

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I  
der Universität Würzburg  
Direktor: Professor Dr. med. G. Ertl**

**Lokalisation und Expression von spannungsabhängigen  
Natriumkanälen an ventrikulären, neonatalen  
Kardiomyozyten der Ratte**

**Inaugural-Dissertation**

**zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
vorgelegt von**

**Sebastian Bischoff  
aus Ilmenau  
Würzburg, März 2009**

**Referent** : Priv.-Doz. Dr. med. S. Maier  
**Koreferent** : Prof. Dr. rer. nat. E. Wischmeyer

**Dekan:** Prof. Dr. med. M. Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung:**

17.07.2009

**Der Promovend ist Arzt.**

# Inhaltsverzeichnis

## Zielsetzung

<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Grundzüge der Anatomie und Physiologie einer Herzmuskelzelle.....	1
1.2 Besonderheiten einer neonatalen Herzmuskelzelle .....	3
1.3 Zelluläre Strukturelemente in Herzmuskelzellen .....	4
1.4 Das Aktionspotenzial.....	5
1.5 Struktur spannungsabhängiger Natriumkanäle.....	6
1.5.1 $\alpha$ -Untereinheit.....	7
1.5.2 $\beta$ -Untereinheiten.....	9
1.6 Lokalisation und Verteilungsmuster der Isoformen.....	10
1.7 Natriumkanalmutationen .....	11
1.8 Pharmakologie .....	12
<b>2 Fragestellung</b> .....	<b>13</b>
<b>3 Methoden</b> .....	<b>14</b>
3.1 Isolation und Kultivierung neonataler Kardiomyozyten .....	14
3.1.1 Präparation .....	14
3.1.2 Preplating .....	15
3.1.3 Plating.....	16
3.2 Zellkultur .....	16
3.3 Immunofärbung der Zellen .....	17
3.4 Primäre Antikörper .....	19
3.5 Sekundäre Antikörper .....	20
3.6 Peptide Block.....	21
3.7 Mikroskopieren.....	22
3.8 Herstellung des Gewebslysates aus neonatalen Rattenherzen .....	22
3.9 BioRad-Methode.....	23
3.10 Western Blotting .....	23
<b>4 Ergebnisse</b> .....	<b>26</b>
4.1 Lokalisation von $\alpha$ -Natriumkanaluntereinheiten mittels des isoformenunspezifischer Antikörpers SP19 .....	26
4.2 Lokalisation von $\alpha$ -Natriumkanaluntereinheiten mittels isoformenspezifischer Antikörper .....	27
4.3 Lokalisation von $\beta$ -Natriumkanaluntereinheit mittels isoformenspezifischer Antikörper .....	33
4.4 Peptide Blocks für Antikörperspezifität, Nativaufnahmen und „No Primary“ .....	38
4.5 Western Blotting für Antikörperspezifität .....	40

<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>41</b>
5.1	Methodische Diskussion .....	41
5.1.1	Präparation der neonatalen Herzzellen.....	41
5.1.2	Vorteil der konfokalen Mikroskopie.....	42
5.1.3	Immunofärbung der Kardiomyozyten .....	42
5.1.4	Spezifität der Antikörper .....	43
5.2	Inhaltliche Diskussion .....	43
5.2.1	Lokalisation von $\alpha$ -Natriumkanaluntereinheiten in ventrikulären, neonatalen Herzmuskelzellen der Ratte.....	43
5.2.2	Lokalisation von $\beta$ -Natriumkanaluntereinheiten in ventrikulären, neonatalen Herzmuskelzellen der Ratte.....	46
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>49</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>51</b>
<b>8</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>63</b>
<b>9</b>	<b>Appendix</b> .....	<b>66</b>
9.1	Abkürzungen .....	66
9.2	Tiere.....	67
9.3	Primäre Antikörper .....	67
9.4	Sekundäre Antikörper .....	68
9.5	Verwendete Chemikalien und Materialien.....	68
9.6	Geräteverzeichnis.....	69
9.7	Verwendete Lösungen.....	70

## **Zielsetzung**

In der vorliegenden Arbeit soll die Lokalisation von Natriumkanälen und deren Untereinheiten in Kardiomyozyten am Beispiel der neonatalen Ratte untersucht werden. Dies dient dem weiteren Verständnis der Physiologie spannungsabhängiger Natriumkanäle mit der Prämisse, Erkrankungen, die auf Defekte in diesem System zurückzuführen sind, besser zu erkennen.

# **1 Einleitung**

## **1.1 Grundzüge der Anatomie und Physiologie einer Herzmuskelzelle**

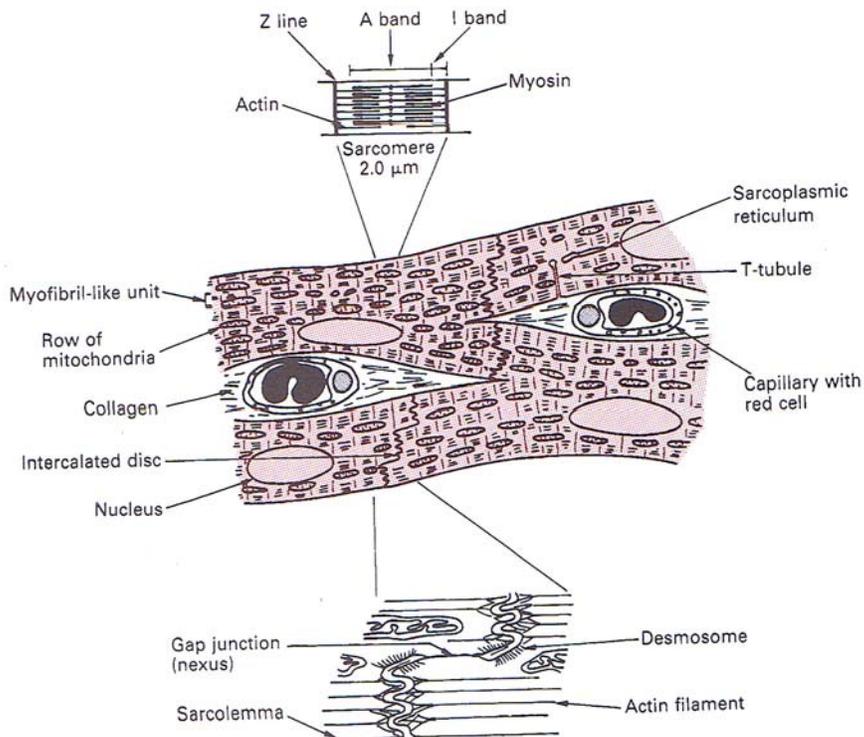
Herzmuskelzellen sind spezialisierte, quergestreifte Muskelzellen. In ihrer Gesamtheit sind sie Hauptbestandteil des Herzens und erhalten über fortwährende, gleichmäßige Kontraktionen den Kreislauf in einem lebenden Organismus aufrecht.

Mikroskopisch betrachtet sind Herzmuskelzellen ca. 50 bis 100  $\mu\text{m}$  lang und bilden durch ihre interzelluläre Verzahnung ein funktionelles Synzytium. Diese Vernetzung wird durch die Glanzstreifen (engl. intercalated disc; lat. Disci intercalares) ermöglicht. Diese bestehen zum einen aus Desmosomenkontakten und sorgen so für mechanische Festigkeit, zum anderen sind sie wegen der enthaltenen Gap Junctions auch von entscheidender Bedeutung für die Erregungsübertragung von Zelle zu Zelle.

Ein Kardiomyozyt ist dicht gepackt mit Myofibrillen, die als kleinere Einheit wiederum aus vielen Sarkomeren bestehen (siehe Abb. 1). Ein Sarkomer ist definitionsgemäß die kleinste kontraktile Einheit und zwischen 1,8 und 2  $\mu\text{m}$  lang. Die parallele Anordnung der Sarkomere sorgt für die typische Querstreifung des Herzmuskelgewebes unter dem Lichtmikroskop. Außerdem lassen sich helle und dunkle Bänder erkennen. Das wird durch Aktin- und Myosin-Filamente hervorgerufen. Diese beiden Strukturproteine ermöglichen durch einen ATP-verbrauchenden Prozess die Kontraktion des Muskels. Weiterhin lässt sich unter dem Mikroskop die Begrenzung des Sarkomers durch Z-Linien erkennen. Die Z-Linien sorgen für Festigkeit und verankern die Aktinfilamente der Sarkomere (Squire, 1975).

Die Zellmembran einer Herzmuskelzelle, auch Sarkolemm genannt, bildet durch Einstülpungen das t-tubuläre System. Es handelt sich dabei um ein System von eingeschlagenen Membranen, senkrecht zu den Z-Linien verlaufend. Im Falle eines ankommenden Stimulus gewährleistet es so eine schnelle und gleichmäßige Weitergabe des Aktionspotenzials zu den Myofibrillen.

Innerhalb der Herzmuskelzelle befindet sich ein zweites tubuläres System, das Sarkoplasmatische Retikulum. Entwickelt aus dem endoplasmatischen Retikulum eukaryonter Zellen, welches dort metabolische Aufgaben hat, enthält es in Muskelzellen eine hohe Konzentration von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, die nach Initiation durch ein Aktionspotenzial freigesetzt werden. Das Sarkoplasmatische Retikulum stellt somit als  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen-Speicher die für die Muskelkontraktion erforderlichen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen zur Verfügung. Mit dieser Vermittlerfunktion ist das Sarkoplasmatische Retikulum von entscheidender Bedeutung für die elektromechanische Kopplung.



**Abb. 1: Darstellung von vernetztem Herzmuskelgewebe. Deutlich erkennbar sind die Disci intercalares zur Erregungsübertragung (aus Levick, 2000).**

## 1.2 Besonderheiten einer neonatalen Herzmuskelzelle

Nach abgeschlossener Embryonalreifeung durchlaufen Kardiomyozyten weitere morphologische und physiologische Veränderungen, obwohl sie sich zu diesem Zeitpunkt schon in einem postmitotischen, terminal differenzierten Zustand befindet.

So endet direkt nach Geburt die Hyperplasie der Zelle und geht in eine Hypertrophie und Maturation über (Claycomb, 1976). Während dieser Maturation kommt es zur Entwicklung des t-tubulären Systems, das zu Beginn nur spärlich ausgebildet ist (Chen et al., 1995; Haddock et al., 1999). Eine zunehmende Vernetzung der Kardiomyozyten untereinander durch den Einbau von Gap Junctions ist ebenso Teil dieser Entwicklung.

Die Anzahl der spannungsabhängigen Ionenkanäle steigt während der Entwicklung zum Erwachsenenalter. Nach neueren Untersuchungen wird dies für Natriumkanäle stark positiv durch  $\beta$ -Adrenergika beeinflusst (de Boer et al., 2007). Durch eine Zunahme von Kaliumkanälen kommt es zu einer Verkürzung der Aktionspotenzialdauer (Grandy et al., 2007). Außerdem wird die Depolarisationsgeschwindigkeit eines Aktionspotenzials durch eine Zunahme von spannungsabhängigen Natriumkanälen erhöht. Insgesamt führt das zu einer physiologischen Verlangsamung des Herzrhythmus, da durch die schnellere Depolarisation die Überleitungsgeschwindigkeit von Zelle zu Zelle steigt und effektiver synchronisiert wird. Die Ökonomie des Herzens wird somit optimiert (de Boer et al., 2007).

### **1.3 Zelluläre Strukturelemente in Herzmuskelzellen**

Da die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente zumeist Doppelfärbungen mit Markerproteinen beinhalten, wird an dieser Stelle auf zwei entscheidende Strukturproteine von Herzmuskelzellen eingegangen.

$\alpha$ -Actinin ist ein Zellprotein, das eine hohe Affinität zu Aktin aufweist und dieses bindet. Es findet sich in Herzmuskelzellen in den Z-Streifen und innerhalb der Aktinfilamente der Muskelsarkomere und ist eng mit den t-Tubuli assoziiert (Lazarides et al., 1975; Goncharova et al., 1992).

Weitere wichtige Strukturproteine in Herzmuskelzellen sind Connexine. Diese homologen Proteine bilden in ihrer Gesamtheit in Form eines Hexamers so genannte Gap Junctions. Im Herzmuskelgewebe sind sie mitverantwortlich für die Synchronisation der Erregungsübertragung.

Connexin 43 gehört zu der Subfamilie des Alpha-Typs (II. Gruppe) und ist das Hauptprotein der kardialen Gap Junctions (van Veen et al., 2006; Traub et al., 1994).

#### **1.4 Das Aktionspotenzial**

Vorraussetzung für die Entstehung eines Aktionspotenzials in einer erregbaren Zelle ist das Vorhandensein eines Ruhemembranpotenzials von -50 bis -100 mV. Verantwortlich dafür ist die  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase, die intrazellulär eine hohe  $\text{K}^+$ -Konzentration schafft und gleichzeitig aktiv  $\text{Na}^+$ -Ionen nach außen pumpt. Dadurch wird entlang der Zellmembran ein Gradient aufgebaut.

Ein Aktionspotenzial besteht aus drei Phasen. Einen ankommender Reiz (z.B. durch Öffnen von postsynaptischen Kationenkanälen durch Neurotransmitter) bewirkt eine langsame Veränderung des Membranpotenzials. Dies bezeichnet man als Vordepolarisation. Nach Überschreiten eines Schwellenpotenzials kommt es zur Depolarisation (1. Phase). Dies wird durch spannungsabhängige Natriumkanäle initiiert. Sie leiten die schnelle Aufstrichphase eines Aktionspotenzials nach dem Alles- oder Nichts-Prinzip ein. Dabei werden kurzzeitig sogar positive Werte erreicht („Overshoot“, siehe Abb. 2).

Da Natriumkanäle nach kürzester Zeit wieder inaktiv sind (ca. 0,1 ms), folgt nun eine Potenzialumkehr, die die Repolarisation (2. Phase) einleitet. Dies wird durch eine potenzialgesteuerte Öffnung von Kaliumkanälen ermöglicht, die ein Annähern an das Ruhemembranpotenzial vorantreibt.

Da die Kaliumleitfähigkeit nach Erreichen des Ruhemembranpotenzials immer noch erhöht ist, kann kurzzeitig noch eine Nachhyperpolarisation (3. Phase) auftreten (Silbernagl et al., 2001).

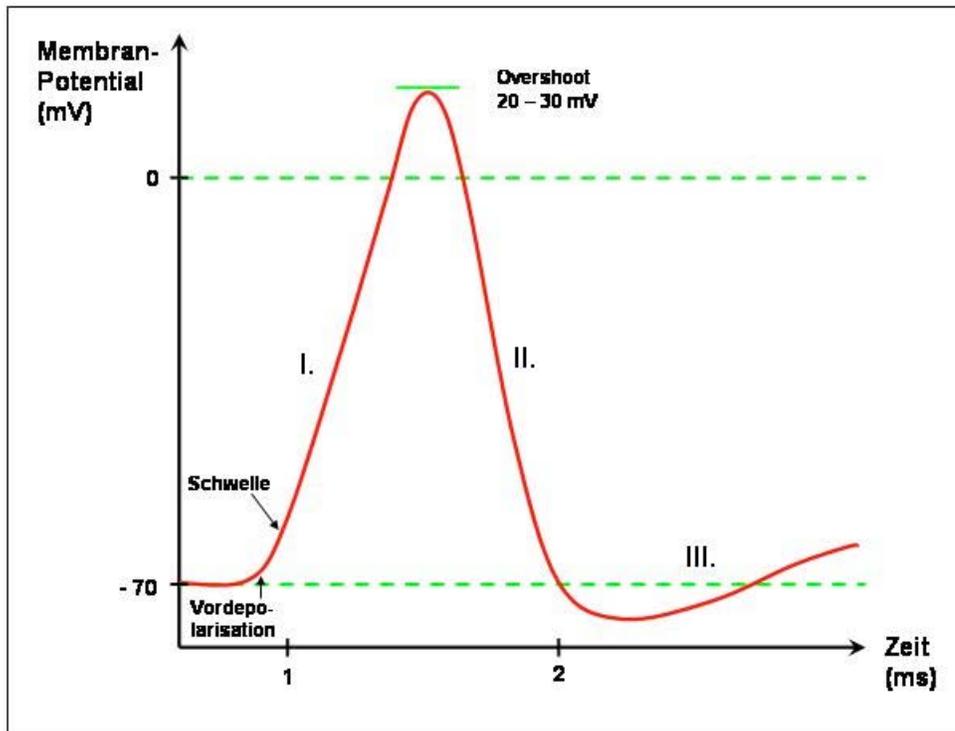
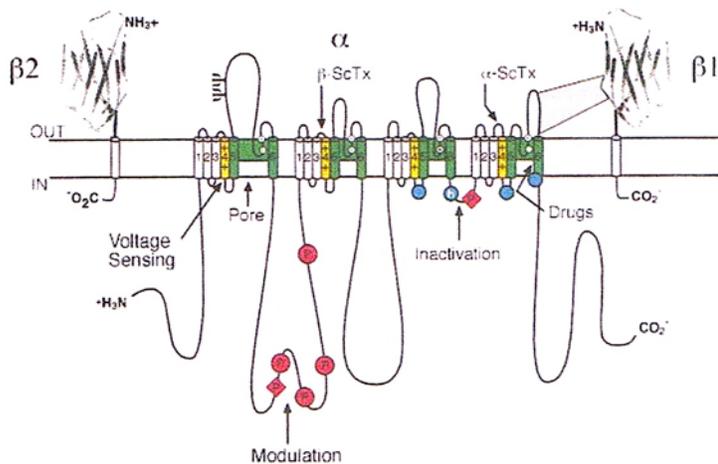


Abb. 2: Verlauf eines Aktionspotenzials mit Depolarisation (I.), Repolarisation (II.) und anschließender Nachhyperpolarisation (III.) (modifiziert nach Silbernagl et al., 2001)

Eine Sonderstellung nimmt das Aktionspotenzial der Herzmuskelzelle ein. Es weist eine Plateauphase auf, verursacht durch den Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen.

### 1.5 Struktur spannungsabhängiger Natriumkanäle

Natriumkanäle bestehen aus einer 260 kDa großen, porenbildenden  $\alpha$ -Untereinheit und bis zu zwei zusätzlichen, nicht porenbildenden 33 bis 36 kDa großen  $\beta$ -Untereinheiten (Catterall, 2000).



**Abb. 3:** Darstellung der molekularen Struktur einer  $\alpha$ -Untereinheit  $\text{Na}_v1.2$  mit zwei  $\beta$ -Untereinheiten  $\beta1$  und  $\beta2$ . Die vier Domänen mit den jeweils sechs Segmenten befinden sich intrazellulär und weisen die Porenöffnung zwischen den Segmenten S5 und S6 auf. Innerhalb des Segments S4 befindet sich der Spannungssensor. Intra- und extrazellulär liegende Proteinschleifen sind Angriffspunkte für verschiedene Gifte und dienen der Natriumkanalmodulation (modifiziert nach Yu et al., 2003).

### 1.5.1 $\alpha$ -Untereinheit

Bisher konnten zehn Gene entschlüsselt werden, die die  $\alpha$ -Untereinheit kodieren. Davon wurden wiederum neun Gene auch funktionell exprimiert (Goldin et al., 2000).

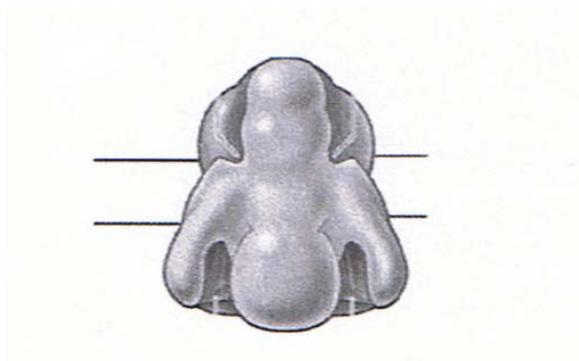
Anhand der am Modell errechneten Aminosäuresequenz kann man darauf schließen, dass die  $\alpha$ -Untereinheit aus vier homologen Domänen besteht (DI bis DIV). Diese wiederum durchspannen die Zellmembran mit jeweils sechs  $\alpha$ -helicalen Segmenten (S1 bis S6).

Eine Aminosäureschleife („Loop“) zwischen S5 und S6 bildet die äußere Öffnung der Pore. Lange, extrazelluläre und intrazelluläre Loops, die in den einzelnen  $\alpha$ -helicalen Segmenten zu finden sind, verankern die Porenöffnung zwischen S5 und S6 in der Zellmembran. Größtenteils negativ geladene Aminosäuren in einem Loop zwischen den Segmenten S3 und S4 in allen Domänen formen vermutlich den

äußeren und inneren Ring der Pore und fungieren als Selektivitätsfilter für Ionen (Catterall, 2000).

Ein Spannungssensor an jeder Domäne sorgt für das Öffnen und Schließen der Natriumkanäle. Dieser Sensor besteht aus positiv geladenen Aminosäuren an jeder dritten Position im Intervall und befindet sich im S4-Segment in einer transmembranen Position (Cestèle et al., 2006). Als Antwort auf eine Depolarisation sorgt der Spannungssensor dafür, dass so genannte „gating charges“ des S4-Segmentes entsprechend des elektrischen Feldes nach außen transportiert werden. Dies führt zu einer Konformationsänderung, die wiederum den Kanal für Natriumionen öffnet (Catterall, 2000).

Bisherige Forschungsergebnisse bezüglich der dreidimensionalen Struktur des Natriumkanals legen nahe, dass das Aussehen dieses Proteins einer Glocke ähnelt. Die vier homologen Domänen sind symmetrisch um die flüssigkeitsgefüllte Pore angeordnet. Die zentrale Pore ist nicht direkt intra- und extrazellulär endend, sondern teilt sich dort jeweils in vier kleinere Öffnungen auf (Sato et al., 2001; Catterall, 2001).



**Abb. 4: Dreidimensionale Struktur der Natriumkanal- $\alpha$ -Untereinheit. Schematische Darstellung einer elektronen-mikroskopischen Aufnahme. In der Mitte ersichtlich die zentrale Pore mit den Öffnungen nach intra- und extrazellulär. Symmetrische Anordnung der vier Domänen um die zentrale Pore. (Sato et al., 2001; modifiziert von Yu et al., 2003).**

Die einzelnen  $\alpha$ -Natriumkanalisoformen weisen unterschiedliche Lokalisationsmuster in Geweben von Säugetieren auf.

So werden  $Na_v1.1$ ,  $Na_v1.2$ ,  $Na_v1.3$ ,  $Na_v1.6$  als neuronale Natriumkanaluntereinheiten bezeichnet, da sie primär im Nervensystem vorkommen. Hingegen wird  $Na_v1.5$  als kardiale Isoform angesehen, da sie primär im Herzen vorkommt.  $Na_v1.4$  ist die primäre Isoform des Skelettmuskels, während  $Na_v1.7$ ,  $Na_v1.8$  und  $Na_v1.9$  in Spinalganglien zu finden sind (Catterall et al., 2005; Schaller et al., 2003; Fozzard et al., 1996).

Diese Unterscheidung in neuronale und kardiale Natriumkanaluntereinheiten lässt sich durch pharmakologische Eigenschaften unterstreichen. Das Gift des Kugelfisches („*Tetraodontidae*“ - Familie der Vierzähner), Tetrodotoxin (TTX), ist ein potenter Natriumkanalblocker. Die neuronalen Untereinheiten ( $Na_v1.1$ ,  $Na_v1.2$ ,  $Na_v1.3$  und  $Na_v1.6$ ), aber auch  $Na_v1.4$  reagieren sensibel auf TTX und werden mit Konzentrationen im Nanomolarbereich blockiert. Dagegen wird  $Na_v1.5$  erst durch eine tausendfach höhere Konzentration von TTX blockiert (Catterall et al., 2005).

### 1.5.2 $\beta$ -Untereinheiten

Aktuell sind vier verschiedene  $\beta$ -Untereinheiten von spannungsabhängigen Natriumkanälen bekannt.

$\beta1$  und  $\beta3$  sind relativ ähnlich in ihrer Aminosäurestruktur und sind nicht kovalent mit der  $\alpha$ -Untereinheit verbunden. Auch  $\beta2$  und  $\beta4$  ähneln sich in ihrer Sequenz, besitzen jedoch Disulfidbrücken zu den korrespondierenden  $\alpha$ -Untereinheiten (Maier et al., 2004).

In Säugetieren konnten alle bisher bekannten  $\beta$ -Untereinheiten in unterschiedlichen Geweben nachgewiesen werden, insbesondere im Herzen, im Gehirn und im Skelettmuskel (Maktia et al., 1992; Isom,

zen, im Gehirn und im Skelettmuskel (Maktia et al., 1992; Isom, 1992; Dhar Malhotra et al., 2001; Fahmi et al., 2001; Isom et al., 1995; Grosson et al., 1996; Yu et al., 2003; Maier et al., 2004).

Die Funktion der assoziierten  $\beta$ -Untereinheiten ist noch nicht abschliessend geklärt. Als bekannt gilt bisher, dass sie als Kanalmodulatoren wirken, mit dem Extrazellularraum agieren, Zellen miteinander verbinden, Funktionen als Zelladhäsionsmoleküle aufweisen und mit dem Zytoskelett der Zelle interagieren (Isom, 2001; Isom, 2002).

Im Herzen moduliert die  $\beta$ 1-Untereinheit den Ionenstrom durch den Natriumkanal, während die  $\beta$ 2-Untereinheit vermutlich nur Zelladhäsionsaufgaben erfüllt (Dhar Malhotra et al., 2001).

## **1.6 Lokalisation und Verteilungsmuster der Isoformen**

In Herzmuskelzellen von Mäusen konnten isoformenspezifische Verteilungsmuster für  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten von spannungsabhängigen Natriumkanälen gefunden werden (Maier et al., 2002; Maier et al., 2004).

Darin zeigte die primäre kardiale Isoform  $\text{Na}_v1.5$  in Gewebeschnitten und in Zellkultur eine deutliche Anhäufung an den Disci intercalares. Die neuronalen Isoformen  $\text{Na}_v1.1$ ,  $\text{Na}_v1.3$  und  $\text{Na}_v1.6$  konnten entlang des t-tubulären Systems des Herzmuskels beobachtet werden.  $\text{Na}_v1.2$  konnte nicht nachgewiesen werden.

Ein ähnliches Bild ergaben immunzytochemische Untersuchungen von  $\beta$ -Untereinheiten. Auch hier fand sich ein isoformenspezifisches Verteilungsmuster. So konnten  $\beta$ 1 und  $\beta$ 3 vorwiegend im t-tubulären System detektiert werden, während  $\beta$ 2 und  $\beta$ 4 an den Disci intercalares gehäuft auftraten (Maier et al., 2002; Maier et al., 2004).

Eine neuere Arbeit von Haufe et al. (2005) konnte diese zuvor genannten Ergebnisse weniger deutlich widerspiegeln. Konfokale Immunofluoreszenzmikroskopie zeigte die Präsenz von  $\text{Na}_v1.1$  und  $\text{Na}_v1.2$  sowohl an den t-Tubuli als auch an den Disci intercalares, während  $\text{Na}_v1.3$  intrazellulär diffus verteilt war. Die Isoform  $\text{Na}_v1.6$  wurde vorwiegend an den Z-Linien detektiert.

## **1.7 Natriumkanalmutationen**

Spezifische Mutationen im Genom verursachen schwere Funktionsstörungen von spannungsabhängigen Natriumkanälen. Das Ergebnis ist eine veränderte Erregungsbildung und Ausbreitung.

So führen Veränderungen der Natriumkanalexpression von  $\text{Na}_v1.1$  und/oder  $\beta1$  zu generalisierter Epilepsie mit oder ohne Fieber (Wallace et al., 1998; Wallace et al., 2001).

Andere Mutationen von  $\text{Na}_v1.1$  können auch schon im Kindesalter Myoklonien zum Vorschein bringen (Claes et al., 2001).

Am Herzen werden Mutationen an  $\text{Na}_v1.5$  und  $\beta4$  als Ursache für das Brugada-Syndrom mitverantwortlich gemacht (Makita et al., 2001). Diese Erkrankung ist durch ST-Segmenterhöhungen in den rechtsprä-kordialen EKG-Ableitungen charakterisiert und kann durch Kammerflimmern zu plötzlichem Herztod führen. Aktuelle genetische Untersuchungen sehen außerdem Mutationen der  $\beta1$ -Untereinheit von spannungsabhängigen Natriumkanälen im Herzen als Mitursache für das Brugada-Syndrom an (Watanabe et al., 2008).

Aber auch andere Erkrankungen, die sich durch Herzrhythmusstörungen auszeichnen, wie das Long-QT-Syndrom (Bennett et al., 1995) oder das Sick-Sinus-Syndrom (Benson et al., 2003) basieren zum Teil auf Natriumkanalmutationen.

Selbst Erkrankungen, bei denen es zu Erregungsleitungsstörungen, ventrikulären Arrhythmien und einer dilatativen Kardiomyopathie kommt, können auf Mutationen in den Aminosäuresequenzen der spannungsabhängigen Natriumkanäle zurückgeführt werden (McNair et al., 2004).

Aktuelle Forschungsergebnisse machen Mutationen der Natriumkanalisform  $Na_v1.7$  (SCN9A) für ein seltenes, vererbbares Schmerzsyndrom, dem „Paroxysmal extreme pain disorder“ (PEPD) verantwortlich (Fertleman et al., 2006). Hierbei handelt es sich um eine Erkrankung, die mit Schmerzen im Rektalbereich, dem Orbitalbereich und in submandibulärer Lokalisation einhergeht. Als Ursache dafür werden Inaktivationsprobleme des Natriumkanals diskutiert.

## **1.8 Pharmakologie**

Spannungsabhängige Natriumkanäle sind sowohl im Gehirn als auch im Herzen Angriffsort für medikamentöse Therapien und für diverse Gifte.

Mindestens sechs verschiedene Bindungsstellen für Neurotoxine und mindestens eine für Lokalanästhetika und Antiarrhythmika sind bereits bekannt (Cestèle et al., 2000). Diese unterschiedlichen Substanzen binden entweder extrazellulär, intrazellulär oder direkt innerhalb der Porenöffnung und modulieren damit die Natriumkanalöffnung. Dies führt beispielsweise zu Zuständen verminderter Inaktivierung (z.B.  $\alpha$ -Scorpiontoxin oder  $\delta$ -Conotoxin) oder verstärkter Aktivierung (z.B.  $\beta$ -Scorpiontoxin).

Eine gänzliche Blockade der Natriumionenleitfähigkeit ist beispielsweise durch das schon oben genannte Tetrodotoxin möglich (Catterall et al., 2005; Cestèle et al., 2000).

## **2 Fragestellung**

Die Expression und Verteilung von spannungsabhängigen Natriumkanälen im Herzen von neonatalen Säugetieren ist nicht abschließend geklärt.

Frühere Arbeiten am Herzen von neonatalen Mäusen und Ratten (Haufe et al., 2005; de Boer et al., 2007) weisen darauf hin, dass Herzmuskelzellen Veränderungen in quantitativer und qualitativer Expression von Natriumkanälen durchlaufen. Dies hat Auswirkungen auf die Erregungsbildung und -leitung im Herzen.

Diese Arbeit soll am Beispiel der neonatalen Ratte (*Rattus norvegicus domesticus*) aufzeigen, welche Lokalisationsmuster für Natriumkanalisoformen vorliegen.

### **3 Methoden**

Alle im Methodenteil verwendeten Chemikalien, Geräte und Materialien sowie die Zusammensetzung der Lösungen und Puffer sind im Appendix aufgelistet.

#### **3.1 Isolation und Kultivierung neonataler Kardiomyozyten**

##### 3.1.1 Präparation

Durch die beschriebene Methodik wurden sterile Kardiomyozyten gewonnen. Da diese für einige Tage in Kultur gebracht wurden, war ein keimfreies Arbeiten und die Benutzung der Sterilbank eine dringende Voraussetzung.

Die Präparation erfolgte nach Simpson et al. (1982) mit geringfügigen Modifikationen:

Für diesen Versuch wurden ca. 48 Stunden alte, neonatale Wistar-Ratten verwendet.

Unter der Sterilbank erfolgten die Dekapitation und eine mediane Längsternotomie des Thorax. Die präparierten Herzen wurden in einer Petrischale mit 10 mL CBFHH und Heparin aufgefangen. Die Vorhöfe wurden in Höhe des Sulcus atrioventricularis abgetrennt und verworfen.

Um eine ausreichend große Dichte der Kardiomyozyten zu erreichen, wurde eine Mindestanzahl von 20 neonatalen Rattenherzen verwendet.

Die präparierten Herzen wurden mit dem Skalpell zerkleinert und anschließend unter Zugabe von 15 mL CBFHH, Trypsin und DNase in einem Falcon Tube mit einem Rührfisch bei niedriger Geschwindigkeit

(30 rpm) gerührt. Zusätzliches Auf- und Abpipettieren beschleunigte die Auflösung von Faser- und Zellverbänden.

Nach 20 Minuten wurde der Verdauvorgang beendet und nach kurzem Warten der Überstand verworfen.

Dies wurde mehrfach wiederholt, allerdings mit einem auf fünf Minuten verkürzten Verdauintervall, wobei nun der Überstand nicht verworfen wurde. Eine mikroskopische Kontrolle eines Tropfens des Überstandes gab Auskunft über die Präsenz von vitalen Kardiomyozyten. Bei einem positiven Nachweis wurde der Überstand in ein neues Falcon Tube übertragen und mit FCS versetzt, das das enthaltene Verdauungsenzym inaktiviert. Auf ein Volumen von 7,5 mL FCS wurden vier Überstände pipettiert.

Diese Arbeitsschritte wurden solange wiederholt, bis etwa vier Falcon Tubes gefüllt waren und der Kardiomyozytennachweis unter dem Mikroskop negativ ausfiel.

Die gewonnene Lösung mit den Kardiomyozyten wurde in den Falcon Tubes über fünf Minuten bei 1600 U (700 g) und RT zentrifugiert. Die Pellets aus den Falcon Tubes wurden zusammengeführt und in MEM/5 resuspendiert.

### 3.1.2 Preplating

Die entstandene Zellsuspension wurde zuerst durch einen Cellstrainer (35 µm) gespült, um größere Gewebsreste herauszufiltern. Nach dem Ausplattieren auf eine Petrischale (10 cm Durchmesser) folgte die erste Inkubation von 90 Minuten bei 37 °C und 1 % CO<sub>2</sub>.

Der Schritt der Preplatings diente dazu, Nicht-Kardiomyozyten, wie beispielsweise Fibroblasten von den Kardiomyozyten weiter zu selektieren. Durch ein deutlich schnelleres Anheften der Fibroblasten am

Boden der Kulturschale (10 cm Durchmesser) blieben diese beim folgenden Abpipettieren auf der Petrischale (10 cm Durchmesser ) zurück.

### 3.1.3 Plating

Im sich anschließenden Plating wurden die Zellen wieder mit 5 mL MEM/5 in Falcon Tubes überführt, um die Dichte der Zellen mithilfe einer Fuchs-Rosenthalkammer zu bestimmen.

Dazu wurden 50  $\mu$ L der Zellsuspension zusammen mit 50  $\mu$ L Trypan-Blau und 400  $\mu$ L PBS in einem Eppendorf-Röhrchen gemischt und unter dem Mikroskop ausgewertet. Das Ergebnis entsprach der Gesamtzellzahl pro mL Lösung.

Um eine ausreichend hohe Dichte an Kardiomyozyten zu erhalten, sollten ca. 5 Mio. Zellen pro 10 cm Petrischale mit MEM/5 auf 6 mL Endvolumen ausplattiert werden. Der Nicht-Kardiomyozytenanteil bei diesem Verfahren liegt bei ca. 4 bis 7 % (Burkard et al., 2005).

## 3.2 Zellkultur

Die entstandenen Zellkulturen frischer, neonataler Kardiomyozyten wurden für zwei Tage bei 37 °C und 1 % CO<sub>2</sub> in Kultur gehalten. Dazu war es notwendig, am ersten Tag in-vitro das Medium zu wechseln, indem die Zellen erneut mit PBS gewaschen und mit MEM/5 aufgefüllt wurden. Um Sterilität zu wahren, fanden diese Arbeitsschritte ausschließlich unter der Sterilbank statt.

Abschließend wurden die Zellen ein letztes Mal im Brutschrank bei 37 °C und 1 % CO<sub>2</sub> über Nacht inkubiert. Damit die Kardiomyozyten auch direkt unter dem Mikroskop betrachtet werden konnten, wurden sie am zweiten Tag in speziellen gekammerten Objektträgern (Chamberslides, siehe Anhang) ausplattiert. Die Zelldichte in den

berslides, siehe Anhang) ausplattiert. Die Zelldichte in den Chamberslides sollte, wie oben beschrieben, ca. 1 Mio. Zellen pro Kammer betragen.

### **3.3 Immunofärbung der Zellen**

Nach 48 Stunden in Kultur wurden die Zellen gefärbt, um Rückschlüsse auf die Ultrastruktur der Zelle und die Lokalisation der Natriumkanaluntereinheiten unter dem Mikroskop ziehen zu können.

Nachdem das Medium verworfen, und die Zellen mit 0.1 M Phosphat-Puffer gespült wurden, folgte die Fixation mit 4 % Paraformaldehyd für 45 Minuten innerhalb der Chamberslides. Es schlossen sich mehrere Waschschriffe mit 0.1 M Phosphat-Puffer (1x), TB (3x) und TBS (3x) an, gefolgt von einer Inkubation mit 2 %iger Avidinlösung in 0.1 M TBS über 30 Minuten. Der Waschvorgang wurde durch dreimaliges Spülen mit 0.1 M TBS über je 10 Minuten abgeschlossen.

Nun folgte die Zugabe einer 2 %igen Biotinlösung in 0.1 M TBS über ebenfalls 30 Minuten.

Diese so genannten „blocking steps“ garantierten ein genaueres Färberegebnis, da sie unspezifisches, endogenes Biotin, Biotin-Rezeptoren oder Avidin-Bindungsstellen im zu färbenden Gewebe blockierten, bevor der eigentliche Färbeschriff erfolgte.

Nach erneuter Spülung der Zellen mit 0.1 M TBS über je 10 Minuten wurden dann die primären Antikörper (s.u.) in einer 0.1 M TBS Lösung, versehen mit 0.05 % Triton X und einem 1 % NGS in der jeweiligen Versuchskonzentration über Nacht auf den Zellen im Kühlschrank bei 4 °C inkubiert.

Triton X ermöglichte hierbei das Herauslösen bestimmter Proteine aus der Zellmembran ohne sie dabei zu zerstören (Helenius et al., 1975).

Die entstandenen „Lecks“ erlaubten den Antikörpern durch die Zellmembran zu penetrieren, um an den passenden Antigenen intrazellulär zu binden.

Die Dosierung und Verteilung der primären Antikörper (s.u.) wurde nach einem vorher festgelegten Schema auf die einzelnen Chamber-slides pipettiert. Dies bedeutete, dass in den jeweiligen Chamberslides die primären Natriumkanalantikörper in Konzentrationen von 1:50 und 1:100 inkubiert wurden. Dies erfolgte zumeist als Doppelfärbung mit dem primären Connexin 43 (stets 1:100) oder dem primären  $\alpha$ -Actinin (stets 1:1000).

Am nächsten Tag wurden die Zellen zu Beginn gründlich sechsmal mit 0.1 M TBS gespült.

Es folgte die Zugabe des sekundären Antikörpers, der mit einer Fluoreszenzsonde versehen war. Zuerst wurde Biotinylated Anti-Rab IgG 1:300, kombiniert mit Anti-Mouse Texas Red 1:100 für zwei Stunden bei RT inkubiert. Nach erneutem sechsfachen Spülen mit 0.1 M TBS wurde dann für zwei Stunden Avidin D Fluorescence 1:300, kombiniert mit Anti-Mouse Texas Red 1:100 auf die Zellen pipettiert.

Es folgten abschließende Spülvorgänge mit 0.1 M TBS, 0.1 M TB und dH<sub>2</sub>O.

Die fertig gestellten Färbungen mussten nun abschließend mit dem Vectashield-Kit luftdicht verschlossen werden.

### 3.4 Primäre Antikörper

- Na<sub>v</sub>1.1 Rabbit Polyclonal Anti-Brain Typ I, gerichtet gegen Aminosäurereste 465-481 des spannungsabhängigen Natriumkanals der Ratte  
(Protein Sequenz: FASEH SREPS AAGRL SD)
- Na<sub>v</sub>1.2 Rabbit Polyclonal Anti-Brain Typ II, gerichtet gegen intrazelluläre Aminosäurereste zwischen den homologen Domänen I und II (korrespondierende AS 467-485)  
(Protein Sequenz: KYASA ESRDF SGAGG IGVFS E)
- Na<sub>v</sub>1.3 Rabbit Polyclonal Anti-Brain Typ III, gerichtet gegen intrazelluläre Aminosäurereste zwischen den homologen Domänen I und II (korrespondierende AS 511-524)  
(Protein Sequenz: KYHLE GNHRA DGDRF P)
- Na<sub>v</sub>1.6 Rabbit Polyclonal Anti-Brain Typ VI, gerichtet gegen intrazelluläre Aminosäurereste zwischen den homologen Domänen I und II (korrespondierende AS 1042-1061)  
(Protein Sequenz: CIANH TGVDI HRNGD FQKNG)
- SH1 Rabbit Polyclonal Anti-Brain Typ V, gerichtet gegen intrazelluläre Aminosäurereste (korrespondierende AS 1122-1137)  
(Protein Sequenz: KTEPO APGCG ETPE DS)
- SH8 Rabbit Polyclonal Anti-Brain Typ V, gerichtet gegen intrazelluläre Aminosäurereste (aus patentrechtlichen Gründen ohne Darstellung der Proteinsequenz)
- SP19 Rabbit Monoclonal Anti-Sodium Channel, gerichtet gegen intrazelluläre Aminosäurereste zwischen den homologen Domänen III und VI (korrespondierende AS 1500-1518)  
(Protein Sequenz: TEEQK KYUNA MKKLG SKKC)

- β1 Rabbit Polyclonal Anti-Na<sub>v</sub> β1, gerichtet gegen intrazelluläre Aminosäurereste (korrespondierende AS 164-191)  
(Protein Sequenz: KKIAA ATEAA AQENA SEYLA ITSES KEN)
- β2 Rabbit Polyclonal Anti-Na<sub>v</sub> β2, gerichtet gegen intrazelluläre, C-terminale Aminosäurereste (korrespondierende AS 59-73)  
(Protein Sequenz: RRKKE QKLST DDLKT EEEGK TDGEG NAEDG AK)
- β3 Rabbit Polyclonal Anti-Na<sub>v</sub> β3, gerichtet gegen intrazelluläre, C-terminale Aminosäurereste  
(Protein Sequenz: KDFLI YEYRN GHQEV ESPFQ G)
- β4 Rabbit Polyclonal Anti-Na<sub>v</sub> β4, gerichtet gegen intrazelluläre Aminosäurereste (korrespondierende AS 51-67)  
(Protein Sequenz: EGTVK NEKNE KSDPK VDLKT)
- α-Act Mouse Monoclonal Anti-α-Actinin (Sarcomeric), gerichtet gegen α-Skelettmuskel Aktin und α-Herzmuskel Aktin
- Cx43 Mouse Monoclonal Anti-Connexin 43, gerichtet gegen Connexin 43 kDa (korrespondierende AS 252-270)  
(Protein Sequenz: GDLS PSKDC GSPKY AYFNG K)

### 3.5 Sekundäre Antikörper

Zur Visualisierung der antikörpermarkierten Natriumkanalisformen, bzw. der strukturellen Zellbestandteile α-Actinin und Connexin 43, wurden sekundäre, mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelte Antikörper verwendet.

Die Antikörper gegen die Natriumkanaluntereinheiten wurden in Kaninchen hergestellt, so dass zu deren Detektion ein Antikörper gegen diese Spezies verwendet wurde. Die Visualisierung ermöglichte hier das Avidin/Biotin-Prinzip mit einer Anregung durch die Wellenlänge 494 nm und einer Emission in der Wellenlänge 515 nm (sichtbare Färbung: Grün). Antikörper gegen Connexin 43 und  $\alpha$ -Actinin wurden durch Anti-Mouse Texas-Red erkannt. Dieser, mit Sulforhodamin 101 bestückte Antikörper wird durch die Wellenlänge 595 nm angeregt und hat eine Emissionswellenlänge von 615 nm, die rot wahrgenommen wird. Überlagern sich die beiden erwähnten Wellenlängen, wie z.B. bei Doppelfärbungen, entsteht eine gelbe Färbung.

### **3.6 Peptide Block**

Zum Nachweis der Spezifität der Antikörper wurden jeweils spezifische „blocking peptides“ verwendet. Bei den verwendeten, industriell hergestellten Antikörpern lagen diese als so genannte „control antigens“ bei. Da nicht alle verwendeten Antikörper industriell hergestellt sind, erfolgte die Verwendung der Peptide Blocks nur bei folgenden Antikörpern:  $\text{Na}_v1.1$ ,  $\text{Na}_v1.2$ ,  $\text{Na}_v1.3$ ,  $\text{Na}_v1.6$ , SP19 und  $\beta 2$ .

Nach der Auflösung des Peptide Block Pulver in PBS im Verhältnis 1:1 wurde es in den Färbeprozess der neonatalen Kardiomyozyten mit eingebunden. Dabei erfolgte die Inkubation des primären Natriumkanalisoformenantikörpers über Nacht zusammen mit dem korrespondierenden Peptide Block in derselben Verdünnung (1:100). Die vorausgehenden und folgenden Schritte entsprachen der Immunofärbung wie oben beschrieben.

### **3.7 Mikroskopieren**

Die Auswertung der Immunozytofärbungen der neonatalen Kardiomyozyten erfolgte an einem hochauflösenden Nikon Konfokal-Mikroskop (Nikon Eclipse E 600).

Die Anregung der sekundären Fluoreszenzantikörper (Avidin und Rhodamin, s.o.) erfolgte mit einem Argon-Laser der Wellenlänge 488 nm.

Zur korrekten Darstellung der unterschiedlichen Farbstoffe wurde ein FITC-Filter (EX 465 nm–495 nm; DM 505 nm; BA 515 nm–555 nm) und ein TRITC-Filter (EX 540 nm, 525 nm; DM 565 nm; BA 605 nm, 655 nm) verwendet. Ein potenzielles Überlappen der Emissionsspektren wurde mit sequenziellem Scannen verhindert.

Als Objektive kamen ein 10-, 20-, 60- und 100-faches Objektiv zum Einsatz (100-faches Objektiv mit Immersionsöl).

Die Bildverarbeitung erfolgte mit der Nikon EZ-C1 Software (Version 1.7). Dabei wurden die Einstellungen für die Lochblende („Pinhole“) und den Schwarzpegel („Black Level Setting“) nicht verändert, jedoch wurde individuell für jedes Bild die Laserstärke („gain“) variiert, um die Fluoreszenz besser darzustellen.

### **3.8 Herstellung des Gewebslysates aus neonatalen Rattenherzen**

Frisch entnommene neonatale Rattenherzen (Menge: 1 bis 2) wurden unter Zugabe von RIPA-Puffer und frischen Proteinaseinhibitoren homogenisiert und anschließend für zehn Minuten auf Eis gestellt. Das entstandene Lysat wurde unter Druck durch eine Einwegkanüle gepresst und dann erneut für 30 bis 60 Minuten auf Eis gestellt. Es folgte eine Zentrifugation bei 10000 g für 10 Minuten. Der gewonnene Über-

stand wurde als Zell-lysat in 1,5 mL Eppendorf-Röhrchen bis zur weiteren Verwendung bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

### **3.9 BioRad-Methode**

Zur Bestimmung des Proteingehaltes wurden ca.  $5\text{ }\mu\text{L}$  des hergestellten Zelllysates (s.o.) zu  $800\text{ }\mu\text{L}$  dest. Wasser mit  $200\text{ }\mu\text{L}$  Dye Reagent Concentrate von BioRad zugesetzt. Zur Messung gegen eine Leerprobe diente ein Spektrophotometer bei  $595\text{ nm}$ .

Der Proteingehalt der Probe ist proportional zu der Lichtmenge, die bei  $595\text{ nm}$  absorbiert wird. Das Messprinzip beruht auf der Bindung eines Farbstoffes (Coomassie Brilliant Blue) an das Protein (Bradford, 1976). Durch die Bindung verändert sich das Absorptionsspektrum des Farbstoffes von  $465\text{ nm}$  auf  $595\text{ nm}$ .

### **3.10 Western Blotting**

Zum Nachweis von Proteinen verwendet man das Western-Blot-Verfahren. Dabei werden Proteine nach ihrer Größe mit Hilfe einer Elektrophorese aufgetrennt. In einem nächsten Schritt werden sie auf eine Membran übertragen und dort mit Hilfe von Antikörpern nachgewiesen.

Ziel des hier durchgeführten Western-Blots war der Nachweis von Natriumkanaluntereinheiten mit einem Antikörper (SP19, korrespondierend zu den Aminosäureketten 1500-1580 in der Natriumkanaluntereinheit Nav1.2 von Ratten), der unselektiv die verschiedenen  $\alpha$ -Untereinheiten eines Natriumkanals erkennt. Als Probematerial wurde Gewebslysat verwendet, das nach der oben dargestellten Methode gewonnen wurde.

Mit der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (Laemmli, 1970) wurde das Auftrennen der Proteine ermöglicht.

Dazu wurde jeweils ein 5 %iges Sammelgel und ein 5 %iges Trenngel aus Polyacrylamid gegossen und für einen geradlinigen Abschluss mit Wasser überschichtet. Nach Abgießen des Wassers erfolgten das Zusammenfügen der beiden Gele und die Positionierung eines Gelkammes, der zur Aussparung für die Probenaschen diente.

Mit der BioRad-Methode wurde der Proteingehalt des Gewebslysates bestimmt (siehe BioRad-Methode).

Der Proteinextrakt wurde mit dem Laemmli-Probenpuffer im Verhältnis 1:1 (25 µg Laemmli und 25 µg Protein) gemischt und anschließend bei 95 °C für fünf Minuten aufgeköcht.

Nach kurzem Kühlen auf Eis folgte die Elektrophorese. Dabei wurde das Lysat auf das Gel geladen und für drei bis vier Stunden bei 80 V im Laufpuffer elektrophoretisch aufgetrennt. Als Proteinmolekulargewichtsstandard diente der Rainbow<sup>TM</sup>-Marker.

Zum Überführen der aufgetrennten Proteine auf die Membran wurde die Elektrotransfermethode nach Towbin verwendet (Towbin et al., 1979).

Gel und PVDF-Membran wurden dabei zuerst für 15 bis 20 Minuten im Transferpuffer äquilibriert. Dann wurde das Gel und die Membran zwischen zwei Whatman-Papiere und zwei Schwämme in die Klammer eingespannt und anschließend in die mit Transferpuffer gefüllte Tank-Blotting-Apparatur (BioRad) gesetzt. Über Nacht erfolgte nun der Transfer der Proteine auf die Membran bei ca. 100 mA.

Am nächsten Morgen wurde die mit den Proteinauftrennungen beladene Membran für 20 Minuten in 50 %igem Methanol äquibriert, um unspezifische Bindungen zu verhindern.

Anschließend wurde der Antikörper SP19, 1:500 verdünnt und in PBS/T über eine Stunde bei RT inkubiert.

Die folgende Inkubation des sekundären, Peroxidase-gekoppelten Antikörpers (Anti-Rabbit Ig Horseradish, Amershan) diente zur Visualisierung der Proteinbanden. Dieser sekundäre Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:5000 in PBS/T auf die Membran aufgetragen. Dabei war die Chemolumineszenzreaktion mit dem ECL-Kit (Amershan) entscheidend, die die Proteinbanden nach Expositionszeit (30 Sekunden bis fünf Minuten) auf Röntgenfilm sichtbar werden ließ.

## 4 Ergebnisse

Insgesamt wurden 229 immunozytochemisch gefärbte Slides unter konfokaler Mikroskopie ausgewertet. Zu jedem primären Antikörper wurden zwischen 28 und 80 Aufnahmen von einzelnen Kardiomyozyten oder Kardiomyozyten mit Zell-Zell-Kontakt analysiert. Insgesamt wurden ca. 1000 Aufnahmen erstellt.

### 4.1 Lokalisation von $\alpha$ -Natriumkanaluntereinheiten mittels des isoformenunspezifischer Antikörpers SP19

In den folgenden Bildern der Färbung neonataler Kardiomyozyten mit dem universellen, alle  $\alpha$ -Natriumkanaluntereinheiten erkennenden Antikörper SP19 sind besonders die prominenten Nuklei aufgefallen. Dies ist ein deutlicher Unterschied zu den anderen Natriumkanalisoformenfärbungen.

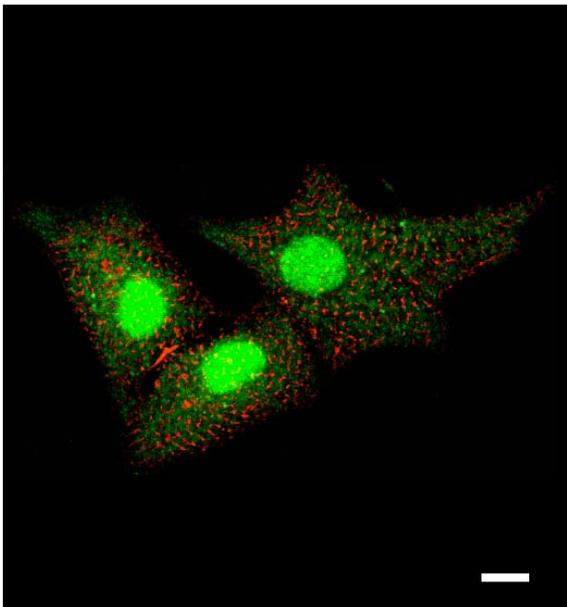


Abb. 5: neonatale Kardiomyozyten, Immunofärbung mit SP 19 (grün) und von  $\alpha$ -Actinin (rot), Messbalken 10  $\mu$ m

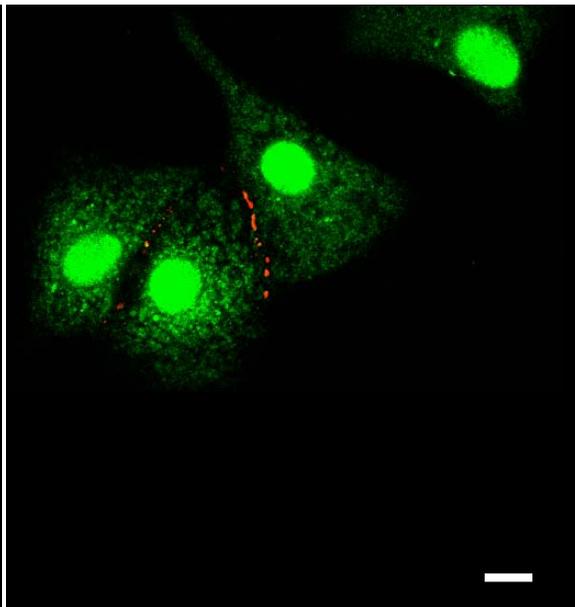


Abb. 6: neonatale Kardiomyozyten, Immunofärbung mit SP 19 (grün) und von Connexin 43 (rot), Messbalken 10  $\mu$ m

## **4.2 Lokalisation von $\alpha$ -Natriumkanaluntereinheiten mittels isoformenspezifischer Antikörper**

Alle untersuchten  $\alpha$ -Natriumkanaluntereinheiten konnten deutlich angefärbt und visualisiert werden.

In mehreren Untersuchungsreihen wurde jede  $\alpha$ -Natriumkanaluntereinheit sowohl mit  $\alpha$ -Actinin, als auch mit Connexin 43 dargestellt. Einzelfärbungen jeweiliger Natriumkanalisoformen sind ebenso angefertigt worden. Unterschiedliche Konzentrationen wurden unter dem Mikroskop miteinander verglichen, wobei die beste Bilddarstellung mit einer primären Antikörperkonzentration von 1:50 erzielt wurde.

Die zusätzliche Färbung von  $\alpha$ -Actinin identifizierte die Zellen in ihrem Aufbau eindeutig als Kardiomyozyten.

Neben der eigentlichen kardialen Isoform  $\text{Na}_v1.5$  konnten auch neuronale, TTX-sensitive Isoformen  $\text{Na}_v1.1$ ,  $\text{Na}_v1.3$  und  $\text{Na}_v1.6$  dargestellt werden. Erstmals gelang so auch die Detektion von  $\text{Na}_v1.2$  an neonatalen Kardiomyozyten.

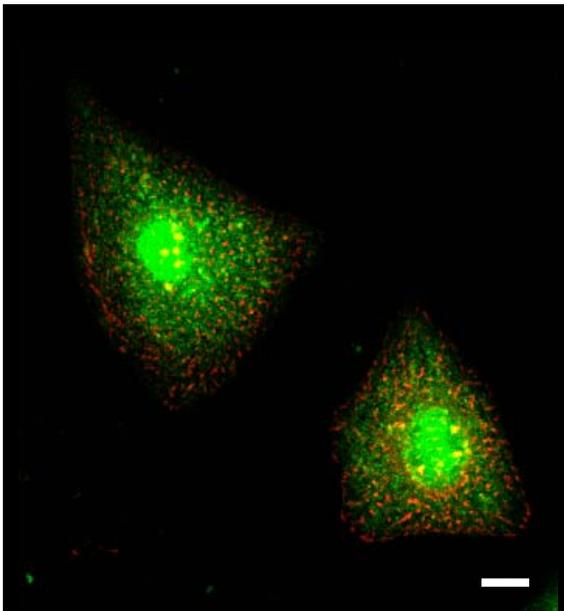
Im Gegensatz zu adulten Herzmuskelzellen konnte zu diesem untersuchten Entwicklungsstadium eine gleichmäßige Verteilung der  $\alpha$ -Natriumkanaluntereinheiten über die Zellmembran festgestellt werden (Maier et al., 2002; Maier et al., 2004).

Einige dargestellte Bilder von aneinanderliegenden und sich berührenden Zellen geben Anlass, über eine Anhäufung der Isoformen an den Disci intercalares zu spekulieren. Dies wird deutlich, wenn man die Lokalisation der dargestellten Connexine (Rot) mit der Lokalisation der einzelnen  $\alpha$ -Isoformen (Grün) vergleicht. Sind die Doppelfärbungen überlagert in einen Bild dargestellt, so erscheinen die Überlagerungen

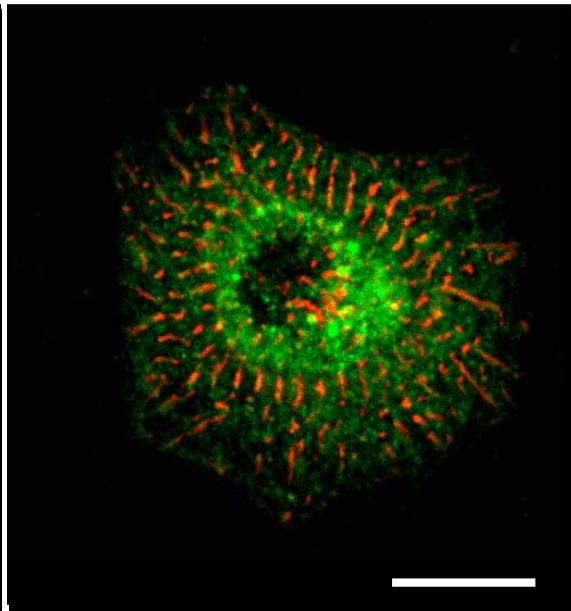
teilweise in gelber Farbe. Dies könnte auf eine Kolokalisation von Natriumkanälen zu Connexinen hindeuten.

SH1 und  $\text{Na}_v1.2$  wiesen eine besonders starke perinukleäre Anfärbung auf, während bei den anderen Natriumkanaluntereinheiten die Zellkerne eher ausgespart erschienen.

Im Folgenden sind der Reihenfolge nach, exemplarisch Bilder der Anfärbungen der  $\alpha$ -Natriumkanaluntereinheiten dargestellt.



**Abb. 7:** neonatale Kardiomyozyten, Immunofärbung von  $\text{Na}_v1.1$  (grün) und  $\alpha$ -Actinin (rot), Messbalken 10  $\mu\text{m}$



**Abb. 8:** neonatale Kardiomyozyte, Immunofärbung von  $\text{Na}_v1.1$  (grün) und  $\alpha$ -Actinin (rot), Messbalken 10  $\mu\text{m}$

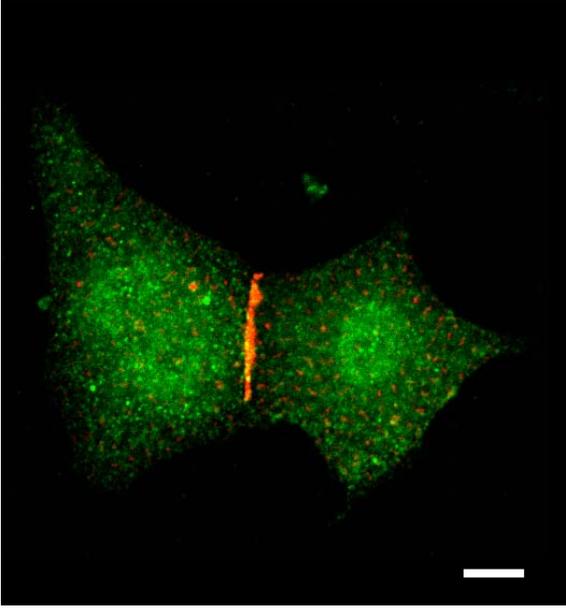


Abb. 9: neonatale Kardiomyozyten, Immunofärbung von Na<sub>v</sub>1.1 (grün) und Connexin 43 (rot), Messbalken 10 μm

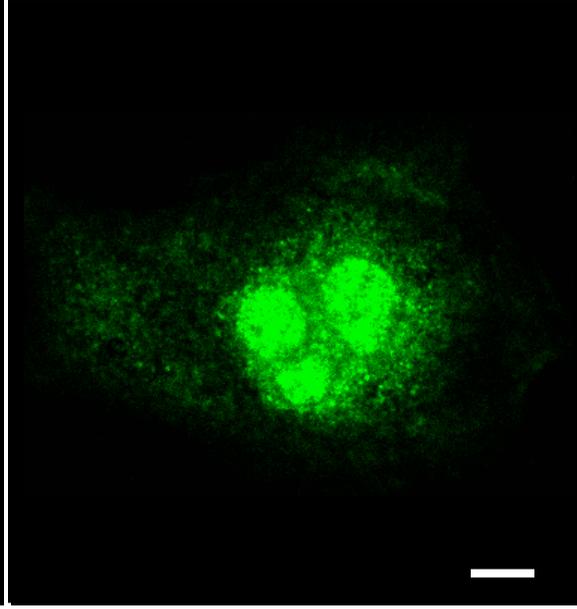


Abb. 10: neonatale Kardiomyozyte, Immunofärbung von Na<sub>v</sub>1.1 (grün), Messbalken 10 μm

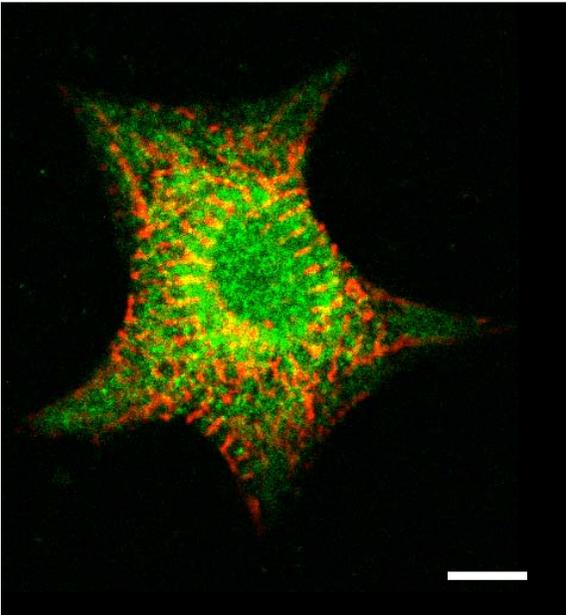


Abb. 11: neonatale Kardiomyozyte, Immunofärbung von Na<sub>v</sub>1.2 (grün) und α-Actinin (rot), Messbalken 10 μm

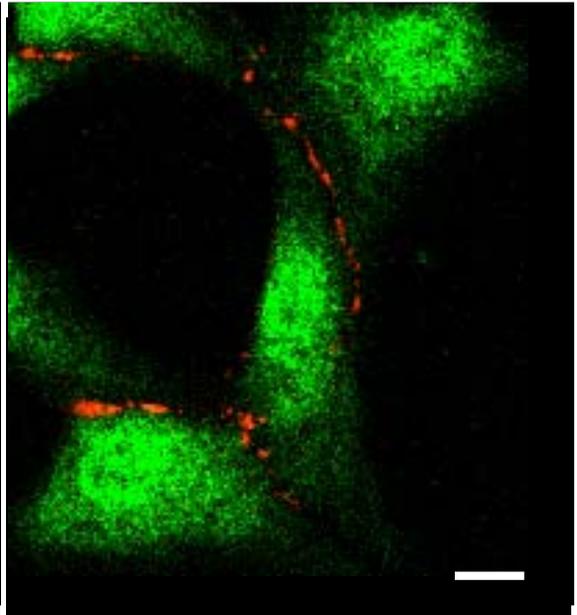
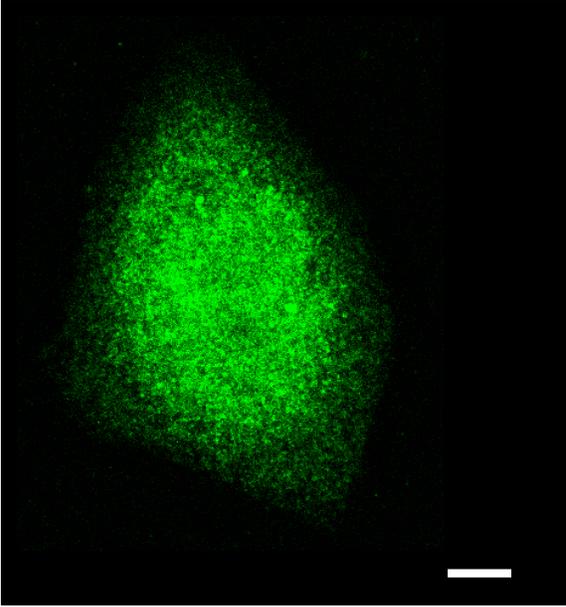
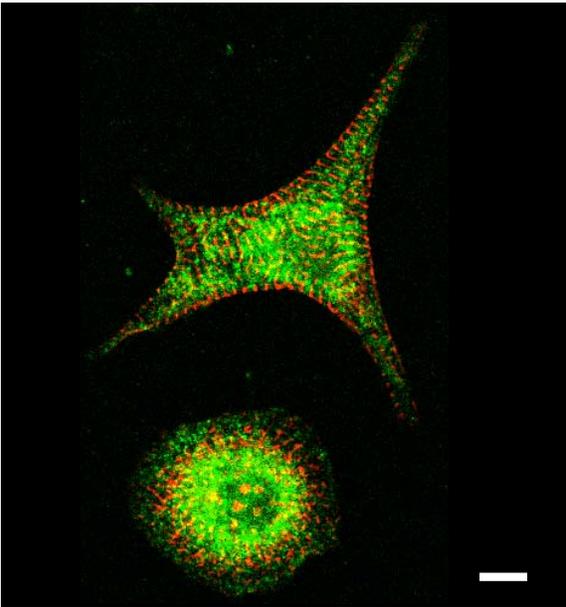


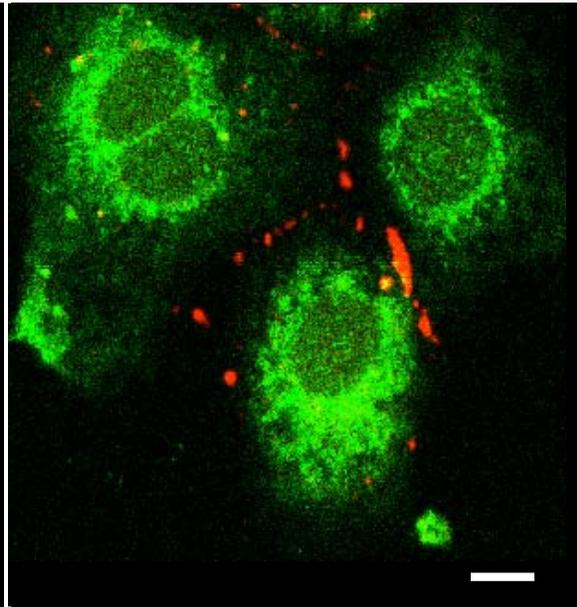
Abb. 12: neonatale Kardiomyozyten, Immunofärbung von Na<sub>v</sub>1.2 (grün) und Connexin 43 (rot), Messbalken 10 μm



**Abb. 13:** neonatale Kardiomyozyte, Immunofärbung von  $\text{Na}_v1.2$  (grün), Messbalken 10  $\mu\text{m}$



**Abb. 14:** neonatale Kardiomyozyten, Immunofärbung von  $\text{Na}_v1.3$  (grün) und  $\alpha$ -Actinin (rot), Messbalken 10  $\mu\text{m}$



**Abb. 15:** neonatale Kardiomyozyten, Immunofärbung von  $\text{Na}_v1.3$  (grün) und Connexin 43 (rot), Messbalken 10  $\mu\text{m}$

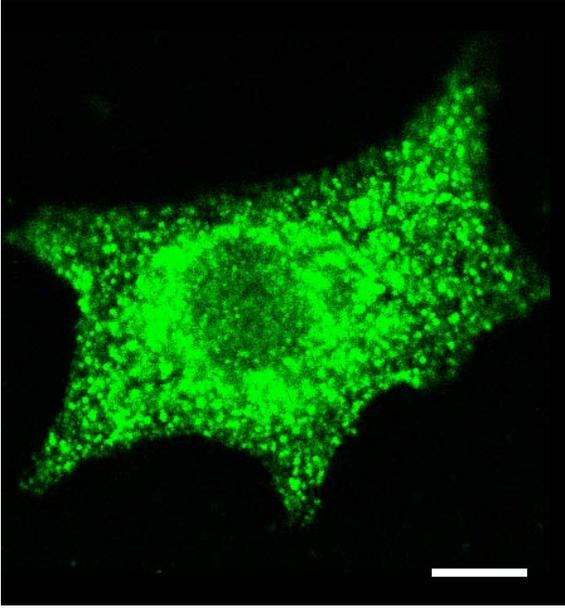


Abb. 16: neonatale Kardiomyozyte, Immunofärbung von  $Na_v1.3$  (grün), Messbalken 10  $\mu\text{m}$

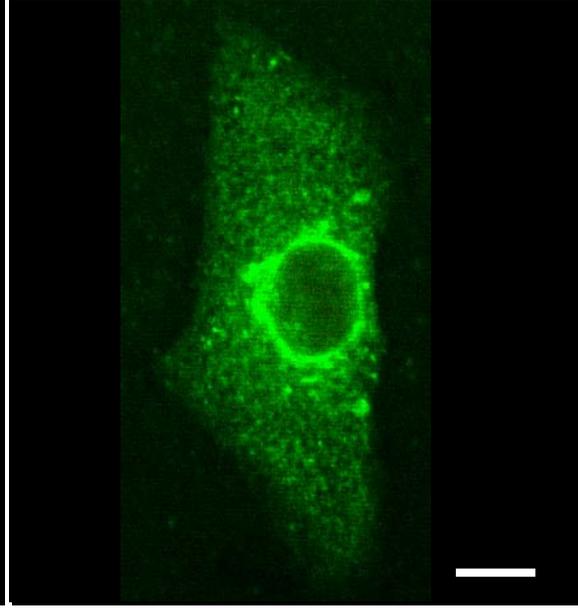


Abb. 17: neonatale Kardiomyozyte, Immunofärbung von  $Na_v1.5$  (SH1) (grün), Messbalken 10  $\mu\text{m}$

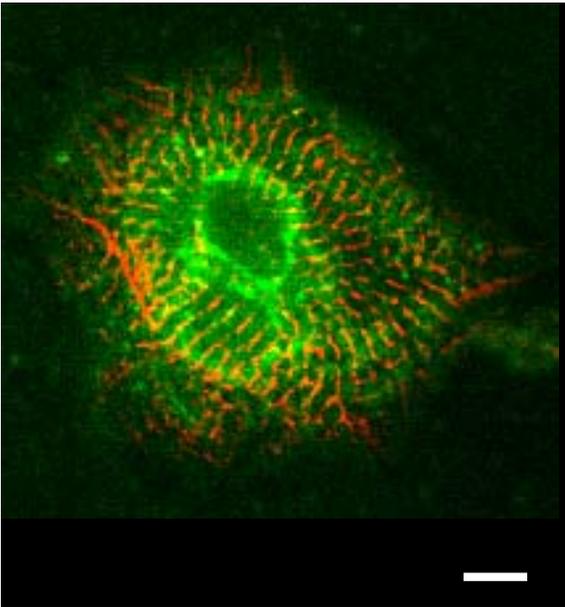


Abb. 18: neonatale Kardiomyozyte, Immunofärbung von  $Nav1.5$  (SH1) (grün) und  $\alpha$ -Actinin (rot), Messbalken 10  $\mu\text{m}$

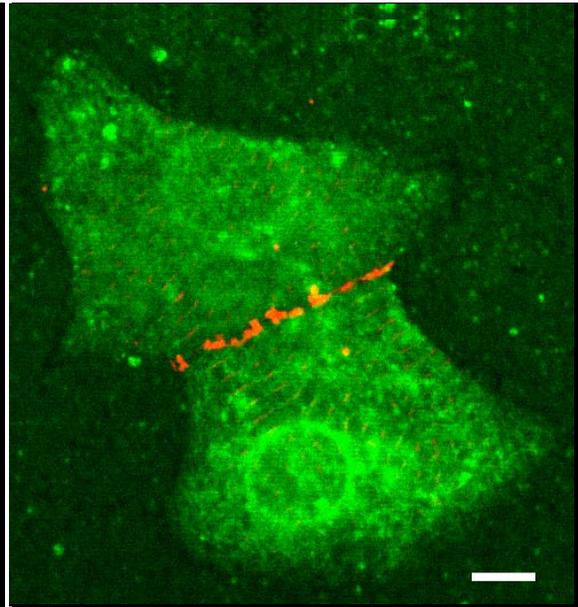


Abb. 19: neonatale Kardiomyozyten, Immunofärbung von  $Nav1.5$  (SH1) (grün) und Connexin 43 (rot), Messbalken 10  $\mu\text{m}$

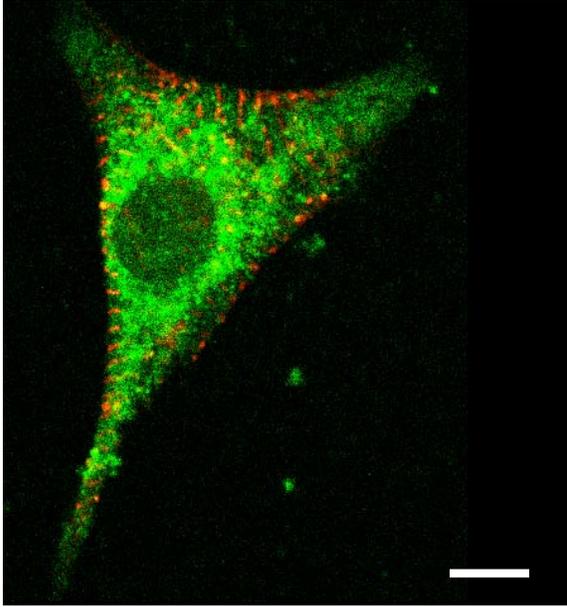


Abb. 20: neonatale Kardiomyozyte, Immunofärbung von Na<sub>v</sub>1.5 (SH8) (grün) und α-Actinin (rot), Messbalken 10 μm

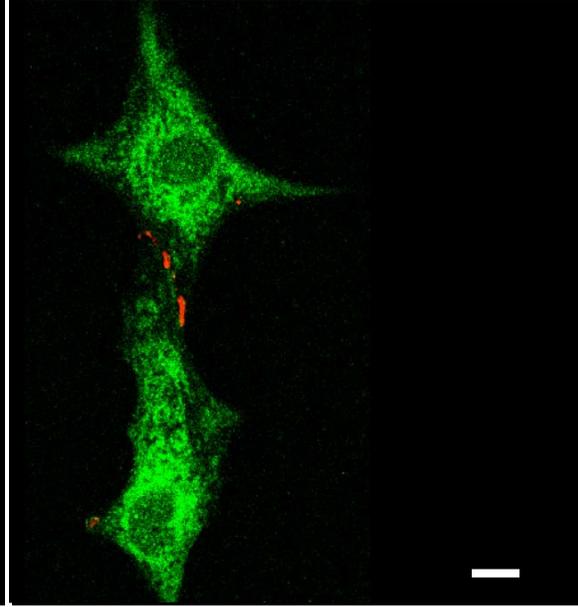


Abb. 21: neonatale Kardiomyozyten, Immunofärbung von Na<sub>v</sub>1.5 (SH8) (grün) und Connexin 43 (rot), Messbalken 10 μm

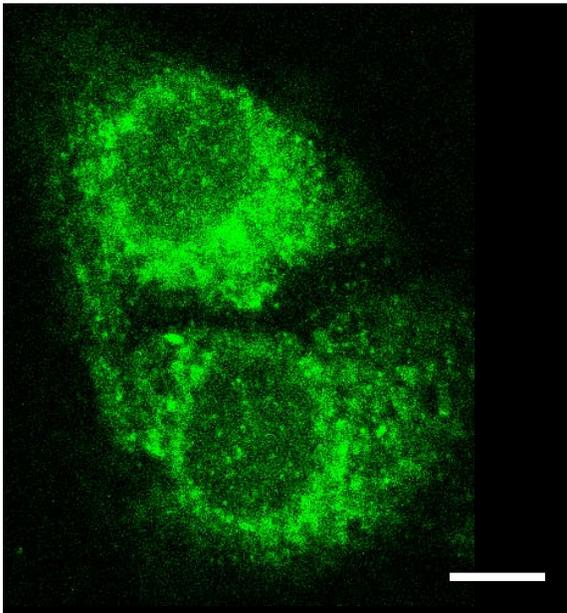


Abb. 22: neonatale Kardiomyozyten, Immunofärbung von Na<sub>v</sub>1.5 (SH8) (grün), Messbalken 10 μm

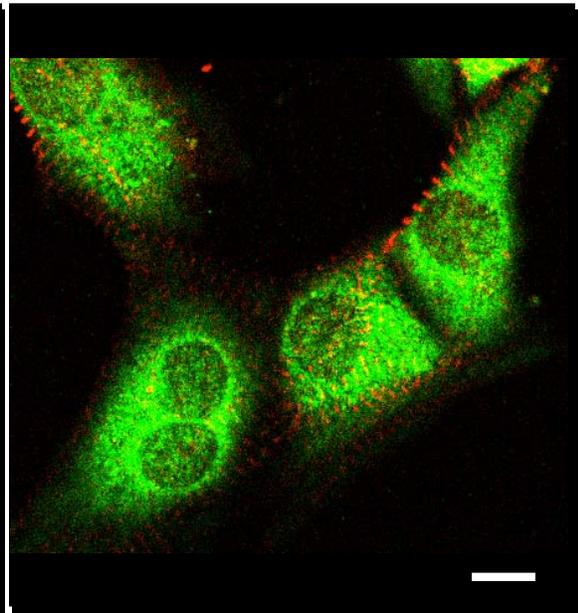


Abb. 23: neonatale Kardiomyozyten, Immunofärbung von Na<sub>v</sub>1.6 (grün) und α-Actinin (rot), Messbalken 10 μm

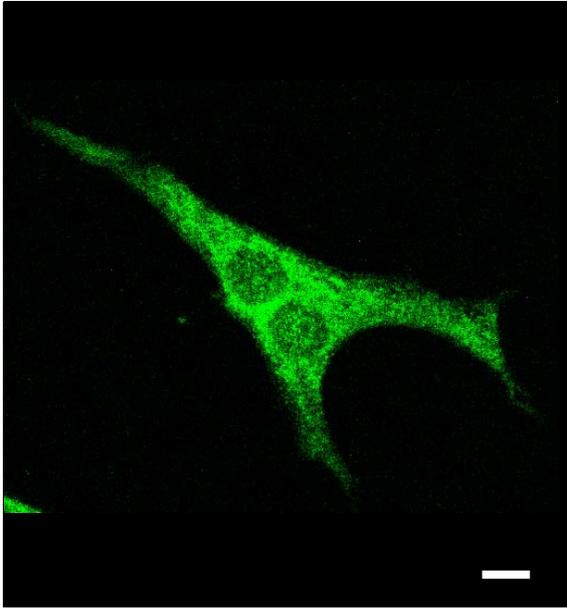


Abb. 24: neonatale Kardiomyozyte, Immunofärbung von  $\text{Na}_v1.6$  (grün), Messbalken 10  $\mu\text{m}$

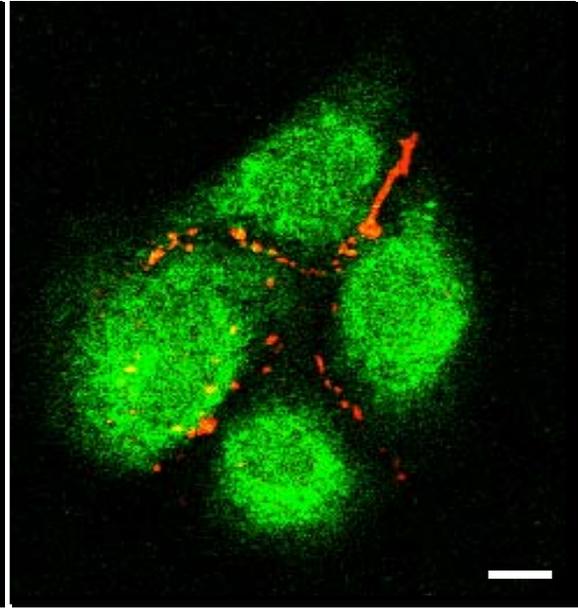


Abb. 25: neonatale Kardiomyozyten, Immunofärbung von  $\text{Na}_v1.6$  (grün) und Connexin 43 (rot), Messbalken 10  $\mu\text{m}$

#### 4.3 Lokalisation von $\beta$ -Natriumkanaluntereinheit mittels isoformenspezifischer Antikörper

Analog zu den  $\alpha$ -Natriumkanaluntereinheiten konnten alle bekannten  $\beta$ -Isoformen in neonatalen Kardiomyozyten der Ratte detektiert werden.

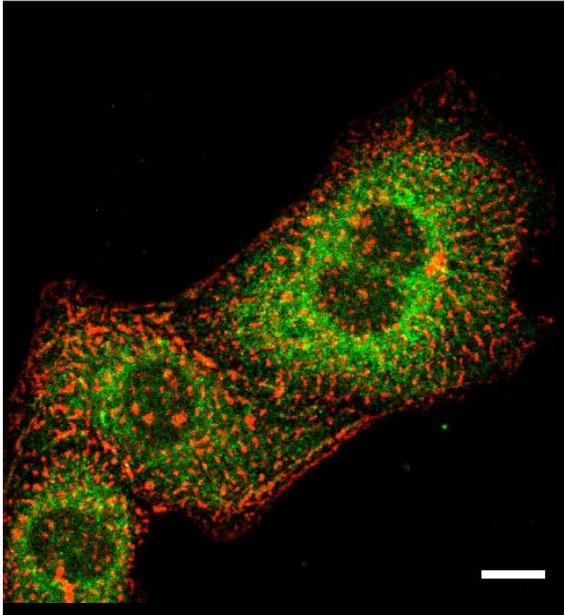
Doppellabeling mit  $\alpha$ -Actinin identifizierte die gefärbten Zellen als Kardiomyozyten.

Alle vier  $\beta$ -Untereinheiten wiesen auch in diesen Färbungen ein einheitlich über die Zellmembran verteiltes Muster mit deutlicher Anfärbung auf. Bei allen Bildern fällt eine stärkere perinukleäre Färbung auf, während die Zellkerne eher ausgespart bleiben.

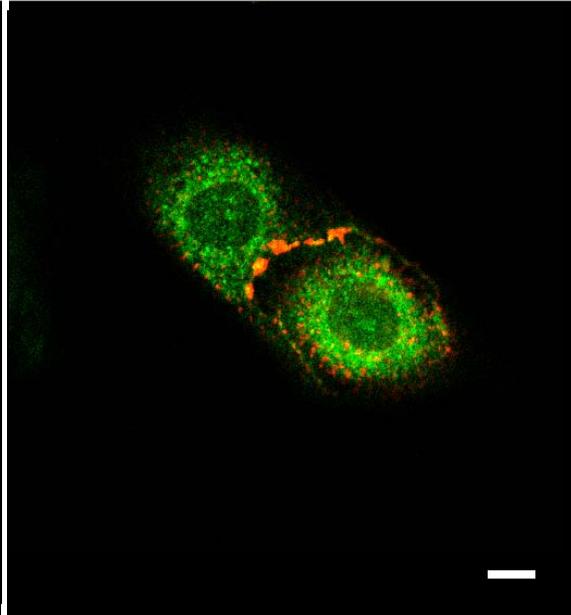
Auf Bildern mit Zell-Zellkontakt ließ sich besonders bei der  $\beta$ 1-Natriumkanaluntereinheit eine Kolo-kalisation mit Connexin 43 vermuten. Dies wurde durch eine Gelbfärbung der Cluster an den Disci inter-

calares sichtbar, wenn man die Kanäle für  $\beta$ -Untereinheiten (Grün) und Connexin 43 (Rot) bei sich berührenden Zellen überlagert.

Im Folgenden sind exemplarisch Bilder der Anfärbungen der  $\beta$ -Natriumkanaluntereinheiten dargestellt.



**Abb. 26:** neonatale Kardiomyozyten, Immunofärbung von  $\beta$  1 (6549) (grün) und  $\alpha$ -Actinin (rot), Messbalken 10  $\mu$ m



**Abb. 27:** neonatale Kardiomyozyten, Immunofärbung von  $\beta$  1 (6549) (grün) und Connexin 43 (rot), Kolokalisation (gelb), Messbalken 10  $\mu$ m

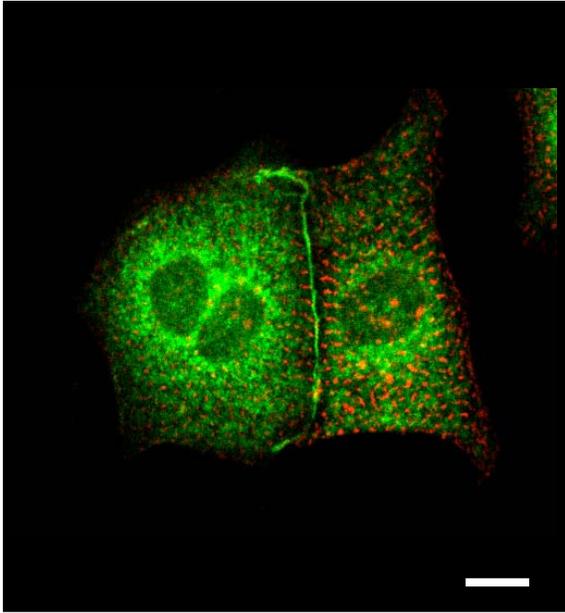


Abb. 28: neonatale Kardiomyozyten, Immunofärbung von  $\beta$  1 (6550) (grün) und  $\alpha$ -Actinin (rot), Messbalken 10  $\mu$ m

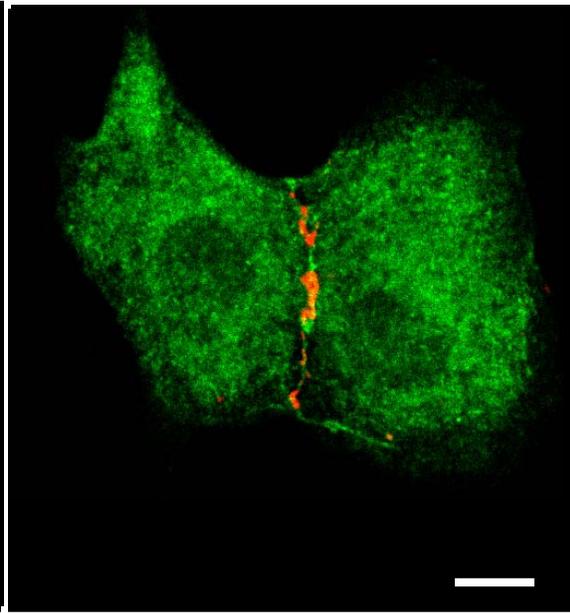


Abb. 29: neonatale Kardiomyozyten, Immunofärbung von  $\beta$  1 (6550) (grün) und Connexin 43 (rot), Kolokalisation (gelb), Messbalken 10  $\mu$ m

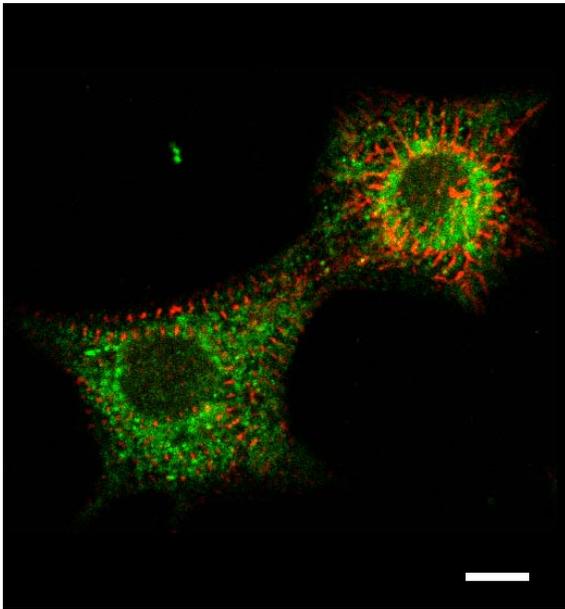


Abb. 30: neonatale Kardiomyozyten, Immunofärbung von  $\beta$  2 (grün) und  $\alpha$ -Actinin (rot), Messbalken 10  $\mu$ m

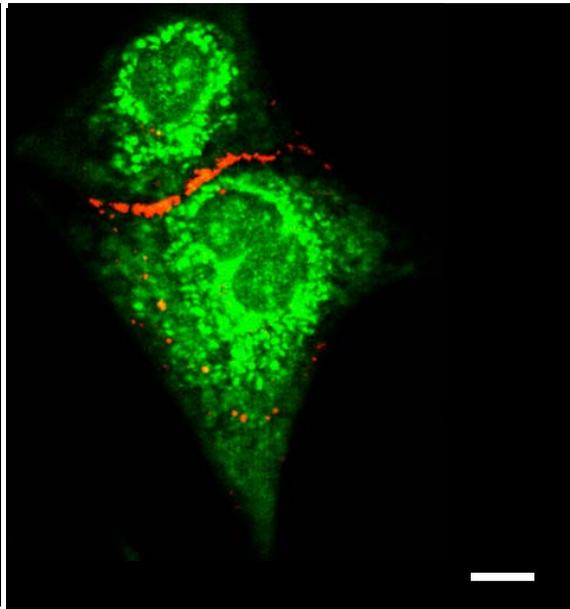


Abb. 31: neonatale Kardiomyozyten, Immunofärbung von  $\beta$  2 (grün) und Connexin 43 (rot), Messbalken 10  $\mu$ m

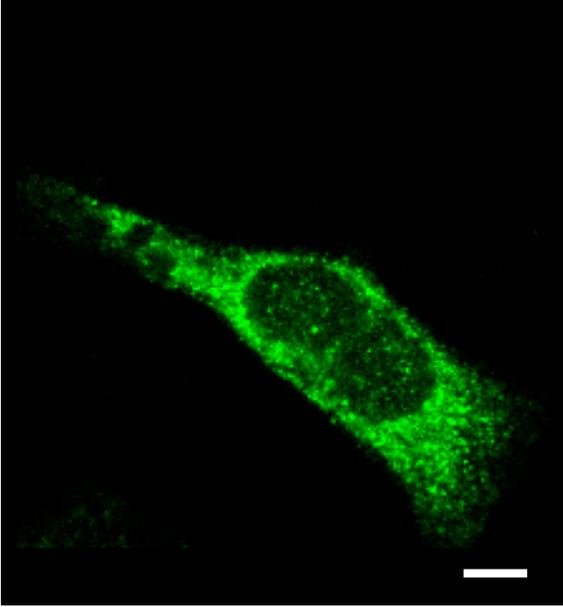


Abb. 32: neonatale Kardiomyozyte, Immunofärbung von  $\beta$  2 (grün), Messbalken 10  $\mu$ m

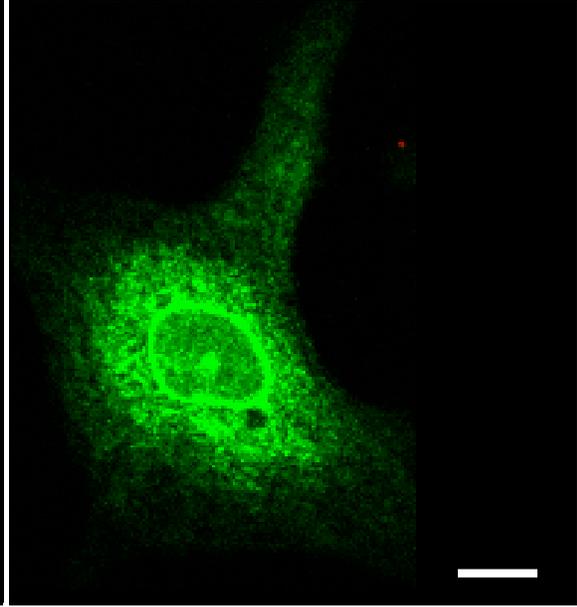


Abb. 33: neonatale Kardiomyozyte, Immunofärbung von  $\beta$  3 (grün), Messbalken 10  $\mu$ m

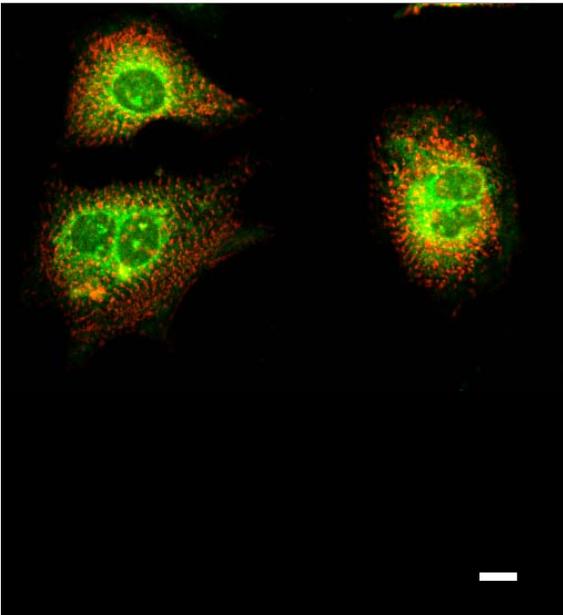


Abb. 34: neonatale Kardiomyozyten, Immunofärbung von  $\beta$  3 (grün) und  $\alpha$ -Actinin (rot), Messbalken 10  $\mu$ m

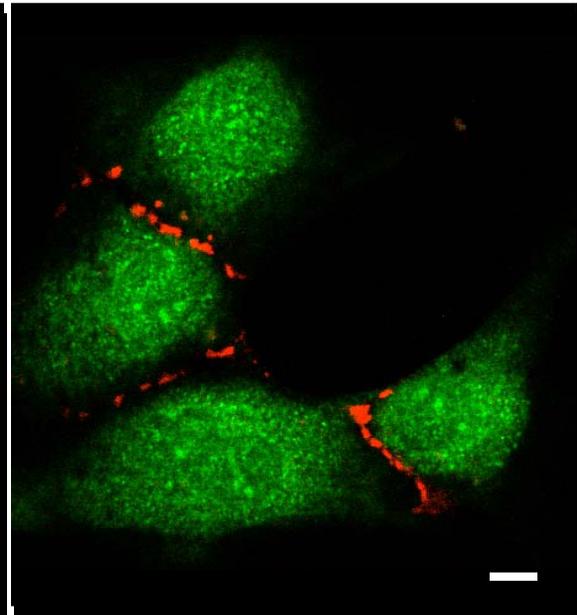


Abb. 35: neonatale Kardiomyozyten, Immunofärbung von  $\beta$  3 (grün) und Connexin 43 (rot), Messbalken 10  $\mu$ m

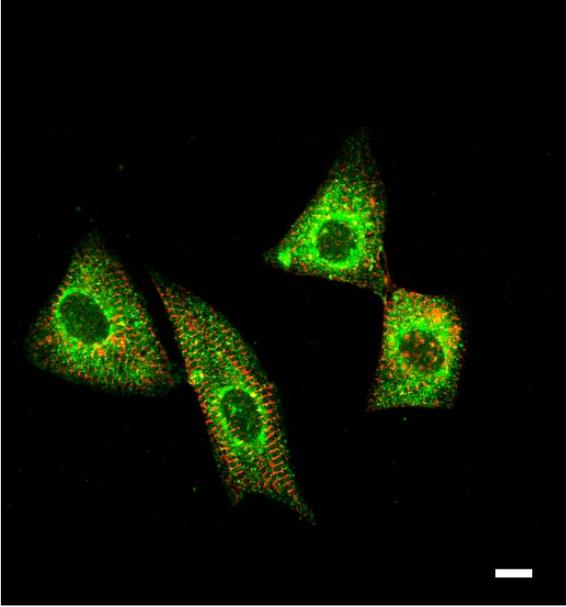


Abb. 36: neonatale Kardiomyozyten, Immunofärbung von  $\beta$  4 (grün) und  $\alpha$ -Actinin (rot), Messbalken 10  $\mu$ m

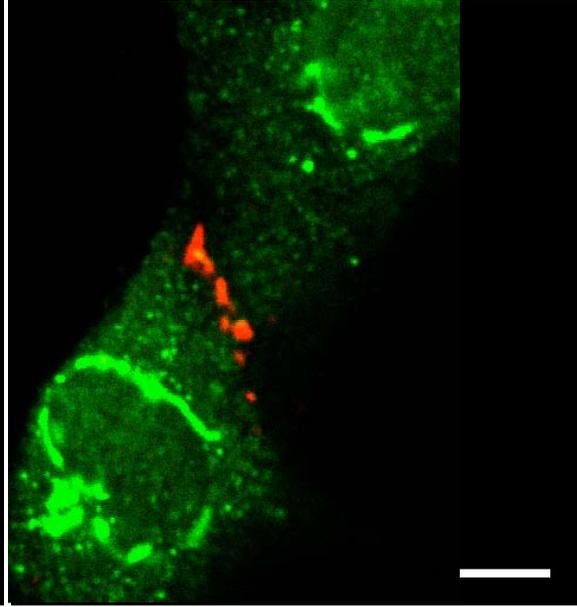


Abb. 37: neonatale Kardiomyozyten, Immunofärbung von  $\beta$  4 (grün) und Connexin 43 (rot), Messbalken 10  $\mu$ m

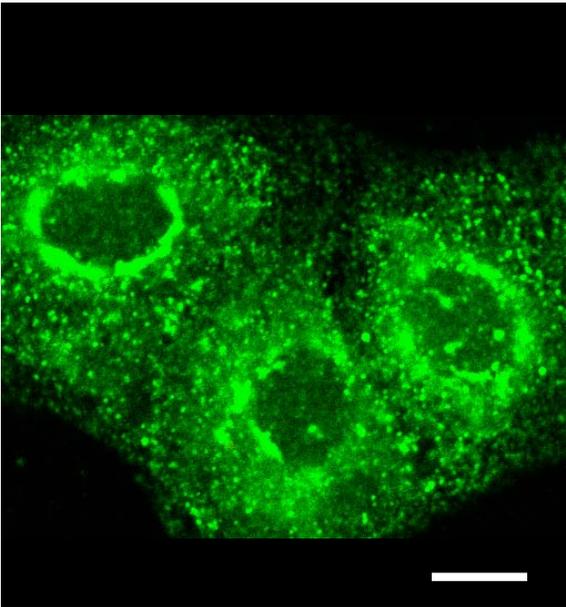


Abb. 38: neonatale Kardiomyozyten, Immunofärbung von  $\beta$  4 (grün), Messbalken 10  $\mu$ m

#### **4.4 Peptide Blocks für Antikörperspezifität, Nativaufnahmen und „No Primary“**

Um die Spezifität der verwendeten Antikörper zu demonstrieren wurden „control antigens“ in den Färbeprozess in gleichen Konzentrationen wie die Antikörper mit eingebunden (s.o.). Dies erfolgte für Na<sub>v</sub>1.1, Na<sub>v</sub>1.2, Na<sub>v</sub>1.3, Na<sub>v</sub>1.6, SP19 und β2.

Nach der Verwendung der Blocking Peptides zeigte sich keine spezifische Anfärbung. Exemplarisch dafür sind zwei Bilder dargestellt. Da jedoch das Avidin-Biotin-System als sekundäre, fluoreszenzgebende Färbung verwendet wurde, waren entsprechend leichte, unspezifische Anfärbungen sichtbar.

Ebenso zeigte sich keine spezifische Anfärbung, wenn die primären Antikörper im Färbeprozess nicht verwendet wurden („No Primary“).

Kein Färbeverhalten wurde bei der Betrachtung angefertigter Nativaufnahmen beobachtet.

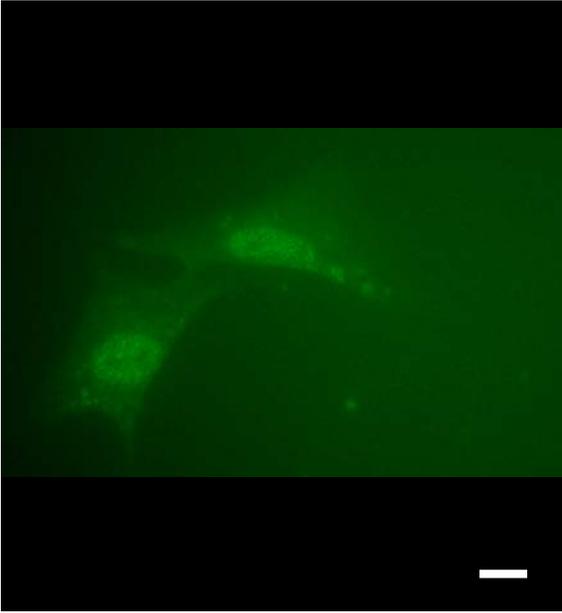


Abb. 39: neonatale Kardiomyozyten, Immunofärbung mit Verwendung der Kontrollantigene des Peptide Blocks  $\text{Na}_v1.2$ , Messbalken 10  $\mu\text{m}$

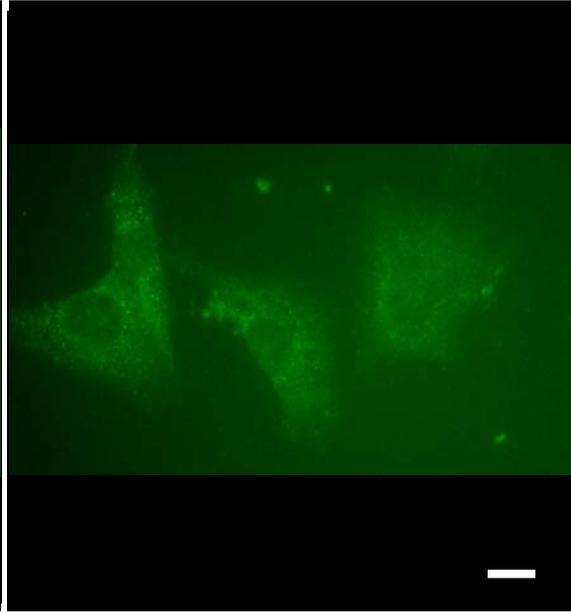


Abb. 40: neonatale Kardiomyozyten, Immunofärbung mit Verwendung der Kontrollantigene des Peptide Blocks  $\text{Na}_v1.6$ , Messbalken 10  $\mu\text{m}$

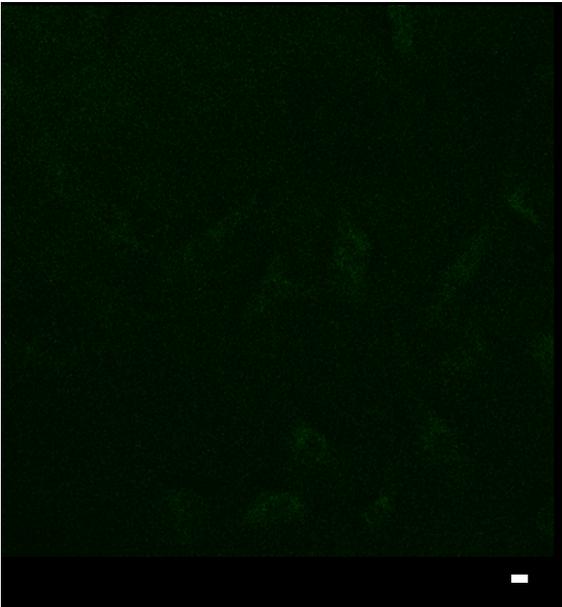


Abb. 41: neonatale Kardiomyozyten, ohne Immunofärbung in Nativaufnahme, Messbalken 10  $\mu\text{m}$

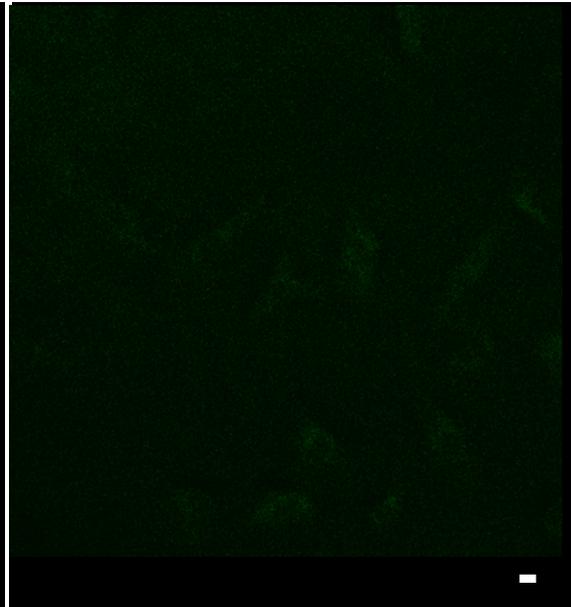


Abb. 42: neonatale Kardiomyozyten, Immunofärbung ohne Verwendung der primären Antikörper zur Darstellung der Natriumkanäle („No Primary“), Messbalken 10  $\mu\text{m}$

#### **4.5 Western Blotting für Antikörperspezifität**

Frisch präparierte, ventrikuläre Abschnitte von neonatalen Rattenherzen wurden lysiert, und der gewonnene Proteingehalt mittels der BioRad-Methode bestimmt.

Um nachweisen zu können, dass die lysierten Herzmuskelzellen Natriumkanäle enthalten, wurde eine diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt. Anschließend wurden die aufgetrennten Proteine übertragen und mit einem Antikörper inkubiert, der alle  $\alpha$ -Natriumkanaluntereinheiten erkennt (SP19). Zuletzt folgte die Visualisierung durch einen sekundären, Peroxidasegekoppelten Antikörper.

Es konnte auf der entstandenen Membran eine Signalverstärkung in Höhe von 260 kDa festgestellt werden. Dies entspricht der Größe einer  $\alpha$ -Natriumkanaluntereinheit.

Dieses Resultat konnte in einer erneuten Präparation neonataler Rattenherzen reproduziert werden.

## 5 Diskussion

Wie die Ergebnisse zeigen, kommen zusätzlich zu der primären kardialen  $\alpha$ -Natriumkanalisoform  $Na_v1.5$  auch vier neuronale Isoformen ( $Na_v1.1$ ;  $Na_v1.2$ ;  $Na_v1.3$ ;  $Na_v1.6$ ) im Herzen vor.

Im Gegensatz zu adulten Kardiomyozyten zeigen alle präsentierten Isoformen bei neonatalen Zellen eine gleichmäßige Verteilung über die Zelloberfläche.

Das gilt analog auch für alle bisher bekannten  $\beta$ -Untereinheiten ( $\beta1$ ,  $\beta2$ ,  $\beta3$ ,  $\beta4$ ), die ebenso in den neonatalen Herzmuskelzellen erstmals visualisiert werden konnten.

Einige Isoformen scheinen konzentriert an Orten des Zell-Zell-Kontaktes nachweisbar zu sein. Besonders deutlich konnte dies für  $\beta1$  nachgewiesen werden. Dies weist auf eine spezifische Rolle bei der Erregungsfortleitung von Zelle zu Zelle hin.

Darüber hinaus gelang es erstmalig, die neuronale Isoform  $Na_v1.2$  im kardialen Gewebe nachzuweisen.

### 5.1 Methodische Diskussion

#### 5.1.1 Präparation der neonatalen Herzzellen

Die Präparation der neonatalen Kardiomyozyten erfolgte nach einem Protokoll von Simpson aus dem Jahre 1982. Eine Verbesserung der Methode wurde durch Maaß und Mitarbeiter (Maaß et al., 2007) mittels einer Überarbeitung der Präparation, besonders bezüglich der Sterilität erreicht. Bei unseren Untersuchungen konnten Infektionen der Zell-

kulturen, nicht zuletzt durch die Zugabe von Antibiotika weitgehend vermieden werden.

### 5.1.2 Vorteil der konfokalen Mikroskopie

Konventionelle Immunofluoreszenzmikroskopie bietet insbesondere bei der Darstellung von Zellbestandteilen eine geringe Genauigkeit. Grund dafür ist die kaum zu kompensierende Hintergrundfluoreszenz, da keine punktgenaue Aufnahme des fokussierten Objektes möglich ist. Detailgenauigkeit bleibt dem Betrachter, vor allem bei dickeren (mehr als 10  $\mu\text{m}$ ) Objekten damit verwehrt. Die Konfokalmikroskopie begegnet diesem Problem mittels lasergesteuerter Anregung der Fluoreszenz und Auffangen der entsprechenden Emission durch digitale Detektoren (Shotton et al., 1989). Mit dieser Technik erhält man keine Darstellung der Gesamtzelle sondern ein Schnittbild.

Besonders eine Darstellung von Koloalisationen, wie in dieser vorliegenden Arbeit, wird dadurch ermöglicht.

Ein weiterer Vorteil ist die saubere Trennung der Fluoreszenzfarben voneinander, da sich durch eine digitale Berechnung die Emissionsspektren der einzelnen Farbstoffe nicht mehr überschneiden.

### 5.1.3 Immunofärbung der Kardiomyozyten

Besonders wichtig bei Immunofärbungen ist eine angepasste Antikörperkonzentration. Überlädt man die Zellen mit primären Antikörpern, kann die Auswertung verfälscht werden. In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene primäre Antikörperkonzentrationen getestet. Die Experimente zeigten, dass das Verhältnis von 1:50 für neonatale Kardiomyozyten die besten Ergebnisse erzielt. In anderen Vorarbeiten am Herzgewebe mit den gleichen Antikörpern wurden ebenso primäre Antikörperkonzentrationen zwischen 1:50 und 1:100

verwendet (Ratcliffe et al., 2001, Maier et al., 2004, Maier et al., 2003; Haufe et al., 2005). Analoges gilt für die Verwendung des sekundären Antikörpers.

#### 5.1.4 Spezifität der Antikörper

Bei Immunofluoreszenzfärbungen ist es entscheidend, dass die primären Antikörper eine hohe Spezifität aufweisen. Dies kann man durch unterschiedliche Untersuchungen überprüfen.

Die für diese Arbeit verwendeten, kommerziell erhältlichen Antikörper ( $\text{Na}_v1.1$ ,  $\text{Na}_v1.2$ ,  $\text{Na}_v1.3$ ,  $\text{Na}_v1.6$ , SP19 und  $\beta 2$ ) wurden durch Peptide Blocks in ihrer Spezifität überprüft. Deshalb wurde auf eine Kontrolle mit dem Prä-Immuserum des Tieres, von dem die Antikörper stammten, ebenso wie auf eine Kontrolle mit Isotyp-Antikörpern verzichtet.

Da die anderen verwendeten, primären Antikörper eingehend in Vorarbeiten (Ratcliffe et al., 2001, Maier et al., 2004, Maier et al., 2003) beschrieben sind, wurde auf eine Kontrolle ihrer Spezifität verzichtet.

Des Weiteren erfolgte bei jeder Färbung eine Kontrolle mit Nativzellen und No Primary. Ziel war es, unspezifische Bindungen der sekundären Antikörper auszuschließen bzw. zu überprüfen, ob die Nativzellen natürliches Fluoreszenzverhalten zeigen.

## 5.2 Inhaltliche Diskussion

### 5.2.1 Lokalisation von $\alpha$ -Natriumkanaluntereinheiten in ventrikulären, neonatalen Herzmuskelzellen der Ratte

Mittels immunozytochemischer Untersuchungen wurde gezeigt, dass neben der eigentlichen kardialen Isoform  $\text{Na}_v1.5$  auch primäre neuro-

nale Natriumkanalisoformen  $Na_v1.1$ ,  $Na_v1.2$ ,  $Na_v1.3$  und  $Na_v1.6$  in neonatalen Kardiomyozyten der Ratte vorkommen.

Alle detektierten Isoformen sind innerhalb der Plasmamembran gleichmäßig verteilt. Zusätzlich sind sie an Orten des Zell-Zell-Kontaktes an den Disci intercalares zu finden.

Diese Resultate in neonatalen Herzmuskelzellen stimmen nicht mit Ergebnissen an adulten Herzmuskelzellen aus früheren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe überein (Maier et al., 2002; Maier et al., 2004). Hierbei wurden immunozytochemische Färbungen mit denselben Antikörpern an acht bis zehn Wochen alten Mäusekardiomyozyten angefertigt. Es zeigte sich, dass die kardiale Isoform  $Na_v1.5$  überwiegend an den Disci intercalares zu finden war, während sich die neuronalen Natriumkanalisoformen  $Na_v1.1$ ,  $Na_v1.3$  und  $Na_v1.6$  ausschließlich im t-tubulären System lokalisieren ließen. In diesem Zusammenhang wurde angenommen, dass die Präsenz von  $Na_v1.5$  an den Disci intercalares für die Übertragung des Aktionspotenzials von Zelle zu Zelle wichtig ist, während die Lokalisation der anderen Natriumkanalisoformen im t-tubulären System für die elektromechanische Kopplung der Herzzelle von entscheidender Bedeutung zu sein scheint.

Wir nehmen aufgrund der hier vorgelegten Ergebnisse an, dass die Entwicklung und Spezifikation der spannungsabhängigen Natriumkanäle nach der Geburt anhält, und es erst im Verlauf der Entwicklung durch physiologischen Einfluss (beispielsweise Stress oder körperliches Training) zu einer entsprechenden (Um-)Organisation und Entwicklung kommt.

Diese Theorie konnte durch eine Arbeit an 38 Tage alten, ventrikulären Herzmuskelzellen der Maus gefestigt werden (Haufe et al., 2005). Die dort dargestellten Ergebnisse detektierten  $Na_v1.1$  und  $Na_v1.6$  im

t-tubulären System, während  $\text{Na}_v1.1$ ,  $\text{Na}_v1.2$  und  $\text{Na}_v1.5$  sowohl an den Z-Linien, als auch an den Disci intercalares zu finden waren. Die hier untersuchten Tiere nahmen aufgrund ihres Alters (38 Tage) im Vergleich zu den neonatalen (ein bis drei Tage) und den adulten (acht bis zehn Wochen) eine Mittelstellung ein. So ließen sich die Ergebnisse von Haufe et al. als Entwicklungsstufe der Natriumkanäle von unifoformer Verteilung zu isoformenspezifischer Lokalisation innerhalb der Zelle deuten.

Die Entwicklung der t-Tubuli ist in der Neonatalzeit noch nicht abgeschlossen (Brette et al. 2003; Chen et al., 1995; Haddock et al., 1999). Es ist davon auszugehen, dass die hier untersuchten Zellen noch kein t-tubuläres System besitzen, was somit eine Detektion unmöglich macht.

In den oben genannten Annahmen werden unterschiedliche Gattungen (Maus vs. Ratte) miteinander verglichen. So weisen Ratte und Maus Unterschiede in der Physiologie (z.B. Herzfrequenz) und Morphologie (z.B. Aktionspotenzialverlauf) auf. Somit sind natürlich auch Unterschiede in der Lokalisation von Natriumkanälen denkbar.

Ebenso sind Färbeartefakte, unspezifische Antikörperbindungen oder andere technische Probleme nicht gänzlich auszuschließen.

In einer elektrophysiologischen Studie von Walsh et al. (2002) konnte eine Veränderung der Natrium-, Calcium- und Kaliumströme während der Kultivierung von neonatalen, drei bis vier Tage alten Kardiomyozyten der Ratte festgestellt werden. Die über mehrere Tage kultivierten Zellen veränderten ihre Morphologie, und eine Zunahme der Ionenströme konnte nachgewiesen werden. Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass sich die Expression von spannungsabhängigen Ionenkanälen während der Entwicklung zur adulten Zelle verändert.

In dieser Arbeit konnte erstmalig die  $\alpha$ -Natriumkanaluntereinheit  $Na_v1.2$  mittels Immunofärbungen in neonatalen Kardiomyozyten detektiert werden. Da  $Na_v1.2$  eine wichtige Rolle bei der Initiierung und Fortführung eines Aktionspotenzials spielt (Catterall et al., 2005), ist dies entscheidend für das weitere Verständnis der Physiologie dieser Zellen. In früheren Arbeiten (Maier et al., 2002; Maier et al., 2004) an acht bis zehn Wochen alten Kardiomyozyten der Maus konnte  $Na_v1.2$  nicht nachgewiesen werden. Jedoch war es möglich, diese Natriumkanalisoform in Kardiomyozyten von 38 Tage alten Mäusen darzustellen (Haufe et al., 2005). Die Diskrepanz zu der vorliegenden Arbeit könnte auch hier wieder in einem Unterschied der Gattung begründet sein, oder auch entwicklungsgeschichtlich erklärt werden. Methodische Gründe, wie beispielsweise die Spezifität der Antikörper, können nicht ausgeschlossen werden.

#### 5.2.2 Lokalisation von $\beta$ -Natriumkanaluntereinheiten in ventrikulären, neonatalen Herzmuskelzellen der Ratte

Es konnten mittels immunozytochemischer Färbungen alle vier bekannten  $\beta$ -Untereinheiten erstmals nachgewiesen werden.

Allerdings konnte ebenso wie bei den  $\alpha$ -Natriumkanalisoformen ein anderes Verteilungsmuster im Vergleich zur adulten Zelle festgestellt werden. Während  $\beta 2$  und  $\beta 4$  Untereinheiten von adulten (acht bis zehn Wochen) Kardiomyozyten der Maus an den Disci intercalares und  $\beta 1$  bzw.  $\beta 3$  hauptsächlich innerhalb des t-tubulären Systems lokalisiert sind (Maier et al., 2004), fand man in den vorliegenden Untersuchungen alle vier  $\beta$ -Untereinheiten gleichmäßig innerhalb der Plasmamembran und im Zytosol der Zelle verteilt.

Eine mögliche Erklärung hierfür könnte eine Veränderung der Lokalisation der  $\beta$ -Untereinheiten im Zusammenhang mit der Veränderung der  $\alpha$ -Natriumkanalisoformen während der Maturation der Herzmuskelzelle sein. Auch hier ist davon auszugehen, dass das t-tubuläre System noch in der Entwicklung ist, und deshalb die Detektion eines entsprechenden Verteilungsmusters noch nicht möglich ist.

In der Arbeit von Domínguez et al. (2005) wird das Expressionsmuster von  $\beta 1$  sowohl mittels PCR, als auch immunhistochemisch im Verlauf der Entwicklung einer Herzzelle vom embryonalen bis hin zum adulten Stadium beleuchtet. Dort konnte festgestellt werden, dass sich die Expression von  $\beta 1$  im Laufe der Entwicklung kontinuierlich erhöht. Abschließend fand man in späteren Entwicklungsstadien auch eine isoformenspezifische Verteilung im t-tubulären System, wie auch bei Maier et al. beschrieben. So schlägt Domínguez die Brücke zwischen der vorliegenden Arbeit an neonatalen Kardiomyozyten und den adulten Zellen von Maier et al.. Jedoch muss auch hier wieder einschränkend erwähnt werden, dass in den oben genannten Ausführungen Mäusekardiomyozyten mit Rattenkardiomyozyten verglichen werden. Außerdem wurden bei Domínguez et al. Gewebsschnitte für die immunhistochemischen Färbungen verwendet, während in der vorliegenden Arbeit Zellkulturen gefärbt wurden.

$\beta$ -Untereinheiten kommen spezifische funktionelle Bedeutungen zu. In anderen Arbeiten konnte deren Einfluss auf die Kanalmodulation belegt werden (Yu et al., 2003; Dhar Malhotra et al., 2001; Fahmi et al., 2001). Ein bedeutender Einfluss der  $\beta$ -Untereinheiten ließ sich auch auf die Zelladhäsion und Kommunikation mit dem Extrazellulärraum bzw. dem Zytoskelett der Kardiomyozyte nachweisen (Isom, 2001; Isom 2002). Diese Feststellung erklärt eine Kollokalisierung aller vier  $\beta$ -Untereinheiten mit den Gap Junctions in der vorliegenden Arbeit.

Auch diese gehören zur Gruppe der Signalübertragungsproteine und erfüllen interzellulär kommunikative Aufgaben.

Bei der Beurteilung der Untersuchungsergebnisse müssen auch hier Unterschiede zwischen den Spezies oder in der Spezifität der Antikörper miteinbezogen werden. Es sind weitere Studien vonnöten, um diesen Sachverhalt näher zu beleuchten.

## 6 Zusammenfassung

Spannungsabhängige Natriumkanäle bestehen aus einer  $\alpha$ -Untereinheit und zugehörigen  $\beta$ -Untereinheiten und sind verantwortlich für die schnelle Aufstrichphase eines Aktionspotenzials. Die  $\alpha$ -Untereinheit bildet unter anderem die Pore, während die assoziierten  $\beta$ -Untereinheiten Zelladhäsionsaufgaben erfüllen und verantwortlich für Modulation der Kinetik und die Kommunikation mit dem Extrazellulärraum sind.

In Vorarbeiten an Herzen von Säugetieren konnte gezeigt werden, dass sowohl die eigentliche kardiale Isoform  $\text{Na}_v1.5$ , als auch die TTX-sensitiven, neuronalen Isoformen  $\text{Na}_v1.1$ ,  $\text{Na}_v1.3$  und  $\text{Na}_v1.6$  vorkommen. Diesen Untersuchungen lagen adulte Kardiomyozyten zugrunde. Unklar war allerdings die Lokalisation und Expression von Natriumkanälen an neonatalen Herzmuskelzellen.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Isolation ventrikulärer Kardiomyozyten von Herzen neonataler, ein bis zwei Tage alter Ratten. Diese wurden nach zwei Tagen in Kultur mit spezifischen Antikörpern gegen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten mithilfe immunzytochemischer Untersuchungsmethoden gefärbt. Zusätzlich wurden Connexin 43 und  $\alpha$ -Actinin als Marker für Disci intercalares und intrazelluläre Sarkomere im Sinne einer Doppelfärbung dargestellt. Die Auswertung erfolgte mittels konfokaler Mikroskopie.

Die Ergebnisse zeigten eine Darstellung sowohl der kardialen ( $\text{Nav}1.5$ ), als auch der neuronalen, TTX-sensitiven  $\alpha$ -Natriumkanalisoformen ( $\text{Na}_v1.1$ ,  $\text{Na}_v1.2$ ,  $\text{Na}_v1.3$  und  $\text{Na}_v1.6$ ).

Ebenso ließen sich alle vier bekannten  $\beta$ -Untereinheiten detektieren.

Im Unterschied zu adulten Kardiomyozyten zeigte sich kein isoformenspezifisches Verteilungsmuster, sondern eine gleichmäßige Verteilung aller Natriumkanaluntereinheiten über die Zellmembran.

Es konnte für die dargestellten Isoformen eine Kolokalisation mit Connexin 43 an den Disci intercalares detektiert werden. Dies weist auf eine wichtige Rolle bei der Erregungsfortleitung von Zelle zu Zelle hin.

## 7 Literaturverzeichnis

Bennett PB, Yazawa K, Makita N, George AL Jr  
Molecular mechanism for an inherited cardiac arrhythmia  
Nature. 1995; 376(6542):683-685

Benson DW, Wang DW, Dyment M, Knilans TK, Fish FA, Strieper MJ,  
Rhodes TH, George AL Jr  
Congenital sick sinus syndrome caused by recessive mutations in the  
cardiac sodium channel gene (SCN5A)  
J Clin Invest. 2003; 112(7):1019-1028

Bradford MM  
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quanti-  
ties of protein utilizing the principle of protein-dye binding  
Anal Biochem. 1976; 72:248-254

Brette F, Orchard C  
T-tubule function in mammalian cardiac myocytes  
Circ Res. 2003; 92(11):1182-1192

Burkard N, Becher J, Heindl C, Neyses L, Schuh K, Ritter O  
Targeted proteolysis sustains calcineurin activation  
Circulation. 2005; 111(8):1045-1053

Catterall WA

From ion currents to molecular mechanisms: The structure and function of voltage-gated sodium channels.

Neuron 2000; 26:13-25

Catterall WA

A 3 D view of sodium channels

Nature 2001; 490: 988-989, 991

Catterall WA, Goldin AL, Waxman SG

International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels

Pharmacol Rev. 2005; 57(4):397-409

Catterall WA

Painful Channels

Neuron 2006; 52(5):743-744

Cestèle S, Catterall WA

Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels

Biochimie. 2000; 82(9-10):883-892

Cestèle S, Yarov-Yarovoy V, Qu Y, Sampieri F, Scheuer T, Catterall WA

Structure and function of the voltage sensor of sodium channels probed by a beta-scorpion toxin

J.Biol.Chem 2006; 282(30), 21332-21344

Chen F, Mottino G, Klitzner TS, Philipson KD, Frank JS  
Distribution of the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange protein in developing rabbit  
myocytes  
Am J Physiol. 1995; 268(1):C1126-1132

Claes L, Del-Favero J, Ceulemans B, Lagae L, Van Broeckhoven C, De  
Jonghe P  
De novo mutations in the sodium-channel gene SCN1A cause severe  
myoclonic epilepsy of infancy  
Am J Hum Genet. 2001; 68(6):1327-1332

Claycomb WC  
Biochemical aspects of cardiac muscle differentiation. Possible control  
of deoxyribonucleic acid synthesis and cell differentiation by adrenergic  
innervation and cyclic adenosine 3':5'-monophosphate  
J Biol Chem. 1976; 251(19):6082-6089

de Boer TP, van Rijen HV, Van der Heyden MA, Kok B, Opthof T, Vos  
MA, Jongsma HJ, de Bakker JM, van Veen TA  
Beta-, not alpha-adrenergic stimulation enhances conduction velocity  
in cultures of neonatal cardiomyocytes  
Circ J. 2007; 71(6):973-981

Dhar Malhotra J, Chen C, Rivolta I, Abriel H, Malhotra R, Mattei LN,  
Brosius FC, Kass RS, Isom LL  
Characterization of Sodium Channel  $\alpha$ - and  $\beta$ -Subunits in Rat and  
Mouse Cardiac Myocytes  
Circulation 2001; 103:1303-1310

Domínguez JN, Navarro F, Franco D, Thompson RP, Aránega AE  
Temporal and spatial expression pattern of beta1 sodium channel  
subunit during heart development  
Cardiovasc Res. 2005; 65(4):842-850

Fahmi AI, Patel M, Stevens EB, Fowden AL, John JE 3rd, Lee K, Pin-  
nock R, Morgan K, Jackson AP, Vandenberg JI  
The sodium channel beta-subunit SCN3b modulates the kinetics of  
SCN5a and is expressed heterogeneously in sheep heart  
J Physiol. 2001; 537(3):693-700

Fertleman CR, Baker MD, Parker KA, Moffatt S, Elmslie FV, Abraham-  
sen B, Ostman J, Klugbauer N, Wood JN, Gardiner RM, Rees M  
SCN9A mutations in paroxysmal extreme pain disorder: allelic variants  
underlie distinct channel defects and phenotypes  
Neuron. 2006; 52(5):767-774

Fozzard HA, Hanck DA  
Structure and function of voltage-dependent sodium channels: com-  
parison of brain II and cardiac isoforms  
Physiol Rev. 1996; 76(3):887-926

Goldin AL, Barchi RL, Caldwell JH, Hofmann F, Howe JR, Hunter JC,  
Kallen RG, Mandel G, Meisler MH, Netter YB, Noda M, Tamkun MM,  
Waxman SG, Wood JN, Catterall WA  
Nomenclature of voltage-gated sodium channels  
Neuron. 2000; 28(2):365-368

Goncharova EJ, Kam Z, Geiger B

The involvement of adherens junction components in myofibrillogenesis in cultured cardiac myocytes

Development. 1992; 114(1):173-183

Grandy SA, Trépanier-Boulay V, Fiset C

Postnatal development has a marked effect on ventricular repolarization in mice

Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2007; 293(4):H2168-77

Grosson CL, Cannon SC, Corey DP, Gusella JF

Sequence of the voltage-gated sodium channel beta1-subunit in wild-type and in quivering mice

Brain Res Mol Brain Res. 1996; 42(2):222-226

Haddock PS, Coetzee WA, Cho E, Porter L, Katoh H, Bers DM, Jafri MS, Artman M

Subcellular  $[Ca^{2+}]_i$  gradients during excitation-contraction coupling in newborn rabbit ventricular myocytes

Circ Res. 1999; 85(5):415-427

Haufe V, Camacho JA, Dumaine R, Günther B, Bollensdorff C, von Banchet GS, Benndorf K, Zimmer T

Expression pattern of neuronal and skeletal muscle voltage-gated  $Na^+$ -channels in the developing mouse heart

J Physiol. 2005; 564(3):683-696

Helenius A, Simons K

Solubilization of membranes by detergents

Biochim Biophys Acta. 1975 Mar 25; 415(1):29-79

Isom LL, De Jongh KS, Patton DE, Reber BF, Offord J, Charbonneau H,  
Walsh K, Goldin AL, Catterall WA

Primary structure and functional expression of the beta 1 subunit of  
the rat brain sodium channel

Science 1992; 256(5058):839-842

Isom LL, Ragsdale DS, De Jongh KS, Westenbroek RE, Reber BF,  
Scheuer T, Catterall WA

Structure and function of the beta 2 subunit of brain sodium channels,  
a transmembrane glycoprotein with a CAM motif

Cell. 1995; 83(3):433-42

Isom LL

Sodium channel beta subunits: anything but auxiliary

Neuroscientist. 2001; 7(1):42-54

Isom LL

Beta subunits: players in neuronal hyperexcitability?

Novartis Found Symp. 2002; 241:124-138; 138-143, 226-232

Kucera JP, Rohr S, Rudy Y

Localization of sodium channels in intercalated disks modulates cardiac  
conduction

Circ Res. 2002; 91(12):1176-1182

Laemmli UK

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4

Nature. 1970; 227(5259):680-685

Lazarides E, Burridge K

Alpha-actinin: immunofluorescent localization of a muscle structural protein in nonmuscle cells

Cell. 1975; 6(3):289-298

Leipold E, Hansel A, Borges A, Heinemann SH

Subtype specificity of scorpion beta-toxin Tz1 interaction with voltage-gated sodium channels is determined by the pore loop of domain 3

Mol Pharmacol. 2006; 70(1):340-347

Levick JR

An Introduction to Cardiovascular Physiology

London, Third edition, 2000

Maass AH, Buvoli M

Cardiomyocyte preparation, culture, and gene transfer

Methods Mol Biol. 2007; 366:321-330

McNair WP, Ku L, Taylor MR, Fain PR, Dao D, Wolfel E, Mestroni L; Familial Cardiomyopathy Registry Research Group

SCN5A mutation associated with dilated cardiomyopathy, conduction disorder, and arrhythmia

Circulation. 2005; 110(15):2163-2167

Maier SK, Westenbroek RE, Schenkman KA, Feigl EO, Scheuer T, Catterall WA

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. 2002; 99(6):4073-4078

Maier SK, Westenbroek RE, Yamanushi TT, Dobrzynski H, Boyett MR, Catterall WA, Scheuer T

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. 2003; 100(6):3507-3512

Maier SK, Westenbroek RE, McCormick KA, Curtis R, Scheuer T, Catterall WA

Distinct subcellular localization of different sodium channel alpha and beta subunits in single ventricular myocytes from mouse heart

Circulation 2004; 109(11):1421-1427

Makita N, Bennett PB Jr, George AL Jr

Voltage-gated Na<sup>+</sup>-channel beta 1 subunit mRNA expressed in adult human skeletal muscle, heart, and brain is encoded by a single gene

J Biol Chem. 1994; 269(10):7571-7578

Makita N, Shirai N, Wang DW, Sasaki K, George AL Jr, Kanno M, Kitabatake A.

Cardiac Na<sup>+</sup>-channel dysfunction in Brugada syndrome is aggravated by beta(1)-subunit

Circulation. 2000; 101(1):54-60

Ratcliffe CF, Qu Y, McCormick KA, Tibbs VC, Dixon JE, Scheuer T, Catterall WA

A sodium channel signaling complex: modulation by associated receptor protein tyrosine phosphatase beta

Nat Neurosci. 2000; 3(5):437-444

Ratcliffe CF, Westenbroek RE, Curtis R, Catterall WA

Sodium channel beta1 and beta3 subunits associate with neurofascin through their extracellular immunoglobulin-like domain

J Cell Biol. 2001; 154(2):427-434

Sato C, Ueno Y, Asai K, Takahashi K, Sato M, Engel A, Fujiyoshi Y

The voltage-sensitive sodium channel is a bell-shaped molecule with several cavities

Nature 2001; 490:1047-1051

Schaller KL, Caldwell JH

Expression and distribution of voltage-gated sodium channels in the cerebellum

Cerebellum. 2003; 2(1):2-9

Shotton D, White N

Confocal scanning microscopy: three-dimensional biological imaging

Trends Biochem Sci. 1989; 14(11):435-439

Silbernagl S, Despopoulos A

Taschenatlas der Physiologie

Stuttgart, 5. Auflage, 2001

Simpson P, Savion S.

Differentiation of rat myocytes in single cell cultures with and without proliferating nonmyocardial cells. Cross-striations, ultrastructure, and chronotropic response to isoproterenol.

Circ Res. 1982; 50(1):101-116

Spampanato J, Escayg A, Meisler MH, Goldin AL

Functional effects of two voltage-gated sodium channel mutations that cause generalized epilepsy with febrile seizures plus type 2

J Neurosci. 2001; 21(19):7481-7490

Squire JM

Muscle filament structure and muscle contraction

Annu Rev Biophys Bioeng. 1975; 4(00):137-63

Traub O, Eckert R, Lichtenberg-Fraté H, Elfgang C, Bastide B, Scheidtmann KH, Hülser DF, Willecke K

Immunochemical and electrophysiological characterization of murine connexin40 and -43 in mouse tissues and transfected human cells

Eur J Cell Biol. 1994; 64(1):101-112

Towbin H, Staehelin T, Gordon J

Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitro-cellulose sheets: procedure and some applications

Proc Natl Acad Sci U S A; 76(9):4350-4354

van Veen TA, van Rijen HV, Jongsma HJ

Physiology of cardiovascular gap junctions

Adv Cardiol. 2006; 42:18-40

Wallace RH, Wang DW, Singh R, Scheffer IE, George AL Jr, Phillips HA, Saar K, Reis A, Johnson EW, Sutherland GR, Berkovic SF, Mulley JC  
Febrile seizures and generalized epilepsy associated with a mutation in the Na<sup>+</sup>-channel beta1 subunit gene SCN1B  
Nat Genet. 1998; 19(4):366-370

Wallace RH, Scheffer IE, Barnett S, Richards M, Dibbens L, Desai RR, Lerman-Sagie T, Lev D, Mazarib A, Brand N, Ben-Zeev B, Goikhman I, Singh R, Kremmidiotis G, Gardner A, Sutherland GR, George AL Jr, Mulley JC, Berkovic SF  
Neuronal sodium-channel alpha1-subunit mutations in generalized epilepsy with febrile seizures plus  
Am J Hum Genet. 2001; 68(4):859-865

Walsh KB, Parks GE  
Changes in cardiac myocyte morphology alter the properties of voltage-gated ion channels  
Cardiovasc Res. 2002; 55(1):64-75

Watanabe H, Koopmann TT, Le Scouarnec S, Yang T, Ingram CR, Schott JJ, Demolombe S, Probst V, Anselme F, Escande D, Wiesfeld AC, Pfeufer A, Kääh S, Wichmann HE, Hasdemir C, Aizawa Y, Wilde AA, Roden DM, Bezzina CR  
Sodium channel beta1 subunit mutations associated with Brugada syndrome and cardiac conduction disease in humans  
J Clin Invest. 2008; 118(6):2260-2268

Yu FH, Westenbroek RE, Silos-Santiago I, McCormick KA, Lawson D, Ge P, Ferriera H, Lilly J, DiStefano PS, Catterall WA, Scheuer T, Curtis R

Sodium channel beta4, a new disulfide-linked auxiliary subunit with similarity to beta2

J Neurosci. 2003; 23(20):7577-7585

Yu FH, Catterall WA

Overview of the voltage-gated sodium channel family

Genome Biol. 2003; 4(3):207

## 8 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Darstellung von vernetztem Herzmuskelgewebe. Deutlich erkennbar sind die Disci intercalares zur Erregungsübertragung (aus Levick, 2000). .....	3
Abb. 2: Verlauf eines Aktionspotenzials mit Depolarisation (I.), Repolarisation (II.) und anschließender Nachhyperpolarisation (III.) (modifiziert nach Silbernagl et al., 2001) .....	6
Abb. 3: Darstellung der molekularen Struktur einer $\alpha$ -Untereinheit $\text{Na}_v1.2$ mit zwei $\beta$ -Untereinheiten $\beta1$ und $\beta2$ . Die vier Domänen mit den jeweils sechs Segmenten befinden sich intrazellulär und weisen die Porenöffnung zwischen den Segmenten S5 und S6 auf. Innerhalb des Segments S4 befindet sich der Spannungssensor. Intra- und extrazellulär liegende Proteinschleifen sind Angriffspunkte für verschiedene Gifte und dienen der Natriumkanalmodulation (modifiziert nach Yu et al., 2003). ...	7
Abb. 4: Dreidimensionale Struktur der Natriumkanal- $\alpha$ -Untereinheit. Schematische Darstellung einer elektronen-mikroskopischen Aufnahme. In der Mitte ersichtlich die zentrale Pore mit den Öffnungen nach intra- und extrazellulär. Symmetrische Anordnung der vier Domänen um die zentrale Pore. (Sato et al., 2001; modifiziert von Yu et al., 2003). .....	8
Abb. 5: neonatale Kardiomyozyten, Immunofärbung mit SP 19 (grün) und von $\alpha$ -Actinin (rot), Messbalken 10 $\mu\text{m}$ .....	26
Abb. 6: neonatale Kardiomyozyten, Immunofärbung mit SP 19 (grün) und von Connexin 43 (rot), Messbalken 10 $\mu\text{m}$ .....	26
Abb. 7: neonatale Kardiomyozyten, Immunofärbung von $\text{Na}_v1.1$ (grün) und $\alpha$ -Actinin (rot), Messbalken 10 $\mu\text{m}$ .....	28
Abb. 8: neonatale Kardiomyozyte, Immunofärbung von $\text{Na}_v1.1$ (grün) und $\alpha$ -Actinin (rot), Messbalken 10 $\mu\text{m}$ .....	28
Abb. 9: neonatale Kardiomyozyten, Immunofärbung von $\text{Na}_v1.1$ (grün) und Connexin 43 (rot), Messbalken 10 $\mu\text{m}$ .....	29
Abb. 10: neonatale Kardiomyozyte, Immunofärbung von $\text{Na}_v1.1$ (grün), Messbalken 10 $\mu\text{m}$ .....	29
Abb. 11: neonatale Kardiomyozyte, Immunofärbung von $\text{Na}_v1.2$ (grün) und $\alpha$ -Actinin (rot), Messbalken 10 $\mu\text{m}$ .....	29
Abb. 12: neonatale Kardiomyozyten, Immunofärbung von $\text{Na}_v1.2$ (grün) und Connexin 43 (rot), Messbalken 10 $\mu\text{m}$ .....	29
Abb. 13: neonatale Kardiomyozyte, Immunofärbung von $\text{Na}_v1.2$ (grün), Messbalken 10 $\mu\text{m}$ .....	30
Abb. 14: neonatale Kardiomyozyten, Immunofärbung von $\text{Na}_v1.3$ (grün) und $\alpha$ -Actinin (rot), Messbalken 10 $\mu\text{m}$ .....	31
Abb. 15: neonatale Kardiomyozyten, Immunofärbung von $\text{Na}_v1.3$ (grün) und Connexin 43 (rot), Messbalken 10 $\mu\text{m}$ .....	31
Abb. 16: neonatale Kardiomyozyte, Immunofärbung von $\text{Na}_v1.3$ (grün), Messbalken 10 $\mu\text{m}$ .....	31
Abb. 17: neonatale Kardiomyozyte, Immunofärbung von $\text{Na}_v1.5$ (SH1) (grün), Messbalken 10 $\mu\text{m}$ .....	31

Abb. 18: neonatale Kardiomyozyte, Immunofärbung von Na <sub>v</sub> 1.5 (SH1) (grün) und α-Actinin (rot), Messbalken 10 μm.....	31
Abb. 19: neonatale Kardiomyozyten, Immunofärbung von Na <sub>v</sub> 1.5 (SH1) (grün) und Connexin 43 (rot), Mess-balken 10 μm .....	31
Abb. 20: neonatale Kardiomyozyte, Immunofärbung von Na <sub>v</sub> 1.5 (SH8) (grün) und α-Actinin (rot), Messbalken 10 μm.....	32
Abb. 21: neonatale Kardiomyozyten, Immunofärbung von Na <sub>v</sub> 1.5 (SH8) (grün) und Connexin 43 (rot), Mess-balken 10 μm .....	32
Abb. 22: neonatale Kardiomyozyten, Immunofärbung von Na <sub>v</sub> 1.5 (SH8) (grün), Messbalken 10 μm .....	32
Abb. 23: neonatale Kardiomyozyten, Immunofärbung von Na <sub>v</sub> 1.6 (grün) und α-Actinin (rot), Messbalken 10 μm .....	33
Abb. 24: neonatale Kardiomyozyte, Immunofärbung von Na <sub>v</sub> 1.6 (grün), Messbalken 10 μm .....	33
Abb. 25: neonatale Kardiomyozyten, Immunofärbung von Na <sub>v</sub> 1.6 (grün) und Connexin 43 (rot), Messbalken 10 μm.....	33
Abb. 26: neonatale Kardiomyozyten, Immunofärbung von β 1 (6549) (grün) und α-Actinin (rot), Messbalken 10 μm.....	34
Abb. 27: neonatale Kardiomyozyten, Immunofärbung von β 1 (6549) (grün) und Connexin 43 (rot), Kolokalisation (gelb), Messbalken 10 μm.....	34
Abb. 28: neonatale Kardiomyozyten, Immunofärbung von β 1 (6550) (grün) und α-Actinin (rot), Messbalken 10 μm.....	35
Abb. 29: neonatale Kardiomyozyten, Immunofärbung von β 1 (6550) (grün) und Connexin 43 (rot), Kolokalisation (gelb), Messbalken 10 μm.....	35
Abb. 30: neonatale Kardiomyozyten, Immunofärbung von β 2 (grün) und α-Actinin (rot), Messbalken 10 μm .....	35
Abb. 31: neonatale Kardiomyozyten, Immunofärbung von β 2 (grün) und Connexin 43 (rot), Messbalken 10 μm .....	35
Abb. 32: neonatale Kardiomyozyte, Immunofärbung von β 2 (grün), Messbalken 10 μm .....	36
Abb. 33: neonatale Kardiomyozyte, Immunofärbung von β 3 (grün), Mess-balken 10 μm.....	36
Abb. 34: neonatale Kardiomyozyten, Immunofärbung von β 3 (grün) und α-Actinin (rot), Messbalken 10 μm .....	36
Abb. 35: neonatale Kardiomyozyten, Immunofärbung von β 3 (grün) und Connexin 43 (rot), Messbalken 10 μm.....	36
Abb. 36: neonatale Kardiomyozyten, Immunofärbung von β 4 (grün) und α-Actinin (rot), Messbalken 10 μm.....	37
Abb. 37: neonatale Kardiomyozyten, Immunofärbung von β 4 (grün) und Connexin 43 (rot), Messbalken 10 μm.....	37
Abb. 38: neonatale Kardiomyozyten, Immunofärbung von β 4 (grün), Messbalken 10 μm.....	37
Abb. 39: neonatale Kardiomyozyten, Immunofärbung mit Verwendung der Kontrollantigene des Peptide Blocks Na <sub>v</sub> 1.2, Messbalken 10 μm .....	39
Abb. 40: neonatale Kardiomyozyten, Immunofärbung mit Verwendung der Kontrollantigene des Peptide Blocks Na <sub>v</sub> 1.6, Messbalken 10 μm .....	39

Abb. 41: neonatale Kardiomyozyten, ohne Immunofärbung in Nativaufnahme,  
Messbalken 10  $\mu\text{m}$  ..... 39

Abb. 42: neonatale Kardiomyozyten, Immunofärbung ohne Verwendung der primären  
Antikörper zur Darstellung der Natriumkanäle („No Primary“),  
Messbalken 10  $\mu\text{m}$  ..... 39

## 9 Appendix

### 9.1 Abkürzungen

Die Abkürzungen der SI-Einheiten werden als bekannt vorausgesetzt.

%	Prozent
°C	Grad Celsius
ca.	circa
$\alpha$ -Act	$\alpha$ -Actinin
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AS	Aminosäure
BA	Bandbreite
BrdU	Bromodeoxyuridine
bzw.	beziehungsweise
$\text{Ca}^{2+}$	Calciumionen
CBFHH	calcium and bicarbonate free Hanks with Hepes
$\text{CO}_2$	Kohlenstoffdioxid
Cx 43	Connexin 43
Da	Dalton
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	DNA spaltendes Enzym
DM	Diffusionsmaximum
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EKG	Elektrokardiogramm
EX	Extinktion
FCS	foetal calf serum
g	Fallbeschleunigung
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure
HRP	horseradish peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)
Ig	Immunglobulin
$\text{K}^+$	Kaliumionen
MEM	minimum essential medium (Eagle)
MEM/5	minimum essential medium mit 5% FCS
min	Minuten
Mio	Million
mRNA	messenger Ribonucleic Acid
ms	Millisekunde
$\text{Na}^+$	Natriumionen
NGS	Normal Goat Serum

O <sub>2</sub>	Sauerstoff
o.g.	oben genannt
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
Pen/Strept	Penicillin/Streptomycin
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	Phosphationen
rpm	(runs per minute); Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
T&D	Trypsin und DNase
TB	Trisbuffer
TBS	Tris-buffered saline
Tris	Trishydroxymethylamionomethan
TTX	Tetrodotoxin
U	(units); Einheiten
z.B.	zum Beispiel

## 9.2 Tiere

Die trächtigen Wistar Ratten wurden von Harlan Winkelmann GmbH (Borchen, Deutschland) bezogen. Alle Experimente wurden von den zuständigen Behörden und Kommissionen der Universität Würzburg und der Regierung von Unterfranken genehmigt (Organentnahme AZ 44/03). Die Arbeit an den Tieren fand unter qualifizierter Aufsicht und nach vorheriger Einweisung statt.

## 9.3 Primäre Antikörper

Die hier nicht erwähnten Antikörper sind uns freundlicherweise aus dem Labor von William A. Catterall, Department of Pharmacology, University of Washington, Seattle, USA zur Verfügung gestellt worden. Sie sind selbst hergestellt und nicht kommerziell verfügbar.

Na <sub>v</sub> 1.1	Chemicon #AB5204
Na <sub>v</sub> 1.2	Chemicon #AB5206
Na <sub>v</sub> 1.3	Chemicon #AB5208
Na <sub>v</sub> 1.5 (Anti-SH1)	Alomone #AN-02

Na <sub>v</sub> 1.6 (Anti-Scn8a)	Alomone #ASC-009
SP 19	Alomone #ASC-003
β2	Alomone #ASC-007
Connexin 43	Millipore #MAB3068
α-Actinin	Sigma-Aldrich #A7811

#### 9.4 Sekundäre Antikörper

Biotinylated Anti-Rabbit IgG (made in Goat)	Vector Laboratories #BA1000
Fluorescein Avidin D	Vector Laboratories #A2001
Texas Red Anti-Mouse IgG (made in horse)	Vector Laboratories #TI2000

#### 9.5 Verwendete Chemikalien und Materialien

Alle nicht im Folgenden erwähnten Chemikalien wurden von der Firma Merck, Darmstadt, bezogen. Der Reinheitsgrad war mindestens „pro analysi“.

Acrylamid	BioRad, München
BrdU	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
BioRad Protein Assay Dye Reagent Concentrate	BioRad, München
Cellscraper	Sarstedt, Nümbrecht
DNase	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
ECL-Kit	Amershan, UK
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	J. T. Baker, Griesheim
EDTA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
FCS	Biochrom, Berlin
Full range Rainbow™	Amershan, UK
Molecular weight marker	
Goat Serum	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
HEPES	Serva, Heidelberg
Kulturschalen (1) 10cm	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Kulturschalen (2) Chamber slides	Nunc, Wiesbaden
Laemmli Probenpuffer	BioRad, München
L-Arginin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Igepal	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Magermilchpulver	Frema, Luneburg

MEM	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Nitrozellulosemembran	BioRad, München
Paraformaldehyd	Serva, Heidelberg
Penicillin	GibcoBRL, Karlsruhe
Proteinaseinhibitorcocktail tablets	Boehringer, Mannheim
Reagent Concentrate	BioRad, München
SDS	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Streptomycin	GibcoBRL, Karlsruhe
TEMED	BioRad, München
TRIS	Serva, Heidelberg
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypsin	Difco, USA
Tween 20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trizma Base	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Vectashield Mounting Medium	Vector Laboratories, UK
Vitamin B12	Serva, Heidelberg
Whatmann 3MM Papier	Whatmann, Dassel
x-ray Retina Film	Fotochemische Werke, Berlin

## 9.6 Geräteverzeichnis

Autoklav	Fedegari (Tecnomara) Nr.E, TypFV
Cellstrainer	Falcon
Elektrophoresekammer	Hoefer Scientific Instruments
Gelelektrophoresekammer	BioRad
Inkubator	Heraeus Function Line, Typ BB 16
Lichtmikroskop	Zeiss, axoivert 135
Konfokales Mikroskop	Nikon Eclipse E 600, C1 confocal System
Küvetten	Bradford
Pipetten	Eppendorf
Röntgenkassette	Amersham
Spannungsgerät	Hoefer Scientific Instruments
Spektrophotometer	Shimadzu, UV-160
Sterilbank	Bio Flow, Modell Antares 72
Sterilisator	Braun Biotech
Vortexer	Scientific Industries, Vortex-Genie 2
Western Blot Gelkammer	BioRad
Zählkammer	Brand
Zentrifuge (1)	Beckmann, CL-GPKR
Zentrifuge (2)	Kentro Biofuge pico
Zentrifuge (3)	Sigma

## 9.7 Verwendete Lösungen

### CBFHH, pH 7.4

HEPES, pH 7.4	20.06 mmol
NaCl	137 mmol
KCl	5.36 mmol
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0.81 mmol
Dextrose	5.55 mmol
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.44 mmol
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.34 mmol
Penicillin G	50 U/mL CBFHH
Streptomycin	50 µg/mL CBFHH

### Blockierlösung für Western Blot

Trockenmilchpulver	5 %
Tween 20	0.5 %
In PBS	

### Laufpuffer für Western Blot, pH 8,3 (RT)

Tris-Base	3 g/L
Glycin	6 g/L
SDS	1 g/L

### Paraformaldehyd 4%

Paraformaldehyd	10 g
PO <sub>4</sub> 0.4 mol	62.5 mL
Rühren und erhitzen auf 65 °C, dann hinzufügen von dH <sub>2</sub> O	187.5 mL
erneutes Erhitzen auf 60 °C, dann filtrieren	

### PBS, pH 7.4

NaCl	137 mmol
KCl	2.7 mmol
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4.3 mmol
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.4 mmol

### RIPA-Puffer

PBS	1x
Triton X-100	1 %
Sodiumdeoxycholate	0.5 %
Igepal	1 %
Proteinaseinhibitor	1:25

### Sammelgel 5%

1.0 M Tris, pH 6,8	2.5 mL
10 % SDS	100 µL
30 % Acrylamid	1.7 mL
dH <sub>2</sub> O	5.7 mL

	Ammoniumpersulfat	100 µL
	TEMED	10 µL
TB		
	Tris-HCl	0.1 M
	Trizma Base	1.94 g/L
	dH <sub>2</sub> O	1000 mL
TBS		
	TB, s.o.	1000 mL
	NaCl	8.76 g
Transferpuffer für Western Blot, pH 8,3		
	Tris-Base	0.48 M
	Glycin	0.39 M
	Methanol	20 %
Trenngel 5 %		
	1,0 M Tris, pH 8.8	5 mL
	10 % SDS	200 µL
	30 % Acrylamid	3.33 mL
	dH <sub>2</sub> O	11.37 mL
	Ammoniumpersulfat	200 µL
	TEMED	10 µL
Trypsin/Dnase-Verdauungslösung		
	CBFHH	s.o.
	Trypsin	1.5 mg/mL CBFHH
	DNase (2ng/ml 0.15 M NaCl)	1 µL/mL CBFHH
Zellkulturmediumzusätze in MEM/5, pH 7.1		
	L-Glutamin	291 mg
	Na-Bikarbonat	350 mg
	FCS	5 %
	Penicillin G	50 U/mL MEM
	Streptomycin	50 µg/mL MEM
	Vitamin B12	2 µg/mL MEM
	BrdU	3.074 mg/mL MEM

## Danksagung

Herrn Priv.-Doz. Dr. Sebastian Maier danke ich herzlich für die Überlassung des interessanten Themas und für seine hervorragende Unterstützung in allen anstehenden Fragen. Ohne ihn wäre ein unvergesslicher Forschungsaufenthalt in Seattle, USA nie möglich gewesen. Maßgeblich prägte er als Vorbild mein medizinisches und wissenschaftliches Interesse und Handeln.

Meine Verbundenheit gilt Frau Jenny Muck und Frau Irina Davydenko, die mich auf meinen ersten Schritten im Labor begleiteten. Ohne diese Hilfe wäre es unendlich schwerer gewesen. Ebenso bedanke ich mich bei Herrn Dr. Alexander Maaß, Frau Dr. Susann Kaufmann, Herrn Dr. Christoph Zechner, Herrn Prof. Dr. Kai Schuh und Herrn Marco Abeßer für die fortwährende, freundschaftliche Unterstützung bei meiner Arbeit.

Ganz besonders möchte ich an dieser Stelle auch dem Forscherteam des Department of Pharmacology, University of Washington, Seattle, USA danken. Prof. Dr. Ruth Westenbroek, Prof. Dr. Todd Scheuer, Dr. Dan Beachem, Dr. Frank Yu und Prof. Dr. William Catterall nahmen mich herzlichst auf, und mit ihrer unermüdlichen Hilfsbereitschaft erlernte ich viele spannende Labormethoden.

Danken möchte ich auch allen wissenschaftlichen Mitarbeitern des Labors „Molekulare Kardiologie“ in der Medizinischen Klinik I der Universitätsklinik Würzburg.

Herrn Prof. Dr. Erhard Wischmeyer danke ich für die Übernahme des Koreferates.

Für die kontinuierliche Diskussion und Unterstützung bei meiner Dissertation möchte ich Herrn Ralf Schneider danken.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir mein Studium ermöglichten und mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

## Lebenslauf

Geburtsdatum/-ort 10. Mai 1980 in Halle (Saale)  
Adresse Corrensstrasse 72, 48149 Münster  
E-Mail [bischoff.sebastian@gmail.com](mailto:bischoff.sebastian@gmail.com)  
Staatsangehörigkeit deutsch

### Ausbildung

1990 – 1998 Europagymnasium „Am Lindenberg“ Ilmenau  
1998 – 1999 Zivildienst: OP-Pflege und Instrumentensterilisation

### Studium

Seit 1999 Studium der Humanmedizin an der Bayer. Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
03/2002 Physikum  
03/2003 1. Staatsexamen  
03/2005 2. Staatsexamen  
11/2006 3. Staatsexamen

### Famulaturen/Praktisches Jahr

Unfallchirurgie Krankenhaus Ilmenau (2002)  
Dermatologie Hautarztpraxis Ilmenau (2003)  
Plastische Chirurgie Markuskrankenhaus Frankfurt (2003)  
Intern. Intensivmedizin Universitätsklinikum Würzburg (2004)  
PJ Chirurgie Kantonsspital Frauenfeld/Schweiz (2006)  
PJ Innere Medizin Kantonsspital Frauenfeld/Schweiz (2006)  
PJ Anästhesie Universitätsklinikum Würzburg (2006)

### berufliche Tätigkeit

seit 02/07 wissenschaftlicher Mitarbeiter der Klinik und Poliklinik für Anästhesie und operative Intensivmedizin, Uniklinikum Münster (Direktor Prof. Dr. Dr. h.c. H. Van Aken)