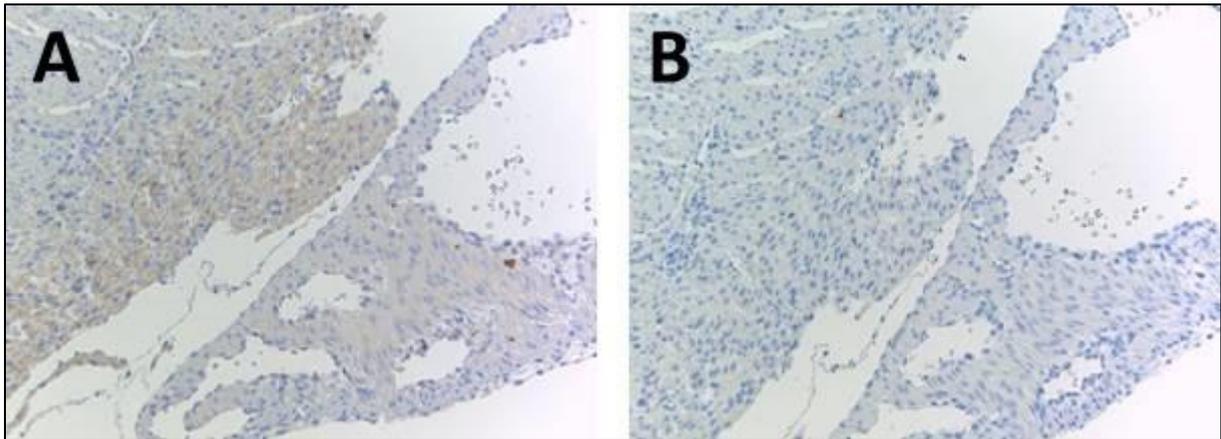


Abbildung 25 - Na_v1.6 (200x), Altersstufe 1. Tag

(A) Die Färbung der einen Tag alten Rattenherzen zeigte wie die Färbung der embryonalen Herzen eine Expression des Kanals Na_v1.6 im Myokard. (B) Die Substitutionskontrolle zeigte keine immunhistochemische Reaktion.

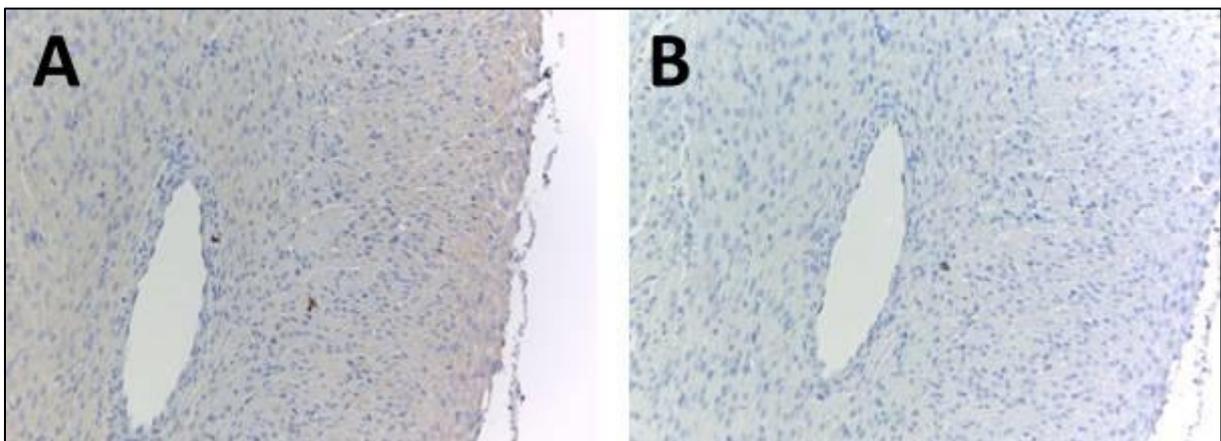


Abbildung 26 - Na_v1.6 (200x), Altersstufe 7. Tag

(A) Myokard einer 7 Tage alten Ratte mit angeschnittenem Gefäß. Die Anfärbung erscheint homogen. (B) In der Substitutionskontrolle sind keine gefärbten Bereiche zu erkennen.

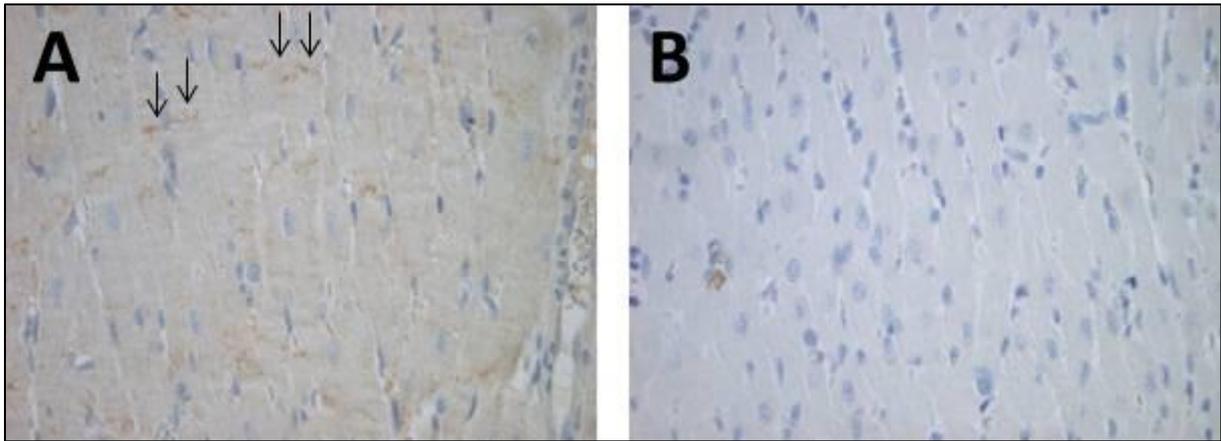


Abbildung 27 - Na_v1.6 (400x), Altersstufe 6 Wochen

(A) Das Myokard einer 6 Wochen alten Ratte zeigte eine leichte Anfärbung mit streifiger Betonung einiger Areale (durch Pfeile markiert). (B) Die Substitutionskontrolle blieb ohne immunhistochemische Reaktion.

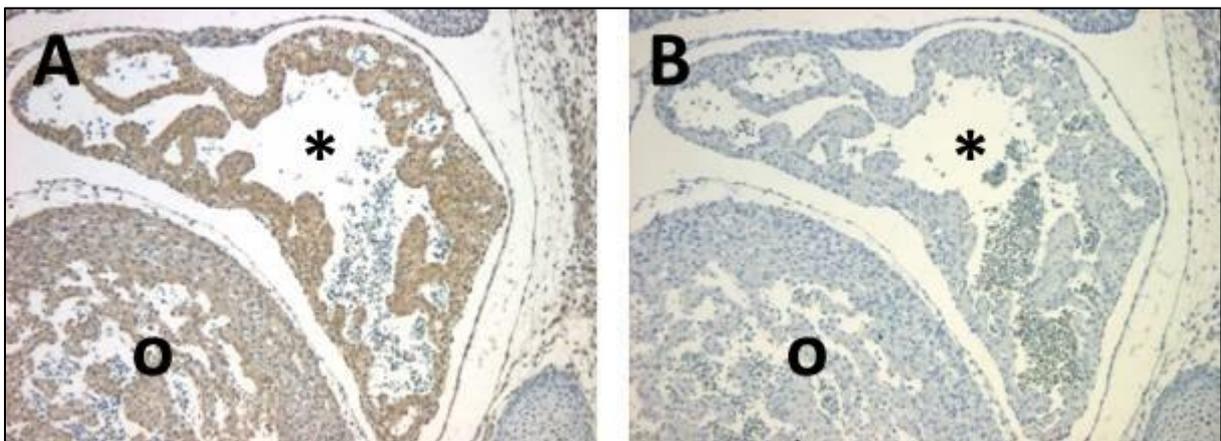


Abbildung 28 - Na_v1.6 (100x), Altersstufe 21 Tage, Vorhofmyokard / Ventrikelmyokard

(A) Stärkere Anfärbung des Vorhofmyokards (*) im Vergleich zum Kammermyokard (o). (B) Die Substitution blieb sowohl im Vorhof- (*) als auch im Kammermyokard (o) ohne Färbung.

4. Diskussion

Im Myokard ist die Expression vieler verschiedener Ionenkanäle zur Aufrechterhaltung einer geregelten elektrischen Aktivität erforderlich. Für die Entstehung und Weiterleitung von Aktionspotentialen in erregbaren Zellen wie den Kardiomyozyten ist das Vorhandensein spannungsabhängiger Natriumkanäle essentiell. Im Herzmuskel wird überwiegend der spannungsabhängige Natriumkanal $\text{Na}_v1.5$ als sog. herzspezifischer Natriumkanal exprimiert. Aber auch andere spannungsabhängige Natriumkanäle, welche hauptsächlich in neuronalen Geweben exprimiert werden, kommen im Myokard vor. Maier et al. beschrieben erstmals die wichtige Funktion dieser sogenannten „Hirntyp-Natriumkanäle“ für die regelgerechte Funktion des Herzens, insbesondere für die elektromechanische Kopplung und die Schrittmacherfunktion des Sinusknotens (Maier et al. 2002; 2003). Da die differentielle Expression vieler Proteine (so auch spannungsabhängiger Natriumkanäle) für eine regelgerechte Gewebe- und Organdifferenzierung notwendig ist, ist die Kenntnis der physiologischen Expressionsmuster dieser spezialisierten Proteine notwendig, bevor dann in weiteren Schritten pathologische Expressionsprofile, welche z.B. im Rahmen bestimmter Erkrankungen auftreten, untersucht und beurteilt werden können.

In dieser Arbeit wurde die Expression der Hirntyp-Kanäle ($\text{Na}_v1.1$ und $\text{Na}_v1.6$) mit der Expression des Herztyp-Kanals ($\text{Na}_v1.5$) während der Ontogenese verglichen, um Rückschlüsse auf das Verteilungsmuster und die anteilige Bedeutung der jeweiligen Kanäle während der ontogenetischen Herzentwicklung zu erlangen.

4.1. SCN1A ($\text{Na}_v1.1$)

Der Kanal $\text{Na}_v1.1$ zeigte für das zugehörige Gen SCN1A in der PCR eine postnatale Expressionssteigerung um das 6-fache zwischen der Altersstufe E17 und dem ersten postnatalen Tag. Allerdings folgte die Proteinmessung mittels Western-Blot nicht diesem Verlauf. Hier zeigte sich von E17 an eine kontinuierliche Abnahme der Expression bis auf ca. 50% des Ausgangswerts in 6 Wochen alten Herzen.

Als Ursache für diese Diskrepanz sind u.a. die posttranslationale Modifikation und microRNA vermittelte Translationsblockade des Proteins $\text{Na}_v1.1$ zu diskutieren, die in den folgenden Abschnitten 4.5.1 - 4.5.3 näher behandelt werden.

Ein weiterer Grund könnte die Degradation des Proteins während der Probenaufbereitung sein. Da bei den Hirntyp-Natriumkanälen wesentlich geringere Gesamtmengen als bei dem herzspezifischen Kanal $\text{Na}_v1.5$ vorlagen, könnte dieser Effekt hier stärker ins Gewicht fallen.

Ein Einfluss auf die relative Expression ist jedoch unwahrscheinlich, da sich dieser Effekt gleichermaßen auf Proben aller Altersstufen auswirken sollte. Dies war nicht der Fall, zudem ließen sich die Ergebnisse in unabhängigen Messreihen reproduzieren und bestätigen.

In zukünftigen Arbeiten gilt es daher zu klären, auf welchen Wegen die Expression des Kanalproteins $\text{Na}_v1.1$, bei zunehmender Transkription, gesteuert und letztlich herabreguliert wird.

4.2. SCN5A ($\text{Na}_v1.5$)

Die Ergebnisse der PCR und Proteinmessung mittels Western-Blot dieser Arbeit zeigten einen postnatalen Anstieg der Expression des Kanals $\text{Na}_v1.5$. Für die PCR-Ergebnisse war dieser Anstieg signifikant, die Ergebnisse des Western-Blots folgten zwar den PCR-Ergebnissen, erreichten jedoch keine Signifikanz. Der postnatale Anstieg der Expression stimmte gut mit PCR-Messungen an Mäuseherzen überein, dort konnte ebenfalls ein signifikanter postnataler Anstieg der SCN5A-Expression gezeigt werden (Haufe et al. 2005; Domínguez et al. 2008).

Des Weiteren konnte ein nicht signifikanter Unterschied zwischen der Expression im Vorhof- und Kammermyokard, sowohl in den PCR- als auch den Western-Blot-Ergebnissen, gezeigt werden, wobei dieser Unterschied in den Proteinmessungen deutlicher ausfiel als auf Ebene der mRNA. Dabei fiel die Expression in den Vorhöfen geringer aus als im Kammermyokard.

Die immunhistochemischen Färbungen zeigten von E17 beginnend an eine deutliche Anfärbung des Myokards, wobei zwischen den Schnitten aus den Herzen der Altersstufe E17 und denen der postnatalen Tiere subjektiv eine Zunahme der Färbeintensität beobachtet wurde. Ein objektiveres Verfahren zur Beurteilung der immunhistochemischen Reaktion, wie es beispielsweise bei immunhistochemisch angefärbten Zellkulturen Anwendung findet, konnte auf Grund des starken Zellverbandes im Myokard nicht sicher verwendet werden.

Daher ist eine objektive Aussage über die Intensität der Färbung und damit über die Menge an exprimierten Proteinen so nicht zu treffen.

4.3. SCN8A (Na_v1.6)

Verglichen mit der Expression zu dem Zeitpunkt E17 nahm diese kontinuierlich und signifikant im Verlauf der Ontogenese ab. Die Auftrennung in Vorhof- und Kammermyokard zeigte zudem eine signifikant höhere Expression im Vorhof in den Altersstufen 21. Tag und 6 Wochen.

Die Proteinmessung mittels Western-Blot gelang mit den untersuchten Herzproben nicht, war jedoch in Hirnproben mit mutmaßlich höheren Proteinkonzentrationen des Kanals Na_v1.6 möglich. Die zum Teil schwierige Extraktion größerer Membranproteine wurde auch im Zusammenhang mit der Struktur- und Funktionsanalyse dieser Proteine immer wieder festgestellt. Dabei besteht die Schwierigkeit u.a. darin, die hydrophoben, in der Lipiddoppelschicht gelegenen Anteile der großen Membranproteine in einer wässrigen Lösung mit Hilfe von Detergenzien zu lösen (Bannwarth und Schulz 2003; Schwarz et al. 2007). Gleichzeitig muss dabei das Ausbilden von Aggregaten (beispielsweise von lipophilen Membranfragmenten mit den Kanalproteinen) verhindert werden, da diese im weiteren Versuchsablauf (z.B. während eines Zentrifugationsschrittes durch die höhere Gesamtmasse des Aggregats in die zu verwerfende Fraktion) abgetrennt werden.

Es gelang jedoch den Kanal Na_v1.6 immunhistochemisch darzustellen. Die Signalintensität der immunhistochemischen Färbung war bei den 6 Wochen alten Tieren schwächer als bei den Tieren zwischen E17 und dem 7. Lebenstag. Bei den 6 Wochen alten Tieren zeigte sich zudem eine bevorzugte Lokalisation des Na_v1.6 Proteins an distinkten Punkten der Zelle. Im Gegensatz dazu stellte sich die Anfärbung der Schnitte jüngerer Altersstufen homogen dar. Eine Zuordnung der Lokalisation hoher Signalintensität zu bestimmten zellulären oder subzellulären Strukturen war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.

4.4. Bedeutung während der Ontogenese

Während sowohl die Expression der mRNA für das Gen SCN5A als auch die des zugehörigen Proteins Na_v1.5 während der Ontogenese zunahm, fielen die Proteinkonzentration des Hirntyp-Kanals Na_v1.1 und die Expression des Gens SCN8A (für den Hirntyp-Kanal Na_v1.6) signifikant ab.

Die funktionelle Bedeutung der Hirntyp-Kanäle scheint also in der Pränatal- und frühen Säuglingszeit höher zu sein und im Laufe der Entwicklung weiter abzunehmen, vorausgesetzt die Protein- und RNA-Mengen spiegeln diese tatsächlich wider. Zur Untersuchung der funktionellen Bedeutung der beobachteten Expressionsunterschiede sind zukünftig elektrophysiologische Untersuchungen und hierdurch eine Quantifizierung der durch die Kanalproteine vermittelten Ionenströme notwendig. Die immunhistochemische Färbung des Kanals Na_v1.6 legt zudem nahe, dass sich die Rolle der Hirntyp-Kanäle in älteren Herzen eher auf spezielle Funktionen an distinkten Orten der Zelle konzentriert. Denkbar wäre die von Maier et al. (2002) beschriebene Rolle der Hirntyp-Kanäle bei der Elektromechanischen Kopplung.

Untersuchungen menschlicher Gehirne zeigten ebenfalls eine stärkere Expression des Kanals Na_v1.1 während des ersten Lebensjahres. Die Autoren diskutieren daher, Kinder mit SCN1A-Anomalien (siehe Abschnitt 1.3.5 Dravet-Syndrom) möglicherweise schon vor Auftreten der ersten schweren Symptome im ersten Lebensjahr zu behandeln. Hierdurch könnte eine Entwicklungsbeeinträchtigung des kindlichen Gehirns in einer sensiblen Phase verhindert werden (Wang W et al. 2011). Dabei sollten Antikonvulsiva, welche die Natriumkanäle blockieren wie Carbamazepin und Lamotrigin, vermieden werden, da diese eine Verstärkung der Symptome auslösen können (Horn et al. 1986; Guerrini et al. 1998). Da beim Dravet-Syndrom meist ein einzelnes Gen betroffen ist, welches die Erkrankung auslöst, könnte diese Erkrankung in Zukunft für gentherapeutische Ansätze in Betracht kommen.

4.5. Regulation der Expression spannungsabhängiger Natriumkanäle

4.5.1. Regulation auf Ebene der Transkription

Der erste Schritt zur Regulation der Expression beginnt auf der Ebene der Transkription.

Diese Regulation erfolgt häufig über spezifische Gensequenzen (sog. cis-Elemente), welche die Transkription entweder fördern oder hemmen. Eine dieser Sequenzen konnte auch bei dem spannungsabhängigen Natriumkanal mit dem zugehörigen Gen SCN2A gezeigt werden (Maue et al. 1990).

In nicht-neuronalen Zellen fand man Mitte der 1990er Jahre ein Protein, das spezifisch die Expression neuronaler Proteine unterbinden kann, indem es an die entsprechende Gensequenz bindet, und nannte es „*Neuron-Restrictive Silencer Factor*“ (NRSF) bzw. „*RE-1 silencing transcription factor*“ (REST) (Schoenherr und Anderson 1995; Chong et al. 1995).

In diesem Zusammenhang wäre es interessant zu untersuchen, welche Rolle diese – oder ähnliche Proteine – auf die Regulation der Expression der Natriumkanäle speziell im sich entwickelnden Myokard haben und ob sich deren Einfluss auf die Transkription während der Ontogenese verändert.

4.5.2. Regulation der Translation mittels microRNA

Die Differenzen in den Messergebnissen zwischen den mRNA- und Proteinmessungen des Kanals Na_v1.1 legen die Vermutung nahe, dass die Expression des Kanals Na_v1.1 neben der Transkriptionsregulation weiteren Faktoren unterworfen ist, die bei vorhandener mRNA eine Expression des Proteins verhindern. Denkbar wäre hier beispielsweise eine microRNA-vermittelte Blockierung der Translation, was in weiterführenden Studien untersucht werden müsste.

Bei microRNA handelt es sich häufig um 21 Nukleotide beinhaltende RNA-Stränge, die nicht für ein Protein kodieren, sondern über Basenpaarung, meist mit der 3'-UTR Region der Ziel-mRNA, deren Translation behindern oder zu deren Abbau führen (Fabian et al. 2010).

Seit der ersten Beschreibung der durch microRNA verursachten Translationsblockade Anfang der 1990er Jahre durch Lee et al. (1993) sind immer mehr Ziel-mRNAs für microRNA beschrieben worden. Diese Regulation ist auch an der regelgerechten Entwicklung des Gehirns und Herzens entscheidend beteiligt, was u.a. in einer Studie an Zebrafischarten gezeigt werden konnte. Dabei gelang der Nachweis, dass Zebrafischarten, die auf Grund einer erzeugten Mutation keine funktionsfähigen microRNAs produzieren können, keine ordnungsgemäße Ausbildung des Gehirns und des Herzens zeigten. Dieser Effekt konnte durch Hinzugabe einer spezifischen funktionsfähigen microRNA aufgehoben werden (Wienholds et al. 2005; Giraldez et al. 2005). Auch konnte die Beteiligung von microRNA an

der Entstehung von Herzinsuffizienz und -hypertrophie in mehreren Versuchen an Tiermodellen gezeigt werden (van Rooij et al. 2006; Sayed et al. 2007; van Rooij et al. 2007). Neuere Studien schließlich kamen zu dem Schluss, dass ca. 60% der für Proteine kodierenden Gene durch microRNAs reguliert werden (Friedman et al. 2009). Daher ist eine microRNA-vermittelte Regulation der Expression der spannungsabhängigen Natriumkanäle durchaus denkbar und wäre gut mit den hier erzielten Diskrepanzen in den Messergebnissen zwischen RNA und Protein vereinbar.

4.5.3. Regulation durch posttranslationale Modifikation

Weitere Mechanismen, welche die Regulation des Einbaus funktionsfähiger Natriumkanäle mitbestimmen, sind die vielfältigen Möglichkeiten der posttranslationalen Modifikation. Für die Proteine Nedd4 und Nedd4-2 aus der Familie der Ubiquitin-Ligasen konnte beispielsweise eine Regulation verschiedener Hirntyp-Natriumkanäle gezeigt werden. Dabei interagieren diese Ligasen mit einem speziellen Motiv (PY-Motiv) des Zielproteins. Dieses (oder ein verwandtes) PY-Motiv wurde u.a. auf den spannungsabhängigen Natriumkanälen $Na_v1.1$, $Na_v1.5$ und $Na_v1.6$, die in dieser Arbeit näher untersucht wurden, gefunden (Fotia et al. 2004). Als Folge der durch die Ubiquitin-Ligasen erzeugten Poly-Ubiquitinierung werden die so markierten Proteine dem 26S-Proteasom zugeführt und abgebaut (Hershko und Ciechanover 1992). Als weitere Möglichkeit wurde die Regulierung des Membraneinbaus funktioneller Na_v -Proteine über durch Proteinkinasen vermittelte Phosphorylierung gezeigt. Eine Aktivierung der Proteinkinase A (PKA), vermittelt z.B. durch β -adrenerge Stimulation, führte in Versuchen an *Xenopus*-Oozyten zu einem vermehrten Einbau und einer geänderten Kanalkinetik von $Na_v1.5$ (Zhou et al. 2000). Für die Aktivierung der Ca^{2+} -abhängigen Proteinkinase C (PKC) konnte eine beschleunigte Internalisierung und damit ein beschleunigtes Entfernen der funktionsfähigen Proteine aus der Zellmembran der Na_v -Proteine gezeigt werden (Yanagita et al. 1996; Shiraishi et al. 2001).

Zicha et al. (2004) beschrieben die Herabregulation des Proteins $Na_v1.5$ bei unveränderter mRNA-Expression in einem Herzinsuffizienzmodell an Hunden. Als Ursache diskutierten sie u.a. den möglichen Abbau des Kanalproteins über Ca^{2+} -vermittelte Aktivierung der PKC bei erhöhtem Ca^{2+} -Gehalt der Myokardzellen bei Herzinsuffizienz. Außerdem hielten sie die verminderte Aktivierung der PKA (und dadurch einen verminderten Einbau der Kanalproteine in die Zellmembran) bei reduzierter β -Rezeptor-Expression, wie sie bei der

Herzinsuffizienz beobachtet wurde, für eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz zwischen Kanalprotein- und mRNA-Expression (Zicha et al. 2004).

Auch die Regulation der Expression der Natriumkanäle des Myokards mittels posttranslationaler Modifikation während der Ontogenese kommt also in Betracht.

4.6. Fetales Verteilungsmuster und dessen mögliche Gefahren

Hoshijima und Chien beschrieben 2002 in einer Analyse der Herzinsuffizienz eine Rückkehr der Genexpression zu einem fetalen Muster (Hoshijima und Chien 2002). In einem Herzinsuffizienzmodell an Ratten konnte gezeigt werden, dass u.a. die Hirntyp-Kanäle $\text{Na}_v1.1$ und $\text{Na}_v1.6$ in den Kardiomyozyten der betroffenen Tiere hochreguliert wurden, während die Expression des Kanals $\text{Na}_v1.5$ abnahm (Xi et al. 2009).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass das fetale Verteilungsmuster der Kanäle $\text{Na}_v1.1$ und $\text{Na}_v1.6$ dem von Xi et al. (2009) als Herzinsuffizienz-assoziierten Muster ähnlich ist. Diese Ergebnisse bestätigen damit auch die Beobachtung von Hoshijima und Chien für die untersuchten Natriumkanäle. In den Herzen von Patienten mit Herzinsuffizienz konnte ein erhöhter persistierender Natriumeinstrom (I_{NaL}) nachgewiesen werden, der an der Verlängerung des Aktionspotentials und der Dysregulation der Na^+ - und Ca^{2+} -Homöostase durch vermehrten Einstrom von Na^+ beteiligt ist (Maltsev et al. 1998; Undrovinas et al. 1999; Valdivia et al. 2005). Xi et al. konnten zeigen, dass dieser Natriumstrom I_{NaL} möglicherweise durch eine vermehrte Expression der Hirntyp-Natriumkanäle zustande kommt (Xi et al. 2009).

Die Inhibition spannungsabhängiger Natriumkanäle, welche den späten Natriumstrom I_{NaL} vermitteln, ist Wirkmechanismus einiger potenter Antiarrhythmika (Belardinelli et al. 2006; Saint 2008). Es kann daher ein Einfluss der Hirntyp-Natriumkanäle auf die Entwicklung dieser durch einen vermehrten Natriumstrom I_{NaL} getragenen Arrhythmien diskutiert werden. Andererseits könnte dies bedeuten, dass bei erhöhter Expression von Hirntyp-Natriumkanälen ein höheres Risiko für die Entwicklung dieser Arrhythmien vorliegen könnte. Dies würde insbesondere dann gelten, wenn die Hirntyp-Natriumkanäle zusätzlich einer *gain-of-function*-Mutation, die den späten Natriumstrom I_{NaL} noch verstärken würde, (siehe Abschnitt 1.3 Ionenkanalerkrankungen und assoziierte Erkrankungen) unterliegen.

Diesem Modell und den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen folgend wären Säuglinge auf Grund des höheren Anteils an Hirntyp-Natriumkanälen eher gefährdet, Arrhythmien, die durch die Verlängerung des Aktionspotentials oder die Störung des Na^+ - und Ca^{2+} -Gleichgewichts entstehen, zu entwickeln. In diesen zeitlichen Rahmen passt die höchste Rate an SIDS-Fällen bei Säuglingen mit dem in dieser Arbeit beschriebenen Verteilungsmuster dieser Altersgruppe. Dies würde einen weiteren Ansatzpunkt für die zukünftige Forschung auf dem Gebiet des plötzlichen Herztods und des plötzlichen Säuglingstods bieten.

Ein interessanter Forschungsansatz wäre daher die Beschreibung der differentiellen Expression spannungsabhängiger Natrium- und anderer Ionenkanäle von Kindern, welche am plötzlichen Säuglingstod verstorben sind.

5. Zusammenfassung

Spannungsabhängige Natriumkanäle sind in entscheidender Weise an der Entstehung und Weiterleitung von Aktionspotentialen in erregbaren Zellen und deren Gewebeverbänden beteiligt. Auch im Herzen tragen sie damit zur Entstehung und Weiterleitung der elektrischen Erregung bei. Dabei unterscheidet man in der Familie der spannungsabhängigen Natriumkanäle mehrere Kanäle voneinander, die unterschiedliche Eigenschaften und bevorzugte Expressionsorte besitzen (Goldin 2001; Catterall et al. 2005). Es ist eine Vielzahl von Erkrankungen bekannt, die mit Mutationen in den Genen für diese Kanäle vergesellschaftet sind und die elektrische Herzaktion stören können. Neuere Studien haben auch die Beteiligung von (wegen des Hauptexpressionsortes so genannten) Hirntyp-Natriumkanälen an der Entstehung des regelgerechten Herzschlags im Sinusknoten nachgewiesen (Maier et al. 2003; Lei et al. 2004). Außerdem konnte den spannungsabhängigen Natriumkanälen eine Rolle bei der postnatalen Entwicklung des Nervensystems zugeschrieben werden (García et al. 1998).

Ziel dieser Arbeit war es daher, die unterschiedliche Expression der Hirntyp-Natriumkanäle SCN1A ($\text{Na}_v1.1$) und SCN8A ($\text{Na}_v1.6$) mit der Expression des herztypischen Natriumkanals SCN5A ($\text{Na}_v1.5$) zu verschiedenen Zeiten der Entwicklung an Herzen in einem Rattenmodell zu untersuchen. Hierzu kamen die Real-Time-PCR für den Nachweis auf mRNA-Ebene sowie Western-Blots und immunhistochemische Färbungen für den Nachweis auf Proteinebene zum Einsatz.

Es konnte gezeigt werden, dass die Expression des Kanals $\text{Na}_v1.5$ im Laufe der Entwicklung signifikant zunahm, während die Expression der Hirntyp-Natriumkanäle abnahm. Für den Kanal $\text{Na}_v1.1$ folgte die Proteinmessung dabei nicht den Ergebnissen der mRNA-Analyse, was eine Regulation der Kanäle nach der Transkription nahe legt. Den Ergebnissen dieser Arbeit folgend kann vermutet werden, dass die Hirntyp-Natriumkanäle eine wichtige Rolle in der Entwicklung einnehmen, die mit zunehmendem Alter abnimmt. Ionenkanalerkrankungen, welche die Hirntyp-Natriumkanäle betreffen, könnten in dieser Entwicklungsphase also stärker ins Gewicht fallen. Weitere Untersuchungen sollten sich daher der Frage widmen, ob durch die erhöhte Expression dieser Kanäle in der frühen Lebensphase ein besonderes Risiko für Herzrhythmusstörungen besteht und wie diese frühzeitig erkannt und behandelt werden können.

6. Anhang

6.1. Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tabelle 1 - Spannungsabhängige Natriumkanäle..... | 8 |
| Tabelle 2 - SCN1A Primer | 20 |
| Tabelle 3 - SCN5A Primer | 20 |
| Tabelle 4 - SCN8A Primer | 20 |
| Tabelle 5 - Adiponectin-Rezeptor Primer..... | 20 |
| Tabelle 6 - Protokoll Einbettautomat..... | 25 |
| Tabelle 7 - Entparaffinierung / Rehydrierung | 26 |
| Tabelle 8 - HE-Färbung | 27 |
| Tabelle 9 - Konzentrationen Immunhistochemie..... | 29 |
| Tabelle 10 - Sekundärantikörper Immunhistochemie | 29 |
| Tabelle 11 - Entwässerung | 30 |
| Tabelle 12 - Chemikalien | 31 |
| Tabelle 13 - Angesetzte Puffer und Lösungen..... | 32 |
| Tabelle 14 - Primer und Antikörper..... | 33 |
| Tabelle 15 - Einwegartikel | 34 |
| Tabelle 16 - Geräte | 34 |
| Tabelle 17 - Verwendete Computerprogramme..... | 35 |
| Tabelle 18 - Kits für die Molekularbiologie | 36 |

6.2. Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1 - Aktionspotential im Arbeitsmyokard..... | 7 |
| Abbildung 2 - Struktur eines spannungsabhängigen Natriumkanals (α -Untereinheit) | 10 |
| Abbildung 3 – Ionenkanalzustände | 11 |
| Abbildung 4 - Entnahme Herz E17 Embryo | 18 |
| Abbildung 5 - Etablierung Western-Blot (Beispiel $\text{Na}_v1.6$)..... | 24 |
| Abbildung 6 - HE-Färbung E17-Embryo..... | 28 |
| Abbildung 7 - mRNA-Messung SCN1A..... | 38 |
| Abbildung 8 - mRNA-Messung SCN5A..... | 39 |
| Abbildung 9 - mRNA-Messung SCN8A..... | 40 |
| Abbildung 10 – Western-Blot für $\text{Na}_v1.1$, inkl. GAPDH | 41 |
| Abbildung 11 - Western-Blot $\text{Na}_v1.1$ | 41 |
| Abbildung 12 - Protein / RNA SCN1A | 42 |
| Abbildung 13 – Western-Blot für $\text{Na}_v1.5$, inkl. GAPDH | 43 |
| Abbildung 14 - Western-Blot $\text{Na}_v1.5$ | 43 |
| Abbildung 15 - Protein / RNA SCN5A | 44 |
| Abbildung 16 - Western-Blot $\text{Na}_v1.6$ | 45 |
| Abbildung 17 - $\text{Na}_v1.1$ an Gehirnprobe | 46 |
| Abbildung 18 - $\text{Nav}1.5$ (40x), Altersstufe E17 | 46 |
| Abbildung 19 - $\text{Na}_v1.5$ (100x), Altersstufe E17 | 47 |
| Abbildung 20 - $\text{Na}_v1.5$ (200x), Altersstufe 1. Tag | 47 |
| Abbildung 21 - $\text{Na}_v1.5$ (200x), Altersstufe 7. Tag | 48 |
| Abbildung 22 - $\text{Na}_v1.5$ (400x), Altersstufe 6 Wochen | 48 |
| Abbildung 23 - $\text{Na}_v1.6$ (40x), Altersstufe E17 | 49 |
| Abbildung 24 - $\text{Na}_v1.6$ (100x), Altersstufe E17 | 49 |
| Abbildung 25 - $\text{Na}_v1.6$ (200x), Altersstufe 1. Tag | 50 |
| Abbildung 26 - $\text{Na}_v1.6$ (200x), Altersstufe 7. Tag | 50 |
| Abbildung 27 - $\text{Na}_v1.6$ (400x), Altersstufe 6 Wochen | 51 |
| Abbildung 28 - $\text{Na}_v1.6$ (100x), Altersstufe 21 Tage, Vorhofmyokard / Ventrikelmyokard | 51 |

7. Literaturverzeichnis

Abriel H (2007): Roles and regulation of the cardiac sodium channel Nav1.5: Recent insights from experimental studies. *Cardiovasc Res* 76, 381-389

Ackerman MJ and Mohler PJ (2010): Defining a new paradigm for human arrhythmia syndromes: phenotypic manifestations of gene mutations in ion channel- and transporter-associated proteins. *Circ Res* 107, 457-465

Adán V and Crown L (2003): Diagnosis and Treatment of Sick Sinus Syndrome. *Am Fam Physician* 67, 1725-1732

Amin A, Asghari-Roodsari A and Tan H (2010): Cardiac sodium channelopathies. *Pflugers Arch* 460, 223-237

Antzelevitch C, Brugada P, Borggrefe M, Brugada J, Brugada R, Corrado D, Gussak I, LeMarec H, Nademanee K, Perez Riera AR, Shimizu W, Schulze-Bahr E, Tan H and Wilde A (2005): Brugada Syndrome: Report of the Second Consensus Conference. *Circulation* 111, 659-670

Armstrong CM and Bezanilla F (1977): Inactivation of the sodium channel. II. Gating current experiments. *J Gen Physiol* 70, 567-590

Arnestad M, Crotti L, Rognum TO, Insolia R, Pedrazzini M, Ferrandi C, Vege A, Wang DW, Rhodes TE, George AL and Schwartz PJ (2007): Prevalence of Long-QT Syndrome Gene Variants in Sudden Infant Death Syndrome. *Circulation* 115, 361-367

Bajanowski T and Poets C (2004): Der plötzliche Säuglingstod: Epidemiologie, Ätiologie, Pathophysiologie und Differenzialdiagnostik. *Dtsch Arztebl* 101, 3185-3190

Bannwarth M and Schulz GE (2003): The expression of outer membrane proteins for crystallization. *Biochim Biophys Acta* 1610, 37-45

Belardinelli L, Shryock JC and Fraser H (2006): Inhibition of the late sodium current as a potential cardioprotective principle: effects of the late sodium current inhibitor ranolazine. *Heart* 92, iv6-iv14

Bennett ES, Smith BA and Harper JM (2004): Voltage-gated Na⁺ channels confer invasive properties on human prostate cancer cells. *Pflugers Arch* 447, 908-914

Bennett PB, Yazawa K, Makita N and George AL (1995): Molecular mechanism for an inherited cardiac arrhythmia. *Nature* 376, 683-685

Benson DW, Wang DW, Dymont M, Knilans TK, Fish FA, Strieper MJ, Rhodes TH and George AL (2003): Congenital sick sinus syndrome caused by recessive mutations in the cardiac sodium channel gene (SCN5A). *J Clin Invest* 112, 1019-1028

Brown H, DiFrancesco D and Noble S (1979): How does adrenaline accelerate the heart? *Nature* 280, 235-236

Brugada J and Brugada P (1997): Further Characterization of the Syndrome of Right Bundle Branch Block, ST Segment Elevation, and Sudden Cardiac Death. *J Cardiovasc Electrophysiol* 8, 325-331

Catterall WA (1986): Voltage-dependent gating of sodium channels: correlating structure and function. *Trends Neurosci* 9, 7-10

Catterall WA, Goldin AL and Waxman SG (2005): International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Voltage-Gated Sodium Channels. *Pharmacol Rev* 57, 397-409

Chong JA, Tapia-Ramirez J, Kim S, Toledo-Aral JJ, Zheng Y, Boutros MC, Altshuler YM, Frohman MA, Kraner SD and Mandel G (1995): REST: A mammalian silencer protein that restricts sodium channel gene expression to neurons. *Cell* 80, 949-957

Delogu AB, Spinelli A, Battaglia D, Dravet C, De Nisco A, Saracino A, Romagnoli C, Lanza GA and Crea F (2011): Electrical and autonomic cardiac function in patients with Dravet syndrome. *Epilepsia* 52, 55-58

Domínguez JN, de la Rosa Á, Navarro F, Franco D and Aránega AE (2008): Tissue distribution and subcellular localization of the cardiac sodium channel during mouse heart development. *Cardiovasc Res* 78, 45-52

Escayg A and Goldin AL (2010): Sodium channel SCN1A and epilepsy: Mutations and mechanisms. *Epilepsia* 51, 1650-1658

Fabian MR, Sonenberg N and Filipowicz W (2010): Regulation of mRNA Translation and Stability by microRNAs. *Annu Rev Biochem* 79, 351-379

Fotia AB, Ekberg J, Adams DJ, Cook DI, Poronnik P and Kumar S (2004): Regulation of Neuronal Voltage-gated Sodium Channels by the Ubiquitin-Protein Ligases Nedd4 and Nedd4-2. *J Biol Chem* 279, 28930-28935

Fraser SP, Diss JKJ, Chioni AM, Mycielska ME, Pan H, Yamaci RF, Pani F, Siwy Z, Krasowska M, Grzywna Z, Brackenbury WJ, Theodorou D, Koyutürk M, Kaya H, Battaloglu E, De Bella MT, Slade MJ, Tolhurst R, Palmieri C, Jiang J, Latchman DS, Coombes RC and Djamgoz MBA (2005): Voltage-Gated Sodium Channel Expression and Potentiation of Human Breast Cancer Metastasis. *Clin Cancer Res* 11, 5381-5389

Friedman RC, Farh KK-H, Burge CB and Bartel DP (2009): Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 19, 92-105

García KD, Sprunger LK, Meisler MH and Beam KG (1998): The Sodium Channel Scn8a Is the Major Contributor to the Postnatal Developmental Increase of Sodium Current Density in Spinal Motoneurons. *J Neurosci* 18, 5234-5239

Giraldez AJ, Cinalli RM, Glasner ME, Enright AJ, Thomson JM, Baskerville S, Hammond SM, Bartel DP and Schier AF (2005): MicroRNAs Regulate Brain Morphogenesis in Zebrafish. *Science* 308, 833-838

Goldin AL (1999): Diversity of Mammalian Voltage-Gated Sodium Channels. *Ann N Y Acad Sci* 868, 38-50

Goldin AL (2001): Resurgence of sodium channel research. *Annu Rev Physiol* 63, 871-894

Grimes JA, Fraser SP, Stephens GJ, Downing JEG, Laniado ME, Foster CS, Abel PD and Djamgoz MBA (1995): Differential expression of voltage-activated Na⁺ currents in two prostatic tumour cell lines: contribution to invasiveness in vitro. *FEBS Lett* 369, 290-294

Guerrini R, Dravet C, Genton P, Belmonte A, Kaminska A and Dulac O (1998): Lamotrigine and Seizure Aggravation in Severe Myoclonic Epilepsy. *Epilepsia* 39, 508-512

Hartshorne RP and Catterall WA (1981): Purification of the saxitoxin receptor of the sodium channel from rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 4620-4624

Haufe V, Camacho JA, Dumaine R, Günther B, Bollensdorff C, von Banchet GS, Benndorf K and Zimmer T (2005): Expression pattern of neuronal and skeletal muscle voltage-gated Na⁺ channels in the developing mouse heart. *J Physiol* 564, 683-696

Haverkamp W, Schulze-Bahr E, Hördt M, Wedekind H, Funke H, Borggrefe M, Assmann G and Breithardt G (1997): QT-Syndrome: Aspekte zur Pathogenese, molekularen Genetik, Diagnostik und Therapie. *Dtsch Arztebl* 94, 667-672

Hershko A and Ciechanover A (1992): The Ubiquitin System for Protein Degradation. *Annu Rev Biochem* 61, 761-807

Hille B: *Ion Channels Of Excitable Membranes*, 3. Auflage; Sinauer Associates, Inc., Sunderland, U.S.A. 2001

Hiyama TY, Watanabe E, Ono K, Inenaga K, Tamkun MM, Yoshida S and Noda M (2002): Nax channel involved in CNS sodium-level sensing. *Nat Neurosci* 5, 511-512

Horn CS, Ater SB and Hurst DL (1986): Carbamazepine-exacerbated epilepsy in children and adolescents. *Pediatr Neurol* 2, 340-345

Hoshijima M and Chien KR (2002): Mixed signals in heart failure: cancer rules. *J Clin Invest* 109, 849-855

Kapplinger JD, Tester DJ, Salisbury BA, Carr JL, Harris-Kerr C, Pollevick GD, Wilde AAM and Ackerman MJ (2009): Spectrum and prevalence of mutations from the first 2,500 consecutive unrelated patients referred for the FAMILION® long QT syndrome genetic test. *Heart Rhythm* 6, 1297-1303

Krous HF, Beckwith JB, Byard RW, Rognum TO, Bajanowski T, Corey T, Cutz E, Hanzlick R, Keens TG and Mitchell EA (2004): Sudden Infant Death Syndrome and Unclassified Sudden Infant Deaths: A Definitional and Diagnostic Approach. *Pediatrics* 114, 234-238

Laemmli U (1970): Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685

Laniado ME, Lalani EN, Fraser SP, Grimes JA, Bhangal G, Djamgoz MB and Abel PD (1997): Expression and functional analysis of voltage-activated Na⁺ channels in human prostate cancer cell lines and their contribution to invasion in vitro. *Am J Pathol* 150, 1213-1221

Lee RC, Feinbaum RL and Ambros V (1993): The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843-854

Lei M, Jones SA, Liu J, Lancaster MK, Fung SSM, Dobrzynski H, Camelliti P, Maier SKG, Noble D and Boyett MR (2004): Requirement of neuronal- and cardiac-type sodium channels for murine sinoatrial node pacemaking. *J Physiol* 559, 835-848

Lei M, Goddard C, Liu J, Léoni AL, Royer A, Fung SSM, Xiao G, Ma A, Zhang H, Charpentier F, Vandenberg JI, Colledge WH, Grace AA and Huang CLH (2005): Sinus node dysfunction following targeted disruption of the murine cardiac sodium channel gene *Scn5a*. *J Physiol* 567, 387-400

Maier SKG, Westenbroek RE, Schenkman KA, Feigl EO, Scheuer T and Catterall WA (2002): An unexpected role for brain-type sodium channels in coupling of cell surface depolarization to contraction in the heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 4073-4078

Maier SKG, Westenbroek RE, Yamanushi TT, Dobrzynski H, Boyett MR, Catterall WA and Scheuer T (2003): An unexpected requirement for brain-type sodium channels for control of heart rate in the mouse sinoatrial node. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 3507-3512

Maltsev VA, Sabbah HN, Higgins RSD, Silverman N, Lesch M and Undrovinas AI (1998): Novel, Ultraslow Inactivating Sodium Current in Human Ventricular Cardiomyocytes. *Circulation* 98, 2545-2552

Mantegazza M, Yu FH, Catterall WA and Scheuer T (2001): Role of the C-terminal domain in inactivation of brain and cardiac sodium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 15348-15353

Marini C, Scheffer IE, Nabbout R, Suls A, De Jonghe P, Zara F and Guerrini R (2011): The genetics of Dravet syndrome. *Epilepsia* 52, 24-29

Maue RA, Kraner SD, Goodman RH and Mandelt G (1990): Neuron-specific expression of the rat brain type II sodium channel gene is directed by upstream regulatory elements. *Neuron* 4, 223-231

Morita H, Wu J and Zipes DP (2008): The QT syndromes: long and short. *Lancet* 372, 750-763

Noda M, Shimizu S, Tanabe T, Takai T, Kayano T, Ikeda T, Takahashi H, Nakayama H, Kanaoka Y, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H, Raftery MA, Hirose T, Inayama S, Hayashida H, Miyata T and Numa S (1984): Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature* 312, 121-127

Rogart RB, Cribbs LL, Muglia LK, Kephart DD and Kaiser MW (1989): Molecular cloning of a putative tetrodotoxin-resistant rat heart Na⁺ channel isoform. Proc Natl Acad Sci U S A 86, 8170-8174

Saint DA (2008): The cardiac persistent sodium current: an appealing therapeutic target? Br J Pharmacol 153, 1133-1142

Sayed D, Hong C, Chen IY, Lypowy J and Abdellatif M (2007): MicroRNAs Play an Essential Role in the Development of Cardiac Hypertrophy. Circ Res 100, 416-424

Schmidt RF, Lang F and Heckmann M: Physiologie des Menschen, 31. Auflage; Springer Medizin Verlag, Heidelberg 2010

Schneider CA, Rasband WS and Eliceiri KW (2012): NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. Nat Methods 9, 671-675

Schoenherr CJ and Anderson DJ (1995): The neuron-restrictive silencer factor (NRSF): a coordinate repressor of multiple neuron-specific genes. Science 267, 1360-1363

Schwarz D, Klammt C, Koglin A, Löhr F, Schneider B, Dötsch V and Bernhard F (2007): Preparative scale cell-free expression systems: New tools for the large scale preparation of integral membrane proteins for functional and structural studies. Methods 41, 355-369

Shi W, Wymore R, Yu H, Wu J, Wymore RT, Pan Z, Robinson RB, Dixon JE, McKinnon D and Cohen IS (1999): Distribution and Prevalence of Hyperpolarization-Activated Cation Channel (HCN) mRNA Expression in Cardiac Tissues. Circ Res 85, e1-e6

Shiraishi S, Shibuya I, Uezono Y, Yokoo H, Toyohira Y, Yamamoto R, Yanagita T, Kobayashi H and Wada A (2001): Heterogeneous increases of cytoplasmic calcium: distinct effects on down-regulation of cell surface sodium channels and sodium channel subunit mRNA levels. Br J Pharmacol 132, 1455-1466

Smith RD and Goldin AL (1998): Functional Analysis of the Rat I Sodium Channel in *Xenopus* Oocytes. *J Neurosci* 18, 811-820

Stühmer W, Conti F, Suzuki H, Wang X, Noda M, Yahagi N, Kubo H and Numa S (1989): Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel. *Nature* 339, 597-603

Undrovinas AI, Maltsev VA and Sabbah HN (1999): Repolarization abnormalities in cardiomyocytes of dogs with chronic heart failure: role of sustained inward current. *Cell Mol Life Sci* 55, 494-505

Valdivia CR, Chu WW, Pu J, Foell JD, Haworth RA, Wolff MR, Kamp TJ and Makielski JC (2005): Increased late sodium current in myocytes from a canine heart failure model and from failing human heart. *J Mol Cell Cardiol* 38, 475-483

van Rooij E, Sutherland LB, Liu N, Williams AH, McAnally J, Gerard RD, Richardson JA and Olson EN (2006): A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 18255-18260

van Rooij E, Sutherland LB, Qi X, Richardson JA, Hill J and Olson EN (2007): Control of Stress-Dependent Cardiac Growth and Gene Expression by a MicroRNA. *Science* 316, 575-579

Vassilev PM, Scheuer T and Catterall WA (1988): Identification of an intracellular peptide segment involved in sodium channel inactivation. *Science* 241, 1658-1661

Wang DW, Desai RR, Crotti L, Arnestad M, Insolia R, Pedrazzini M, Ferrandi C, Vege A, Rognum T, Schwartz PJ and George AL (2007): Cardiac Sodium Channel Dysfunction in Sudden Infant Death Syndrome. *Circulation* 115, 368-376

Wang W, Takashima S, Segawa Y, Itoh M, Shi X, Hwang SK, Nabeshima K, Takeshita M and Hirose S (2011): The developmental changes of Nav1.1 and Nav1.2 expression in the human hippocampus and temporal lobe. *Brain Res* 1389, 61-70

West JW, Patton DE, Scheuer T, Wang Y, Goldin AL and Catterall WA (1992): A cluster of hydrophobic amino acid residues required for fast Na⁽⁺⁾-channel inactivation. Proc Natl Acad Sci U S A 89, 10910-10914

Wienholds E, Kloosterman WP, Miska E, Alvarez-Saavedra E, Berezikov E, de Bruijn E, Horvitz HR, Kauppinen S and Plasterk RHA (2005): MicroRNA Expression in Zebrafish Embryonic Development. Science 309, 310-311

Xi Y, Wu G, Yang L, Han K, Du Y, Wang T, Lei X, Bai X and Ma A (2009): Increased late sodium currents are related to transcription of neuronal isoforms in a pressure-overload model. Eur J Heart Fail 11, 749-757

Yanagita T, Wada A, Yamamoto R, Kobayashi H, Yuhi T, Urabe M and Niina H (1996): Protein Kinase C-Mediated Down-Regulation of Voltage-Dependent Sodium Channels in Adrenal Chromaffin Cells. J Neurochem 66, 1249-1253

Zhou J, Yi J, Hu N, George AL and Murray KT (2000): Activation of Protein Kinase A Modulates Trafficking of the Human Cardiac Sodium Channel in Xenopus Oocytes. Circ Res 87, 33-38

Zicha S, Maltsev VA, Nattel S, Sabbah HN and Undrovinas AI (2004): Post-transcriptional alterations in the expression of cardiac Na⁺ channel subunits in chronic heart failure. J Mol Cell Cardiol 37, 91-100

8. Veröffentlichung

Poster

Krause U, Alflen C, Quentin T, Paul T (2013): Differential expression of voltage gated sodium channels in the developing rat myocardium. Poster Abstract #9582, Heart Rhythm 2013 - 34th Annual Scientific Sessions, Denver, USA, 08. bis 11. Mai 2013

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Thomas Paul, der mir es ermöglicht hat diese Arbeit anzufertigen.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinem Betreuer Dr. med. Ulrich Krause, der mir während der experimentellen Phase und bei dem Entstehungsprozess dieser Arbeit immer zur Seite stand.

Für die tolle Laboratmosphäre und ausgezeichnete Hilfestellung während und nach meiner Zeit im Labor möchte ich mich bei Dr. rer. nat. Thomas Quentin, Andrea Poppe und Karin Bär bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie und meiner Freundin Astrid, die mich u.a. durch Korrekturlesen der Arbeit unterstützt haben.