

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Methodenübersicht

Die Charakterisierung des nicht selektiven Kationenkanals in Pansenepithelzellen erfolgte im Rahmen von *in vitro* Versuchen. Hierzu wurden Epithelzellen aus zuvor präpariertem Pansengewebe gewonnen und in Zellkulturen vermehrt.

Mittels immunzytochemischer Methoden erfolgte der Nachweis von Zytokeratin und somit des epithelialen Ursprungs der kultivierten Zellen.

Die Membranpotentiale und Ionenströme über die Zellmembranen wurden mittels Patch-Clamp-Technik gemessen.

3.2 Material

3.2.1 Versuchsgewebe

Zur *in vitro* Kultivierung primärer Pansenepithelzellen (PEZ) wurde Pansengewebe überwiegend von institutseigenen Versuchstieren und seltener von Schafen verschiedener Schlachthöfe verwendet. Die Schafe waren unterschiedlicher Rasse. Das Alter der Tiere variierte zwischen sechs und zwölf Monaten. Auch die zum Zeitpunkt der Schlachtung im Pansen festgestellte Zusammensetzung des Futters (Heu, Gras oder Krafffutter) war von Tier zu Tier verschieden.

3.3 Methoden

3.3.1 *In vitro* Kultivierung primärer Pansenzellen

Zur Gewinnung primärer PEZ-Kulturen wurde die Methode nach GALFI et al. (1981) in einer modifizierten Form genutzt.

Aus dem cranialen Blindsack des Pansens wurden etwa 5 cm breite Gewebestreifen entnommen, drei- bis viermal in Ca^{2+} - und Mg^{2+} -freiem Dulbecco's PBS (DPBS) mit 4% Penicillin-Streptomycin gewaschen und bei 4°C in dieser Lösung aufbewahrt. Nach einer Inkubationszeit von mindestens 45 Minuten wurden die Pansenzotten vom restlichen Gewebe abpräpariert, mehrmals gründlich in Ca^{2+} - und Mg^{2+} -freiem DPBS mit 1% Penicillin-Streptomycin und abschließend zweimal in antibiotikafreiem DPBS gewaschen.

Die Gewinnung von Primärzellen zur Kultivierung erfolgte mittels der so genannten warmen, fraktionierten Trypsinierung. Dazu wurden die gründlich mit DPBS gewaschenen Pansenzotten in einer Trypsin-EDTA-Lösung (2,5 g/l Schweinetrypsin, 0,2 g/l EDTA) aufgenommen und unter kontinuierlicher Durchmischung bei einer Temperatur von 37°C inkubiert. Alle 30 Minuten wurde die Trypsinlösung mitsamt der darin enthaltenen Zellen durch frische Trypsin-EDTA Lösung ersetzt. Mittels Filtration durch Gaze wurden die Zellen von Geweberesten und Pflanzenbestandteilen separiert. Die Neutralisation der Restaktivität des Trypsins erfolgte durch Zugabe serumhaltigen Mediums.

Um die Vitalität der Zellen zu überprüfen wurde auf den Routinetest der Trypanblaufärbung zurückgegriffen. Trypanblau ist ein saurer Farbstoff, dessen Anion an Zellproteine bindet. Das Trypanblau dringt durch defekte Zellmembranen toter Zellen in das Zytosol und färbt diese Zellen tiefblau. Lebende Zellen erscheinen unter dem Mikroskop leuchtend hell.

20 µl jeder Zellfraktion wurden mit Trypanblau eingefärbt und mikroskopisch untersucht. Besonderes Augenmerk galt dabei der Beurteilung der Vitalität jeder Zellfraktion sowie der Bestimmung des Verhältnisses von Zellen aus der Keimschicht des Pansenepithels (Stratum basale und Stratum spinosum) zu Zellen aus den oberen Zellschichten (Hornzellen, Zellen des Stratum granulosum).

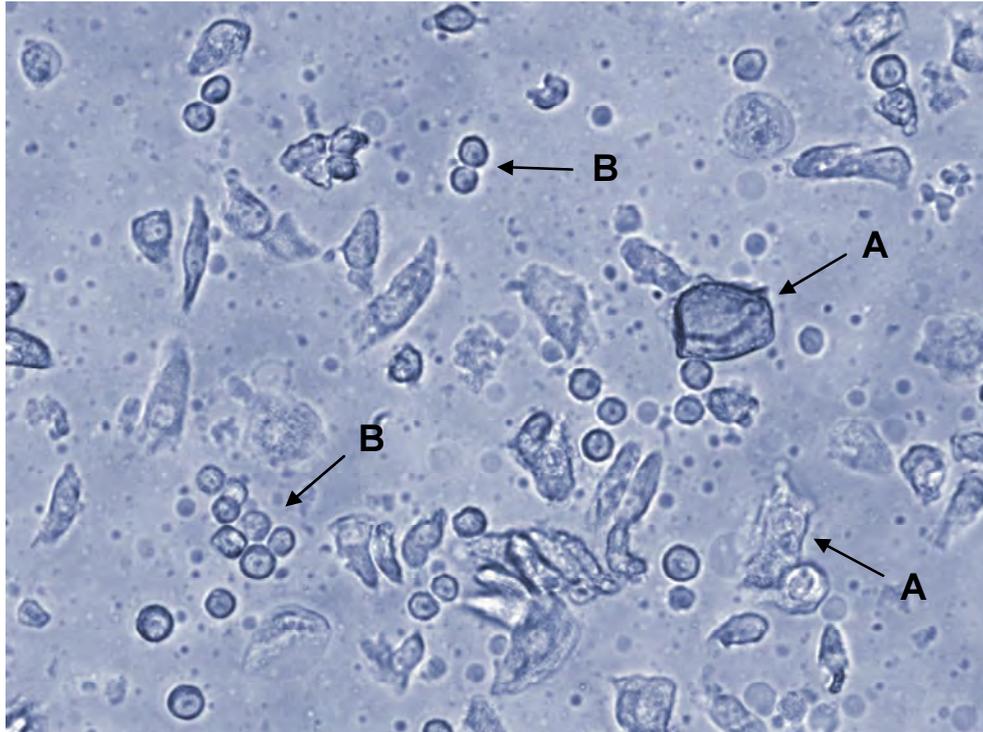


Abbildung 3.1: Mikroskopisches Bild einer Zellfraktion im Rahmen einer Zellisolierung. Alle Zellfraktionen wurden nach dem Gehalt verhornter Zellen (A) und dem Gehalt lebender Zellen aus dem Stratum germinativum (Stratum spinosum und Stratum basale, B) beurteilt (100-fache Vergrößerung); (PARK, 2003).

Da nur Zellen der Keimschicht am Substrat anheften und proliferieren, wurden ausschließlich Zellfraktionen mit einem hohen Anteil von Zellen aus dem Stratum spinosum und Stratum basale weiterverarbeitet. Diese wurden zweimal in DPBS mit 1% Penicillin-Streptomycin sowie einmal in antibiotikafreier DPBS gewaschen und anschließend im Zellkulturmedium 1 (**Tabelle 3.1**) resuspendiert. Die Aussaat der Zellen erfolgte auf Deckgläsern (Ø 13 mm, Menzel, Braunschweig) in Zellkultur-schalen (Ø 35 mm, Biochrome, Berlin). Die Epithelzellen wurden danach im Brutschrank bei 100% Wasserdampfsättigung in einem Luft-CO₂(5%)-Gemisch bei 38°C inkubiert und täglich mikroskopisch kontrolliert. 24 Stunden nach dem Aussäen wurde das Zellkulturmedium 1 gegen das Zellkulturmedium 2 getauscht und alle 48 Stunden erneuert.

Zwei bis drei Tage nach dem Aussäen wurden die Deckgläser für Patch-Clamp-Experimente entnommen. Damit die Zellen in einem teilungsfähigen Zustand blieben und nicht durch ausgeschiedene Stoffwechselprodukte sowie durch Mangel an

Nährstoffen starben, war in regelmäßigen Abständen das Passagieren der Zellen notwendig. Dies erfolgte wiederum durch Trypsinierung, bei der die Zellen mit Hilfe von Trypsin in Verbindung mit EDTA von der Unterlage gelöst wurden.

Tabelle 3.1: Zusammensetzung der zur Kultivierung der PEZ benötigten Medien

Substanz	Zellkulturmedium 1	Zellkulturmedium 2
Medium 199	Basismedium	Basismedium
Fetales Kälberserum	150 ml/l	100 ml/l
L-Glutamin (200 mM)	6,8 ml/l	6,8 ml/l
HEPES (1 M)	20 ml/l	20 ml/l
Nystatin	$2,4 \cdot 10^5$ U/l	-
Gentamycin	50 mg/l	50 mg/l
Kanamycin	100 mg/l	100 mg/l

Medium 199, Trypsin, Glutamin und die Antibiotika (Gentamycin, Kanamycin und Nystatin) wurden von Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), die gepufferten Salzlösungen (Dulbecco's PBS, phosphate buffered saline), Kollagen und Fetales Bovines Serum (FBS) von Biochrom (Berlin) bezogen.

Eine detaillierte Zusammenstellung der Versuchsmaterialien und Versuchsmedien findet sich im Anhang (**siehe Kapitel 9**).

3.3.2 Immunzytochemischer Nachweis von Zellen epithelialen Ursprungs

Zum Nachweis ihres epithelialen Ursprungs wurden die Pansenepithelzellen mit Hilfe eines indirekten Immunfluoreszenzverfahrens auf die Existenz von Zytokeratinen untersucht (PARK, 2003). Zunächst erfolgte dazu eine Aussaat der Zellen auf Kammerdeckgläsern. Nach Anheftung der Zellen auf den Deckgläsern wurden die Zellen 10 Minuten lang bei -20°C methanolfixiert. Anschließend wurde das Methanol durch Waschen mit DPBS entfernt. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Kammerdeckgläser 15 Minuten lang bei 37°C mit fetalem Kälberserum beschichtet, welches im Anschluss durch Waschen mit DPBS entfernt wurde.

Die Inkubation der Deckgläser mit dem primären Antikörper (Maus-Anti-Cytokeratin-Pan-Antikörper, Klon Lu5) erfolgte bei Zimmertemperatur über einen Zeitraum von 60 Minuten. Anschließend wurde der primäre Antikörper durch Waschen mit DPBS (dreimal über einen Zeitraum von jeweils 3 Minuten) entfernt. Um die Strukturen, an die der primäre Antikörper gebunden ist, sichtbar zu machen, wurden die Zellen bei Zimmertemperatur 60 Minuten lang mit einem Schaf-Anti-Maus-Ig-Antikörper (konjugiert mit Fluorescein; $20\ \mu\text{g}/\text{ml}$) inkubiert. Nach dem Entfernen der Kammerstruktur wurden die Kammerdeckgläser mehrmals gründlich in DPBS gewaschen, in phosphatgepuffertem Glycerin eingebettet und fluoreszenzmikroskopisch beurteilt.

3.3.3 Elektrophysiologische Messungen

3.3.3.1 Patch-Clamp Technik

Zur Messung der Membranpotentiale und Ionenströme an isolierten Pansenepithelzellen wurde die Patch-Clamp-Methode angewandt. Diese Technik wurde von Erwin Neher und Bert Sakmann entwickelt, um Ströme, die durch einzelne Ionenkanäle in biologischen Membranen fließen, zu messen. Für ihre Arbeiten erhielten sie 1991 den Nobel-Preis für Medizin und Physiologie. Die vielfältigen

Anwendungsmöglichkeiten dieser Technik führten zu einer weiten Verbreitung der Methode und machten die Untersuchung einer Reihe wichtiger Ionenkanäle möglich. Ionenströme haben nicht nur bei elektrisch erregbaren Zellen eine Funktion, sie sind für alle Gewebe, inklusive dem Pansenepithel, wichtige Regulations- und Transportmechanismen.

Das besondere der Patch-Clamp-Technik gegenüber anderen Voltage-Clamp-Verfahren ist die extrem hohe Auflösung der gemessenen Signale, die im pA-Bereich liegen (10^{-12} A). Diese Signale werden leicht vom elektrischen Hintergrundrauschen, zum Beispiel durch Leckströme, überlagert. Wesentlich für die Reduktion des Rauschens ist deshalb der hohe Abdichtwiderstand zwischen Pipettenöffnung und Zellmembran (engl. *seal* = Abdichtung, Versiegelung). Durch Anlegen eines Unterdruckes in der Pipette wird das Membranstück in die Öffnung gesaugt. Der dadurch entstandene direkte Kontakt zwischen Glas- und Membranoberfläche ist sehr stabil. Im Idealfall beträgt der elektrische Widerstand zwischen Pipetteninnerem und umgebender Badlösung mehrere GigaOhm (GΩ), man spricht daher vom „Gigaseal“.

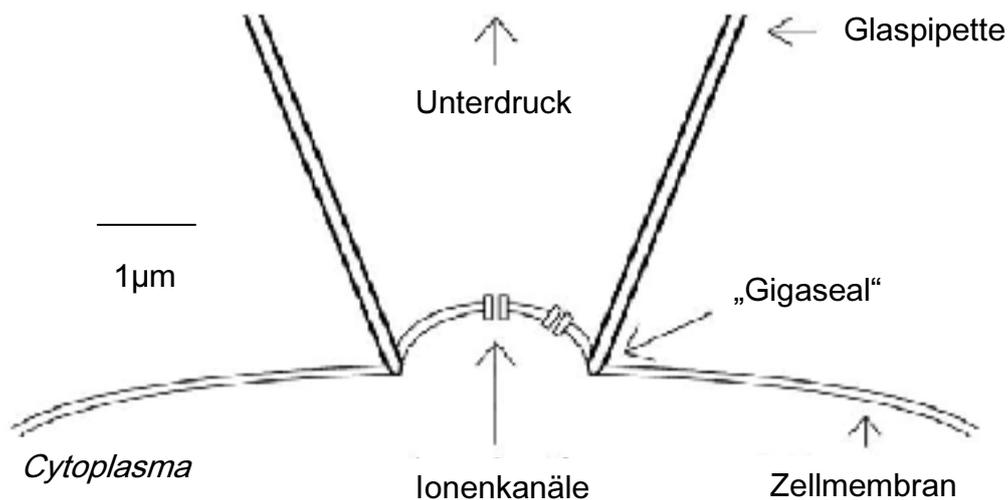


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der Herstellung eines „Gigaseals“

3.3.3.2 Messprinzip

Die Lipiddoppelschicht einer Zellmembran ist impermeabel für Ionen. Vereinfacht kann die Zellmembran als Isolator zwischen Extra- und Intrazellulärraum verstanden werden. Erst der Einbau von spezialisierten Transmembranproteinen erlaubt die selektive Passage von Ionen von innen nach außen oder von außen nach innen.

Abhängig von der Ionenzusammensetzung des Intra- bzw. Extrazellulärraums und der Membranspannung besteht für die jeweiligen Ionen eine bestimmte treibende Kraft, ein elektrochemischer Gradient, über die Membran hinweg. Nach Aktivierung membranständiger Ionenkanäle bewirkt dieser Gradient einen Fluss der den jeweiligen Kanal passierbaren Ionen.

Diese Ionenkanäle können durch verschiedene Faktoren aktiviert werden, z.B. durch

- das Membranpotential,
- die Konzentration eines aktivierenden Liganden wie PGE₂,
- die Konzentration eines aktivierenden *second messengers* wie cAMP, cGMP etc. oder
- mechanische Reize.

3.3.3.3 Patch-Clamp-Konfigurationen

In **Abbildung 3.3** sind die verschiedenen Patch-Clamp-Konfigurationen dargestellt, die zur Untersuchung unterschiedlicher Problemstellungen präpariert werden können. Die Cell-attached-Konfiguration liegt bereits vor, wenn nach Aufsetzen der Pipette auf die Zelloberfläche ein Gigaseal gebildet wurde. In dieser Konfiguration werden die Ströme durch Kanäle in dem Membranstück unter der Pipettenspitze gemessen.

Wird in der Cell-attached-Konfiguration ein Unterdruck an die Pipette angelegt, kann das Membranstück unter der Pipettenspitze aufgebrochen werden, so dass eine Verbindung zwischen dem Zellinneren und dem Inneren der Messpipette entsteht und ein Lösungsaustausch in den intrazellulären Bereich stattfindet. Diese

Anordnung wird als Whole-Cell-Konfiguration bezeichnet. Es wird die Stromantwort aller Kanäle auf angelegte Spannungspulse gemessen.

Bewegt man die Pipette aus der Cell-attached-Konfiguration von der Zelloberfläche zurück, erhält man die Inside-Out-Konfiguration: Der von der Zelle abgelöste Membranflicken (= Patch) befindet sich so an der Pipettenspitze, dass seine Innenseite zur Badlösung zeigt und die Außenseite Kontakt mit der Lösung in der Pipette hat.

Wird die Pipette aus der Whole-Cell-Konfiguration von der Zelloberfläche weg bewegt, erhält man einen Outside-Out-Patch. Das Membranstück ist ebenfalls von der Zelle entfernt; im Gegensatz zur Inside-Out-Konfiguration weist jedoch die Außenseite des Membranpatches zur Badlösung. Damit ist es möglich, wie im physiologischen System Wirkstoffe an die Außenseite der Zellmembran zu applizieren.

Inside-Out- und Outside-Out-Konfigurationen werden auch als excised patch-Konfigurationen bezeichnet. In beiden Fällen wird der Strom durch die Kanäle in dem aus der Zellmembran herausgelösten Patch gemessen. Nach Applikation von Wirkstoffen ist es so möglich, direkte oder membranvermittelte Effekte dieser auf die Kanäle zu messen, da auf die Kanäle rückwirkende Effekte aus dem Zellinneren ausgeschlossen werden können. Ein Einfluss membranassoziierter Proteine in dem gepatchten Membranstück auf die Kanäle ist jedoch nicht auszuschließen.

Durch den Zugang der Pipette zum Zellinneren ist eine exakt definierte Zusammensetzung des Zellinneren gewährleistet, jedoch werden lösliche Faktoren, z.B. Enzyme und *second messenger* aus dem Zytoplasma mit der Pipettenlösung ausgetauscht, die natürliche Zusammensetzung geht somit verloren. Der Verlust dieser niedermolekularen Bestandteile kann eine Veränderung der Regulationsprozesse an bestimmten Ionenkanälen zur Folge haben.

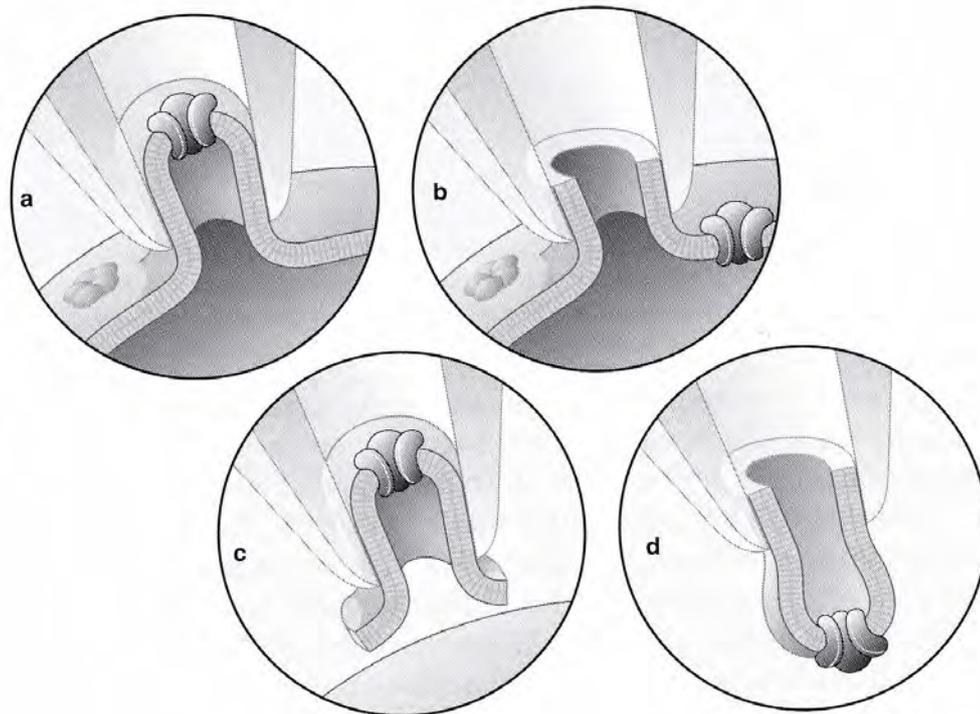


Abbildung 3.3: Patch-Clamp-Konfigurationen

Die Zeichnungen stellen die vier wichtigsten Konfigurationen der Patch-Clamp-Technik dar: a) Cell-attached, b) Whole-Cell, c) Inside-Out, d) Outside-Out (aus NUMBERGER und DRAGUHN, 1996)

3.3.4 Der Patch-Clamp Messaufbau

3.3.4.1 Der Messplatz

Da bei Patch-Clamp-Experimenten extrem kleine elektrische Ströme gemessen werden, war der gesamte Aufbau darauf ausgelegt, elektromagnetische Störungen abzuschirmen und zu vermeiden. Daher umgab die Messkammer ein Faradayscher Käfig und alle leitenden Bestandteile wurden an einem zentralen Punkt geerdet. Zur Vermeidung mechanischer Störungen erfolgte der Aufbau des Experimentierplatzes auf einem luftgefederten Tisch.

Im Zentrum des Aufbaus stand ein inverses Mikroskop (Axiowert 25, Carl Zeiss AG, Oberkochen). Bei einem solchen Mikroskop befindet sich der optische Teil unter dem Objektisch, man blickt also von unten auf das Präparat. Dadurch blieb über dem

Präparat viel Platz für die Messpipette, die Badperfusion und Beleuchtungseinrichtung.

Anstelle des Objektisches des Mikroskops wurde eine Halterung für die Flusskammer mit den zu untersuchenden Zellen benutzt, die sich zur Auswahl einer geeigneten Zelle mechanisch in zweidimensionaler Richtung bewegen ließ. Die Kammer bestand aus einer 5 mm starken Plexiglasscheibe (\varnothing 35 mm) mit einer runden Vertiefung in der Mitte. Der Boden war durchbrochen, so dass dort ein Deckglas mit Hilfe von Silikonpaste befestigt werden konnte und gute optische Verhältnisse garantierte.

Die 50 ml Gefäße (Einmalspritzen, HEILAND Vet GmbH, Hamburg) mit den Perfusionslösungen waren ca. 30 cm oberhalb der Kammer angebracht. Über mit Absperrhähnen bestückten Polyamidschläuche (Tygon Standardschläuche, ISMATEC, Wertheim-Mondfeld) gelangten die Lösungen in die Kammer. Um eine gleichmäßige Perfusion der Zellen zu gewährleisten, wurde der Zulauf über eine Schlauchpumpe (ISMATEC, Wertheim-Mondfeld) gesteuert. Die Schläuche mündeten in ein Manifold (8-channel Millimanifold, ALA Scientific Instruments, Westbury, NY, USA), welches bis zu acht Polyamidschläuche zu einem einzigen Ausgang zusammenführt. Das letzte Teilstück des Kammerzuflusses bestand aus einer mit Temperatursensor und Heizelement ausgestatteten Kanüle. Über ein Temperaturkontrollsystem (*Standard Temperature Controller* und Kanüle: Lohmann Research Equipments, Castrop-Rauxel) konnte so eine konstante Temperatur von 37,5°C der Badlösung in der Flusskammer erreicht werden. Sämtliche Heizelemente waren so gegenüber der Umgebung isoliert, dass sie den experimentellen Aufbau nicht beeinträchtigten.

An der dem Zulauf gegenüberliegenden Seite der Flusskammer wurde in definierter Höhe eine Absaugung positioniert, so dass der Flüssigkeitsspiegel (0,2 ml) in der Kammer konstant blieb. Der Durchfluss durch die Kammer betrug 4 ml/min.

Die Messpipette wurde in den Pipettenhalter eingesetzt, der zur Gewährleistung eines möglichst kurzen Signalweges direkt am Vorverstärker angebracht war und über einen elektrischen Mikromanipulator (Eppendorf PatchMan, Brinkmann Instruments, Inc., NY, USA) gesteuert werden konnte. Ein luftdicht mit dem Pipetteninneren verbundener Kolben ermöglichte über einen Silikonschlauch das Anlegen eines leichten Unterdrucks in der Patchpipette.

Alle anderen Komponenten des Versuchsstandes befanden sich außerhalb des Faradayschen Käfigs. Dazu gehörten die Steuereinheit für den Mikromanipulator, der Messverstärker mit integriertem Analog-Digital-Wandler (EPC9, HEKA Elektronik, Lamprecht) und der Computer.

3.3.4.2 Elektronik und Aufnahme der Messdaten

Die Messungen erfolgten unter Voltage-Clamp-Bedingungen. Prinzipiell wird dabei das Potential der Zelle vorgegeben und der dazu notwendige Kompensationsstrom gemessen. Erzeugt wird der Kompensationsstrom dabei durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus, bei dem das Membranpotential gemessen und mit dem vorgegebenen, gewünschten Wert – der Soll- oder Kommandospannung – verglichen wird. Jeder Unterschied zwischen der Sollspannung und der tatsächlich gemessenen Membranspannung aktiviert einen Regler, der einen entgegen gerichteten Strom in die Zelle injiziert. Dieser Strom wird gemessen und ist genauso groß, wie der, der durch die Membran fließt. Der dazu notwendige Schaltkreis befindet sich im Vorverstärker und ist in **Abbildung 3.4** vereinfacht dargestellt.

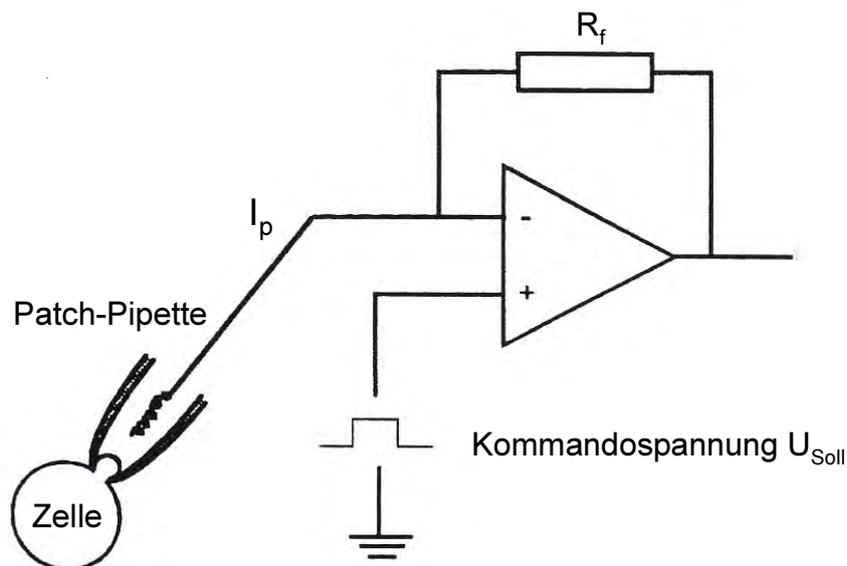


Abbildung 3.4: Schematische Darstellung des Vorverstärkers (nach OGDEN und STANFIELD, 1994)

Der Rückkopplungswiderstand (R_f) ist so ausgelegt, dass die Sollspannung (U_{Soll}) auf definierte Weise geklemmt und der Pipettenstrom (I_p) gemessen werden kann.

Für einen möglichst kurzen Signalweg von der Pipette zum Verstärker ist der Pipettenhalter direkt auf den Vorverstärker montiert. Alle Messwerte gehen von dort über ein flexibles Kabel zum Hauptverstärker, der zusammen mit den übrigen Geräten neben dem Messtisch steht. Dort wurden die Signale nochmals verstärkt und gefiltert. Die Vermittlung zwischen dem analog „kommunizierenden“ Verstärker und dem digital arbeitenden Computer übernahm ein integrierter Analog-Digital-Wandler (EPC9, HEKA Elektronik, Lamprecht).

Der Computer war mit einer Software zur Erfassung, Speicherung und Verarbeitung der Messdaten sowie zur elektrischen Stimulation der Zellen ausgestattet (TIDA [Turbo Pascal Interface for Data Acquisition], HEKA Elektronik, Lamprecht). Über programmierbare Stimulationsprotokolle konnten die Zellen mit Spannungssprüngen genau definierter Amplitude und Dauer aktiviert werden.

3.3.4.3 Herstellung der Glaspipetten und Messelektroden

Die Pipetten für die Messungen wurden aus Borosilikatglaskapillaren ($\varnothing_{\text{außen}} = 1,5 \text{ mm}$, $\varnothing_{\text{innen}} = 1,17 \text{ mm}$; Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) für jeden Versuch mit einem automatischen Pipettenziehgerät (DMZ-Universal Puller, Zeitz, Augsburg) frisch hergestellt.

Um eine stumpf zulaufende Spitze zu gewährleisten, die das Durchstechen der Zellmembran durch die Pipette verhindern soll, wurden die Pipetten horizontal in drei Erhitzungs- und Zugintervallen gezogen und anschließend in einem vierten Erhitzungsintervall poliert. Der Pipettenwiderstand wurde anhand des Testsignals nach Eintauchen der Pipette in die Badlösung überprüft und lag im Bereich von 3 - 4 M Ω .

Für den Übergang zwischen metallischen Leitern und Elektrolytlösungen wurden in der Patchpipette und im Bad Silberdrähte verwendet, die in einer NaCl-Lösung (1 M) chloriert wurden. Die Badelektrode war über eine Agarbrücke mit der Perfusionslösung verbunden.

3.3.5 Vorzeichenkonvention

Generell betrachtet man die Richtung des Stromes aus der Sicht der Zelle. Somit ist ein Strom positiv geladener Ionen in die Zelle hinein ein Einwärtsstrom und wird definitionsgemäß als negativer Strom dargestellt. Ein Strom positiv geladener Ionen aus der Zelle heraus ist ein Auswärtsstrom und wird als positiver Strom dargestellt. Für negativ geladene Ionen gilt das Umgekehrte.

Für die einzelnen Messkonfigurationen bedeutet das:

- Ganzzelleableitung (Whole-Cell) und Outside-Out-Konfiguration

Da die Pipettenlösung ein Kontinuum mit dem Zytosol bildet bzw. die Innenseite der Membran überspült, bedeutet ein positiver Strom, dass Kationen aus der Pipette über die Zellmembran in das Bad oder Anionen aus dem Bad in die Pipette fließen.

Die Potentialdifferenz über der Membran entspricht der an der Pipette anliegenden Kommandospannung. Somit bedeutet ein positiveres Kommandopotential eine Depolarisation der Zelle.

- Ableitung an der intakten Zelle (Cell-attached) und Inside-Out-Konfiguration

Wenn die Pipette mit der Außenseite der Membran verbunden ist, bedeutet ein positiver Strom, dass Kationen aus der Zelle bzw. aus dem Bad über die Membran in die Pipette fließen.

Der zellfreie Membranfleck ist mit seiner Innenseite dem Bad zugewandt. Deshalb entspricht das Membranpotential dem Kommandopotential.

Bei der Ableitung an der intakten Zelle (Cell-attached) wird das Potential über der Membran nicht nur von der Klemmspannung, sondern auch durch das Ruhemembranpotential bestimmt. Ein positiveres Kommandopotential bewirkt eine Hyperpolarisation der Zelle. Bei diesen Messanordnungen mussten deshalb Strom- und Spannungssignal zur Auswertung invertiert werden.

3.3.6 Analyse der Patch-Clamp-Daten

3.3.6.1 Strom-Spannungs-Kurven

Klemmt man die Zellen auf ein definiertes Membranpotential (*Voltage-Clamp*), kann man den entsprechenden Membranstrom, der über die Zellmembran fließt, kontinuierlich aufzeichnen. Misst man die Ströme bei verschiedenen Haltepotentialen und trägt den Strom in Abhängigkeit vom Potential auf, erhält man eine Strom-Spannungs-Kurve oder -Kennlinie. Der Schnittpunkt dieser Kurve mit der Spannungsachse (Abszisse) ergibt das Umkehrpotential, also die Spannung, bei der kein Strom mehr fließt.

Abhängig ist das Umkehrpotential sowohl von der Ionenzusammensetzung auf beiden Seiten der Membran als auch von der relativen Leitfähigkeit der Kanäle für die verschiedenen vorhandenen Ionen.

Leitet ein Kanal in einem Potentialbereich besser als in die andere, wird er als gleichrichtender Kanal (engl.: *rectifier*) bezeichnet. Auswärtsrektifizierend bedeutet dabei, dass nach Depolarisation die Leitfähigkeit der Zellmembran für positive Ionen zunimmt. Somit wird die (ungeklemmte) Zelle *in vivo* nach Depolarisation automatisch repolarisiert („rektifiziert“). Einwärtsrektifizierend besagt, dass nach Hyperpolarisation die Leitfähigkeit zunimmt. Bei diesen (negativen) Potentialen strömen positive Ionen in die Zelle hinein, die Zelle wird also automatisch wieder zum Ausgangspotential zurückgeführt (wobei sich die Leitfähigkeit für positive Ionen verringert). In beiden Fällen können Ionen in beide Richtungen durch den jeweiligen Kanal strömen, wobei die Richtung vom angelegten Potential abhängt. Eine gekrümmte Strom-Spannungs-Kennlinie kann auf die Tatsache hinweisen, dass der Kanal einen Spannungssensor hat (*voltage dependent potassium channels*, K_v), dass zytosolische Ionen spannungsabhängig blockieren (*inward rectifying K^+ channel*, K_{ir}) oder dass sich nach der Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung aufgrund einer Ungleichverteilung der Ionen bei spannungsunabhängiger Leitfähigkeit eine gekrümmte Kennlinie ergibt.

3.3.6.2 Pulsprotokolle

Zur Charakterisierung des Membranstroms wurden zwei Pulsprotokolle erstellt, die sich an den berechneten Nernst-Potentialen für die wichtigsten Ionen orientierten.

- Pulsprotokoll 1 (kontinuierliches Pulsprotokoll):

Ausgehend von einem Haltepotential von -40 mV wurde die Spannung stufenweise in 20 mV-Schritten von $+100$ mV auf -120 mV gesenkt. Jeder Spannungspuls dauerte 20 ms und war gefolgt von einer Rückkehr zum Haltepotential für jeweils 200 ms.

Dieses Pulsprotokoll wurde kontinuierlich während der Messung fortgeführt und mit einer Frequenz von 100 Hz aufgezeichnet. Diese Art der Aufzeichnung hatte den Vorteil, dass man prompte Änderungen der Stromantworten bei Lösungswechseln registrieren konnte.

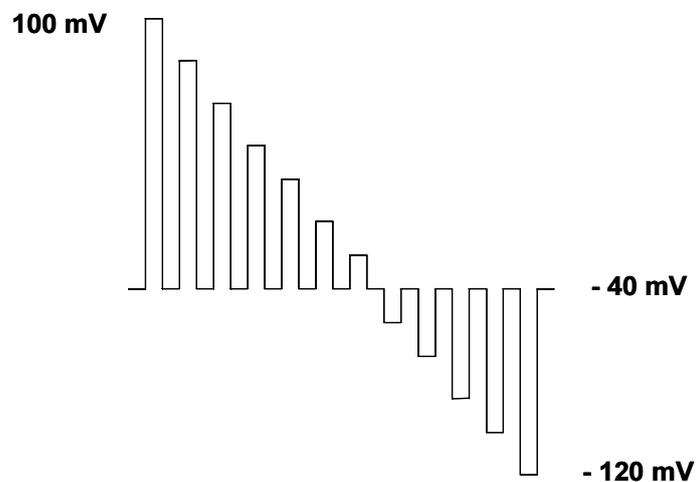


Abbildung 3.5: Schematische Darstellung von Pulsprotokoll 1 zur Charakterisierung des Membranstroms.

- Pulsprotokoll 2

Zusätzlich zu den kontinuierlichen Protokollen wurden konventionelle Pulsprotokolle mit 10 mV - Abständen erzeugt, auch hier jeweils ausgehend von einem Ruhemembranpotential von -40 mV. Aufgezeichnet wurde dieses Protokoll mit einer Frequenz von 5 kHz.

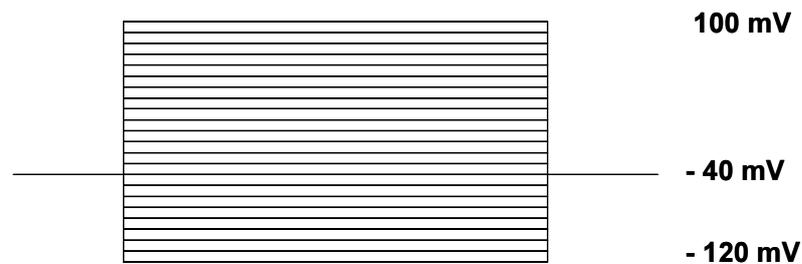


Abbildung 3.6: Schematische Darstellung von Pulsprotokoll 2 zur Charakterisierung des Membranstroms. Zur besseren Übersicht werden zu unterschiedlichen Zeiten erhaltene Stromantworten auf Spannungen zwischen -120 mV und 100 mV wie üblich übereinander dargestellt.

Die Einzelkanalableitungen wurden mit einer Frequenz von 10 kHz aufgezeichnet.

3.3.7 Praktische Durchführung eines Patch-Clamp-Experiments

Eine Zelle wurde unter dem Mikroskop für die Messung ausgewählt. Voraussetzung war eine feste Verbindung des Präparats mit dem Untergrund, um Störungen der Messung durch Verlust des Seals zu vermeiden. Eine unmittelbar vor dem Versuch gezogene Pipette wurde mit entsprechender Pipettenlösung gefüllt und in den Pipettenhalter eingespannt.

Bei Überschreiten der Luft-Flüssigkeits-Grenze entsteht in der Messkette Pipettenelektrode – Pipettenlösung – Perfusionslösung – Badelektrode ein Messartefakt, das als Offsetpotential bezeichnet wird. Es ist nicht auf das Präparat oder die Kommandospannung zurückzuführen. Die Korrektur der Spannung, eine Einstellung des Membranpotentials (V_{Mem}) auf „Null“, erfolgte mittels der Software TIDA. Somit lag das eingestellte Kommandopotential während der Messung auch wirklich an.

Nun wurde zur Berechnung des Pipettenwiderstandes eine definierte Spannung in Form eines 10 mV- Rechteckimpulses appliziert. Aus dem daraus resultierenden Strom wurde nach dem Ohmschen Gesetz ($R = U / I$) automatisch durch die Software der Widerstand berechnet. Entsprechend der Pipettenwiderstand Werten von 3 - 4 MegaOhm, wurde die Pipette unter optischer Kontrolle mit Hilfe des Mikro-manipulators an die Zelloberfläche geführt. Die unmittelbare Nähe zur Zellmembran wurde durch eine verkleinerte Stromantwort aufgrund geringgradiger Widerstandserhöhung deutlich.

Um die innige Verbindung zwischen Zellmembran und Pipette herbeizuführen, wurde vorsichtig ein Unterdruck an die Pipette angelegt. Durch den sich in den GigaOhm-Bereich erhöhenden Widerstand fiel nun die Stromantwort auf den Kommando-spannungspuls nur noch minimal aus. Der Membranfleck unter der Pipettenöffnung war fast vollständig isoliert. Die angezeigten Ströme stellten eine fast durchgehend flache Linie dar mit zwei kapazitiven Artefakten am Anfang und am Ende des Spannungspulses. Diese entstehen durch Umladeprozesse an Pipette und Zellmembran und wurden vor Beginn der Messung mit Hilfe der Software kompensiert. Nach der Herstellung des Gigaseals wurde die Zellmembran auf ein Haltepotential von -40 mV geklemmt. Durch ruckartiges Anlegen eines Unterdrucks wurde die Membran durchbrochen und ein elektrischer Zugang (Whole-Cell-Modus) durch die Pipettenöffnung hergestellt.

Die Ganzzelleableitung erfasste den Stromfluss über der gesamten Membran, wodurch sich eine deutliche Änderung der Stromantwort ergab. So nahmen die kapazitiven Ströme durch die Vergrößerung der Messfläche zu. Gleichzeitig verringerte sich der Widerstand unterhalb der Pipette und die Stromantwort wurde größer. Nach softwaregestützter Kompensation der Kapazität wurde mit den Messungen mittels der verschiedenen Pulsprotokolle begonnen.

3.3.8 Zusammensetzung der Pipetten- und Perfusionslösungen

Tabelle 3.2: Perfusionslösungen für Whole-Cell-Messungen

Substanz	NaCl (Standard- Lösung +Ca ²⁺ +Mg ²⁺)	Na- Gluconat	NaCl 0Ca ²⁺ 0Mg ²⁺	KCl	CholinCl	MgCl ₂
NaCl	130 mM	5 mM	130 mM	-	-	-
Na-Gluconat	-	130 mM	-	-	-	-
CholinCl	-	-	3,9 mM	-	130 mM	-
NaH ₂ PO ₄	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM
HEPES	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM
CaCl ₂ *	1,7 mM	1,7 mM	-	1,7 mM	1,7 mM	1,7 mM
MgCl ₂ **	0,9 mM	0,9 mM	-	0,9 mM	0,9 mM	65 mM
EGTA	-	-	0,5 mM	-	-	-
KCl	5 mM	5 mM	5 mM	135 mM	5 mM	5 mM
Mannitol	-	-	-	-	-	65 mM

pH-Wert von 7,4 eingestellt bei Raumtemperatur mit 1 mol/l TRIS (C₄H₁₁NO₃)
Osmolarität von 290 mmol/l eingestellt mit äquivalenten Mengen des dominierenden Ions. Kurz vor der Messung wurde der Perfusionslösung 5 mmol/l Glukose hinzugefügt.

Tabelle 3.3: Perfusionslösungen für Inside-Out-Messungen

Substanz	NaCl	NaCl 0Ca ²⁺ 0Mg ²⁺	KCl 0Ca ²⁺ 0Mg ²⁺	MgCl ₂	CaCl ₂
NaCl	136 mM	136 mM	5 mM	-	-
HEPES	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM
CaCl ₂ *	1,7 mM	-	-	-	-
MgCl ₂ **	0,9 mM	-	-	92,66 mM	92,66 mM
EGTA	-	5 mM	5 mM	-	-
KCl	-	-	136 mM	-	5 mM

pH-Wert von 7,2 eingestellt bei Raumtemperatur mit 1 mol/l TRIS (C₄H₁₁NO₃)
Osmolarität von 289 mmol/l eingestellt mit äquivalenten Mengen des dominierenden Ions.

*CaCl₂ · 2H₂O, **MgCl₂ · 6H₂O

Angesetzt in Aqua bidestillata
EGTA = Ethylenglycol-bis(Oxyethylnitril)-Tetraessigsäure
HEPES = N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N'-(2-Ethan-Sulfonsäure)

Tabelle 3.4: Pipettenlösungen für Whole-Cell-Messungen

Substanz	K-Gluconat	CholinCl	CholinCl 0 Mg ²⁺	CsCl	Cs- Methansulfonat
K-Gluconat	123 mM	-	-	-	-
CholinCl	-	118 mM	118 mM	-	-
KH ₂ PO ₄	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM
Na ₂ SO ₄	-	-	0,9 mM	-	-
CaCl ₂ *	0,8 mM	0,8 mM	0,8 mM	0,8 mM	0,8 mM
MgSO ₄	0,9 mM	0,9 mM	-	0,9 mM	0,9 mM
HEPES	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM
NaCl	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM
KCl	-	5 mM	5 mM	5 mM	5 mM
EGTA	5 mM	5 mM	5 mM	5 mM	5 mM
Cs- Methansulfonat	-	-	-	-	118 mM
CsCl	-	-	-	118 mM	-

*CaCl₂ · 2H₂O

Angesetzt in Aqua bidestillata

EGTA = Ethylenglycol-bis(Oxyethylnitril)-Tetraessigsäure

HEPES = N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N'-(2-Ethan-Sulfonsäure)

pH-Wert von 7,2 eingestellt bei Raumtemperatur mit 1 mol/l TRIS-OH (C₄H₁₁NO₃)

Osmolarität von 289 mmol/l eingestellt mit äquivalenten Mengen des dominierenden Ions

3.3.9 Statistische Analyse

In die Auswertung wurden Daten aus 3 bis 24 Einzelexperimenten einbezogen und im Folgenden mit **n** angegeben. Die quantitativen Angaben erfolgten als Mittelwerte mit Standardfehler (\pm SEM, standard error of the mean).

Für die statistische Analyse der Membranströme wurden die Stromwerte bei einem Haltepotential (Pipettenpotential) von -120 mV (= Einwärtsstrom) und +100 mV

(= Auswärtsstrom) herangezogen. Aufgrund verschiedener Zellgrößen variierten die absoluten Stromwerte stark. Um die Daten miteinander vergleichen zu können, wurden zwei Methoden angewandt. Bei Anwendung der ersten Methode wurden die Ströme in Prozent von dem Wert angegeben, der zu Beginn der Messung bei dem Pipettenpotential von 100 mV (bzw. -120 mV) gemessen wurde. Alle anderen Ströme wurden anschließend in Relation zu diesen Werten betrachtet. Auf diese Weise konnten sowohl unterschiedliche Zellgrößen als auch Leckströme korrigiert werden.

Diese Art der Auswertung eignete sich jedoch nicht für Daten, die man aus Messungen mit unterschiedlichen Pipettenlösungen erhielt. Aus diesem Grund wurden **sämtliche** Zellkapazitäten vor der Analyse mit Hilfe des Computerprogramms TIDA bestimmt. Anschließend wurde die Stromdichte (pA/pF) mit dem Computerprogramm SigmaPlot 2002 for Windows Version 8.0 (SPSS Inc.) berechnet. Die so korrigierten absoluten Werte machten es möglich, auch Messungen mit unterschiedlichen intrazellulären Lösungen vergleichen zu können.

Vor der Berechnung der Umkehrpotentiale (E_{rev}) wurde zunächst der Spannungsfehler, der sich durch unterschiedliche Mobilität von Ionen ergibt, mit Hilfe des Formalismus von BARRY und LYNCH (1991) korrigiert.

Die Umkehrpotentiale erhielt man mittels einer linearen Regression zwischen den Stromwerten gerade über und unter Null.

Die Prüfung auf signifikante Unterschiede wie auch die graphische Darstellung erfolgte mit SigmaPlot 2002 for Windows Version 8.0 (SPSS Inc.).

Aus Gründen der besseren Übersichtlichkeit wurde auch bei stark variierenden Gruppengrößen in den Abbildungen stets der Mittelwert \pm Standardfehler abgebildet.

Zum Vergleich zweier unabhängiger Stichproben wurde der ungepaarte t-Test nach Student verwendet, zum Vergleich zweier abhängiger Stichproben der gepaarte t-Test nach Student herangezogen. Ein signifikanter Unterschied der Stichproben wurde angenommen, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit unter 5% lag ($p < 0,05$) und wurde entweder in der Graphik mit n.s. (nicht signifikant), * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) gekennzeichnet oder im Text erwähnt.