Zeitschrift: Schweizer Archiv für Tierheilkunde SAT : die Fachzeitschrift für Tierärztinnen und Tierärzte = Archives Suisses de Médecine Vétérinaire ASMV : la revue professionnelle des vétérinaires

Herausgeber: Gesellschaft Schweizer Tierärztinnen und Tierärzte

Band: 142 (2000)

Heft: 5

Artikel: Speziesdifferenzen kardialer Natriumkanäle

Autor: Mevissen, M. / Denac, H. / Haltiner, R.

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-591986

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 07.08.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

Speziesdifferenzen kardialer Natriumkanäle

M. Mevissen, H. Denac, R. Haltiner und G. Scholtysik

Veterinär-pharmakologisches Institut der Universität Bern

Zusammenfassung

Es wird ein Projekt beschrieben, in dem Speziesdifferenzen der Na^+-Kanäle des Myokards mit elektrophysiologischen und molekularbiologischen Methoden erforscht werden. Ausgangspunkt war die Beobachtung, dass neuartige synthetische Wirkstoffe (DPI 201-106, SDZ 211-939), welche die Ionenleitfähigkeit der Kanäle verlängern und positiv inotrop wirken, beim Rind unwirksam sind, im Gegensatz zu allen anderen untersuchten Spezies. Ziel des Projektes ist es, das Na^+-Kanal-Protein des Rinderherzens zu klonieren und molekular vergleichend zu charakterisieren, um Grundlagenkenntnisse über die Steuerung der Kanäle zu erweitern und diese zur Entwicklung von praxistauglichen Inotropika anzuwenden. Eine funktionelle Charakterisierung der kardialen Isoform des Na^+-Kanals des Rindes wird in Oozyten *(Xenopus laevis)* vorgenommen, mit dem Ziel der Identifizierung der Bindungsstelle der synthetischen Liganden.

Schlüsselwörter: Natriumkanäle – Myokard – Rind – Speziesunterschiede

Différences interraciales dans les canaux sodiques cardiaques

Cette étude électrophysiologique, effectué avec des méthodes de biologie moléculaire, décrit la différence interraciale des canaux sodiques cardiaques. Des études préalables ont montré l'efficacité des nouvelles substances synthétisées (DPI 201-106, SDZ 211-939) qui prolongent la conduction ionique des canaux et ont un effet inotrope positif. Ces molécules sont inefficaces chez les bovins, au contraire de toutes les autres espèces animales examinées. En clonant et isolant la séquence de l'isoforme bovine des canaux sodiques du myocarde afin d'obtenir les caractéristiques moléculaires comparatives, nous espérons étendre les connaissances de base sur les mécanismes d'action des canaux sodiques dans l'idée de développer à l'avenir de nouveaux agents inotropes positifs. Une caractérisation fonctionnelle de l'isoforme du canal sodique du myocarde bovin est faite dans des oocytes *(xenopus laevis)* avec le but d'identifier le point de fixation des particules synthétiques mentionnées.

Mots-clé: canaux sodiques cardiaques – myocarde – bovin – différences interriciales

Einleitung

Die Untersuchungen an kardialen Ionenkanälen bilden einen Schwerpunkt der Grundlagenforschung am Veterinär-pharmakologischen Institut der Universität Bern. Wir konzentrieren uns dabei auf die Natrium-(Na^+-)Kanäle der Herzzellen. Die Ionenleitung durch den Kanal wird durch das Membranpotential reguliert. Hierbei ist ein Spannungsfühler im oder am Kanal erforderlich. Durch Vorgänge der Aktivierung und Inaktivierung des Kanals wird die Ionenleitung reguliert. Beide Vorgänge werden durch Depolarisation ausgelöst. Wirkstoffe, die gezielt Na^+-Kanal-Wirkungen vermitteln, benötigen entsprechende Bindungsstellen. Liganden für diese Bindungsstellen sind bekannt, wobei nur wenige für das Herz spezifisch sind. Zu diesen Liganden gehören äusserst potente Toxine wie Tetrodotoxin und Saxitoxin (Bindungsstelle 1, am Selektivitätsfilter), Batrachotoxin, Ceveratrumalkaloide und Akonitin (Bindungsstelle 2, an m- und h-Toren, welche dann permanent offen gehalten werden) oder Polypeptide von Skorpionen und Seeanemonen (Bindungsstelle 3) (Scholtysik und Quast, 1986). Letztere sind für uns von besonderem Interesse. Auf andere Bindungsstellen des Na^+-Kanals kann hier verzichtet werden, da sie für die Wirkung der in diesem Projekt untersuchten Substanzen nicht von Bedeutung sind. Die durch Liganden der Bindungsstellen 2 und 3 besetzten Kanäle können ihr Inaktivierungstor nicht mehr betätigen. Es werden die h-Tore in geöffneter Position fixiert, während die m-Tore den normalen Zyklus durchlaufen. Die wesentliche elektrophysiologische Folgeerscheinung ist die Verlängerung der Dauer des Aktionspotentials, da die Öffnungszeit der Na^+-Kanäle verlängert ist. Die funktionelle Konsequenz ist eine Belastung der Herzzellen mit Na^+, was dann via Na^+-Ca^{++}-Austausch zu einem positiv inotropen Effekt führt (Scholtysik, 1989). Dieser Effekt ist auch prinzipiell von den Herzglykosiden her bekannt.

 SAT ©Verlag Hans Huber, Bern 2000

Unsere Arbeiten zielen also sowohl auf die Gewinnung grundlegender Erkenntnisse der Steuerung kardialer Na^+-Kanäle ab als auch auf die praktische Anwendung neuer Wirkstoffe als Inotropika.

Synthetische Na^+-Kanal-Liganden

Es ist uns gelungen, mit synthetisch hergestellten Stoffen eine neue Klasse von Verbindungen aufzufinden, die die Na^+-Kanäle des Herzens in der erwünschten Weise modulieren (Scholtysik et al., 1985; Scholtysik und Rüegg, 1987; Scholtysik, 1989; Scholtysik et al., 1993). Im Gegensatz zu den bereits genannten Toxinen wie Veratridin und Batrachotoxin oder Seeanemonentoxinen zeigen diese Substanzen keine proarrhythmogene und vasokonstriktorische Wirkung. Sie sind also für den therapeutischen Einsatz bei Herzversagen geeignet. Die chemischen Strukturen wirksamer Derivate sind in Abbildung 1 dargestellt. Es handelt sich um Indole und Purine. Diese Grundstrukturen wurden von anderen Arbeitsgruppen aufgegriffen und weiterentwickelt (Raap et al., 1997; Doggrell und Brown, 1997; Tsushima et al., 1999).

Speziesdifferenzen

Die umfangreichsten pharmakologischen Informationen liegen für DPI 201-106 vor. Die Bibliografie für diese Verbindung umfasst inzwischen 186 Publikationen weltweit (bei den Autoren erhältlich). Es ist erwiesen, dass DPI 201-106 bei allen bisher untersuchten Tierarten inklusive am menschlichen Herzen insofern wirksam ist, als dass es Aktionspotentiale verlängert und positiv inotrop wirkt. Zu den literaturbekannten in dieser Hinsicht untersuchten Spezies zählen Affe, Meerschweinchen, Ratte, Katze, Kaninchen, Hund, Hamster, Frettchen, Pferd, Schwein, Schaf und Ziege (Scholtysik und Rüegg, 1987; Schaad et al., 1999). Die einzige Ausnahme hiervon macht das Myokard des Rindes (Scholtysik und Schaad, 1992; Schaad et al., 1999). Unwirksamkeit am Rindermyokard wurde auch für SDZ 211-939 gefunden (Schaad et al., 1999). Diese Speziesdifferenz hochaffiner Liganden ist insofern interessant, als dass vermutet werden muss, dass das Na^+-Kanalprotein des Rinderherzens eine Differenz gegenüber allen anderen untersuchten Spezies aufweisen muss.

Bemerkenswert ist, dass sich die Wirkungslosigkeit beim Rind nur mit den synthetischen Liganden DPI 201–106 und SDZ 211-939 zeigt, deren Bindungsstellen nicht definiert sind. Ähnlich wirkende Verbindungen wie Veratridin und ATX II (Seeanemonentoxin) sind am Rind wirksam. Zum Vergleich sind in Tabelle 1 aus Konzentrations-Wirkungs-Kurven Werte für die Verlängerung der Aktionspotentialdauer bei Rind und Schwein aufgeführt.

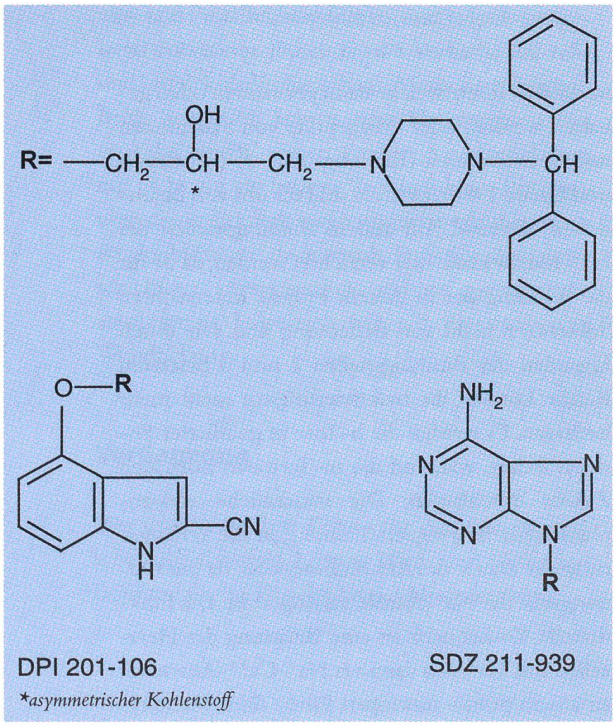

Abbildung 1: Chemische Strukturen der synthetischen Verbindungen DPI 201-106 und SDZ 211-939.

Versuch zur molekularen Charakterisierung des Na^+-Kanals

Um die Gründe für die auffallende Speziesdifferenz zu untersuchen, haben wir ein molekularbiologisches Projekt initiiert. Das Ziel dieses Projektes ist, den spannungsabhängigen kardialen Na^+-Kanal des Rindes zu klonieren und mögliche Unterschiede in der Sequenz der α-Untereinheit des kardialen Na^+-Kanals im Vergleich zu der anderer Spezies zu analysieren. Der entsprechende Klon der α-Untereinheit des kardialen Na^+-Kanals von Ratte und Mensch ist erhältlich. Die Struktur des Na^+-Kanals ist in verschiedenen Reviews (Marban et al., 1998, Fozzard and Hanck, 1996, Catterall 1995, Steinberg et al., 1998) detailliert beschrieben.

Da im Herzen zwei Isoformen des spannungsabhängigen Na^+-Kanals vorkommen, nämlich eine kardiale und eine neuronale Isoform, haben wir spezifische Sonden hergestellt, die geeignet sind, die jeweilige Isoform zu identifizieren. Diese cRNA-Sonden können zur Identifikation von Herz- und Gehirnisoform mittels Northern Blots verwendet werden.

Für die Herstellung eines «full length clones» des kardialen Na^+-Kanals des Rindes wurde in einem

Tabelle 1: Verlängerungen transmembranärer ventrikulärer Aktionspotentiale um 50% bei 30% Repolarisation.

Wirkstoff	Bindungsstelle	Rind	Schwein
Veratridin	2	0,42 µM	0,22 µM
ATX II	3	0,09 µM	0,25 µM
DPI 201-106	unbestimmt	**unwirksam**	6,5 µM
SDZ 211-939	unbestimmt	**unwirksam**	2,9 µM

ersten Schritt aus Gewebeproben des Herzens vom Kalb, die in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden, Total-RNA isoliert. Aus dieser RNA-Matrize wurde mittels RT-PCR-(reverse transcription polymerase chain reaction) und RACE-(rapid amplification of cDNA ends) Techniken die cDNA, die die codierende Sequenz für die kardiale Isoform des Na^+-Kanals des Rindes enthält, amplifiziert. Durch Klonierung und anschliessende Sequenzierung erhielten wir eine Nukleotidsequenz einer Grösse von 6,5 kB. Die erhaltene Sequenz wurde mittels BLAST-Suche analysiert. Die Analyse ergibt ein offenes Leseraster von 2025 Aminosäuren, die eingefasst sind von einer kurzen nicht translatierten Region am 5`-Ende und einer längeren nicht translatierten Region am 3`-Ende. Der Vergleich mit der Herzisoform des Menschen und der Ratte zeigt eine Übereinstimmung des spannungsabhängigen Na^+-Kanals von 89,7%.

Zur funktionellen Charakterisierung sollen die Na^+-Kanalproteine (cRNA der klonierten α-Untereinheit des kardialen Na^+-Kanals) von Rind und Ratte nachfolgend in Oozyten des Frosches *«Xenopus laevis»* injiziert und elektrophysiologisch, mittels Zwei-Elektroden-Spannungsklemmtechnik, untersucht werden. Die Expression von Ionenkanälen in Oozyten ist ein geeignetes Modellsystem, um Struktur-Wirkungs-Beziehungen von spannungsabhängigen Ionenkanälen zu untersuchen. In diesem System sollen eine funktionelle Charakterisierung des kardialen spannungsabhängigen Na^+-Kanals des Rindes und eine mögliche Identifizierung der Bindungsstelle von DPI 201-106 bzw. SDZ 211-939 erfolgen.

Literatur

Buggisch D., Isenberg G., Ravens U., Scholtysik G. (1985): The role of sodium channels in the effects of the cardiotonic compound DPI 201-106 on contractility and membrane potentials in isolated mammalian heart preparations. European J. Pharmacol. 118, 303–311.

Catterall W.A. (1995): Structure and function of voltage-gated ion channels. Ann. Rev. Biochem. 64, 493–531.

Denac H., Haltiner R., Mevissen M., Schaad A., Lis J., Scholtysik G. (1999): Identification of sodium channel isoform-specific cRNA probes. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 359 (Suppl.3), R109.

Doggrell S.A., Brown L. (1997): Sodium channel modulation and positive inotropism. Ion Channel Modulators / Current Drugs. 2: (5), 153–158.

Fozzard H.A., Hanck D.A. (1996): Structure and function of voltage-dependent sodium channels: Comparison of Brain II and cardiac isoforms. Physiological Reviews 76 (3), 887–926.

Marban E., Yamagishi T., Tomaselli G.F. (1998): Structure and function of voltage-gated sodium channels. J. Physiology508 (3), 647–657.

Raap A., Armah B., Mest H.J., Stenzel W., Schloos J. Blechacz W. (1997): Investigations of the mechanism of the positive inotropic action of BDF 9148: comparison with DPI 201-106 and the enantiomers. J. Cardiovasc. Pharmacol. 29: (2), 164–173.

Schaad A., Denac H., Mevissen M., Haltiner R., Scholtysik G. (1999): Cardiac sodium channel species differences. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 359 (Suppl.3), R109.

Scholtysik G. (1989): Cardiac Na+ channel activation as a positive inotropic principle. J. Cardiovasc. Pharmacol. 14 (Suppl. 3), S24–S29.

Scholtysik G., Quast U. (1986): Sodium channel pharmacology in mammalian cardiac cells: extension by DPI 201-106. Triangle 25, 105–116.

Scholtysik G., Quast U., Schaad A. (1986): Evidence for different receptor sites for the novel cardiotonic S-DPI 201-106. ATX II and veratridine on the cardiac sodium channel. European J. Pharmacol. 125, 111–118.

Scholtysik G., Rüegg P. (1987): DPI 201-106. In: New Cardiovascular Drugs 1987, 173–188, ed. by A. Scriabine, Raven Press, New York.

Scholtysik G., Salzmann R., Berthold R., Herzig J.W., Quast U., Markstein R. (1985): DPI 201-106, a novel cardioactive agent. Combination of cAMP-independent positive inotropic, negative chronotropic, action potential prolonging and coronary dilatory properties. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 329, 316–325.

Scholtysik G., Salzmann R., Quast U., Berthold R., Ott H., Schaad A., Wettwer E. (1993): SDZ 211-939, a new cardiotonic Na+current activator. Naunyn-Schmiedeberg`s Arch. Pharmacol. 347 (Suppl.), R.87.

Scholtysik G., Schaad A. (1992): Cardiac sodium channel variabilities in farm animals. J. Mol. Cell. Cardiol. 24 (Suppl. I), 272.

Steinberg M.I., McCall E., Mest H.-J., Raap A., Wright T. (1998): Cardiac sodium channels as targets for new inotropic agents. Heart Failure Reviews 2, 173–193.

Tsushima R.G., Kelly J.E., Salata J.J., Liberty K.N., Wasserstrom J.A. (1999): Modification of cardiac Na^+ current by RWJ 24517 and its enantiomers in guinea pig ventricular myocytes. J. Pharmacol. Exp. Therap. 291: (2), 845–855.

Korrespondenzadresse

Dr. Meike Mevissen, Veterinär-pharmakologisches Institut der Universität Bern, Länggass-Strasse 124, CH-3012 Bern, E-Mail: meike.mevissen@vpi.unibe.ch, Fax +41 31 631 26 30