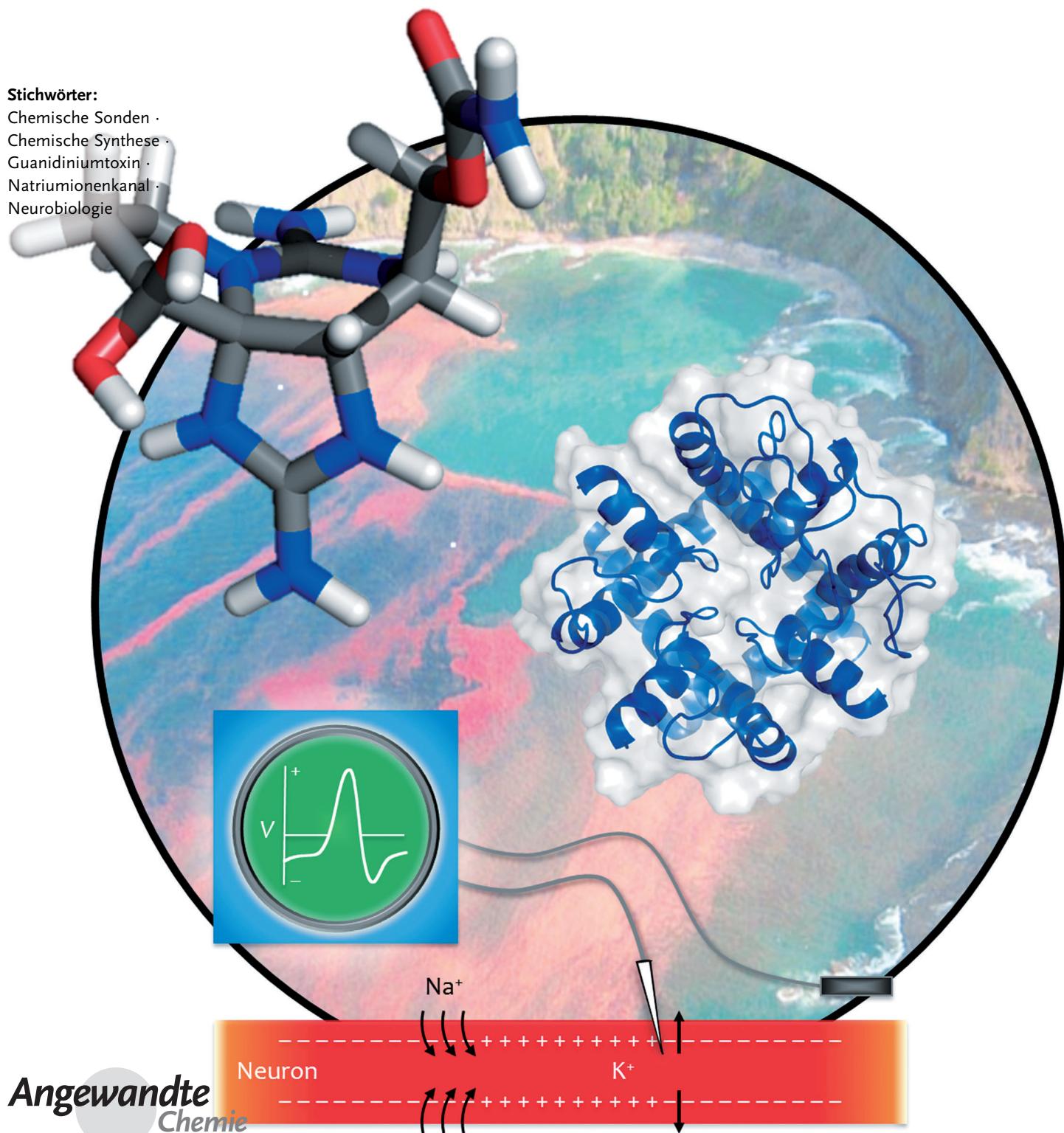


Saxitoxin

Arun P. Thottumkara, William H. Parsons und J. Du Bois*

Stichwörter:

Chemische Sonden ·
Chemische Synthese ·
Guanidiniumtoxin ·
Natriumionenkanal ·
Neurobiologie



Die lähmend wirkende Verbindung (+)-Saxitoxin (STX), die mit den Roten Tiden der Meere und der paralytischen Schalentiervergiftung assoziiert wird, ist ein potenter Inhibitor der elektrischen Leitung in erregbaren Zellen. Seine tödlichen Wirkungen sind eine Folge der Hemmung spannungsgesteuerter Natriumionenkanäle (Na_V), d. h. der Proteine, die für die Initierung und Fortpflanzung von Aktionspotentialen unerlässlich sind. Ein entscheidender Punkt für den Fortschritt der Ionenkanalforschung und die Identifizierung und Charakterisierung von Na_V war die Verfügbarkeit von STX und des verwandten Guanidiniumderivats Tetrodotoxin. Die Besonderheit von STX zeigt sich in seiner Funktion und Form, weist dieses außerordentlich kompakte Dikation doch mehr Heteroatome als Kohlenstoffzentren auf. Dieser Aufsatz gibt einen Überblick über die Chemie und die chemische Biologie dieses faszinierenden Naturstoffs und zeigt Perspektiven für die gezielte Erforschung der Struktur und Funktion von Na_V auf.

Aus dem Inhalt

1. Einleitung	5869
2. Saxitoxin: ein potentes Neurotoxin	5870
3. De-novo-Synthese von Saxitoxin	5874
4. Bestimmung der Toxinbindungsstelle im Na_V	5881
5. Molekulare Sonden für Na_V Untersuchungen	5886
6. Schlussbemerkungen	5890

1. Einleitung

Neurotoxische Stoffe dienen als wichtige chemische Hilfsmittel zum Verständnis der Proteinfunktionen im Zusammenhang mit den hoch komplexen ionischen Mechanismen der elektrischen Übertragung in Zellen.^[1] Ein Hauptwirkort für viele dieser giftigen Substanzen ist der spannungsgesteuerte Na^+ -Ionenkanal (Na_V). Diese Gruppe von Transmembranproteinen ist zuständig für die Erzeugung des Na^+ -Stroms, der der Einleitung und Fortpflanzung des Aktionspotentials in Nerven und Muskelfasern zugrunde liegt.^[2] Die gegenwärtigen Vorstellungen zu Struktur und Wirkung von Na_V beruhen hauptsächlich auf umfangreichen biochemischen und elektrophysiologischen Untersuchungen sowie Struktur-Aktivitäts-Beziehungen der Toxine. Dabei kann die Bedeutung der beiden speziellen Toxine Tetrodotoxin (TTX)^[3–6] und Saxitoxin (STX)^[7] für die Forschung an Ionenkanälen nicht hoch genug eingeschätzt werden (Abbildung 1). Nach den wegweisenden Arbeiten von Hodgkin und Huxley,^[9] die die Aufgabe der Ionenkanalproteine bei der Modulierung des elektrischen Stroms erkennen ließen, bewiesen Untersuchungen durch Narahashi, Moore,^[8] Hille und Armstrong^[10] die Einzigartigkeit von TTX als Na_V -selektiver Blocker. Gleichzeitige Studien mit STX ergaben, dass diese ungewöhnliche Bisguanidiniumverbindung ein funktionelles Äquivalent von TTX ist.^[11–13] Beide Toxine haben umfangreiche Verwendung als molekulare Reagentien zur Charakterisierung von Na_V und als Hilfsmittel in der Elektrophysiologie zur selektiven Blockierung von Natriumströmen gefunden. Bisher wird die Bindungsaffinität von Tetrodotoxin gegenüber einzelnen Na_V -Isoformen (d. h. nanomolar oder mikromolar) zur Klassifizierung von Ionenkanal-Subtypen als „empfindlich“ oder „resistant“ genutzt. Wegen der Einmaligkeit von TTX und STX bezüglich Form und Funktion ist die chemische, biologische und pharmakologische Literatur zu diesen Verbindungen ausgesprochen umfangreich. Diese

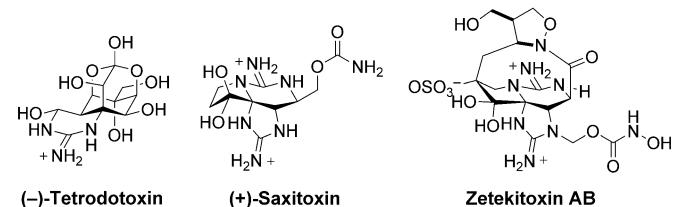


Abbildung 1. Natürlich vorkommende Guanidiniumtoxine: wirksame Inhibitoren von spannungsgesteuerten Natriumkanälen.

reiche Geschichte, die noch lange nicht beendet ist, erinnert an die zentrale Rolle von Naturstoffen in der Wirkstoff-Forschung.

Die Verwendung niedermolekularer Verbindungen wie TTX und STX als chemische Sonden zur Untersuchung der komplexen Funktion von Kanalproteinen bei der Elektrogenese bot eine Fülle von Möglichkeiten in der chemischen und biologischen Forschung.^[7,14] Angesichts der umfangreichen Literatur zu diesem Thema haben wir uns entschlossen, diesen Aufsatz ausschließlich auf Arbeiten über STX zu beschränken. Saxitoxin gehört zu einer Gruppe von inzwischen mehr als 50 verwandten, natürlich vorkommenden Verbindungen, die als paralytisch wirkende Schalentiergifte (PSPs) bekannt sind. Auch Zetekitoxin AB, das aus dem Giftfrosch *Atelopus zeteki* isoliert wurde und ein äußerst wirksamer Inhibitor von Na_V ist, besitzt die Molekülstruktur von STX.^[15] Die Häufung von Stickstoffatomen in dem tricyclischen Perhydropyrrrolopuringerüst dieser Sekundärmetaboliten bietet zahlreiche Herausforderungen für die Synthesechemie. Die Möglichkeit zur strukturellen Derivatisierung

[*] A. P. Thottumkara, Dr. W. H. Parsons, Prof. J. Du Bois
Department of Chemistry, Stanford University
Stanford, CA 94305-5080 (USA)
E-Mail: jdubois@stanford.edu

von STX an mehreren Positionen ist ein klarer Vorteil gegenüber TTX als Ausgangspunkt für die Entwicklung Na_V-selektiver chemischer Sonden. Wir haben versucht, diese beiden Aspekte der inzwischen mehr als 50 Jahre umfassenden STX-Forschung herauszustellen. Interessierte Leser dieses Aufsatzes sollten auch auf andere neuere, umfassende Abhandlungen zu diesem Thema zurückgreifen.^[7,16]

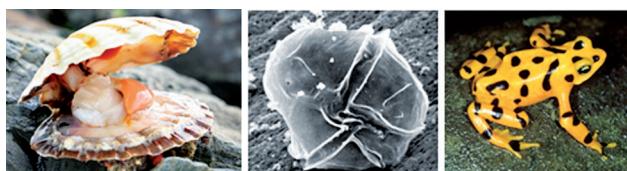


Abbildung 2. Natürliche Quellen von Guanidiniumtoxinen: Muschel, der Dinoflagellat *Gonyaulax Catenella* (Mitte) und der panamaische Stummelfußfrosch *Atelopus Zeteki* (rechts).

2. Saxitoxin: ein potentes Neurotoxin

2.1. Historischer Abriss

Saxitoxin gehört zu den giftigsten bekannten Nicht-eiweißstoffen, und sein Erscheinen in der medizinischen Literatur lässt sich über Jahrhunderte verfolgen. Der erste dokumentierte Bericht über eine paralytische Schalentiervergiftung (PSP, paralytic shellfish poisoning) stammt von 1798^[17] und stellt eindrucksvoll eine durch giftige Muscheln verursachte Erkrankung mehrerer Besatzungsmitglieder dar, die die kanadische Küste von British Columbia erforschten. Andere schriftliche Zeugnisse aus dieser Zeit belegen, dass die giftige Natur von Schalentieren während bestimmter jahreszeitlicher Perioden bei der örtlichen Bevölkerung der Küstenregionen von Alaska bekannt war, und von Heinrich Johan Holmberg ist eine eindeutige Beschreibung erhalten:^[18]

*„When we found ourselves in Pogibshii proliv (Peril Strait), we turned to eating mussels (*Mytilis*) because of a shortage of fresh fish. They must have been poisonous at this time of year for a few hours later more than half of our men died. Even I was near death, but remembering my father's advice, to eat smelt (*korushki*) at such times, I vomited and recovered my health.“*

Saxitoxin und eine Reihe eng verwandter Derivate werden von verschiedenen einzelligen Dinoflagellatalgen und Süßwasser-Cyanobakterien gebildet (Abbildung 2).^[19] Die paralysierende Wirkung von Saxitoxin wurde vor mehr als 80 Jahren von Sommer erkannt, der als erster Letalitätsdaten für Extrakte aus Schalentieren von der Pazifikküste der Vereinigten Staaten erhob.^[20] Weichtiere, die sich durch Filtern des Wassers ernähren, können die Toxine bis zu letalen Mengen anreichern, vor allem während der mit der „Roten Tide“ einhergehenden Algenblüte.^[21] Schwierigkeiten beim Sammeln und Messen der Toxine führten zu höchst unter-

schiedlichen Werten für die toxische Dosis STX beim Menschen. Aus einer Reihe von Vergiftungsfällen wurde eine geschätzte Menge von 0.5–1 mg STX als letale Dosis für eine Person durchschnittlicher Größe ermittelt.^[22] Bei Schalentieren, die diese Giftstoffe anreichern, wurden Toxinspiegel von 20000 µg je 100 g Muschelfleisch gefunden (Miesmuschel, *Mytilus edulis*).^[23] Die amerikanische Food and Drug Administration (FDA) hält Schalentiere mit mehr als 80 µg STX/100 g Fleisch für nicht sicher.

Die genaue Ursache der paralytischen Schalentiervergiftung erkannte Sommer 1927, als eine Massenvergiftung durch Muscheln vor der Küste von Zentralkalifornien mit der Blüte der Dinoflagellatenart *Gonyaulax catenella* (nun *Alexandria catenella*) korrelierte.^[20c,d] Extrakte aus Muscheln und aus Algen hatten ähnliche physiologische Wirkungen und führten bei der Verabreichung an Mäuse zum Tod. An diese Arbeit anknüpfend sammelte Sommer mit Unterstützung der US Navy 5000 Liter „rotes“ Meerwasser während einer Algenblüte nahe der Monterey Bay. Diese Anstrengungen ergaben 90 mg STX (500 000 Mauseinheiten), obwohl die damaligen Trennmethoden für die Reinigung dieses Materials unzureichend waren.^[1a] Eine nachfolgende Arbeit von Schantz und Sommer zur Isolierung von STX aus 280 kg feuchtem Siphon der alaskischen Buttermuschel erwies sich als effizienterer Zugang zu dem Gift und ergab 1.5 g der Substanz. Mit der gleichen Methode konnten Wissenschaftler der Biological Laboratories in Fort Detrick in Maryland 20 g(!) der Reinsubstanz erhalten.^[1a]

2.2. Spannungsgesteuerte Natriumionenkanäle (Na_V)

Der Zugang zu großen Mengen an gereinigtem STX ermöglichte nachfolgende Arbeiten zur Aufklärung der molekularen Grundlagen für seine paralytischen Wirkungen.



Arun Thottumkara wurde 1986 in East Lansing, Michigan, geboren und studierte an der Harvard University, wo er bei Prof. Eric N. Jacobsen Forschungen zur asymmetrischen Katalyse durchführte. Derzeit promoviert er bei Prof. Justin Du Bois an der Stanford University über die Entwicklung von metallkatalysierten Carbocyclisierungen und die Untersuchung spannungsgesteuerter Natriumkanäle in Neuronen des zentralen und peripheren Nervensystems.



William Parsons, geboren 1985 in Fort Knox, Kentucky, studierte am Williams College bei Prof. Sarah Goh und promovierte 2013 an der Stanford University bei Prof. Justin Du Bois über die Entwicklung von Saxitoxin-derivaten als molekulare Sonden zur Untersuchung spannungsgesteuerter Natriumkanäle. Derzeit absolviert er ein Postdoktorat bei Prof. Benjamin Cravatt am Scripps Research Institute.

Mitte der 1960er Jahre entdeckten Evans,^[12] Kao und Nishiyama,^[11] dass STX die Natriumströme im entnommenen Ischiasnerv vom Frosch selektiv unterbrechen konnte. Zeitgleiche Versuche durch Narahashi, Moore und Scott^[8] an Hummeraxonen ergaben die gleiche Wirkungsweise für TTX. Die Wirkungen der beiden Toxine traten nur dann auf, wenn das Gift von der extrazellulären Seite der spannungsversorgten Zelle verabreicht wurde.^[8,11,12] Diese wegweisenden Ergebnisse erschienen genau rechtzeitig, denn Arbeiten von Hodgkin, Huxley und Katz, die nachwiesen, dass der selektive Transport von Na^+ und K^+ die Fortpflanzung des Aktionspotentials unterstützt, wurden im Wesentlichen ohne molekulare Kenntnisse der Ionenkanalproteine durchgeführt.^[9] Wie Na^+ - und K^+ -Ionen die lipophile Zellmembran selektiv durchqueren können, wurde erst Jahre später verstanden. Die Spezifität von STX und TTX zur Blockierung des Na^+ -Flusses (sowie von Et_4N^+ zur selektiven Inhibition von K^+ -Kanälen) ermöglichte eine saubere Trennung der Ionenströme und löste zahlreiche Forschungen über die Molekülstruktur und Funktion der Ionenkanalproteine aus.

Ionenkanäle sind die molekularen Maschinen, die die passive Diffusion von Ionen durch die Zellmembran ermöglichen und in allen tierischen, pflanzlichen und bakteriellen Zellen vorkommen (Abbildung 3).^[2a] Solche Kanäle steuern sehr genau die Bewegung von Na^+ -, K^+ -, Ca^{2+} - und Cl^- -Ionen, die zu kleinen vorübergehenden Änderungen der Ionenkonzentration in den Zellen führen. Diese Veränderungen sind wiederum an so unterschiedliche Vorgänge wie die Erregung von Nerven und Muskeln, die Hormonsekretion und die sensorische Transduktion gekoppelt.

Spannungsgesteuerte Natriumionenkanäle sind zuständig für die Anstiegsphase des Aktionspotentials in elektrisch erregbaren Zellen.^[2] Als Antwort auf eine Erregung, die das Membranpotential aus seinem Ruhewert bewegt, öffnen diese Proteine gemeinsam und ermöglichen das rasche Einströmen von Natriumionen in die Zelle. Die Depolarisierung der Membran wird durch spannungsgesteuerte Kaliumionenkanäle umgekehrt, und ATP-gesteuerte Na/K -Austauscher halten das Ungleichgewicht von Na- und K-Ionen gegen ihr Nernst-Potential aufrecht. Strukturell bestehen Na_v -Kanäle aus einem Proteinkomplex, der sich aus einer großen, porenbildenden α -Untereinheit und einem oder mehreren kleineren β -Hilfsproteinen zusammensetzt.^[24] Bei Säugetieren wurden neun verschiedene Isoformen der porenbildenden $\text{Na}_v\alpha$ -Untereinheit funktionell exprimiert, und ein zehntes Natriumkanal-ähnliches Protein (Na_x) wurde geklont.



Justin Du Bois erhielt seinen BS von der UC Berkeley in der Arbeitsgruppe von Ken Raymond. Er promovierte 1997 am Caltech unter bei Erick Carreira und forschte als Postdoktorand am MIT bei Stephen Lippard. Seine Forschungsinteressen gelten der Methodenentwicklung, chemischen Synthese und chemischen Biologie. Seit 1999 ist er Professor in Stanford.

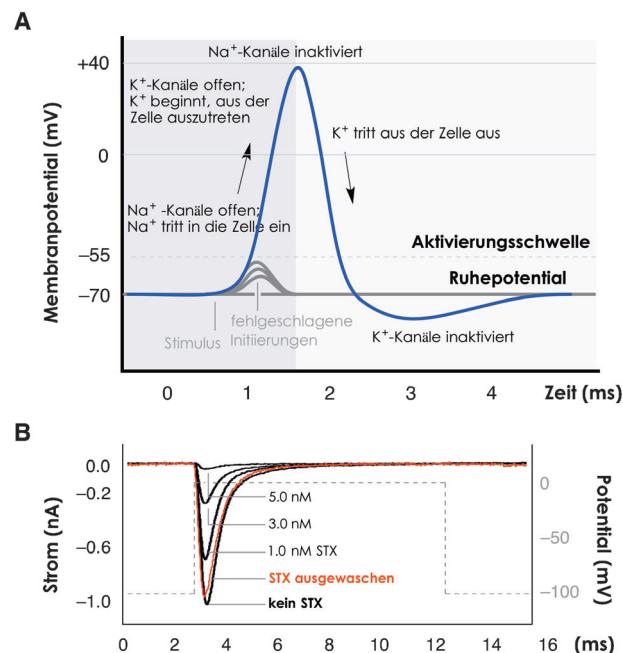


Abbildung 3. A) Ein Aktionspotential (blau) ist der rasche Anstieg und Abfall des elektrischen Potentials über einer Zellmembran. Zu Beginn wird das Ruhepotential der Membran durch einen Reiz gestört, der eine Depolarisierung des Membranpotentials über einen bestimmten Schwellenwert hinaus verursacht. Als Reaktion darauf öffnet der Na_v kooperativ und ermöglicht Na^+ -Ionen den Eintritt in die Zelle, wodurch die Zellmembran weiter depolarisiert wird. Diese Anstiegsphase des Aktionspotentials (dunkelgrauer Bereich) geht mit der Öffnung spannungsgesteuerter Kaliumkanäle einher (K_v). In der abfallenden Phase des Aktionspotentials (hellgrauer Bereich) verlassen K^+ -Ionen die Zelle, um das Ruhepotential wiederherzustellen. B) Wirkung von Saxitoxin als vollkommen reversibler Na_v -Inhibitor. Typische Strom-Zeit-Kurve aus der elektrophysiologischen Ganzzellen-Messung von $\text{Na}_v1.4$, das in CHO-Zellen exprimiert wurde. Der Natriumstrom wird durch nanomolare Konzentrationen von STX blockiert. Durch Auswaschen des Toxins aus der Zelle wird der Maximalstrom wiederhergestellt.

(Tabelle 1).^[2b] Die primären Aminosäuresequenzen dieser Na_v -Subtypen sind in den Transmembran- und Extrazellulärdomänen zu mehr als 50 % gleich.^[2b] Die neun Na_v -Isoformen sind charakterisiert durch ihre Empfindlichkeit ge-

Tabelle 1: Säugetierisoformen der $\text{Na}_v\alpha$ -Untereinheiten.

Isoform	TTX IC_{50} [nM]	Primärlokalisation	Erkrankung ^[a]
TTX-empfindlich			
$\text{Na}_v1.1$	5.9 ^[28, 29]	ZNS, ^[b] Herz	Epilepsie
$\text{Na}_v1.2$	7.8 ^[30, 31]	ZNS	Epilepsie
$\text{Na}_v1.3$	2.0 ^[31, 32]	Embryonales ZNS	Nervenverletzung
$\text{Na}_v1.4$	4.5 ^[31, 33]	Skelettmuskel	Myotonie
$\text{Na}_v1.6$	3.8 ^[31, 34]	DRG, ^[c] ZNS	ZNS-Erkrankungen
$\text{Na}_v1.7$	5.5 ^[31, 35]	DRG	Schmerzempfinden
TTX-resistent			
$\text{Na}_v1.5$	1970 ^[28, 31]	Herz, ZNS	Kardiale Arrhythmie
$\text{Na}_v1.8$	1330 ^[31, 36]	DRG	Schmerzempfinden
$\text{Na}_v1.9$	59 600 ^[37, 38]	DRG	Schmerzempfinden

[a] Nur ein Teil der zugehörigen Erkrankungszustände ist genannt.

[b] ZNS: Zentralnervensystem. [c] DRG: Spinalganglion.

genüber TTX, wobei sechs der neun funktionell exprimierten Isoformen durch nanomolare Konzentrationen der Verbindung inhibiert wurden.^[2b] Außer durch unterschiedliche Aminosäuresequenzen werden Variationen der Ionenkanalzusammensetzung durch Editierung und Spleißmodifizierungen von RNA, Proteinglycosylierung und andere post-transkriptionale Änderungen (z.B. Phosphorylierung, Methylierung) eingeführt.^[2c] Die Assoziation der porenbildenden α -Untereinheit mit β -Proteinen bietet ein weiteres Mittel zur Modulierung der Kanalfunktion. Isoformen der α - wie auch der β -Untereinheiten werden über verschiedene Gewebearten unterschiedlich exprimiert, da sich Konzentration und Eigenschaft der Na_v -Subtypen signifikant auf die Frequenz und die Amplitude des abgehenden Aktionspotentials auswirken (Tabelle 1).^[2d, 2e]

Der zuverlässige Informationstransfer in elektrisch erregbaren Zellen beruht auf der exakten Regulierung, der separaten subzellulären Lokalisation, der Spannungsantwort und der Ionensteuerung von Na_v s. Die Dysfunktion von Na_v s aufgrund von Faktoren wie genetischer Veränderung, Gewebeverletzung oder Entzündung kann schwere physiologische Folgen haben.^[3g] Erkrankungen von Zentralnervensystem (Epilepsie),^[4g] Herz (Long-QT- und Brugada-Syndrom)^[4i] und Skelettmuskel system (periodische Paralyse, Ataxi, Dystonie)^[4j] stehen in Zusammenhang mit Problemen bei der Na_v -Subtypexpression und/oder der Ionenkanalfehlfunktion.^[4k] Besonderes Interesse galt der Rolle von Na_v s bei der Schmerzempfindung, als beim Menschen genetische Varianten identifiziert wurden, die in ursächlichem Zusammenhang mit schwerer Schmerzsymptomatik stehen, darunter der ererbten Erythromelalgie (inherited erythromelalgia, IEM),^[4l] der PEPD-Krankheit (paroxysmal extreme pain disorder)^[4m] und der angeborenen Schmerzunempfindlichkeit (congenital insensitivity to pain, CIP).^[4n] Letztere bewirkt bei den Betroffenen eine Analgesie des gesamten Körpers, sodass beispielsweise ein Messerstich in die Hand keinerlei Reaktion hervorruft. IEM und PEPD wurden auf Funktionsgewinn-Mutationen (gain-of-function) in einzelnen, hauptsächlich in sensorischen Neuronen exprimierten Na_v -Subtypen ($\text{Na}_v1.7$) zurückgeführt, dagegen resultiert CIP aus einer Verkürzung mit Funktionsverlust (loss-of-function) der gleichen Proteinisoform.^[4o, 4p] Angesichts dieser ungewöhnlichen Erkrankungen überrascht es nicht, dass Na_v -Subtypen, zu denen $\text{Na}_v1.7$ sowie 1.3, 1.6 und 1.8 gehören, ein besonders interessantes Ziel für die Entwicklung künftiger Analgetika sind.^[4q]

Die Entwicklung von niedermolekularen Modulatoren der Ionenkanalfunktion, die spezifisch für einzelne Na_v -Isoformen sind, ist eine Hauptaufgabe in der modernen pharmakologischen und medizinisch-chemischen Forschung.^[4r] Jüngste röntgenkristallographische Analysen bakterieller Natriumionenkanäle^[50–53] sollten zwar die Planung niedermolekularer Sonden und/oder Wirkstoffe erleichtern, zwischen prokaryotischen und eukaryotischen Na_v s bestehen jedoch signifikante Strukturunterschiede. Folglich trugen Erkenntnisse, die durch Untersuchungen von Toxinbindung und Proteinmutagenese gewonnen wurden, zur Homologie-modellierung der α -Untereinheit (d.h. der Na^+ -Leitungsponde) bei. Diesbezüglich sind Untersuchungen mit STX, TTX

und verwandten, natürlich vorkommenden Verbindungen exemplarisch. Diese Arbeiten haben nachgewiesen, dass beide Toxine als selektive „Korken“ wirken, die den Ionenfluss blockieren, indem sie in der äußeren Öffnung des Kanals (der Position 1) hängen bleiben. Elektrophysiologische Messungen der Toxinaffinitäten gegenüber einzelnen Na_v -Subtypen ließen Abweichungen einzelner Aminosäuren zwischen TTX-empfindlichen und TTX-resistenten Kanälen erkennen. Eine genauere Kenntnis der Wechselwirkung zwischen Toxin und Ionenkanal könnte zur Entwicklung neuer analoger Verbindungen führen, die an bestimmt Na_v -Subtypen angreifen. Die Verfügbarkeit von STX durch De-novo-Synthese hat auch modifizierte Toxine geliefert, die für die Proteinmarkierung und die Bildgebung lebender Zellen genutzt werden. Beispiele hierfür werden in Abschnitt 5 besprochen.

2.3. Strukturen von STX und seinen natürlichen Analogien

Saxitoxindihydrochlorid ist eine weiße hygroskopische Substanz mit der Summenformel $C_{10}H_{19}N_7O_4Cl_2$. Durch Titration wurde der diprotische Charakter des Toxins mit gemessenen pK_a -Werten von 8.24 und 11.60 in wässriger Lösung ermittelt.^[54] Die polaren amorphen Eigenschaften erschweren erste Bemühungen zur Kristallisation von STX, und Versuche zur Strukturaufklärung blieben auf chemische Abbaustudien beschränkt. Diese Studien durch Rapoport et al. resultierten in zwei Strukturvorschlägen für STX (Abbildung 4).^[55] Angesichts der analytischen Möglichkeiten in den



Abbildung 4. Erste Strukturvorschläge^[55] für STX und die korrekte, röntgenkristallographisch bestimmte Toxinstruktur.^[56]

1960er Jahren und der Besonderheit einer Struktur, die nahezu gesättigt an Stickstoffatomen ist und daher in Bezug auf charakteristische $^1\text{H-NMR}$ -Kopplungskonstanten nur wenig bietet, war die Klärung der genauen Molekülstruktur von STX eine entmutigende Aufgabe. Unter diesen Gesichtspunkten sollte die Arbeit von Rapoport bewertet werden. Röntgenographische Kristallstrukturen von STX-Derivaten, über die Clardy/Schantz^[56] und Rapoport^[55a] 1975 unabhängig berichteten, ergaben schließlich jedoch eine andere Konnektivität, die aber noch zwei Guanidinium-einheiten und ein hydratisiertes Keton enthält. Eine endgültige Bestätigung der Struktur von STX war 1977 die erfolgreiche Totalsynthese durch Kishi (siehe Abschnitt 3.1).

Modifizierte STX-Verbindungen bilden eine große Gruppe isolierter Naturstoffe, wovon die überwältigende Mehrzahl hydroxylierte und sulfatierte Derivate sind (Abbildung 5). Seit 2010 wurden 57 verschiedene Verbindungen charakterisiert, die das spezielle Perhydropyrrrolopurin-

Saxitoxin

Toxin	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶
STX	H	H	H	OH	OH	C(O)NH ₂
neo-STX	OH	H	H	OH	OH	C(O)NH ₂
dcSTX	H	H	H	OH	OH	H
GTX I	OH	H	OSO ₃ ⁻	OH	OH	C(O)NH ₂
GTX II	H	H	OSO ₃ ⁻	OH	OH	C(O)NH ₂
GTX III	H	OSO ₃ ⁻	H	OH	OH	C(O)NH ₂
GTX IV	OH	OSO ₃ ⁻	H	OH	OH	C(O)NH ₂
α-STXol*	H	H	H	H	OH	C(O)NH ₂
β-STXol*	H	H	H	OH	H	C(O)NH ₂

Abbildung 5. Ausgewählte Beispiele natürlicher und nichtnatürlicher (*) Analoga von STX veranschaulichen Strukturvariationen am Toxingerüst. α- und β-STXol sind durch Reduktion von STX erhältlich.^[59,60]

Grundgerüst gemeinsam haben.^[16,57] Insgesamt erfolgen Strukturmodifizierungen an einer der vier Positionen C11, C13, N1 und N21. Bei Verbindungen, deren Affinität gegenüber rekombinanten, in Froschoozyten oder Säugetierzellen (CHO, HEK) exprimierten Na_v-Isoformen gemessen wurde, destabilisiert die Einführung eines Hydroxy- oder Sulfatsubstituenten die Toxinbindung. Eine Ausnahme bildet das N1-hydroxylierte Derivat Neosaxitoxin, das annähernd die gleiche Wirksamkeit hat wie STX.^[58]

Die 2004 beschriebene Molekülstruktur von Zetekitoxin AB (ZTX) ist recht ungewöhnlich.^[15e] ZTX ist die giftige Hauptkomponente in Hautextrakten des giftigen Goldfroschs, der in den 1960er Jahren in Panama gesammelt wurde.^[15] Da nur eine geringe Menge der Substanz (300 µg) zur Verfügung stand, vergingen nach der Isolierung und Erforschung weiterentwickelter Analysemethoden mehr als 30 Jahre bis zur ihrer Strukturanalyse. Elektrophysiologische Messungen gegen die drei Na_v-Isoformen 1.2, 1.4 und 1.5 ergaben IC₅₀-Werte von 6.1, 65 bzw. 280 pm, womit ZTX 60- bis 600-mal wirksamer ist als STX.^[15e] Eingehendere Untersuchungen der molekularen Wechselwirkungen von ZTX mit dem Ionenkanal und der mögliche Nachweis einer gemeinsamen Rezeptorposition von ZTX und STX (Abbildung 6) erfordern weiteres Material. Die Aufnahme des Stummel-

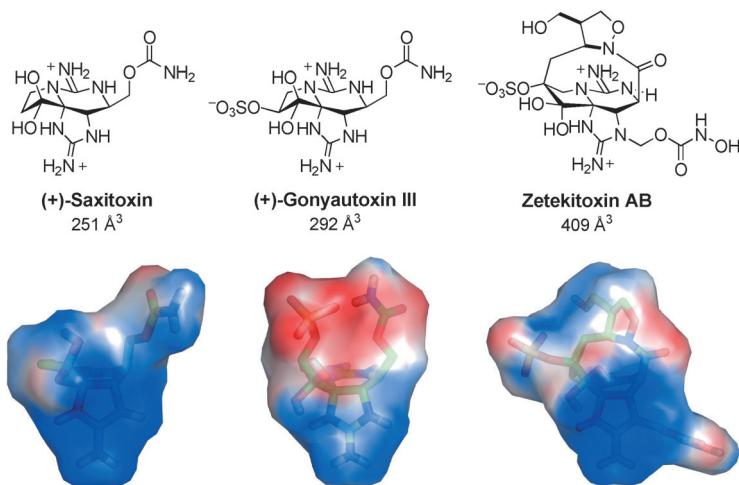
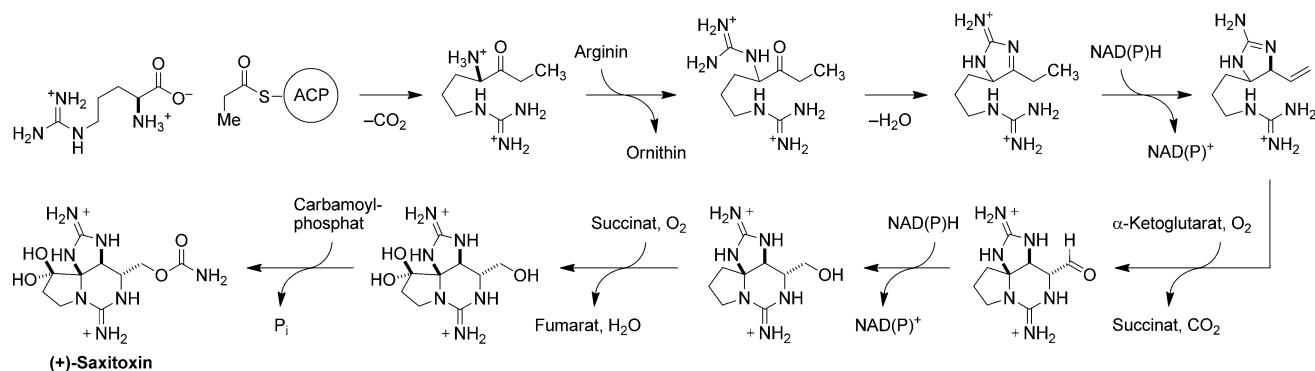


Abbildung 6. STX, GTX III und ZTX wirken vermutlich durch Blockieren der äußeren Porenöffnung des Na_v – trotz drastischer Unterschiede beim Molekülvolume (Å³) und bei den berechneten elektrostatischen Potentialflächen. Elektrostatische Potentialflächen von -1 (rot) bis +4 kT (blau).

fußfroschs, *Atelopus zeteki*, in die Rote Liste gefährdeter Arten beschränkt den Zugang zu dieser natürlichen Quelle der Verbindung.

2.4. Biosynthese von STX

Bei ersten Untersuchungen durch Shimizu et al., die den schrittweisen Mechanismus der STX-Biosynthese entschlüsseln sollten, wurden der Dinoflagellat *Alexandrium tamarense* und die blaugrüne Alge *Aphanizomenon flos-aquae* mit radioaktiv markierten Aminosäuren und ¹³CO₂ behandelt.^[61] Diese aufschlussreichen Arbeiten führten zur Postulierung einer Claisen-Kondensation von Acetat (oder einem Derivat davon) mit Arginin. Mehr als 20 Jahre nach diesen Versuchen gelang Neilan et al. die Identifizierung eines möglichen Gen-Clusters für die STX-Biosynthese in dem Cyanobakterium *Cylindrospermopsis raciborskii* T3.^[62] Die Analyse dieser Ergebnisse lässt einen Biosyntheseweg für die STX-Bildung vermuten, der mit den von Shimizu durchgeföhrten Versuchen in Einklang ist und an dem Arginin und Acetyl-CoA sowie S-Adenosylmethionin und Carbamoylphosphat als Vorstufen der STX-Biosynthese beteiligt sind (Schema 1).



Schema 1. Vermuteter Mechanismus der STX-Biosynthese im Cyanobakterium *C. raciborskii* T3.^[62b]

Nach dieser ersten Arbeit wurden Gen-Cluster, die für STX kodieren, in den völlig verschiedenen Stämmen von Cyanobakterien und Dinoflagellaten nachgewiesen.^[63] Diesbezüglich ist Saxitoxin ein recht ungewöhnliches Toxin, denn es wird von Organismen zweier unterschiedlicher Lebensformen synthetisiert – ein Ergebnis, das die Aufmerksamkeit von Evolutionsbiologen erregt hat.^[64] Diese jüngsten Berichte haben auch das Interesse an der biosynthetischen Herstellung von TTX wieder entfacht (allerdings wurde bisher kein potenzieller Gen-Cluster für dieses Toxin identifiziert).^[4] Seit der Abfassung dieses Aufsatzes wurden keine Proteinprodukte der Gene, die für die Bildung von STX zuständig sind, isoliert und charakterisiert, sodass eine Methode zur In-vitro-Herstellung dieses Toxins und veränderter Analoga derzeit nicht realisierbar ist.^[65]

3. De-novo-Synthese von Saxitoxin

Die lange Geschichte von STX als Synthesenziele in der Naturstoffchemie ist so reich an Details wie das Molekül selbst. Jüngste Bestrebungen zur Synthese des Toxins waren zum Teil dadurch motiviert, die De-novo-Herstellung des Toxins als möglichen Zugang zu selektiven Werkzeugen für die Untersuchung des Na_v zu nutzen. Die nachfolgende vergleichende Besprechung der einzelnen Methoden zum Aufbau von STX soll dem Leser die Vielseitigkeit des Perhydropyrroloropuringerüsts als Templat für die Entwicklung von Analoga vermitteln. Dieser Aspekt ist im Zusammenhang mit dem Moleküldesign besonders zu erwähnen, da er einen wichtigen Unterschied zu TTX bildet – das in der Na_v -Forschung wohl bekanntere der beiden Toxine. Die Struktur von TTX besteht aus einem polysubstituierten, polyoxygenierten Cyclohexangerüst, in dem jedes Kohlenstoffatom substituiert ist. Untersuchungen zur Na_v -Inhibierung mit natürlich vorkommenden desoxygenierten Analoga von TTX ergaben, dass der hohe Oxygenierungsgrad entscheidend für die Wirksamkeit zu sein scheint.^[66] Bei decarbamoyliertem STX (dcSTX) und anderen C11- und C13-Varianten bleibt hingegen die Fähigkeit erhalten, in niedrigen nanomolaren Konzentrationen Na_v s zu blockieren. Eine Analyse der bekannten chemischen Synthesen von STX und TTX lässt einen zweiten Gegensatz erkennen. Die Herstellungsmethoden, die für TTX zur Verfügung stehen, sind tatsächlich doppelt so lang wie die für STX (ca. 30 bzw. 15 Stufen) und damit ein beträchtliches Hindernis bei der Herstellung von Analoga. Diese Faktoren begünstigen STX als „Blaupause“ für die Entwicklung von chemischen Werkzeugen zur Na_v -Untersuchung.

Die Molekülgröße von STX ist zwar gering, täuscht aber hinsichtlich der komplizierten Anforderungen seiner chemischen De-novo-Synthese. Die geladenen polaren funktionellen Bisguanidiniumgruppen und die schwach chromophore Eigenschaft des Toxins erschweren die Isolierung und Reinigung geringer Stoffmengen. Das tricyclische Gerüst, das an C4 eine ungewöhnliche Aminaleinheit trägt, zeichnet sich durch eine kleine Phalanx von Heteroatomen aus, deren Zahl größer ist als die der Kohlenstoffatome – eine Seltenheit unter den bekannten Sekundärmetaboliten. Durch Zerlegen

in die Bestandteile wird das C4-Aminal als Ketogruppe erkennbar, die auf einer Seite von einem zweiten Keton (C12) und auf der anderen Seite von drei benachbarten substituierten Kohlenstoffzentren (C5, C6, C13) flankiert wird. Die vier vollendeten Synthesen von STX sowie zwei Synthesen der eng verwandten C11-sulfatierten Form GTX II/III bieten jeweils neue Lösungsansätze für die komplizierte Molekülstruktur des Toxins.

3.1. Kishi (1977)

Die wegweisende Synthese von racemischem STX durch Kishi et al. 1977 wurde nur zwei Jahre nach Erscheinen der Röntgenkristallstruktur vollendet.^[67] Die Schwierigkeiten, die mit der Handhabung und Reinigung von Verbindungen solcher Polarität einhergehen, und die begrenzten analytischen Möglichkeiten der damaligen Zeit machen diese Arbeit umso eindrucksvoller. Aus strategischer Sicht vermeidet die Synthese durch Kishi einige Komplikationen im Zusammenhang mit den Guanidiniumgruppen, indem sie diese in einem späten Synthesestadium einführt. Kishi vermerkte, dass „the reason for postponing the introduction of the guanidino groups to the very late stage of the synthesis was to avoid as much as possible technical difficulties in handling the very basic, polar guanidine derivatives.“^[67b] Der tricyclische Thioharnstoff **1**, eine wichtige Zwischenverbindung des Gesamtschemas, wird über zwei elektrocyclische Reaktionen aufgebaut (Abbildung 7).

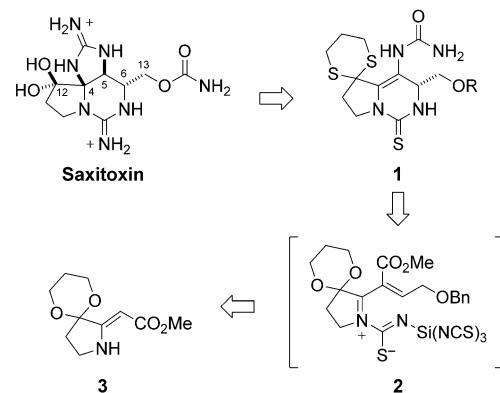


Abbildung 7. Retrosynthetische Analyse der Synthese von (\pm)-STX durch Kishi.

Die Synthese des Harnstoffs **1** geht von γ -Aminobuttersäure aus, die in acht Stufen zu dem Thiolactam **4** umgesetzt wird (Abbildung 8). Eine kürzere Reaktionssequenz mit einer Esterenolat-Nitril-Addition (Blaise-Reaktion) liefert das analoge Dithianderivat.^[67b, 68] Nach einer von Eschenmoser beschriebenen Methode^[69] wurde durch Kupplung von **4** mit dem α -Brom- β -ketoester **5** das vinyloge Carbamat **3** erhalten. Anders als herkömmliche Sulfidkontraktionen verläuft die Umwandlung zu **3** ohne ein thiophiles Reagens. Die anschließende Umsetzung dieser Verbindung zu dem Thioharnstoff **6** ist besonders bemerkenswert, weil hierfür das

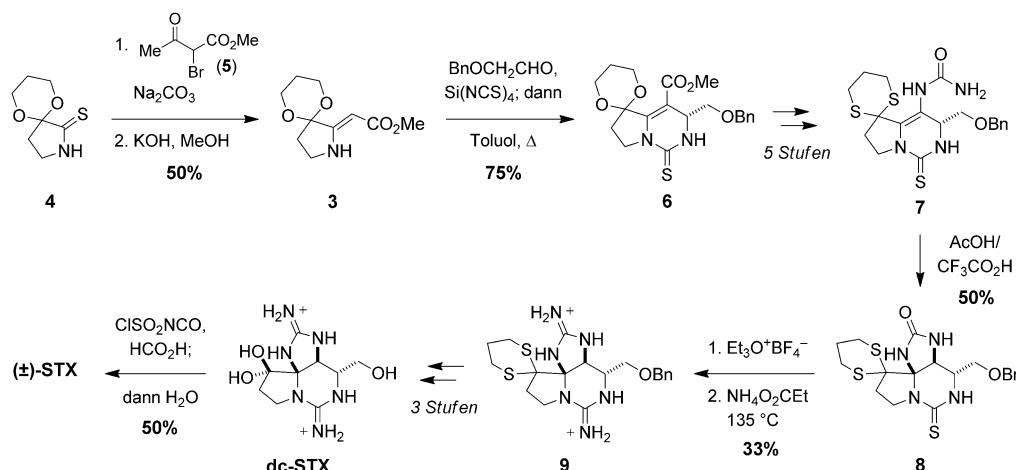


Abbildung 8. Die erste beschriebene Synthese von (\pm)-STX.

Reagens $\text{Si}(\text{NCS})_4$ eingesetzt wurde, das seit seiner Einführung durch Neville 1963 in der organischen Synthese nur selten Anwendung gefunden hat.^[70] Der Ringschluss erfolgt vermutlich durch eine 6π -Elektrocyclisierung der Zwischenstufe **2** und führt zum ersten von drei benötigten Chiralitätszentren. Nach Beendigung der Synthese von racemischem STX lieferte eine modifizierte Sequenz mit (*R*)-Glyceraldehydacetondiäther anstelle von Benzylxyacetaldehyd das Thioharnstoffprodukt **10** als 9:1-Diastereomerengemisch (Abbildung 9). Diese Weiterentwicklung ermöglichte die asymmetrische Synthese des nichtnatürlichen Naturstoffenantiomers (*-*)-Decarbamoylsaxitoxin.^[71]

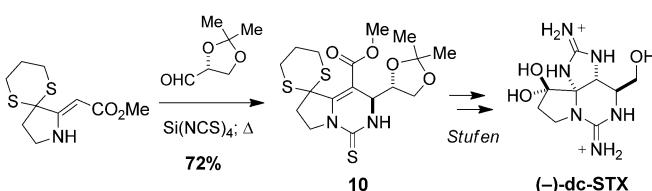


Abbildung 9. Die Elektrocyclisierung mit (*R*)-Glyceraldehyd ermöglicht die asymmetrische Synthese von (*-*)-dcSTX.

Die weitere Synthese von (\pm)-STX verläuft über eine Reihe von Reaktionen funktioneller Gruppen des Thioharnstoffs **7** und eine säurekatalysierte Ringschlussreaktion, die den dritten Ring des tricyclischen Gerüsts bildet (Abbildung 8). Man nimmt an, dass dieser Schritt ebenfalls über einen konzertierten pericyclischen Prozess abläuft. Bemerkenswerterweise entsteht das gewünschte Produkt **8** in 50 % Ausbeute mit nur 10 % des zugehörigen Diastereomers. Die offenkundige Torquoselektivität dieser elektrocyclischen Reaktion lässt sich mit einer gewissen konformativen Ausrichtung erklären, die durch das einzelne C6-Chiralitätszentrum induziert wird.

Mit der erfolgreichen Herstellung der wichtigen Bis-harnstoff-Zwischenverbindung **8** war der Weg frei für die Synthese von (\pm)-dcSTX. Die Umwandlung der beiden Harnstoffgruppen in das Bisguanidiniumprodukt **9** erfordert

forcierte Bedingungen (135°C)^[67] und verläuft mäßig effizient. Auch die Einführung der benötigten C13-Carbamatgruppe an dcSTX in reiner Ameisensäure ist etwas schwierig. Daher ist diese Schlussequenz hinsichtlich der Herstellung von Analoga limitierend, vor allem in Bezug auf die Modifizierung der Substituentengruppe an C13. Nichtsdestoweniger hat die Arbeitsgruppe von Kishi mit der ersten Synthese von STX und später (*-*)-dcSTX eine anerkennenswerte Leistung und zeitlose Arbeit hervorgebracht.

3.2. Jacobi (1984)

Jacobi et al. haben eine durch ihre Planung und Kürze beeindruckende Synthese von racemischem STX entworfen.^[72] Inspiriert durch die Arbeit von Kishi wurde der Bis-harnstoff **11** als entscheidende Zwischenstufe geplant (Abbildung 10). Die Vollendung der Synthese aus dieser Ver-

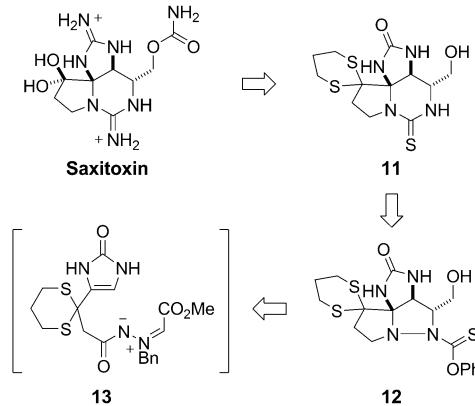


Abbildung 10. Von Jacobi beschriebener Syntheseweg zu (\pm)-STX mit einer [3+2]-Azomethinylid-Cycloaddition.

bindung würde die letzten fünf Schritte der Synthesestrategie von Kishi nutzen, die im vorletzten Schritt über (\pm)-dcSTX verläuft.^[67a] Die Erkenntnis, dass **11** durch reduktive N-N-Spaltung des Hydrazids **12** erhalten werden kann, ist wirklich inspirierend und verringert das Problem der Synthese des tricyclischen Gerüsts von STX auf eine diastereoselektive intramolekulare [3+2]-Cycloaddition des Azomethinylids **13**.

Die Herstellung der Cycloadditionsvorstufe **15** geht von käuflichem Imidazolin-2-on (**14**) aus, das leicht in das ge-

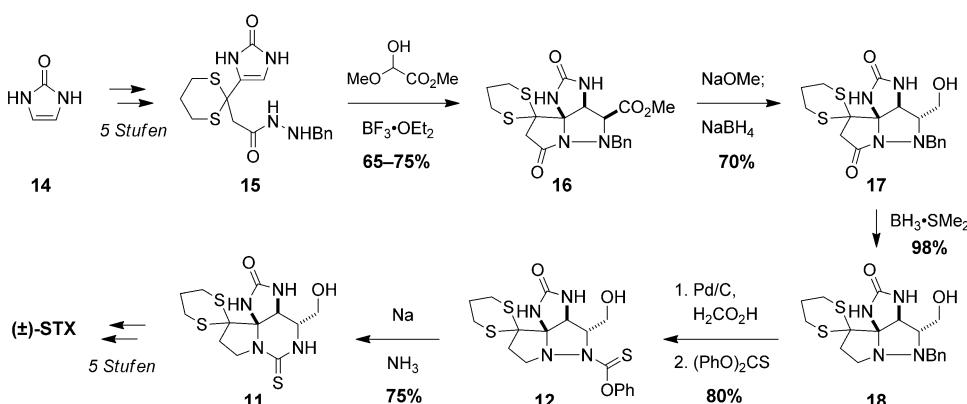


Abbildung 11. Synthese von (±)-STX durch Jacobi.

wünschte Hydrazid überführt werden kann (Abbildung 11). Durch Kondensation dieses Nucleophils mit Methylglyoxal-bacetal entsteht das reaktive Azomethinimin **13**, dessen Cycloaddition an das angehängte Imidazolinon das [3+2]-Addukt liefert. Diese Reaktion verläuft außerordentlich selektiv und ergibt **16** als einziges Produkt.^[73] Als Erklärung für dieses stereochemische Ergebnis vermutet man eine destabilisierende Wechselwirkung zwischen dem Methylester und den Benzylgruppen in der Übergangsverbindung (**16-α⁺**), die zu dem anderen Isomer führt (**16-β**, Abbildung 12). Bei dieser

Thioharnstoff erhalten. Nach Schützen des C13-Alkohols als Acetatester folgt die gleichzeitige Umwandlung der Harnstoffgruppen in die Bisguanidiumverbindung unter den von Kishi beschriebenen Bedingungen. Auf diese Weise wird Decarbamoylsaxitoxin in Mengen von 0.5–1 g erhalten, ohne dass in der gesamten Reaktionssequenz chromatographische Aufreinigungen erforderlich sind. Es ist schwer, sich einen einfacheren Zugang zu racemischem

Saxitoxin vorzustellen als die von Jacobi beschriebene stereokontrollierte Azomethiniminmethode, und es scheint überraschend, dass keine Arbeit über die Verwendung eines asymmetrischen Katalysators oder chiralen Auxiliars zur Steuerung der absoluten Induktionsrichtung bei der [3+2]-Reaktion erschienen ist. Insgesamt ist die von Jacobi beschriebene Herstellung von STX ein Meisterstück der Naturstoffsynthese.

3.3. Nagasawa (2009)

Ähnlich wie bei der Arbeit von Jacobi spielt die Bildung der Stickstoffheterocyclen durch geschickte Anwendung dipolarer Cycloadditionsmethoden eine wichtige Rolle in der STX-Synthese durch Nagasawa et al.^[74] In diesem Fall führt die Verknüpfung eines optisch aktiven Nitrons **21** mit einem Nitroalken **22** jedoch zu einem enantiomerenangereicherten Isoxazolin **20** und ermöglicht so den Zugang zu nur einem Naturstoffenantiomeren (Abbildung 13). Ein weiterer wichtiger

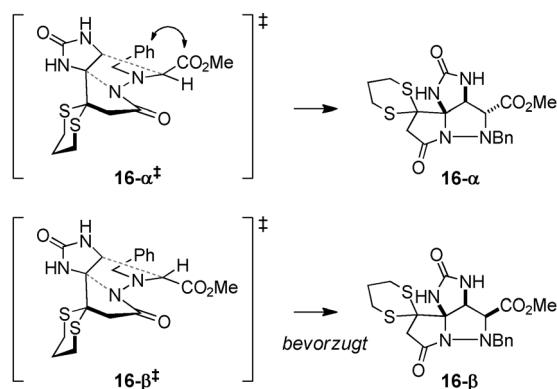


Abbildung 12. Stereochemische Ursachen für die selektive Bildung von 16-β.

Umwandlung entsteht zwar überwiegend das tricyclische Produkt mit der unerwünschten Konfiguration an C6, dennoch beeindruckt sie durch ihre Einfachheit. Der Ester epimerisiert mit NaOMe leicht zum α-konfigurierten Produkt ($\geq 98:2$ Selektivität im thermodynamischen Gleichgewicht), das ohne vorherige Isolierung zum Alkohol **17** reduziert werden kann.

Die Synthese des Bisharnstoffs **11** aus **17** gelingt mit hoher Ausbeute in vier Stufen, darunter die selektive BH₃-vermittelte Hydrazidreduktion zu **18** mit anschließender N-Debenzylierung und Hydrazinacylierung zu dem O-Thiocarbamat **12**. Schließlich wird **11** durch reduktive N-N-Spaltung mit Na in NH₃ unter gleichzeitigem Ringschluss des sechsgliedrigen

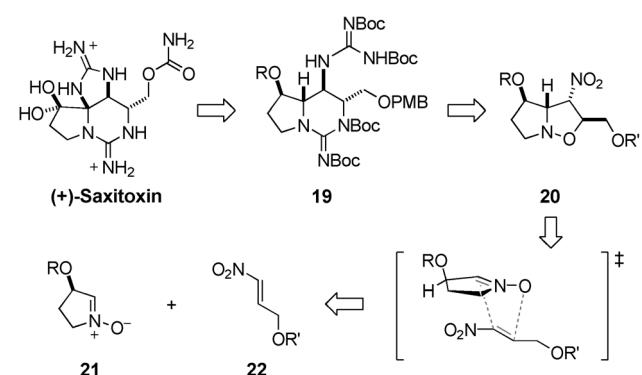
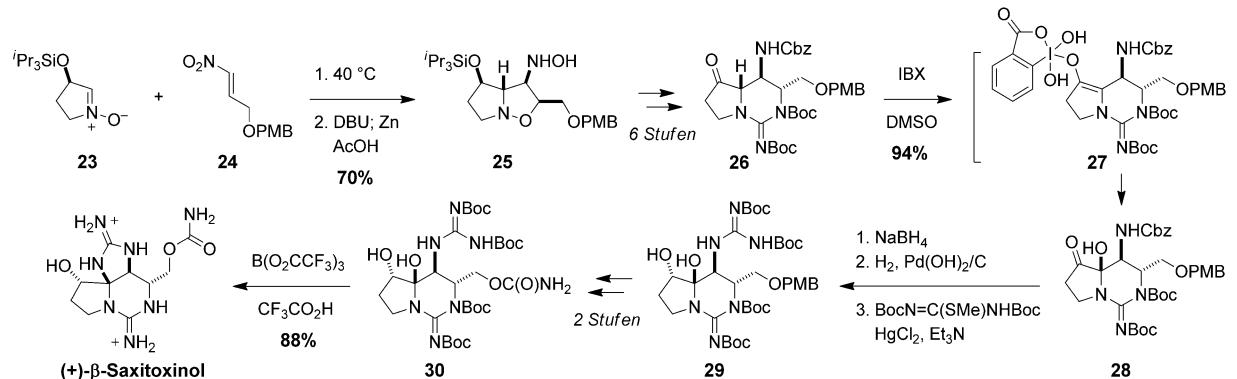


Abbildung 13. Strategie der Synthese von (+)-STX durch Nagasawa.

Schritt in der Strategie von Nagasawa ist eine intramolekulare Kondensationsreaktion zum fünfgliedrigen Guanidinring, die für die richtige Konfiguration an C4 sorgt. Diese in einem späten Synthesestadium vorgesehene Reaktion kam auch in einer verwandten Methode von Du Bois zum Einsatz (siehe Abschnitt 3.6).^[75]

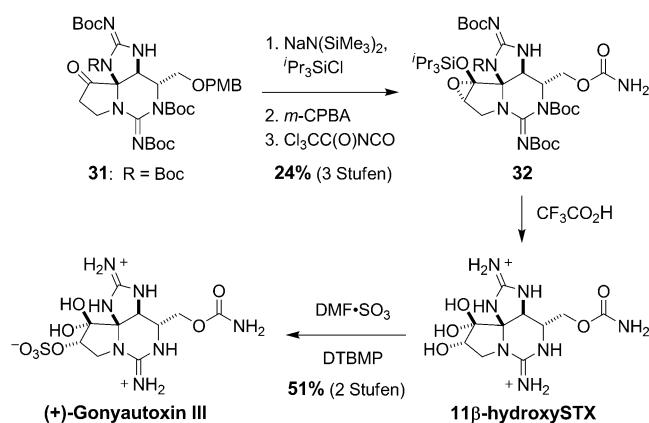
Abbildung 14. Syntheseweg zu (+)-STX mit einer selektiven α -Ketonoxidation.

Das Nitron **23** ist in Grammmengen aus L-Äpfelsäure in fünf Schritten erhältlich.^[76,77] Durch Rühren dieser dipolaren Verbindung mit dem Nitroalken **24** ohne Lösungsmittel entsteht das zugehörige Isoxazolin vollkommen diastereokontrolliert. Das stereochemische Ergebnis dieser Reaktion ist in Einklang mit einem bevorzugten *endo*-Übergangszustand (Abbildung 13), in dem die Annäherung des Nitroalkens entgegengesetzt zur raumfüllenden Siloxygruppe erfolgt. Durch Umsetzung mit DBU epimerisiert die C5-Position zur gewünschten Konfiguration (Abbildung 14). Bemerkenswert ist die Reduktion der so erhaltenen Verbindung mit Zn, die selektiv die Nitroeinheit in das zugehörige Hydroxylamin überführt, ohne die N-O-Bindung des Heterocyclus zu spalten. Die Optimierung der Reaktionsfolge lieferte aus dem Nitron **23** in einer dreistufigen Eintopfreaktion das Hydroxylamin **25** (Abbildung 14).

Aus dem Isoxazolin **25** ist die bicyclische Verbindung **26** zugänglich, die zwei der benötigten Guanidineinheiten des Naturstoffs enthält (Abbildung 14). Die selektive α -Hydroxylierung des C12-Ketons mit *o*-Iodoxybenzoësäure (IBX) in DMSO ist eine charakteristische Reaktion der Nagasawa-Synthese von STX, die mit 94 % Ausbeute zu dem Halbaminal führt. Man nimmt an, dass die bemerkenswerte Selektivität dieser Reaktion auf die intramolekulare Oxidation einer enolischen hypervalenten Iodverbindung wie **27** zurückgeht. Das Halbaminal **28** hat zwar die passende Konfiguration für den Ringschluss zum fünfgliedrigen Guanidin, tatsächlich wurden aber Versuche zur Aminalbildung an C4 durch das vorhandene C12-Keton verhindert, sodass die Reduktion dieser Ketogruppe in **28** erforderlich war.

Das Halbaminal **28** ist unter reduzierenden Bedingungen überraschend stabil, die anschließende Hydrogenolyse spaltet die Cbz-Schutzgruppe ab und nachfolgende selektive Guanidinylierung des C5-Amins führt zu **29**. Nach Abspaltung der PMB-Gruppe und Carbamoylierung wird **30** erhalten und durch Lewis-Säure-vermittelte Kondensationsreaktion in das tricyclische Gerüst von STX überführt. Die abschließende Reaktionssequenz zur Bildung von (+)- β -Saxitoxinol, einer reduzierten Form des Naturstoffs, folgt der Synthese von Du Bois^[75] und beruht auf einer von Koehn et al.^[59] beschriebenen Methode zur Oxidation des C12-Carbinols unter Bildung von (+)-STX.

Entscheidende Reaktionen der Synthese von (+)-STX durch Nagasawa sind die diastereoselektive Nitronycyclodition und die IBX-vermittelte selektive Oxidation von C4. Bemerkenswert ist auch die strategische Entscheidung, auf die Verwendung von Harnstoff- oder Thioharnstoffderivaten als Guanidinsurrogate zu verzichten und so zusätzliche Reaktionsschritte sowie die moderaten Ausbeuten, die mit solchen Austauschreaktionen funktioneller Gruppen verbunden sind, zu vermeiden. Ähnliche Überlegungen sind charakteristisch für die von Du Bois,^[75] Looper^[78] und Nishikawa^[79] beschriebenen STX-Synthesen. Die Vielseitigkeit des Nagasawa-Synthesewegs ermöglichte die Herstellung nichtnatürlicher STX-Formen (siehe Abschnitt 5.2) sowie von (+)-Gonyautoxin III, einem C11-sulfatierten Derivat, das ursprünglich aus dem Dinoflagellaten *Gonyaulax tamarensis* isoliert wurde (Abbildung 15).^[77]

Abbildung 15. Alternative Endsequenz zur Herstellung von (+)-GTx III. DTBMP = 2,6-Di-*tert*-butyl-4-methylpyridin.

3.4. Looper (2011)

Arbeiten von Looper et al. zur Entwicklung allgemeiner Methoden für die Bildung cyclischer Guanidine aus Propargylderivaten zeigen, dass sich die Regioselektivität und die Ringgröße bei diesen Reaktionen durch das Reagens steuern lassen.^[80] Diese Methode eignet sich optimal zum Aufbau von

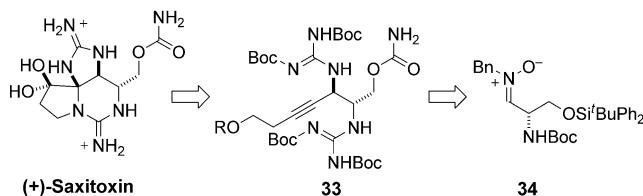


Abbildung 16. Eine oxidative Alkincyclisierung ist ein Hauptschritt der Synthese von (+)-STX durch Looper.

(+)-STX und löst das komplizierte tricyclische Grundgerüst gewissermaßen zu der wesentlich vereinfachten acyclischen Struktur **33** auf (Abbildung 16). Dieses Alkin-substituierte Derivat lässt sich nach einer früher beschriebenen Methode leicht aus dem von Serin abgeleiteten Aldonitron **34** erhalten.^[75b,81] In Übereinstimmung mit Untersuchungen durch Du Bois und Nagasawa basiert die Synthese durch Looper auf der direkten Einführung der beiden Guanidineinheiten. Die Nutzung einer funktionellen Alkingruppe als Surrogat für das C4,C12- α -Diketon und die stereochemische Steuerung der selektiven Aminalbildung über C5 und C6 resultieren in einem sehr geradlinigen Toxinaufbau. Die Synthese durch Looper unterscheidet sich von anderen Synthesen auch dadurch, dass der Pyrrolidinring als letzter der drei Ringe gebildet wird.

Die diastereoselektive Addition von Magnesiumacetylid an das Nitron **34** verläuft glatt zu einem 9:1-Gemisch der *anti/syn*-konfigurierten Produkte **35** (Abbildung 17). Diese werden in vier Stufen, darunter die Einführung der benötigten C13-Carbamatgruppe des Naturstoffs, in das Boc-geschützte Bisguanidin **36** überführt. Die regioselektive Bildung der 5-*exo*- oder 6-*endo*-dig-Guanidinisomere wird durch eine überlegte Wahl des Metallkatalysators zur Induzierung der Cyclisierung gesteuert. In diesem speziellen Fall entstand das Fünfringprodukt **37** nahezu quantitativ in Gegenwart von 10 Mol-% AgOAc. Versuche, den zweiten Ringschluss mit Epoxidierungsreagentien auszulösen, blieben erfolglos, dagegen war die Kombination aus I₂ und AgOAc reaktiv genug und führte zum gewünschten Ergebnis. Schließlich bewirkte eine dritte Umsetzung von **37** mit AgOAc den intramolekularen Austausch des sekundären Iodids unter Bildung des

Oxazolidinons **38**. Die Abhängigkeit dieser drei Reaktionsschritte von AgOAc war ein großer Vorteil bei einer optimierten Methode, durch die **36** im selben Reaktionsgefäß direkt in **38** überführt wird. Mit dieser eleganten AgOAc-vermittelten Reaktionskaskade wird die unscheinbare acyclische Verbindung auf einem Reaktionsweg umgewandelt, der zwei C-N- und eine C-O-Bindung sowie drei neue Ringe knüpft.

Ausgehend von **38** endet die Synthese von (+)-STX durch Looper mit fünf effizienten Umsetzungen, von denen die einstufige Oxazolidinonhydrolyse/Pyrrolidinringbildung besonders interessant ist. Sie gelingt durch Umsetzung des Mesylats **39** mit Cs₂CO₃ in Ethanol;^[82] im Anschluss daran wird der Naturstoff durch Oxidation des Alkohols und Abspaltung der Guanidinschutzgruppe erhalten. Insgesamt bietet die vollendete Synthese von (+)-STX einen modernen Überblick über die chemische Synthese, die übergangsmetallkatalysierte Reaktionen zur Steuerung von Chemo- und Regioselektivität nutzt. Die Kürze der Synthese, die Schutzgruppenstrategie und der Zugang zu einer Guanidin geschützten Form von STX sollten das Potenzial zur Herstellung anderer PSP-Derivate haben.

3.5. Nishikawa (2011)

Für das natürlich vorkommende, von Cyanobakterien gebildete Saxitoxinderivat (+)-Decarbamoyl- α -saxitoxinol haben Nishikawa et al. eine Synthese entwickelt.^[79] Diese Arbeit hat Ähnlichkeit mit der von Looper, da ebenfalls eine Alkingruppe als Surrogat für das C4,C12-Diketon verwendet wird (Abbildung 18).^[78] Die Bildung des Guanidins **41** ist

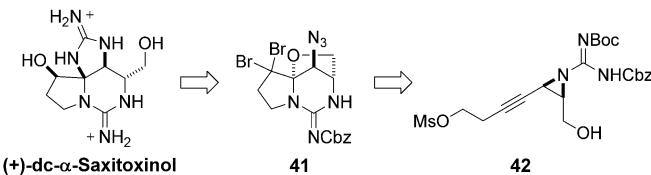


Abbildung 18. Retrosynthese von (+)-Decarbamoyl- α -STXol durch Nishikawa.

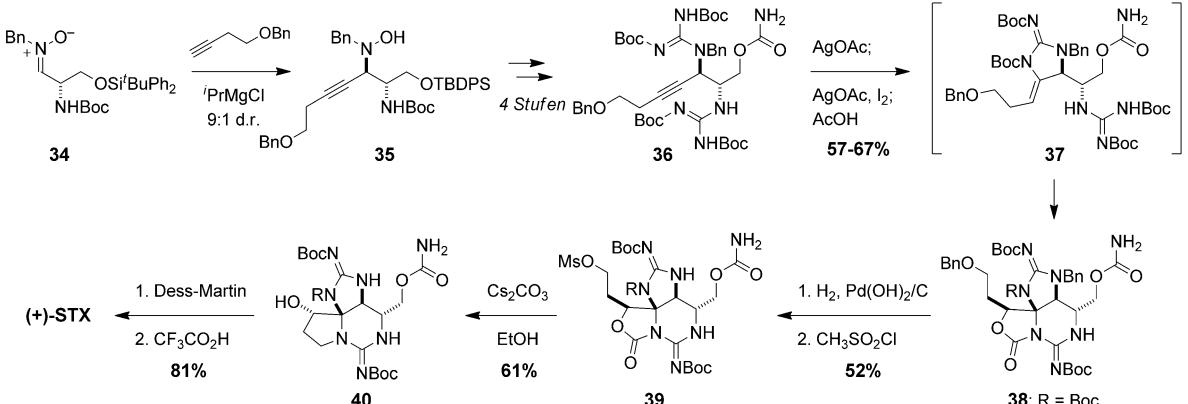


Abbildung 17. Eine sequenzielle dreistufige Tricyclisierung im selben Reaktionsgefäß überführt eine acyclische Ausgangsverbindung in das Grundgerüst von STX.

durch Oxidation des Alkins und intramolekulare Cyclisierung möglich.

Der von Serin abgeleitete Aldehyd **43** (Garner-Aldehyd) wurde über eine direkte zehnstufige Reaktionssequenz in das Azid **44** überführt (Abbildung 19).^[83] Die Umsetzung dieser Verbindung mit Pyridiniumtribromid (PyHBr_3) in einem Zweiphasensystem initiiert eine Reaktionskaskade, die als Endprodukt das Aminal **41** liefert. Bei dieser Umwandlung löst die Bromierung des Alkins die Guanidincyclisierung aus, wodurch der erste von drei Ringen entsteht. Eine zweite Bromierung des intermediären Alkens **45** bewirkt die Bildung des N,O-Acetals, danach folgt der Pyrrolidinringschluss durch intramolekulare Substitution des C10-Mesylats. Die Reaktivität von PyHBr_3 scheint für diese Reaktion besonders geeignet zu sein, denn andere konventionelle BromierungsmitTEL (z.B. *N*-Bromsuccinimid) führen nicht zum gewünschten Ergebnis.^[83] Das *gem*-Dibromid **41** wird auf ungewöhnliche Weise mit Acetanhydrid und Triethylamin in das Enolacetat **46** überführt,^[79] dessen Reduktion mit NaBH_4 den α -C12-Alkohol **47** als einziges Diastereomer liefert. Aus **47** ist das gewünschte Toxin über eine nur vierstufige Reaktionssequenz erhältlich, wobei $\text{B}(\text{O}_2\text{CCF}_3)_3$ zur Bildung des fünfgliedrigen Guanidinrings eingesetzt wird (siehe Abschnitte 3.3, 3.6). Demzufolge wird ein komplexes Problem in der stereokontrollierten Synthese einer cyclischen Verbindung effizient gelöst, indem ausgehend von der leicht herstellenden acyclischen Verbindung **44** eine oxidative Reaktionskaskade verwendet wird.

3.6. Du Bois (2006, 2007, 2008)

Fleming und Du Bois^[75a] haben fast 30 Jahre nach der Hauptsynthese durch Kishi die erste asymmetrische Synthese von STX beschrieben. Die Syntheseplanung erfolgte mit dem Wissen, dass STX ein wichtiges Hilfsmittel in der Ionenkanalforschung ist, und mit der Erwartung, dass die De-novo-Herstellung des Toxins für Untersuchungen der Molekülstruktur und der Zellfunktionen von Na_v s genutzt werden könnte. Fortschritte bei den Methoden der C-H-Aminierung, Alkenoxidation und Guanidinfunktionalisierung führten zur Entwicklung von zwei ganz verschiedenen Synthesewegen zu dem tricyclischen Bisguanidiniumgerüst der paralytischen Schalentiergifte. Zusammen können diese Reaktionen zu Toxiderivaten führen, die an N1, N7, N9, N21, C10, C11 und C13 substituiert sind.^[60,84–88]

Wie bereits erwähnt wurde, maskieren die benachbarten C4- und C12-Kohlenstoffatome in STX ein vicinales Diketon. Bei der Suche nach einer funktionellen Surrogatgruppe für diese Einheit kommt offensichtlich ein Alken oder Alkin in

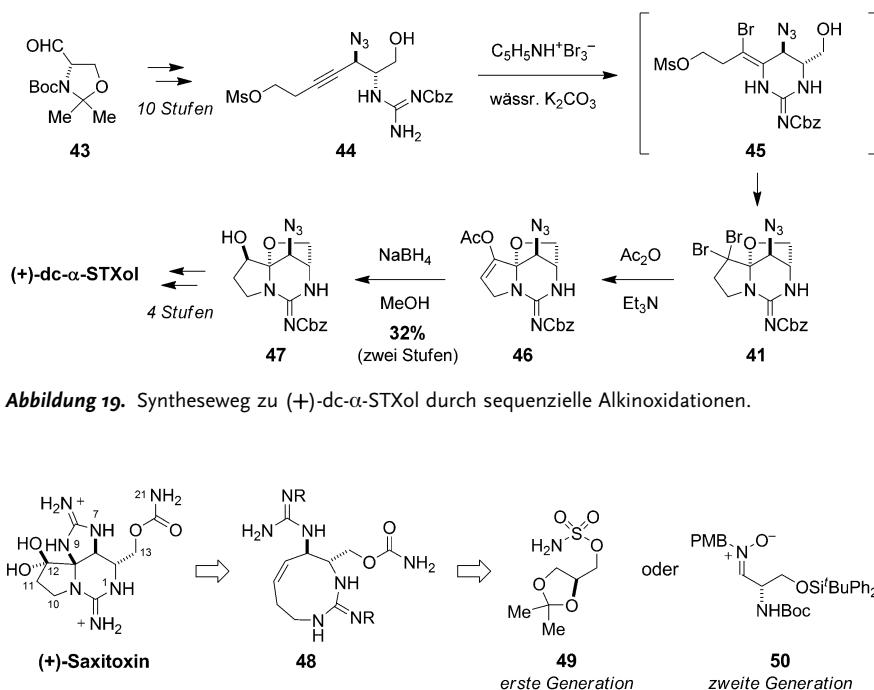


Abbildung 19. Syntheseweg zu (+)-dc- α -STXol durch sequenzielle Alkinoxidationen.

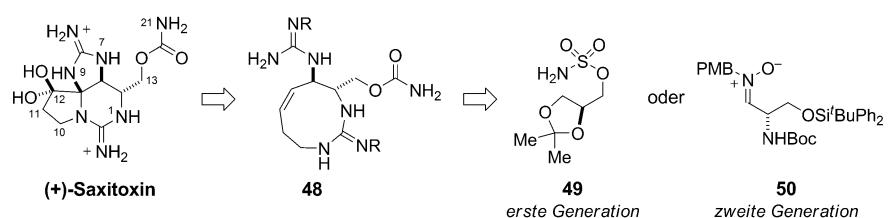


Abbildung 20. Retrosynthetische Bindungsbrüche von (+)-STX zu einem monacyclischen Bis-guanidin.

Betracht. Das Alken kann leicht in einen mittelgroßen Ring **48** eingebaut sein, der die beiden Chiralitätszentren C5 und C6 kodiert (Abbildung 20). Mit diesem Syntheseplan sollen die konformativen Vorgaben von **48** genutzt werden, um das stereochemische Resultat der C4-Aminalbildung zu steuern. Die Aufgaben dieser Trennungsstrategie verlangen Methoden für 1) eine Sechs-Elektronen-Alkenoxidation zur Bildung des benötigten C4,C12-Diketons und 2) die Herstellung des ungewöhnlichen neungliedrigen cyclischen Guanidins.

Die Arbeitsgruppe von Du Bois hat zwei Wege zur Herstellung des cyclischen Guanidins **48** entwickelt (Abbildung 21).^[75] Der eine nutzt die Rh-katalysierte C-H-Aminierung^[89] zur stereoselektiven Synthese des Oxathiazinans **51**, einer neuen heterocyclischen Einheit, die einen 1,3-Aminoalkohol maskiert.^[90] Nach Überführung dieser Verbindung in den Isothioharnstoff **53** folgt eine Reaktionssequenz aus Azidreduktion, Carbodiimidbildung und Ringschluss zu **54**. Das neungliedrige cyclische Guanidin, eine bis dahin unbekannte Struktur, ist über diese Eintopfreaktion in 65% Ausbeute erhältlich.

Das Oxathiazinan **51** ermöglicht zwar eine effiziente Herstellung von **54**, dennoch gibt es für diese Verbindung eine kürzere und maßstäblich leicht zu vergrößernde Synthesemethode aus dem von L-Serin abgeleiteten Nitron **50** (Abbildung 21).^[75b] Durch Acetylidaddition von **55** an **50** wird der benötigte Isothioharnstoff eingeführt, wodurch sich die Gesamtzahl der Reaktionsschritte zu **57** verringert. Aus dieser Verbindung kann **54** leicht durch Cyclokondensation erhalten werden.

Für die direkte Überführung von Alkenen in α -Ketol- oder α -Diketoneinheiten gibt es zwar nur eine begrenzte Zahl von Oxidationsmethoden, doch mit einer Kombination aus

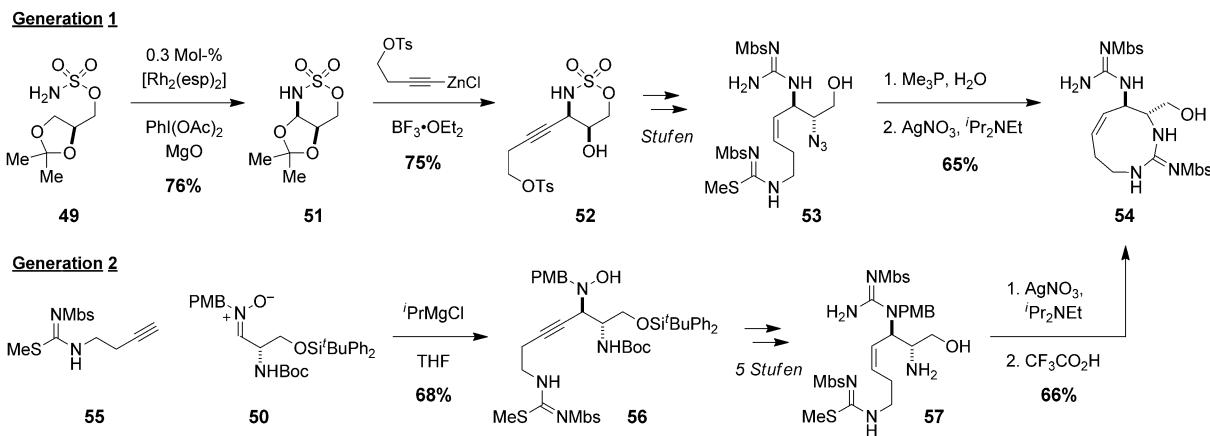


Abbildung 21. Erste und zweite Synthese eines ungewöhnlichen Neunringguanidins als Zwischenverbindung.

dem Katalysator OsCl_3 und Oxon entstand der Ketoalkohol regioselektiv aus dem Carbamat **58** (Abbildung 22). Das C4-Keton wurde hingegen nicht erhalten, da die transannulare Addition des Guanidin-N3-Stickstoffatoms stark bevorzugt

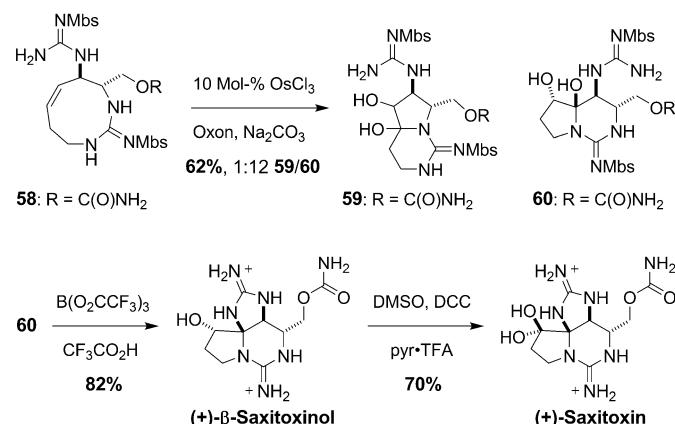


Abbildung 22. Die Schlussequenz aus Alkenoxidation und Ringschluss.

ist und das bicyclische Halbaminal **60** als einziges Epimer liefert. Die Bedingungen zur Bildung dieses Produkts sind sehr speziell, denn andere Kombinationen mit Oxidantien wie OsO_4 und $t\text{BuOOH}$ ergeben den isomeren Bicyclus **59**. Auch wenn die Faktoren, die die Selektivität dieser ungewöhnlichen Vier-Elektronen-Alkenoxidation steuern, unklar bleiben, lässt sich das gewünschte Produkt durch Umsetzung mit $\text{B(O}_2\text{CCF}_3)_3$ leicht in β -Saxitoxin überführen. Diese Lewis-Säure vermittelt sowohl den Ringschluss des fünfgliedrigen

Guanidins als auch die Abspaltung der Methoxybenzolsulfonyl(Mbs)-Schutzgruppen. Die abschließende Oxidation von β -Saxitoxin mit Dicyclohexylcarbodiimid/DMSO erfolgt nach einer früher beschriebenen Methode.^[59]

Mit dem Abschluss der Synthese von (+)-STX war der Zugang zu nichtnatürlichen, vor allem an N21 der Carbamatgruppe substituierten Toxinderivaten möglich (siehe Abschnitt 5.3).

Der Wunsch, die mit STX verwandten Verbindungen GTX II, GTX III und ZTX sowie an C10 und C11 modifizierte STX-Derivate herzustellen, veranlasste die Arbeitsgruppe von Du Bois, eine andere Synthese für das diesen Zielverbindungen gemeinsame Perhydropyropurin-Grundgerüst zu entwickeln (Abbildung 23). Methoden zur Bildung elektrophiler Nitrenoid-Oxidantien waren die Basis für einen Syntheseplan, bei dem die Pyrroloxi-dation zur Bildung des tricyclischen N,O-Acetals **61** genutzt wird. Diese Zwischenverbindung ist so konfiguriert, dass sowohl der benötigte C11-Substituent als auch die C12-Ketogruppen für den Aufbau von GTX oder ZTX eingeführt werden können.

Die asymmetrische Synthese von (+)-GTX III geht von L-Serinmethylester aus (**65**, Abbildung 24), der über eine vierstufige Sequenz unter Verwendung einer diastereo-selektiven Pictet-Spengler-Additionsreaktion (>20:1 *trans/cis*) in den Harnstoff **67** überführt wird. Dieser wird zu dem Bisguanidin **68** umgesetzt, wobei die beiden funktionellen Gruppen mit konventionellen Methoden eingeführt werden. Für die anschließende Nitrenoidbildung muss das *N*-7,8,9-Guanidin als *N*-Trichlorethoxysulfonamid (Tces) geschützt werden. Die Oxidation des Pyrrols mit einem hypervalenten Oxidationsmittel in Gegenwart eines Dirhodiumtetracarb-

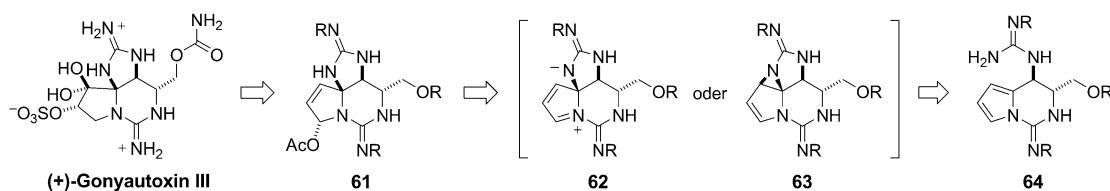


Abbildung 23. Alternativer Reaktionsweg zu PSPs unter Verwendung der metallkatalysierten Pyrroloxidation.

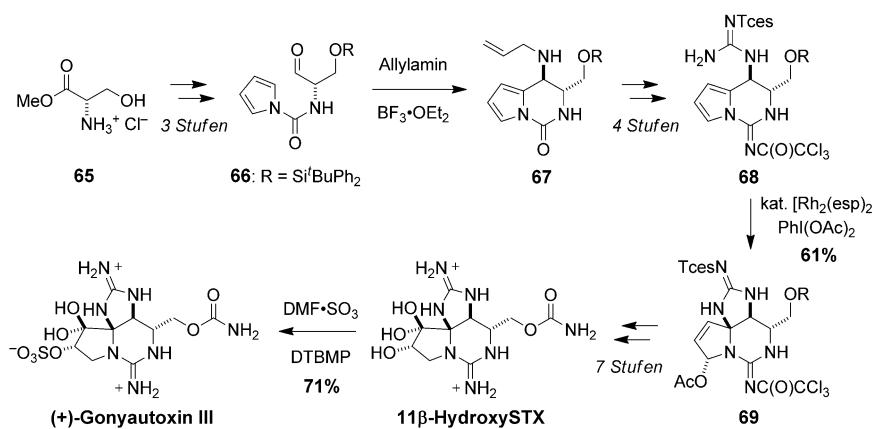


Abbildung 24. Die erste vollendete Synthese von (+)-GTX.

oxylat-Katalysators liefert das Pyrrolin **69**. Es wird als einziges Diastereomer erhalten und entsteht entweder durch Abfangen einer dipolaren Spezies **62** oder durch Ringöffnung des Aziridins **63** mit AcOH (Abbildung 23). Das N,O-Acetal **69** ist eine vielseitige Zwischenverbindung, die an den Positionen C10, C11 und C12 des Pyrrolidinrings und, da die beiden Guanidinogruppen verschiedene Schutzgruppen haben, auch an N1, N7 und N9 modifiziert werden kann. Der Abschluss der ersten Synthese von GTX III verläuft über 11β-Hydroxy-STX, dessen selektive C11-OH-Sulfatierung mit DMF-SO₃ und einer Pyridinbase den Naturstoff liefert. Die Epimerisierung des C11-Sulfats in schwach alkalischer wässriger Lösung zu einem 3:1-Gemisch aus GTX II und GTX III wurde auch bei der ursprünglichen Isolierung der beiden Verbindungen beobachtet.^[91]

3.7. Synopsis

Die ungewöhnliche polycyclische und an Heteroatomen reiche Struktur von STX und verwandten Toxinen bleibt eine faszinierende aktuelle Herausforderung für die chemische Synthese. Die vielen Synthesewege, die für diese Toxine entwickelt wurden, unterscheiden sich voneinander und markieren den Fortschritt bei der Entwicklung von Reaktionsmethoden zum Aufbau von Stickstoffheterocyclen und Guanidinderivaten. Diese Arbeiten gipfelten schließlich in asymmetrischen Synthesen von (+)-STX und (+)-GTX III, die die Herstellung ausgewählter Derivate für Untersuchungen der Struktur und Wirkung von Na_vs ermöglichen, wie in den folgenden Abschnitten besprochen wird. Der Bedarf an molekularen Sonden nach dem Vorbild von STX sollte zu künftigen Innovationen in der Synthese anregen und die Herstellung dieser komplizierten Verbindungen weiter optimieren. Und mit der Aufklärung von Strukturen neuer STX-Analoga wie ZTX bleibt das Interesse an den Guanidiniumtoxinen sicherlich groß.

4. Bestimmung der Toxin-bindungsstelle im Na_v

Untersuchungen mit STX und TTX hatten entscheidende Bedeutung für die Bestimmung der zellulären und molekularen Eigenschaften von Na_vs. Die Größe (ca. 260 kDa) der porenbildenden α-Untereinheit von Säugetier-Natriumkanälen, der Umfang der Glycosylierung (15–30 Gew.-%)^[25c] sowie die obligatorische Platzierung in der Zyttoplasmamembran von Zellen erschweren die Isolierung des Proteins in für Strukturstudien ausreichenden Mengen. Kristallographische Analysen von spannungsgesteuerten Bakterien- und Säugetier-K⁺-Kanälen^[92] und prokaryotischen Na_vs^[50] erleichterten die Entwicklung von Homologiemodellen für Säugetier-Na_v-Orthologe; die Modelltreue wird jedoch durch die niedrige Sequenzhomologie und die homotetramere Form dieser anderen Kanäle auf die Probe gestellt. Eine verfügbare kryoelektronenmikroskopische Darstellung des Na_v von *Electrophorus electricus* in 19 Å Auflösung bietet zwar einen recht interessanten Blick auf die grobe Topologie des Proteins und der Ionenstromporten,^[93] ihre Auflösung reicht aber nicht aus, um Einblicke in die molekulare Form und Funktion des Na_v zu gewinnen. Dementsprechend beruhen die gegenwärtigen Vorstellungen von der Na_v-Struktur auf Ergebnissen, die durch rekombinante Na_v-Expression, ortsspezifische Proteinmutagenese, Elektrophysiologie und Struktur-Aktivitäts-Beziehungen des Toxins erhalten wurden.

4.1. Die Struktur des eukaryotischen Na_v-Kanals

1984 veröffentlichten Noda et al. die vollständige Aminosäuresequenz des Natriumkanals aus dem Elektroplax des Zitteraals *Electrophorus electricus*.^[94] Durch diese wegweisenden Ergebnisse wurde die funktionelle α-Untereinheit des Kanals als ein großes (260 kDa) einzelnes Polypeptid mit vier homologen Wiederholungseinheiten identifiziert. In späteren Arbeiten postulierten Guy und Seetharamulu auf der Basis einer Sequenzanalyse ein verfeinertes Modell der Sekundär- und Tertiärstruktur des Proteins.^[95] Jede Domäne besteht aus sechs α-Helices (S1–S6), die sich über die Länge der Membran erstrecken, darunter eine Arginin-reiche Helix (S4), die als Spannungssensor^[96] auf Änderungen des Membranpotentials reagiert (Abbildung 25). Große intrazelluläre Schleifenregionen verknüpfen die vier Wiederholungseinheiten und enthalten Positionen für die Proteinphosphorylierung. Die schnelle Inaktivierung des Kanals vermittelt ein zwischen den Domänen III und IV lokalisiertes Isoleucin-Phenylalanin-Methionin(IFM)-Strukturmotiv, das vermutlich wie ein „Klapptablett“ wirkt und die Innenöffnung der Kanalpore blockiert.^[97] In dem von Guy und Seetharamulu entwickelten Modell faltet sich ein Teil der Sequenz zwischen S5 und S6 jeder Domäne zurück in die Membran und bildet so die äußere Kanalöffnung und den Ionenselektivitätsfilter.

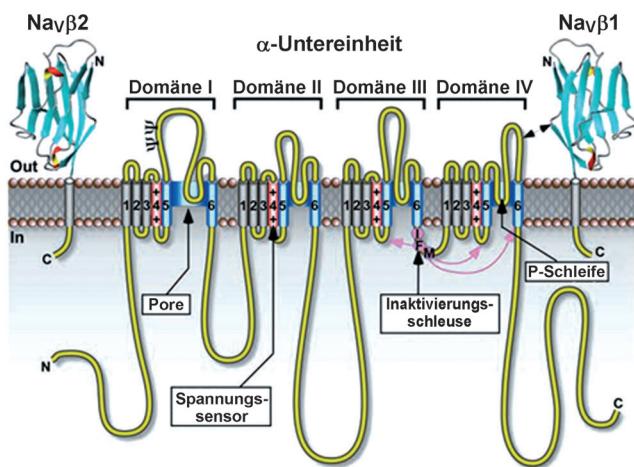


Abbildung 25. Schematische Darstellung der Molekülstruktur und Membrantopologie des Na_v . Die porenauskleidenden α -Helices S5 und S6 und die dazwischenliegenden p-Schleifenregionen, die den Ionenleitungsweg bilden, sind blau hervorgehoben.^[99]

ter.^[50,95] Diese so genannte p-Schleifenregion enthält viele Carboxylatreste und wurde aufgrund von Mutagenese- und SAR-Studien als Bindungsort des Guanidiniumtoxins (Position 1) vermutet. Die stärkste Verengung in der Leitungspore resultiert aus der dichten Packung von vier Aminosäuren (eine aus jeder Domäne) – Aspartat (D), Glutamat (E), Lysin (K) und Alanin (A) – und wird oft als DEKA-Schleife oder Selektivitätsfilter bezeichnet.^[98] Dieser Ring aus Aminosäuren bildet die Basis einer äußeren Öffnung der Kanalpore, wo STX und TTX vermutlich hängen bleiben. Demnach entspricht das heutige Bild von der Bindung des Guanidiniumtoxins einem Stopfen, der Öffnung eines konischen Lochs verschließt.

4.2. Entscheidende Aminosäuren am STX-Bindungsort

Schon vor der Arbeit von Noda lieferten Untersuchungen der relativen Permeabilität organischer Kationen erste Erkenntnisse bezüglich der Porenstruktur und des Ionenselektivitätsfilters von Na_v s.^[100] Demnach erfolgt die Na^+ -Leitung durch eine $3 \times 5 \text{ \AA}$ große Pforte, die für die Passage der Guanidiniumtoxine zu eng, für das Guanidinium-Ion selbst aber groß genug ist.^[101] Spätere Untersuchungen durch Henderson, Ritchie und Strichartz ergaben, dass monovalente (H^+ , Li^+ , Tl^+), divalente (Be^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+}) und trivale Kationen (La^{3+} , Sm^{3+} , Er^{3+}) mit STX und TTX um eine gemeinsame Na_v -Bindungsstelle konkurrieren.^[102,103] Diese Arbeiten ließen vermuten, dass die Toxinbindungsstelle am Ionenpermeationsweg liegt. Darüber hinaus ergaben Versuche zur Bindung von STX und TTX an Na_v s, die mit speziellen Reagentien für funktionelle Gruppen modifiziert waren, weitere Einzelheiten der Kanalpore und ließen vermuten, dass der Selektivitätsfilter aus mehreren Carboxylatresten besteht (siehe Abbildung 29).^[30,103a]

Durch Klonen von cDNA konnten die primären Aminosäuresequenzen von mehreren eukaryotischen Na_v -Orthologen und Subtypen charakterisiert werden, darunter solche aus

Ratten- und Menschenhirn ($\text{Na}_v1.2$),^[104] Skelettmuskel- ($\text{Na}_v1.4$),^[105] und Herzmuskelzellen ($\text{Na}_v1.5$). Die meisten Isoformen und Proteinmutanten von Säugetieren können in heterologen Systemen wie Froschoozyten oder CHO(Chinese hamster ovary)-Zellen funktionell exprimiert werden. Zu den ersten Versuchen dieser Art gehören die von Noda et al., die nachwiesen, dass der Austausch von Glutamat (E) in der p-Schleife der Wiederholungseinheit I (E387, $\text{Na}_v1.2$) durch ein neutrales Glutamin (Q) zu einem > 1000-fachen Affinitätsverlust bei STX und TTX führt.^[106] Nach dieser ersten Arbeit erschienen mehrere Berichte über umfangreiche Mutageneversuche gegen $\text{Na}_v1.2$ und 1.4.^[107] Diese Untersuchungen ergaben fünf entscheidende Carboxylatreste – D400, E403, E755, E758, D1532 ($\text{Na}_v1.4$ -Nummerierung) –, die für den richtigen Ionenstrom und die Toxinbindung zuständig sind. Arbeiten von Terlau legen nahe, dass diese Cluster aus anionischen Gruppen in zwei „Ringen“ als DEKA und EEMD (eine Aminosäure aus jeder Wiederholungseinheit von I nach IV) den Selektivitätsfilter bzw. die Schleife der äußeren Öffnung bilden (Abbildung 26).^[107]

Isoform	Domäne I	Domäne II	Domäne III	Domäne IV
$\text{Na}_v1.2$	TQDFWEN	CG E WIET	TF K GWMD	TS A GDG
$\text{Na}_v1.4$	TQDYWEN	CG E WIET	TF K GWMD	TS A GDG
$\text{Na}_v1.5$	TQDCWER	CG E WIET	TF K GWMD	TS A GDG
$\text{Na}_v1.8$	TQDSWER	CG E WIEN	TF K GWMD	TS A GDG

Nav-Isoform	Mutation	K_d TTX (nM)	K_d STX (nM)
1.4	keine	40	3.0
1.5	keine	950	91.1
1.5	C374Y	1.3	5.2
1.5	R377N	7580	184

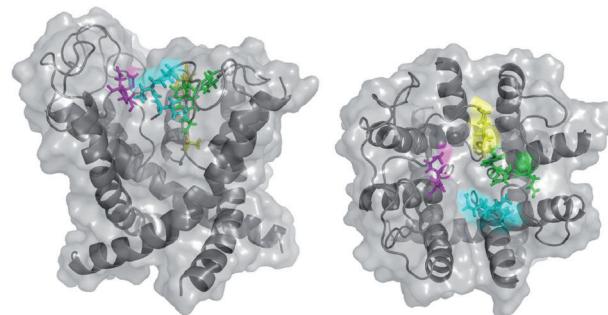
Abbildung 26. Oben: Sequenzreihen für die porenauskleidenden Regionen der Domänen I–IV bei $\text{Na}_v1.2$, 1.4, 1.5 und 1.8; unten: Bindungsdissoziationskonstanten von TTX und STX gemessen gegen $\text{Na}_v1.4$ und $\text{Na}_v1.5$ und ausgewählte, in Oozyten exprimierte Mutationen.^[28]

Ein Vergleich der Aminosäuresequenz von $\text{Na}_v1.4$ mit den evolutionär verwandten spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanälen lässt darauf schließen, dass D400 und E755 zusammen mit Lysin1237 (K1237) und Alanin1529 (A1529) den Ionenselektivitätsfilter bilden.^[108] Diese vier Aminosäuren, DEKA, sind in allen eukaryotischen Na_v -Subtypen konserviert; in den verwandten Ca_v -Kanälen befinden sich an strukturell homologen Positionen vier Glutamatreste, EEEE. Die Doppelmutation der Aminosäuren Lysin und Alanin in $\text{Na}_v1.2$ zu Glutamatresten (DEKA → DEEE) verändert die Ionenselektivität beträchtlich: Sie verringert sich für Na^+ gegenüber K^+ ($P_{\text{K}}/P_{\text{Na}} = 0.03$ für den Wildtyp gegenüber 0.69 für die Lysin → Glutamat-Mutante), während sich die Permeabilität von Ca^{2+} erhöht.^[108] Entsprechende Mutationen zum EEEE-Ring des Calciumkanals bestätigen die entscheidende Aufgabe dieser Aminosäuregruppen bei der Steuerung des spezifischen Ionenstroms.^[109]

Untersuchungen mit [^3H]-STX und Herzgewebe der Ratte^[110] sowie später mit STX und TTX an heterolog ex-

primiertem $\text{Na}_v1.5^{[111]}$ ergaben die fehlende Empfindlichkeit dieser Kanalisoform (ca. 100-fach) gegenüber einer Blockade durch das Toxin. Diese Entdeckung ist von historischer Bedeutung für die Na_v -Forschung, denn sie hat erhebliche Forschungsanstrengungen zur Bestimmung der molekularen Ursache für die Unterschiede zwischen „TTX-empfindlichen“ und „TTX-unempfindlichen“ (z. B. $\text{Na}_v1.5$) Subtypen initiiert. Durch Mutagenesevereversuche wurde festgestellt, dass die unterschiedliche Toxinbindungsaffinität für die Na_v -Subtypen von einzelnen Aminosäurevariationen in der p-Schleifenregion herrührt (Abbildung 26). Bei $\text{Na}_v1.5$ wird durch den Austausch des Cysteins an Position 374 ($\text{Na}_v1.5$ -Nummerierung) gegen einen Phenylalanin- oder Tyrosinrest die nanomolare Affinität von TTX und STX wiederhergestellt.^[28] Umgekehrt wird die Bindung von TTX und STX an $\text{Na}_v1.4$ destabilisiert, wenn Tyrosin 401 (Y401, $\text{Na}_v1.4$ -Nummerierung) durch Cystein ersetzt wird.^[112] Analoge IC_{50} -Messungen der Toxine wurden an Wildtyp- und Mutanten- $\text{Na}_v1.2$ durchgeführt.^[113] Das Vorhandensein einer aromatischen Aminosäure (Tyrosin oder Phenylalanin) in der Wiederholungseinheit I, eine Aminosäure von Selektivitätsfilter entfernt, scheint entscheidend für die hohe Affinität der Toxinblockade zu sein.^[114] Zwei weitere, überwiegend in sensorischen Nervenzellen exprimierte „TTX-unempfindliche“ Isoformen, $\text{Na}_v1.8^{[115]}$ und 1.9, haben an dieser Stelle einen Serinrest (S). TTX-Bindungsstudien mit Na_v -Mutanten, die an Position 401 ($\text{Na}_v1.4$ -Nummerierung) ein nichtnatürliches fluorsubstituiertes Phenylalanin enthalten, sprechen sehr stark für eine direkt π -Kation-Wechselwirkung mit der Guanidiniumgruppe in TTX.^[116] Ähnliche Untersuchungen mit STX wurden nicht beschrieben. Diese Ergebnisse liefern überzeugende molekulare Details der TTX/STX-Rezeptorstelle.^[117]

Die Gensequenzierung von Na_v s in Organismen, die TTX und STX nachweislich anreichern (z. B. Kugelfisch, Muscheln, Strumpfbandnattern) liefert weitere strukturelle Erkenntnisse über die entscheidenden Kontakte zwischen Toxin und Protein (Abbildung 27).^[64] Im Skelettmuskel des Kugelfisches sowie in $\text{Na}_v1.5$, 1.8 und 1.9 bewirkt die Mutation des aromatischen Rests 401 ($\text{Na}_v1.4$ -Nummerierung) zu Asparagin (N) Resistenz gegen eine Blockade durch submikromolare Toxinkonzentrationen.^[118] Weitere Untersuchungen, unter anderem mit dem Na_v der Sandklaffmuschel *Mya arenaria* – eine STX-Quelle, wenn sie während der Roten Tiden geerntet wird –, belegen die Bedeutung von Carboxylatresten für die Toxinbindung.^[119] Dieses Beispiel ist bemerkenswert, weil eine einzige Mutation von Glutamat (758, $\text{Na}_v1.4$ -Nummerierung) zu Aspartat die STX-Affinität um das 1500fache verringert (1.7 gegenüber 2700 nm). Mit neuen Fortschritten in der Gensequenzierungstechnik werden wahrscheinlich weitere Mutationen dieser Art in Organismen nachgewiesen, die gegenüber Vergiftungen mit STX und TTX resistent sind. Auch wenn die Affinitäten von TTX und STX für Na_v -Subtypen normalerweise die gleiche Größenordnung haben (was zu der allgemeinen Annahme führte, dass die beiden Toxine gewissermaßen äquivalent sind), haben mehrere Arbeitsgruppen Mutationen der Auskleidung von Ionenkanalporen nachgewiesen, die von diesem Muster abweichen. So vermindert eine Y401D-Mutation in $\text{Na}_v1.4$ die Wirksamkeit



Spezies	Domäne I	Domäne II	Domäne III	Domäne IV
<i>Fugu</i> ^{a,[64]}	QDNWES	GEWIET	FKGWMN	ITTSAG
<i>Clam</i> ^{b,[119]}	QDYWEN	GEWIDS	YKGWID	MCTSAG
<i>Garter Snake</i> ^{c,[120]}	QDYWEN	GEWIET	FKGWMD	VTTSAg
<i>H.sapiens</i>	QDYWEN	GEWIET	FKGWMD	ITTSAG

Abbildung 27. Ein Homologiemodell, das häufige Mutationen der Porenausträumung im Skelettmuskel- Na_v von toxinresistenten Organismen zeigt (grün = Domäne I, cyan = Domäne II, magenta = Domäne III, gelb = Domäne IV); die Tabelle enthält nur ausgewählte Beispiele sowie die entsprechenden Aminosäuresequenzen von menschlichem $\text{Na}_v1.4$. Mutationen, die die Toxinbindung destabilisieren, sind blau hervorgehoben. Die zum Selektivitätsfilter gehörenden Aminosäuren, DEKA, sind rot dargestellt. [a] *Takifugu rupripes*. [b] *Mya arenaria*. [c] *Thamnophis sirtalis*.

von TTX erheblich um das 4800fache ($\text{IC}_{50} = 36$ gegenüber 171 000 nm), hat aber nur moderate Auswirkungen auf STX (55fach, $\text{IC}_{50} = 3.1$ gegenüber 169 nm).^[121] Ähnliche Ergebnisse wurden für die Kanalmutanten D384E und W386Y erhalten.^[107] Eine speziesabhängige Variation zweier Aminosäuren in $\text{Na}_v1.7$ veränderte die STX-Affinität um das 300fache bei Nichtprimaten- gegenüber Primatenorthologen.^[122] Diese Strukturunterschiede betreffen benachbarte Aminosäuren der Wiederholungseinheit III. Überraschenderweise ist die Wirkung der beiden Reste auf die Affinität von TTX nahezu null (siehe Abschnitt 4.4).

4.3. Die Bindung modifizierter Saxitoxine an Na_v -Kanäle

Bindungsstudien mit natürlichen und nichtnatürlichen Derivaten von TTX und STX ergänzen die Versuche zur Proteinmutagenese bei der Untersuchung der Na_v -Porenstruktur. Die gemessenen Wirksamkeiten für die Kanalblockade durch desoxygierte TTX-Formen und sulfatierte STX-Derivate (d.h. Gonyautoxine) variieren gegenüber den Stammverbindungen von gering bis beträchtlich.^[66,123] Von den natürlich vorkommenden Saxitoxinvarianten (siehe Abbildung 5) erwiesen sich Neosaxitoxin (Neo-STX), eine N1-hydroxylierte Form von STX, und ausgewählte Gonyautoxine in Bindungsstudien als besonders informativ. Versuche zur Messung der Inhibitorwirkung von Neo-STX auf die Natriumströme in Skelettmuselfasern des Frosches ergaben, dass diese Modifizierung nur wenig Einfluss auf die Wirksamkeit des Toxins hat.^[124] Der pK_a -Wert der N-OH-Gruppe in Neo-STX wurde mit 6.75 gemessen, die Aciditätskonstanten für

das 7,8,9-Guanidin betragen in STX und Neo-STX 8.25 bzw. 8.65 und für das 1,2,3-Guanidin in beiden Verbindungen > 11.^[125] Bei pH-Werten unter 8.2 bleibt die Wirksamkeit beider Verbindungen im unteren nanomolaren Bereich gegen den Ionenkanal erhalten.^[126] Nur wenn der pH-Wert auf > 8.2 steigt, sinkt die Affinität der beiden Toxine. Diese Ergebnisse verdeutlichen den essentiellen Charakter des protonierten 7,8,9-Guanidins für eine wirksame Toxinbindung und bilden die Grundlage für Toxinrezeptormodelle, bei denen diese Einheit in Richtung der DEKA-Schleife (Selektivitätsfilter) positioniert ist.^[4,117]

Auch Versuche mit den C11- α - und C11- β -sulfatierten Toxinen GTX II und GTX III sprechen für die entscheidende Rolle der 7,8,9-Guanidiniumeinheit bei der Ligandenbindung.^[126–128] Die Wirksamkeit dieser Verbindungen unterscheidet sich verglichen mit STX nicht sehr von der ihrer Strukturverwandten GTX I und IV (z.B. GTX III IC₅₀ = 14.9 ± 2.1 nm, rNa_v1.4),^[122] obwohl sie ein größeres Volumen und eine andere Gesamtladung haben. Demnach ist die dicationische Ladung von STX keine Vorbedingung für eine hochaffine Blockade des Natriumkanals.

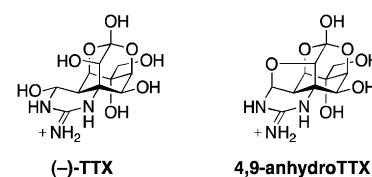
Nichtnatürliche STX-Derivate wie α - und β -Saxitoxinol^[59,60] und C12-Oximaddukte^[129] wurden durch Semisynthese erhalten. Die Wirksamkeit der Saxitoxinole (570 nm bzw. 33 μ m gegen Na_v1.4)^[60] wird allgemein als Beweis gegen eine reversible kovalente Toxin-Protein-Bindung angeführt.^[130] Insgesamt bekräftigen Blockierungsmessungen mit diesen Verbindungen die Bedeutung des hydratisierten C12-Ketons für die hohe Affinität der Toxinblockade, da ihre Wirksamkeit verglichen mit STX deutlich geringer ist. Aktuelle Modelle für die STX-Bindung an die Kanalpore lassen darauf schließen, dass das hydratisierte Keton wichtige Wasserstoffbrücken mit Glutamat 758 (Na_v1.4-Nummerierung) bildet.^[122,131–133] Diese Modelle geben jedoch keine Erklärung für die unterschiedlichen IC₅₀-Werte von α - und β -Saxitoxinol.

Die Abspaltung des C13-Carbamats in STX zu dcSTX durch saure Hydrolyse des Naturstoffs^[134] resultiert in einer 12fach geringeren Inhibition des Na_v1.4 (früheren Untersuchungen zufolge behält dcSTX ca. 1/5 der Wirksamkeit von STX).^[135] Diese moderate Wirkung auf die Toxinaffinität initiierte Arbeiten, bei denen die C13-Position von STX auf zwei verschiedene Arten modifiziert wird: 1) durch Reaktion von dcSTX mit Bernsteinsäureanhydrid zu einem C13-Esterderivat, allerdings mit niedriger Ausbeute (16%);^[59] 2) durch De-novo-Synthese wie von Du Bois und Nagasawa beschrieben. Die Synthese eines N21-Dimethylderivats von STX durch Andresen und Du Bois belegt, dass eine Substitution des Carbamat-Stickstoffatoms die Affinität des Toxins für Na_v1.4 (2.1 nm) nicht verringert.^[60] Später nutzten Llewellyn,^[136] Oshima,^[137] Nagasawa^[138,139] und Du Bois^[60,85–88] die C13-Position von Saxitoxin als Zugang zu modifizierten Toxinen, darunter biotin-, affinitäts- und fluoreszenzmarkierte Konjugate (siehe Abschnitte 5.2, 5.3).

Parallel zu den Arbeiten mit STX wurden elektrophysiologische Messungen und Untersuchungen der Proteinbindung mit natürlich vorkommenden desoxygениerten Formen von TTX durchgeführt, um die Auswirkungen dieser Modifizierungen auf die Toxinbindung zu untersuchen.^[66,140] Die

Struktur von TTX und die ihm eigene Instabilität gegenüber Basen bieten erhebliche Schwierigkeiten bei einer Derivatisierung des Toxins durch Semisynthese.^[141] Die Modifizierung des C11-Alkohols, die eine oxidative C6,C11-Spaltung zum C6-Keton umfasst, ist möglich und wurde zur Herstellung eines TTX-Photoaffinitätssensors genutzt.^[142] Proteinmarkierungsversuche mit dieser Verbindung ließen jedoch keine spezifischen Details der Toxinbindungsstelle erkennen, da die photochemische Verknüpfung an mehreren Orten erfolgte.

Unter den TTX-Analoga ist 4,9-Anhydrotetrodotoxin das wohl überzeugendste (Abbildung 28). Die Verbindung wurde 1964 erstmals identifiziert und als schwach wirksames TTX-



Nav-Isoform	IC ₅₀ TTX	IC ₅₀ 4,9-anhydroTTX
1.2	7.8 ± 1.3	1260 ± 121
1.3	2.0 ± 0.4	341 ± 36
1.4	4.5 ± 1.0	988 ± 62
1.5	1970 ± 565	78,500 ± 11,600
1.6	3.8 ± 1.5	7.8 ± 2.3
1.7	5.5 ± 1.4	1270 ± 251
1.8	1330 ± 459	>30,000

Abbildung 28. Vergleich der Affinitäten von TTX und 4,9-Anhydro-TTX gegenüber sieben Nav-Subtypen, die durch elektrophysiologische Messungen an *Xenopus*-Oocyten bestimmt wurden. 4,9-Anhydro-TTX ist ein selektiver Inhibitor von Na_v1.6.^[145]

Derivat weitgehend verworfen.^[143,144] 2007 berichteten Schreibmayer et al. jedoch über eine umfassende elektrophysiologische Untersuchung von 4,9-Anhydro-TTX gegen eine Gruppe Na_vs, die sieben der neun Säugetierisoformen umfasste (Na_v1.2–1.8, Oozyten).^[145] Bemerkenswert ist die einzigartige Selektivität dieser Verbindung für Na_v1.6 (IC₅₀ = 7.8 nm). Im Vergleich dazu erfordert die IC₅₀-Blockade anderer Na_v-Subtypen durch 4,9-Anhydro-TTX 40–1000-mal höhere Konzentrationen. Die molekulare Basis für diese differenzierte Wirksamkeit ist derzeit zwar noch nicht bekannt, dennoch könnten die Ergebnisse in Bezug auf das Design und die Entwicklung Isoform-selektiver Na_v-Inhibitoren äußerst nützlich sein.

Eine Methode, die Proteinmutagenese und Struktur-Aktivitäts-Beziehungen des Toxins kombiniert und als Doppelmutationszyklusanalyse bezeichnet wird, lieferte wichtige Einblicke in die Struktur der Na_v-Toxinrezeptorposition. Arbeiten von Terlau,^[107a] Lipkind und Fozard^[132a] sowie Dudley^[131,146] resultierten in TTX- und STX-Bindungsmodellen, von denen letzteres in Abbildung 29 gezeigt ist. Die jeweilige Anordnung der vier Wiederholungseinheiten im Uhrzeigersinn basiert auf den am besten passenden Daten der Mutationszyklusanalyse, die mit Toxinen wie dem Peptidinhibitor μ -Conotoxin GIIIA durchgeführt wurde.^[147]

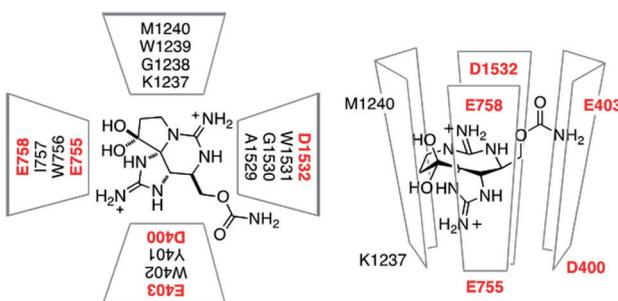


Abbildung 29. Vorgeschlagene Orientierung der STX-Bindung, die durch Proteinmutagenese, Struktur-Aktivitäts-Beziehungen des Toxins und Analyse von Doppelmutationszyklen ermittelt wurde. Rot dargestellte Carboxylatreste sind entscheidend für die hohe Affinität der Blockade durch das Toxin.^[85]

Obwohl eine große Untergruppe natürlich vorkommender TTX- und STX-Derivate erhältlich ist, wäre eine vielfältigere Kollektion von Toxinanaloga – Verbindungen, die durch chemische De-novo-Synthese zugänglich sind – vermutlich von Vorteil für die strukturelle Kartierung des Ionenkanals durch Mutationszyklusanalyse. Durch Untersuchungen, die die Proteinmutagenese mit kompensierenden Modifizierungen der Toxinstruktur kombinieren, sollten sich orthogonale Toxin/ Na_v -Mutantenpaare identifizieren lassen, die als potenzielle Hilfsmittel für chemisch-genetische Studien der Funktion von Na_v -Isoformen dienen könnten.

4.4. Computermodelle des Na_v -Kanals

Umfangreiche Daten, die durch Proteinmutagenese und Struktur-Aktivitäts-Beziehungen des Toxins erhalten wurden, bilden zusammen mit der Sequenzanalyse und Homologiemodellierung die Grundlage aktueller molekularer Darstellungen der Kanalpore und der Toxinbindungsstelle. 1994, noch vor der Veröffentlichung der ersten Röntgenkristallstruktur eines Kationenkanals überhaupt, entwickelten Lipkind und Fozard ein Modell der äußeren Öffnung von Na_v 1.4, der damals am besten untersuchten Kanalisoform.^[148] Das ursprüngliche Lipkind/Fozard-Modell enthielt 40 Aminosäuren, zehn von jeder der einspringenden Schleifen, die die Transmembranhelices S5 und S6 in jeder Wiederholungseinheit verknüpfen. Obwohl das Lipkind/Fozard-Modell nach heutigen Standards einfach ist, ließ es wichtige Kontakte der Carboxylatreste in den Wiederholungseinheiten I und II des Kanals (D400, E755, E758, Na_v 1.4-Nummerierung) mit dem 7,8,9-Guanidiniumring und dem hydratisierten C12-Keton von STX erkennen. Dieses Modell der STX-Bindung implizierte auch eine hydrophobe Wechselwirkung zwischen einem unpolaren Methionin (M1240) in der Domäne III und der C10-C11-Region des Toxins. Der 7,8,9-Guanidiniumring ist zur engsten Stelle der Porenregion ausgerichtet, den die Aminosäureschleife D400-E755-K1237-A1529 (DEKA), die den Ionenselektivitätsfilter bildet, bestimmt.

Mit den ersten Proteinröntgenstrukturen von Kationenkanälen^[92b] wurden differenziertere Modelle der Na_v -Pore entwickelt.^[149] Auf der Basis von KcsA, einem homotet-

meren bakteriellen Kaliumkanal, haben Lipkind und Fozard ein verbessertes Na_v -Modell beschrieben, das neben den p-Schleifenabschnitten jeder Wiederholungseinheit die S5- und S6-Helices enthält.^[133] Ein durch röntgenkristallographische Analyse von KcsA erhaltenes α -helicales β -Strangmotiv wurde als Templat für die p-Schleifenabschnitte verwendet. Die Verfeinerung dieses Modells beruhte auf einer Reihe von Berichten, die detailliert die Mitwirkung der die Poren auskleidenden Aminosäuren an der Na_v -Ionenselektivität beschreiben. Unter Berücksichtigung von Mutagenesestudien, die das Lysin im DEKA-Filter als entscheidend für die Na^+ -Selektivität bestimmten, wurden die Kontakte der nächsten benachbarten Aminosäuren mit K1237 untersucht.^[98] Alles in allem bildete diese verfeinerte Untersuchung der Ionenkanalstruktur den Ausgangspunkt für nachfolgende Arbeiten dieser Art.

Andere Computermodelle der Na_v -Pore wurden auf der Basis von Röntgenstrukturen der prokaryotischen Kaliumkanäle MthK, KcsA und K_vAP erstellt. Vor kurzem nutzten Tikhonov und Zhorov^[132] die Struktur des bakteriellen Natriumkanals Na_vAb als Templat für die Analyse des Säugetierorthologen. Allerdings wird der bakterielle Kanal durch TTX nicht blockiert, und der Grad der strukturellen Ähnlichkeit mit dem Säugetierkanal ist unklar, da Na_vAb ein Homotetramer ist.^[4,50] Ein sinnvoller Abgleich der Na_v 1.4-Proteinsequenz mit dem bakteriellen Kanal erfordert in der p-Schleifenregion die Einführung einer Lücke aus einem Rest. Diese Anpassung sorgt für eine Abstimmung der Seitenkettenorientierung wichtiger Aminosäuren, die in Kontakt mit TTX treten. Trotz eindrucksvoller Fortschritte bei der Vorhersage von Proteinstrukturen in den vergangenen 20 Jahren bleibt die genaue Modellierung der Sekundär- und Tertiärstruktur eines Proteins von der Größe und Komplexität der Na_v -Untereinheit eine ungenaue Wissenschaft.

Ein nach der K_vAP -Struktur angefertigtes Molekülmodell der Na_v -Pore (Abbildung 30) diente dazu, die unterschiedliche Wirksamkeit von STX, GTX III und TTX gegenüber dem menschlichen Na_v 1.7-Subtyp zu erklären (siehe Ab-

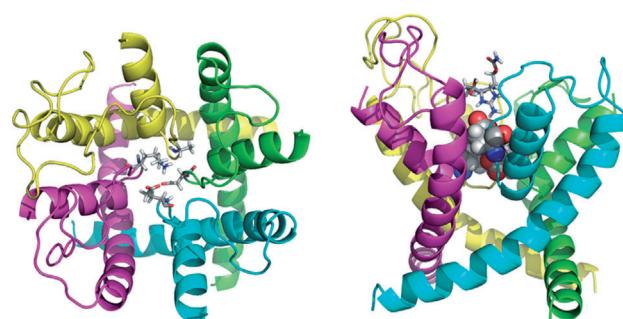


Abbildung 30. Ein r Na_v 1.4-Homologiemodell,^[122] das die S6- und p-Schleifenreste von der extrazellulären Seite (links) und von der Membran aus gesehen (rechts) zeigt. Die vier Domänen der Pore sind grün (Domäne I), türkis (Domäne II), purpur (Domäne III) und gelb (Domäne IV) dargestellt. Reste, die den DEKA-Selektivitätsfilter bilden, sind als Stäbchen- und als Kalottenmodell gezeigt; die Atome sind rot (Sauerstoff), blau (Stickstoff), weiß (Wasserstoff) und grau (Kohlenstoff). STX bindet oberhalb des Selektivitätsfilters, wie die Seitenansicht zeigt.

schnitt 4.3).^[122] Der Bericht von Walker et al. stellt die lange akzeptierte Auffassung infrage, dass STX und TTX ähnliche Affinitätsprofile gegen die neun „toxinempfindlichen“ und „toxinunempfindlichen“ Nav-Isoformen von Säugetieren haben (Tabelle 2). Elektrophysiologische Messungen an

Tabelle 2: Inhibitorkonstanten für TTX und STX gegen hNa_v1.7, rNa_v1.4 und ausgewählte Mutationen, bestimmt durch elektrophysiologische Messungen an CHO-Zellen.^[122]

Na _v -Isoform	Mutation	IC ₅₀ TTX	IC ₅₀ STX
1.4	keine	17.1 ± 1.2	2.8 ± 0.1
1.4	M1240T	466 ± 42	73 ± 2.6
1.4	D1241I	8.7 ± 0.8	53 ± 4.6
1.4	M1240T, D1241I	90 ± 4.7	1153 ± 60
1.7	keine	18.6 ± 1.0	702 ± 53
1.7	T1398M, I1399D	5.0 ± 0.9	2.3 ± 0.2

der α-Untereinheit von in CHO-Zellen exprimiertem hNa_v1.7 zeigen deutliche Unterschiede in den Wirksamkeiten von STX, GTX III und TTX. Konzentrations-Wirkungs-Kurven ergeben IC₅₀-Werte von 702 und 1513 nm für STX bzw. GTX III, dagegen blockiert TTX 50% dieses Kanals bereits in einer Konzentration von 19 nm. Demgegenüber liegen die IC₅₀-Werte der drei Toxine für die Inhibition von Na_v1.4 alle in einer Größenordnung. Ein Sequenzabgleich von Na_v1.4 und 1.7 ergibt zwei Aminosäureunterschiede in strukturell homologen Positionen der Domäne III in der p-Schleifenregion (M1240, D1241 in Na_v1.4; T1398, I1399 in Na_v1.7). Diese Doppelvariation scheint nur in Na_v1.7 und – was besonders bemerkenswert ist – nur in Primatenorthologen vorzukommen. Einfache und doppelte Punktmutationen der Aminosäuren sprechen zusammen mit Untersuchungen der Toxinbindung dafür, dass diese beiden Aminosäuren direkt für die Änderung des STX/TTX-Selektivitätsprofils verantwortlich sind.

Molecular-Modeling- und Liganden-Docking-Studien lassen darauf schließen, dass die MD → TI-Variation zwischen Na_v1.4 und 1.7 die lokale elektrostatische Potentialfläche und die Größe der äußeren Öffnung signifikant ändert (Abbildung 31).^[122] Die Bindung von STX an hNa_v1.7 wird vermutlich dadurch destabilisiert, dass die Coulomb-Anziehung verringert ist und die dichte Packung zwischen Ligand und Rezeptor verlorengeht, weil durch die Threonin- und Isoleucin-Substitution ein großer Leerraum entsteht. Unterschiede in der Affinität von TTX und STX zu hNa_v1.7 manifestieren sich weitgehend als Folge der ganz verschiedenen Ladungsüberflächen dieser beiden Verbindungen. An den Grenzen des derzeitigen Modells eröffnen diese Ergebnisse die verlockende Möglichkeit, ein STX-Derivat als selektiven hNa_v1.7-Inhibitor herzustellen. Angesichts des großen Interesses an diesem Zielprotein in der Schmerzforschung könnte eine solche Entdeckung erhebliche translationale Auswirkungen haben.^[48]

Fortschritte bei den Computermodellen werden zusammen mit der fast sicheren Gewissheit, dass die Strukturbioologie eines Tages die atomare Auflösung eines Säugetier-Na_v-Kanals leisten wird, unser Wissen zur Toxinbindung weiterentwickeln. Die intrinsische Dynamik der spannungsgesteu-

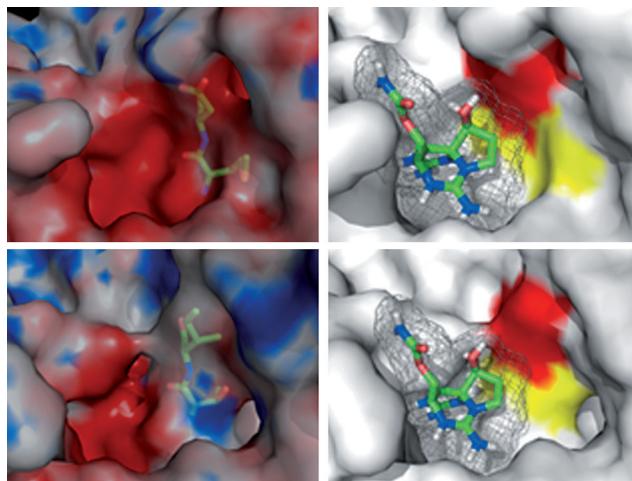


Abbildung 31: Darstellungen auf der Basis eines Homologiemodells^[122] zeigen Unterschiede zwischen Nav1.4 (oben) und Nav1.7 (unten). Bei den Abbildungen rechts ist STX in identischen Positionen angedockt, um die sterischen Unterschiede der Zweipunktvariation M→T/D→I hervorzuheben. M1240 und T1398 sind gelb, D1241 und I1399 rot dargestellt.

erten Ionenkanäle verlangt, dass Proteine rasch verschiedene Konformationszustände durchlaufen, die grob als offen, inaktiviert und geschlossen betrachtet werden.^[2b] Demzufolge werden Proteinmutagenese und Daten zu Struktur-Aktivitäts-Beziehungen des Toxins unser Wissen über die Na_v-Struktur erweitern, selbst wenn bestimmte Proteinkonformere durch Röntgenkristallographie identifiziert werden. Die derzeit verfügbaren Modelle für die äußere Öffnung und den Selektivitätsfilter des Nav können bestimmte Eigenschaften nicht erklären, unter anderem Unterschiede bei den Toxinaffinitäten gegenüber verschiedenen Isoformen (z. B. Kanälen, die im Kugelfisch, in der Muschel oder der Strumpfbandnatter exprimiert werden) und bei den Wirksamkeiten nahe verwandter Toxinverbindungen (z. B. α- und β-Saxitoxin, TTX und 4,9-Anhydro-TTX). Zu gegebener Zeit wird es Antworten auf diese Fragen geben, und mit neuen, durch chemische Synthese erhältlichen Toxinderivaten könnte das rationale Design wirksamer, für Na_v-Subtypen spezifischer Inhibitoren realisiert werden.

5. Molekulare Sonden für Na_v-Untersuchungen

Das Interesse an der Struktur und Wirkungsweise des Na_v, die Einzigartigkeit von STX als Na_v-selektiver Inhibitor und die Möglichkeit, diese Verbindung durch chemische Synthese zu erhalten, veranlassten die Planung von Toxinanaloga für biochemische und pharmakologische Untersuchungen. Diese Verbindungen sind potenziell nützlich für die detaillierte Kartierung der Porenstruktur und eine Überprüfung der Genauigkeit von Homologiemodellen, als Sonden zur Markierung der Zellorte von Na_vs und zur Klärung der physiologischen Aufgabe einzelner Na_v-Isoformen sowie als künftige Therapeutika in der Schmerzbehandlung. In Bezug auf die therapeutischen Möglichkeiten ist die Effektivität von STX,^[150] GTX^[151] und Neo-STX^[152] als langwirkende Lokal-

anästhetika bei chronischen und neuropathischen Schmerzen anhand klinischer Daten beim Menschen bewiesen, auch wenn die systemische Toxizität noch ein wichtiger Faktor ist. Der Bedarf an Subtyp-spezifischen Na_v -Modulatoren, die als klinisch sichere und effiziente Analgetika an den vermutlich für die Nozizeption zuständigen Isoformen ($\text{Na}_v1.3, 1.6, 1.7, 1.8$) wirken, ist eine gewaltige Aufgabe für die Wirkstoffentwicklung.^[48] Topologische Unterschiede in der p-Schleifenregion von Na_v -Isoformen, die beispielsweise entdeckt wurden durch die jüngste Identifizierung von 4,9-Anhydro-TTX als $\text{Na}_v1.6$ -selektiver Inhibitor, die differenzierte Wirkung von Aminosäuremutationen auf die Toxinbindung und den Nachweis natürlicher Aminosäurevariationen in menschlichem $\text{Na}_v1.7$, die diese Isoform von anderen unterscheiden, eröffnen die interessante Möglichkeit, ein modifiziertes STX für nur einen Kanalsubtyp zu entwickeln. Die Realisierung dieser Idee ausgehend von einer so komplizierten Leitstruktur wie STX kann nur mit der Leistungsfähigkeit der modernen chemischen Synthese gelingen.

5.1. Kishi/Strichartz

Die Totalsynthese von (\pm) -STX durch Kishi ermöglichte die spätere Untersuchung ausgewählter Derivate, darunter die beiden Enantiomere von dcSTX sowie nichtnatürliche C12- und C13-Desoxyverbindungen (Abbildung 32). In Zu-

Verbindung	K_i ($M \times 10^{-9}$)	$K_{i(\text{STX})}/K_i$	EC_{50} (nM)
$(+)$ -STX	0.96 ± 0.07	1	7.2 ± 1.3
$(+)$ -dcSTX	3.80 ± 0.68	0.25	16 ± 3
$(-)$ -dcSTX	33.9 ± 3.6	0.03	30 ± 6
70	960 ± 15	10^{-3}	$2.3 \pm 0.6 \times 10^3$
71	$3.5 \pm 0.4 \times 10^4$	2.8×10^{-5}	$2.5 \pm 0.5 \times 10^5$
72	ND	ND	$7.7 \pm 1.0 \times 10^5$
73	$5.9 \pm 2.4 \times 10^5$	1.6×10^{-6}	$>10^6$

Abbildung 32. Bindungsdissoziationskonstanten (K_i) und unterschiedliche Wirksamkeiten (EC_{50}) von C6- und C12-modifizierten Saxitoxinen.^[153] Die Werte wurden erhalten, indem die Inhibition des Aktionspotentials (AP) durch die Verbindung in hülfreien Ischiasnerven von *Rana pipiens* analysiert wurde.^[154]

sammenarbeit mit Strichartz wurden die Bindungsaffinitäten durch kompetitive Verdrängungs-Assays mit tritiummarkiertem STX ($[^3\text{H}]$ -STX) gegen in Kaninchenhirn exprimierten Ionenkanälen bestimmt.^[153] Diese Versuche ergaben für die Dissoziationskonstante (K_i) des Inhibitorkomplexes mit dem natürlichen Enantiomer $(+)$ -dcSTX den Wert 3.8 nM ($(+)$ -STX $K_i = 0.96 \text{ nM}$). Auch aus elektrophysiologischen Einzelkanalmessungen ging hervor, dass $(+)$ -dcSTX 25–40 %

weniger wirksam ist als der Naturstoff. Die überraschenderweise messbare Inhibitoraktivität von $(-)$ -dcSTX wird auf eine Verunreinigung der Probe mit 3–4% des $(+)$ -Isomers zurückgeführt. Das Entfernen des C13-Alkohols (**70**, doSTX) oder aller C13-Substituenten (**71**) schwächt die Ligand-Rezeptor-Bindung beträchtlich, Gleicher gilt für die Desoxygerierung an C12 (**72, 73**).

Insgesamt geht aus diesen Bindungsstudien mit STX-Analoga hervor, dass die Proteinwechselwirkung mit der C13-Carbamatgruppe keine signifikante Rolle bei der Toxinbindung spielt. Außerdem sprechen die Ergebnisse für eine stereoselektive Toxinbindung und rechtfertigen damit die Entwicklung neuer Synthesewege, die STX in optisch reiner Form liefern.

5.2. Yotsu-Yamashita/Nagasawa

In einer kürzlich erschienenen Arbeit berichtet Nagasawa über die systematische Analyse der inhibitorischen Aktivitäten von drei C13-modifizierten STX-Derivaten und drei verwandten kondensierten tricyclischen Verbindungen, die als FD-STX bezeichnet werden.^[138] Alle sechs Verbindungen sind durch Totalsynthese als Einzelenantiomere erhältlich. Die FD-STX werden aus dem Alkohol **74** hergestellt, der durch Umsetzung mit IBX das Halbaminal **75** liefert (Abbildung 33). Auf diese Weise wurden die drei Einzelverbindungen FD-C13-Desoxy-STX (FD-doSTX, **76**), FD-C13-Decarbamoyl-STX (FD-dcSTX, **77**) und FD-STX (**78**) erhalten (Abbildung 33).

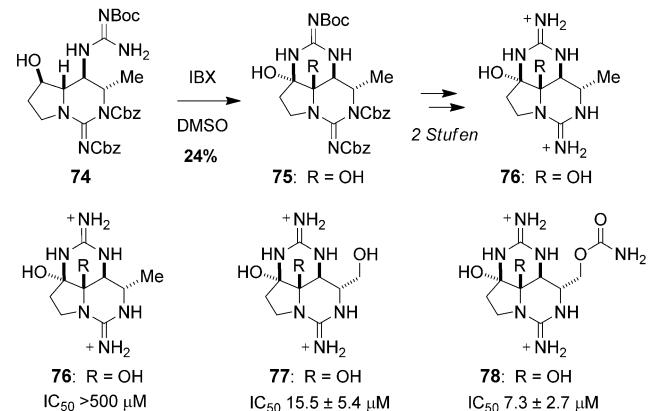


Abbildung 33. Isomere Formen von STX haben verminderte Wirksamkeit gegenüber Na_v in Neuro-2a-Zellen.

Die Bindungsaffinitäten der STX- und FD-STX-Derivate an Na_v wurden mit einem Lebensfähigkeits-Assay an Neuro-2A-Zellen^[155] und durch Ganzzellen-Voltage-Clamp-Elektrophysiologie untersucht (HEK293-Zellen). Diese Versuche wurden mit rekombinanten $\text{Na}_v1.4$ und 1.5 durchgeführt, um Unterschiede in der Wirksamkeit gegenüber Subtypen zu erkennen. FD-STX sind zwar ca. 1000-mal weniger wirksam als die analogen STX-Derivate, aber ähnlich wie diese natürlichen Toxine haben FD-STX und FD-dcSTX bevorzugt

Affinität für $\text{Na}_v1.4$ gegenüber 1.5. Zudem zeigt die relative Wirkungsabnahme bei FD-STX und C13-Derivaten einen ähnlichen Trend (d.h., FD-dcSTX ist weniger wirksam als FD-STX) wie bei früheren vergleichenden Untersuchungen an STX, dcSTX und doSTX. Gegenüber $\text{Na}_v1.5$ zeigt FD-dcSTX eine überraschend irreversible Inhibierung der Ionenleitung. Eine mechanistische Erklärung dieser interessanten Beobachtung, die Unterschiede zwischen FD-STX und dem decarbamoylierten Derivat berücksichtigt, erfordert weitere Untersuchungen.

Der Nachweis, dass FD-STX-Derivate in niedrigen mikromolaren Konzentrationen die Funktion des Ionenkanals blockieren können, erinnert an Ergebnisse von Gawley, der berichtete, dass auch ein Monoguanidinderivat auf der Basis von STX Nav1.1 und 1.2 (neuronale B50-Zellen der Ratte) inhibieren kann.^[156] Diese Resultate sowie der Umstand, dass STX und andere paralytische Schalentiergifte, TTX und ZTX, alle durch Verschließen der äußeren Pore wirken, lassen vermuten, dass der Wirkort I ein ziemlich wahlloser Rezeptor für organische Kationen ist. Durch Proteinmutationen erhaltene Ergebnisse sprechen allerdings für eine „starre“ Porenstruktur (siehe Abschnitt 4.2). Die Klärung dieser offensichtlichen strukturellen Unstimmigkeiten erfordert weitere Mutagenesevereuche und Untersuchungen der Struktur-Aktivitäts-Beziehungen mit Toxinanaloga.

Der von Nagasawa entwickelte Syntheseweg zu (+)-STX lässt sich an einer Zwischenverbindung durch den selektiven Einbau einer C13-Azidogruppe zu **79** modifizieren (Abbildung 34). Aus diesem Azid wurden die drei STX-Derivate

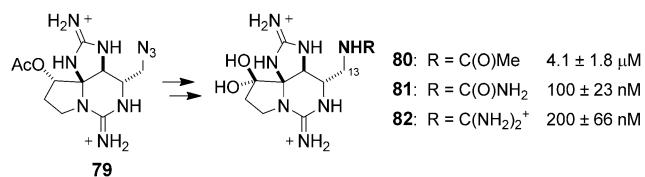


Abbildung 34. IC₅₀-Werte von C13-Carboxamid-, C13-Harnstoff- und C13-Guanidiniumanaloga von STX.

80–82 mit einer Acetamid-, Harnstoff- bzw. Guanidingruppe an C13 hergestellt. Mit einem Assay auf der Basis von Neuro2a-Zellen^[155], der für (+)-dcSTX einen IC₅₀-Wert von 4.4 nM ergibt, wurden für **80**, **81** und **82** Wirksamkeiten gemessen, die 1000-, 20- bzw. 50-mal schwächer sind als für dcSTX.^[139] Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis sind die Auswirkungen von Hydrophilie und Ladungsbilanz auf die Inhibitorbindung.

5.3. *Du Bois*

Dynamische Änderungen der Expression, Lokalisation, Spannungsemp-

findlichkeit und Ionenleitung des Na_v -Subtyps tragen zur Amplitudenform und Frequenz des Aktionspotentials bei. Die Existenz von neun Genloci, die neun spezifische $\text{Na}_v\alpha$ -Untereinheiten in Säugetierzellen kodieren, täuscht über die Heterogenität in der Struktur von Membranproteinen hinweg, die durch RNA-Spleißen und RNA-Editieren sowie posttranskriptionale Modifizierungen (PTMs, z.B. Glycosylierung, Phosphorylierung, Methylierung) eingeführt wird.^[157] Die Bemühungen zur Synthese modifizierter Saxitoxine werden von dem Wunsch geleitet, zu verstehen, wie sich Änderungen der Na_v -Struktur, einschließlich der PTMs, und der Expressionsspiegel des Subtyps auf die Aktionspotentiale und letztlich die Verhaltensreaktion auswirken.

Durch Arbeiten von Du Bois et al. wurde eine Reihe neuer carbamatmodifizierter STX-Derivate erhalten, darunter fluoreszenz-, affinitäts- und radiomarkierte Konjugate.^[60, 84-87, 158] Diese Verbindungen sollen die Bildgebung von Na_v s in lebenden Zellen und Tieren sowie Untersuchungen zur Isolierung und Charakterisierung von Proteinen ermöglichen. Die rasche und reversible Bindung an die äußere Kanalöffnung unterscheidet die Guanidiniumtoxine von anderen bekannten niedermolekularen Na_v -Modulatoren (z.B. Steroidalkaloide, Pyrethrine, leiterförmige Toxine, Lokalanästhetika).^[159] Diese Eigenschaft in Verbindung mit der Tatsache, dass die N21-Position des Toxins ohne signifikante Störung der Bindungsaffinität modifiziert werden kann, spricht für STX als Ausgangspunkt zur Entwicklung von Na_v -Sonden für die Zellbildung.

Durch Adaption des früher von Du Bois veröffentlichten Synthesewegs zu (+)-STX konnten N21-modifizierte STX-Derivate erhalten werden.^[85] Eine wichtige Zwischenverbindung der geplanten Synthese ist das Oxazolidinon **83**, dessen Umsetzung mit entweder einem primären oder sekundären Amin die gewünschten N21-Derivate liefert (Abbildung 35). Die elektrophile Reaktivität des Oxazolidinons wird dem induktiven Effekt der N-Guanidinylgruppe und der Torsionsspannung des anellierten Sechsringes zugeschrieben. Beendet wird die Synthese jedes Toxinderivats aus **84** in zwei Stufen durch Lewis-Säure-vermittelte Guanidincyclisierung/Schutzgruppenabspaltung und Oxidation des C12-Alkohols.

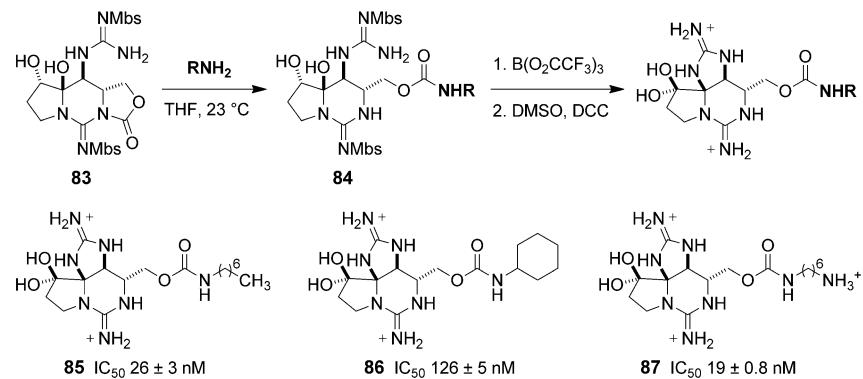


Abbildung 35. Allgemeiner Syntheseweg für Carbamoylderivate von STX. Gezeigt sind ausgewählte Analoga und ihre IC_{50} -Werte, die durch elektrophysiologische Messungen gegen $Na_v1.4$ in CHO-Zellen bestimmt wurden.^[60, 85, 86]

Messungen der Wirksamkeit einiger N21-Toxinderivate lieferten Erkenntnisse zu den strukturellen Grenzen der Carbamatsubstitution. Unverzweigte gesättigte Alkylgruppen (*n*-Heptyl, **85**) steigern IC₅₀ auf das 10fache des Werts von (+)-STX (gemessen gegen Na_v1.4, CHO-Zellen). Verzweigte Alkylgruppen wie Isopropyl oder Cyclohexyl (**86**) verringern die Toxinaffinität in größerem Ausmaß, was darauf schließen lässt, dass die Carbamatgruppe in einem engen Raum liegt, möglicherweise zwischen Domänen einer Untereinheit. Der Einfluss geladener und polarer funktioneller Gruppen auf die Bindung von Toxinderivaten wird durch diese Untersuchungen ebenfalls deutlich.^[60,85]

Das N21-Hexylamin **87** und verwandte Ethyl-, Propyl-, Butyl- und Octylderivate waren außerordentlich nützliche Ausgangsverbindungen zur Herstellung von Toxinkonjugaten. Unter schwach alkalischen Bedingungen (pH 8.5–9.5) bildet **87** mit einem reaktiven Ester auf der Basis von *N*-Hydroxysuccinimid (NHS) selektiv das Amid, wobei die Ausbeuten abhängig von der Struktur der elektrophilen Gruppe 30–60 % erreichen können. Mit dieser Strategie gelang die Verknüpfung fluoreszierender Reportergruppen und Cystein-reaktiver Maleimidderivate mit dem Toxingrüst. Nach der gleichen Kupplungsmethode wird mit *p*-¹⁸F-Benzoësäure-NHS-Ester ein markiertes Toxin für Anwendungen in der Autoradiographie und der Positronenemissionstomographie (PET) erhalten.^[158]

Informationen zur Dynamik von Na_vs innerhalb der Zellmembran können prinzipiell mit Na_vs erhalten werden, die an grün fluoreszierende Proteine (GFP) gekuppelt sind;^[160] diese Markierungsmethoden werden jedoch durch geringe Expressionsspiegel des Proteins und/oder Probleme beim Proteintransport erschwert.^[161] Die Immunfärbung von Na_vs in Zellen oder Gewebe mit markierten Antikörpern ist eine äußerst wirkungsvolle Methode zur Markierung von Proteinorten, aber die Zellen müssen fixiert sein, damit diese Stoffe die Zellmembran durchdringen können. Toxin-Farbstoff-Konjugate sind daher einzigartige Hilfsmittel für die Bildgebung bei der Echtzeitverfolgung von Na_v-Verläufen in lebenden Zellen.

Die Abbildung von Na_vs lebender Zellen gelang durch Verwendung der ersten fluoreszierenden STX-Derivate **88** und **89** (Abbildung 36). Elektrophysiologische Messungen gegen differenzierte PC12-Zellen – eine Modellnervenzelle, die rNa_v1.2 und 1.7 exprimiert – belegen, dass diese Verbindungen trotz des angehängten großen lipophilen Farbstoffs ihre Wirksamkeit als Ionenkanalinhibitor im niedrigen nanomolaren Bereich beibehalten. Die Lokalisierung der Farbstoffmoleküle an der somatischen Membran und in Neuritenfortsätzen, die sich durch konfokale Mikroskopie beobachten lässt, ist in Einklang mit früheren Untersuchungen zur Markierung der räumlichen Verteilung von Na_vs in PC12-Zellen. Darüber hinaus bestätigen die Daten, dass die Fluoreszenz auf die äußere Membran beschränkt ist.

Die Verwendung von **88** und **89** in der hochauflösenden Einzelmolekülbildung von Na_vs in lebenden Zellen lässt feine Details der Zellstruktur erkennen und liefert Informationen über die Beweglichkeit der Ionenkanäle in verschiedenen Zellregionen.^[87] Die Visualisierung einzelner Kanäle in den Zellkörpern, Neuriten und deren Ausläufern ermög-

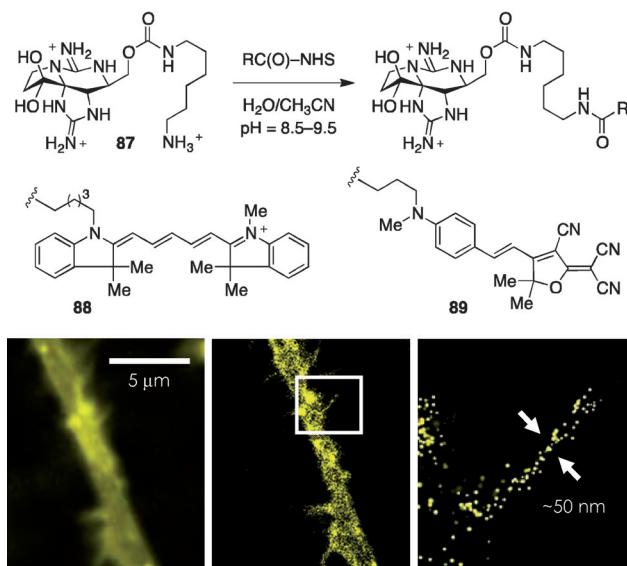


Abbildung 36. Modifizierte Saxitoxine für die Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie (links) und Hochauflösungsmikroskopie (Mitte, rechts). Bilder eines Nervenzellaxons (links, Mitte) und eines dendritischen Dorns (rechts) von PC12-Zellen, die mit dem Nervenwachstumsfaktor behandelt wurden.^[87]

licht die punktgenaue Rekonstruktion des gesamten Zellkörpers. Stark fluktuirende Seitenbewegungen, Verlängerungen und Einziehungen von Filopodien können in Quasi-Echtzeitfilmen erfasst und die Geschwindigkeiten dieser Abläufe bestimmt werden. Durch Beobachtung einzelner Teilchen und Messungen der Momentangeschwindigkeit werden die Dynamik von Na_vs charakterisiert und Unterschiede bei den Geschwindigkeiten erkannt, mit denen die Kanäle die Zellmembran durchqueren.

N21-Saxitoxinderivate mit einem Cystein-reaktiven Maleimid sind durch NHS-Konjugationsreaktionen mit Ausgangsverbindungen wie **87** erhältlich. Die Bindung dieser Verbindungen an in CHO-Zellen exprimierte Wildtyp-Na_vs (Na_v1.2, 1.4) und endogene Kanalproteine, die in den Nervenzellen des Rattenhippocampus vorkommen, ist entsprechend der kovalenten Proteinmodifizierung irreversibel (Abbildung 37). Eine Reihe von Kontrollversuchen spricht für einen Mechanismus, bei dem die Bindung des Toxins vor der Maleimidalkylierung eines benachbarten Aminosäurerests erfolgt. Mit der Verfügbarkeit difunktioneller Toxinkonjugate, die sowohl ein reaktives Elektrophil als auch eine

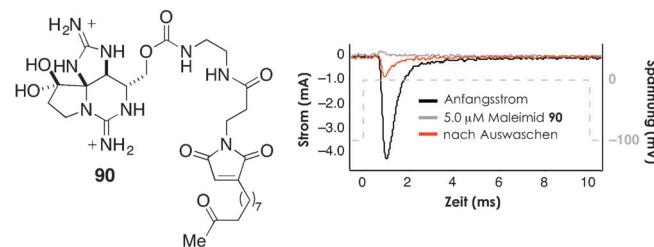


Abbildung 37. Maleimid-Konjugate von STX wirken als irreversible Inhibitoren des STX-empfindlichen Wildtyp-Na_v (Ergebnisse aus Versuchen an Na_v1.2).^[88]

funktionelle Gruppe für selektive Verknüpfungsreaktionen (z.B. ein Keton wie in **90**) enthalten, sollte die Na_v -Markierung mit Fluoreszenzmarkern oder Proteinkofaktoren (Biotin) möglich sein. Solche Sonden könnten die Beobachtung der Endozytose von Ionenkanälen ermöglichen oder die Isolierung und Identifizierung von Na_v s, die an der Zelloberfläche exprimiert werden, erleichtern.

STX-Konjugate mit fluoreszierenden Reportergruppen und/oder reaktiven Elektrophilen könnten bei späteren Untersuchungen dazu dienen, Na_v -Populationen aufzuspüren und die Verteilung von Subtypen in Zellen und Geweben zu bestimmen. Schließlich könnten molekulare Sonden, z.B. radioaktiv markiertes [¹⁸F]-STX (**91**, Abbildung 38), in vivo die serielle Überwachung anomaler Änderungen der Na_v -Expression im Zusammenhang mit genetischen oder Umweltfaktoren oder als Reaktion auf therapeutische Behandlungen ermöglichen.^[158]

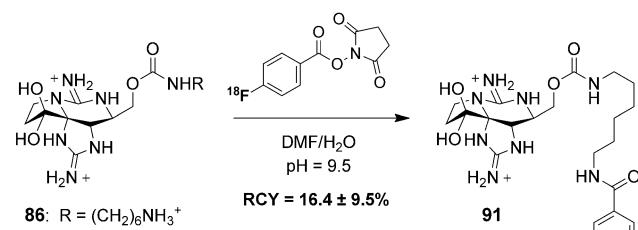


Abbildung 38. Synthese eines radioaktiv markierten PET-Tracers durch selektive Konjugation mit dem STX-Hexylamin **86**.^[158] RCY = radiochemische Ausbeute.

6. Schlussbemerkungen

Die Geschichte von STX umfasst inzwischen mehr als 80 Jahre, es ist ein wertvolles chemisches Hilfsmittel in der Neurowissenschaft und findet sich zusammen mit seinem Analogon TTX auch auf Lehrbuchseiten. Das Interesse an STX erstreckt sich über verschiedene Fachrichtungen, darunter die chemische Synthese, chemische Biologie, Pharmakologie und Medizin. Die strukturell ungewöhnlichen Sekundärmetaboliten einzelliger Organismen wirken als Akutgifte, indem sie die elektrische Signalübermittlung in Nervenzellen durch selektive hochaffine Blockade der spannungsgesteuerten Natriumkanäle ausschalten. Unser derzeitiges Wissen über die Struktur von Ionenkanälen, die Expression von Proteinsubtypen und die räumliche Verteilung in Zellen beruht weitgehend auf Untersuchungen mit diesen Verbindungen.

Das Interesse an STX ist weiterhin ungebrochen, vor allem weil es sich ebenso wie die verwandten Gonyautoxine und analoge Verbindungen durch chemische Synthese effizient herstellen lässt. Pharmakologische Untersuchungen von STX und seinen natürlichen Analoga wurden durch Informationen veranlasst, wonach schwere Krankheitsbilder beim Menschen mit einer Na_v -Fehlfunktion korrelieren, wozu in erster Linie vermutlich das Schmerzempfinden gehört.^[150–152, 162] Die chemische Synthese macht neue STX-

Derivate für diese Studien ebenso zugänglich wie chemische Sonden für die Untersuchung von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen, die Proteinmarkierung in lebenden Zellen und die Reinigung und Charakterisierung von Proteinen. Die Erkenntnis, dass 4,9-Anhydro-TTX die Funktion von Na_v 1.6 selektiv blockiert und dass natürliche Varianten in der Schleifenregion der Kanalpore die relativen Affinitäten der Guanidiniumtoxine für Na_v 1.7 ändern, lässt die äußere Porenöffnung als geeigneten Ort erscheinen, an dem Na_v -Subtyp-spezifische Inhibitoren angreifen. Die Identifizierung modifizierter Saxitoxine, die einzelne Na_v -Isoformen blockieren, könnte in der Tat realisierbar sein.

Da Kristallstrukturen von Säugetier- Na_v s fehlen, wurden Molekülmodelle der Kanalpore und des Selektivitätsfilters – die bei der Entwicklung von chemischen Sonden und Therapeutika helfen – durch eine Kombination aus Proteinsequenzierung und Ergebnissen aus Struktur-Aktivitäts-Beziehungen mit Toxinanaloga und Proteinmutanten erstellt. Künftige Untersuchungen der Na_v -Struktur können nun von der De-novo-Toxinherstellung in Kombination mit modernen Methoden der Molekularbiologie und Elektrophysiologie profitieren, um Na_v s in heterologen Expressionssystemen zu analysieren und so unsere Vorstellung von der Struktur der Ionenkanalpore weiter verfeinern. Vor dem Hintergrund dieser Untersuchungen gibt es einen ungedeckten Bedarf an neuen chemischen Hilfsmittel zur Erleichterung von Untersuchungen, deren Ziel es ist, die diversen und komplexen Aufgaben der Na_v s für Signalprozesse in der Zelle und die grundlegenden molekularen Mechanismen von Fehlfunktionen im Zusammenhang mit Na_v s zu verstehen. Für dieses Zweck bietet die Natur, so scheint es, mit Saxitoxin eine außergewöhnliche „Leitverbindung“.

Unser Dank gilt den vielen Mitarbeitern, die zu verschiedenen Teilen unserer hier beschriebenen Forschung beigetragen haben, sowie den National Institutes of Health (R01 NS045684, R21 NS070064), Pfizer und SiteOne Therapeutics für die Förderung unseres Forschungsprogramms. Wir danken Paul Novick für die Anfertigung von Abbildung 6 und James Walker, Rhiannon Thomas-Tran und Matt Logan für hilfreiche Diskussionen und das Korrekturlesen des Manuskripts. A.P.T. ist National Science Foundation Predoctoral Fellow, W.H.P. erhält ein Stipendium der Stanford Interdisciplinary Graduate Fellowship (SIGF).

Eingegangen am 19. September 2013
Online veröffentlicht am 25. April 2014

Übersetzt von Dr. Kathrin-M. Roy, Langenfeld

- [1] a) *Tetrodotoxin, Saxitoxin, and the Molecular Biology of the Sodium Channel*, Bd. 479 (Hrsg.: C. Y. Kao, S. R. Levinson), Annals of the New York Academy of Science, New York, **1986**; b) W. A. Catterall, A. L. Goldin, S. G. Waxman, *Pharmacol. Rev.* **2005**, 57, 397–409; c) T. Narahashi, *J. Toxicol. Toxin Rev.* **2001**, 20, 67–84.
- [2] a) B. Hille, *Ion Channels of Excitable Membranes*, 3. Aufl., Sinauer Associates, Sunderland, **2001**; b) W. A. Catterall, *J. Physiol.* **2012**, 590, 2577–2589.
- [3] T. Narahashi, *Proc. Jpn. Acad. Ser. B* **2008**, 84, 147–154.

- [4] Neue Übersichten zu Tetrodotoxin: a) T. Nishikawa, M. Isobe, *Chem. Rec.* **2013**, *13*, 286–302; b) E. G. Moczydlowski, *Toxicon* **2013**, *63*, 165–183.
- [5] Sonderheft über Tetrodotoxin: *Mar. Drugs* **2010**, *8*(2), 219–339 (Hrsg.: P. Ruben).
- [6] C. H. Lee, P. C. Ruben, *Channels* **2008**, *2*, 407–412.
- [7] a) L. E. Llewellyn, *Nat. Prod. Rep.* **2006**, *23*, 200–222; b) K. D. Cusick, G. S. Sayler, *Mar. Drugs* **2013**, *11*, 991–1018.
- [8] T. Narahashi, J. W. Moore, W. R. Scott, *J. Gen. Physiol.* **1964**, *47*, 965–974.
- [9] a) A. L. Hodgkin, A. F. Huxley, *J. Physiol.* **1952**, *116*, 424–448; b) A. L. Hodgkin, A. F. Huxley, *J. Physiol.* **1952**, *116*, 449–472; c) A. L. Hodgkin, A. F. Huxley, *J. Physiol.* **1952**, *116*, 473–496; d) A. L. Hodgkin, A. F. Huxley, *J. Physiol.* **1952**, *116*, 497–506; e) A. L. Hodgkin, A. F. Huxley, *J. Physiol.* **1952**, *117*, 500–544.
- [10] a) B. Hille, *J. Gen. Physiol.* **1971**, *58*, 599–619; b) B. Hille, *J. Gen. Physiol.* **1972**, *59*, 637–658; c) B. Hille, *J. Gen. Physiol.* **1975**, *66*, 535–560; d) C. M. Armstrong, *J. Gen. Physiol.* **1971**, *58*, 413–437; e) C. M. Armstrong, F. Bezanilla, *Nature* **1973**, *242*, 459–461; f) C. M. Armstrong, F. Bezanilla, E. Rojas, *J. Gen. Physiol.* **1973**, *62*, 375–391.
- [11] C. Y. Kao, A. Nishiyama, *J. Physiol.* **1965**, *180*, 50–66.
- [12] M. H. Evans, *Br. J. Pharmacol.* **1964**, *22*, 478–485.
- [13] Es ist bekannt, dass STX auch an andere Zielorte als Na⁺ bindet, allerdings mit geringerer Affinität. Interessierte Leser seien auf Lit. [7] verwiesen.
- [14] T. Narahashi, *Physiol. Rev.* **1974**, *54*, 813–889.
- [15] a) F. A. Fuhrman, G. J. Fuhrman, H. S. Mosher, *Science* **1969**, *165*, 1376–1377; b) J. Shindelman, H. S. Mosher, F. A. Fuhrman, *Toxicon* **1969**, *7*, 315–319; c) Y. H. Kim, G. B. Brown, H. S. Mosher, F. A. Fuhrman, *Science* **1975**, *189*, 151–152; d) G. B. Brown, Y. H. Kim, H. Küntzel, H. S. Mosher, G. J. Fuhrman, F. A. Fuhrman, *Toxicon* **1977**, *15*, 115–128; e) M. Yotsu-Yamashita, Y. H. Kim, S. C. Dudley, Jr., G. Choudhary, A. Pfahl, Y. Oshima, J. W. Daly, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 4346–4351.
- [16] Übersichten zu STX und verwandten Toxinen: a) M. Wiese, P. M. D'Agostino, T. Mihali, M. C. Moffitt, B. A. Neilan, *Mar. Drugs* **2010**, *8*, 2185–2211; b) G. Blunden, *Phytother. Res.* **2001**, *15*, 89–94; c) R. F. Clark, S. R. Williams, S. P. Nordt, A. S. Manoguerra, *Undersea Hyperbaric Med.* **1999**, *26*, 175–184.
- [17] a) C. Y. Kao in *Algal Toxins in Seafood and Drinking Water* (Hrsg.: I. R. Falkoner), Academic Press, New York, **1993**, S. 75–86; b) L. Lehane, *Paralytic Shellfish Poisoning: A Review*, National Office of Animal and Plant Health, Agriculture, Fisheries, and Forestry, Canberra, **2000**.
- [18] H. Holmberg, *Holmberg's Ethnographic Sketches, The Ramuson Library Historical Translation Series*, Bd. 1 (Hrsg.: F. J. ensch, M. W. Falk), University of Alaska Press, Fairbanks, **1985**.
- [19] Jüngste Hinweise sprechen dafür, dass STX und verwandte Toxine in der Natur ausschließlich von Cyanobakterien und Dinoflagellaten gebildet und anschließend von verschiedenen Organismen angereichert werden. Für eine neuere Übersicht über die Evolution der STX-Synthese in Cyanobakterien und Dinoflagellaten siehe Lit. [63].
- [20] a) H. Sommer, *Science* **1932**, *76*, 574–575; b) M. Prinzmetal, H. Sommer, C. D. Leake, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1932**, *46*, 63–74; c) H. Sommer, K. F. Meyer, *AMA Arch. Pathol.* **1937**, *24*, 560–598; d) H. Sommer, W. F. Whedon, F. A. Kofoid, R. Stohler, *AMA Arch. Pathol.* **1937**, *24*, 537–559.
- [21] a) E. J. Schantz, J. D. Mold, D. W. Stanger, J. Shavel, F. J. Riel, J. P. Bowden, J. M. Lynch, R. S. Wyler, B. Riegel, H. Sommer, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 5230–5235; b) J. D. Mold, J. P. Bowden, D. W. Stanger, J. E. Maurer, J. M. Lynch, R. S. Wyler, E. J. Schantz, B. Riegel, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 5235–5238.
- [22] E. J. Schantz, *Environ. Lett.* **1975**, *9*, 225–237.
- [23] R. RaLonde, *Alaska's Mar. Resources* **1996**, *8*, 1–7.
- [24] W. J. Brackenbury, L. L. Isom, *Front. Pharmacol.* **2011**, *2*, 53.
- [25] Ausgewählte Beiträge: a) A. Schroeter, S. Walzik, S. Blechschmidt, V. Haufe, K. Benndorf, T. Zimmer, *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2010**, *49*, 16–24; b) R. Numann, W. A. Catterall, T. Scheuer, *Science* **1991**, *254*, 115–118; c) J. W. Schmidt, W. A. Catterall, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 13713–13723; d) P. Beltran-Alvarez, S. Pagans, R. Brugada, *J. Proteome Res.* **2011**, *10*, 3712–3719.
- [26] Lit. [1b].
- [27] W. A. Catterall, *J. Physiol.* **2012**, *590*, 2577–2589.
- [28] J. Satin, J. W. Kyle, M. Chen, P. Bell, L. L. Cribbs, H. A. Fozard, R. B. Rogart, *Science* **1992**, *256*, 1202–1205.
- [29] J. J. Clare, S. N. Tate, M. Nobbs, M. A. Romanos, *Drug Discovery Today* **2000**, *5*, 506–520.
- [30] P. Schrager, C. Profera, *Biochim. Biophys. Acta* **1973**, *318*, 141–146.
- [31] M. Nakamura, T. Yasumoto, *Toxicon* **1985**, *23*, 271–276.
- [32] Y. H. Chen, T. J. Dale, M. A. Romanos, W. R. Whitaker, X. M. Xie, J. J. Clare, *Eur. J. Neurosci.* **2000**, *12*, 4281–4289.
- [33] M. Chahine, P. B. Bennett, A. L. George, Jr., R. Horn, *Pfluegers Arch.* **1994**, *427*, 136–142.
- [34] P. S. Dietrich, J. G. McGivern, S. G. Delgado, B. D. Koch, R. M. Eglen, J. C. Hunter, L. Sangameswaran, *J. Neurochem.* **1998**, *70*, 2262–2272.
- [35] L. Sangameswaran, L. M. Fish, B. D. Koch, D. K. Rabert, S. G. Delgado, M. Ilnikca, L. B. Jakeman, S. Novakovic, K. Wong, P. Sze, E. Tzoumaka, G. R. Stewart, R. C. Herman, H. Chang, R. M. Eglen, J. C. Hunter, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 14805–14809.
- [36] A. N. Akopian, L. Sivilotti, J. N. Wood, *Nature* **1996**, *379*, 257–262.
- [37] T. R. Cummins, S. D. Dib-Hajj, J. A. Black, A. N. Akopian, J. N. Wood, S. G. Waxman, *J. Neurosci.* **1999**, *19*, 1–6.
- [38] A. N. Akopian, V. Souslova, S. England, K. Okuse, N. Ogata, J. Ure, A. Smith, B. J. Kerr, S. B. McMahon, S. Boyce, R. Hill, L. C. Stanfa, A. H. Dickenson, J. N. Wood, *Nat. Neurosci.* **1999**, *2*, 541–548, zit. Lit.
- [39] T. R. Cummins, P. L. Sheets, S. G. Waxman, *Pain* **2007**, *131*, 243–257.
- [40] a) M. H. Meisler, J. E. O'Brien, L. M. Sharkey, *J. Physiol.* **2010**, *588*, 1841–1848; b) M. H. Meisler, J. A. Kearney, *J. Clin. Invest.* **2005**, *115*, 2010–2017.
- [41] A. S. Amin, A. Asghari-Roodsari, H. L. Tan, *Pfluegers Arch. Eur. J. Physiol.* **2010**, *460*, 223–237.
- [42] G. C. Ebers, A. L. George, Jr., R. L. Barchi, S. S. Ting-Passador, R. G. Kallen, G. M. Lathrop, J. S. Beckmann, A. F. Hahn, W. F. Brown, R. D. Campbell, A. J. Hudson, *Ann. Neurol.* **1991**, *30*, 810–816.
- [43] A. L. George, Jr., *J. Clin. Invest.* **2005**, *115*, 1990–1999.
- [44] a) P. L. Sheets, J. O. Jackson, Jr., S. G. Waxman, S. D. Dib-Hajj, T. R. Cummins, *J. Physiol.* **2007**, *581*, 1019–1031; b) Y. Yang, Y. Wang, S. Li, Z. Xu, H. Li, L. Ma, J. Fan, D. Bu, B. Liu, Z. Fan, G. Wu, J. Jin, B. Ding, X. Zhu, Y. Shen, *J. Med. Genet.* **2004**, *41*, 171–174; c) T. R. Cummins, S. D. Dib-Hajj, S. G. Waxman, *J. Neurosci.* **2004**, *24*, 8232–8236.
- [45] a) C. R. Fertleman, C. D. Ferrie, J. Aicardi, N. A. F. Bednarek, E. Eeg-Olofsson, F. V. Eimslie, D. A. Griesemer, F. Goutières, M. Kirkpatrick, N. O. Malmros, M. Pollitzer, M. Rossiter, E. Roulet-Perez, R. Schubert, V. V. Smith, H. Tessard, V. Wong, J. B. P. Stephenson, *Neurology* **2007**, *69*, 586–595; b) C. R. Fertleman, M. D. Baker, K. A. Parker, S. Moffatt, F. V. Eimslie, B. Abrahamsen, J. Ostman, N. Klugbauer, J. N. Wood, R. M. Gardiner, M. Rees, *Neuron* **2006**, *52*, 767–774.
- [46] a) J. J. Cox, J. Sheynin, Z. Shorer, F. Reimann, A. K. Nicholas, L. Zubovic, M. Baralle, E. Wraige, E. Manor, J. Levy, C. G. Woods, R. Parvari, *Hum. Mutat.* **2010**, *31*, E1670–E1686; b) K. B. Nilsen, A. K. Nicholas, C. G. Woods, S. I. Mellgren, M.

- Nebuchennykh, J. Aasly, *Pain* **2009**, *143*, 155–158; c) Y. P. Goldberg, J. MacFarlane, M. L. MacDonald, J. Thompson, M. P. Dube, M. Mattice, R. Fraser, C. Young, S. Hossain, T. Pape, B. Payne, C. Radomski, G. Donaldson, E. Ives, J. Cox, H. B. Younghusband, R. Green, A. Duff, E. Boltshauser, G. A. Grinspan, J. H. Dimon, B. G. Sibley, G. Andria, E. Toscano, J. Kerdraon, D. Bowsher, S. N. Pimstone, M. E. Samuels, R. Sherrington, M. R. Hayden, *Clin. Genet.* **2007**, *71*, 311–319; d) J. J. Cox, F. Reimann, A. K. Nicholas, G. Thornton, E. Roberts, K. Springell, G. Karbani, H. Jafri, J. Mannan, Y. Raashid, L. Al-Gazali, H. Hamamy, E. M. Valente, S. Gorman, R. Williams, D. P. McHale, J. N. Wood, F. M. Gribble, C. G. Woods, *Nature* **2006**, *444*, 894–898.
- [47] a) M. A. Nassar, L. C. Stirling, G. Forlani, M. D. Baker, E. A. Matthews, A. H. Dickenson, J. N. Wood, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 12706–12711; b) J. P. H. Drenth, S. G. Waxman, *J. Clin. Invest.* **2007**, *117*, 3603–3609.
- [48] a) S. D. Dib-Hajj, Y. Yang, J. A. Black, S. G. Waxman, *Nat. Rev. Neurosci.* **2013**, *14*, 49–62; b) S. D. Dib-Hajj, J. A. Black, S. G. Waxman, *Pain Med.* **2009**, *10*, 1260–1269.
- [49] A. Nardi, N. Damann, T. Hertrampf, A. Kless, *ChemMedChem* **2012**, *7*, 1712–1740.
- [50] a) J. Payandeh, T. M. Gamal El-Din, T. Scheuer, N. Zheng, W. A. Catterall, *Nature* **2012**, *468*, 135–139; b) J. Payandeh, T. Scheuer, N. Zheng, W. A. Catterall, *Nature* **2011**, *475*, 353–358.
- [51] X. Zhang, W. Ren, P. DeCaen, C. Yan, X. Tao, L. Tang, J. Wang, K. Hasegawa, T. Kumasaka, J. He, J. Wang, D. E. Clapham, N. Yan, *Nature* **2012**, *486*, 130–134.
- [52] E. C. McCusker, C. Bagnérés, C. E. Naylor, A. R. Cole, N. D'Avanzo, C. G. Nichols, B. A. Wallace, *Nat. Commun.* **2012**, *3*, 1102.
- [53] D. Shaya, F. Findeisen, F. Abderemane-Ali, C. Arrigoni, S. Wong, S. R. Nurva, G. Loussouarn, D. L. Minor, Jr., *J. Mol. Biol.* **2013**, *426*, 467–483.
- [54] P. S. Rogers, H. Rapoport, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 7335–7339.
- [55] a) J. L. Wong, R. Oesterlin, H. Rapoport, *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 7344–7345; b) F. E. Russell, *Fed. Proc.* **1967**, *26*, 1206, zurückgeführt auf H. Rapoport, M. S. Brown, R. Oesterlin, W. Schuett, Abstracts, 147th National Meeting of the American Chemical Society, Philadelphia, April 1964, p. 3N.
- [56] a) J. Bordner, W. E. Thiessen, H. A. Bates, H. Rapoport, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 6008–6012; b) E. J. Schantz, V. E. Ghazarossian, H. K. Schnoes, F. M. Strong, J. P. Springer, J. O. Pezzanite, J. Clardy, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 1238–1239.
- [57] P. Vale, *Phytochem. Rev.* **2010**, *9*, 525–535.
- [58] C. Y. Kao, S. E. Walker, *J. Physiol.* **1982**, *323*, 619–637.
- [59] F. E. Koehn, V. E. Ghazarossian, E. J. Schantz, H. K. Schnoes, F. M. Strong, *Bioorg. Chem.* **1981**, *10*, 412–428.
- [60] B. M. Andresen, Dissertation, Stanford University (USA), **2009**.
- [61] a) Y. Shimizu, *Annu. Rev. Microbiol.* **1996**, *50*, 431–465; b) Y. Shimizu, S. Gupta, K. Masuda, L. Maranda, C. K. Walker, R. H. Wang, *Pure Appl. Chem.* **1989**, *61*, 513–516; c) Y. Shimizu, M. Kobayashi, A. Genenah, N. Ichihara, *Seafood Toxins*, Bd. 262; ACS Symposium Series (Hrsg.: E. Ragelis), American Chemical Society, Washington, **1984**, S. 151–160.
- [62] a) R. Kellmann, T. K. Mihali, Y. J. Jeon, R. Pickford, F. Pomati, B. A. Neilan, *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, *74*, 4044–4053; b) T. K. Mihali, R. Kellmann, B. A. Neilan, *BMC Biochem.* **2009**, *10*, 8; c) A. Stüken, R. J. Orr, R. Kellmann, S. A. Murray, B. A. Neilan, K. S. Jakobsen, *PLoS One* **2011**, *6*, e20096; d) T. K. Mihali, W. W. Carmichael, B. A. Neilan, *PLoS One* **2011**, *6*, e14657.
- [63] Neue Übersicht zur Evolution der STX-Synthese in Cyanobakterien und Dinoflagellaten: J. D. Hackett, J. H. Wisecaver, M. L. Brosnan, D. M. Kulis, D. M. Anderson, D. Bhatta-
- charya, F. G. Plumley, D. L. Erdner, *Mol. Biol. Evol.* **2013**, *30*, 70–78.
- [64] Neuere Übersicht zur evolutionären Anpassung an STX und verwandte Toxine: M. C. Jost, D. M. Hillis, Y. Lu, J. W. Kyle, H. A. Fozzard, H. H. Zakon, *Mol. Biol. Evol.* **2008**, *25*, 1016–1024.
- [65] Die mögliche Herstellung von STX durch Aquakultur wurde ebenfalls untersucht: J. A. Galvão, M. Oetterer, M. C. Bitten-court-Oliveira, S. Gouvêa-Barros, S. Hiller, K. Erler, B. Luckas, E. Pinto, P. Kujbida, *Toxicon* **2009**, *54*, 891–894.
- [66] a) M. Yotsu-Yamashita, B. Schimmele, T. Yasumoto, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1999**, *63*, 961–963; b) T. Yasumoto, M. Yotsu, M. Murata, H. Naoki, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 2344–2345; c) J. H. Jang, M. Yotsu-Yamashita, *Toxicon* **2007**, *50*, 947–951; d) M. Yotsu-Yamashita, Y. Yamagishi, T. Yasumoto, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 9329–9332.
- [67] a) H. Tanino, T. Nakata, T. Kaneko, Y. Kishi, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 2818–2819; b) Y. Kishi, *Heterocycles* **1980**, *14*, 1477–1495.
- [68] S. M. Hannick, Y. Kishi, *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 3833–3835.
- [69] a) Y. Yamada, D. Miljkovic, P. Wehrli, B. Golding, P. Löliger, R. Keese, K. Müller, A. Eschenmoser, *Angew. Chem.* **1969**, *81*, 301–306; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1969**, *8*, 343–348; b) M. Roth, P. Dubbs, E. Götschi, A. Eschenmoser, *Helv. Chim. Acta* **1971**, *54*, 710–734.
- [70] R. G. Neville, J. J. McGee, *Can. J. Chem.* **1963**, *41*, 2123–2129.
- [71] C. Y. Hong, Y. Kishi, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 7001–7006.
- [72] P. A. Jacobi, M. J. Martinelli, S. Polanc, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 5594–5598.
- [73] P. A. Jacobi, A. Brownstein, M. Martinelli, K. Grozinger, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 239–241.
- [74] O. Iwamoto, T. Shinohara, K. Nagasawa, *Chem. Asian J.* **2009**, *4*, 277–285.
- [75] a) J. J. Fleming, J. Du Bois, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 3926–3927; b) J. J. Fleming, M. D. McReynolds, J. Du Bois, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 9964–9975.
- [76] A. Goti, M. Cacciari, F. Cardona, A. Brandi, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 2853–2856.
- [77] O. Iwamoto, M. Sekine, H. Koshino, K. Nagasawa, *Heterocycles* **2006**, *70*, 107–112; b) J. Shimokawa, K. Shirai, A. Tanatani, Y. Hashimoto, K. Nagasawa, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 1585–1588; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 1559–1562; c) J. Shimokawa, T. Ishiwata, K. Shirai, H. Koshino, A. Tanatani, T. Nakata, Y. Hashimoto, K. Nagasawa, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 6878–6888.
- [78] V. R. Bhonde, R. E. Looper, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 20172–20174.
- [79] Y. Sawayama, T. Nishikawa, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 7314–7316; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 7176–7178.
- [80] a) R. L. Giles, J. D. Sullivan, A. M. Steiner, R. E. Looper, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 3162–3166; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 3116–3126; b) M. J. Gainer, N. R. Bennett, Y. Takahashi, R. E. Looper, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 710–713; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 684–687.
- [81] a) P. Merino, A. Lanaspa, F. L. Merchan, T. Tejero, *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, *9*, 629–646; b) P. Merino, S. Franco, F. L. Merchan, T. Tejero, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 5627–5630.
- [82] Cyclische N-Boc-Carbamate reagieren unter ähnlichen Bedingungen unter Ringöffnung: T. Kunieda, T. Ishizuka, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 4185–4188.
- [83] Y. Sawayama, T. Nishikawa, *Synlett* **2011**, 651–654.
- [84] A. P. Thottumkara, J. R. Walker, J. E. Merit, R. Thomas-Tran, D. S. Finkelstein, J. Du Bois, Manuskript in Vorbereitung.
- [85] B. M. Andresen, J. Du Bois, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 12524–12525.
- [86] W. H. Parsons, Dissertation, Stanford University (USA), **2013**.

- [87] A. E. Ondrus, H.-I. D. Lee, S. Iwanaga, W. H. Parsons, B. M. Andresen, W. E. Moerner, J. Du Bois, *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 902–912.
- [88] W. H. Parsons, J. Du Bois, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 10582–10585.
- [89] Neue Übersicht zur C-H-Aminierung: J. L. Roizen, M. E. Harvey, J. Du Bois, *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 911–922.
- [90] C. G. Espino, P. M. Wehn, J. Chow, J. Du Bois, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6935–6936.
- [91] a) Y. Shimizu, L. J. Buckley, M. Alam, Y. Oshima, W. E. Fallon, H. Kasai, I. Miura, V. P. Fullo, J. Nakanishi, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 5414–5416; b) G. L. Boyer, E. J. Schantz, H. K. Schnoes, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1978**, 889–890.
- [92] a) D. A. Doyle, J. M. Cabral, R. A. Pfuetzner, A. Kuo, J. M. Gulbis, S. L. Cohen, B. T. Chait, R. MacKinnon, *Science* **1998**, *280*, 69–77; b) R. MacKinnon, *Potassium Channels and the Atomic Basis of Selective Ion Conduction*, in *Les Prix Nobel. The Nobel Prizes 2003* (Hrsg.: T. Frängsmyr), Stockholm, **2004**; c) R. MacKinnon, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 4363–4376; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 4265–4277.
- [93] a) C. Sato, Y. Ueno, K. Asai, K. Takahashi, M. Sato, A. Engel, Y. Fujiyoshi, *Nature* **2001**, *409*, 1047–1051; b) C. Sato, M. Sato, A. Iwasaki, T. Doi, A. Engel, *J. Struct. Biol.* **1998**, *121*, 314–325.
- [94] M. Noda, S. Shimizu, T. Tanabe, T. Takai, T. Kayano, T. Ikeda, H. Takahashi, H. Nakayama, Y. Kanaoka, N. Minamino, K. Kangawa, H. Matsuo, M. A. Raftery, T. Hirose, S. Inayama, H. Hayashida, T. Miyata, S. Numa, *Nature* **1984**, *312*, 121–127.
- [95] H. R. Guy, P. Seetharamulu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, *83*, 508–512.
- [96] a) B. Hirschberg, A. Rovner, M. Lieberman, J. Patlak, *J. Gen. Physiol.* **1995**, *106*, 1053–1068; b) N. Yang, A. L. George, Jr., R. Horn, *Neuron* **1996**, *16*, 113–122.
- [97] J. W. West, D. E. Patton, T. Scheuer, Y. Wang, A. L. Goldin, W. A. Catterall, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 10910–10914.
- [98] a) I. Favre, E. Moczydowski, L. Schild, *Biophys. J.* **1996**, *71*, 3110–3125; b) T. Schlieff, R. Schönherr, K. Imoto, S. H. Heinemann, *Eur. Biophys. J.* **1996**, *25*, 75–91; c) Y.-M. Sun, I. Favre, L. Schild, E. Moczydowski, *J. Gen. Physiol.* **1997**, *110*, 693–715.
- [99] Abbildung entnommen aus: G. F. King, P. Escoubas, G. M. Nicholson, *Channels* **2008**, *2*, 100–116.
- [100] B. Hille, *J. Gen. Physiol.* **1971**, *58*, 599–619.
- [101] B. Hille, *Biophys. J.* **1975**, *15*, 615–619.
- [102] R. Henderson, J. M. Ritchie, G. R. Strichartz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1974**, *71*, 3936–3940.
- [103] Weitere Kompositionsexperimente, die eine Strukturaufklärung der Ionenkanalpore ermöglichen: a) R. L. Barchi, J. B. Wiegele, *J. Physiol.* **1979**, *295*, 383–396; b) W. A. Catterall, C. S. Morrow, R. P. Hartshorne, *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 11379–11387.
- [104] M. Noda, T. Ikeda, T. Kayano, H. Suzuki, H. Takeshima, M. Kurasaki, H. Takahashi, S. Numa, *Nature* **1986**, *320*, 188–192.
- [105] J. S. Trimmer, S. S. Cooperman, S. A. Tomiko, J. Zhou, S. M. Crean, M. B. Boyle, R. G. Kallen, Z. Sheng, R. Barchi, F. J. Sigworth, R. H. Goodman, W. S. Agnew, G. Mandel, *Neuron* **1989**, *3*, 33–49.
- [106] M. Noda, H. Suzuki, S. Numa, W. Stühmer, *FEBS Lett.* **1989**, *259*, 213–216.
- [107] a) H. Terlau, S. H. Heinemann, W. Stühmer, M. Pusch, F. Conti, K. Imoto, S. Numa, *FEBS Lett.* **1991**, *293*, 93–96; b) M. Pusch, M. Noda, W. Stühmer, S. Numa, F. Conti, *Eur. Biophys. J.* **1991**, *20*, 127–133; c) K. J. Kontis, A. L. Goldin, *Mol. Pharmacol.* **1993**, *43*, 635–644; d) M. M. Stephan, J. F. Potts, W. S. Agnew, *J. Membr. Biol.* **1994**, *137*, 1–8.
- [108] S. H. Heinemann, H. Terlau, W. Stühmer, K. Imoto, S. Numa, *Nature* **1992**, *356*, 441–443.
- [109] J. Yang, P. T. Ellinor, W. A. Sather, J.-F. Zhang, R. W. Tsien, *Nature* **1993**, *366*, 158–161.
- [110] C. M. Bay, G. R. Strichartz, *J. Physiol.* **1980**, *300*, 89–103.
- [111] L. L. Cribbs, J. Satin, H. A. Fozard, R. B. Rogart, *FEBS Lett.* **1990**, *275*, 195–200.
- [112] P. H. Backx, D. T. Yue, J. H. Lawrence, E. Marban, G. F. Tomaselli, *Science* **1992**, *257*, 248–251.
- [113] S. H. Heinemann, H. Terlau, K. Imoto, *Pfluegers Arch. Eur. J. Physiol.* **1992**, *422*, 90–92.
- [114] I. Favre, E. Moczydowski, L. Schild, *J. Gen. Physiol.* **1995**, *106*, 203–229.
- [115] L. Sivilotti, K. Okuse, A. N. Akopian, S. Moss, J. N. Wood, *FEBS Lett.* **1997**, *409*, 49–52.
- [116] V. P. Santarelli, A. L. Eastwood, D. A. Dougherty, R. Horn, C. A. Ahern, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 8044–8051.
- [117] Neuere Übersicht zum TTX-Bindungsort: H. A. Fozard, G. M. Lipkind, *Mar. Drugs* **2010**, *8*, 219–234.
- [118] M. Yotsu-Yamashita, K. Nishimori, Y. Nitani, M. Isemura, A. Sugimoto, T. Yasumoto, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, *267*, 403–412.
- [119] V. M. Bricelj, L. Connell, K. Konoki, S. P. MacQuarrie, T. Scheuer, W. A. Catterall, V. L. Trainer, *Nature* **2005**, *434*, 763–767.
- [120] C. R. Feldman, E. D. Brodie, Jr., E. D. Brodie III, M. E. Pfrender, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 4556–4561.
- [121] J. L. Penzotti, H. A. Fozard, G. M. Lipkind, S. C. Dudley, Jr., *Biophys. J.* **1998**, *75*, 2647–2657.
- [122] J. R. Walker, P. Novick, W. H. Parsons, M. MacGregor, J. Zablocki, V. S. Pande, J. Du Bois, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 18102–18107.
- [123] C. T. Hanifin, *Mar. Drugs* **2010**, *8*, 577–593.
- [124] C. Y. Kao, S. E. Walker, *J. Physiol.* **1982**, *323*, 619–637.
- [125] Y. Shimizu, C.-p. Hsu, W. E. Fallon, Y. Oshima, I. Miura, K. Nakanishi, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 6791–6793.
- [126] G. Strichartz, *J. Gen. Physiol.* **1984**, *84*, 281–305.
- [127] E. Moczydowski, S. Hall, S. S. Garber, G. S. Strichartz, C. Miller, *J. Gen. Physiol.* **1984**, *84*, 687–704.
- [128] C. Y. Kao, P. N. Kao, M. R. James-Kracke, F. E. Koehn, C. F. Wichmann, H. K. Schnoes, *Toxicon* **1985**, *23*, 647–655.
- [129] S. L. Hu, C. Y. Kao, F. E. Koehn, H. K. Schnoes, *Toxicon* **1987**, *25*, 159–165.
- [130] C. Y. Kao, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1986**, *479*, 52–67.
- [131] G. Choudhary, M. Yotsu-Yamashita, L. Shang, T. Yasumoto, S. C. Dudley, Jr., *Biophys. J.* **2003**, *84*, 287–294.
- [132] D. B. Tikhonov, B. S. Zhorov, *Mol. Pharmacol.* **2012**, *82*, 97–104.
- [133] a) G. M. Lipkind, J. A. Fozard, *Biochemistry* **2000**, *39*, 8161–8170; b) G. M. Lipkind, J. A. Fozard, *J. Gen. Physiol.* **2008**, *131*, 523–529.
- [134] V. E. Ghazarossian, E. J. Schantz, H. K. Schnoes, F. M. Strong, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1976**, *68*, 776–780.
- [135] R. Thomas-Tran, J. Du Bois, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [136] a) L. E. Llewellyn, P. M. Bell, E. G. Moczydowski, *Proc. R. Soc. London Ser. B* **1997**, *264*, 891–902; b) C. Robillot, D. Kineavy, J. Burnell, L. E. Llewellyn, *Toxicon* **2009**, *53*, 460–465.
- [137] R. Watanabe, R. Samusawa-Saito, Y. Oshima, *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 459–465.
- [138] R. Shinohara, T. Akimoto, O. Iwamoto, T. Hirokawa, M. Yotsu-Yamashita, K. Yamaoka, K. Nagasawa, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 12144–12152.
- [139] T. Akimoto, A. Masuda, M. Yamashita, T. Hirokawa, K. Nagasawa, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 6642–6649.
- [140] Y. Kudo, T. Yasumoto, K. Konoki, Y. Cho, M. Yotsu-Yamashita, *Mar. Drugs* **2012**, *10*, 655–667.
- [141] „The Chemistry of Tetrodotoxin“: H. S. Mosher in *Tetrodotoxin, Saxitoxin, and the Molecular Biology of the Sodium*

- Channel, Bd. 479 (Hrsg.: C. Y. Kao, S. R. Levinson), Annals of the New York Academy of Science, New York, **1986**.
- [142] a) H. Nakayama, E. Yoshida, Y. Kanaoka, *Chem. Pharm. Bull.* **1986**, *34*, 2684–2686; b) E. Yoshida, H. Nakayama, Y. Hatanaka, Y. Kanaoka, *Chem. Pharm. Bull.* **1990**, *38*, 982–987; c) H. Nakayama, Y. Hatanaka, E. Yoshida, K. Oka, M. Takanohashi, Y. Amano, Y. Kanaoka, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1992**, *184*, 900–907.
- [143] K. Tsuda, S. Ikuma, M. Kawamura, R. Tachikawa, K. Sakai, C. Tamura, O. Amakasu, *Chem. Pharm. Bull. Jpn.* **1964**, *12*, 1357–1374.
- [144] T. Goto, Y. Kishi, S. Takahashi, Y. Hirata, *Tetrahedron* **1965**, *21*, 2059–2088.
- [145] C. Rosker, B. Lohberger, D. Hofer, B. Steinecker, S. Quasthoff, W. Schreibmayer, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2007**, *293*, C783–C789.
- [146] G. Choudhary, L. Shang, X. Li, S. C. Dudley, Jr., *Biophys. J.* **2002**, *83*, 912–919.
- [147] G. Choudhary, M. P. Aliste, D. P. Tielemans, R. J. French, S. C. Dudley, *Channels* **2007**, *1*, 344–352.
- [148] G. M. Lipkind, J. A. Fozard, *Biophys. J.* **1994**, *66*, 1–13.
- [149] a) D. B. Tikhonov, B. S. Zhorov, *Biophys. J.* **2005**, *88*, 184–197; b) D. B. Tikhonov, B. S. Zhorov, *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 2998–3006.
- [150] S. A. Shankarappa, J. H. Tsui, K. N. Kim, G. Reznor, J. C. Dohlman, R. Langer, D. S. Kohane, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 17555–17560.
- [151] Ausgewählte Arbeiten zur Verwendung von GTx in der Schmerzbehandlung: a) R. Garrido, N. Lagos, M. Lagos, A. J. Rodriguez-Navarro, C. Garcia, D. Truan, A. Henriquez, *Colorectal Dis.* **2007**, *9*, 619–624; b) R. Garrido, N. Lagos, K. Lattes, M. Abedrapo, G. Bocic, A. Cuneo, H. Chiong, C. Jensen, R. Azolas, A. Henriquez, C. Garcia, *Dis. Colon Rectum* **2005**, *48*, 335–343; c) K. Lattes, P. Venegas, N. Lagos, M. Lagos, L. Pedraza, A. J. Rodriguez-Navarro, C. Garcia, *Neurol. Res.* **2009**, *31*, 228–233.
- [152] Ausgewählte Berichte zur Verwendung von Neo-STX in der Schmerzbehandlung beim Menschen: a) A. J. Rodriguez-Navarro, M. Lagos, C. Figueroa, C. Garcia, P. Recebal, P. Silva, V. Iglesias, N. Lagos, *Neurotoxic. Res.* **2009**, *16*, 408–415; b) A. J. Rodriguez-Navarro, N. Lagos, M. Lagos, I. Braghetto, A. Csendes, J. Hamilton, C. Figueroa, D. Truan, C. Garcia, A. Rojas, V. Iglesias, L. Brunet, F. Alvarez, *Anesthesiology* **2007**, *106*, 339–345; c) A. J. Rodriguez-Navarro, C. B. Berde, G. Wiedmaier, A. Mercado, C. Garcia, V. Iglesias, D. Zurakowski, *Reg. Anesth. Pain Med.* **2011**, *36*, 103–109.
- [153] G. R. Strichartz, S. Hall, B. Magnani, C. Y. Hong, Y. Kishi, J. A. Debin, *Toxicon* **1995**, *33*, 723–737.
- [154] R. Stämpfli, *Experientia* **1954**, *10*, 508–509.
- [155] Zu Beschreibungen dieser Zelllinie siehe: a) K. Kogure, M. L. Tamplin, U. Simidu, R. R. Colwell, *Toxicon* **1988**, *26*, 191–197; M. Yotsu-Yamashita, D. Urabe, M. Asai, T. Nishikawa, M. Isobe, *Toxicon* **2003**, *42*, 557–560.
- [156] H. Mao, L. A. Fieber, R. E. Gawley, *ACS Med. Chem. Lett.* **2010**, *1*, 135–138.
- [157] J. W. Schmidt, W. A. Catterall, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 13713–13723.
- [158] A. Hoehne, D. Behera, W. H. Parsons, M. L. James, B. Shen, P. Borgohain, D. Bodapati, A. Prabhakar, S. S. Gambhir, D. C. Yeomans, S. Biswal, F. T. Chin, J. Du Bois, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 18012–18015.
- [159] Repräsentative Diskussionen zur Verwendung von Anästhetika mit Na_v als Wirkort: a) A. Scholz, *Br. J. Anaesth.* **2002**, *89*, 52–61; b) K. F. Herold, H. C. Hemmings, Jr., *Front. Pharmacol.* **2012**, *3*, 50.
- [160] Die GFP-Markierung einzelner Na_v -Isoformen wurde durchgeführt; siehe: a) T. Zimmer, C. Biskup, C. Bollendorff, K. Benndorf, *J. Membr. Biol.* **2002**, *186*, 13–21; b) T. Zimmer, C. Biskup, S. Dugarmaa, F. Vogel, M. Steinbis, T. Böhle, Y. S. Wu, R. Dumaine, K. Benndorf, *J. Membr. Biol.* **2002**, *186*, 1–12; c) H. Hallaq, Z. Yang, P. C. Viswanathan, K. Fukuda, W. Shen, D. W. Wang, K. S. Wells, J. Zhou, J. Yi, K. T. Murray, *Cardiovasc. Res.* **2006**, *72*, 250–261; d) A. Gasser, T. S.-Y. Ho, X. Cheng, K.-J. Chang, S. G. Waxman, M. N. Rasband, S. D. Dibb-Hajj, *J. Neurosci.* **2012**, *32*, 7232–7243.
- [161] Ausgewählte Berichte über Schwierigkeiten im Zusammenhang mit GFP- Na_v -Fusionsproteinen, siehe: a) R. Maue, *J. Cell. Physiol.* **2007**, *213*, 618–623; b) B. J. Baker, H. Lee, V. A. Pieribone, L. B. Cohen, E. Y. Isacoff, T. Knopfel, E. K. Kosmidis, *J. Neurosci. Methods* **2007**, *161*, 32–38; c) G. G. Schofield, H. L. Puhl III, S. R. Ikeda, *J. Neurophysiol.* **2008**, *99*, 1917–1927; d) K. Ataka, V. A. Pieribone, *Biophys. J.* **2002**, *82*, 509–516.
- [162] Neuere Berichte über die Verwendung von TTX in klinischen Tests zur Schmerzbehandlung beim Menschen: a) N. A. Hagen, K. M. Fisher, B. Lapointe, P. du Souich, S. Chary, D. Moulin, E. Sellers, A. H. Ngoc, *J. Pain Symptom Manage.* **2007**, *34*, 171–182; b) N. A. Hagen, P. du Souich, B. Lapointe, M. Ong-Lam, B. Dubuc, D. Walde, *J. Pain Symptom Manage.* **2008**, *35*, 420–429.