

Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. F. Hofmann)

Der Einfluss von
Magnesium und anderen Kationen
auf die
Ionen-Ströme von Herzmuskelzellen

Rainer Wilhelm

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. W. Vierling
2. Univ.-Prof. Dr. F. Hofmann

Die Dissertation wurde am 04.04.2006 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 14.06.2006 angenommen.

Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Promotionsprüfung vorgelegte Arbeit mit dem Titel:

Der Einfluss von
Magnesium und anderen Kationen
auf die
Ionen-Ströme von Herzmuskelzellen

im Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Technischen Universität München

unter Anleitung und Betreuung durch

Herrn Professor Dr. med. Wolfgang Vierling

ohne sonstige Hilfe erstellt und bei der Abfassung nur die gemäß § 6 Abs. 5 angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe die Dissertation in keinem anderen Prüfungsverfahren als Prüfungsleistung vorgelegt.

Ich habe den angestrebten Doktorgrad noch nicht erworben und bin nicht in einem früheren Promotionsverfahren für den angestrebten Doktorgrad endgültig gescheitert.

Die Promotionsordnung der Technischen Universität München ist mir bekannt.

München, den 04.04.2006


Unterschrift

LEBENS LAUF

RAINER WILHELM

- Geburtsdatum: 08.09.1974
- Geburtsort: Augsburg
- Schulbildung: 1981 – 1985 Grundschule Kissing
1985 – 1994 Wernher-von-Braun-Gymnasium,
Friedberg (Bay.)
- Studium: WS 1995 – SS 1997 Vorklinisches Studium der Humanmedizin an der TU München
WS 1997 – SS 2000 Klinisches Studium der Humanmedizin an der Technischen Universität München
- Aug. 1998 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Sep. 2001 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- Okt. 2000 – Nov. 2001 Praktisches Jahr am Zentralklinikum Augsburg (akademisches Lehrkrankenhaus der Ludwig-Maximilians-Universität München)
07. Nov. 2001 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- Berufliche Tätigkeit: 01. Jan 2002 – 30. Jun. 2003 Arzt im Praktikum an der II. Med. Klinik des Zentralklinikums Augsburg.
01. Juli 2003 Vollapprobation als Arzt
- Seitdem Assistenzarzt an der II. Med. Klinik des Zentralklinikums Augsburg
- Wissenschaftliche Tätigkeit: Im Rahmen der Promotion seit 1997 am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Technischen Universität München.



(Rainer Wilhelm)

1. INHALTSVERZEICHNIS

1. INHALTSVERZEICHNIS.....	1
2. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	4
3. EINLEITUNG	6
4. PHYSIOLOGIE DER HERZMUSKELZELLE.....	8
4.1. Allgemeiner Aufbau einer Zelle	8
4.1.1. Die Zellmembran	8
4.1.2. Die Glycokalix.....	9
4.1.3. Zytoskelett	9
4.1.3.1. Mikrotubuli	10
4.1.3.2. Mikrofilamente	10
4.1.3.3. Intermediäre Filamente.....	10
4.1.4. Das Zytoplasma	10
4.1.5. Der Zellkern	11
4.2. Die spezielle Anatomie und Funktion der Herzmuskelzelle ...	11
4.2.1. Der Kontraktile Apparat	12
4.3. Elektrophysiologische Vorgänge am Herzmuskel	13
4.3.1. Die elektromechanische Kopplung	13
4.3.1.1. Das Aktionspotential.....	14
4.3.2. Elektrische Eigenschaften der Zellmembran	15
4.3.2.1. Molekularer Aufbau der Zellmembran	15
4.3.2.1.1. Lipide der Zellmembran	16
4.3.2.1.2. Bildung einer Doppelschichtmembran	18
4.3.2.2. Modellvorstellung der Membran	19
4.3.2.3. Aufrechterhaltung des Ionenmilieus in der Zelle.....	19
4.3.2.3.1. Die zelluläre Regulation der Ionenverteilung	19
4.3.2.4. Der elektrochemische Gradient über der Zellmembran	23
4.3.2.4.1. Wichtige Kenngrößen von Ionen-Kanälen	31
4.3.3. Charakterisierung einiger für die elektromechanische Kopp- lung am Herzen wichtiger Ionen	34
4.3.3.1. Natrium.....	34
4.3.3.2. Kalium	35
4.3.3.3. Calcium	35
4.3.3.4. Magnesium.....	36
5. DIE PATCH-CLAMP-TECHNIK.....	38
5.1. Grundlagen der Technik.....	38
5.1.1. Voraussetzungen für einen Giga-Seal.....	39
5.2. Möglichkeiten der Anwendung	40
5.2.1. Die Ganzzelleableitung (whole-cell recording)	40
5.2.2. Die Einzelkanal-Messung	40
5.2.3. Die Strom-Klemme (current-clamp).....	41
5.2.4. Superfusion	41
6. METHODIK.....	42
6.1. Allgemeine Arbeitsmethoden.....	42
6.1.1. Herstellung der Badlösungen	42
6.1.2. Herkunft der Substanzen und Reagenzien.....	42
6.1.3. Statistische und graphische Auswertung.....	43
6.1.3.1. Mittelwerte und Standardfehler.....	44

6.1.3.2.	ANOVA.....	44
6.1.3.3.	Lineare Regression und die Kurvenanpassung an die Messwerte.....	44
6.1.3.4.	Spezielle Kurvenanpassung	44
6.2.	Spezielle Arbeitsmethoden.....	44
6.2.1.	Zellisolierung	44
6.2.1.1.	Die Herstellung der Lösungen zur Zellisolation	45
6.2.1.2.	Gewinnung der Herzmuskelzellen.....	47
6.2.1.3.	Auswahl der für die Versuche am ehesten geeigneten Zellen.....	48
6.2.2.	Die Patch-Clamp-Technik.....	48
6.2.2.1.	Geschichte der Patch-Clamp-Technik	49
6.2.2.2.	Geräte und Versuchsaufbau.....	49
6.2.3.	Herstellung der Mikroelektrodenlösung	51
6.2.4.	Die Spannungskontrolle	52
6.2.4.1.	Messung des Calcium-Stroms.....	52
6.2.4.2.	Messung des Natrium-Stroms	54
6.2.5.	Versuchsaufbau zur Messung von Ionen-Strömen bei variabler Ionen-Konzentration in der Badlösung	55
7.	EIGENE VERSUCHE MIT DER PATCH-CLAMP-TECHNIK	57
7.1.	Messung von Ionen-Strömen durch die Zellmembran.....	57
7.1.1.	Messung des Calcium-Stroms an der Herzmuskelzelle	57
7.1.1.1.	Technik der Messung des Calcium-Stroms an einzelnen Kardiomyozyten.....	57
7.1.1.1.1.	Der gemessene Calcium-Einwärts-Strom.....	58
7.1.1.1.2.	Die Strom-Spannungs-Beziehung des Calcium-Einwärts-Stroms	60
7.1.1.2.	Beeinflussung der Strom-Spannungs-Beziehung des Calcium-Stroms durch divalente positive Ionen	62
7.1.1.2.1.	Effekte von Magnesium auf den Calcium-Einwärts-Strom..	62
7.1.1.2.2.	Effekte von Calcium auf den Calcium-Einwärts-Strom	71
7.1.2.	Verhalten der Auslöseschwelle des Natrium-Einwärts-Stroms bei veränderter Magnesiumionen-Konzentration.....	78
7.1.2.1.	Messung des Natrium-Einwärts-Stroms	78
7.1.2.1.1.	Änderung der Aktivierungsschwelle des Natrium-Einwärts-Stroms bei Erhöhung der Magnesiumionen-Konzentration von 1 mmol/l auf 10 mmol/l.....	80
7.1.3.	Zusammenfassung der Versuchsreihen	82
7.1.4.	Bestimmung der Verschiebung der IU-Beziehung mit Hilfe einer mathematischen Funktion	84
7.1.4.1.	Beurteilung	87
7.1.4.2.	Anwendung der Formel von Gilbert und Ehrenstein.....	87
8.	DISKUSSION DER ERGEBNISSE	89
8.1.	Wie beeinflussen divalent positiv geladene Ionen den Calcium-Einwärts-Strom an ventrikulären Kardiomyozyten?	89
8.1.1.	Die Theorie der Oberflächenpotentiale.....	90
8.1.1.1.	Die mathematische Beschreibung der Effekte.....	92
8.1.1.2.	Haben unterschiedliche Ionen gleicher Ladung den gleichen Effekt?	92
8.1.1.3.	Wie kann der Effekt von variabler Calcium- und Magnesium-	

	ionen-Konzentration im verwendeten Konzentrationsintervall einfach beschrieben werden?.....	93
8.1.1.3.1.	Rückschlüsse der Ergebnisse der Anpassung der Sätti- gungs-funktion an die Messpunkte der Konzentrations- Wirkungs-Beziehungen.....	94
8.1.1.4.	Einbeziehung des mathematischen Modells von Gilbert und Ehrenstein.	95
8.1.2.	Gibt es weitere Effekte von divalent positiv geladenen Ionen auf den Calcium-Einwärts-Strom von Herzmuskelzellen?	97
8.2.	Werden auch andere potentialabhängige Ionenkanäle durch divalent positiv geladene Ionen beeinflusst?	99
9.	ZUSAMMENFASSUNG	101
10.	LITERATURVERZEICHNIS.....	105

2. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.:	Abbildung
ADP:	Adenosindiphosphat
AP:	Aktionspotential
ATP:	Adenosintriphosphat
BK-Kanal:	K ₁ -Kanal mit großer Leitfähigkeit (big)
BTZ:	Benzothiazepine
bzw.:	beziehungsweise
Ca:	Calcium
Ca ²⁺ :	Calciumionen
cAMP:	cyclisches Adenosinmonophosphat
C-Atom:	Kohlenstoffatom
d.h.:	das heißt
DHP:	Dihydropyridine
DNA:	Desoxyribonukleinsäure
DOC:	potentialgesteuerter Kanal (depolarisation operated channel)
E:	elektrisches Potential
E _{ion} :	elektrochemisches Potential für ein Ion
E _m :	elektrisches Potential über der Membran
E _s :	elektrochemischer Gradient für ein Ion S
g:	Leitfähigkeit
GΩ:	Giga-Ohm (10 ⁹ Ohm)
g _s :	Leitfähigkeit für ein Ion S
g _{Smax} :	maximale Leitfähigkeit eines Ionenkanaltyps für ein Ion S
HVA-Kanal:	durch große Potentialänderung aktivierter Calcium-Kanal (high-voltage activated)
I _K :	Verzögerter Gleichrichter-Kalium-Strom (delayed rectifier)
I _{K1} :	Einwärts-Gleichrichter-Kalium-Strom (inward rectifier)
I _{Kr} :	schneller verzögerter Gleichrichter-Kalium-Strom (rapid)
I _{Ks} :	langsamer verzögerter Gleichrichter-Kalium-Strom (slow)
I _{Kur} :	ultraschneller verzögerter Gleichrichter-Kalium-1 Strom
(ultra-	rapid)
I _S (E):	Strom des Ions S bei einem Potential E
I _{to} :	Transienter Kalium-Auswärts-Strom (transient outward)
i.S.:	im Serum
K ⁺ :	Kaliumionen
K ₁ -Kanal:	Einwärts-Gleichrichter-Kalium-Kanal (inward rectifier)
K _{Ach} -Kanal:	Acetylcholin-abhängiger Kaliumkanal
K _{ATP} -Kanal:	ATP-abhängiger Kaliumkanal
K _{Na} -Kanal:	Natrium-abhängiger Kaliumkanal
Kd-Wert:	Dissoziationskonstante für eine Substanz-Rezeptor-Beziehung
KG:	Körpergewicht

KH-Lösung:	Krebs-Henseleit-Lösung
LVA-Kanal:	durch niedrige Potentialänderung aktivierter Calcium-Kanal (low-voltage activated)
m(x):	Masse von x
mA:	Milliampere (10^{-3} A)
Mg:	Magnesium
Mg ²⁺ :	Magnesiumionen
mm:	Millimeter (10^{-3} m)
mM:	millimolar (10^{-6} mol/l)
ms:	Millisekunde (10^{-3} s)
mV:	Millivolt (10^{-3} V)
µm:	Mikrometer (10^{-6} Meter)
µM:	Mikromolar (10^{-3} mol/l)
Na:	Natrium
Na ⁺ :	Natriumionen
nA:	Nanoampere (10^{-9} A)
nm:	Nanometer (10^{-9} m)
nM:	nanomolar (10^{-9} mol/l)
o.g.:	oben genannt
OH-Gruppe:	Hydroxylgruppe
pA:	Pikoampere (10^{-12} A)
PAA:	Phenylalkylamine
PC:	Personal Computer
RAAS:	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
ROC:	rezeptorgesteuerter Kanal (receptor operated channel)
SEM:	Standard-Fehler des Mittelwertes (standard error of the mean)
SK-Kanal:	K ₁ -Kanal mit geringer Leitfähigkeit (small)
s.o.:	siehe oben
s.u.:	siehe unten
SR:	Sarkoplasmatisches Retikulum
TTX:	Tetrodotoxin
u.a.:	unter anderem
IU-Beziehung:	Strom-Spannungs-Beziehung
V _½ :	Spannung für die halbmaximale Strom-Auslösung
V _{max} :	Spannung für die maximale Strom-Auslösung
v.a.:	vor allem
[x]:	Konzentration von x
[x] _i oder [x] _o :	extrazelluläre oder intrazelluläre Konzentration von x
ZNS:	Zentrales Nervensystem

3. EINLEITUNG

Das Herz ist ein lebenswichtiges Organ aller höheren Organismen. Es hat die Aufgabe die Blutzirkulation aufrecht zu erhalten. Mit dem Blut werden Nährstoffe und Sauerstoff zu den Organen transportiert und Stoffwechselmetaboliten und Kohlendioxid wieder abtransportiert. Neben dieser Hauptaufgabe dient das Blut u.a. zum Transport von Botenstoffen (Hormonen) oder zur Temperaturregulation. Hier zeigt sich, dass ein adäquater Blutfluss unabdingbar für die Lebensfähigkeit eines Organismus ist. Dazu gehört ein funktionierendes Herz.

In der Medizin wird oft versucht, durch Anwendung verschiedener Medikamente bei Fehlfunktion des Herzens seine Funktion so zu beeinflussen, dass wieder eine adäquate Funktion gewährleistet wird.

Seit vielen Jahren ist die antiarrhythmische Wirkung von Magnesium bekannt (Zwillinger, 1935). So kann zum Beispiel die intravenöse Verabreichung von Magnesiumlösungen Kammerflimmern (Enselberg et al., 1950), das Auftreten von ventrikulären Extrasystolen bei Intoxikation mit Herzglycosiden (Ghani und Rabah, 1977; Cohen et al., 1983), Torsarde des pointes-Arrhythmien (Tzivoni et al., 1988), von Herzrhythmusstörungen nach einem Myokardinfarkt (Shechter et al., 1990) oder nach operativer koronarer Revaskularisation (Speziale et al., 2000; Kiziltepe et al., 2003) günstig beeinflussen.

Andererseits kann bei einer Hypomagnesiämie ein gehäuftes Auftreten von kardialen Arrhythmien beobachtet werden (Rasmussen et al., 1986). Ghani und Rabah wiesen 1972 im Tiermodell eine signifikante Erhöhung der Auslöseschwellen für Kammerflimmern und vorzeitige Depolarisationen durch Magnesiuminfusion nach.

Dabei weist sehr viel darauf hin, dass die antiarrhythmischen Effekte von Magnesium auf dessen Interaktion mit den Ionenmechanismen der Zellmembran beruhen und somit einen direkten Einfluss auf das Aktionspotential haben. Es gibt dabei zwei hervorzuhebende Effekte von Magnesium an der Herzmuskelzelle, einerseits die Verschiebung der Strom-Spannungs-Beziehungen von Ionenkanälen zu positiveren Potentialen (Frankenhäuser und Hodgkin, 1957; Gilbert und Ehrenstein 1969; Dichtl und Vierling, 1991; Hall und Fry, 1992), andererseits eine direkte hemmende Wirkung auf den Calcium-Einstrom in die Herzmuskelzelle (Dichtl und Vierling, 1991; Hall und Fry, 1992). Somit hat Magnesium am Herzen einen „membranstabilisierenden“ und Calcium-antagonistischen und damit negativ inotropen Effekt. Die Auswirkungen einer „Membranstabilisierung“ wurden bereits von Kiyosue und Arita (1982) eindrücklich anhand des Aktionspotentials von Herzmuskelzellen gezeigt, nachdem diese durch eine hohe extrazelluläre Kaliumionen-Konzentration depolarisiert wurden. Dadurch kam es zu einer teilweisen Inaktivierung der Natrium-Kanäle. Durch Steigerung der extrazellulären Magnesiumionen-Konzentration konnte durch die Verschiebung der Strom-Spannungs-Beziehung der Natrium-Kanäle deren Reaktivierung und eine Normalisierung der Form des Aktionspotentials erreicht werden. Die Verschiebung der Strom-Spannungs-Beziehung von Ionen-Strömen konnte nicht nur für den Natrium-Strom nachgewiesen werden, sondern für alle potentialabhängigen Ionen-Strömen wie auch den Calcium-Strom (Dichtl und Vierling, 1991; Hall und Fry, 1992) und die Kalium-Ströme (mit Ausnahme des Einwärts-Gleichrichter-Kalium-Stroms; Gilbert und Ehrenstein, 1969).

Die Verschiebung der Strom-Spannungs-Beziehung von Natrium-Kanälen durch divalent positiv geladene Ionen zu positiveren Potentialen wurde bereits 1957 von Frankenhäuser und Hodgkin gezeigt. Dieser Effekt ist der Wirkung von divalent positiv geladenen Ionen auf das intramembranäre Potential zuzuschreiben und wurde bereits früh von Gouy (1910) und Chapman (1913) theoretisch beschrieben. Dabei ging man von einer hypothetisch gleichmäßigen Verteilung negativer Ladungen über die gesamte Zellmembran aus, an die sich positive Ionen anlagern. Grahame entwickelte 1947 ein mathematisches Modell dazu. Diesen Effekt der Ionen konnten Muller und Finkelstein (1972) auch an künstlich hergestellten Lipidvesikeln mit unterschiedlicher Oberflächenladungsverteilung experimentell nachweisen. Frankenhäuser und Hodgkin (1957) kamen im Rahmen ihrer Untersuchungen zu dem Schluss, dass sich die positiv divalenten Ionen nicht nur an die negativen Oberflächenladungen anlagern, sondern auch eine Ionenbindung mit ihnen eingehen können. Diese Aspekte griffen Gilbert und Ehrenstein (1969) in ihrer Arbeit erneut auf und konnten dabei eine Abhängigkeit der Verschiebung der Kalium-Leitfähigkeit an Tintenfischaxonen von der Konzentration divalent positiver Ionen rechnerisch darstellen. Der Effekt von divalent positiv geladenen Ionen auf die Potentialabhängigkeit von Ionen-Strömen durch die Zellmembran konnte mehrfach an Hand der Beeinflussung des Natrium- und Calcium-Stroms von Herzmuskelzellen nachgewiesen werden.

Allerdings wurde bisher noch nie versucht, die Wirkung der physiologisch wichtigen positiv divalenten Ionen Magnesium und Calcium auf die Ionen-Ströme an Herzmuskelzellen so darzustellen, dass eine Konzentrations-Wirkungs-Beziehung ersichtlich wurde, da bis jetzt meist nur sehr wenige Konzentrationsschritte gewählt wurden (z.B. 0, 10 und 50 mmol/l bei Gilbert und Ehrenstein, 1969; 1,2 und 9,8 mmol/l bei Dichtl und Vierling, 1991). Darüber hinaus wurde auch oft mit sehr hohen Konzentrationen (vgl. Gilbert und Ehrenstein, 1969) gearbeitet, weshalb wegen der Möglichkeit eines osmotischen Effektes auf das zu untersuchende Gewebe mehrere Ionen-Konzentrationen der Extrazellulärlösung gleichzeitig geändert werden mussten. In dieser Arbeit soll nun eine Konzentrations-Wirkungs-Beziehung für den Effekt der Verschiebung der Strom-Spannungs-Beziehung des Calcium-Stroms des ventrikulären Myokards am Meerschweinchen in Abhängigkeit von der extrazellulären Magnesiumionen-Konzentration erarbeitet und dem Effekt von Calciumionen vergleichend gegenübergestellt werden. Dabei sollen die Konzentrationen von Magnesium- und Calciumionen in jeweils getrennten Versuchsreihen verändert werden und sich nahe dem physiologischen Milieu bewegen. Weiterhin soll die Konzentrations-Wirkungs-Beziehung mathematisch beschrieben und daraus Hinweise auf die Wirkungsweise von Magnesium und Calcium an der Zellmembran gewonnen werden. Um letzteres zu gewährleisten, wird darüber hinaus der Effekt veränderter Konzentrationen von Magnesium- und Calciumionen auf die Inaktivierung des Calcium-Stroms betrachtet. Ebenso wird versucht, die erhaltenen Ergebnisse in das mathematische Modell von Gilbert und Ehrenstein zu integrieren.

4. PHYSIOLOGIE DER HERZMUSKELZELLE

4.1. Allgemeiner Aufbau einer Zelle

Die Zelle gilt als elementare Baueinheit des Organismus. Ihr Aufbau lässt sich in drei Hauptstrukturen unterteilen:

- Der **Zellkern** enthält das genetische Material.
- Die **Zellmembran** stellt die Abgrenzung der Zelle zu der Außenwelt dar. Sie ist gegenüber ihrer Umgebung selektiv durchlässig.
- Das **Zytoplasma** enthält für die Zelle wichtige Organellen und Plasmaeinschlüsse, die in der amorphen Matrix (Hyaloplasma) eingebettet sind.

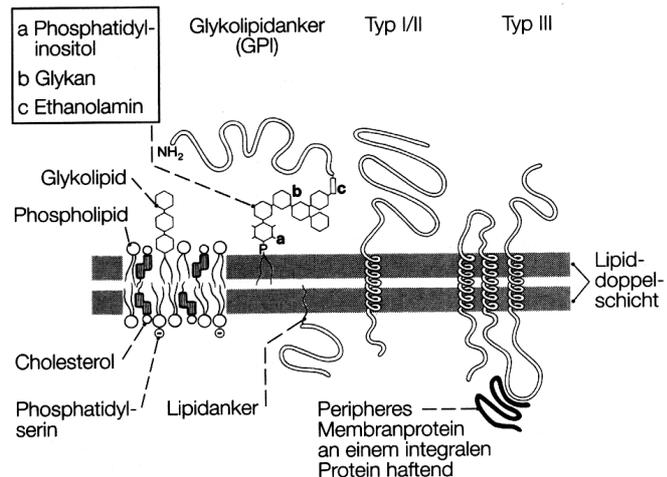
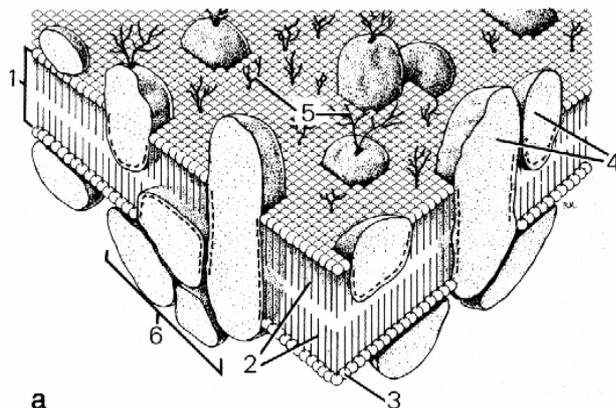


Abbildung 1:

Schematische zweidimensionale Darstellung der Zellmembran. In der Lipiddoppelschicht sind funktionelle Strukturen wie zum Beispiel Proteine verankert (aus Benninghoff, 1994).



a

Abbildung 2:

Dreidimensionale Darstellung der Zellmembran.

- 1: Lipiddoppelschicht
- 2: hydrophobe Seitenketten
- 3: hydrophile Kopfgruppen
- 4: eingelagerte Proteinmoleküle
- 5: Kohlenhydratketten (Glycokalix)
- 6: intrazelluläre Proteine

die gestrichelten Linien zeigen Abschnitte der Proteine mit hydrophoben Aminosäuren (aus Schiebler, 1996).

4.1.1. Die Zellmembran

Die Zellmembran (Plasmamembran) ist in ihrer Grundstruktur eine ca. 5 bis 10 nm dicke Lipiddoppelschicht, die das Zytoplasma umgibt und das Zellinnere vom Zelläußeren, dem Extrazellulärraum, abgrenzt. Die Lipide (s.u.) der Zellmem-

bran ordnen sich zu einer Doppelschicht. Dies beruht darauf, dass sich die Phospholipide, Glycolipide und Cholesterin mit ihren hydrophoben Ketten in wässriger Lösung zusammenlagern und die hydrophilen Kopfgruppen der wässrigen Lösung innen und außen entgegenstrecken (siehe Abb. 1 und 2). Diese Lipiddoppelschicht stellt eine äußerst effiziente Diffusionsbarriere für wasserlösliche Moleküle und Ionen dar. Um Stoffe austauschen und mit anderen Zellen in Kontakt treten zu können, sind in die Lipidmembran Proteine integriert. Sie dienen dem Stoffaustausch, der Verankerung oder als Rezeptoren für Reize, die von außen auf die Zelle eindringen. Die Membranproteine verleihen der Zellmembran die für die Funktion der jeweiligen Zelle nötigen Eigenschaften.

4.1.2. Die Glycokalix

An der Außenseite der Zellmembran befindet sich ein Geflecht von Oligosacchariden, die Glycokalix. Die Zuckerketten sind an Lipide und Proteine der Plasmamembran gebunden. Ihre Zusammensetzung ist charakteristisch für jeden Zelltyp. Sie sind z.B. Träger der Blutgruppeneigenschaften auf Erythrozyten. Abbildung 3 zeigt am Beispiel eines Lymphozyten die Zellmembran mit anhaftenden Oligosacchariden. Ähnliche Verhältnisse

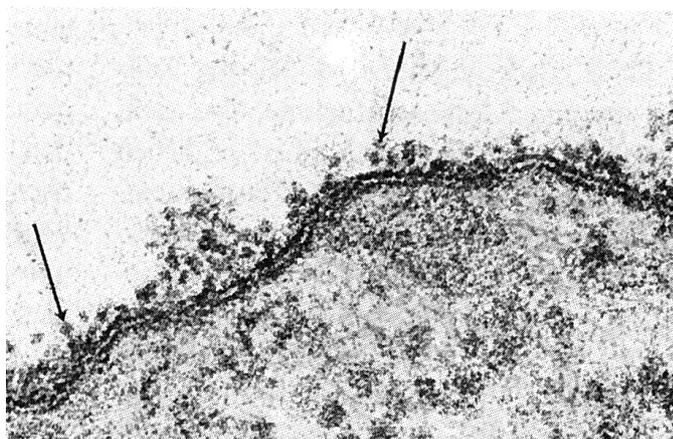


Abbildung 3: Elektronenmikroskopische Aufnahme der Zellmembran und von Mannose- und Glucosegruppen der Glycokalix eines Lymphozyten. Vergr. 180000-fach (aus Benninghoff, 1994).

herrschen auch an anderen Zellen des menschlichen Körpers vor (z.B. an den Herzmuskelzellen).

4.1.3. Zytoskelett

An der Innenseite der Zellmembran befinden sich filamentäre Proteinstrukturen, die durch Verankerungsproteine in der Doppelmembran befestigt sind – das sogenannte Zytoskelett. Es gibt der Zelle ihre Gestalt, ist beteiligt am intrazellulären Transport und ist auch mitverantwortlich für zelluläre Bewegungsvorgänge, wie zum Beispiel die Kontraktion von Muskelzellen.

4.1.3.1. Mikrotubuli

Zu erwähnen sind hier die Mikrotubuli (Durchmesser etwa 24 nm), die in jeder Zelle vorhanden sind und ihren Beitrag zur Zellgestalt und zum intrazellulären Transport leisten.

4.1.3.2. Mikrofilamente

Die sog. Mikrofilamente zählen ebenso zum Zytoskelett. Dies sind Aktinfilamente, bestehend aus zwei ineinander gewundenen Aktin-Einzelfäden mit einem Durchmesser von 5nm (f-Aktin).

Aktin kommt vor allem in Muskelzellen in Assoziation mit Myosin vor. Es dient hauptsächlich der Kontraktion der Muskelzellen. Im Herzmuskel füllen die Aktin- und Myosinfilamente fast die gesamte Zelle aus und sind in streng regelmäßigen Formen angeordnet, was zu der charakteristischen Querstreifung dieser Zellen führt.

Aktin kommt auch in nicht myosinassozierten Formen in jeder Zelle vor und dient hier meist dem zellulären Stofftransport oder trägt als Teil des subplasmalemalen Zytoskeletts zur Form der Zelle bei.

4.1.3.3. Intermediäre Filamente

Diese inhomogene Gruppe der Strukturfilamente dient vor allem der Stabilisierung des Zytoskeletts und ist somit meist in mechanisch beanspruchten Zellen, wie Muskelzellen, anzutreffen. Sie sind maßgeblich am Aufbau von Desmosomen, den interzellulären Haftverbindungen, beteiligt.

4.1.4. Das Zytoplasma

Das Zytoplasma wird von der Zellmembran umgeben und beinhaltet die Zellorganellen und Zelleinschlüsse, umgeben von einer hyalinen Matrix.

Zur Matrix gehören auch die oben beschriebenen Filamente. Des Weiteren bildet die intrazelluläre Flüssigkeit die Grundsubstanz der hyalinen Matrix und beinhaltet Ionen und weitere Stoffe, die das intrazelluläre Milieu bestimmen. Die Ionenverteilung innerhalb der Zelle ist stark unterschiedlich zu der der extrazellulären Umgebung. Dies kann Grundlage sein für die Entstehung eines elektrischen Potentials zwischen den Lösungen innerhalb und außerhalb der Zelle.

Die Organellen, wie Mitochondrien, Golgi-Apparat oder Lysosomen sorgen für die Aufrechterhaltung des zellulären Stoffwechsels. Die Mitochondrien sind die „Kraftwerke“ der Zelle. Sie produzieren im aeroben Energiestoffwechsel aus ADP und Phosphat ATP und sichern damit die Energieversorgung vieler energieabhängiger Prozesse wie z.B. der Muskelkontraktion.

4.1.5. Der Zellkern

Im Zellkern ist, abgesehen von einer geringen Menge mitochondrialer DNA, die genetische Information des gesamten Organismus in Form von DNA enthalten.

4.2. *Die spezielle Anatomie und Funktion der Herzmuskelzelle*

Das Herz hat im Organismus die Aufgabe den Bluttransport zu gewährleisten. Dies ist möglich, da das Herz ein mit Ventilkappen versehener Hohlmuskel ist. Da das Herz aus einer linken und rechten Kammer und aus einem linken und rechten Vorhof besteht, kann es als Doppelpumpe arbeiten. Die rechte Pumpe dient der Perfusion der Lungen und die linke der des gesamten Körpers.

Wesentlicher Faktor für den effizienten Transport des Blutes ist die geordnete periodische Kontraktion des Herzens. Um dies zu gewährleisten, haben sich verschiedene Zelltypen ausgebildet, die sich in Aussehen und Funktion unterscheiden. Den größten Anteil besitzen Arbeitsmuskelzellen des Vorhofs und der Kammer. Daneben gibt es Erregungsleitungs- und Erregungsbildungszellen. Für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente wurden Zellen aus dem Arbeitsmyokard der Ventrikel verwendet. Deswegen sollen Aufbau und Funktion dieser Zellen genauer erklärt werden. Die Zellen des Arbeitsmyokards sind mit 10 bis 20 μm Breite und 70 bis 120 μm Länge im Vergleich zu anderen Zellarten relativ groß.

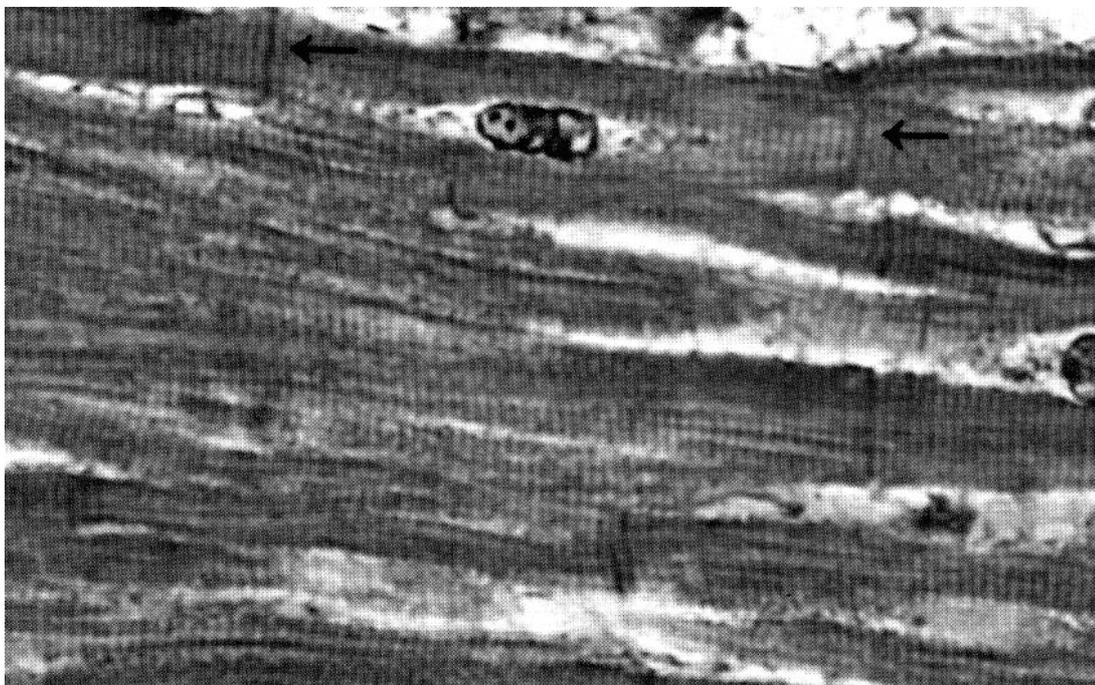


Abbildung 4:

Herzmuskel im Längsschnitt. Die Pfeile zeigen die Adhäsionsscheiben (Disci intercalares), die die einzelnen Zellen elektrisch und mechanisch miteinander verbinden. Vergr. ca. 400-fach (nach Schiebler, 1996).

Abbildung 4 zeigt einen histologischen Schnitt durch das Ventrikelmyokard unter lichtmikroskopischer Vergrößerung. Man kann deutlich die Querstreifung erkennen. Sie entsteht durch die regelmäßige und wiederholte Anordnung von Strukturelementen der Aktin-Myosin-Fibrillen (Myofibrillen) des kontraktile Apparats der Herzmuskelzellen. Im Gegensatz zur Skelettmuskulatur besteht das Muskelgewebe des Herzens nicht aus synzytialen Fasern mit mehreren Zellkernen, sondern aus einzelnen Zellen mit nur einem Zellkern. Einer dieser Zellkerne ist in Abbildung 4 oben in der Mitte zu erkennen.

Für einen funktionellen und strukturellen Zusammenhalt der Zellen sorgen die Glanzstreifen (Disci intercalares). Sie verbinden die einzelnen Zellen zu Fasersträngen. Dies geschieht durch Haftverbindungen (Desmosomen) in den Glanzstreifen und durch Gap-Junctions, welche die Erregungsausbreitung von einer zur nächsten Zelle sichern. So werden die einzelnen Zellen sowohl mechanisch als auch elektrisch vernetzt.

Der Herzmuskel ist ein erregbares Gewebe. Das bedeutet, dass ein Reiz, wenn er stark genug ist, an der Zellmembran ein Aktionspotential auslösen kann. Dafür sind in die Membran der Herzmuskelzelle spezielle Ionen-Kanalproteine (v.a. für Na^+ , K^+ und Ca^{2+}) eingelassen.

Eine weitere Besonderheit von Herzmuskelzellen sind Einstülpungen der Zellmembran ins Zellinnere, sogenannte T-Tubuli. Sie sind dazu da, die elektrische Erregung der Membran ins Zellinnere zu leiten und so eine Kontraktion der Zelle auszulösen. Dieser Mechanismus soll an anderer Stelle ausführlicher besprochen werden.

Das sarkoplasmatische Retikulum (SR) ist ein intrazelluläres Röhrensystem, das mit dem System der T-Tubuli in engem Kontakt steht, so dass bei Erregung der Zellmembran das im SR gespeicherte Calcium ins Zellinnere freigesetzt werden kann.

4.2.1. Der Kontraktile Apparat

Den größten Teil der Herzmuskelzelle nimmt der kontraktile Apparat, bestehend aus filamentären Proteinen, ein. Hauptbestandteile sind Aktin (bildet die dünnen Filamente) und Myosin (bildet die dicken Filamente).

Die Aktinfilamente bestehen aus zwei ineinander verwundenen Proteinpolymeren, den f-Aktin-Elementen. Das Aktinfilament ist Träger der Regulatorproteine Tropomyosin und Troponin.

Myosinfilamente sind aus rund 300 Myosinmolekülen aufgebaut. Die Moleküle bestehen aus zwei schweren und vier leichten Proteinketten. Sie besitzen einen dicken Kopf- und einen wesentlich längeren Schwanzanteil.

Betrachtet man ein Filament als ganzes (Abbildung 5), so zeigt sich eine bipolare Ausrichtung, indem sich im Mittelabschnitt (M-Zone) des Myosinfilaments, der keine Kopfgruppen trägt, die gegeneinander gerichteten Schwanzgruppen der beiden Enden überlagern. Hier sind mehrere parallel angeordnete Myosinfilamente durch Querverbindungen vernetzt.

Die Aktinfilamente sind ebenfalls parallel gerichtet und an den sogenannten Z-Scheiben miteinander verbunden. So können sich die Aktin- und

Myosinfilamente streng geometrisch anordnen, was sich in der Querstreifung der Muskelzellen widerspiegelt. Den Bereich zwischen zwei Z-Scheiben nennt man Sarkomer, die kleinste funktionelle Einheit des kontraktile Apparats. Die durchschnittliche Länge eines Sarkomers beträgt etwa 2,2 μm .

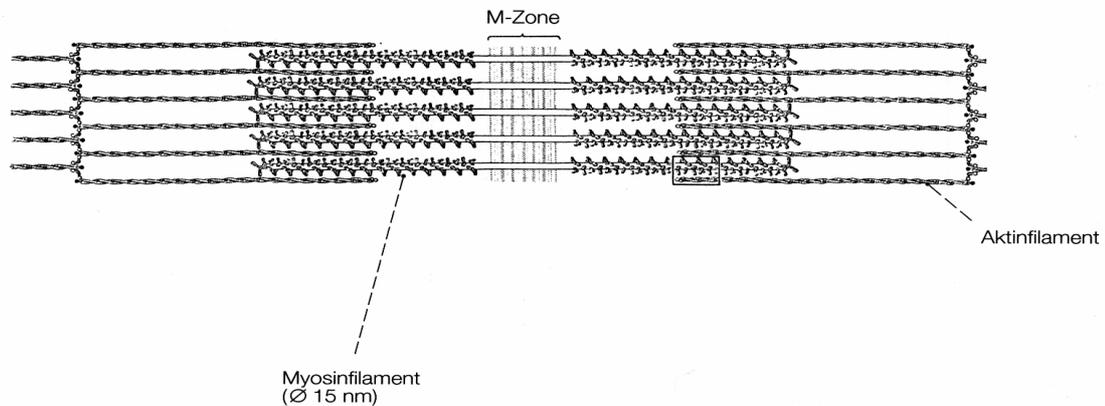


Abbildung 5:

Aufbau eines Sarkomers (nach Benninghoff, 1994)

Zur Muskelkontraktion kommt es, indem Ca^{2+} an Troponin bindet und so die Myosin-Bindungsstelle am Aktin frei gibt. Jetzt kann der Myosinkopf eine Querverbindung mit dem benachbarten Aktinfilament eingehen und durch eine Knickbewegung die beiden Filamente gegeneinander verschieben. Nach Bindung von ATP am Myosinkopf kann die Bindung zwischen Aktin und Myosin wieder gelöst werden. Der Kopf geht wieder in die Ausgangsstellung zurück. Durch eine mehrfache Wiederholung von Bindung, Abknickung und Lösung unter Verbrauch von ATP kommt es zur Verkürzung der Zelle in Längsrichtung. Die Muskelzelle kontrahiert sich.

4.3. Elektrophysiologische Vorgänge am Herzmuskel

4.3.1. Die elektromechanische Kopplung

Die Verbindung von elektrischer Erregung und Kontraktion bezeichnet man als elektromechanische Kopplung. Bei diesem Vorgang nehmen Calciumionen eine wichtige Rolle ein.

Durch die elektrische Erregung (Depolarisation) der Zelle werden Calcium-Kanäle der Zellmembran (einschließlich der T-Tubuli) geöffnet. Calcium kann entweder direkt die Kontraktion der Myofibrillen auslösen oder aber nach Bindung an Calcium-Kanäle des SR (Ryanodin-Rezeptoren) und Öffnung dieser Kanäle eine intrazelluläre Freisetzung von Calcium aus dem SR bewirken. Als Folge dieser Vorgänge steigt die Calciumionen-Konzentration in der Zelle von

ursprünglich rund 100 nmol/l auf 1 bis 2 $\mu\text{mol/l}$ an. Nach der Repolarisation der Zelle wird ein Teil des Calciums mit Hilfe des Natrium-Calcium-Austauschers und der membranständigen Calcium-Pumpe aus der Zelle eliminiert, der andere Teil wird mit Hilfe der Calcium-Pumpe des SR wieder ins SR aufgenommen. Dies führt zur Absenkung der intrazellulären Calciumionen-Konzentration und zur Erschlaffung des Muskels.

4.3.1.1. Das Aktionspotential

Während der Ruhephase der Herzmuskelzelle besteht auf Grund der unterschiedlichen Ionen-Konzentrationen zu beiden Seiten der Zellmembran ein elektrisches Potential zwischen Intra- und Extrazellulärraum von ca. -70 bis -90 mV. Hauptverantwortlich hierfür ist der Konzentrationsgradient von Kalium-Ionen, die intrazellulär in wesentlich höherer Konzentration als extrazellulär vorliegen.

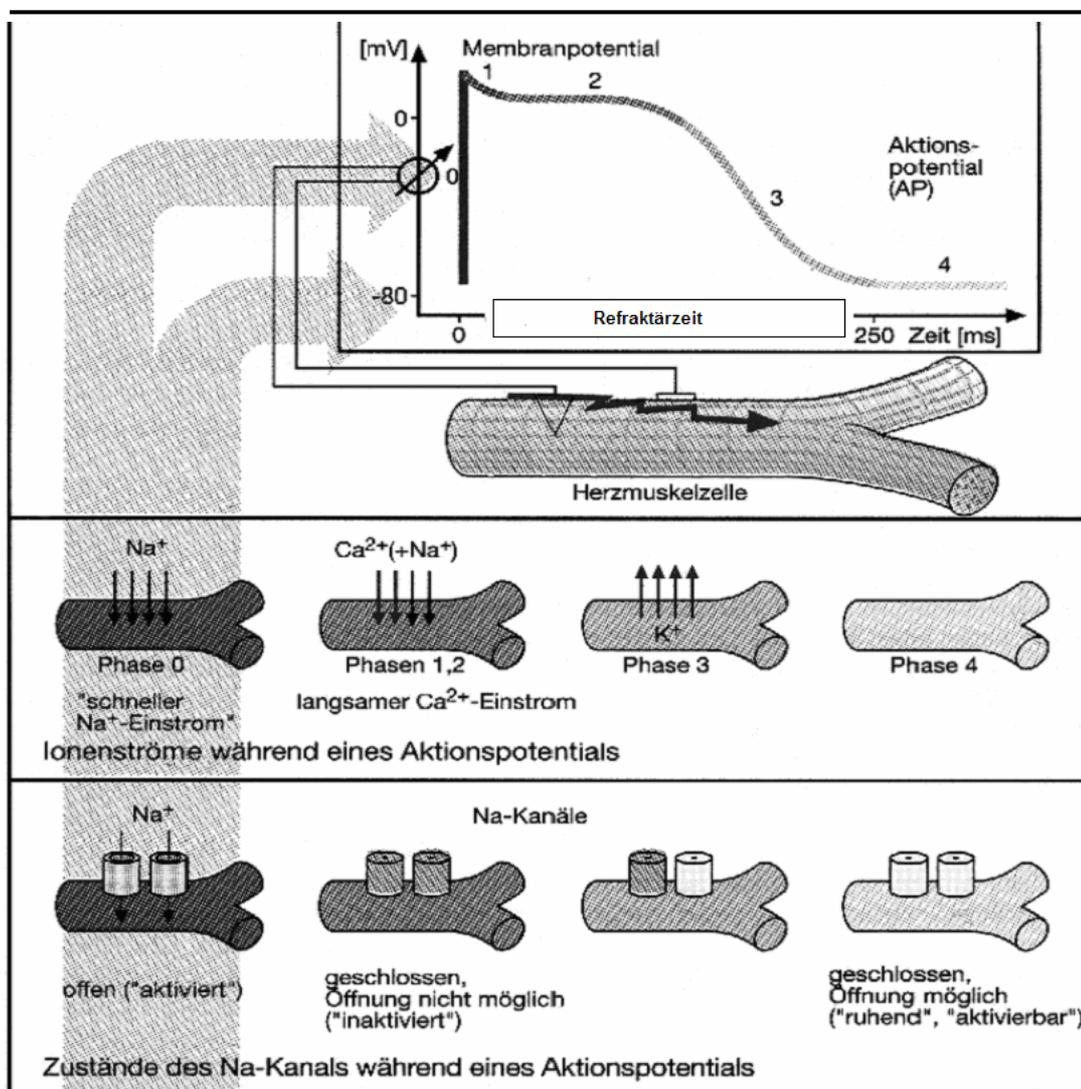


Abbildung 6:

Das Aktionspotential an einer Herzmuskelzelle und dazugehörige Ionen-Ströme. (nach Lüllmann et al., 1996)

Die elektrische Erregung des Herzens geht vom Erregungsbildungszentrum, dem Sinusknoten aus, verbreitet sich über das Vorhofmyokard und wird durch das Erregungsleitungssystem zu den Myokardfasern der Ventrikel gebracht. Die Zellen des Arbeitsmyokards, die in dieser Arbeit zu experimentellen Zwecken verwendet wurden, reagieren auf diese elektrische Erregung mit einem Aktionspotential. Es hat in der Herzmuskelzelle eine typische Form mit Ausbildung eines Plateaus und dauert ca. 200 bis 300 ms, was erheblich länger ist als in Skelett-Muskeln oder Nerven-Zellen.

Dabei öffnen sich zuerst die Natrium-Kanäle, wodurch das (negative) Potential über der Membran schlagartig zusammenbricht und sogar positive Werte erreicht werden (steiler Aufstrich der Phase 0). Die Natrium-Kanäle gehen rasch in den inaktiven Zustand über. Gleichzeitig werden Kalium-Kanäle aktiviert und es kommt zu einer gewissen Repolarisation (Phase 1). Als Besonderheit des Herzmuskels kehrt jetzt das Potential nicht sofort zum Ausgangswert zurück, sondern bleibt zunächst weitgehend konstant (Plateau, Phase 2). Verantwortlich hierfür sind einerseits die Kalium-Kanäle, die im Bereich von 0 mV nur einen geringen Stromfluss aufweisen und andererseits die Calcium-Kanäle, die für einen länger andauernden Einwärts-Strom sorgen. Es folgt die Phase der Repolarisation (Phase 3), wenn die Calcium-Kanäle in den inaktiven Zustand übergehen und der Kalium-Auswärts-Strom überwiegt. Das Potential der Zelle kehrt wieder zum Ausgangswert zurück.

Abbildung 6 zeigt die verschiedenen Phasen des Aktionspotentials. Zusätzlich sind im unteren Teil der Graphik die Zustandsformen der Natrium-Kanäle während des Aktionspotentials wiedergegeben.

4.3.2. Elektrische Eigenschaften der Zellmembran

4.3.2.1. Molekularer Aufbau der Zellmembran

Zuerst soll der allgemeine molekulare Aufbau von Zellmembranen behandelt werden, damit die speziellen Effekte besser erklärt werden können.

Die Zellmembran besteht, wie bereits erwähnt, zum größten Teil aus Lipiden und Proteinen und ist zwischen 5 und 10 nm dick. Das Massenverhältnis $m(\text{Protein})$ zu $m(\text{Lipid})$ variiert zwischen 1:4 und 4:1. An der Außenseite sind Kohlenhydratketten an den Lipiden und Proteinen befestigt und bilden die Glycokalix. Sie ist mitverantwortlich für die Ausrichtung der Proteine in der Zellmembran. Die Zusammensetzung der Membran ist nie symmetrisch, sondern sie unterscheidet sich zwischen Innen- und Außenseite. Zusammengehalten werden die einzelnen Bestandteile durch nicht-kovalente Bindungen (v.a. Van-der-Waals'sche Kräfte). Zu erwähnen sei, dass die Membran keine starre Struktur ist, sondern flüssig bzw. Gel-artig. In diesem Zusammenhang spricht man von einer sogenannten zweidimensionalen Lösung gerichteter Proteine und Lipide.

4.3.2.1.1. Lipide der Zellmembran

Beim Aufbau der Zellmembran bilden verschiedene Lipide, also schlecht wasserlösliche Moleküle, die Grundsubstanz.

Man findet:

- Phospholipide
- Glycolipide
- Cholesterin.

Im Folgenden sollen diese verschiedenen Lipidgruppen vorgestellt und deren Funktion in Membranen erläutert werden.

Diese Verbindungen sind alle amphiphil, das bedeutet die Moleküle besitzen einen polaren (hydrophilen) und unpolaren (hydrophoben) Bereich. So können sie in Wasser Doppelschichten ausbilden.

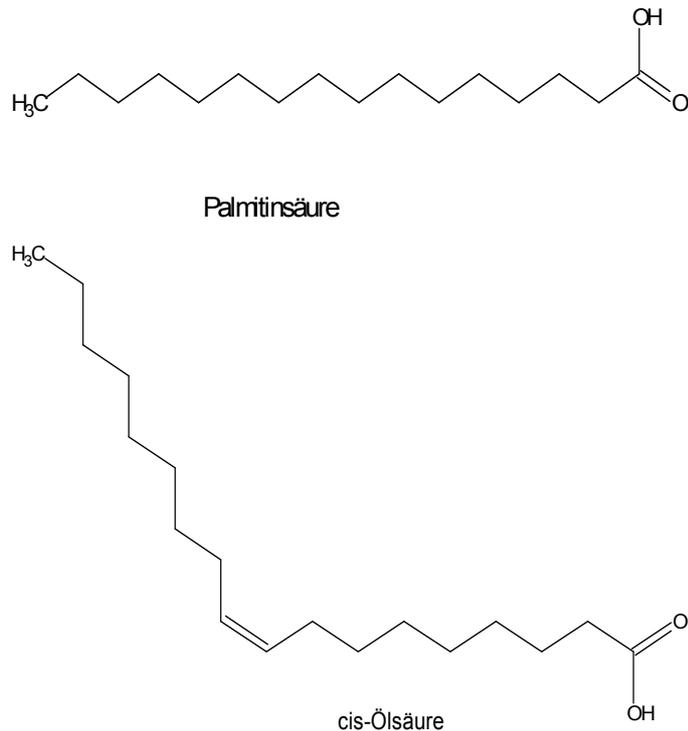


Abbildung 7:

- a) Palmitinsäure
- b) Cis-Ölsäure

Phospholipide

Diese Gruppe stellt die größte Fraktion der Membranlipide dar. Die Lipide enthalten Sphingosin oder Glycerin. Man spricht deshalb von Sphingolipiden bzw. Phosphoglyceriden.

An diese Gruppen sind Fettsäuren mittels Esterbindung gebunden. Sie bilden die hydrophoben Bereiche aus.

In der Regel sind die Fettsäuren in biologi-

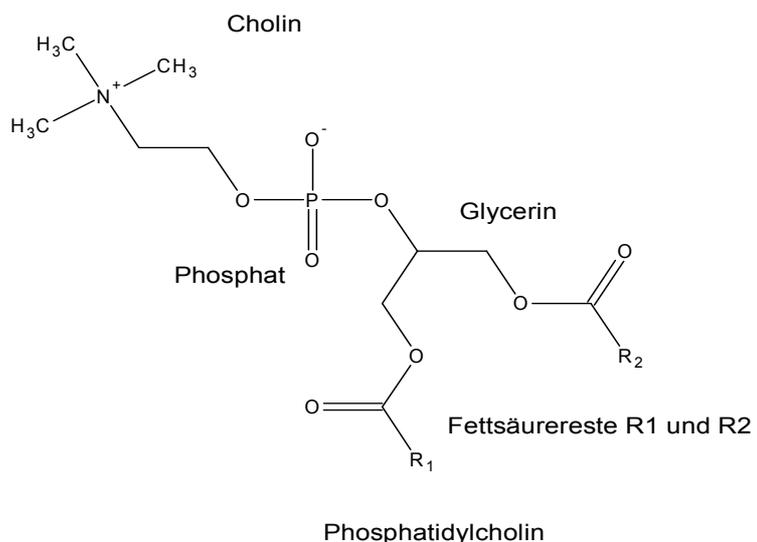


Abbildung 8:

Phosphatidylcholin als Beispiel für ein Phosphoglycerid. Cholin und der Phosphatrest bilden die hydrophile Kopfgruppe. R₁ und R₂ sind Fettsäurereste und bilden den hydrophoben Teil des Lipids.

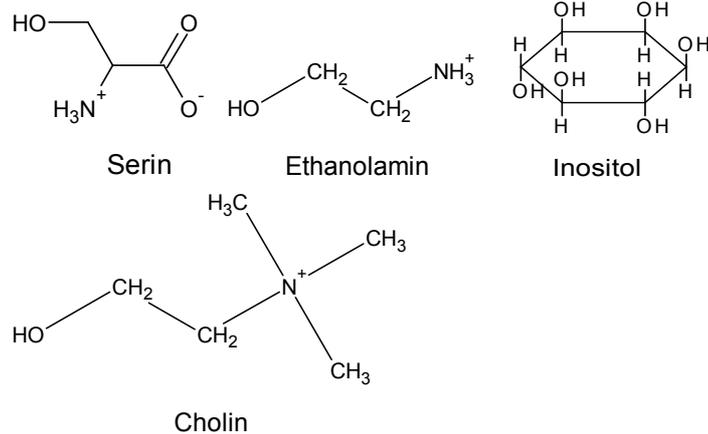
schen Membranen 14 bis 20 C-Atome lang und in tierischen Organismen unverzweigt. Am häufigsten kommen Palmitinsäure (C16) und Ölsäure (C18^{Δ9}) vor (Abbildung 7).

Phosphoglyceride

Bei den Phosphoglyceriden sind die OH-Gruppen der C-Atome 1 und 3 des Glycerins mit Fettsäuren verestert, welche die hydrophoben Komponenten bilden. Die OH-Gruppe am C-Atom 2 ist mit einem phosphorylierten Alkohol verbunden und bildet die hydrophile Kopfgruppe (Abbildung 8).

Die Alkoholkomponenten sind (siehe Abbildung 9):

- Serin *
- Inositol *
- Ethanolamin
- Cholin



Die mit * gekennzeichneten Alkoholgruppen bilden bei physiologischem pH Lipide mit negativer Nettoladung in der Kopfgruppe aus.

Die beiden anderen Verbindungen bilden zwitterionische Lipide, deren Nettoladung 0 ist.

Abbildung 9: Alkoholkomponenten der Membranlipide.

Spingolipide

Der einzige Vertreter der Phospholipide in biologischen Membranen ohne Glycerinanteil ist das Spingomyelin (Abbildung 10). Es ist am häufigsten in Membranen der neuralen Myelinscheiden anzutreffen.

Bei physiologischem pH ist Spingomyelin ein neutrales Zwitterion.

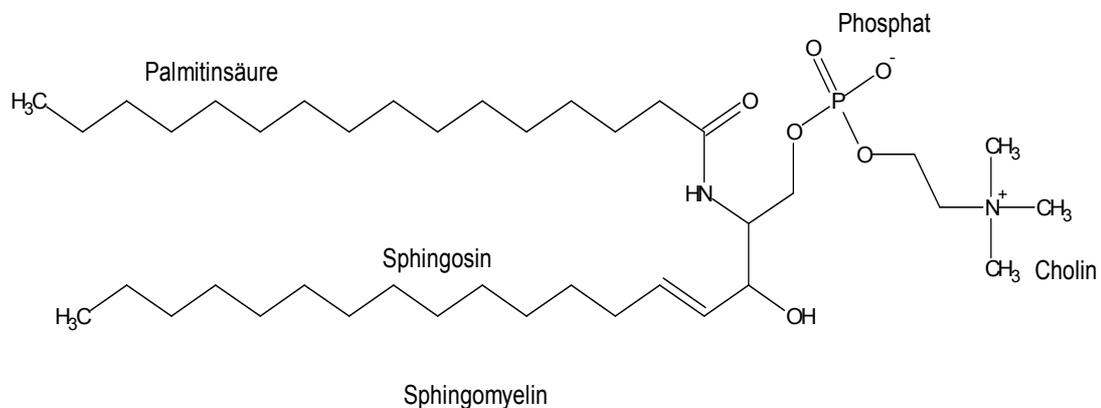
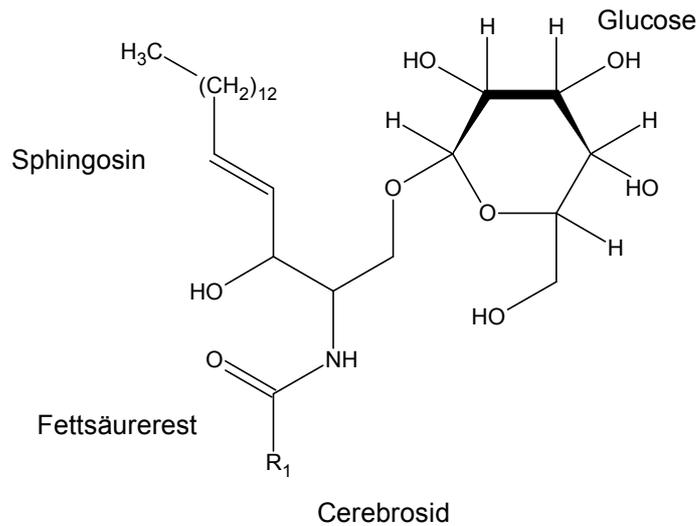


Abbildung 10: Spingomyelin.

Glycolipide

Das „Rückgrat“ dieser Lipide bildet wie beim Sphingomyelin Sphingosin. Ebenso trägt der Stickstoff am β -C-Atom eine Fettsäure. Allerdings ist die terminale OH-Gruppe statt mit einem Alkohol mit einem Zucker verknüpft.

**Abbildung 11:**

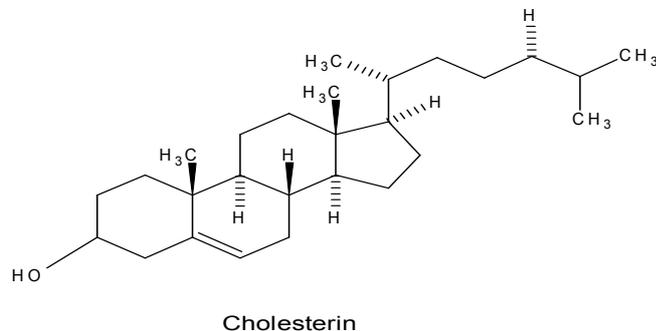
Ein Cerebrosid mit Glucose als Zuckerbaustein.

Die Zuckerkomponenten in biologischen Membranen

sind Glucose, Galactose (Cerebroside) und verzweigte Oligosaccharide (Ganglioside). Als Beispiel für die Glycolipide ist in Abbildung 11 ein Cerebrosid gezeigt. Glycolipide treten gehäuft in Membranen von Nervenzellen auf.

Cholesterin

Cholesterin kommt nur in eukaryotischen Zellen vor und dient der mechanischen Stabilisierung der Membran. Es trägt keine elektrische Ladung.

**Abbildung 12:**

Cholesterinmolekül.

4.3.2.1.2. Bildung einer Doppelschichtmembran

Wie oben bereits besprochen, haben Membranlipide einen amphiphilen Charakter. Dabei ist die Formation einer Doppelschicht, wie in Abbildung 1 und 2 sichtbar, in wässriger Lösung energetisch am günstigsten.

Permeabilitätsuntersuchungen an Lipidmembranen haben gezeigt, dass eine gute Durchlässigkeit für die Diffusion unpolarer Stoffe besteht, polare Stoffe und Ionen aber stark zurückgehalten werden. Die Membran ist somit eine Permeabilitätsschranke für diese Stoffe.

Negative Ladungen im Bereich der hydrophilen Köpfe sind vorwiegend an der Außenseite (da im Zellinneren ein negatives Potential herrscht), aber auch an

der Innenseite lokalisiert. Sie können als Mikropotentiale das Potential innerhalb der Membran und somit die Spannungssensoren der potentialabhängigen Ionenkanäle beeinflussen.

Phospholipide können auch von der inneren Seite der Doppelschichtmembran nach außen oder umgekehrt wechseln. Dies wird als Flip-Flop-Mechanismus bezeichnet. Der Wechsel wird durch das Enzym Flipase erleichtert.

In die Grundsubstanz aus Lipiden sind in biologischen Membranen Proteine eingelagert, die der Membran die für die Zelle typischen Eigenschaften verleihen. Viele davon sind transmembranär angeordnet, d.h. das Protein erstreckt sich von der Außenseite durch die hydrophobe Zwischenschicht bis zur Innenseite der Membran (z.B. Ionenkanäle oder Transporter). So steht ein Teil dieser Proteine unmittelbar in Kontakt mit den Lipiden und wird durch diese Umgebung beeinflusst. Für eine optimale Funktion benötigen die Kanalproteine eine intakte Membran. Über die Bedeutung einiger Kanal- und Pumpenproteine wird an anderer Stelle noch ausführlicher berichtet.

4.3.2.2. Modellvorstellung der Membran

Die Lipide und Proteine der Membran sind nicht starr in ihrem Verbund gefangen, sondern können sich u.a. in der Membranebene bewegen, man spricht von lateraler Bewegung. Die Viskosität der Lipide und Proteine ist mit der von Öl vergleichbar. Die Fluidität wird durch die Temperatur und die Zusammensetzung der Membran beeinflusst. Cholesterin wirkt in eukaryotischen Zellen modulierend, indem es die kristalline Zusammenlagerung der Fettsäuren verhindert, aber gleichzeitig die laterale Bewegung der Lipide und Proteine hemmt. Es kommt in ungefähr gleichen Molekülzahlen wie die Phospholipide in Zellmembranen vor.

4.3.2.3. Aufrechterhaltung des Ionenmilieus in der Zelle

Wie für jede Zelle ist es auch für die Herzmuskelzelle von essenzieller Bedeutung, im Zellinneren ein bestimmtes Ionenmilieu aufrechtzuerhalten. Bereits Sydney Ringer erkannte Ende des 19. Jahrhunderts, dass ein Froschherz mit einer Lösung, die bestimmte Ionen enthält, perfundiert werden muss, um weiter zu schlagen. Ionen sind u.a. für die Ausbildung des Ruhepotentials der Zelle verantwortlich. Darüber hinaus haben Ionen viele weitere Funktionen und sind zum Beispiel auch Bestandteile von Enzymen oder Hormonen.

4.3.2.3.1. Die zelluläre Regulation der Ionenverteilung

Im frühen 20. Jahrhundert (1902) erkannte Julius Bernstein, dass die Membran erregbarer Zellen im Ruhezustand für Kaliumionen durchlässig ist und die Leitfähigkeit für weitere Ionen während der Erregung ansteigt. Im Laufe der Zeit

wurde die Bedeutung weiterer Ionen für das Membranpotential bzw. die Erregung im Organismus erforscht.

Um mit der Umgebung in Kontakt treten zu können, haben sich in der Herzmuskelzelle, wie auch in anderen Zellen, Transportsysteme entwickelt, womit Stoffe über die Zellmembran ausgetauscht werden können. Solche Systeme bestehen für alle Substanzen, die die Zelle zur Ausübung ihrer Funktion aufnehmen bzw. abgeben muss. Dies gilt auch für Ionen, um das physiologische intrazelluläre Ionenmilieu beizubehalten. Die Transportsysteme bestehen aus transmembranären Proteinen.

Für den Transport von Natrium-, Kalium-, Wasserstoff- und Calciumionen existieren ATP-abhängige Pumpen. Hier wird die chemische Energie des ATP genutzt, um diese Ionen entgegen dem Konzentrationsgradienten durch die Membran zu bewegen. Einige Transportsysteme nutzen den Konzentrationsgradienten von Natrium- oder Wasserstoffionen, um andere Ionen oder organische Substanzen auszutauschen. Die Transportsysteme sind essenziell zur Aufrechterhaltung des elektrochemischen Potentials über der Zellmembran. Teilweise arbeiten die Pumpen- und Austausch-Proteine relativ langsam, so dass sie bei der elektromechanischen Kopplung eine untergeordnete Rolle spielen.

Für die Entstehung eines Aktionspotentials zur Fortleitung von Impulsen und Kopplung mit der Kontraktion sind spezielle Ionen-Kanäle der Zellmembran verantwortlich. In der Herzmuskelzelle sind dies hauptsächlich Natrium-, Kalium- und Calcium-Kanäle.

Ionen-Kanäle

Allgemein sind Ionen-Kanäle Proteinstrukturen, die die Zellmembran komplett durchdringen und eine wassergefüllte Pore bilden. An der dem Zellinneren zugewandten Seite sind die Kanalproteine mit Filamenten des Zytoskeletts verbunden und an der Zellaußenseite tragen sie Glycosidketten. Sie sind in nahezu jeder Zelle zu finden. Die Kanäle sind in homologe Untereinheiten gegliedert, die wiederum aus hydrophoben α -Helices und hydrophilen Peptidketten bestehen. Die Helices durchdringen die Membran und die Peptidketten bilden die intra- und extrazellulären Domänen.

Die Weite der Pore ist größer als das entsprechende Ion im Durchmesser. Auf einem kurzen Abschnitt verengt sie sich jedoch auf einen Durchmesser, der nicht viel größer als der des Ions ist. Hier ist der sogenannte Selektivitätsfilter lokalisiert, der je nach Kanaltyp bevorzugt eine Ionenart passieren lässt. Dabei kann neben der Größe des Ions auch eine spezifische Bindung des Ions an der Bindungsstelle des Selektivitätsfilters eine Rolle spielen.

Geöffnet wird ein Ionenkanal durch eine Konformationsänderung des Proteins, wodurch sich ein „Tor“ von der geschlossenen Position in die offene Position bewegt. Jetzt können Ionen entlang ihrem Konzentrationsgefälle in die Zelle ein- oder aus ihr ausströmen.

Die Öffnung wird entweder durch Bindung eines chemischen Effektors (z.B. Neurotransmitters) oder durch die Spannung über der Zellmembran initiiert. Je

nach Steuerungsmechanismus werden die Ionenkanäle in rezeptorgesteuerte Kanäle (receptor-operated channels, ROCs) und potentialgesteuerte Kanäle (depolarisation-operated channels, DOCs; oder auch voltage-operated channels, VOCs genannt) unterteilt. Die Sensoren der DOCs befinden sich in einigen der transmembranären Helices. Sie zeichnen sich durch Peptidstrukturen mit gehäuften positiv geladenen Aminosäuren aus. Eine Änderung des Membranpotentials bewirkt eine Veränderung des elektrischen Feldes innerhalb der Membran und hat dadurch einen Einfluss auf die Ladungen des intramembranär gelegenen Spannungssensors des Kanalproteins. So kann die Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals beeinflusst werden.

Für das Aktionspotential sind in Herzmuskelzellen vorwiegend potentialgesteuerte Ionen-Kanäle verantwortlich (Natrium-Kanal, L-Typ-Calcium-Kanal, T-Typ-Calcium-Kanal, Kalium-Kanäle). Durch sie können in kurzer Zeit genügend Ladungsträger durch die Membran ausgetauscht werden, so dass sich das Potential über der Membran und die elektrischen Feldlinien in ihr gravierend ändern. Während des Aktionspotentials werden verschiedene Kanäle aktiviert und die elektrische Erregung über die Zelle fortgeleitet. Wichtig ist zu erwähnen, dass nicht die Ionen-Konzentrationen in der gesamten Zelle verändert werden, sondern nur die Ionen-Zusammensetzung nahe der Membran. Nur so ist der schnelle Wechsel des Potentials an der Membran möglich.

Natrium-Kalium-Pumpe

Dieses System ist hauptsächlich für die ungleiche Ionenverteilung innerhalb und außerhalb der Zelle und damit für das Ruhemembranpotential und die elektrische Erregbarkeit der Zelle verantwortlich. Hier werden unter ATP-Verbrauch drei Natrium-Ionen aus der Zelle aus- und zwei Kalium-Ionen in sie eingeschleust. Durch die Schaffung des Konzentrationsgefälles von Natrium und Kalium zwischen innen und außen wird auch wesentlich die Calciumelimination beeinflusst, da durch diese Pumpe der Konzentrations-Gradient von Natrium zwischen Zellinnerem und -äußerem, der direkten Einfluss auf die Kapazität des Natrium-Calcium-Austauschers hat, aufrecht erhalten wird.

Natrium-Calcium-Austauscher

Dieser Ionentauscher befördert ein Calciumion aus der Zelle im Austausch gegen drei Natriumionen, die in die Zelle fließen. So verlassen zwei Elementarladungen die Zelle und drei werden hineingebracht. Für den Auswärtstransport des Calciums entgegengesetzt dem Konzentrationsgefälle liefert der Natrium-Einstrom auf Grund des Konzentrationsgradienten die Energie. Da der Transport elektrogen arbeitet, wird er durch das Membranpotential beeinflusst. Außerdem hängt er von den Konzentrationen der an dem Transport beteiligten Ionen ab. Dieser Mechanismus wurde zunächst am Tintenfischaxon nachgewiesen (Baker et al., 1967). Am Herzmuskel hat er wegen seiner großen Kapazität einen entscheidenden Anteil an der raschen

Absenkung des intrazellulären Calciums und der Erschlaffung nach der Kontraktion (Caroni und Carafoli, 1983).

Calcium-Pumpe der Zellmembran

Diese Ionenpumpe ist ATP-abhängig und befördert Calciumionen unter ATP-Verbrauch entgegen dem Konzentrationsgefälle aus der Zelle. Die Kapazität dieser Pumpe für den Transport von Calcium ist wesentlich geringer als die des Na-Ca-Austauschers (Caroni und Carafoli, 1983). Die wesentliche Aufgabe besteht in der Calcium-Elimination in der Diastole des Herzens, also nach dem Aktionspotential. Charakteristisch ist die hohe Affinität zu Calcium, wodurch die intrazelluläre Calcium-Konzentration sehr niedrig (bei ca. 100 nmol/l) gehalten werden kann. Diese Calcium-Pumpe wurde zunächst an der Erythrozytenmembran entdeckt (Schatzmann und Vincenzi, 1967). Dabei zeigte sich, dass die Aktivität von der intrazellulären Magnesium-Konzentration abhängt. An Herzen hat möglicherweise nicht nur das intrazelluläre sondern auch das extrazelluläre Magnesium einen Einfluss auf die Funktion dieser Pumpe (Vierling und Stampfl, 1994).

Ionenregulation des Sarkoplasmatischen Retikulums

Das sarkoplasmatische Retikulum (SR) ist der wichtigste intrazelluläre Calcium-Speicher der Herzmuskelzellen. Wenn die Zelle erregt wird, kann er entleert und der kontraktile Apparat aktiviert werden. Die Erregung wird durch das tubuläre System der Zellmembran (T-System) bei einem Aktionspotential an das SR weitergegeben.

In der Membran des SR befindet sich eine weitere ATP-abhängige Calcium-Pumpe, die das ausgeschüttete Calcium wieder in das Innere des SR bringt. Die Aktivität dieses Pumpenproteins wird durch den second messenger cAMP gesteigert. Dies geschieht durch die Phosphorylierung des Regulator-Proteins Phospholamban, wodurch eine Hemmwirkung des Phospholamban auf die Calcium-Pumpe reduziert wird.

Regulationsmechanismen der Mitochondrien

In den Mitochondrien sind etwa 20 % des intrazellulären Calciums gespeichert. Sie können aktiv aus dem Zytoplasma Calcium aufnehmen. Dieser Transport ist jedoch sehr langsam und beeinflusst die Kontraktion der Herzmuskelzelle nur gering. Hier dient Calcium hauptsächlich der Regulation von intramitochondrialen Enzymen. Die Mitochondrien können aber bei Calcium-Überladung durch ihre Fähigkeit zur Calciumspeicherung als Puffer für die Aufrechterhaltung der intrazellulären Calcium-Homöostase dienen.

4.3.2.4. Der elektrochemische Gradient über der Zellmembran

Da die Lipidmembran die verschiedenen Ionen des Intra- und Extrazellulärraums effektiv voneinander trennt und die oben beschriebenen Mechanismen stark unterschiedliche Ionen-Konzentrationen zwischen Zellinnerem und -äußerem hervorrufen, liegt über der Zellmembran ein elektrochemisches Potential an, das durch die Nernst'sche Gleichung beschrieben werden kann.

Für verschiedene Konzentrationen eines Ions lautet diese:

$$E_{ion} = \frac{R \cdot T}{Z \cdot F} \cdot \ln \frac{[Ion]_{au\beta en}}{[Ion]_{innen}} .$$

Dabei ist R die allgemeine Gaskonstante, T die Temperatur in Kelvin, Z die Ladung des Ions und F die Faraday'sche Konstante. Die Attribute der Ionen Konzentrationen „innen“ und „außen“ beziehen sich auf geschlossene Membranen wie die Zellmembran.

In allen Zellen, wie auch in Herzmuskelzellen, liegen jedoch auf beiden Seiten der Membran verschiedene Konzentrationen mehrerer Ionenarten vor. Für das Potential gilt dann näherungsweise:

$$E_m = \frac{R \cdot T}{F} \cdot \ln \frac{P_K [K]_{au\beta en} \cdot P_{Na} [Na]_{au\beta en} \cdot P_{Cl} [Cl]_{innen}}{P_K [K]_{innen} \cdot P_{Na} [Na]_{innen} \cdot P_{Cl} [Cl]_{au\beta en}}$$

P hier ist die Permeabilität für das jeweilige Ion durch die Membran:

$$P = \frac{\mu \cdot R \cdot T}{d \cdot F} .$$

Hier steht d für die Membrandicke und μ bezeichnet die Beweglichkeit des Ions durch die Membran. μ kann also durch Änderung der Leitfähigkeit von Ionenkanälen der Zellmembran variieren. Das Membranpotential E_m kann somit berechnet werden, wenn bei vorherrschendem Ruhemembranpotential Ionen die Zellmembran passieren können, was bei der Herzmuskelzelle im physiologischen Milieu zutrifft. Hier sind in Ruhe hauptsächlich Kalium-Kanäle permanent geöffnet, woraus sich das Membranpotential von -70 bis -90 mV erklären lässt. In anderen Zelltypen erstreckt sich das Spektrum des Ruhemembranpotentials von -40 bis -120 mV (nach Schmidt und Thews, 1990). Aus der obigen Gleichung folgt, dass zur Berechnung von E_m neben der Konzentration von Kaliumionen nur die Konzentrationen von Natrium-, und Chloridionen herangezogen werden. Diese Vereinfachung ist erlaubt, da diese Ionen den weitaus größten Teil der gelösten geladenen Teilchen der intra- und extrazellulären Lösung darstellen. Die weiteren in Tabelle 1 aufgelisteten Ionen haben unter physiologischen Bedingungen keinen nennenswerten Einfluss auf die Potentialdifferenz zwischen intra- und extrazellulärem Milieu der Zelle. Allerdings besitzen die zwei-wertigen Ionen wie Magnesium und Calcium durch

die Beeinflussung eines Oberflächenpotentials an der Zellmembran einen gravierenden Einfluss auf das Verhalten von Spannungssensoren der Ionen-Kanäle in der Membran.

INTRAZELLULÄR (mmol/l)		EXTRAZELLULÄR (mmol/l)	
Na ⁺	5 – 7	Na ⁺	145
K ⁺	155	K ⁺	4
Ca ²⁺	0,0001 – 0,001	Ca ²⁺	1,2
Cl ⁻	4	Andere Kationen	5
HCO ₃ ⁻	8	Cl ⁻	120
Mg ²⁺	0,5 – 0,75	Mg ²⁺	0,5 – 1
A ⁻	155	HCO ₃ ⁻	27

Tabelle 1

Intra- und extrazelluläre Konzentrationen an freien, d.h. nicht gebundenen Ionen einer Muskelzelle eines Warmblüters. A⁻ steht für große intrazelluläre Anionen, wie zum Beispiel geladene Proteine (modifiziert nach Schmidt und Thews, 1990).

Ionen-Kanäle der Herzmuskelzelle

An der Auslösung des Aktionspotentials und der Kontraktion sind am Herzen maßgeblich die potentialabhängigen Ionen-Kanäle (DOC) des Sarkolemms beteiligt.

Im folgenden Teil dieser Arbeit sollen die wichtigsten am Aktionspotential beteiligten Kanäle näher besprochen werden:

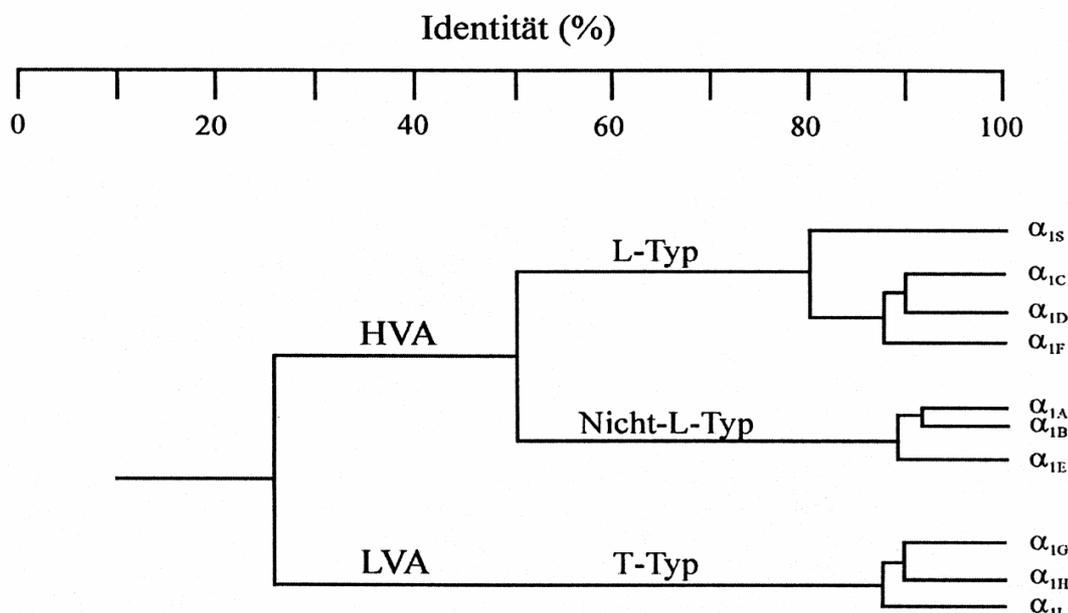


Abbildung 13:

Stammbaum der Potential-abhängigen Calcium-Kanäle. Hier werden die Unterteilungen der Kanäle in die Untergruppen bis zur α_1 -Untereinheit gezeigt (nach Lacinova und Hofmann, 2001).

Potentialabhängige Calcium-Kanäle

Calcium-Kanäle erfüllen im Herzen vielfältige Aufgaben. Eine davon ist die Mitwirkung an der Kontraktion des Vorhof- und Kammermyokards. In erkrankten Herzen können sie an der Entstehung von ektopter Erregungsbildung und von Rhythmusstörungen beteiligt sein.

Diese Kanäle werden auch in anderen Geweben gefunden, wo sie ebenfalls wichtige Aufgaben erfüllen. Außer der Steuerung der Kontraktion sind sie beispielsweise verantwortlich für die Transmitterfreisetzung an Neuronen und der Initiierung der Sekretion von Drüsen.

Eine grobe Einteilung der Calcium-Kanäle erfolgt in Abhängigkeit ihrer Reaktion auf das Membranpotential. Die Kanäle, die bereits durch geringe Depolarisation aktiviert werden, nennt man „low-voltage activated (LVA) channels“ und die Kanäle, die erst durch stärkere Depolarisation aktiviert werden, bezeichnet man als „high-voltage activated (HVA) channels“.

Die HVA-Kanäle wiederum werden in zwei Klassen unterteilt: Einmal in die der L-Typ Calcium-Kanäle und die Klasse der Nicht-L-Typ Calcium-Kanäle.

Charakterisiert werden die verschiedenen Kanalproteine vor allem anhand der α_1 -Untereinheit, wovon bis heute zehn verschiedene Formen mittels cDNA-Klonierung identifiziert wurden. Elektrophysiologisch lassen sich in der Membran der Herzmuskelzelle zwei Typen von Calcium-Kanälen identifizieren. Dies gelingt durch Betrachtung der unterschiedlichen Kinetiken der Aktivierung und Inaktivierung sowie der verschiedenen Potentialabhängigkeiten und Einzelkanalleitfähigkeiten:

Der L-Typ Calcium-Kanal

Der L-Typ Calcium-Kanal mit der α_{1C} -Untereinheit ist der am stärksten exprimierte Calcium-Kanal im Herzen. Er ist maßgeblich an der elektromechanischen Kopplung beteiligt: Einerseits ist dieser Kanal mitverantwortlich für die Ausbildung des für den Herzmuskel charakteristischen Plateaus des Aktionspotentials, andererseits stellt er einen Teil des für die Kontraktionsauslösung wichtigen intrazellulären Calciums zur Verfügung. An dieser Stelle soll genauer auf den Aufbau und die Funktion eingegangen werden, da die Untersuchung der Strom-Spannungs-Beziehungen für diese Kanäle zentraler Bestandteil dieser Arbeit ist.

L steht für „long lasting“ oder „large conductance“, was bedeutet, dass der Strom durch diese Kanäle relativ lange (einige hundert ms) anhält, und dass wegen der relativ hohen Leitfähigkeit dieser Kanäle eine große Ionenmenge ins Zellinnere strömen kann.

Da die Potential-Schwelle zur Auslösung eines makroskopischen, d.h. im 100 pA-Bereich liegenden Calcium-Stroms sich an einer Myokardzelle zwischen -40 und -30 mV befindet, gehören sie zu den HVA-Kanälen (high-voltage activated channels). Unter physiologischen Bedingungen kann ein maximaler Calcium-Strom am Kardiomyozyten nach Depolarisation auf 0 bis $+5$ mV ausgelöst werden.

Die Kanäle inaktivieren während der Depolarisation spontan, wodurch die Zelle vor Calciumüberladung geschützt wird.

Diese Kanäle können pharmakologisch durch drei Typen von organischen Calcium-Kanal-Blockern blockiert werden, nämlich durch Dihydropyridine (DHP) wie zum Beispiel Nifedipin, Phenylalkylamine (PAA) wie zum Beispiel Verapamil und Benzothiazepine (BTZ) wie beispielsweise Diltiazem.

Neben Calcium können noch einige andere zweiwertige Ionen wie z.B. Barium und Strontium den Kanal passieren (Katzka et al., 1992).

Komponenten des L-Typ Calcium-Kanals

Der L-Typ Calcium-Kanal setzt sich aus der α_1 -Untereinheit, die aus vier homologen Domänen (repeats) besteht, einer $\alpha_2\delta$ -, einer β - und einer γ -Untereinheit zusammen.

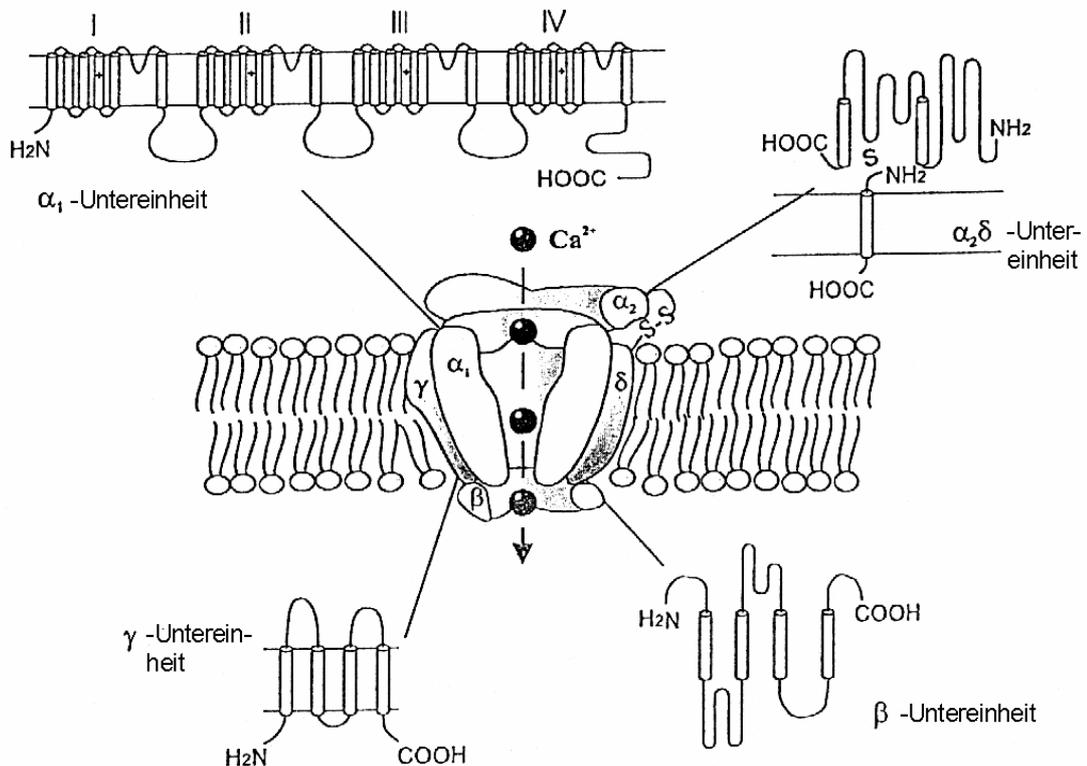


Abbildung 14:

Schematische Darstellung eines L-Typ Calcium-Kanals mit den einzelnen Untereinheiten (nach Lacinova und Hofmann, 2001).

Die α_1 -Untereinheit

Die vier Repeats der α_1 -Untereinheiten bilden die Pore und beinhalten unter anderem auch den Selektivitätsfilter und den intramembranären Spannungssensor. Sie verleihen dem Kanal seine wesentlichen charakteristischen Merkmale. Außerdem tragen die α_1 -Untereinheiten die Bindungsstellen für die Calcium-Kanal-Blocker.

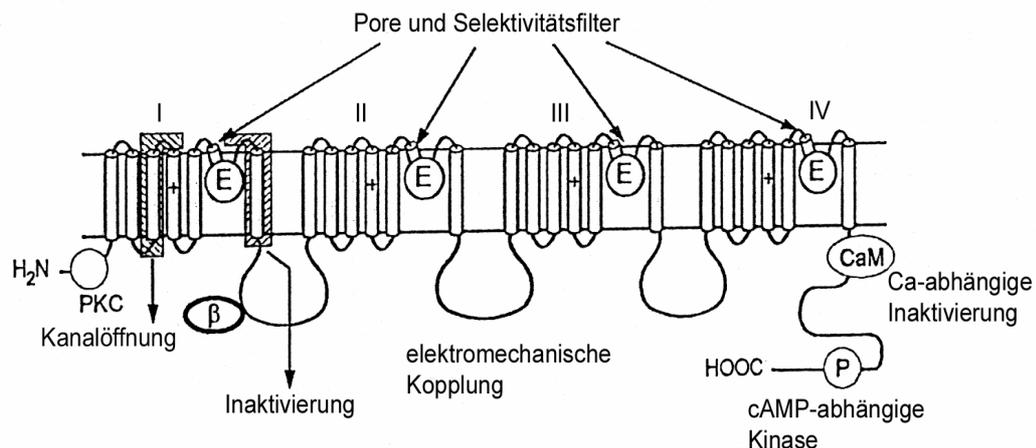


Abbildung 15:

Schematische Darstellung einer α_1 -Untereinheit eines L-Typ Calcium-Kanals. Die römischen Ziffern I bis IV bezeichnen die vier homologen Domänen. Die parallel angeordneten Zylinder zeigen die Lage der transmembranären Segmente (S1 bis S6) einer jeden Domäne. Mit eingezeichnet sind einige Stellen des Kanalproteins, denen bestimmte Aufgaben zugewiesen werden können. Die Einstülpungen zwischen dem Repeat S5 und S6 mit den Glutaminsäureresten (E) bilden den Selektivitätsfilter (nach Lacinova und Hofmann, 2001).

Das transmembranäre Segment S4 eines jeden α_1 -Untereinheit-Repeats beinhaltet fünf oder sechs positiv geladene Aminosäuren (Arginin oder Lysin), die auf das Membranpotential reagieren: Bei positiven Potentialen bewegen sie sich nach außen, was die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals erhöht.

Die Selektivität für Calciumionen wird durch die Schleifen (loops) zwischen den Segmenten S5 und S6, die eine nicht-transmembranäre α -Helix bilden, gewährleistet. Sie ragen in das Innere der gebildeten Pore hinein und bilden die engste Stelle, den Selektivitätsfilter. Die Selektivität für Calciumionen wird durch vier Glutaminsäurereste gewährleistet, die eine hochaffine Bindungsstelle für Calcium im Inneren der Pore bilden (siehe Abbildung 15; Lacinova und Hofmann, 2001).

Die β -Untereinheit

Die β -Untereinheit befindet sich auf der Zellinnenseite (s. Abbildung 14) und moduliert zahlreiche Eigenschaften des Calcium-Kanals wie die Potentialabhängigkeit, die Aktivierungs- und Inaktivierungskinetik sowie die Größe des Calcium-Stroms. Diese modulatorische Eigenschaft beruht auf der entsprechenden

quaternären Struktur des Proteinkomplexes und der Interaktion der β - mit der α_1 -Untereinheit. Im Herzen wird am L-Typ Calcium-Kanal ausschließlich die β_{2a} -Untereinheit gefunden.

Die $\alpha_2\delta$ -Untereinheit

Die $\alpha_2\delta$ -Untereinheit besteht aus zwei durch Disulfidbrücken verbundenen Proteinuntereinheiten, nämlich aus der α_2 - und der δ -Untereinheit. Die $\alpha_2\delta$ -Untereinheit ist verantwortlich für eine Verschiebung der Potentialabhängigkeit der Kanalöffnung zu positiveren Potentialen, einer Beschleunigung der Aktivierung und Inaktivierung und einer Beeinflussung der Größe des Ionenstroms.

Die γ -Untereinheit

Es ist noch nicht geklärt, ob eine bzw. welche γ -Untereinheit am Aufbau des L-Typ Calcium-Kanals des Herzens beteiligt ist. An anderen Kanälen mit einer γ -Untereinheit wirkt diese moderierend auf die Inaktivierung des Kanals.

Mechanismen und Möglichkeiten der Regulation des L-Typ Calcium-Kanals

Damit das Herz als Organ im menschlichen Organismus seine Aufgabe erfüllen kann, muss seine Funktion geregelt ablaufen. So können auch die für die Kontraktion wichtigen L-Typ Calcium-Kanäle der Herzmuskelzelle durch mehrere Mechanismen bzw. Substanzen gesteuert werden.

Regulation durch das Membranpotential

Bei den L-Typ Calcium-Kanälen handelt es sich um potentialabhängige Kanäle, die zusammen mit potentialabhängigen Kalium- und Natrium-Kanälen das Aktionspotential bestimmen. Sie gehören zu den sogenannten S4-Kanälen, was bedeutet, dass sie in ihren S4-Segmenten eines jeden Repeats der α_1 -Untereinheit den Spannungssensor tragen (Cha et al., 1999).

Die Inaktivierung des Calciumstroms gliedert sich in eine schnelle und eine langsame Komponente. Die Geschwindigkeit der Inaktivierung wird durch die durchtretenden Calciumionen und das Membranpotential beeinflusst.

Calciumabhängige Inaktivierung

Dieser Mechanismus verhindert die Überladung der Zelle mit Calcium und kann als Rückkopplungsmechanismus gesehen werden. So können bei erhöhter Calcium-Konzentration im Zellinneren weniger Calciumionen in die Zelle gelangen.

Beeinflussung der Calcium-Kanäle durch Agonisten und Antagonisten

Wie bereits erwähnt, ist der L-Typ Calcium-Kanal des Herzens Angriffspunkt mehrerer pharmakologisch genutzter Substanzen. Die Interaktion dieser Substanzen findet an den α_1 -Untereinheiten statt.

Hormonelle Regulation der Calcium-Kanäle am Herzen

Katecholamine wie zum Beispiel Noradrenalin initiieren eine cAMP-abhängige Phosphorylierung der Kanalproteine, was eine Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit der Calcium-Kanäle während der Depolarisation zur Folge hat. Der Ionenstrom kann so um das Drei- bis Siebenfach gesteigert werden (Lacina und Hofmann, 2001). Dann kann bei einer Depolarisation mehr Calcium in die Zelle gelangen und eine stärkere Kontraktion hervorgerufen werden. Neben dieser Modulation des L-Typ Calcium-Kanals spielt für die positiv inotrope Wirkung von Katecholaminen auch noch eine verstärkte Speicherung und Freisetzung von Calcium aus dem SR eine Rolle.

Ein weiterer wichtiger Weg der hormonellen Steuerung der Herzaktion geht über die Proteinkinase C (PKC), die vermutlich ebenfalls die Offenwahrscheinlichkeit von L-Typ Calcium-Kanälen steigern kann.

Der T-Typ Calcium-Kanal

Dieser Kanal, der auch zu den S4-Kanälen zählt, wird ebenfalls im Herzen exprimiert und dort vor allem in den Vorhöfen. T-Typ Calcium-Kanäle leisten ihren Beitrag bei der Generation der Aktionspotentiale im Sinusknoten und der Fortleitung des atrioventrikulären Aktionspotentials. Der Strom durch einen einzelnen T-Typ Calcium-Kanal ist ungefähr dreimal kleiner als der durch einen L-Typ Kanal. Der transiente Charakter des Stroms (T-Typ) beruht auf der raschen Inaktivierung, die sich nicht potentialabhängig verhält.

Die Schwelle zur Auslösung eines Calcium-Stroms durch diese Kanäle liegt bei etwa -50 mV. Sie zählen zu den LVA-Kanälen (low-voltage activated channels). Der maximale Strom wird bei einem Potential von etwa -20 mV erreicht.

Es wurden drei α_1 -Untereinheiten identifiziert, die einen T-Typ Strom zulassen (α_{1G} , α_{1H} und α_{1I} ; Cribbs et al., 1998; Klugbauer et al., 1999). Die Zusammensetzung der Untereinheiten ist noch unklar. Spezifische Blocker für den T-Typ Calcium-Kanal sind noch nicht bekannt. Allerdings können die Calcium-Kanal-Blocker Mibefradil und Kurtoxin diese Kanäle hemmen.

Natrium-Kanäle

Natrium-Kanäle sind im Organismus weit verbreitet. Ihre vornehmliche Aufgabe ist es, in erregbaren Geweben bei der Auslösung von Aktionspotentialen und deren Fortleitung mitzuwirken. Sie wurden wegen ihres zahlreichen Vorkommens und ihres großen Stroms als erste potentialabhängige Ionen-Kanäle beschrieben (Hodgkin und Huxley, 1952). Sie sind unter anderem in Nerven, im Skelettmuskel, im Herzmuskel und anderen Geweben anzutreffen.

Der Aufbau ist weitgehend analog dem des L-Typ Calcium-Kanals: Die Pore wird von der α_1 -Untereinheit gebildet. Die α_1 -Untereinheit besteht auch aus vier homologen Domänen (I-IV) mit sechs transmembranären Segmenten (S1-S6), wovon S4 den Spannungssensor mit positiv geladenen Aminosäuren trägt. Die

Pore mit dem Selektivitätsfilter formen wiederum die Schleifen zwischen den Segmenten S5 und S6.

In der Herzmuskelzelle wird unter physiologischen Bedingungen der Natrium-Strom ab einer Schwelle von etwa -60 mV aktiviert und im Vergleich zu den L-Typ-Calcium-Kanälen schnell (innerhalb einiger ms) wieder inaktiviert (Hille, 2001).

Mit Ausnahme der Sinusknoten- und AV-Knotenregion ist der Natrium-Kanal von entscheidender Bedeutung für die Fortleitung der Erregung am Herzen. Er ist verantwortlich für die rasche Depolarisation (Phase 0 des Aktionspotentials). Der Natrium-Kanal ist Angriffspunkt vieler antiarrhythmisch wirksamer Medikamente.

Kalium-Kanäle

Die Kalium-Kanäle lassen sich in spannungsabhängige und rezeptorgesteuerte Kanäle einteilen.

Zu den spannungsabhängigen Kalium-Kanälen der Herzmuskelzellen zählt man unter anderem den transienten Auswärts-Kalium-Kanal (transient outward potassium channel, I_{to}) und den verzögerten Gleichrichter-Kalium-Kanal (delayed rectifier potassium channel, I_K). Ebenso wie die bisher besprochenen potentialabhängigen Ionen-Kanäle sind die potentialabhängigen Kalium-Kanäle S4-Kanäle mit dem Spannungssensor in Form von positiv geladenen Aminosäuren im Segment S4.

Der I_{to} -Strom ist maßgeblich an der Phase 1 des Aktionspotentials und der frühen Phase 2 beteiligt. Er bestimmt das Ausmaß der frühen Repolarisation in Phase 1 (Abbildung 16).

Der I_K -Kanal hat die besondere Eigenschaft, dass er nach einer Änderung der Spannung über der Membran erst mit einer zeitlichen Verzögerung während der Phase 2 aktiviert wird. Er trägt einerseits zu deren Ausbildung bei und ist andererseits mitverantwortlich für die Rückkehr des Membranpotentials zum Ruhepotential (frühe Phase 3). Dieser Strom kann noch in drei Komponenten unterteilt werden: I_{Kur} (ultra rapid), I_{Kr} (rapid) und I_{Ks}

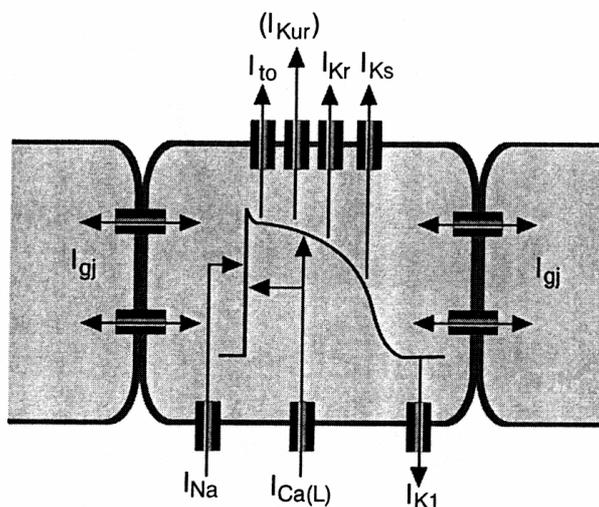


Abbildung 16:

Vereinfachte graphische Zuordnung der Ionenströme einer Myokard-Zelle zum Aktionspotential (AP). I_{gj} steht für den Strom durch gap junction-Kanäle, die der Weiterleitung des AP von Zelle zu Zelle dienen. I_{Kur} steht in Klammern, da dieser Strom in menschlichen Zellen des ventrikulären Arbeitsmyokards bis jetzt nicht nachgewiesen werden konnte (aus Strauss et al., 2001).

(slow), die den zeitlichen Ablauf des verzögerten Gleichrichter-Stroms widerspiegeln. Im menschlichen Arbeitsmyokard der Ventrikel wurde I_{Kur} noch nicht nachgewiesen, wohl aber in den Vorhöfen (Strauss et al., 2001).

Der Einwärts-Gleichrichter-Kalium-Kanal (inward rectifier potassium channel, I_{K1}) wird primär nicht durch das Membranpotential gesteuert, sondern mittels intrazellulärer Substanzen wie Magnesiumionen und Polyamine. Dieser Kanal bewirkt eine relativ hohe Leitfähigkeit der Membran für Kalium bei Potentialen, die im Bereich des Ruhemembranpotentials liegen. Mit zunehmender Depolarisation nimmt die Leitfähigkeit ab. Dies beruht auf der Blockade des Kanals durch intrazelluläres Magnesium beziehungsweise Polyamine, wodurch die Einwärts-Gleichrichter-Eigenschaften erklärt werden. Der I_{K1} -Kanal leistet seinen Beitrag zur Rückkehr des Potentials zum Ruhemembranpotential (Phase 4) und zur Aufrechterhaltung dieses Potentials. Diese Kanäle unterscheiden sich auch im Aufbau von den potentialabhängigen Kanälen. (Tanemoto et al., 2001). Bestimmte I_{K1} -Kanäle können durch Acetylcholin (K_{ACh} -Kanal), durch ATP (K_{ATP} -Kanal) und durch Natrium (K_{Na} -Kanal) aktiviert werden. Dies erlaubt eine Modulation des Ruhemembranpotentials und der Dauer des Aktionspotentials.

4.3.2.4.1. Wichtige Kenngrößen von Ionen-Kanälen

Um eine geordnete Zusammenarbeit an der Zelle und im Organismus zu gewährleisten, unterliegen die Ionenkanäle verschiedenen Gesetzmäßigkeiten.

Aktivierung von potentialabhängigen Ionen-Kanälen

Diese Ionen-Kanäle der Herzmuskelzelle können durch eine Änderung des Membranpotentials über eine bestimmte Schwelle ihre Leitfähigkeit verändern. Öffnen gleichzeitig viele Kanäle der Zellmembran, wie es beispielsweise beim Aktionspotential der Fall ist, so fließt ein Strom, der sich aus der Summe der Einzelströme der Kanäle zusammensetzt. Nach Entwicklung der Patch-Clamp-Technik wurde es möglich, den Ionen-Strom einzelner Kanäle zu messen. Dabei wurde erkannt, dass ein einzelner Kanal nach dem Alles-oder-Nichts-Prinzip sich öffnet oder schließt. Das bedeutet, dass es im Allgemeinen nur einen offenen oder geschlossenen Zustand des Kanals gibt. Durch eine Potentialänderung wird die Wahrscheinlichkeit des Offenzustands verändert.

Zustandsformen potentialabhängiger Ionen-Kanäle

Summiert man die Ströme mehrerer Einzelkanalmessungen und bildet sie in einer Strom-Zeit-Kurve, wie in Abbildung 17 ab, so sieht man trotz anhaltendem Depolarisationspuls bei einigen Kanälen, wie Natrium- und Calcium-Kanälen, dass nach anfänglicher Zunahme die Öffnungswahrscheinlichkeit wieder abnimmt. Man spricht von der Inaktivierung des Stroms. Der Ionen-Kanal durchläuft drei Zustände: „Geschlossen und aktivierbar“, „offen“ und „geschlossen inaktiviert“. Bei den potentialabhängigen Kanälen wird durch Depolarisation der Kanal häufiger in den „Offen-Zustand“ versetzt, d.h. die

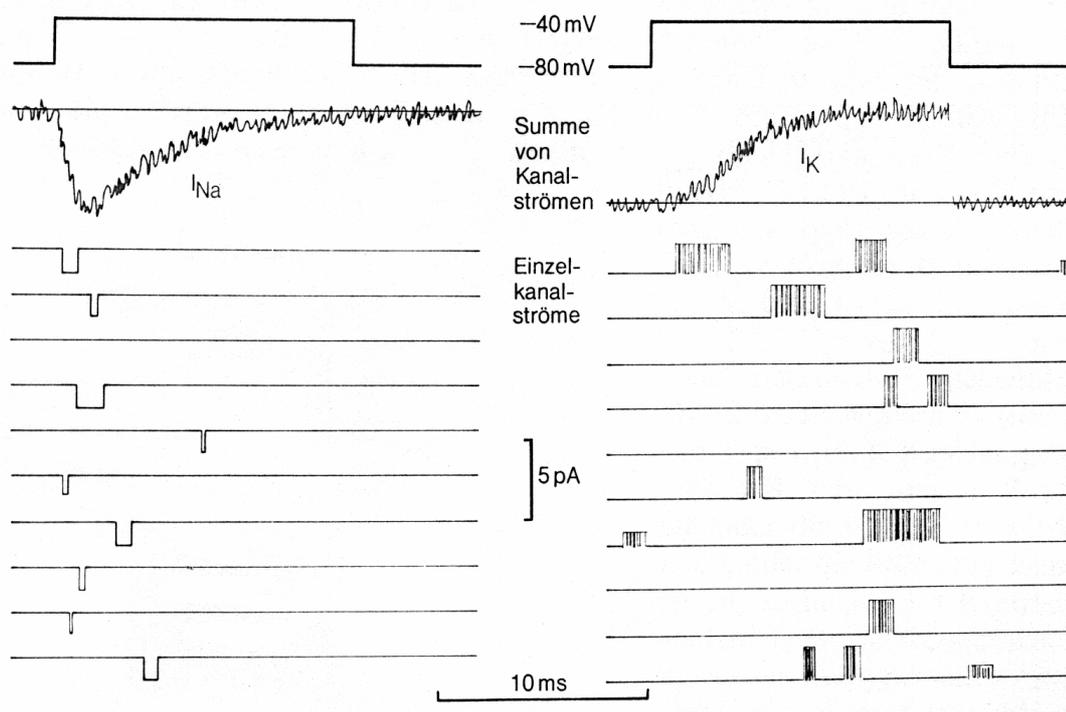


Abbildung 17:

Ströme durch Natrium- (links) und Kalium-Kanäle (rechts). Ein „Membranfleck“ der Zelle wird zur Einzelkanalmessung für 14 ms von -80 auf -40 mV mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik depolarisiert (Spannungsprotokoll ganz oben). Dabei werden die Einzelströme gemessen und summiert. So erhält man die Summenstromkurven I_{Na} bzw. I_K (unterhalb des Spannungsprotokolls gezeichnet; aus Dudel, 1990).

Offenwahrscheinlichkeit nimmt zu. Danach geht er in den inaktiven Zustand über, was sich in einer Abnahme der Offenwahrscheinlichkeit trotz weiter bestehender Depolarisation widerspiegelt. Um nochmals aktiviert werden zu können, muss eine Repolarisation erfolgen, die es dem Kanal ermöglicht in den „Geschlossen- und Aktivierbar-Zustand“ zurückzukehren. Zwischen diesen drei Zustandsformen besteht ein Gleichgewicht, das je nach Potential in die eine oder andere Richtung verschoben wird.

Dies ist nur ein sehr allgemeines Modell der Kanalaktivitäten, denn wie man an den Messungen am Kalium-Kanal sieht, scheint hier der „geschlossen inaktive“ Zustand nicht zu existieren, sondern eher zwei verschiedene „geschlossene“ Zustände, da der Kanal nach Aktivierung mehrere

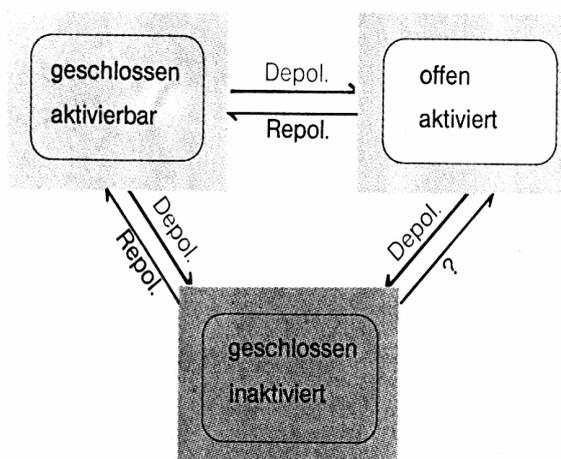


Abbildung 18:

Vereinfachtes Schema der Zustände von Ionenkanälen (aus Dudel, 1990).

Salven von Einzelströmen abgibt (siehe hierzu die Abbildungen 17 und 18).

Die Strom-Spannungs-Beziehung von Ionen-Kanälen

Um das Verhalten potentialabhängiger Ionen-Kanäle bei verschiedenen Potentialen beurteilen zu können, kann man den Strom, der durch Ionen-Kanäle fließt, in Beziehung zum jeweiligen Potential, bei dem dieser Strom gemessen wird, setzen. Graphisch spiegelt dies die Strom-Spannungs-Beziehung wider. Hier werden in einem Koordinatensystem mit dem Potential auf der Abszisse und dem gemessenen Strom auf der Ordinate die Werte aufgetragen.

Den Verlauf der Strom-Kurve ($I_S(E)$) bestimmen die Leitfähigkeit des Kanals für das Ion S (g_S), das elektrische Potential über der Membran (E) und das elektrochemische Potential (E_S) für das Ion S.

$$I_S = g_S \cdot (E - E_S)$$

Die treibende elektrische Kraft setzt sich aus der Differenz des elektrischen Potentials zwischen Innen- und Außenseite der Zellmembran (E) und des elektrochemischen Konzentrationsgradienten des jeweiligen Ions (E_S) zusammen.

Die Leitfähigkeit der Membran für das entsprechende Ion S ist nicht immer gleich sondern ändert sich abhängig von der potentialabhängigen Aktivierung ent-

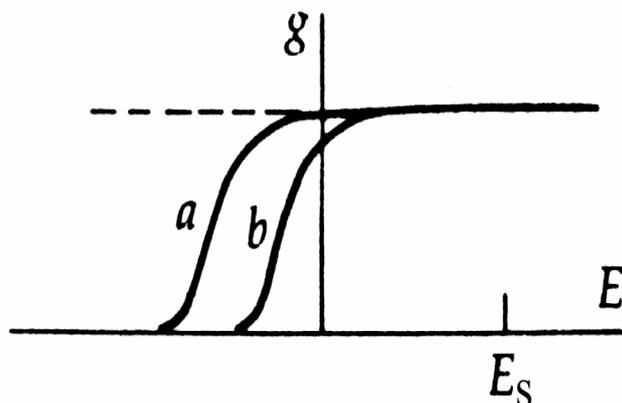


Abbildung 19:

Verhalten der Leitfähigkeit g von Ionen-Kanälen mit zwei verschiedenen Aktivierungsschwellen eines Kanals (a und b) in Abhängigkeit des Potentials E (nach Hille, 2001).

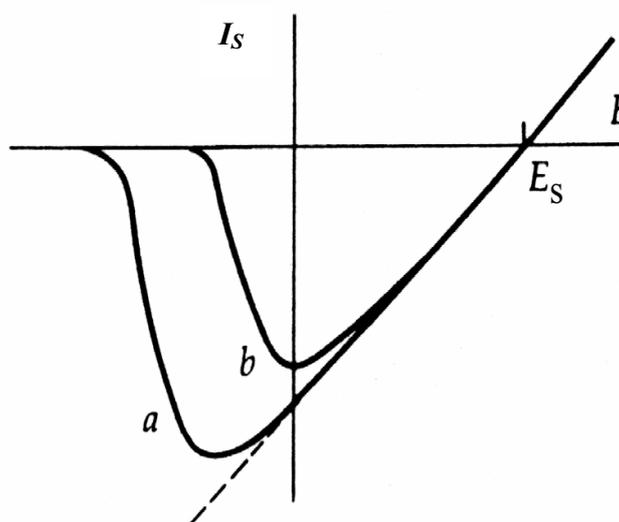


Abbildung 20:

Strom-Spannungs-Beziehungen unter Berücksichtigung potentialabhängiger Veränderung der Leitfähigkeiten bei zwei Aktivierungsschwellen (a und b). Der elektrochemische Gradient E_S bleibt gleich (nach Hille, 2001).

sprechender Ionen-Kanäle. Darum ist die Kurve $I_S(E)$ keine Gerade. Abbildung 19 zeigt graphisch das Verhalten der Leitfähigkeit von Ionen-Kanälen in Abhängigkeit vom Potential. Daraus wird ersichtlich, dass sich bei höheren Potentialen die Leitfähigkeit der Membran einem Maximalwert g_{Smax} annähert und sich nicht mehr verändert. Hier sind die Kanäle der Membran maximal aktiviert und der Graph der Strom-Spannungs-Beziehung nähert sich einer Gerade mit der Steigung g_{Smax} an (Abbildung 20). Die Gerade ergibt sich aus dem Zusammenwirken des Potentials über der Zellmembran E und dem elektrochemischen Gradienten E_S für das entsprechende Ion S . Bei niedrigen Potentialen unterhalb der Aktivierungsschwelle ist der Wert der Leitfähigkeit fast 0, das heißt hier ist der Stromfluss fast 0.

In diesem Modell schneidet die Stromkurve $I_S(E)$ die Abszisse bei $E = E_S$ und setzt sich dann, wie in Abbildung 20, der Gerade $I_S = g_{Smax} \cdot (E - E_S)$ folgend ins Positive fort. Diese Beobachtung konnte aber bei den untersuchten Calcium-Kanälen nicht gemacht werden, da sie wohl eine gewisse Gleichrichter-Funktion innehaben und deshalb nur einen Stromfluss bevorzugt in die Einwärtsrichtung zulassen.

4.3.3. Charakterisierung einiger für die elektromechanische Kopplung am Herzen wichtiger Ionen

Im menschlichen Organismus treten eine Vielzahl verschiedener Ionen in Erscheinung, die spezielle Aufgaben erfüllen. Für den Ablauf und die Steuerung der Kontraktion speziell am Herzen reduziert sich die Zahl hauptsächlich auf Natrium-, Kalium-, Calcium- und Magnesiumionen. Sie sollen kurz charakterisiert werden.

4.3.3.1. Natrium

Natrium ist außerhalb der Zelle in hoher (ca. 145 mmol/l) und innerhalb in deutlich geringerer Konzentration (ca. 7 mmol/l) anzutreffen. Durchschnittlich werden von einem erwachsenen Menschen täglich etwa drei bis vier Gramm (ca. 130 bis 175 mmol) Natrium aufgenommen. Der Natrium-Einstrom zu Beginn des Aktionspotentials ist verantwortlich für die rasche Depolarisation der Zelle und die Weiterleitung der Erregung. Auch ist der Natriumgradient treibende Kraft für eine Reihe von Transportmechanismen durch die Zellmembran hindurch. Beispielsweise spielt dieser Gradient eine entscheidende Rolle bei der Calcium-Elimination aus der Zelle durch den Natrium-Calcium-Austauscher. Hierbei kann Natrium seinem Konzentrationsgefälle entsprechend in die Zelle fließen. Die freiwerdende Energie wird vom Transportprotein verwendet, um Calciumionen entgegen deren Gradienten aus der Zelle hinaus zu befördern. Der Regeneration des Natrium-Gradienten dient die Natrium-Kalium-ATPase.

Bei der Regulation der extrazellulären Natriummenge spielt das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) eine wichtige Rolle. Natrium trägt auch

essentiell zur Volumenkontrolle der extrazellulären Flüssigkeit bei (Mutschler, 1996).

4.3.3.2. Kalium

Kalium ist das vorherrschende Ion des Zellinneren (ca. 155 mmol/l) während im Extrazellulärraum deutlich niedrigere Konzentrationen (ca. 4 mmol/l) vorhanden sind. Die tägliche Aufnahme beträgt beim Erwachsenen etwa zwei bis vier Gramm (50-100 mmol). Kalium ist von elementarer Bedeutung für die Ausbildung des Ruhemembranpotentials. Es wird von der Natrium-Kalium-ATPase unter ATP-Verbrauch in die Zelle hinein gepumpt. Die Zellmembran ist auch im Ruhezustand für Kalium-Ionen gut leitend. Kalium-Ionen diffundieren nun solange durch die Zellmembran bis der elektrochemische Gradient dem Konzentrationsgradienten entspricht. Die Ausbildung dieses Diffusionspotentials ist eine elementare Voraussetzung für die Erregbarkeit der Zelle. Den extrazellulären Kaliumhaushalt regelt das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System über die renale Ausscheidung. Das Verhältnis von intra- zu extrazellulärem Kalium kann durch Insulin und Änderung des pH-Werts beeinflusst werden. Insulin fördert die Aufnahme von Glucose in die Zelle. Dabei wird einerseits im Symport mit Glucose Natrium in die Zelle eingeschleust und andererseits steht auf Grund der erhöhten Glucosezufuhr vermehrt ATP zur Verfügung, was die Aktivität der Natrium-Kalium-ATPase steigert und so die Verschiebung von Kalium ins Zellinnere fördert. Bei steigendem pH im Extrazellulärraum werden zur Aufrechterhaltung der Homöostase Protonen aus der Zelle aus- und Kaliumionen in sie eingeschleust.

4.3.3.3. Calcium

Das Erdalkalimetall Calcium kommt im menschlichen Körper in großer Menge vor und erfüllt eine Vielfalt an verschiedenen Aufgaben. Der größte Teil ist in der Knochensubstanz in Form von Calcium-Apatit (Calcium-Phosphat-Komplexen) gebunden und trägt so zur Stabilität des Skelettsystems bei. Der Bedarf an Calcium beläuft sich beim Erwachsenen auf ca. 0,8 g (20 mmol) pro Tag.

Die extrazelluläre Flüssigkeit enthält durchschnittlich 2,4 mmol/l Calcium. Davon sind ungefähr 50 % komplex an Proteine gebunden und die restlichen 50 % (1,2 mmol/l) befinden sich in freier Lösung als Ca^{2+} -Ionen. Dieser Teil steht für die Steuerung von Vorgängen wie Muskelkontraktion, Neurotransmission und Sekretion aber auch für die Blutgerinnung zur Verfügung.

Innerhalb der Zelle sind Calciumionen nur in einer Konzentration von ca. 100 nmol/l vorhanden. Durch Anstieg der Calcium-Konzentration im Zytoplasma können Vorgänge wie Kontraktion oder Sekretion ausgelöst werden. Man spricht von der sog. Trigger-Funktion des Calciums (Petrides, 1998). In der Herzmuskelzelle kann durch Calcium-Einstrom durch die L-Typ Calcium-Kanäle und Calcium-Freisetzung aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum die intrazel-

luläre Konzentration während der Depolarisation auf 1 bis 2 $\mu\text{mol/l}$ angehoben werden. Dies reicht aus, dass das Troponin die Bindungsstelle für Myosin am Aktin freigibt und der Kontraktionsmechanismus unter Verbrauch von ATP in Gang kommt. Bei Absinken unter die Schwelle von ca. 500 nmol/l Calciumionen erschlafft der Muskel wieder. Für die Elimination des Calcium aus dem Zytosol wird ebenfalls ATP verbraucht wie beispielsweise von den Calcium-Pumpen der Zellmembran und des Sarkoplasmatischen Retikulums. Die Calcium-Konzentration in der Zelle steht also in Relation zum ATP-Verbrauch (Rüegg, 1990). Wird der Herzmuskelzelle Calcium entzogen, so verliert sie ihre Kontraktilität. Die Zelle bleibt aber weiterhin erregbar.

Darüber hinaus besitzen Calcium-Ionen einen gewissen membranstabilisierenden Effekt, was sich bei einer Hypocalciämie ($< 1,1 \text{ mmol/l}$ ionisiertes Calcium im Serum) in einer Tetanie äußern kann, wenn durch unkontrollierte Aktionspotentiale der destabilisierten Membran unwillkürliche Muskelkontraktionen ausgelöst werden.

Eine Hypercalciämie ($> 1,3 \text{ mmol/l}$ ionisiertes Calcium im Serum) hingegen bewirkt gastrointestinale Symptome wie Obstipation, Meteorismus und Appetitlosigkeit. Dazu kommen Polyurie mit Gewichtsabnahme sowie Herzrhythmusstörungen mit QT-Verkürzungen im EKG. Außerdem können diverse zentralnervöse Störungen bis hin zu Krämpfen und Coma auftreten.

Der Calcium-Haushalt unterliegt der Regulation durch Parathormon (PTH) und 1,25-Dihydroxy-Cholecalciferol (Vitamin D_3).

4.3.3.4. Magnesium

Magnesium ist ein Cofaktor für die Funktion vieler Enzyme. Zum Beispiel spielt es eine wichtige Rolle bei allen ATP-abhängigen Stoffwechselprozessen wie dem Nucleotidstoffwechsel und für die Funktion der Ionen-Pumpen. Der Gesamtgehalt im menschlichen Körper beträgt ca. 24 g (1 mol). Der größte Massenanteil ist in der Knochensubstanz (67 %) und der Skelettmuskulatur (32 %) gebunden. Nur etwa 1 % findet sich im Plasma und davon sind 30 % an Proteine gebunden. Intrazellulär ist Magnesium überwiegend an ATP gebunden (MgATP). Eine ausgeglichene Bilanz ist beim Erwachsenen bei einer täglichen Zufuhr von etwa 0,30 g (12 mmol) zu erreichen. Die Ausscheidung von Magnesium wird durch die Niere geregelt.

Des Weiteren ist Magnesium ein natürlicher Antagonist zu Calcium. Es konkurriert wegen seiner ähnlichen Bindungseigenschaften um Bindungsstellen des Effektors Calcium. Magnesium kann deshalb Calcium verdrängen und seinen Effekt abschwächen. Als Beispiel wäre anzuführen, dass extrazelluläres und intrazelluläres Magnesium den Calcium-Einstrom durch Calcium-Kanäle hemmt. Intrazelluläre Erhöhung des Magnesiums hemmt auch die Calcium-Freisetzung aus dem SR. Anhand dieser Beispiele wird die modulierende Wirkung von Magnesium deutlich.

Nicht zuletzt sei zu erwähnen, dass Magnesium ähnlich wie Calcium einen „membranstabilisierenden“ Effekt besitzt. Dieser wirkt sich an allen erregbaren

Gewebe wie Neuronen, Herz- und Skelettmuskulatur sowie an der glatten Muskulatur aus. Die Erregungsschwelle wird erhöht.

Ein Magnesiummangel (Hypomagnesiämie; Serummagnesium $< 0,75$ mmol/l) äußert sich in tetaniformen Zuständen. Auffällig sind Herzrhythmusstörungen (Extrasystolen), erhöhte Digitalisempfindlichkeit und eine erhöhte Neigung zu Coronar spasmen. Im EKG zeigt sich u.a. eine QT-Verlängerung. Zudem kommen ZNS-Symptome (z.B. Depression) und Darmspasmen vor.

Eine Hypermagnesiämie ($> 1,1$ mmol/l i.S.) zeigt eine verringerte Erregbarkeit der Skelettmuskulatur, Obstipation und herabgesetzte zentralnervöse Aktivität bis hin zum Coma. Bei einer Serumkonzentration von über 5 mmol/l tritt eine Lähmung der Atmung und ein diastolischer Herzstillstand ein.

Den Effekt der Reizschwellenerhöhung durch Magnesium macht man sich pharmakologisch zunutze: Magnesium wird eingesetzt bei verschiedenen Herzrhythmusstörungen wie Extrasystolie oder Digitalis-induzierter ventrikulärer Tachykardie. Bei Torsade de pointes-Kammertachykardien ist die intravenöse Magnesium-Verabreichung Mittel der Wahl. In der Gynäkologie wird Magnesium mit zur Behandlung der Eklampsie mit generalisierten Krämpfen und zur Tokolyse verwendet.

5. DIE PATCH-CLAMP-TECHNIK

5.1. Grundlagen der Technik

Die von Neher und Sakmann 1976 entwickelte Methode der Membran-Fleck-Klemme (Patch-Clamp-Technik) bietet die Möglichkeit an Zellmembranen fließende Ströme direkt zu messen.

Hierzu benötigt man eine Glaspipette mit einer Öffnung an der Spitze von ca. 1 μm . Sie wird mit einer Elektrolytlösung gefüllt und mit dem Messverstärker verbunden. Die Spitze der Pipette wird mittels Mikromanipulator vorsichtig an die zu messende Zelle angenähert, bis sie Kontakt zur Membranoberfläche hat. Das kann anhand einer Erhöhung des elektrischen Widerstandes erkannt werden. Dann wird der Kontakt zur Zelloberfläche durch Anlegen eines wohl dosierten Unterdrucks an die Pipette verbessert. Bei guten Versuchsbedingungen legt sich dann die Membran so dicht an die Pipettenöffnung an, dass der Membranfleck unter der Pipettenspitze zur äußeren Badlösung hin elektrisch isoliert wird. Der Widerstand bewegt sich nun im Bereich von 1 $\text{G}\Omega$ und der Abstand zwischen Membran und Glas beträgt dann nur noch ca. 0,1 nm. Man spricht vom sogenannten „Giga-Seal“. Diese Verbindung zwischen Membran und Glaspipette zeichnet sich nicht nur durch einen extrem hohen Widerstand aus, sondern verankert die Membran am Glasrand der Öffnung so stabil, dass der Fleck unter der Pipette aus der Zellmembran herausgebrochen werden kann, ohne den isolierenden Zustand zu zerstören.

Diese Anordnung erlaubt es nun, Ströme zu messen, die durch den umschlossenen Membranfleck fließen. Ein weiterer positiver Nebeneffekt der guten Isolierung ist die Reduzierung des Hintergrundrauschens auf ein Minimum. Dies ermöglicht die Messung sehr kleiner Ströme (im pA-Bereich).

Um einen direkten Zugang zum Zellinneren zu erhalten, wird die Pipette an der Zelle belassen und durch Anlegen eines stärkeren Unterdrucks die

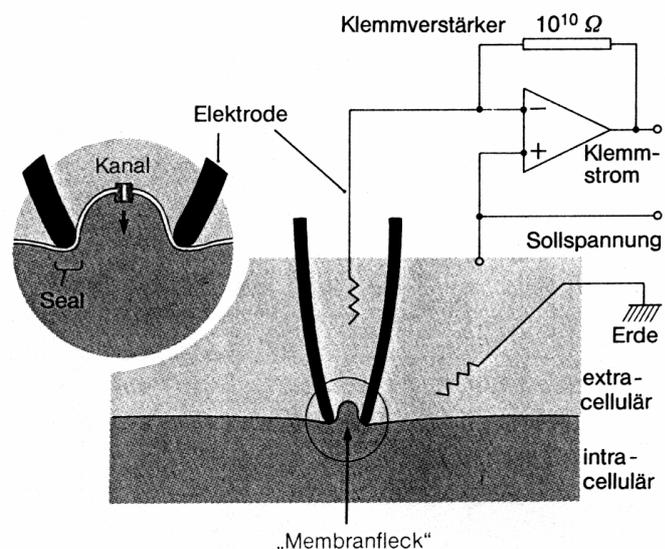


Abbildung 21:

Schematischer Aufbau der Patch-Clamp-Messanordnung. Die Glaspipette liegt der Zellmembran dicht an und bildet einen Giga-Seal aus. Durch den Fleck in der Pipettenöffnung können jetzt Einzelströme gemessen werden oder der Fleck kann durchbrochen werden zur Ganzzellableitung (nach Dudel, 1990).

Zellmembran durchbrochen. Dieses Manöver führt zu einer direkten elektrisch leitenden Verbindung der Messelektrode mit dem Intrazellulärraum. Es können nun Ströme gemessen werden, die durch die Zellmembran in die Zelle hinein oder aus ihr heraus fließen (Ganzzell- bzw. Whole-Cell-Ableitung).

Durch Ansteuerung des Messverstärkers wird der Zelle ein bestimmtes Potential aufgezwungen, wodurch es zu einem Stromfluss durch aktivierte Ionen-Kanäle in der Membran kommen kann. Der Strom führt zu einer Veränderung der Spannung an der Zellmembran. Diese Ist-Spannung wird von einem Rückkopplungsverstärker gemessen und mit der vorgegebenen Soll-Spannung verglichen. Daraufhin wird ein adäquater Strom (Klemmstrom) in die Zelle appliziert, um den Strom durch die Membran auszugleichen und so wieder die Soll-Spannung zu erreichen. Der Klemmstrom ist vom Betrag her gleich groß wie der transmembranäre Strom, jedoch mit umgekehrtem Vorzeichen. Die Kontrolle des Potentials der Membran nennt man Spannungs-Klemme (voltage-clamp).

5.1.1. Voraussetzungen für einen Giga-Seal

Um optimale Voraussetzungen für eine enge Verbindung zwischen der Zellmembran und der Pipettenspitze zu schaffen, müssen einige Dinge beachtet werden.

Zum einen muss die Pipettenspitze absolut sauber sein, da sonst keine enge Verbindung mit der notwendigen Stabilität und Dichtigkeit hergestellt werden kann. Folge ist das Auftreten von sogenannten Leck-Strömen zwischen Pipettenlösung und extrazellulärer Lösung. Somit ist es unverzichtbar, für jeden Versuch eine neue, frisch hergestellte Pipette zu verwenden (Hamill et al., 1981). Zusätzlich kann die Oberfläche der Pipettenspitze noch durch „fire-polishing“ verfeinert werden. Dabei wird mit der Hitze eines glühenden Drahtes die Glasfläche vorsichtig geglättet. Darauf konnte bei den Versuchen jedoch verzichtet werden, da sich auch schon mit den unpolierten Pipetten ein Giga-Seal erreichen ließ.

Auch die Oberfläche der Zelle soll glatt und „sauber“ sein. Hierzu wurden die verwendeten Herzzellen während der Isolation Enzymen ausgesetzt, die die einzelnen Zellen nicht nur aus dem geweblichen Verband lösen, sondern auch anhaftende Bindegewebsreste entfernen sollten. Hierfür wurde ein Gemisch aus den Enzymen Trypsin, Kollagenase und Protease verwendet.

Um den bisher erreichten Grad an Sauberkeit nicht zu verringern, sollten auch die verwendeten Lösungen möglichst frei von Verunreinigungen sein, die sich auf der Pipettenspitze oder den Zellen ablagern können.

5.2. Möglichkeiten der Anwendung

5.2.1. Die Ganzzelleableitung (whole-cell recording)

Nach Erreichen des Giga-Seals kann durch Erzeugung eines stärkeren Unterdrucks in der Pipette die Zellmembran in der Pipettenöffnung durchbrochen werden. Dabei muss die isolierende Verbindung zwischen Membran und Glas erhalten bleiben. Diese Anordnung ermöglicht die Messung aller Ströme durch die gesamte Zellmembran, das heißt man leitet die Summenströme der Einzelkanäle über die gesamte Zelle ab. Mit dieser Messmethode kann man auch kleine und empfindliche Zellen untersuchen (Bödding, 1996). Die Methode wurde in der vorliegenden Arbeit angewendet.

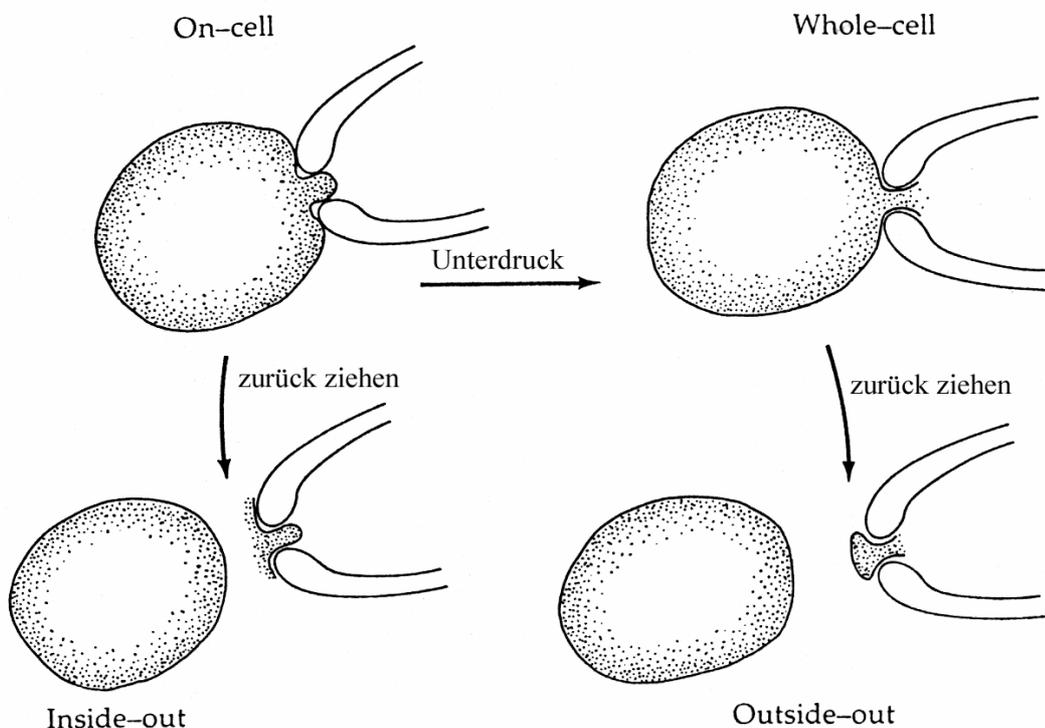


Abbildung 22:

Schematische Darstellung der vier Messkonfigurationen der Fleck-Klemme (nach Hille, 1992).

5.2.2. Die Einzelkanal-Messung

Voraussetzung für diese Konfiguration ist ebenfalls der Giga-Seal. Dabei wird der Membranfleck nicht durchbrochen, sondern die Pipette wird während des Seals zurückgezogen. Die Bindung zwischen dem Membranfleck und der Pipette ist so stabil, dass der Fleck an der Öffnung haften bleibt. So können die Ströme gemessen werden, die durch diesen kleinen Membranfleck fließen. Hier handelt es sich um Ladungsbewegungen durch einzelne oder zumindest sehr

wenige Kanäle. Welche Seite (Innen- oder Außenseite) des Membranflecks nach außen zeigt, kann durch verschiedene Maßnahmen verändert werden. So bewirkt beispielsweise eine niedrige Calcium-Konzentration in der Badlösung eine Wendung der Innenseite nach außen (inside-out). Durchbricht man die Membran nach Erreichen des Seals zum whole-cell patch und zieht erst dann die Pipette zurück, so schließt sich die Lipidmembran wieder über der Pipette. Damit ist an der Pipettenöffnung ein Membranfleck mit der Außenseite nach außen (outside-out).

Eine dritte und sehr schonende Methode zur Einzelkanalmessung ist die on-cell- oder cell-attached-Methode. Hier wird der Fleck nach Formierung eines Giga-Seals an der Zelle belassen und dann der Strom durch ihn gemessen.

5.2.3. Die Strom-Klemme (current-clamp)

Bei der Ganzzelleableitung (whole-cell recording) können der Zelle nicht nur Potentiale (Spannungen) aufgezwungen und die dabei fließenden Ströme gemessen werden. Die Parameter können auch umgekehrt werden, indem man einen Reizstrom der Zelle appliziert und die dadurch hervorgerufene Veränderung des Membranpotentials, beispielsweise in Form von Aktionspotentialen, misst. Man spricht dann von einer Strom-Klemme (current-clamp).

5.2.4. Superfusion

Um an der zu untersuchenden Zelle Veränderungen des extrazellulären Milieus möglichst zeitsparend gestalten zu können, wurde die Superfusions-Methode angewendet, was erlaubte, innerhalb kurzer Zeit die entsprechende Zelle einem veränderten extrazellulären Lösungsmilieu auszusetzen. Der vollständige Austausch der extrazellulären Lösung kann damit innerhalb von zwei bis vier Sekunden erzielt werden (Koch, 2000). Dabei wird eine weitere Glaspipette mit einer Öffnung von ca. 100 μm in unmittelbarer Nähe über die zu messende Zelle gebracht. Durch diese Pipette kann die Zelle mit der gewünschten Lösung überströmt werden, so dass dort die Superfusionslösung das extrazelluläre Milieu bildet.

6. METHODIK

6.1. Allgemeine Arbeitsmethoden

6.1.1. Herstellung der Badlösungen

Bei allen Versuchsreihen dieser Arbeit wurde mit der Patch-Clamp-Methode gearbeitet und als Badlösungen wurden durchwegs modifizierte Krebs-Henseleit-Lösungen (Krebs und Henseleit, 1932) verwendet. Die Herstellung der Lösungen erfolgte durch Auflösen der Substanzen in demineralisiertem Wasser. Die Zusammensetzungen dieser Lösungen sind in Tabelle 2 aufgeführt.

	Lösung A (mmol/l)	Lösung B (mmol/l)
NaCl	115	115
KCl	4,8	4,8
CaCl ₂	1,2	variabel (0,5 – 5)
NaHCO ₃	25	25
KH ₂ PO ₄	1,2	1,2
MgCl ₂	variabel (0 – 10)	1,2
Glucose	10	10

Tabelle 2 :

Übersicht der verwendeten Badlösungen; Konzentrationen in mmol/l. Beide Lösungen wurden vor Beginn und während der Messungen mit Carbogen begast. In Lösung A wurde die Magnesiumionen-Konzentration und in Lösung B die Calciumionen-Konzentration verändert.

Die Lösungen wurden mindestens 10 Minuten vor Beginn und während der Versuchsreihen mit Carbogen (95 % O₂ + 5 % CO₂) begast.

Lösung A diente der Durchführung der Versuchsreihen mit variabler Magnesiumionen-Konzentration. Die Konzentrationen betragen 0, 1, 3, 5, 7 und 10 mmol/l. Die Konzentrationen der anderen Substanzen blieben gleich.

Lösung B stellte die Badlösung bei Versuchsreihen mit veränderter Calciumionen-Konzentrationen dar. Die Konzentrationen betragen 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4 und 5 mmol/l.

6.1.2. Herkunft der Substanzen und Reagenzien

Albumin (bovin):

Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland

ATP:

Na₂ATP (Adenosin-5'-Triphosphorsäure-Dinatriumsalz): Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland

Calciumchlorid p.a.:	CaCl ₂ ; Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Carbogen:	Fa. Linde, Höllriegelskreuth, Deutschland
EGTA:	Titriplex [®] VI (Bis(aminoethyl)-glycerolether-N,N,N',N',-tetraessigsäure): Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
D-Glucose:	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Heparin (25000IE/5ml):	Fa. B. Braun, Melsungen, Deutschland
HEPES:	N-(2-Hydroxyethyl)-piperacin-N'-2-ethansulfonsäure: Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Joklik:	Minimum essential medium (S-MEM) Joklik Modifikation: Fa. Gibco, Paisley, UK
Kaliumdihydrogenphosphat p.a.:	KH ₂ PO ₄ ; Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid p.a.:	KCl; Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Kollagenase:	Worthington, Tpy CLC II; Fa. Biochrom, Berlin, Deutschland (Aktivität abhängig von Charge)
Magnesiumchlorid p.a.:	MgCl ₂ ; Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid p.a.:	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat p.a.:	NaHCO ₃ ; Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Protease:	(0,41 U/mg): Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Trypsin:	(2,4 DCM U/mg): Fa. Serva, Heidelberg, Deutschland

6.1.3. Statistische und graphische Auswertung

Die Statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms Graph Pad Prism[®], Version 2.01 (Fa. GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

Die Erstellung der Kurven der Strom-Spannungs-Beziehungen aus den einzelnen Messpunkten und deren graphischen Darstellung zur Vermessung erfolgten mit dem Programm Excel 98, Firma [Microsoft](#), Redmond, WA, USA.

6.1.3.1. Mittelwerte und Standardfehler

In den graphischen Darstellungen wiedergegeben sind die Mittelwerte und die Standardfehler der Mittelwerte (standard error of the mean, SEM).

6.1.3.2. ANOVA

Die Unterschiede zwischen Messwerten bei verschiedenen Ionen-Konzentrationen wurden mittels ANOVA unter Verwendung der GraphPad Software überprüft.

6.1.3.3. Lineare Regression und die Kurvenanpassung an die Messwerte

Die lineare Regression und die Kurvenanpassung an die Messwerte für eine Sättigungskinetik wurden ebenfalls mit Hilfe der GraphPad Software durchgeführt.

6.1.3.4. Spezielle Kurvenanpassung

Die Kurvenanpassung an die Messpunkte der Strom-Spannungs-Beziehungen mit Hilfe von Chebychew-Polynomen, die rechnerische Ermittlung der $V_{1/2}$ - und der V_{max} -Werte der Strom-Spannungs-Beziehung sowie die Annäherung der Beziehung von Gilbert und Ehrenstein an die gewonnenen Daten erfolgten mit dem Programm Mathematika, Version 4.0 (Wolfram Research 1998, Champaign, IL, USA)

6.2. Spezielle Arbeitsmethoden

6.2.1. Zellisolierung

Für die Versuchsreihen wurden ausschließlich ventrikuläre Herzmuskelzellen von Meerschweinchen verwendet. Diese mussten für jeden Versuchstag neu gewonnen werden. Die Isolation der Zellen erfolgte nach einer Variation der von Bendukidze et al. (1985) beschriebenen Methode. Hierbei wurde ein Enzymgemisch aus Kollagenase, Protease und Trypsin verwendet, um das Herz zu perfundieren. Die Dauer der Perfusion betrug sechs Minuten.

6.2.1.1. Die Herstellung der Lösungen zur Zellisolation

Für die Lösungen zur Zellisolation wurde als Lösungsmittel hochreines, vollentsalztes Wasser verwendet, das durch eine zweifache Getrennbett-Isolierung aus Aqua demineralisata mit einem Ionentauscher der Fa. Millipore, Eschborn, Deutschland hergestellt wurde. Nach erfolgter Deionisierung wurde das Wasser noch mit einem Aktivkohle- und einem Entkeimungsfilter gereinigt. Die fertigen Lösungen (s.u.) wurden vor und während des Isolationsvorganges mit Carbogen (95 % O₂ + 5 % CO₂) begast.

Als Standardlösung zur Zellisolation diene eine nominell Calcium-freie Nährlösung, nämlich eine Joklik-Lösung (Minimum Essential Medium Joklik Modification). Dieser Lösung wurde nach Begasung mit Carbogen 2,1 g/l NaHCO₃ zugesetzt und dann der pH auf 7,4 eingestellt. Hierzu diene als Messinstrument ein pH-Meter der Fa. Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA. Zur groben Abschätzung des pH-Werts der Standardlösung konnte das in der Jokliklösung enthaltene Phenolrot herangezogen werden. Die Standardlösung wurde bei 4 °C maximal zwei Tage lang aufbewahrt. Diese Lösung diene auch als Grundlage für die zur Isolation verwendeten Enzymlösungen (s.o.) und der Albuminlösung zur Aufbewahrung der Zellen.

Substanz	mg/l
NaCl	6500
KCl	400
MgCl ₂	94
NaH ₂ PO ₄	1327
Glucose	2000
L-Arginin/HCl	126
L-Cystein/HCl	32
L-Glutamin	292
L-Histidin	31
L-Isoleucin	52
L-Leucin	52
L-Lysin	58
L-Methoinin	15
L-Phenylalanin	32
L-Threonin	48
L-Tryptophan	10
L-Tyrosin	55
L-Valin	46
D-Ca-Pantothenat	1
Cholinchlorid	1
Folsäure	1
Inositol	2
Nicotinamid	1
Pyridoxal/HCl	1
Riboflavin	0,1
Thiamin/HCl	1
Phenolrot	10
NaHCO ₃	2100

Tabelle 3

Joklik-Lösung (Minimal Essential Medium, S-MEM, Joklik Modification, Fa Gibco, Paisley, UK), mit einem Zusatz von 2100 mg/l NaHCO₃. Der pH-Wert wurde im Anschluss an die Begasung mit Carbogen durch Zusatz von KOH auf 7,4 eingestellt.

Substanz	Konzentration
Kollagenase	105·10 ³ U/l
Protease	205 U/l
Trypsin	480 DMC U/l
Albumin (bovin)	1 g/l
CaCl ₂	0,5 mmol/l

Tabelle 4

Zusammensetzung der für die Zellisolation verwendeten Enzymlösung. Die Enzyme, Albumin und CaCl₂ wurden in Joklik-Lösung mit NaHCO₃-Zusatz (Tab. 3) gelöst.

Substanz	Konzentration	
Albumin (bovin)	10,0	g/l
CaCl ₂	0,25	mmol/l

Tabelle 5

Albuminlösung zur Aufbewahrung der isolierten Zellen. Die Substanzen wurden in Joklik-Lösung gelöst.

6.2.1.2. Gewinnung der Herzmuskelzellen

Wie bereits erwähnt, wurden für die in dieser Arbeit gezeigten Versuche ventrikuläre Herzmuskelzellen von Meerschweinchen verwendet. Die Tiere waren beiderlei Geschlechts und zwischen acht und zehn Wochen alt. Das Gewicht betrug zwischen 250 und 300 g. 30 min vor Explantation des Herzens wurde den Tieren 5000 IE/kg KG Heparin zur Antikoagulation subcutan appliziert, um ein möglichst rückstandsloses Auswaschen von Blut auch aus den kleinsten Gefäßen zu ermöglichen.

Die Meerschweinchen wurden mittels Konkussion und zervikaler Dislokation getötet. Danach wurde rasch der Thorax eröffnet, das Herz in toto entnommen und zur weiteren Präparation in eine gekühlte und Carbogen-begaste Extrazellulärlösung (modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung) gegeben. Hier wurde das Herz von anhängendem Gewebe und vom Herzbeutel befreit. Nach diesem Schritt konnte das Herz für die weiteren Isolationsschritte mit der Aorta zur retrograden Perfusion an eine Perfusionsapparatur nach Langendorff angeschlossen werden.

Zunächst erfolgte die Perfusion mit einem konstanten hydrostatischen Druck von 6,9 kPa bei 35 °C nach folgendem Schema:

- 4 min Extrazellulärlösung (Krebs-Henseleit-Lösung mit 3,2 mmol/l Calcium)
- 4 min nominell Calcium-freie Joklik-Lösung

Anschließend wurde das Herz mit der in Tabelle 4 beschriebenen Enzymlösung mittels Schlauchpumpe mit einer Flussrate von 8 ml/min bei 35 °C perfundiert. Die Dauer betrug hier, je nach Größe und Zustand des Herzens, zwischen vier und acht Minuten, im Durchschnitt ca. sechs Minuten. Auch die Enzymlösung wurde konstant mit Carbogen begast. Gegen Ende dieser Perfusionsperiode war bereits makroskopisch eine deutliche Schwellung des Organs zu sehen, was auf die laufende Auflösung des Zellverbands hinwies.

Im Anschluss wurde das Herz von der Perfusionsapparatur entfernt, die Vorhöfe abgetrennt und die verbleibenden Ventrikel mit einer Schere zerkleinert. Die zerkleinerten Ventrikel wurden nun in begaster Enzymlösung suspendiert und in diesem Zustand für drei Minuten inkubiert. Die so erhaltene Zellsuspension wurde durch ein Kunststoffnetz mit einer Maschenweite von 500 µm filtriert, um grobe Gewebsreste zurückzuhalten. Das Filtrat, das nun

einzelne, isolierte Herzmuskelzellen enthielt, wurde in ein mit ca. 10 ml Albuminlösung gefülltes Gefäß geleitet. Die erste Fraktion an isolierten Zellen war nun gewonnen und konnte unter ständiger oberflächlicher Begasung mit Carbogen für die durchzuführenden Versuche bei Zimmertemperatur aufbewahrt werden. Um die Zahl der zur Verfügung stehenden Zellen zu erhöhen, wurde der Rückstand im Filter erneut mit Enzymlösung suspendiert, für weitere drei Minuten inkubiert und erneut durch das Kunststoffnetz filtriert. Dieses Filtrat der zweiten Zellfraktion wurde in ein zweites mit 10 ml Albuminlösung gefülltes Gefäß gebracht und konnte ebenso unter kontinuierlicher oberflächlicher Begasung für Versuche aufbewahrt werden.

6.2.1.3. Auswahl der für die Versuche am ehesten geeigneten Zellen

Durch Variation der Perfusionsdauer des Herzens mit Enzymlösung konnten die Anzahl der gewonnenen Zellen sowie auch deren Qualität deutlich verbessert werden. Dennoch unterlagen diese beiden Parameter bei der praktischen Durchführung der Versuche erheblichen Schwankungen. Durch die relativ lange Dauer der Versuchsreihen, welche zum Erhalt genügend vieler Strom-Spannungs-Beziehungen nötig war, unterlagen die Zellen extremer Beanspruchung. So war es nicht selten, dass auch optisch unversehrte Zellen größere Leckströme oder Spontankontraktionen aufwiesen, wodurch die erhaltenen Ergebnisse unbrauchbar wurden.

Deswegen wurden bevorzugt Zellen ausgewählt, welche die typische Ziegelsteinform von ventrikulären Kardiomyozyten ohne jegliche Ausfaserungen an den Zellgrenzen aufwiesen und eine klare, möglichst geradlinige Querstreifung zeigten. So geartete Zellen lieferten die besten Ergebnisse und zeigten die längste Stabilität.

Trotz intensiver Bemühungen, die Versuchsreihen unter möglichst konstanten Bedingungen durchzuführen, schwankten die Zellzahlen und Qualitäten erheblich. Dies wurde auch schon von mehreren anderen Autoren beschrieben (Sensch, 1995; Gödecke, 1997; Koch, 2000). Als mögliche Ursache dieser Schwankungen wird eine mögliche multifaktorielle Beeinflussung der Oberflächenstrukturen der Zellen und deren Glycocalix diskutiert (Stegemann et al., 1990).

6.2.2. Die Patch-Clamp-Technik

Die Versuche dieser Arbeit wurden alle mittels Spannungsklemme und der Patch-Clamp-Technik durchgeführt. Es wurden Potentiale an ganze Zellen appliziert (whole-cell-Methode) und die entsprechenden Ströme zu den Potentialen gemessen und aufgezeichnet. So konnten Stromkurven in Abhängigkeit vom Membranpotential aufgezeichnet werden und daraus sogenannte Strom-Spannungs- (IU)-Beziehungen aufgestellt werden.

6.2.2.1. Geschichte der Patch-Clamp-Technik

Bereits Ende der 30-er Jahre des vergangenen Jahrhunderts entwickelten Cole und Curtis die Spannungsklemme. Mit Hilfe dieser Technik konnten sie erstmalig zeigen, dass eine Potentialänderung der Zellmembran einer Nervenzelle eine Änderung deren Leitfähigkeit hervorruft (Cole und Curtis, 1939).

In den 50-er Jahren des vergangenen Jahrhunderts konnten Hodgkin und Huxley mit dieser Methode nachweisen, welche Ionen-Ströme am Aktionspotential von Axonen des Tintenfisches *Loligo* beteiligt sind (Hodgkin und Huxley, 1952).

Auch Gilbert und Ehrenstein benutzten 1969 die Technik der Spannungsklemme an Riesenaxonen von Tintenfischen, um den Einfluss von divalenten Ionen auf den Kalium-Strom zu erforschen und zu beschreiben.

Der Nachweis von Strömen durch einzelne Ionen-Kanäle gelang erst 1976 den deutschen Wissenschaftlern Erwin Neher und Bert Sakmann. Dies war möglich, da durch ihre Entwicklung der Technik der Membran-Fleck-Klemme (patch-clamp) auch die Spannungsklemme an kleinen Membranflecken angewendet werden konnte. Dies ermöglichte Stromveränderungen an einzelnen Ionen-Kanälen zu beobachten und somit Rückschlüsse auf die Reaktionen der einzelnen Membranmoleküle zu ziehen. Für diese Entdeckung erhielten 1991 beide Wissenschaftler den Nobelpreis für Physiologie und Medizin. Zu erwähnen sei, dass beide Forscher zumindest einen Teil ihres Studiums an den Münchener Hochschulen absolvierten.

6.2.2.2. Geräte und Versuchsaufbau

Bei der Spannungsklemme gilt auch für die Patch-Clamp-Technik, dass eine bestimmte Spannung an die Membran angelegt wird. Die dabei fließenden Ströme werden kompensiert und dieser kompensatorische Strom kann als Abbild des tatsächlich über die Zellmembran fließenden Stroms gemessen und aufgezeichnet werden. Die Auswahl der Zellen und die Annäherung der Pipetten wurde mit Hilfe eines inversen Mikroskops IM 35 der Fa. Zeiss, Oberkochen, Deutschland und eines hydraulischen Mikromanipulators, Fa. Narishige, Tokyo, Japan realisiert. Für die Übersicht wurde eine Vergrößerung von 100-fach verwendet, für die genaue Auswahl der Zellen und Annäherung 400-fach. Das Behältnis der Badlösung (Versuchs- bzw. Messkammer) bildete ein Plexiglasfassring mit aufsitzender Gummidichtung, der in eine vergoldete Metallfassung eingeschraubt wurde, in der sich ein rundes Deckglas (Durchmesser ca. 1,2 cm) befand, das den Boden des Badgefäßes bildete. Das Volumen des Gefäßes betrug ca. 1,5 ml. Die Metallfassung wurde geerdet, um ein störendes „Brummen“ zu verhindern, welches durch induktive Störungen (z.B. Netzbrummen) verursacht wurde. Um die im Badgefäß befindliche Lösung ständig erneuern zu können, wurde dauernd frische Badlösung aus einem Vorratsgefäß über eine Schlauchpumpe bei einer Flussrate von 4 ml/min eingeleitet. Die überschüssige Lösung wurde am Oberrand des Gefäßes über

eine Woulff'sche Flasche durch eine Membranpumpe abgesaugt. Um optimale Bedingungen zur Versuchsdurchführung zu erhalten, wurde im Badgefäß die Lösung auf eine konstante Temperatur von 35 °C ($\pm 0,5$ °C) eingestellt. Dies ließ sich dadurch erzielen, dass die Lösung, die in die Versuchskammer gepumpt wurde, noch im zuführenden Schlauch über einen Heizwendel erhitzt wurde. Zur Kontrolle dienten zwei Thermosensoren, einer in der Nähe des Heizwendels und einer im Gefäß mit der Badlösung. Reguliert wurde die Heizleistung über ein elektronisches Regelgerät (PETC 80 – 3S npi) der Fa. npi-Polder, Tamm, Deutschland. Die Temperatur im Gefäß konnte über eine LED-Anzeige am Regelgerät abgelesen werden und die Temperatur konnte in Schritten zu 0,1 °C eingestellt werden.

Die Spannungsklemme selbst und die Messung der an der Membran fließenden Ströme wurden mit Hilfe eines Patch-Clamp L/M-EPC-7-Verstärkers der Fa. List Electronic, Darmstadt, Deutschland bewerkstelligt. Die empfangenen elektrischen Signale wurden durch einen im Gerät integrierten 3 kHz 3-Pol-Bessel-Filter gefiltert. Sogenannte kapazitive Ströme, welche durch die Kondensatorwirkung der Zellmembran bei Spannungsänderungen entstehen, konnten teilweise mit Hilfe des Verstärkers kompensiert werden.

Die genaue Ansteuerung und die Aufzeichnung der Messsignale erfolgten über einen IBM-kompatiblen Rechner, der über eine A/D-D/A-Wandler-Karte mit dem Verstärker verbunden war. Als Software zur Ansteuerung der Wandler-Karte und zur Erfassung der erhaltenen Messsignale diente das Programm ISO3[®]-Multitasking-Patch-Clamp-Program. Diese Software und die Wandler-Karte wurden von der Fa. MFK, Niedernhausen, Deutschland geliefert. Als optische Kontrolle der am Computer-Bildschirm gezeigten Stromkurven diente ein digitales Oszilloskop (Nicolet 3091) der Fa. Nicolet, Offenbach, Deutschland, das an einem Analogausgang der Wandlerkarte angeschlossen war.

Die Referenzelektrode zur Messelektrode (Erdung) bildete ein chlorierter Silberdraht, der über eine Agar-Agar-Brücke (ca. 3% Agar-Agar in Badlösung) mit der Badlösung verbunden war.

Zur Herstellung einer Verbindung des Elektrodendrahtes (Abbildung 23) mit dem Zellinneren wurden spezielle Glaspipetten verwendet, die für jeden Messversuch neu hergestellt werden mussten. Ausgangsmaterial waren Mikro-Hämatokrit-Röhrchen der Fa. Brand, Wertheim, Deutschland. Diese wurden

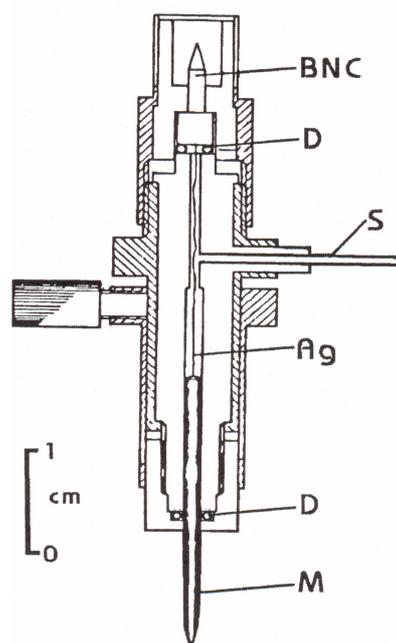


Abbildung 23:

Darstellung des Pipettenhalters im Längsschnitt (nach Hamill et al., 1981).

- M: Mikroelektrode aus Glas
- D: Dichtungsring
- Ag: Elektrodendraht aus Ag/AgCl.
- BNC: BNC-Steckverbindung
- S: Schlauchverbindung zur 10ml-Spritze.

mittels eines vertikalen Pipettenziehgeräts (L/M-3P-A, Fa. List Electronic, Darmstadt, Deutschland) in zwei Schritten gezogen. Dadurch konnte der ursprüngliche Durchmesser der Kapillarröhrchen (1,2 mm) auf ca. 1 μm an der Spitze reduziert werden. Danach wurde die fertige Messkapillare mit der Mikroelektrodenlösung (siehe folgendes Kapitel) gefüllt. Die Füllung musste luftblasenfrei erfolgen, da sonst eine kontinuierlich leitende Verbindung zwischen dem Elektrodendraht, der sich im Inneren der Messkapillare befand, und dem Zellinneren nicht garantiert werden konnte. Bei der Befüllung wurde die Pipettenlösung über einen 0,2 μm Filter (Minisart NML, Fa. Sartorius, Göttingen, Deutschland) gefiltert. So beschickt, konnte die Glaskapillare nun an den Elektrodenhalter, an dem der Elektrodendraht, ein chlorierter Silberdraht, befestigt war, eingesetzt werden. Der Draht ragte so weit in das Lumen der Kapillare hinein, dass er von der Messelektrodenlösung umgeben war. Auf der anderen Seite des Pipettenhalters war er über einen BNC-Stecker elektrisch leitend mit dem Vorverstärker verbunden. Der Elektrodenhalter war weiterhin so beschaffen, dass mittels einer 10 ml Spritze über einen Silikonschlauch der Druck innerhalb der Glaskapillare variiert werden konnte.

Der Elektrodenhalter war mit dem Vorverstärker über eine Steckverbindung fest verbunden und konnte mit Hilfe eines hydraulischen Mikromanipulators (Fa. Narishige, Tokyo, Japan) mikrometergenau bewegt werden, was unabdingbar war, um die Mikroelektrode entsprechend auf der zu messenden Zelle zu platzieren. Vor- und Hauptverstärker waren über eine Kabelverbindung miteinander verbunden.

Zur Verhinderung induktiver Störungen waren einige Komponenten des Versuchsaufbaus, wie z.B. die Schlauchpumpe für den Zulauf der Badlösung oder die Schläuche der Absaugung mit einem Faraday'schen Käfig umgeben. Weiterhin wurden alle anderen Geräte, der Objektisch und das Versuchsbad geerdet. Dies war nötig, da bei Messungen im Nano- bis Picoamperebereich auch kleinste Störungen die Messergebnisse unbrauchbar machen können.

Für die in dieser Arbeit angewendete Ganzzell-Ableitung genügte es, für die Pipettenherstellung Natrium-Glas mit einem Anteil von 30% Na_2O zu verwenden. Der Vorteil dabei war, dass das Glas relativ weich war und sich leicht verarbeiten ließ. Allerdings war das Hintergrundrauschen im Vergleich zu anderen Glassorten wie Borosilikatglas (ca. 15% B_2O_3) ungünstiger. Das konnte allerdings wegen der großen gemessenen Ströme bei der Ganzzell-Klemme in Kauf genommen werden.

6.2.3. Herstellung der Mikroelektrodenlösung

Nach Durchbrechen der Zellmembran steht die Mikroelektrodenlösung über die ca. 1 μm durchmessende Öffnung der Glaskapillare in direkter Verbindung mit dem Zellinneren. Um die physiologische Zusammensetzung der Intrazellulärflüssigkeit nicht zu stören, musste die Lösung dem intrazellulären Milieu angepasst werden. So enthielt die Lösung (s. Tabelle 6) außer den Elektrolyten auch Na_2ATP , um das Zellinnere nicht am Energieäquivalent ATP verarmen zu lassen. Weiterhin wurde mit HEPES (N-(2-Hydroxyethyl)-

piperacin-N'-2-ethansulfonsäure) als Puffer und KOH ein pH-Wert von 7,2 eingestellt, der dem des intrazellulären Milieus entspricht. Zusätzlich sollten 0,05 mmol/l des Chelatbildners EGTA (Titriplex® VI, Bis-(aminoethyl)-glycoether-N,N,N',N'-tetraessigsäure) die Konzentration des freien Calcium im Inneren der Herzmuskelzelle niedrig halten, da eine Überladung der Zelle mit Calciumionen zytotoxisch wirken kann.

Die fertige Lösung wurde bis zu ihrer Benutzung eingefroren, um einen Abbau des ATP zu verhindern.

Substanz	Konzentration in mmol/l
NaCl	5
KCl	140
MgCl ₂	1
HEPES	5
EGTA	0,05
Na ₂ ATP	3

Tabelle 6: Zusammensetzung der Mikroelektrodenlösung. Der pH-Wert der Lösung wurde vor Gebrauch mit KOH auf einen pH-Wert von 7,2 eingestellt.

6.2.4. Die Spannungskontrolle

Die Spannung, die an der zu messenden Zelle anliegen soll, wird mit Hilfe des Verstärkers L/M-EPC-7 der Fa. List Electronic, Darmstadt, Deutschland über die angeschlossene Mikroelektrode angelegt. Die Steuerung des Verstärkers erfolgte über den PC mit dem Programm ISO3® und der A/D-D/A-Wandlerkarte der Fa. MFK, Niedernhausen, Deutschland. Dadurch konnten ganze Spannungsprotokolle vor Beginn der Versuche festgelegt werden. Bei allen Versuchen betrug das angelegte Haltepotential -80 mV. Dieses Potential war also der Ausgangspunkt für die entsprechenden Depolarisationsprotokolle.

6.2.4.1. Messung des Calcium-Stroms

Wenn man ausgehend von einem Haltepotential (-80 mV) sofort auf 0 mV depolarisiert, erzeugt man eine Mischung aus Natrium- und Calcium-Strom. Um nur den Calcium-Strom messen zu können, muss man die Natrium-Ströme vorher ausschalten. Dies kann auf zwei verschiedene Arten geschehen: Entweder blockiert man die Natrium-Kanäle selektiv pharmakologisch (z.B. durch TTX) oder man versucht den Natrium-Strom vor Auslösung des Calcium-Stroms elektrisch zu inaktivieren. In den Versuchsreihen dieser Arbeit wurde letztere Methode gewählt.

Hierzu wurde ausgehend vom Haltepotential die Membran zunächst auf -40 mV depolarisiert. Dadurch kommt es zu einer Auslösung des Natriumstroms mit anschließender Inaktivierung der Natrium-Kanäle. Bei der nachfolgenden Depolarisation auf 0 mV wird kein Natrium-Strom, sondern nur noch isoliert ein Calcium-Strom ausgelöst. Abbildung 24 zeigt das verwendete Spannungsprotokoll. Die Dauer der Vordepolarisation betrug 600 ms. Die Dauer der Auslösung des Calciumstroms, also des zweiten Depolarisationsschrittes betrug 400 ms. Eine Periode des Durchlaufes der zweistufigen Depolarisation dauerte 5 s (d.h. die Depolarisationsfrequenz betrug $0,2$ Hz). Zur Überprüfung der Qualität der Zelle und der Verbindung zwischen Mikroelektrode und Zelle wurde zunächst ein Calcium-Strom bei 0 mV ausgelöst. Dieser entspricht im physiologischen extrazellulären Milieu ungefähr dem maximal erzielbaren Calcium-Strom. So konnte zunächst die Qualität des gemessenen Stroms optisch am Oszilloskop oder am PC-Monitor abgeschätzt werden. Die bei raschem Potentialwechsel ausgelösten kapazitiven Ströme wurden durch entsprechende Einstellungen am Verstärker teilweise kompensiert.

Um das Verhalten des Calcium-Stroms bei verschiedenen Depolarisationspotentialen beurteilen zu können, wurde das Potential zur Auslösung des Calcium-Stroms ausgehend vom Niveau der Vordepolarisation in Schritten zu 5 mV bis auf $+40$ mV geändert. So konnte eine Beziehung von Auslösepotential und Größe des fließenden Stroms, also

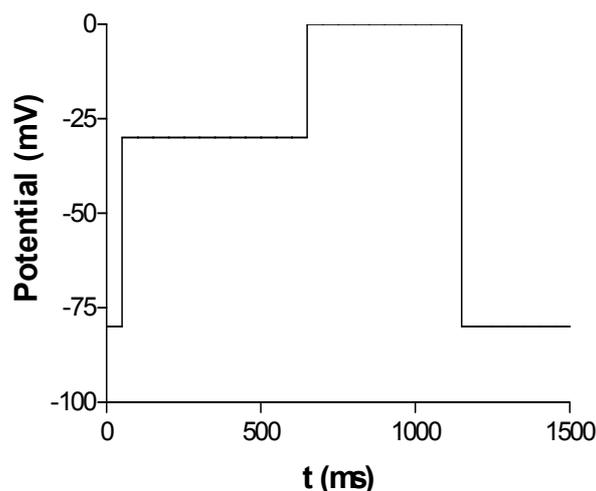


Abbildung 24:

Depolarisationsprotokoll zur Messung von Calcium-Strömen.

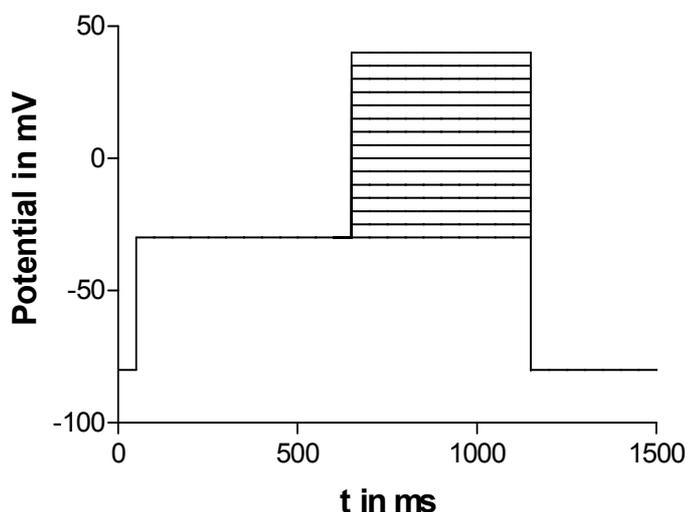


Abbildung 25:

Depolarisationsprotokoll zur Ermittlung der Strom-Spannungs-Beziehung des Calcium-Einwärts-Stroms. Hier erfolgt die schrittweise Änderung des Auslösepotentials für den Calcium-Einwärts-Strom bei jedem Durchlauf der Depolarisationsperiode (Frequenz $0,2$ Hz) um 5 mV bis $+40$ mV.

eine Strom-Spannungs-Beziehung aufgestellt werden. In Abbildung 25 wird das entsprechende Depolarisationsprotokoll gezeigt.

Im Verlauf der Versuchsreihen zeigte sich, dass unter den Versuchsvoraussetzungen bei einer Vordepolarisation auf -40 mV bei der zweiten Depolarisation teilweise noch störende (Rest-) Natriumströme ausgelöst wurden und so die Strom-Spannungs-Beziehung des Calcium-Stroms während des zweiten Depolarisationsschritts verzerrt wurde. Dies war vor allem bei der Bestimmung von $V_{1/2}$, (Potential des halbmaximalen Calcium-Einwärts-Stroms) problematisch, da eine Verfälschung des Wertes durch Überlagerung von Natriumströmen möglich war. Es wurde deshalb eine Vordepolarisations-Spannung von -30 mV gewählt, was zur weitgehenden Elimination des Problems der Überlagerung führte.

6.2.4.2. Messung des Natrium-Stroms

Zur Messung der Natrium-Einwärts-Ströme genügte es, einen Auslöseimpuls ausgehend vom Haltepotential zu applizieren. Bis -40 oder -30 mV wird dieser nicht vom Calcium-Strom überlagert, da dieser erst bei einem Potential von -40 mV bis -30 mV zu fließen beginnt. Allerdings wurde das Depolarisationsprogramm zur Auslösung der Calcium-Einwärts-Ströme modifiziert. Es wurde, wie bei der Messung des Calcium-Stroms, mit einem zweistufigen Depolarisationsprogramm gearbeitet (Abbildung 26). Dabei war diesmal die erste Stufe variabel: Ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV wurde in 1 bzw. 2 mV-Schritten zunehmend stärker depolarisiert bis zu einem Potential von -30 mV. Während der zweiten Stufe wurde immer auf -30 mV depolarisiert. Durch dieses Programm war es möglich, die Strom-Spannungs-Beziehung für den Natrium-Strom zu bestimmen. Diese ist allerdings nur bei mäßiger Depolarisation repräsentativ, da bei starker Depolarisation die Ströme so groß werden, dass sie durch den Patch-Clamp-Verstärker nicht mehr kompensiert werden können.

Während der zweiten Depolarisationsstufe konnte festgestellt werden, wie sich die Vordepolarisation inaktivierend auf den Natrium-Strom während der zweiten Stufe auswirkte.

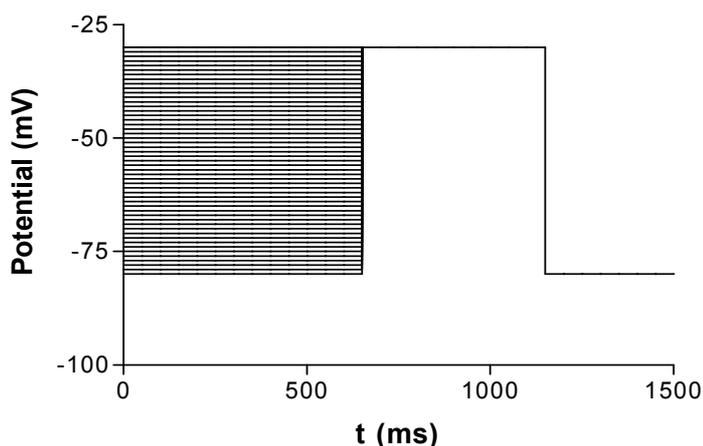


Abbildung 26:

Protokoll zur Auslösung des Natrium-Einwärts-Stroms. Hier erfolgte ausgehend vom Haltepotential (-80 mV) eine stufenweise stärkere Depolarisation in Schritten von 1 bzw. 2 mV bis -30 mV.

6.2.5. Versuchsaufbau zur Messung von Ionen-Strömen bei variabler Ionen-Konzentration in der Badlösung

Eine Änderung der extrazellulären Ionen-Konzentration der zu untersuchenden Zelle kann auf verschiedene Weise erreicht werden. Am einfachsten ist es, die im Vorratsgefäß befindliche Badlösung durch eine Lösung mit der gewünschten Ionen-Konzentration auszutauschen. So kann die gewünschte Lösung durch die Pumpe, die der ständigen Erneuerung der Badlösung in der Messkammer dient, dem Bad zugeleitet werden. Die Wartezeit bis zum kompletten Austausch der Lösung in der Messkammer beträgt aber etwa 5 Minuten (Dichtl und Vierling, 1991).

Um die sich daraus ergebenden langen Wartezeiten zu umgehen, wurde ein spezieller Versuchsaufbau (Abbildung 27) gewählt. Hier wurde der Lösungswechsel mittels Superfusion erzielt. Das Prinzip beruht darauf, dass nach Positionierung der Mikropipette an der Zelle und Durchbrechen der Zellmembran, eine weitere Pipette mit einer Öffnung von ca. 100 μm , die Superfusionspipette, dicht über der Zelle platziert wird. Über diese Superfusionspipette kann dann die Zelle mit der entsprechenden Lösung, die die geänderten Ionen-Konzentrationen enthält, überströmt werden. Damit kann ein sehr rascher Lösungswechsel innerhalb von 2 bis 3 Sekunden (Koch, 2000) vollzogen werden.

Die Lösungen zur Untersuchung des Calcium-Stroms enthielten veränderte Konzentrationen von MgCl_2 (0, 1, 3, 5, 7 und 10 mmol/l) oder CaCl_2 (0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4 und 5 mmol/l). Die Auslöseschwelle des Natrium-Stroms wurde bei 1 und 10 mmol/l Magnesium untersucht. Die Badlösung, die durch die Pumpe in die Messkammer transportiert wurde und mit der die Experimente begonnen wurden, enthielt 1 mmol/l CaCl_2 und 1 mmol/l MgCl_2 . Die weiteren Lösungen wurden mittels Superfusion appliziert.

Diese Lösungen wurden in bis zu sechs verschiedene Vorratsgefäße gefüllt und mit Carbogen begast. Die Vorratsgefäße waren jeweils über eine Schlauchverbindung aus Teflon mit einem Konfluens verbunden, der die Lösungen in die in dem Pipettenhalter befindliche Superfusionspipette leitete. In den Schlauchverbindungen der Vorratsgefäße der Lösungen waren Magnetventile zwischengeschaltet. Diese konnten elektronisch einzeln geöffnet und geschlossen werden. So konnte, nachdem die Superfusionspipette über der Zelle richtig platziert worden war, die gewünschte Lösung an die Zelle appliziert werden.

Um die Temperatur an der Zelle konstant zu halten, wurden die Lösungen im Bereich des Konfluens mit Hilfe eines Heizblocks erwärmt. Die Temperatur wurde mittels Thermostat so eingestellt, dass die Temperatur an der Zelle 35 °C betrug.

Die Lösungen wurden infolge des hydrostatischen Drucks bei einem Höhenunterschied von ca. 50 cm von den Vorratsgefäßen über die Superfusionspipette an die Zelle befördert.

Der prompter Wechsel der die Zelle umgebenden Lösung war nur möglich, wenn die gesamte Superfusionsapparatur absolut luftblasenfrei befüllt wurde.

Die Superfusionspipetten für diesen Versuchsaufbau wurden selbst aus handelsüblichen Hämatokrit-Röhrchen gezogen.

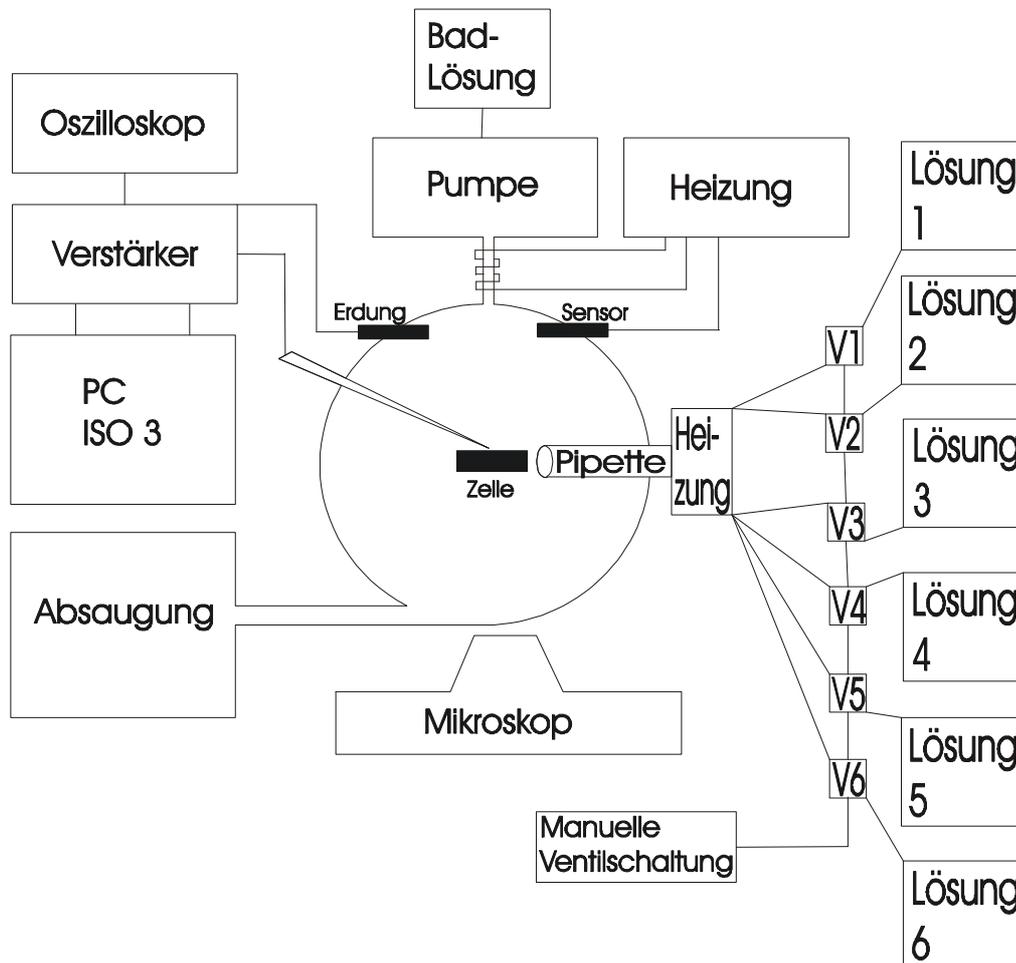


Abbildung 27:

Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus bei Versuchsreihen mit variabler Ionen-Konzentration. Die Lösungen 1 bis 6 stehen für die modifizierten KH-Lösungen mit verschiedenen Magnesium- oder Calciumionen-Konzentrationen. Diese können einzeln durch die Superfusionspipette durch elektronische Schaltung der Magnetventile V1 bis V6 über die Zelle geleitet werden.

7. EIGENE VERSUCHE MIT DER PATCH-CLAMP-TECHNIK

7.1. *Messung von Ionen-Strömen durch die Zellmembran*

Ziel dieser Arbeit war es, die Wirkung von divalent geladenen Ionen im extrazellulären Milieu auf spannungsabhängige Ionen-Kanäle der Herzmuskelzelle näher zu beleuchten. Verwendet wurden hierzu Zellen aus der ventrikulären Herzmuskulatur von Meerschweinchen. In erster Linie wurde der Einfluss dieser Ionen auf den Calcium-Kanal untersucht. Als Beispiele für divalente Ionen wurden in den Versuchsreihen Magnesium- und Calciumionen gewählt, da diese physiologischerweise vorkommen (nähere Erläuterungen siehe Kap. Physiologie der Herzmuskelzelle). Untersucht wurde in Ganz-Zell- (whole-cell-) Messungen die Wirkung dieser Ionen auf die Strom-Spannungs-Beziehung des Calcium-Stroms durch die Membran der ganzen Zelle. Dabei wurde entweder die Magnesiumionen-Konzentration bei konstanter Calciumionen-Konzentration oder umgekehrt die Calciumionen-Konzentration bei konstanter Magnesiumionen-Konzentration verändert.

Neben der Beeinflussung der Potentialabhängigkeit des Calcium-Stroms sollte zusätzlich auch noch die Wirkung dieser Ionen auf die Inaktivierungskinetik des Calcium-Stroms beleuchtet werden.

Des Weiteren wurde der Effekt von Magnesium auf die Potentialabhängigkeit des spannungsabhängigen Natrium-Kanals betrachtet. Hier beschränkte sich die Arbeit auf einen Konzentrationsschritt von 1 auf 10 mmol/l.

7.1.1. Messung des Calcium-Stroms an der Herzmuskelzelle

7.1.1.1. Technik der Messung des Calcium-Stroms an einzelnen Kardiomyozyten

Alle Versuchsreihen dieser Arbeit wurden mit isolierten Herzmuskelzellen aus Meerschweinchenherzen durchgeführt. Diese mussten täglich frisch isoliert werden. Wie bereits erwähnt, geschah dies mittels enzymatischer Auflösung der Organstruktur. Durch Anwendung verschiedener Enzyme (Kollagenase, Trypsin und Protease) konnten funktionsfähige Zellen isoliert werden. Für die Anwendung der Patch-Clamp-Methode war keine weitere Behandlung der erhaltenen Zellen nötig.

Zur Messung des Calcium-Stroms wurde die Messpipette der Zelle angenähert und nach Erreichen eines Giga-Seals ein Stück der Membran herausgebrochen. Es erfolgte die Messung mit der Whole-Cell-Technik, was bedeutet, dass der gesamte Strom, der durch die Zellmembran fließt, gemessen wurde.

Das Ruhemembranpotential (Haltepotential) wurde auf -80 mV festgesetzt. Wie bereits erwähnt, fließt der größte Teil des Calcium-Einwärts-Stroms bei einem Aktionspotential im ventrikulären Myokard durch die sogenannten L-Typ-Calcium-Kanäle. Die Schwelle für diesen Strom liegt bei einem Membranpotential von ca. -40 mV. Der Strom nimmt dann mit steigender Depolarisation zu und erreicht sein Maximum bei ca. 0 mV (Reuter und Beeler, 1969; Lacinova und Hofmann, 2001).

Um einen derartigen Strom zu erzeugen, muss also das Membranpotential von -80 mV auf 0 mV gesenkt werden. Dadurch wird aber nicht nur der Calcium-Strom sondern auch der Natrium-Strom ausgelöst, der infolge seiner Größe den Calcium-Strom überlagert, weshalb das Maximum der Calcium-Stroms nicht erfasst werden kann. Um diese Schwierigkeit zu umgehen, musste der Natrium-Strom inaktiviert werden. Dafür gibt es zwei Möglichkeiten: Zum einen können die Natrium-Kanäle pharmakologisch blockiert werden (z.B. mit Tetrodotoxin). Zum anderen können diese aber auch inaktiviert werden, indem man vor der Auslösung des Calcium-Stroms in einem Vordepolarisationsschritt den Natrium-Strom auslöst und durch Beibehaltung dieses Potentials die Natrium-Kanäle im inaktivierten Zustand verweilen lässt, bevor man in einem zweiten Depolarisationsschritt den Calcium-Strom auslöst.

In vorangegangenen Arbeiten wurde ein Vordepolarisationsschritt von -40 mV gewählt (Dichtl und Vierling, 1991; Koch, 2000). Jedoch konnte man in Vorversuchen dieser Arbeit feststellen, dass bei -40 mV nicht immer alle Natrium-Kanäle inaktiv wurden. Deswegen wurde in der vorliegenden Arbeit das Niveau der Vordepolarisation auf -30 mV festgelegt.

Abbildung 28 zeigt das Potentialprotokoll des Steuerprogramms zur Messung des Calcium-Stroms, das in den Versuchsreihen verwendet wurde.

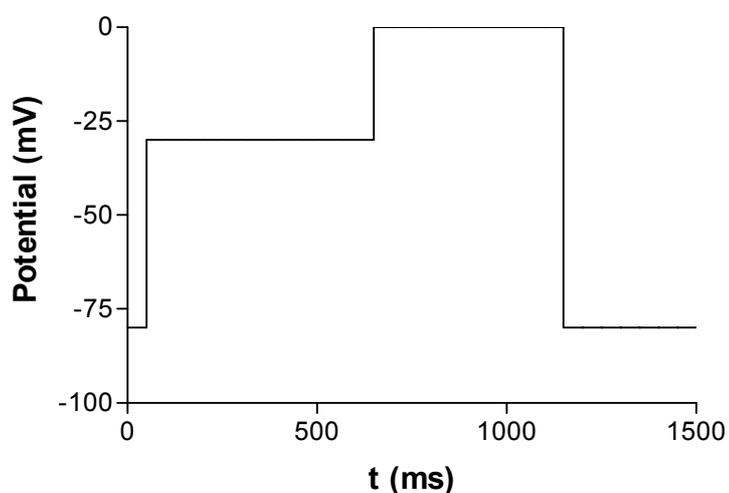


Abbildung 28:

Potentialprotokoll zur Messung des Calcium-Stroms in Kardiomyozyten.

7.1.1.1.1. Der gemessene Calcium-Einwärts-Strom

Appliziert man Spannungsschritte nach diesem Protokoll an einem Kardiomyozyten und betrachtet den gemessenen Strom im Zeitintervall zwischen 600 und 1200 ms, so zeigt sich der Strom-Zeit-Verlauf des Ionen-Stroms bei einem Auslösepotential von 0 mV nach dem zuvor applizierten

Potentialplateau von -30 mV. Wie bereits beschrieben, werden bei -30 mV die Natriumionen-Kanäle inaktiviert und bei dem Potentialschritt auf 0 mV fließt der Ionen-Strom vor allem durch die L-Typ-Calcium-Kanäle. Abbildung 29 zeigt den zeitlichen Verlauf dieses Stroms. Die Zeitachse beginnt hier nicht bei 600 ms, sondern bei 0 , was den Beginn der Messaufzeichnung 50 ms vor dem zweiten Depolarisationsschritt (von -30 auf 0 mV) kennzeichnet.

Zu Beginn der Strom-Zeit-Kurve im genannten Zeitfenster zeigt sich ein konstanter Strom von etwa $+100$ pA. Zu diesem Zeitpunkt lag bereits seit 550 ms ein Potential von -30 mV an. Dadurch wurden die Natrium-Kanäle, nachdem sie vorübergehend aktiviert wurden, in einem inaktivierten Zustand gehalten. Bei diesem Potential von -30 mV fließt noch ein leichter Auswärts-Strom, der den fließenden Kalium-Strom (I_{K1}) repräsentiert. Ein positives Vorzeichen zeigt den Auswärts-Strom positiver Ionen an.

Nach 50 ms im abgebildeten Fenster, also nach einem insgesamt 600 ms langen Plateau des Potentials bei -30 mV, erfolgte der nächste Depolarisationsschritt auf 0 mV. Zu Beginn dieses Schritts trat ein kurzer positiver Strom-Peak auf. Dabei handelt es sich um einen kapazitiven Strom, der auf Grund des plötzlichen Spannungswechsels an der Zellmembran entsteht, die als isolierende Fläche zwischen beiden Ladungsseiten auch Kondensator-Eigenschaften besitzt. Der kapazitive Strom zeigt also den Wechsel der Ladungsverteilung direkt an der Membran an und ist nur von kurzer Dauer. Im Anschluss zeigte sich ein rasch ansteigender negativer Strom,

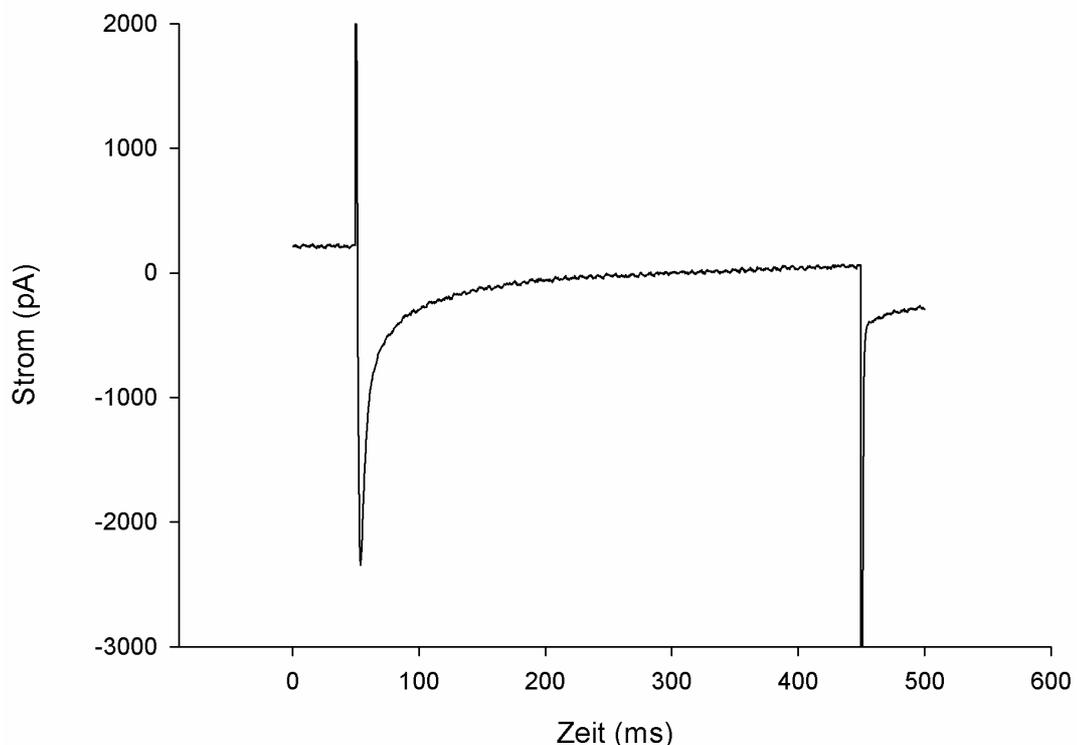


Abbildung 29:

Strom-Zeit-Verlauf des Calcium-Stroms einer Kardiomyozyte.

der nach Erreichen eines Maximums zunächst rasch abklingt und sich dann relativ langsam einer Asymptote annähert. Negativ bedeutet per definitionem eine Bewegung von positiven Ladungen von der Badlösung ins Zellinnere. Diese Kurve entspricht dem Verlauf des Calcium-Einstroms durch L-Typ-Calcium-Kanäle. Dieser kann durch Calcium-Kanal-blockierende Substanzen wie Nifedipin blockiert werden (vgl. Dichtl und Vierling, 1991).

Nach 400 ms wurde das Potential wieder auf das festgelegte Ruhemembranpotential von -80 mV geklemmt. Da hier das Vorzeichen des Potentialsprungs umgekehrt ist (also ins Negativere), ist der resultierende kapazitive Strom negativ.

Die Größe des gemessenen maximalen Calcium-Einwärts-Stroms ergibt sich aus der Differenz zwischen dem Maximum (peak-current) und dem Wert am Ende des 400 ms dauernden Potential-Plateaus (late-current).

7.1.1.1.2. Die Strom-Spannungs-Beziehung des Calcium-Einwärts-Stroms

Die Strom-Spannungs-(I-U-) Beziehung beschreibt die Größe des Spitzenstroms bei verschiedenen Auslösepotentialen. Also muss der Calcium-Strom bei verschiedenen Potentialen gemessen werden. Um dies zu verwirklichen, wurde das Auslösepotential in Schritten von 5 mV zwischen -30 mV und $+40$ bzw. $+50$ mV variiert. Abbildung 30 zeigt das Steuer-Protokoll mit den verschiedenen Potentialschritten für die Auslösung des Calcium-Stroms. Klemmt man diese Zelle auf dieses Potential, so sieht man, dass bei verschiedenen Auslösepotentialen der gemessene Calcium-Strom unterschiedlich groß ist. In Abbildung 31 sieht man die gemessenen Ströme bei exemplarisch ausgewählten Auslösepotentialen von -40 , -20 , -10 und 0 mV. Abbildung 32 zeigt eine Strom-Spannungs-Beziehung bei $1,2$ mmol/l Magnesium und $1,0$ mmol/l Calcium in der Badlösung.

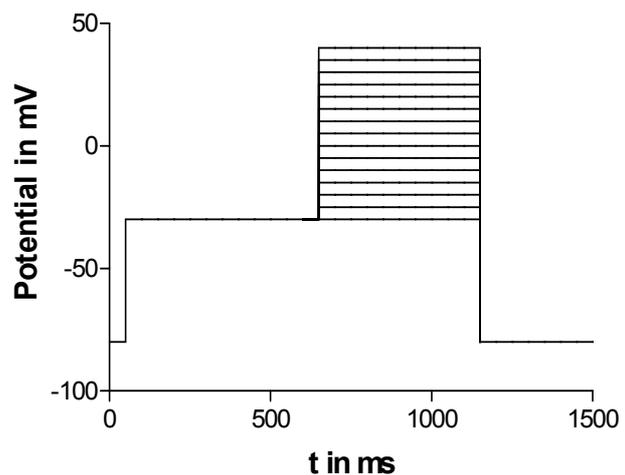


Abbildung 30:

Messprotokoll mit variablen Auslösepotentialen des Calcium-Stroms.

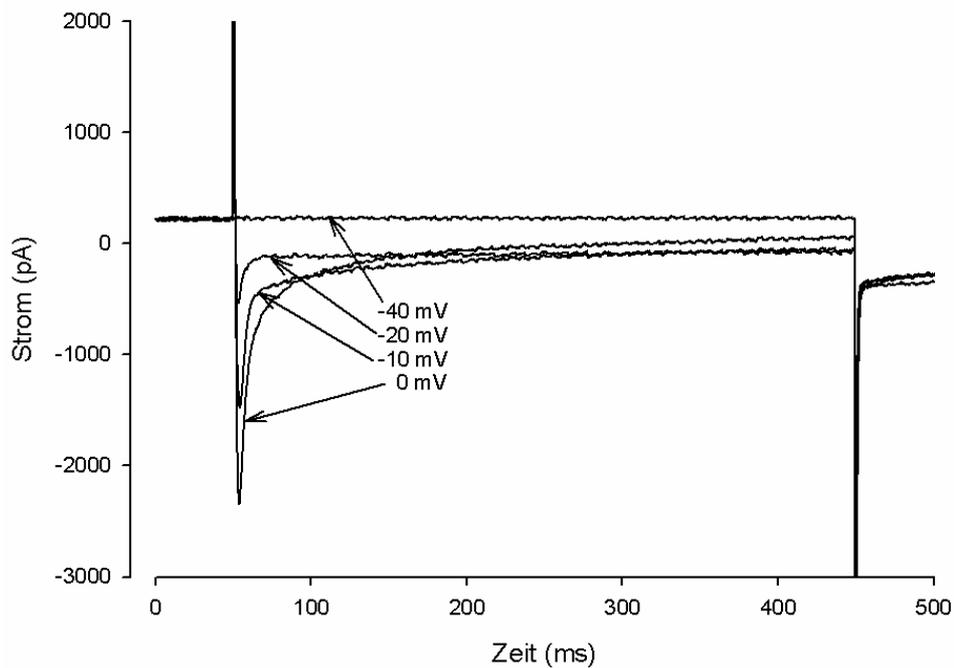


Abbildung 31:

Calcium-Ströme bei 4 ausgewählten Potentialen (-40, -20, -10 und 0 mV).

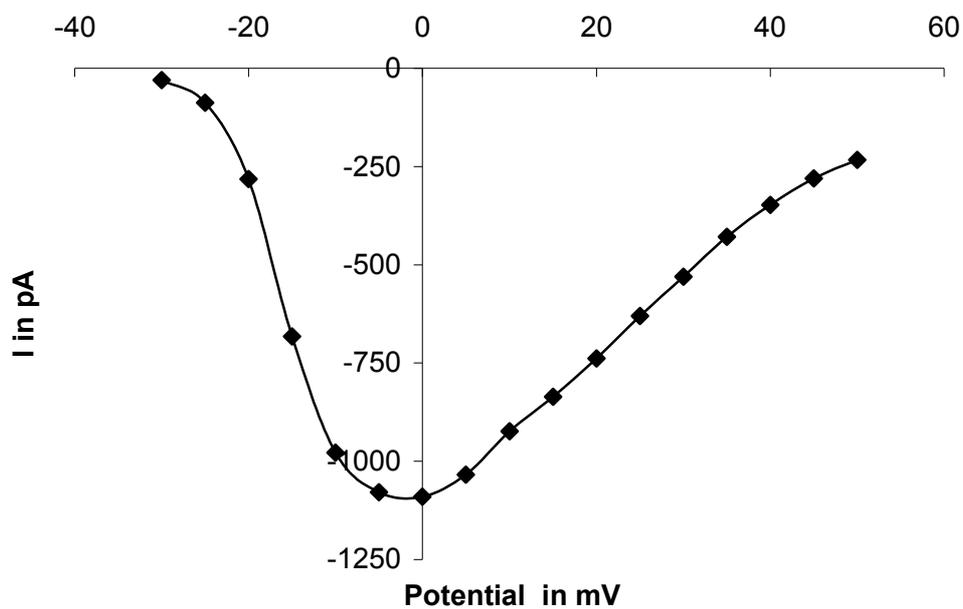


Abbildung 32:

IU-Beziehung des Calcium-Stroms bei 1 mmol/l Calcium und 1,2 mmol/l Magnesium in der Badlösung.

7.1.1.2. Beeinflussung der Strom-Spannungs-Beziehung des Calcium-Stroms durch divalente positive Ionen

Frankenhäuser und Hodgkin zeigten bereits 1957, dass sich die Kurve für die Leitfähigkeit von Kalium-Kanälen an Tintenfischaxonen durch Erhöhung der extrazellulären Calciumionen-Konzentration zu weniger negativen bzw. stärker positiven Potentialen verschiebt. Gilbert und Ehrenstein (1969) erforschten dieses Phänomen, indem sie die veränderten Leitwerte von Kalium-Kanälen bei Veränderung der divalenten Ionen-Konzentrationen (Calcium und Magnesium) an Tintenfischaxonen untersuchten. In der vorliegenden Arbeit sollte der Effekt von divalenten Ionen auf den Calcium-Einwärts-Strom von ventrikulären Herzmuskelzellen untersucht werden. Dabei sollten die Ionen-Konzentrationen nahe dem physiologischen Milieu liegen. Als Beispiele divalenter Ionen wurden Calcium und Magnesium verwendet. Um die Wirkungsweise weiter aufzuschlüsseln, wurden die Konzentrationen von Magnesium und Calcium in der Extrazellulärlösung in zwei verschiedenen Versuchsreihen separat variiert. Dabei sollte das Verhalten der Strom-Spannungs-Beziehungen beobachtet werden, speziell deren Verschiebung entlang der Potentialachse.

7.1.1.2.1. Effekte von Magnesium auf den Calcium-Einwärts-Strom

Begonnen wurde mit der Untersuchung des Effekts einer Variation der Magnesium-Konzentration in der Extrazellulärlösung auf wichtige Kenngrößen des Calcium-Einwärts-Stroms, nämlich die Strom-Spannungs-Beziehung und die Inaktivierungszeiten.

Beeinflussung der Strom-Spannungs-Beziehung des Calcium-Stroms durch Variation der extrazellulären Magnesium-Konzentration

In dieser Versuchsreihe wurden die IU-Beziehungen des Calcium-Stroms wie oben beschrieben aufgestellt. Dafür wurde der Spitzenstrom bei Auslösepotentialen im Intervall von -30 mV bis $+40$ bzw. $+50$ mV bei bestimmten Ionen-Konzentrationen gemessen. Ein gewisser Effekt von Magnesium-Ionen auf die Potentialabhängigkeit des Calcium-Stroms an Meerschweinchenherzen wurde bereits von Dichtl und Vierling (1991) beschrieben, und zwar eine Verschiebung der Strom-Spannungs-Beziehung auf der Spannungsachse zu weniger negativen bzw. stärker positiven Potentialen. Allerdings wurden hier nur zwei verschiedene Konzentrationen (1,2 und 9,6 mmol/l) gewählt. In der vorliegenden Arbeit wurden die Konzentrations-Schritte für Magnesium wie folgt gewählt: 0, 1, 3, 5, 7 und 10 mmol/l. Die Calciumionen-Konzentration blieb konstant bei 1,2 mmol/l. So sollte versucht werden, eine Beziehung zwischen der Verschiebung der IU-Beziehung und der Ionen-Konzentration zu ermitteln.

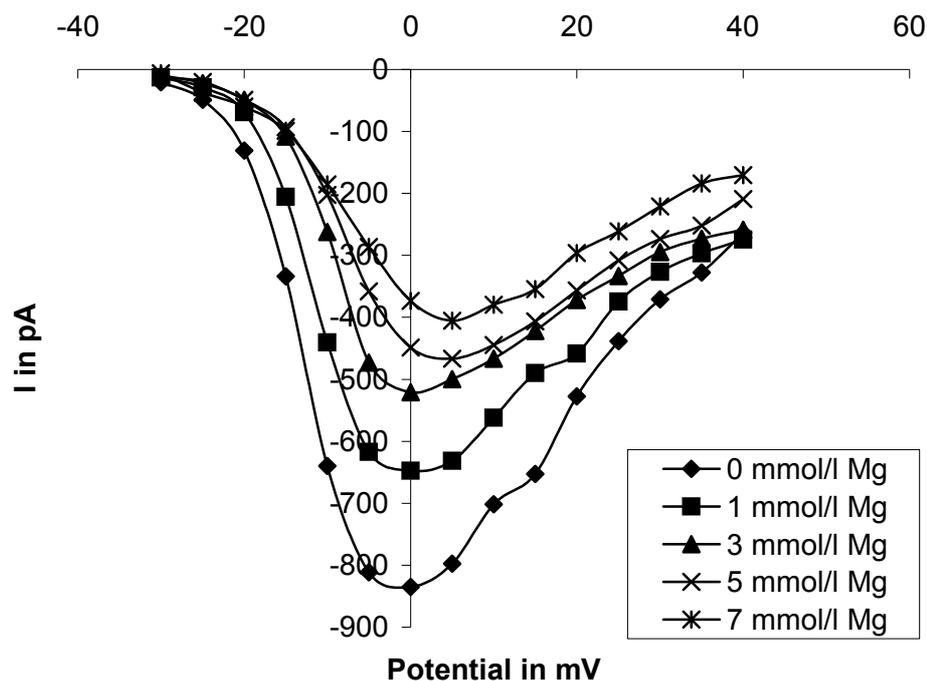


Abbildung 33:

Die Strom-Spannungs-Beziehung des Calcium-Stroms bei variabler Magnesiumionen-Konzentration: 0, 1, 3, 5 und 7 mmol/l.

Um Störeinflüsse zum Beispiel von elektromagnetischen Feldern zu minimieren und zeitabhängige Veränderungen weitgehend auszuschalten, wurden alle Kurven doppelt gemessen und anschließend die Werte gemittelt. Außerdem wurde die Reihenfolge der Messungen variiert.

Trägt man die IU-Beziehungen bei verschiedenen Magnesium-Konzentrationen in einer Graphik zusammen auf, so sieht man hier bereits eine Verschiebung des Potentials des maximal auslösbaren Stroms zu weniger negativen bzw. stärker positiven Potentialen bei steigender Magnesiumionen-Konzentration in der Badlösung (Abbildung 33). Weiterhin ist sichtbar, dass bei steigender Magnesiumionen-Konzentration sich der maximal erreichbare Calcium-Strom verringert. Dieses Phänomen ist nicht primär durch den sog. Run-Down-Effekt zu erklären, sondern in erster Linie durch eine Inhibierung des Calcium-Einwärts-Stroms durch Magnesium (Dichtl und Vierling, 1991).

Um speziell die Verschiebung der Strom-Spannungs-Kurven entlang der Potentialachse zu untersuchen, wurde der maximale Strom bei der jeweiligen Magnesium-Konzentration als 100 % gesetzt. So entstanden Kurven mit gleicher Amplitude (Abbildung 34). Man sieht so noch deutlicher, dass das Auslösepotential für entsprechende Ströme bei steigender Magnesium-Konzentration zum Positiveren hin verschoben wird.

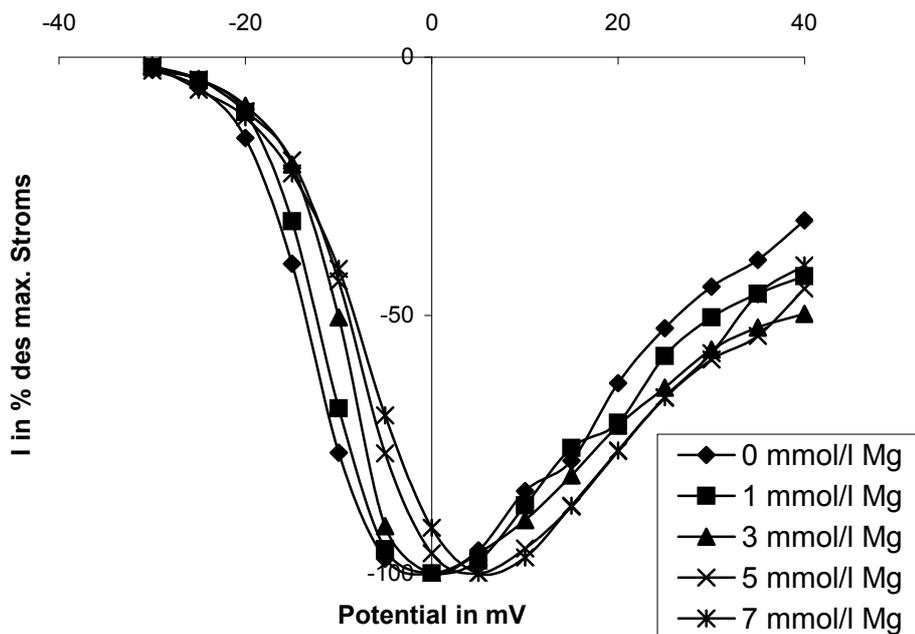


Abbildung 34:

Die Strom-Spannungs-Beziehung des Calcium-Stroms, bei variabler Magnesiumionen-Konzentration: 0, 1, 3, 5 und 7 mmol/l. Relativwerte: Maximaler Strom bei der jeweiligen abgeänderten Magnesiumionen-Konzentration entspricht 100%.

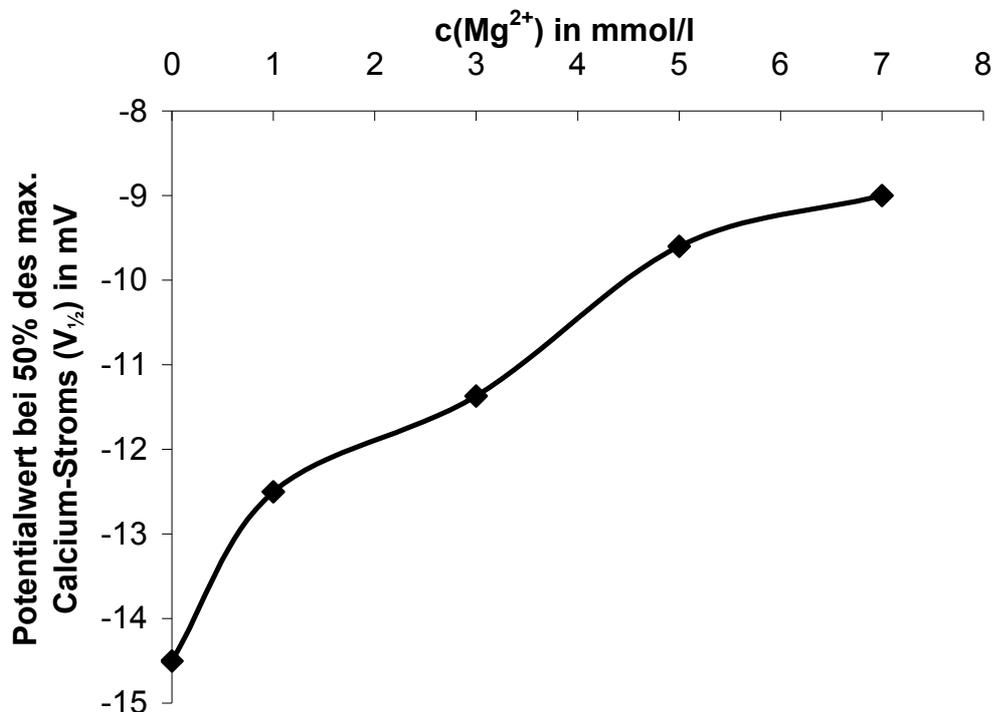


Abbildung 35:

Abhängigkeit des Potentialwerts bei 50 % des maximalen Calcium-Stroms ($V_{1/2}$) von der Magnesium-Konzentration (Werte aus den Einzelmessungen aus dem in Abbildung 33 und 34 gezeigten Versuch).

Da es messtechnisch schwierig ist bei den resultierenden Kurven das exakte Potential am Maximum der Strom-Spannungs-Kurven zu ermitteln, wurde das Potential bei 50 % des maximalen Stroms ($V_{1/2}$) gemessen. So bekommt man für jede Messung bei bestimmter Magnesium-Konzentration einen Potentialwert, $V_{1/2}$. Diese Messwerte kann man in einem Diagramm in Bezug zur Magnesium-Konzentration auftragen, wie dies am Beispiel der Messungen, die den Abbildungen 33 und 34 zugrunde liegen, in der Graphik in Abbildung 35 gezeigt wird.

In der folgenden Darstellung werden nun alle Messungen zusammengefasst, die die Potentialverschiebung von $V_{1/2}$ des Calcium-Einwärts-Stroms zeigen sollen. Es wurden an insgesamt 11 Zellen die Strom-Spannungs-Beziehungen bei verschiedenen Magnesium-Konzentrationen gemessen.

Wie bereits erwähnt, wurden alle Strom-Spannungs-Beziehungen einer Zelle bei einer bestimmten Magnesium-Konzentration zur Minimierung von zeitabhängigen Veränderungen und anderen Störeinflüssen zweimal gemessen. Ein Punkt der dargestellten Graphik in Abbildung 36 entspricht jeweils dem Durchschnittswert der $V_{1/2}$ der zweifach an einer Zelle bestimmten Strom-Spannungs-Beziehungen bei entsprechender Magnesium-Konzentration. Außerdem wurde die Reihenfolge der Messungen variiert.

In Abbildung 36 kann man bereits erkennen, dass bei steigender Magnesium-Konzentration $V_{1/2}$ des Calcium-Stroms zu positiveren Potentialen hin verschoben wird.

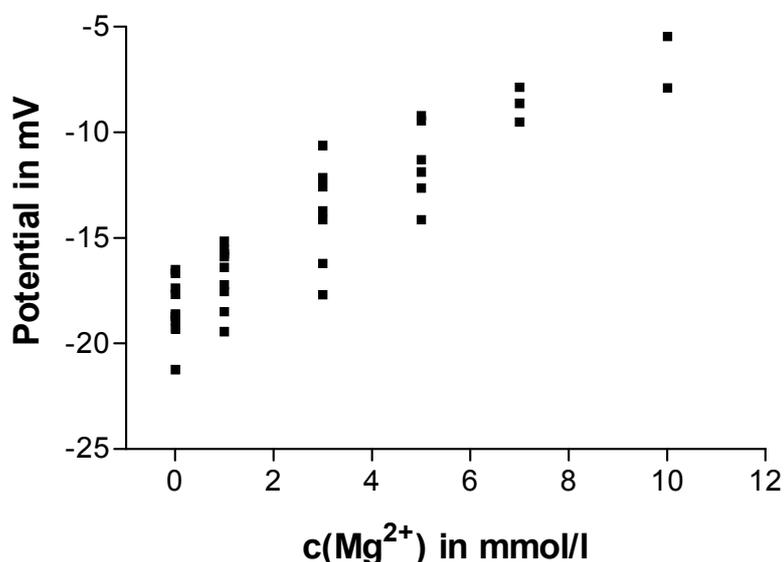


Abbildung 36:

Darstellung der Spannungswerte bei 50 % des Maximalstroms ($V_{1/2}$) der Strom-Spannungs-Beziehungen des Calcium-Stroms der 11 gemessenen Zellen bei verschiedenen Magnesium-Konzentrationen (ein Punkt entspricht dem Durchschnittswert der doppelt durchgeführten Messung an einer Zelle).

Auswertung

Zur besseren Übersichtlichkeit wurden zur Auswertung in den graphischen Darstellungen die Mittelwerte der Potentiale von $V_{1/2}$ der verschiedenen Zellen bei den entsprechenden Magnesium-Konzentrationen verwendet. Die Fehlerbalken zeigen die Standard-Erreres des Mittelwerts (SEM) an.

Um die gemessene Verschiebung der Potentiale mathematisch zu beschreiben, wurde eine Sättigungsfunktion für eine einfache Bindung eines Agens an eine Bindungsstelle mittels eines mathematischen Algorithmus an die gemessenen Einzelwerte angepasst. Der mathematische Ausdruck dieser Sättigungsfunktion lautet:

$$Y(x) = \frac{B_{\max} \cdot x}{K_d + x} + C$$

Wobei: $Y(x)$: Potential für $V_{1/2}$ des Calcium-Stroms in Abhängigkeit von der Magnesium-Konzentration (mV).

B_{\max} : Maximal erreichbare Verschiebung von $V_{1/2}$ bei maximaler Bindung (Maximaleffekt, „efficacy“; mV).

x : Magnesiumionen-Konzentration in der Badlösung (mmol/l)

K_d : Konzentration des Liganden (hier Mg^{2+}) bei halbmaximaler Sättigung der Bindungsstellen („potency“; mmol/l).

C : Konstantes Glied, welches den Beginn der Kurve bei $x=0$ definiert (entspricht dem Potential von $V_{1/2}$ bei 0 mmol/l Magnesium in der Badlösung; mV).

Die Funktion einer Sättigungskinetik wurde gewählt, da zumeist von einer Bindung der divalenten Ionen an Bindungsstellen der Zellmembran ausgegangen wird (Gilbert und Ehrenstein, 1969). Es ist in dieser Darstellung (Abbildung 37) ersichtlich, dass diese einfache Funktion den Effekt der Magnesiumionen (im gemessenen Konzentrationsintervall von 0 bis 10 mmol/l) auf $V_{1/2}$ der Strom-Spannungs-Beziehung des Calcium-Stroms gut beschreibt.

Nach den ermittelten Parametern der Funktion ist von einer $V_{1/2}$ von -18,38 mV (C) bei 0 mmol/l Magnesium und 1,2 mmol/l Calcium in der Badlösung auszugehen. Zum Erreichen der halbmaximalen Verschiebung ist eine Magnesium-Konzentration von 23,81 mmol/l (K_d) nötig. Eine maximale Verschiebung wäre nach dieser Funktion um 40,70 mV (B_{\max}) möglich. Dies sind natürlich nur Beschreibungen der Aussage der Modell-Funktion, die im verwendeten Konzentrationsbereich die Effekte einer Variation der extrazellulären Magnesium-Konzentration auf $V_{1/2}$ des Calcium-Einwärts-Stroms wiedergibt.

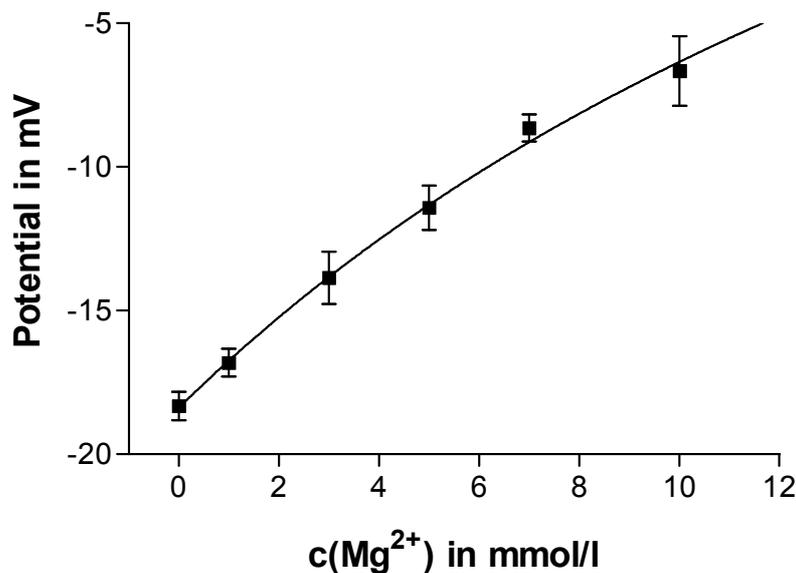


Abbildung 37:

Fit der Sättigungsfunktion $Y(x) = \frac{B_{\max} \cdot x}{K_d + x} + C$ an die Messwerte $V_{1/2}$ der Strom-

Spannungs-Beziehung des Calcium-Stroms (Mittelwerte und Standard-Fehler, SEM). $B_{\max} = 40,70$ mV; $K_d = 23,81$ mmol/l; $C = -18,38$ mV; $R^2 = 0,8332$.

Beeinflussung der Inaktivierung des Calcium-Einwärts-Stroms

Als zweite Kenngröße, die den Calcium-Strom charakterisiert, sollte die Inaktivierungskinetik betrachtet werden. Legt man die Kurven, die den zeitlichen Verlauf des Calcium-Einwärts-Stroms zeigen, so übereinander, dass die Maxima auf den gleichen Zeitpunkt fallen und die gleiche Größe haben, sieht man, dass sich die Zeitverläufe bei verschiedenen Magnesium-Konzentrationen in der Badlösung unterscheiden. In Abbildung 38 wurden exemplarisch die Originalkurven der gemessenen Calcium-Ströme einer Zelle bei verschiedenen Magnesium-Konzentrationen gestreckt, damit sie die gleiche Amplitude haben und die Maxima wurden übereinander gelegt. So sollte der relative zeitliche Verlauf der Inaktivierung des Stroms nach Erreichen des Maximums sichtbar gemacht werden.

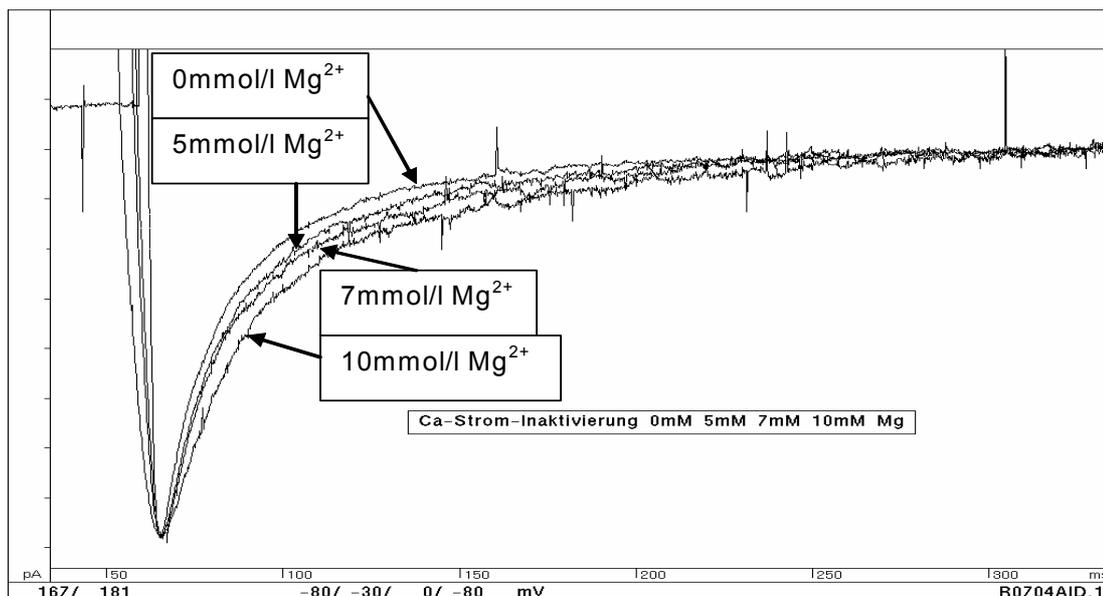


Abbildung 38:

Darstellung des Zeitverlaufs des Calcium-Stroms einer Herzmuskelzelle bei einer Depolarisation auf 0 mV bei verschiedenen Magnesium-Konzentrationen in der Badlösung. Zur Darstellung wurden die Kurven so übereinanderprojiziert, dass sie gleiche Amplitude und gleichen Zeitpunkt des Maximums haben (Originaldarstellung mit Hilfe des Auswerteprogramms ISO3).

Die Inaktivierung des Calcium-Einwärts-Stroms kann mit folgendem mathematischem Modell beschrieben werden:

$$y(t) = A \cdot e^{-\frac{t}{\tau_1}} + B \cdot e^{-\frac{t}{\tau_2}} + C$$

Wobei:

$y(t)$: Strom zum Zeitpunkt t (in pA).

t : Zeit (in ms).

A und B sind Variablen für den „Startwert“ (d.h. bei $t=0$; in pA).

C : Konstantes Glied (Verschiebung auf y -Achse, falls die Asymptote nicht der Y -Achse entspricht; in pA).

τ_1 : Inaktivierungs-Zeitkonstante der ersten Teilgleichung.

τ_2 : Inaktivierungs-Zeitkonstante der zweiten Teilgleichung.

Dieses Modell enthält zwei Teilgleichungen, die eine Inaktivierungsfunktion beschreiben. Entsprechend erhält man zwei Inaktivierungs-Zeitkonstanten, die das Abklingen des Calcium-Stroms beschreiben.

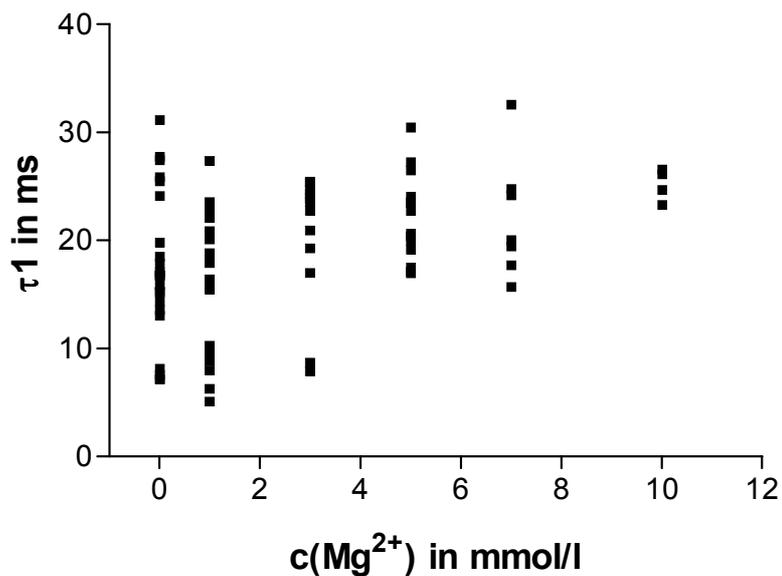


Abbildung 39a:

Einzelwerte der Inaktivierungs-Zeitkonstanten τ_1 in Bezug auf die extrazelluläre Magnesium-Konzentration.

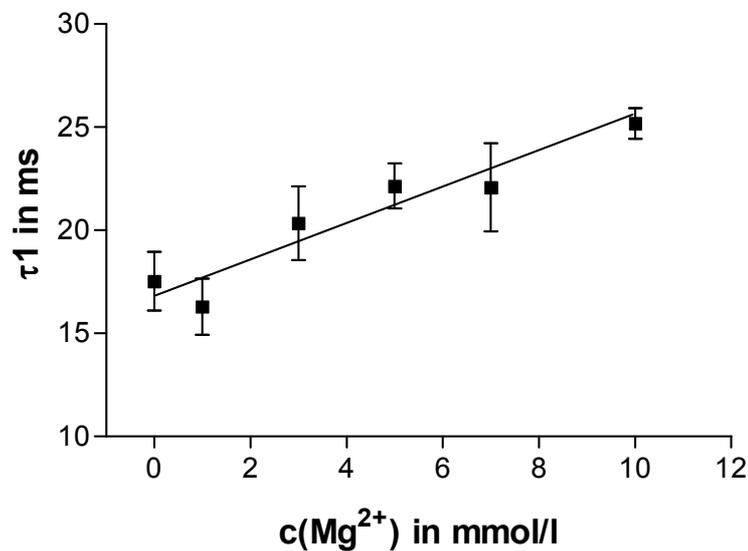


Abbildung 39b:

Mittelwerte der Inaktivierungs-Zeitkonstanten τ_1 in Bezug auf die extrazelluläre Magnesium-Konzentration mit Standard-Fehler (SEM) und der Regressionsgeraden. Die Steigung mit $0,8831 \pm 0,2329$ ist signifikant ($p < 0,001$) von 0 verschieden; (Schnittpunkt mit Ordinate bei $16,82 \pm 0,8996$; $R^2 = 0,1523$).

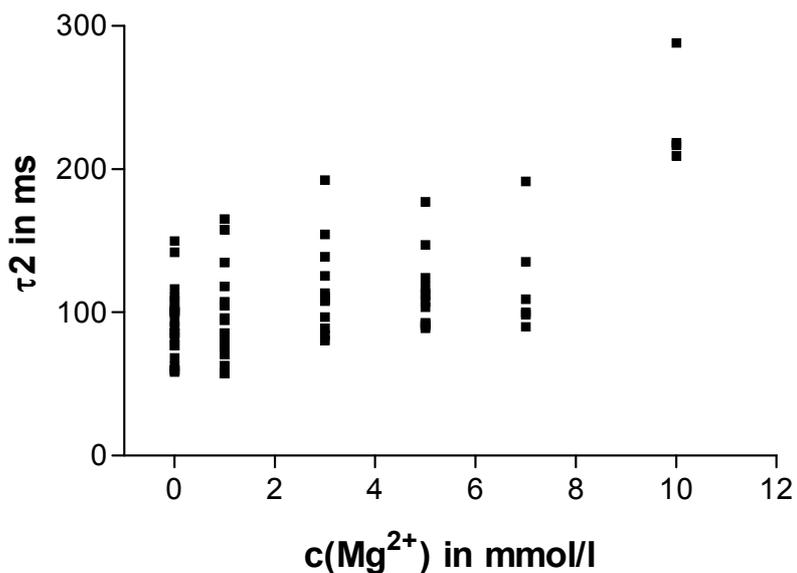


Abbildung 40a:

Einzelwerte der Inaktivierungs-Zeitkonstanten τ_2 in Abhängigkeit von der extrazellulären Magnesium-Konzentration.

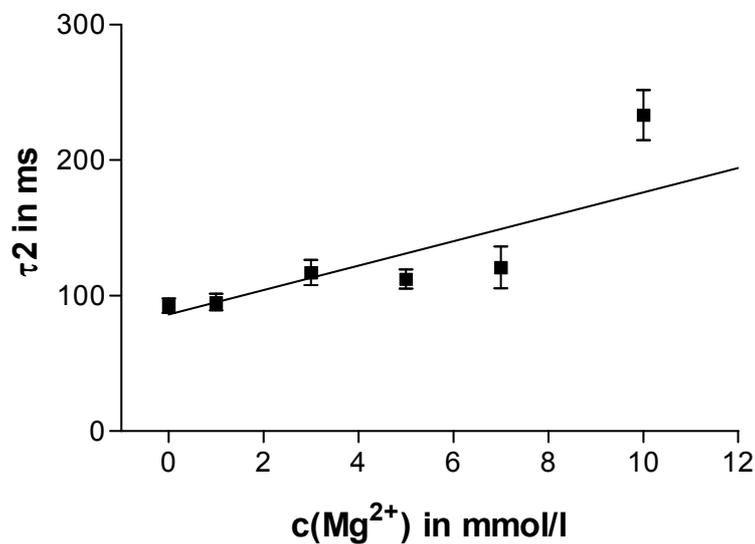


Abbildung 40b:

Mittelwerte der Inaktivierungs-Zeitkonstanten τ_2 in Abhängigkeit von der extrazellulären Magnesium-Konzentration mit Standard-Fehler (SEM) und der Regressionsgeraden. Die Steigung mit $9,010 \pm 1,334$ ist signifikant ($p < 0,0001$) von 0 verschieden; (Schnittpunkt mit der Ordinate bei $86,19 \pm 5,086$; $R^2 = 0,3722$).

Diese Funktion wurde an die Messwerte für den Calcium-Strom bei einem Auslösepotential von 0 mV während der Abklingphase bei verschiedenen Magnesium-Konzentrationen angepasst. Man erhält so für jede Stromkurve die Werte der Inaktivierungs-Zeitkonstanten τ_1 und τ_2 , welche die Geschwindigkeiten der Inaktivierung wiedergeben. Sie wurden für jede Zelle der vorangegangenen Versuche bei den entsprechenden Magnesium-Konzentrationen bestimmt. Die erhaltenen Werte wurden in Bezug auf die Magnesiumkonzentration aufgetragen, wie in den Abbildungen 39a und b sowie 40a und b gezeigt.

Betrachtet man die Änderungen der Inaktivierungs-Zeitkonstanten τ_1 und τ_2 , die ein Maß für die „schnelle“ und die „langsame“ Komponente der Inaktivierung des Calcium-Stroms darstellen, bei verschiedenen Magnesiumionen-Konzentrationen, so zeigt sich, dass beide Parameter mit steigender Magnesiumionen-Konzentration zunehmen. Dies wird in den Graphiken (Abbildungen 39b und 40b) durch die eingefügten Regressionsgeraden verdeutlicht. Die Steigung der Beziehung zwischen der Inaktivierungs-Zeitkonstanten τ_1 und der Magnesiumionen-Konzentration beträgt 0,88. Sie ist signifikant ($p < 0,001$) von 0 verschieden. Auch eine Überprüfung der τ_1 -Werte bei den verschiedenen Magnesiumionen-Konzentrationen mit ANOVA erbrachte signifikante ($p < 0,01$) Unterschiede. Auch die Steigung für τ_2 (9,01) war signifikant verschieden von 0 ($p < 0,001$) und auch die Werte bei den verschiedenen Konzentrationen zeigten bei Überprüfung mit ANOVA eine Signifikanz der Unterschiede ($p < 0,05$).

7.1.1.2.2. Effekte von Calcium auf den Calcium-Einwärts-Strom

Wie bereits besprochen, sollte der Effekt eines weiteren divalent positiv geladenen Ions auf den Calcium-Einwärts-Strom untersucht werden. Hierzu wurde die Calciumionen-Konzentration geändert. Bei diesen Messungen traten aber erhebliche Probleme auf: Die Schwierigkeit bei der Variation der Calciumionen-Konzentration lag darin, dass Calcium einen sehr großen Einfluss auf die Funktion der Herzmuskelzelle besitzt. Somit hatte eine Variation der Konzentration Auswirkungen, die den Messvorgang schwierig gestalteten. Es sollen drei herausragende Probleme angesprochen werden: Es ist klar, dass bei Fehlen von Calciumionen in der Badlösung ($[Ca^{2+}]_o = 0$) kein Calciumionen-Strom gemessen werden kann. Als niedrigste Konzentration wurde deshalb anfangs 0,5 mmol/l gewählt. Hier war der Calcium-Strom aber noch so gering, dass bei der Messung zu viele Artefakte störten, weshalb eine valide Auswertung der Stromkurven nicht möglich war. Außerdem wurden bei dieser niedrigen Calciumionen-Konzentration die Herzmuskelzellen elektrisch instabil, so dass ein ausreichend langer Messvorgang nicht gewährleistet war. Als drittes Problem zeigte sich, dass auch bei erhöhter Calcium-Konzentration die Herzmuskelzellen eine geringere Überlebenszeit an der Messpipette aufwiesen. Grund hierfür dürfte am ehesten eine Calcium-Überladung und die damit ver-

bundene Calcium-getriggerte elektrische Instabilität sowie eine Calcium-abhängige Aktivierung von Proteasen in der Zelle sein.

Beeinflussung der Strom-Spannungs-Beziehung des Calcium-Stroms durch Variation der extrazellulären Calcium-Konzentration

In ähnlicher Weise wie in der vorangegangenen Versuchsreihe mit verschiedenen Magnesiumionen-Konzentrationen, wurden die Strom-Spannungs-Beziehungen für den Calcium-Strom bei verschiedenen Calcium-Konzentrationen aufgestellt. Die Schritte der Calcium-Konzentrationen waren 1, 1,5, 2, 3, 4 und 5 mmol/l. Ursprünglich wurden auch Strom-Spannungs-Beziehungen bei 0,5 mmol/l Calcium erstellt, die jedoch wegen des Auftretens der oben genannten Probleme von der Auswertung ausgeschlossen wurden.

Die Magnesiumionen-Konzentration wurde konstant bei 1,2 mmol/l gehalten. So konnte gezeigt werden, welchen Effekt eine Variation der Calciumionen-Konzentration im extrazellulären Milieu hat.

Auch bei diesen Versuchen zeigte sich, dass sich das Potential, bei dem der maximal erreichbare Strom ausgelöst wurde, bei steigender Calcium-Konzentration zu positiveren Potentials hin verschoben wurde. Anders als bei steigender Magnesiumionen-Konzentration war hier aber eine Zunahme des maximal gemessenen Stroms bei zunehmender Calciumionen-Konzentration zu ver-

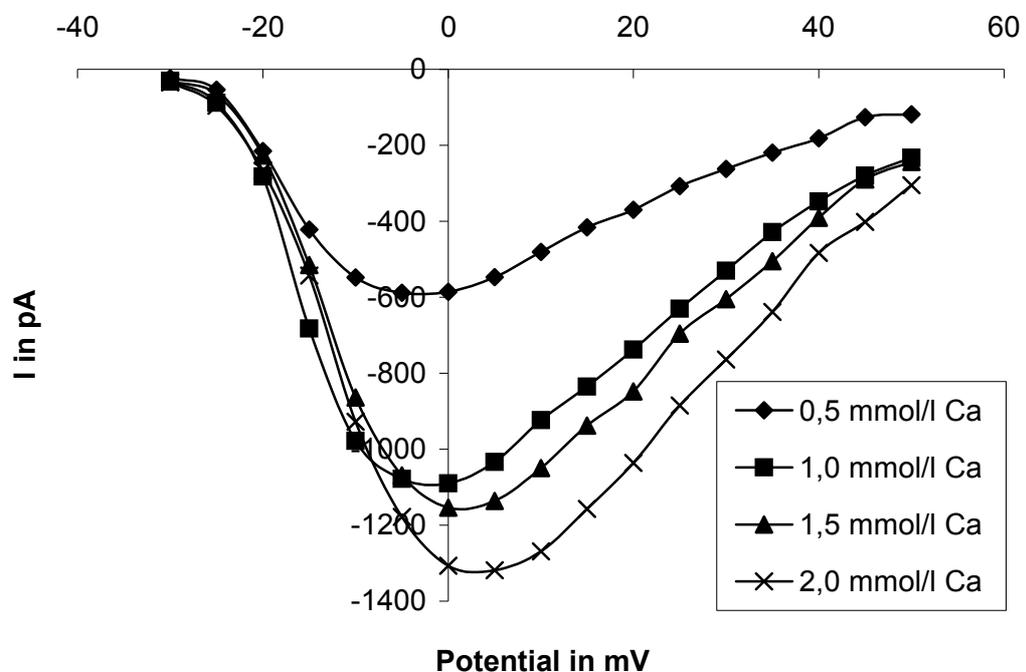


Abbildung 41:

Die Strom-Spannungs-Beziehung für den Calcium-Strom bei veränderter extrazellulärer Calciumionen-Konzentration (0,5, 1, 1,5 und 2 mmol/l Ca^{2+}).

zeichnen (Abbildung 41). Bei höherer Calciumionen-Konzentration verstärkt sich der Strom auf Grund des zunehmenden Konzentrationsgradienten zwischen Extra- und Intrazellulärraum.

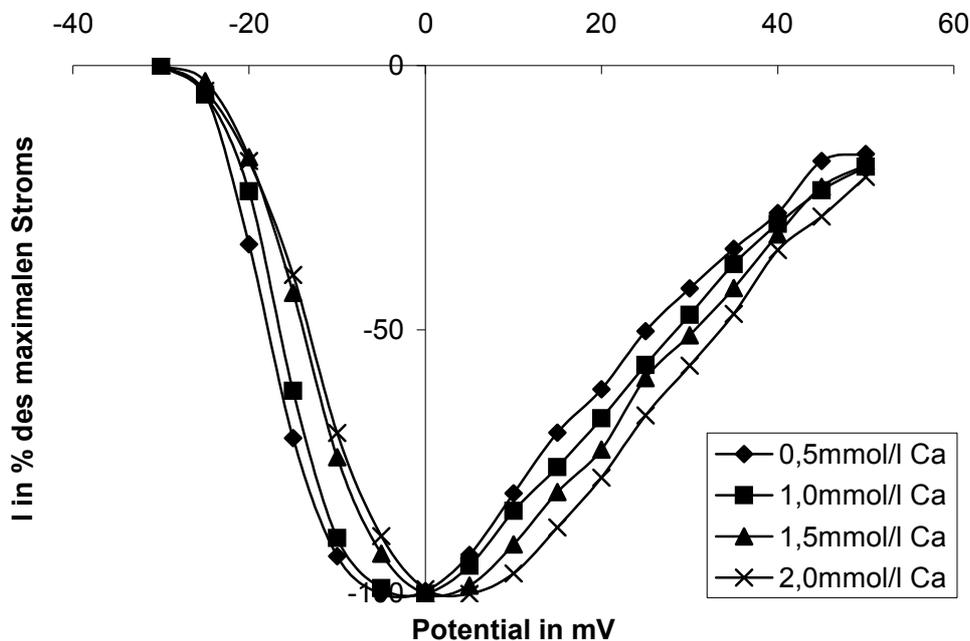


Abbildung 42:

Die Strom-Spannungs-Beziehung des Calcium-Stroms bei Änderung der Calciumionen-Konzentration (0,5, 1, 1,5 und 2 mmol/l). Relativwerte: Maximaler Strom bei der jeweiligen Calciumionen-Konzentration entspricht 100 %.

Das Hauptaugenmerk sollte jedoch auf die Verschiebung des Potentials des maximal gemessenen Stroms bei veränderter Ionen-Konzentration gerichtet werden. Um dies deutlicher darzustellen, wurden in Abbildung 42 auch diese Kurven auf gleiche Amplituden gestreckt. Ebenso wie in der vorangegangenen Versuchsreihe wurde hier $V_{1/2}$ bestimmt, also jenes Potential, bei welchem 50 % des maximalen Stroms vorhanden waren. Dazu wurden die Ergebnisse von 18 verschiedenen Zellen ausgewertet. Zur Minimierung von zeitabhängigen Veränderungen und anderen Störeinflüssen, wurden die jeweiligen Strom-Spannungs-Beziehungen bei den entsprechenden Calcium-Konzentrationen doppelt gemessen. Diese Doppelmessungen wurden dann gemittelt. Die Reihenfolge der Messungen wurde außerdem variiert.

In der folgenden Darstellung (Abbildung 43) werden alle Messungen der Verschiebung von $V_{1/2}$ bei variiert Calcium-Konzentration gezeigt. Hier repräsentiert ein Punkt das Potential von $V_{1/2}$ bei der zugehörigen Calcium-Konzentration. Es zeigt sich eine deutliche Verschiebung zu positiveren Potentialen hin.

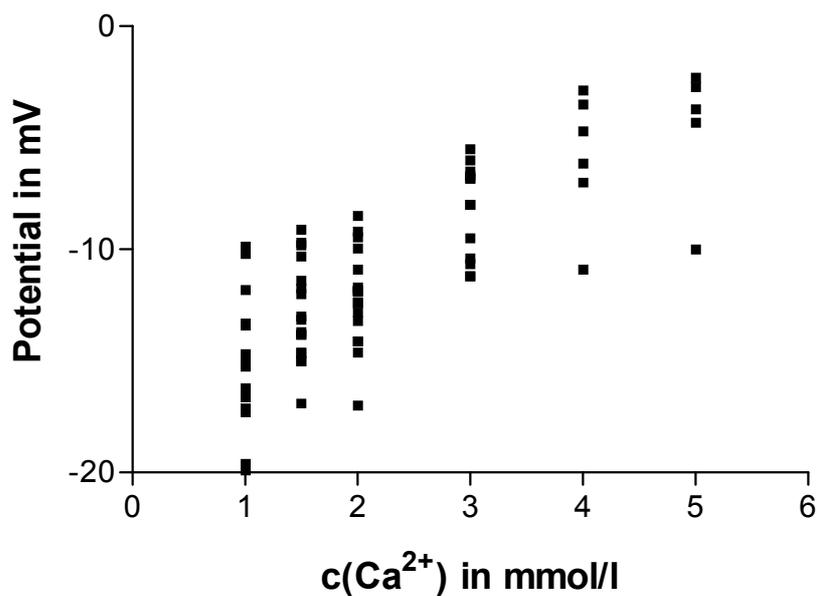


Abbildung 43:

Darstellung der $V_{1/2}$ der Strom-Spannungs-Beziehungen des Calcium-Stroms der verschiedenen Zellen bei verschiedenen Calcium-Konzentrationen. Ein Punkt entspricht jeweils dem Durchschnittswert der doppelt durchgeführten Messung.

Auswertung

In der folgenden Abbildung 44 sind die Mittelwerte der einzelnen gemessenen Potentiale von $V_{1/2}$ bei der jeweiligen Calciumionen-Konzentration dargestellt. Die Fehlerbalken zeigen die Standard-Erreres vom Mittelwert an (SEM). Ebenso wie bei der Versuchsreihe mit veränderter Magnesium-Konzentration wurde auch hier folgende Sättigungsfunktion für eine einfache Bindung eines Agens an eine Bindungsstelle an die Messwerte angepasst:

$$Y(x) = \frac{B_{\max} \cdot x}{K_d + x} + C$$

Hierbei entsprechen nun x der veränderten Calciumionen-Konzentration und K_d der Konzentration des Liganden (Calciumionen) bei halbmaximaler Sättigung der Bindungsstellen.

Auch hier wurde diese einfache mathematische Beschreibung gewählt, entsprechend der Theorie, dass die divalent positiv geladenen Ionen (hier Calciumionen) an eine bestimmte Bindungsstelle an der Zellmembran binden (Gilbert und Ehrenstein, 1969). Es fällt auch hier auf, dass diese Funktion den Effekt der variablen Calcium-Konzentration im extrazellulären Milieu im verwendeten Konzentrationsintervall (1,0 mmol/l bis 5,0 mmol/l) gut zu beschreiben scheint.

Die erhaltenen Parameter besagen, dass ein $V_{1/2}$ -Wert von $-18,62$ mV (C) bei 0 mmol/l Calcium und 1,2 mmol/l Magnesium zu erwarten wäre. Die halbmaxi-

male Verschiebung wird bei einer Calcium-Konzentration von 10,93 mmol/l (K_d) erreicht. Nach dieser Funktion wäre eine maximale Verschiebung um 46,20 mV (B_{max}) möglich (Abbildung 44). An dieser Stelle sei nochmals zu betonen, dass diese Funktion nur einem mathematischen Modell entspricht, welches das Verhalten von $V_{1/2}$ bei variabler Calciumionen-Konzentration im verwendeten Intervall (1,0 mmol/l bis 5,0 mmol/l) beschreibt.

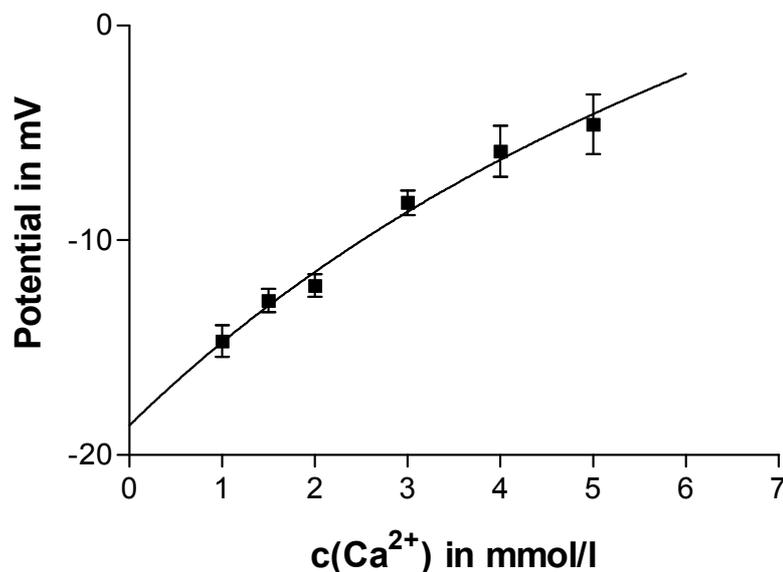


Abbildung 44:

Fit der Sättigungsfunktion $Y(x) = \frac{B_{max} \cdot x}{K_d + x} + C$ an die Messwerte $V_{1/2}$ des Calcium-

Stroms (Darstellung der Mittelwerte der Messwerte mit Standard-Fehler (SEM) bei den entsprechenden Calcium-Konzentrationen). $B_{max} = 46,20$ mV; $K_d = 10,93$ mmol/l; $C = -18,62$ mV; $R^2 = 0,6050$.

Beeinflussung der Inaktivierung des Calcium-Einwärts-Stroms durch variable Calciumionen-Konzentration.

Nun soll auch für die veränderte Calciumionen-Konzentration im extrazellulären Milieu der Effekt auf die Inaktivierung des Calcium-Einwärts-Stroms untersucht werden. Es wird das gleiche mathematische Modell wie bei den Messungen der Versuchsreihe mit variiertes Magnesiumionen-Konzentration verwendet:

$$y(t) = A \cdot e^{-\frac{t}{\tau_1}} + B \cdot e^{-\frac{t}{\tau_2}} + C$$

Diese Gleichung wird an die Messwerte für den Calcium-Strom der verschiedenen Zellen bei einem Potential von 0 mV während der Inaktivierungsphase angepasst. Dies liefert die Inaktivierungs-Zeitkonstanten τ_1 und τ_2 als Charak-

teristika der Inaktivierungs-Geschwindigkeiten in Abhängigkeit von der Calcium-Konzentration.

In den Abbildungen 45a und b sowie 46a und b sind die Inaktivierungs-Zeitkonstanten τ_1 und τ_2 in Abhängigkeit von den Calciumionen-Konzentrationen aufgetragen.

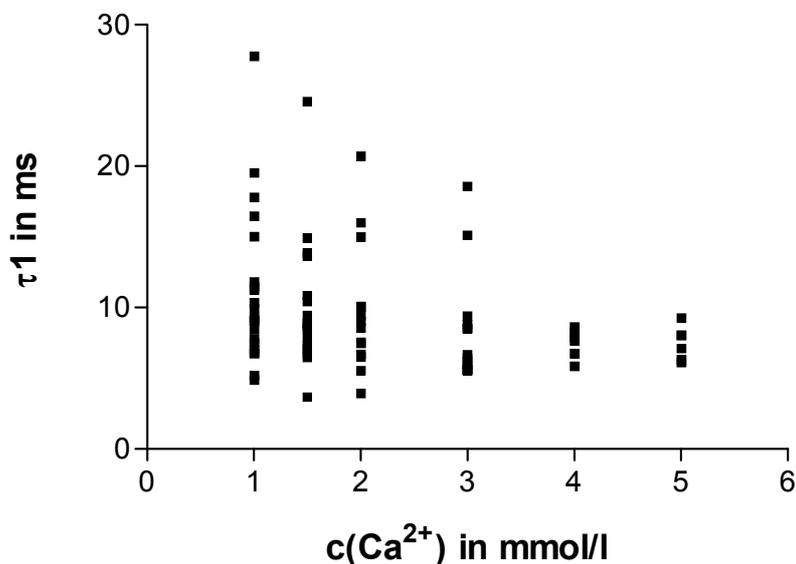


Abbildung 45a:

Einzelwerte der Inaktivierungs-Zeitkonstante τ_1 in Bezug auf die Calcium-Konzentration in der Badlösung.

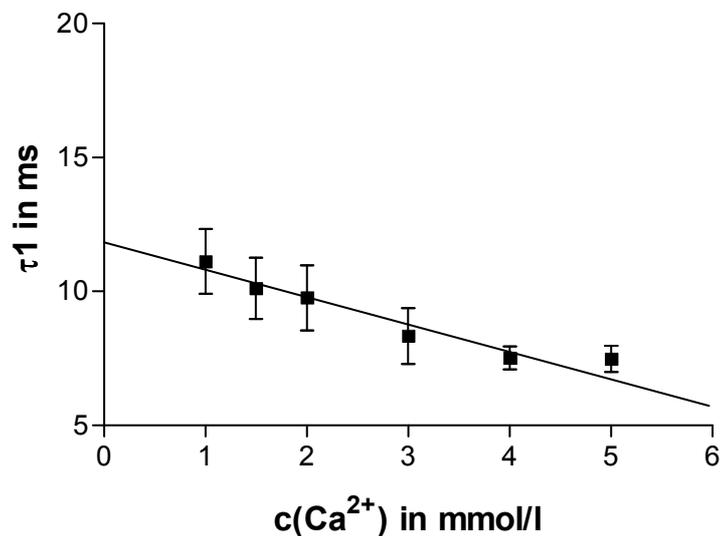


Abbildung 45b:

Mittelwerte der Inaktivierungs-Zeitkonstante τ_1 in Bezug auf die Calcium-Konzentration in der Badlösung mit Standard-Error (SEM) und der Regressionsgeraden. Die Steigung von $-1,022 \pm 0,4091$ ist signifikant ($p < 0,05$) von 0 verschieden; (Schnittpunkt mit der Ordinate bei $11,83 \pm 1,022$; $R^2 = 0,07582$).

Betrachtet man die Darstellung der Mittelwerte von τ_1 bei verschiedenen Calciumionen-Konzentrationen, so ergibt sich eine Verkürzung der Inaktivierungszeit während der schnellen Phase der Inaktivierung mit zunehmender Calciumionen-Konzentration. Die Steigung der Regressionsgeraden (-1,02) war signifikant von 0 verschieden ($p < 0,05$). Ansonsten ergab sich allerdings bei Überprüfung mit ANOVA kein signifikanter Unterschied zwischen den Werten bei verschiedenen Calcium-Konzentrationen.

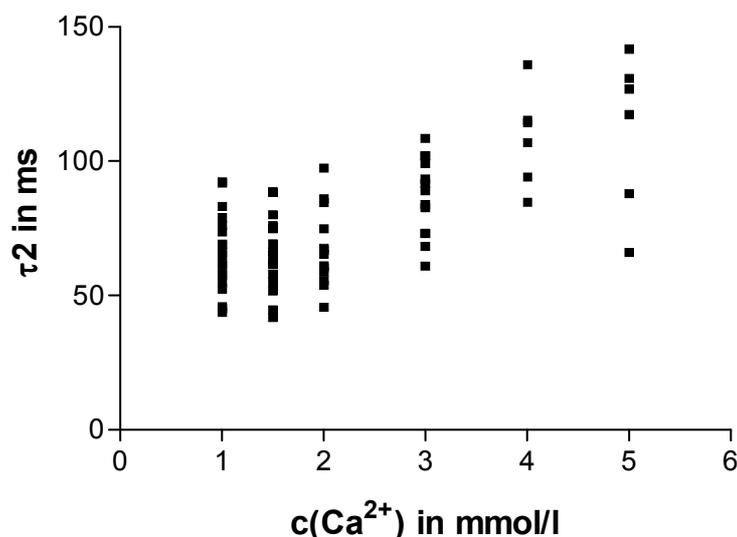


Abbildung 46a:

Einzelwerte der Inaktivierungs-Zeitkonstante τ_2 in Bezug auf die Calcium-Konzentration in der Badlösung.

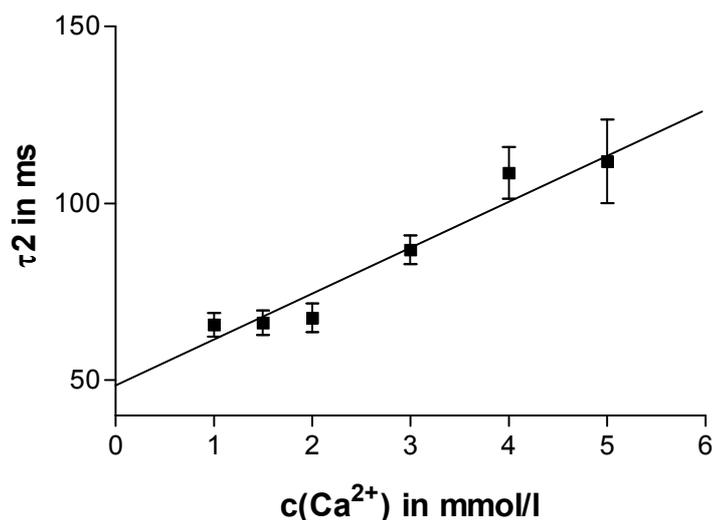


Abbildung 46b:

Mittelwerte der Inaktivierungs-Zeitkonstante τ_2 in Bezug auf die Calcium-Konzentration in der Badlösung mit Standard-Fehler (SEM) und der Regressionsgeraden. Die Steigung von $12,97 \pm 1,560$ ist signifikant ($p < 0,0001$) von 0 verschieden; (Schnittpunkt mit der Ordinate bei $48,47 \pm 3,958$; $R^2 = 0,4934$).

Im Gegensatz dazu, nimmt die Zeitkonstante der langsamen Inaktivierung (τ_2) mit zunehmender Calciumionen-Konzentration deutlich zu. Hier war sowohl die Steigung (12,97) signifikant von 0 verschieden ($p < 0,0001$) und auch die Werte bei den verschiedenen Calcium-Konzentrationen unterschieden sich signifikant ($p < 0,001$; ANOVA).

7.1.2. Verhalten der Auslöseschwelle des Natrium-Einwärts-Stroms bei veränderter Magnesiumionen-Konzentration

Um auch den Effekt von divalent positiv geladenen Ionen auf eine andere Art von spannungsabhängigen Ionen-Kanälen zu erfassen, wurde exemplarisch die Verschiebung der Auslöseschwelle des Natrium-Einwärts-Stroms an Kardiomyozyten durch Magnesiumionen untersucht. Hier sollte nicht wie beim Calciumionen-Strom eine detaillierte Beziehung ermittelt werden, sondern es sollte nur geprüft werden, ob ein Effekt zu erzielen ist. Hierzu wurden die Potentialschwellen der Auslösung des Natrium-Einwärts-Stroms bei 1,0 mmol/l und 10,0 mmol/l Magnesiumionen in der Badlösung gemessen. Die Calciumionen-Konzentration lag konstant bei 1,2 mmol/l.

7.1.2.1. Messung des Natrium-Einwärts-Stroms

Wie bei den vorhergehenden Versuchen wurde auch hier mit der Patch-Clamp-Technik gearbeitet. Als Badlösung wurde wieder eine Krebs-Henseleit-Lösung verwendet, bei der diesmal nur die Konzentration von Magnesium verändert wurde.

Für die Auslösung des Natrium-Stroms wurde das Potential, ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV, für 1000 ms auf -30 mV geklemmt (Abbildung 47). Die Periodenlänge betrug 5 s.

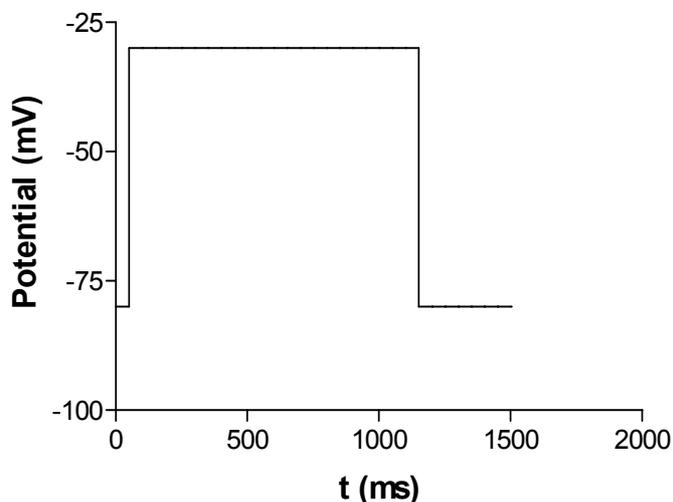


Abbildung 47:

Potentialprotokoll zur Auslösung des Natrium-Stroms in Kardiomyozyten.

Um die Auslöseschwelle für den Natrium-Strom zu bestimmen, wurde in einem ersten Depolarisationsschritt (600 ms) stufenweise (1- bzw. 2-mV-Stufen) stärker bis auf maximal -30 mV depolarisiert. In einer zweiten Stufe wurde immer auf -30 mV depolarisiert (Abbildung 48). Auf diese Weise konnte die Schwelle für die Auslösung des Natrium-Stroms bestimmt werden. Ferner konnte beurteilt werden, in wie weit beim 2. Depolarisationsschritt noch ein Natrium-Strom in Abhängigkeit von der ersten Depolarisation ausgelöst werden konnte.

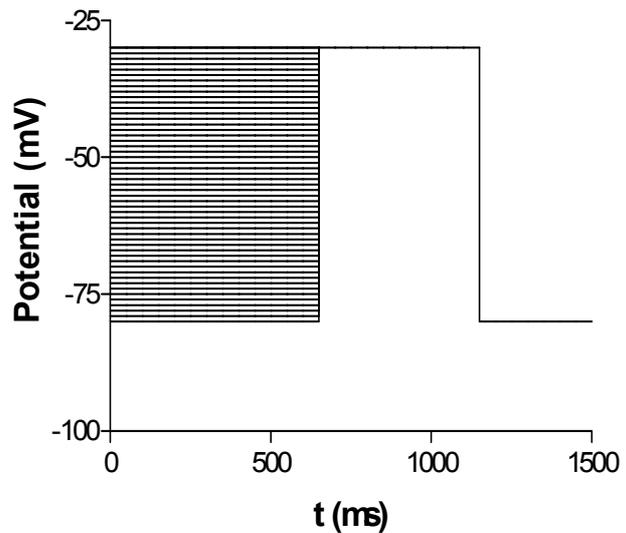


Abbildung 48:

Messprotokoll mit variablen Auslösepotentialen des Natrium-Stroms.

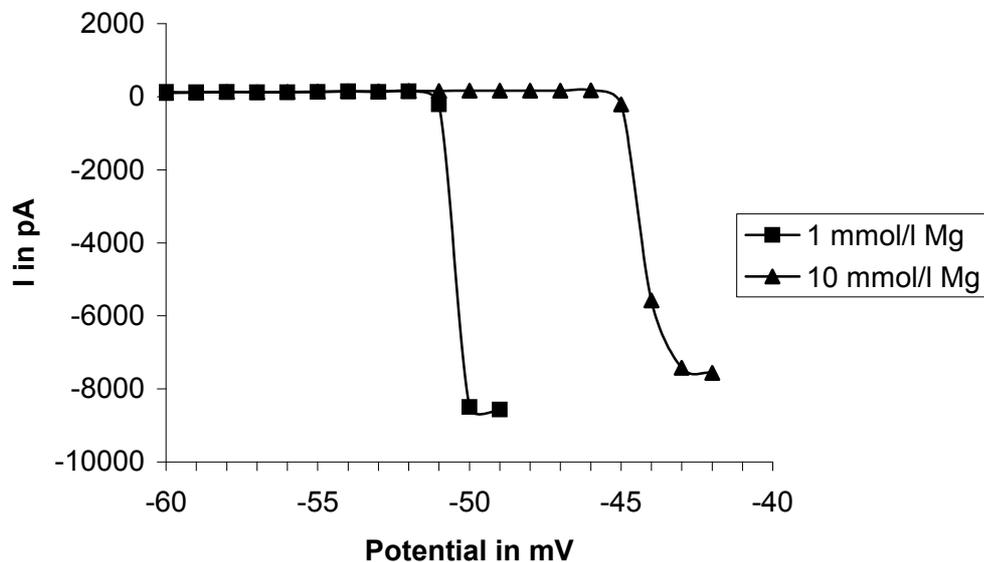


Abbildung 49:

Schwellen für die Auslösung des Natrium-Stroms bei 1 und 10 mmol/l Magnesium (Die Werte wurden an einer Zelle in Gegenwart von 1,2 mmol/l Calcium bestimmt).

Die Aufstellung einer exakten Strom-Spannungs-Beziehung für den Natrium-Strom und die Bestimmung eines Potentials für den halbmaximalen Strom ($V_{1/2}$) ist bei den gegebenen Ionen-Konzentrationen nicht möglich, da der Natrium-Strom so stark ist, dass er die Kapazität des Patch-Clamp-Verstärkers übersteigt (Maximalstrom des Verstärkers ca. 10 nA). Deshalb wurde lediglich bestimmt, bei welchem Potential ein starker Natrium-Strom ausgelöst wird und wie diese Auslöseschwelle für den Natrium-Strom durch Magnesium verändert wird. In Abbildung 49 wird eine solche Messung bei 1 und 10 mmol/l Magnesium gezeigt. Aus der Abbildung geht hervor, dass eine Erhöhung der Magnesiumionen-Konzentration in der Badlösung auch eine Erhöhung der Aktivierungsschwelle der Natrium-Kanäle bedingt. Es wird auch sichtbar, dass der gemessene Strom deutlich größer ist als der Calcium-Strom. Ebenso wie in den vorangegangenen Versuchsreihen wurden Doppelmessungen durchgeführt, um eventuelle Störeinflüsse zu minimieren. Außerdem wurde die Reihenfolge der Versuche variiert. Die Schwellenpotentiale wurden bei 1 mmol/l Magnesiumionen an 18 Zellen und bei 10 mmol/l Magnesiumionen an 15 Zellen gemessen.

7.1.2.1.1. Änderung der Aktivierungsschwelle des Natrium-Einwärts-Stroms bei Erhöhung der Magnesiumionen-Konzentration von 1 mmol/l auf 10 mmol/l.

In der folgenden Abbildung 50 wurden die bestimmten Potentiale für die Auslöseschwelle des Natrium-Stroms bei 1 und 10 mmol/l Magnesium in der Badlösung bei einer konstanten Calciumionen-Konzentration von 1,2 mmol/l als Einzelwerte aufgetragen. Bereits bei Darstellung der Einzelwerte wird eine Verschiebung des Schwellenpotentials für den Natrium-Strom zu weniger negativen Potentialen deutlich. Die Abbildung 51 zeigt die Mittelwerte der Schwellenpotentiale. Der Mittelwert für die Schwellenpotentiale bei 1 mmol/l Magnesium betrug $-50,21 \pm 0,71$ mV und der bei 10 mmol/l $-44,03 \pm 0,66$ mV. Der Unterschied war hochsignifikant ($p < 0,0001$). Die Verschiebung des Schwellenpotentials für die Auslösung des Natrium-Stroms bei einer Anhebung der Magnesiumionen-Konzentration von 1 mmol/l auf 10 mmol/l belief sich auf ca. $6,18 \pm 0,99$ mV. Die Ergebnisse zeigen klar, dass eine Erhöhung der Magnesiumionen-Konzentration in der Badlösung auch die Auslöseschwelle für den Natrium-Einwärts-Strom an ventrikulären Kardiomyozyten deutlich verschiebt.

Somit scheint die Wirkung von divalent positiv geladenen Ionen nicht auf den L-Typ-Calcium-Kanal beschränkt zu sein. Die Untersuchung wurde deshalb auf den Natrium-Kanal ausgedehnt, da dieser ähnlich wie der L-Typ-Calcium-Kanal aufgebaut ist und auch den Spannungssensor im transmembranären Segment S4 enthält.

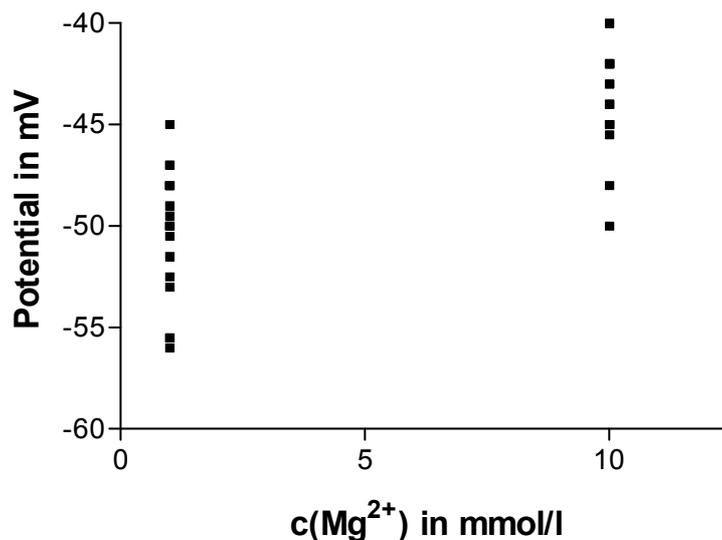


Abbildung 50:

Einzelwerte der Schwellenpotentiale für die Auslösung des Natrium-Strom bei 1 und 10 mmol/l Magnesium (jeder Wert stellt den Mittelwert einer Doppelbestimmung dar).

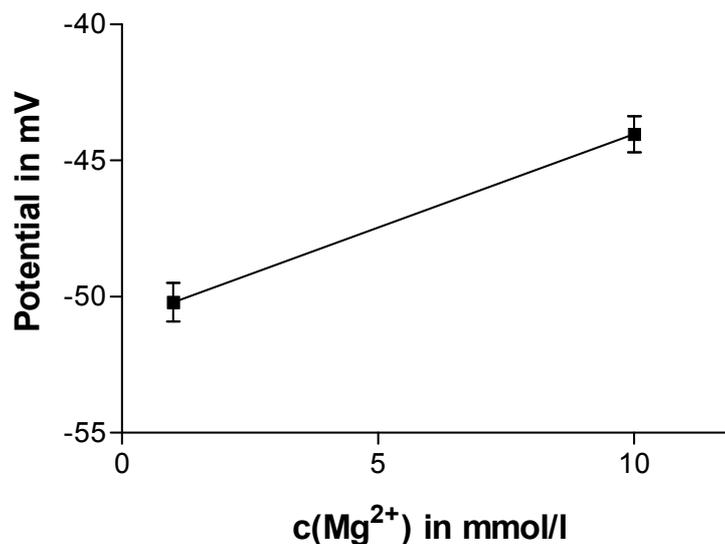


Abbildung 51:

Änderung des Schwellenpotentials für die Auslösung des Natrium-Stroms bei Erhöhung der Magnesium-Konzentration von 1 und 10 mmol/l (Mittelwerte der in Abb. 50 gezeigten Einzelwerte). Der Mittelwert des Schwellenpotentials bei einer Magnesium-Konzentration von 1 mmol/l liegt bei $-50,21 \pm 0,71$ mV und von 10 mmol/l bei $-44,03 \pm 0,66$ mV; der Unterschied der Auslöseschwellen bei 1 und 10 mmol/l Mg^{2+} ist hochsignifikant ($p < 0,0001$) und beträgt $6,18 \pm 0,99$ mV.

7.1.3. Zusammenfassung der Versuchsreihen

In den Versuchsreihen dieser Arbeit sollte der Effekt von divalent positiv geladenen Ionen auf den Calcium-Einwärts-Strom von ventrikulären Myokardzellen von Meerschweinchenherzen untersucht werden. Als Beispiele dafür wurden Calcium- und Magnesiumionen gewählt, da diese bereits physiologischerweise im extrazellulären Milieu vorkommen. Das Hauptaugenmerk wurde auf die Verschiebung der Strom-Spannungs-Beziehung dieses Stroms zu weniger negativen bzw. stärker positiven Potentialen hin bei steigender Konzentration dieser Ionen gerichtet. Zur Vereinfachung der Messungen wurde $V_{1/2}$ vermessen. Das bedeutet es wurden die Potentiale bestimmt, bei welchen der Calcium-Einwärts-Strom 50 % des maximal erreichten Stroms der Strom-Spannungs-Beziehung betrug. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass beide Ionenarten das $V_{1/2}$ -Potential bei steigender Konzentration zu positiveren Potentialen hin verschieben. Die Ionen-Konzentrationen wurden in mehreren Schritten gesteigert, so dass für Magnesiumionen und für Calciumionen eine Konzentrations-Wirkungs-Beziehung dargestellt werden konnte. An die erhaltenen Messkurven wurden, getrennt je nach variiertes Ionenart, die mathematische Beschreibung einer einfachen Bindungsfunktion mittels Fit-Algorithmus angepasst. Die erhaltenen

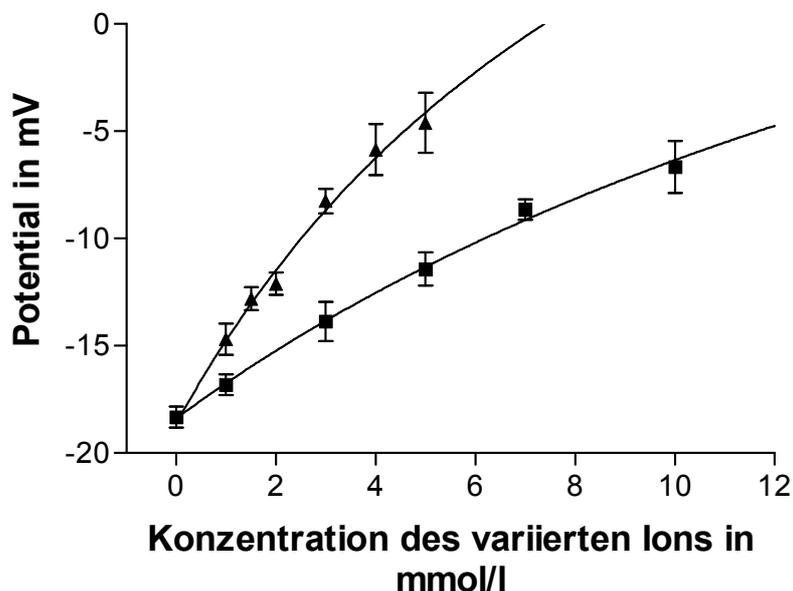


Abbildung 52:

Verschiebung von $V_{1/2}$ der Aktivierung des Calcium-Einwärts-Stroms. Darstellung der Zusammenfassung der Versuchsreihen mit veränderter Magnesium- (Quadrate) und Calciumionen-Konzentration (Dreiecke).

Die ermittelten Variablen betragen

für Mg^{2+} : $B_{max} = 40,70$ mV; $K_d = 23,81$ mmol/l und $C = -18,38$ mV;

für Ca^{2+} : $B_{max} = 46,20$ mV; $K_d = 10,93$ mmol/l und $C = -18,62$ mV.

Kurven scheinen das Verhalten von $V_{1/2}$ des Calcium-Einwärts-Stroms in den verwendeten Konzentrationsintervallen (Calciumionen: 1 bis 5 mmol/l; Magnesiumionen 0 bis 10 mmol/l) hinreichend gut zu beschreiben, so dass einige Aussagen getroffen werden können.

Zur Veranschaulichung werden in Abbildung 52 nochmals die Kurven gezeigt, welche die Mittelwerte der gemessenen Potentiale von $V_{1/2}$ bei der jeweiligen Ionen-Konzentration wiedergeben. Eine Kurve stellt die Verschiebung von $V_{1/2}$ bei veränderter Magnesiumionen-Konzentration dar (Mittelwerte der einzelnen Messungen mit Quadraten dargestellt) und die andere bei veränderter Calciumionen-Konzentration (hier sind die Mittelwerte der einzelnen Messungen als Dreiecke dargestellt). Zusätzlich sind in die Graphik noch die Kurven der angepassten Graphen der Sättigungsfunktion mit einfacher Bindungskinetik eingezeichnet.

Hier sieht man, dass beide divalent positiv geladenen Ionen einen ähnlichen Effekt auf die Verschiebung von $V_{1/2}$ haben, nämlich dass $V_{1/2}$ entlang der Potential-(x-)Achse verschoben wird. Ebenso lassen sich die Verläufe der Beziehung der Potentialverschiebung von $V_{1/2}$ zur Konzentration des jeweiligen Ions mit einer Sättigungsfunktion für einfache Bindungskinetik beschreiben.

Die Ausgangswerte bei Abwesenheit des jeweiligen Ions sind annähernd gleich. $C(\text{Mg})$, also das Potential von $V_{1/2}$ bei 0 mmol/l Magnesium und 1,2 mmol/l Calcium, wurde hier mit $-18,38$ mV ermittelt. $C(\text{Ca})$, d.h. das Potential von $V_{1/2}$ bei 0 mmol/l Calcium und 1,2 mmol/l Magnesium, wurde mit $-18,62$ mV ermittelt.

Die maximal möglichen Verschiebungen des Potentials von $V_{1/2}$ in Relation zum Ausgangspunkt (C) durch Magnesium und Calcium sind ähnlich. Das ermittelte $B_{\text{max}}(\text{Mg})$ lag bei $40,70$ mV. Das bedeutet, dass sich das Potential für halbmaximalen Strom, bei Anwendung dieses mathematischen Modells, um maximal $40,70$ mV verschieben lässt. Im angewandten Modell wären dann alle Bindungsstellen für Magnesiumionen besetzt.

In der Versuchsreihe mit veränderter Calciumionen-Konzentration ergab sich für $B_{\text{max}}(\text{Ca})$ ein Wert von $46,20$ mV, was der maximalen Potentialverschiebung durch Calcium entspricht.

Nach diesem Ergebnis wäre durch Änderung der Konzentration an 2-wertigen Ionen (Calcium oder Magnesium) eine maximale Änderung des Potentials für einen halbmaximalen Calcium-Strom um 41 bis 46 mV möglich. Demnach würde hier ein etwa gleicher Effekt resultieren, wenn die hypothetischen Rezeptoren vollständig mit Magnesium- oder Calciumionen besetzt wären. Es ist klar, dass diese ermittelten Werte relativ unsicher sind, da keine Messungen bei hohen Konzentrationen von 2-wertigen Ionen durchgeführt wurden.

Der K_d -Wert dieses mathematischen Modells gibt an, wie hoch die Ionen-Konzentration sein muss, um die Hälfte des maximal erreichbaren Effekts zu erzielen. Das bedeutet, dass dieser Wert ein Maß für die Affinität des Liganden zum Rezeptor und damit für die Potenz („potency“) des Liganden ist. Da es sich

bei dem K_d -Wert um die Dissoziationskonstante handelt, bedeutet ein höherer Wert eine geringere Potenz des Liganden.

Für Magnesium wurde für diesen Parameter ($K_d(\text{Mg})$) ein Wert von 23,81 mmol/l ermittelt und für Calcium ($K_d(\text{Ca})$) ein Wert von 10,93 mmol/l. Bei Anwendung dieses Modells verschieben also Calciumionen das Potential von $V_{1/2}$ ungefähr doppelt so stark wie Magnesiumionen.

Um eine weitere Kenngröße des Calcium-Einwärts-Stroms zu beleuchten, wurde zusätzlich die Änderung der Inaktivierungszeiten unter verschiedenen Calcium- und Magnesiumionen-Konzentrationen untersucht, genauer die Konstanten der bi-exponentiellen Funktion, die die Inaktivierung beschreiben. Dabei ergab dies, dass die langsame Inaktivierung des Calcium-Einwärts-Stroms (gekennzeichnet durch die Zeitkonstante τ_2) durch steigende Magnesium- und Calciumionen-Konzentrationen verlangsamt wird. Bei der schnellen Inaktivierung verhält sich die zugehörige Zeitkonstante τ_1 unterschiedlich: Bei steigender Magnesiumionen-Konzentration nimmt sie zu (die Inaktivierung verlangsamt sich) und bei steigender Calciumionen-Konzentration nimmt sie ab (die Inaktivierung wird schneller). Allerdings ergab sich für die Variation der Calciumionen-Konzentration wegen der relativ großen Streuung der Werte nur eine Tendenz. Zusammenfassend scheint die Änderung der langsamen Inaktivierungskomponente eher abhängig von der Ladung des Ions und somit vom Membranpotential, die schnelle Inaktivierungskomponente jedoch abhängig von der Ionenart zu sein (siehe hierzu die Abbildungen 39 und 40 sowie 45 und 46).

Schließlich sollte in dieser Arbeit auch noch die Wirkung eines divalent positiv geladenen Ions auf die Potentialabhängigkeit eines weiteren Ionen-Kanals beleuchtet werden. Als Beispiel wurde hier die Wirkung einer veränderten Magnesiumionen-Konzentration im extrazellulären Milieu auf die Aktivierung des Natrium-Einwärts-Stroms gewählt. Auch bei diesem Kanaltyp ergab sich eine Verschiebung der Potentialabhängigkeit bei steigender Magnesiumionen-Konzentration zu positiveren Potentialen hin, die allerdings etwas geringer ausfiel als die für den Calcium-Kanal.

7.1.4. Bestimmung der Verschiebung der IU-Beziehung mit Hilfe einer mathematischen Funktion

Den Messpunkten, welche die Strom-Spannungs-Beziehungen beschreiben, kann eine mathematische Funktion angenähert werden, um den Verlauf der Kurven zu beschreiben. Dazu eignen sich sog. Chebychev-Polynome. Mit Hilfe dieser Polynome lässt sich eine beliebige, also auch eine unbekannte Funktion, beschreiben. Wir verwendeten für die Anpassung einer Kurve an die Messwerte Chebychev-Polynome 8. Grades. Die Anpassung erfolgte durch eine Chi-Quadrat-Minimierung mit Hilfe des Programms Mathematica (Version 5). Das Ergebnis ist in Abbildung 53 wiedergegeben.

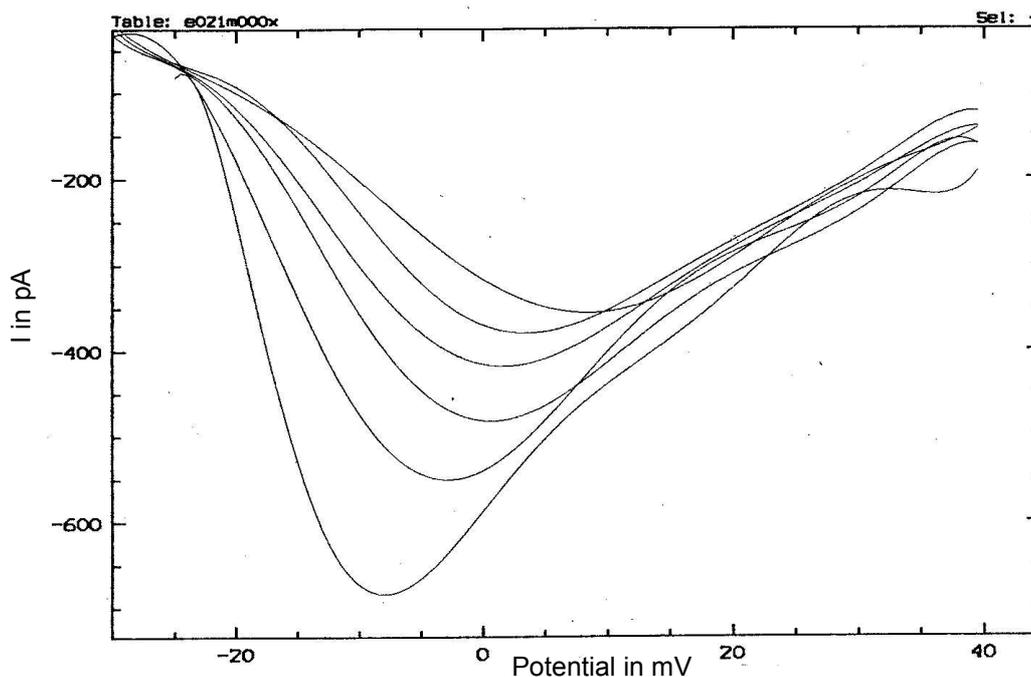


Abbildung 53:

Strom-Spannungs-Beziehungen einer Versuchsreihe mit 0, 1, 2, 3, 4 und 5 mmol/l Magnesium. Die Calciumionen-Konzentration lag konstant bei 1,2 mmol/l. Die gezeichneten Kurven entsprechen den Funktionen der angepassten Chebyshev-Polynome 8. Grades (Berechnung und Darstellung mit Hilfe von Mathematica 5.0).

Mit Hilfe der angepassten Funktion lassen sich die Potentiale für die halbmaximalen ($V_{1/2}$) und die maximalen (V_{max}) Calcium-Ströme bei den verschiedenen Ionen-Konzentrationen berechnen. Die vorhandenen Daten wurden mit dieser Methode erneut analysiert und dann wieder Sättigungsfunktionen an die resultierenden Werte ($V_{1/2}$ und V_{max}) angepasst. Abbildung 54 zeigt die Mittelwerte der errechneten Werte für $V_{1/2}$ (Potential für die halbmaximale Strom-Auslösung) sowohl bei veränderter Calcium- als auch veränderter Magnesiumionen-Konzentration. Hier sind auch bereits die mathematisch gefitteten Kurven der Sättigungsfunktion für die veränderten Magnesium- und Calcium-Konzentrationen eingezeichnet, ebenso die Ergebnisse der angenäherten Parameter. Auch mit dieser Methode wird das vorhergehende Ergebnis bestätigt, dass Calciumionen ($K_d = 6,65$ mmol/l) stärker wirksam sind als Magnesiumionen ($K_d = 9,28$ mmol/l). Allerdings liegen die Konstanten deutlich niedriger als die, die per Interpolation der IU-Kurven für den Calcium-Strom gewonnen wurden.

Abbildung 55 zeigt die Mittelwerte der errechneten Potentiale bei den Maxima der Calcium-Ströme. Hier sind auch die beiden Kurven der errechneten Sättigungsfunktionen für das jeweilige variierte Ion mit den zugehörigen Parametern aufgetragen. Auch bei Betrachtung der Verschiebung der Maxima der IU-Beziehung bestätigt sich, dass Calciumionen deutlich stärker wirksam sind als Magnesiumionen (für Magnesiumionen ist hier $K_d = 19,69$ mmol/l und für Calciumionen ist $K_d = 11,77$ mmol/l). Diese K_d -Werte liegen im selben Bereich wie die, die sich bei graphischer Bestimmung des Potentials für halbmaximalen Strom ergaben.

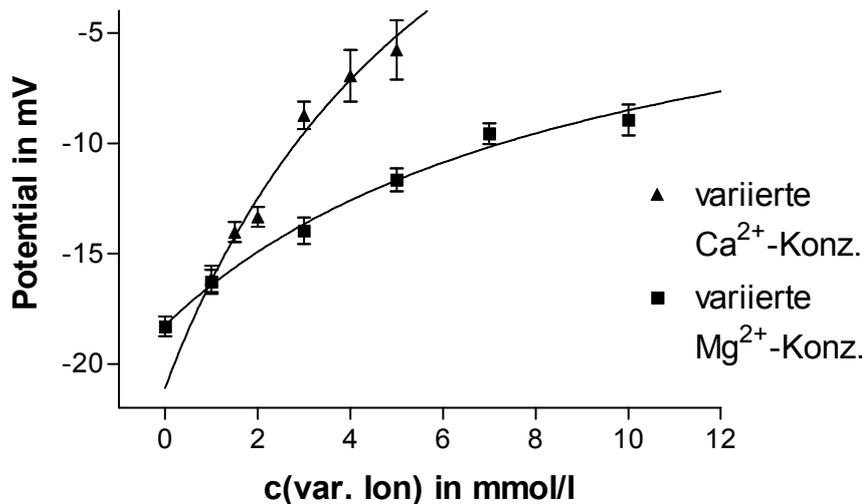


Abbildung 54:

Mittelwerte und Standardfehler der errechneten Potentiale bei 50 % des maximalen Calciumionen-Stroms bei veränderter Magnesiumionen- (Quadrate) und Calciumionen-Konzentration (Dreiecke). Mit eingezeichnet sind die Graphen der den errechneten Werten angenäherten Sättigungsfunktionen, jeweils für Calcium- und Magnesiumionen. Die errechneten Variablen lauten:

Für variierte Mg²⁺-Konz.: $B_{\max} = 18,80$ mV; $K_d = 9,279$ mmol/l; $C = -18,26$ mV
($R^2 = 0,6776$)

Für variierte Ca²⁺-Konz.: $B_{\max} = 37,16$ mV; $K_d = 6,646$ mmol/l; $C = -21,09$ mV
($R^2 = 0,6381$)

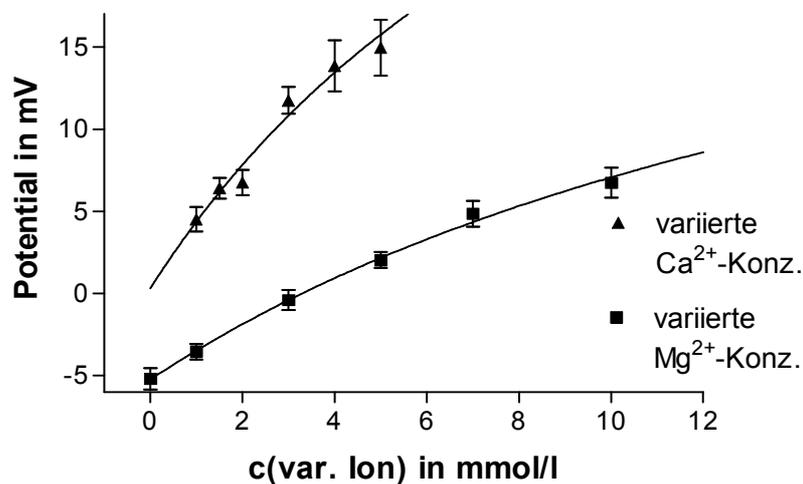


Abbildung 55:

Mittelwerte und Standardfehler der errechneten Potentiale bei den Maxima der Calciumionen-Ströme bei veränderter Magnesiumionen- (Quadrate) und Calciumionen-Konzentration (Dreiecke). Mit eingezeichnet sind die Graphen der den errechneten Werten angenäherten Sättigungsfunktionen, jeweils für Calcium- und Magnesiumionen. Die errechneten Variablen lauten:

Für variierte Mg²⁺-Konz.: $B_{\max} = 36,54$ mV; $K_d = 19,69$ mmol/l; $C = -5,235$ mV
($R^2 = 0,7120$)

Für variierte Ca²⁺-Konz.: $B_{\max} = 51,80$ mV; $K_d = 11,77$ mmol/l; $C = 0,3093$ mV
($R^2 = 0,7120$)

7.1.4.1. Beurteilung

Der Grund der Abweichung der K_d -Werte für die errechneten Potentiale bei den halbmaximalen Calcium-Strömen ($V_{1/2}$) von den Werten bei den Potentialen, die graphisch bestimmt wurden, besteht am ehesten darin, dass bei der Berechnung der $V_{1/2}$ -Werte Variationen der Ströme zu Beginn der Strom-Spannungs-Beziehungen (nahe -30 mV) die Fitkurve für den aufsteigenden Teil der IU-Beziehung relativ stark beeinflussen. Im Gegensatz dazu wirken sich diese Variationen bei der Berechnung des Potentials für den maximalen Strom der Strom-Spannungs-Beziehung nur wenig aus.

7.1.4.2. Anwendung der Formel von Gilbert und Ehrenstein

Gilbert und Ehrenstein stellten 1969 in ihrer Arbeit einen mathematischen Bezug zwischen der Konzentration der divalent positiv geladenen Calcium- und Magnesiumionen und der Verschiebung der Strom-Spannungs-Kurven her. Sie arbeiteten mit Tintenfischaxonen und bestimmten die Leitfähigkeiten von Kalium-Kanälen bei variierten Calcium- und Magnesiumionen-Konzentrationen. In ihrem Modell berücksichtigten sie auch eine mögliche Bindung, die divalente Ionen mit den negativen Ladungen der Membran eingehen und dadurch das elektrische Feld innerhalb der Membran und somit die Potentialabhängigkeit von Ionenkanälen beeinflussen können. Grundlage des mathematischen Modells war die Gleichung von Grahame (1947), die den Effekt positiver Ionen beschreibt, die sich an eine gleichmäßig negativ geladene Membran anlagern. Damit vereint das Modell von Gilbert und Ehrenstein die Vorstellung der unspezifischen Anlagerung und der spezifischen Bindung divalent positiv geladener Ionen an negative Elementarladungen der Zellmembran. Das Modell von Gilbert und Ehrenstein wird durch folgende mathematische Beziehung beschrieben:

$$d^2 \cdot (K \cdot M \cdot e^{2H \cdot (B - V_{1/2})} + 1) = \frac{G}{\sqrt{\sum_{i=1}^n C_i \cdot [e^{Z_i \cdot H \cdot (B - V_{1/2})} - 1]}}$$

Wobei: d = mittlerer Abstand der Ladungen an der Zellmembran

K = Ausgleichskonstante der Ladungsneutralisation

M = effektive Kationen-Konzentration ($ef \cdot c(\text{Mg}^{2+}) + ef \cdot c(\text{Ca}^{2+})$)

ef = Effektivitätskoeffizient ($ef(\text{Ca})=1$; $ef(\text{Mg})=0,5$)

$$H = \frac{F}{R \cdot T}$$

F= Faraday-Konstante

R= Allgemeine Gaskonstante

T= Temperatur in K (= 308 K)

$$G = \frac{F}{N} \cdot \sqrt{\frac{2\pi}{R \cdot T \cdot D \cdot D_0}}$$

N = Avogadro-Konstante

D = Dielektrizitätskonstante von Wasser

D₀ = Dielektrizitätskonstante bei Vakuum

B = Konstante, welche die Beziehung zwischen V_{1/2} und dem Oberflächenpotential wiedergibt

V_{1/2} = Membranpotential bei halbmaximalem Strom

C_i = Konzentration der vorhandenen Kationen

Z_i = Ladung des Kations

Beispielhaft wurden in der vorliegenden Arbeit die berechneten Potentiale aus den Versuchsreihen mit veränderter Magnesiumionen- und konstanter Calciumionen-Konzentration verwendet, um per Chi-Quadrat-Minimierung nach der Levenberg-Marquardt-Methode d (den mittleren Abstand der Ladungen an der äußeren Membran) zu erhalten. Für C_i = Konzentration der vorhandenen Kationen (n=4) wurden entsprechend Na⁺ = 140 mmol/l, K⁺ = 5,9 mmol/l, Ca²⁺ = 1,2 mmol/l und Mg²⁺ = variabel eingesetzt. Statt der V_{1/2}-Werte wurden die berechneten V_{max}-Werte verwendet, da sie sich als weniger störanfällig erwiesen. Wie in der Arbeit von Gilbert und Ehrenstein wurde der Parameter K auf 0,0001 (mmol/l)⁻¹ festgelegt. Ebenso wurde hier mit einem Effektivitätskoeffizienten e_f für Calciumionen von 1 und für Magnesiumionen von 0,5 gearbeitet.

Für den mittleren Abstand der Ladungen an der äußeren Membran ergab sich ein d von etwa 1,5 nm. Es ist klar, dass dieser Wert wegen des Vorhandenseins mehrerer unbekannter Parameter und des begrenzten Konzentrationsbereichs mit einer großen Unsicherheit behaftet ist und deshalb nur einen sehr groben Schätzwert darstellt.

Die Fläche pro Ladung an der Membranoberfläche entspricht dann nach Gilbert und Ehrenstein dem Quadrat des Ladungsabstandes:

$$A = d^2.$$

Demnach wäre die Fläche pro Elementarladung A = 2,25 nm².

8. DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, primär den Einfluss verschiedener Konzentrationen divalent positiv geladener Ionen am Beispiel von Magnesium- und Calciumionen auf die Verschiebung der Strom-Spannungs-Beziehung von L-Typ-Calcium-Kanälen in ventrikulären Kardiomyozyten zu zeigen. Erstmals wurde für diese Fragestellung die Ionen-Konzentrationen in einem relativ schmalen Bereich variiert, nämlich für Magnesiumionen zwischen 0 und 10 mmol/l sowie für Calciumionen zwischen 1 und 5 mmol/l. Die Konzentrationen der jeweiligen Ionen wurden in getrennten Versuchsreihen variiert, um den Effekt der einzelnen Ionenart herausarbeiten zu können. Hier zeigte sich, dass Calciumionen das Potential bei 50 % des maximalen Calcium-Einwärts-Stroms ($V_{1/2}$) ungefähr doppelt so wirksam zu weniger negativen bzw. zu stärker positiven Potentialen hin verschieben als Magnesiumionen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Größe der Potentialverschiebung in Relation zur jeweiligen Ionen-Konzentration im verwendeten Intervall relativ gut durch das mathematische Modell der Bindungsfunktion eines Agonisten an einen Rezeptor beschrieben werden kann.

Als weiterer Aspekt wurde noch die Reaktion der Inaktivierungskinetik des Calcium-Einwärts-Stroms untersucht. Auf Grund der erheblichen Streuung der bestimmten Werte konnten keine sicheren Aussagen gemacht werden. Allerdings ergeben sich Tendenzen bei Betrachtung der Inaktivierungs-Zeitkonstanten τ_1 und τ_2 bei verschiedenen Calcium- und Magnesiumionen-Konzentrationen. So wird die schnelle Inaktivierung durch steigende Magnesiumionen-Konzentration offenbar verlangsamt, während sie durch steigende Calciumionen-Konzentration beschleunigt wird. Im Gegensatz dazu, scheint die langsame Inaktivierung sowohl durch eine steigende Magnesium- als auch Calciumionen-Konzentration verlangsamt zu werden.

Weiterhin zeigte sich, dass nicht nur die Strom-Spannungs-Beziehung für den L-Typ-Calcium-Kanal, sondern auch die Aktivierungsschwelle für den Natrium-Kanal durch Erhöhung der Magnesiumionen-Konzentration zu weniger negativen bzw. stärker positiven Potentialen hin verschoben wird.

8.1. *Wie beeinflussen divalent positiv geladene Ionen den Calcium-Einwärts-Strom an ventrikulären Kardiomyozyten?*

Bereits Sydney Ringer erkannte vor mehr als 100 Jahren, dass Calcium essenziell für die Funktion des Herzmuskels ist. Außerdem wird Calcium eine sog. stabilisierende Eigenschaft an Membranen zugesprochen, was bedeutet, dass eine Erhöhung der Calciumionen-Konzentration im extrazellulären Milieu den Ruhemembranwiderstand und die Schwelle der elektrischen Erregung von Muskeln und Nerven erhöht und eine Verringerung der Calciumionen-Konzentration gegenteilig wirkt (Brink, 1954). In den folgenden Jahren zeigte sich, dass verschiedene divalent positiv geladene Ionen (inklusive Magnesiumionen) grundsätzlich ähnliche Effekte wie Calcium hervorrufen.

Die Verschiebung der Strom-Spannungs-Beziehung von Natrium-Kanälen durch Calcium zu weniger negativen bzw. stärker positiven Potentialen wurde 1957 von Frankenhäuser und Hodgkin nachgewiesen. Zusammenfassend lässt sich mittlerweile feststellen, dass nahezu alle membranständigen spannungsabhängigen Kanäle sich derart beeinflussen lassen. So zeigt sich, dass die in dieser Arbeit beobachteten Effekte nicht auf spezielle Kanäle oder Gewebe beschränkt sind.

8.1.1. Die Theorie der Oberflächenpotentiale

Als Erklärung für diese Potentialverschiebung stellten Frankenhäuser und Hodgkin die sog. Theorie der Oberflächenpotentiale auf. Ausgangspunkt dieser Theorie ist die Vorstellung, dass an der äußeren Zellmembranoberfläche v.a. negative Ladungen vorhanden sind. Diese stammen aus den negativ geladenen Molekülen der Lipiddoppelschicht und aus den ionisierten Gruppen der Kanalproteine selbst.

Befindet sich eine solche Membran in Kontakt mit einer Lösung mit divalenten positiven Ionen, werden diese durch die negativen Ladungen angezogen und lagern sich dort vermehrt an. Man spricht teilweise sogar von der Bildung einer Ionenatmosphäre an der Zellmembran. Vor allem die doppelt positiven Elementarladungen der divalenten Ionen, die in unmittelbarer Nähe der Membran liegen, können das elektrische Feld auch innerhalb der Membran verändern. Geschieht dies in der Nähe eines spannungsabhängigen Kanals, wird dadurch auch der intramembranär gelegene Spannungssensor des Kanals, der die Potentialveränderungen in der näheren Umgebung misst, beeinflusst.

Abbildung 56 soll diese Theorie graphisch erläutern. Sie zeigt eine Doppelschichtmembran mit negativen Ladungen an der äußeren Oberfläche. Die Lösungen des Zellinneren und Zelläußeren unterscheiden sich in ihrer Zusammensetzung, also besteht ein elektrisches Potential zwischen beiden Lösungen (E_M). Die dicke Linie soll den eindimensionalen Verlauf des Potentials auf der Strecke x ($\Psi(x)$) darstellen. Sind bei hoher Ionen-Konzentration alle negativen Ladungen der Membranaußenseite durch divalente Ionen (hier als Beispiel Calciumionen) abgesättigt, so fällt nahezu das gesamte Potential E_M über der Zellmembran ab wie in Abbildung 56 (A) gezeigt. Der Spannungssensor des Ionenkanals misst also eine sehr große Potentialdifferenz über die Membran. Fehlt diese Absättigung der negativen Oberflächenladungen, so verändern die freien negativen Ladungen der Membranoberfläche den Potentialverlauf in der Nähe der Oberfläche dahingehend, dass direkt an der Membranoberfläche bereits ein negativeres Potential Ψ_0 im Verhältnis zur freien Lösung außerhalb der Zelle anliegt. Folglich fällt nun nur noch ein geringes Potential direkt über der Membran ab und der Spannungssensor des spannungsabhängigen Ionen-Kanals misst einen geringeren Unterschied als bei Situation A. Abbildung 56 (B) zeigt die extreme Situation bei gänzlichem Fehlen divalent positiver Ionen.

Bedenkt man nun, dass zur Öffnung des spannungsabhängigen Ionenkanals das durch den Spannungssensor gemessene Potential in der Membran durch eine Depolarisation verändert werden muss, erschließt sich aus dieser stark vereinfachten Darstellung der Mechanismus für die Wirkung der divalenten Kationen: In Abwesenheit positiv divalenter Ionen in der äußeren Lösung ist der Potentialabfall innerhalb der Doppelschicht der Membran geringer als bei Anwesenheit dieser Ionen. Nur dieses Potential ist für den Spannungssensor des Ionen-Kanals „sichtbar“. Um den Spannungssensor zu aktivieren (damit z.B. der Kanal geöffnet wird, muss bei Anwesenheit der positiv divalenten Ionen das messbare Potential E_M stärker abgesenkt werden, also ist, wie in Abbildung 56 (C) gezeigt, eine stärkere Depolarisation nötig als bei Abwesenheit der divalent positiven Ionen.

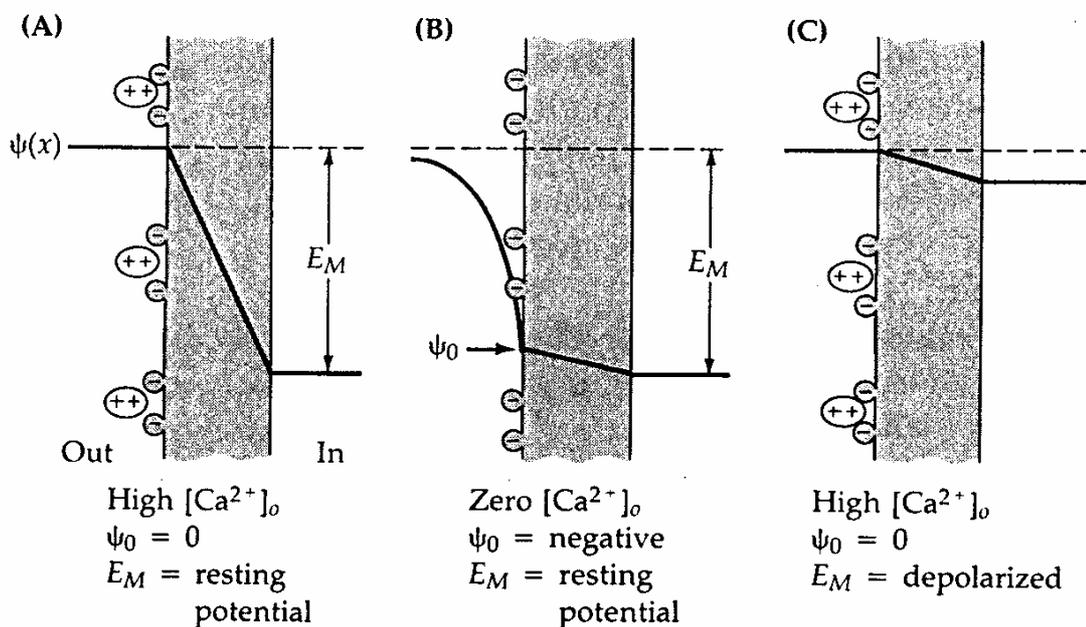


Abbildung 56:

Potentialverlauf innerhalb der Membran nach der Theorie der Oberflächenpotentiale:

$\Psi(x)$ beschreibt den Potentialverlauf auf der Strecke x . Ψ_0 beschreibt das Potential an der Oberfläche der Membran. E_M beschreibt den Potentialunterschied zwischen den Lösungen im Zelläußeren und Zellinneren (d.h. das messbare Potential).

- (A): Situation bei Ruhemembranpotential bei hoher Calciumionen-Konzentration.
 (B): Situation bei Ruhemembranpotential in Abwesenheit von Calciumionen
 (C): Situation bei Depolarisation und hoher Calciumionen-Konzentration

(aus Hille, 2001).

In der Summe erhöhen die induzierten Mikropotentiale der positiv divalenten Ionen das transmembranäre Potentialgefälle. Somit ist zum Erreichen des zur Öffnung eines Ionen-Kanals nötigen Potentials auch eine stärkere Depolarisation notwendig, was die Verschiebung der IU-Beziehungen z.B. für den Calcium- oder Natrium-Kanal zu positiveren Potentialen hin erklärt.

Die Darstellung in Abbildung 56 arbeitet zur besseren Verdeutlichung mit den Extremen, dass alle Ladungen der Oberfläche frei oder besetzt sind. Natürlich

sind hier auch Abstufungen möglich, also werden bei steigender Konzentration divalenter positiver Ionen zunehmend mehr negative Oberflächenladungen besetzt und entsprechend wird die IU-Beziehung zunehmend zu weniger negativen bzw. stärker positiven Potentialen verschoben.

Dies geht auch deutlich aus den in der vorliegenden Arbeit erstellten Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen bei steigenden Magnesium- und Calciumionen-Konzentrationen hervor.

8.1.1.1. Die mathematische Beschreibung der Effekte

Der Effekt positiv geladener Ionen auf eine Doppelschichtmembran wurde bereits früh theoretisch behandelt. Man nahm zunächst zur Vereinfachung an, dass die Ladungen der Membranoberfläche gleichmäßig verteilt seien, man sprach von einer sogenannten verschmierten Ladung mit einer gleichmäßigen Ladungsdichte σ (Gouy, 1910; Chapman, 1913). Grahame brachte 1947 in seiner Gleichung für eine Elektrolytlösung mit n verschiedenen Ionen der Valenz z_k mit einer Konzentration c_k und einer Dielektrizitätskonstanten ϵ das Potential an der Membranoberfläche Ψ_0 in Beziehung mit der Ladungsdichte auf der Membran:

$$\sigma^2 = 2 \cdot \epsilon \cdot \epsilon_0 \cdot R \cdot T \cdot \sum_{k=1}^n c_k \cdot \left(e^{\frac{-z_k \cdot F \cdot \Psi_0}{R \cdot T}} - 1 \right)$$

Hier wird die Summe der Ionen der Lösung berücksichtigt. Stark vereinfacht, zeigt dieser Zusammenhang, dass das Potential an der Oberfläche reduziert wird, wenn die Konzentration der positiven Ionen ansteigt und dass multivalente Ionen ($z_k > 1$) einen größeren Effekt als univalente Ionen haben (Hille, 2001).

8.1.1.2. Haben unterschiedliche Ionen gleicher Ladung den gleichen Effekt?

Die vorangegangenen Betrachtungen des sog. Gouy-Chapman-Modells beziehen sich nur auf die Größe der Ladungen, nicht jedoch auf andere chemisch-physikalische Eigenschaften des jeweiligen Ions.

Zur Beurteilung des Effekts verschiedener divalenter Ionen am Beispiel von Magnesium und Calcium wurde versucht, eine einfache Sättigungsfunktion an die Beziehung zwischen Potential für einen halbmaximalen Calcium-Strom ($V_{1/2}$) und Konzentration der divalenten Ionen mathematisch anzupassen. Wie die Ergebnisse zeigen, kann mit dieser Funktion in den verwendeten Konzentrationsbereichen die Änderung des Potentials in Abhängigkeit von der Konzentration des Ions formal relativ gut beschrieben werden. Die Verschiebung der Strom-Spannungs-Beziehung steht, wie bereits beschrieben, in Zusammenhang mit dem Potential direkt an der Membranoberfläche.

Aus den Versuchsergebnissen dieser Arbeit geht hervor, dass Calciumionen ($K_d(\text{Ca}^{2+})$ ca. 11 mmol/l) die Strom-Spannungs-Beziehung des L-Typ-Calcium-Kanals nahezu doppelt so stark verschieben können wie Magnesiumionen ($K_d(\text{Mg}^{2+})$ ca. 24 mmol/l).

Dieser Effekt kann damit erklärt werden, dass sich die positiv geladenen Ionen nicht nur unspezifisch an die negativen Ladungen der Oberfläche anlagern und diese abschirmen, sondern dass sie spezifische Bindungen mit ihnen eingehen, wobei sich dann je nach Ion die Dissoziationskonstanten unterscheiden würden. Eine Bindung wurde bereits von Frankenhauser und Hodgkin (1957) postuliert. Das von Stern erweiterte Gouy-Chapman-Modell, das sog. Gouy-Chapman-Stern-Modell berücksichtigt die Möglichkeit einer spezifischen Bindung. Als Bindungsstellen an der Membranoberfläche kommen freie Carboxylgruppen der Membranphospholipide oder der Kanalproteine in Frage.

8.1.1.3. Wie kann der Effekt von variabler Calcium- und Magnesiumionen-Konzentration im verwendeten Konzentrationsintervall einfach beschrieben werden?

Die vorrangige Problemstellung dieser Arbeit war es, die Verschiebungen der Strom-Spannungs-Beziehungen von Calcium-Kanälen an ventrikulären Säugetier-Kardiomyozyten unter dem Einfluss steigender Konzentrationen divalenter Kationen zu messen und eine Konzentrations-Wirkungs-Beziehung herauszuarbeiten. Primär sollte der Effekt von Magnesiumionen in einem Konzentrationsbereich gemessen werden, der relativ nahe dem physiologischen Konzentrationsbereich (0,7 bis 1 mmol/l) liegt. In der Arbeit von Gilbert und Ehrenstein (1969), in der die Wirkung von Magnesium am Tintenfischaxon untersucht wurde, erfolgte die Konzentrationserhöhung in sehr großen Schritten (0, 10 und 50 mmol/l). Am Herzmuskel wurden nur wenige Konzentrationen verwendet (Kass und Krafte, 1987: 0,5, 2,5 und 5,5 mmol/l; Dichtl und Vierling, 1991: 1,2 und 9,6 mmol/l; Hall und Fry, 1992: 0,2, 1, 5 und 10 mmol/l). Dabei war die Zahl der Versuche begrenzt (Kass und Krafte, 1987: $n = 1$; Dichtl und Vierling, 1991: $n = 3$). Der Versuch von Kass und Krafte wurde auch unter ziemlich unphysiologischen Bedingungen (Strontium statt Calcium als Ladungsträger) durchgeführt.

Deshalb sollte als weiterführende Betrachtung des Effekts von Magnesium auf die Strom-Spannungs-Beziehung in der Arbeit von Dichtl und Vierling (1991) eine Konzentrations-Wirkungskurve für Magnesiumionen-Konzentrationen zwischen 0 und 10 mmol/l aufgestellt werden. In der eben genannten Arbeit wurde der Effekt einer Erhöhung der Magnesiumionen-Konzentration auf die Verschiebung der Strom-Spannungs-Beziehung nur für eine Erhöhung von 1,2 auf 9,8 mmol/l beschrieben. Diese führte zu einer Verschiebung um ca. 10 mV. Nun wurden in der vorliegenden Arbeit die Strom-Spannungs-Beziehungen bei Magnesiumionen-Konzentrationen von 0, 1, 3, 5, 7 und 10 mmol/l ermittelt.

Zusätzlich wurde der Effekt von Magnesium mit einem weiteren wichtigen divalenten Ion verglichen. Hierzu wurden Calciumionen verwendet. Da angenommen wurde, dass der Effekt von Calcium stärker ausfällt als der von

Magnesium und da hohe Calciumionen-Konzentrationen an Herzzellen schädigend wirken, kamen Konzentrationen von 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4 und 5 mmol/l zum Einsatz.

An die erhaltenen Kurven, welche die Konzentrations-Wirkungs-Beziehung der Verschiebung des Potentials für den halbmaximalen Calcium-Einwärts-Strom in den genannten Konzentrationsintervallen beschreiben, konnte relativ gut der Graph einer einfachen Sättigungskinetik mathematisch angepasst werden.

Diese Funktion beschreibt den Effekt (also die Verschiebung der Strom-Spannungsbeziehung) in Abhängigkeit von der Konzentration des variierten Ions. Sie beinhaltet die Überlegung, dass eine definierte Zahl von Bindungsstellen von dem jeweiligen Ion bei einer bestimmten Konzentration besetzt wird. Je mehr Ionen sich in der Lösung befinden, desto mehr Bindungsstellen werden besetzt und desto größer ist der Effekt. Sind nahezu alle Bindungsstellen besetzt, nähert sich der Graph der Funktion asymptotisch dem hypothetischen Wert des maximal erreichbaren Effekts B_{\max} bei unendlich hoher Konzentration an. Ein Maß für die Wirkstärke (potency) ist die benötigte Konzentration des Agens, um einen halbmaximalen Effekt ($B_{\max}/2$) zu erreichen. Dieser Wert entspricht der Dissoziationskonstanten (K_d) einer hypothetischen Liganden-Rezeptor-Beziehung und stellt eine spezifische Konstante für das jeweilige Agens dar.

Somit können die Effekte von Magnesium- und Calciumionen in den verwendeten Konzentrationen auf den Calcium-Einwärts-Strom mit diesem Modell beschrieben und verglichen werden. Bei den hypothetischen Bindungsstellen handelt es sich wahrscheinlich um die negativen Ladungen in der Nähe der Kanalproteine oder an den Kanalproteinen, an welche die Ionen binden und den Spannungssensor des Ionenkanals beeinflussen können.

8.1.1.3.1. Rückschlüsse der Ergebnisse der Anpassung der Sättigungsfunktion an die Messpunkte der Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen

Nachdem eine Anpassung einer einfachen Sättigungsfunktion an die Messwerte möglich ist, kann der Effekt der Verschiebung der Strom-Spannungs-Beziehung von spannungsabhängigen Ionen-Kanälen bei variablen Konzentrationen divalent positiv geladener Ionen zumindest formal durch eine Bindung dieser Ionen an Bindungsstellen der Zelloberfläche beschrieben werden. Bei den Bindungsstellen dürfte es sich um negativ geladene Carboxylgruppen der Membranphospholipide bzw. der Kanalproteine handeln. Die dadurch verursachte Änderung der Potentialverhältnisse innerhalb der Membran wird vom dort befindlichen Spannungssensor der spannungsabhängigen Kanäle registriert und äußert sich in der beobachteten Veränderung der Strom-Spannungs-Beziehung.

Darüber hinaus bestätigt sich der in der Arbeit von Gilbert und Ehrenstein beobachtete Effekt, dass Calcium die Strom-Spannungs-Beziehung stärker verschiebt als Magnesium. Der in der vorliegenden Arbeit ermittelte K_d -Wert für Calcium (10,93 mmol/l) war in etwa halb so groß wie der von Magnesium (23,81 mmol/l). Das bedeutet, dass nur eine halb so große Menge an Calciumionen

wie Magnesiumionen benötigt wird, um den halbmaximalen Effekt auszulösen. Setzt man in die erhaltene Beziehung für Calciumionen exemplarisch die Konzentrationen 1 und 10 mmol/l ein, so erhält man für 1 mmol/l das errechnete Potential $Y(1)Ca = -14,74$ mV und für 10 mmol/l $Y(10)Ca = +3,45$ mV, also eine Potentialverschiebung von 18,19 mV. Setzt man die gleichen Konzentrationen in die erhaltene Gleichung für Magnesiumionen ein, so erhält man $Y(1)Mg = -16,74$ mV und $Y(10)Mg = -6,43$ mV, also eine Potentialverschiebung von 10,31 mV. Wie schon erwähnt, ist es deshalb unwahrscheinlich, dass die unterschiedliche Wirkung von Calcium und Magnesium allein durch eine unspezifische (physikalische) Adsorption an die Membran erklärbar ist. Bei Annahme einer spezifischen Ionenbindung würden die verschiedenen K_d -Werte verschiedene Dissoziationskonstanten von Magnesium- und Calciumionen repräsentieren. Dies würde bedeuten, dass Magnesiumionen schneller von der negativen Oberflächenladung wieder abdissoziieren als Calciumionen.

8.1.1.4. Einbeziehung des mathematischen Modells von Gilbert und Ehrenstein.

In ihrer Arbeit verwendeten Gilbert und Ehrenstein (1969) Tintenfischaxone, um eine Verschiebung der Leitfähigkeit von Kalium-Kanälen bei variiertem Konzentration von Calcium- und Magnesiumionen zu messen. In ihrem Modell wollten sie das Vorhandensein fixierter negativer Ladungen an der Zelloberfläche nachweisen, an welche divalente Gegenionen binden. Dieser zusätzliche Effekt wurde in das mathematische Modell der einfachen Anlagerung positiver Ionen an eine gleichmäßig geladene Membranoberfläche eingearbeitet. Entsprechend wurden hier zwei verschiedene Mechanismen für die Verschiebung der Strom-Spannungs-Beziehung zu weniger negativen bzw. stärker positiven Potentialen hin postuliert: Einerseits die Abschirmung der gleichmäßig verteilten negativen Ladungen der Oberfläche durch Anlagerung und andererseits die direkte Bindung v.a. divalent positiver Ionen an fixierte negative Ladungen der Membranoberfläche. Im Gegensatz zu der oben gezeigten Analyse mit Hilfe der einfachen Sättigungskinetik, geht man in dem Modell von Gilbert und Ehrenstein davon aus, dass die Bindung aber nur eine untergeordnete oder gar keine Rolle spielt. Entsprechend wurde die Konstante für die Bindung (entspricht dem Kehrwert der Dissoziationskonstanten) K sehr niedrig angesetzt ($K = 0,0001$ (mmol/l)⁻¹). Mit Hilfe ihres Modells errechneten Gilbert und Ehrenstein einen mittleren Abstand der titrierbaren Ladungen im Bereich der Membranoberfläche von ca. 1 nm. Bei diesen Berechnungen wurde ein Effektivitätskoeffizient von 0,5 für Magnesiumionen gewählt, da die geringere Wirkstärke von Magnesiumionen (etwa halb so groß) im Vergleich zu Calciumionen bei der Verschiebung der potentialabhängigen Eigenschaften von Ionen-Kanälen bereits bekannt war.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Daten der Versuchsreihe mit variabler Magnesiumionen- und konstanter Calciumionen-Konzentration verwendet, um mit Hilfe der Potentiale für eine maximale Calciumstrom-Auslösung (V_{max}) in Anlehnung an das Modell von Gilbert und Ehrenstein den mittleren Abstand der fixierten Ladungen an der Zelloberfläche zu ermitteln. Dabei wurden Parameter

aus der Arbeit von Gilbert und Ehrenstein übernommen, wie z.B. die Konstante für die Bindung (K) und der Effektivitätskoeffizient e_f von 0,5. Dieser Koeffizient ergab sich auch aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit.

Weiterhin wurden nicht die direkt vermessenen Potentiale von V_{\max} verwendet, sondern sie wurden berechnet und zwar aus den an die Messpunkte mathematisch angenäherten Kurven auf der Grundlage von Chebychev-Polynomen 8. Grades.

Aus der Analyse ergab sich ein mittlerer Abstand (d) der Oberflächenladungen von ca. 1,5 nm. Dieser Abstand ist größer als der von Gilbert und Ehrenstein bestimmte (1,2 nm). Er liegt aber noch in einem Bereich, den diese Autoren als möglich angesehen haben. Kass und Krafte (1987), die wie in der vorliegenden Arbeit mit Herzmuskelzellen arbeiteten, konnten ihre Ergebnisse mit einem angenommenen Wert von 1,7 nm in Einklang bringen. Es ist klar, dass der von uns ermittelte Wert auf Grund von mehreren Variablen, die zum Teil willkürlich festgelegt wurden und dem begrenzten Konzentrationsbereich außerordentlich unsicher ist. Dass der Wert sich von dem von Gilbert und Ehrenstein unterscheidet, kann aber auch daran liegen, dass diese Autoren mit Tintenfischaxonen gearbeitet und Kalium-Ströme vermessen haben. Die Verschiebung der Auslösepotentiale wird nicht alleine durch die Ladungen an der gesamten Membranoberfläche beeinflusst, sondern besonders durch Ladungen, die sich in der Nähe der entsprechenden Kanalproteine befinden. Es ist anzunehmen, dass auch Ladungen von Proteinen (u.a. von den Kanalproteinen selbst) eine wesentliche Rolle spielen (Moczydlowski, 1985). In der vorliegenden Arbeit wurde mit ventrikulären Herzmuskelzellen von Säugern gearbeitet und es wurden Calcium-Ströme vermessen. Das bedeutet, dass in der vorliegenden und in der Arbeit von Gilbert und Ehrenstein (1969) bei verschiedenen Spezies verschiedene Kanal-Typen vermessen wurden. Also können sich die Lipid-Zusammensetzung der Doppelschicht der Membran und hier besonders der Anteil der negativ geladenen Phospholipide, die Proteinbestückung der Membran und das Kanalprotein voneinander unterscheiden, so dass sich die Ladungsverteilung in der Umgebung der Kanalproteine nicht entsprechend miteinander vergleichen lassen. Weiterhin wurde mit unterschiedlichen extrazellulären Milieus gearbeitet. In dieser Arbeit wurde eine der physiologischen Umgebung von Säugetierzellen entsprechende Krebs-Henseleit-Lösung verwendet, im Gegensatz zu der imitierten Meerwasserlösung bei Gilbert und Ehrenstein.

Um die Sicherheit der Aussagen zu erhöhen, hätte man noch wesentlich höhere Konzentrationen von divalenten Ionen verwenden müssen. Allerdings bewegt man sich dann in einem extrem unphysiologischen Bereich. Um dann massive osmotische Effekte auszuschließen, müsste man (wie Gilbert und Ehrenstein) auch andere Ionen-Konzentrationen (z.B. Natrium) verändern. Es ist zu bezweifeln, dass durch diese unphysiologischen Veränderungen die Sicherheit der Aussage wirklich verbessert werden würde.

Die in dem Modell von Gilbert und Ehrenstein verwendete Konstante für die Bindung (K) ist mit $0,0001 \text{ mmol}^{-1}$ extrem niedrig. Sie entspricht einer Dissoziationskonstante von 10.000 mmol/l. Damit ist der Einfluss der Bindung auf die Beziehung zwischen Ionen-Konzentration und Verschiebung der Strom-

Spannungs-Beziehung außerordentlich gering. Die in der vorliegenden Arbeit bei Annahme einer "reinen" Bindung erhaltenen apparenten Dissoziationskonstanten (K_d -Werte) sind mit 10,93 mmol/l für Calcium und 23,81 mmol/l für Magnesium um Kategorien niedriger. Sie liegen aber immer noch weit über den Dissoziationskonstanten, die für die Beziehung zwischen negativ geladenen Phospholipiden und Kationen ermittelt wurden. So fanden Hauser et al. (1976) für die Beziehung zwischen Calcium und Phosphatidylserin Dissoziationskonstanten zwischen 1 und 100 μ mol/l. Im Gegensatz dazu war die Bindung von Calcium an Phospholipide ohne negative Nettoladung wesentlich schwächer: Für die Bindung von Calcium and Phosphatidylcholin ergab sich ein K_d -Wert von ≥ 30 mmol/l (Hauser et al., 1975). Die in der vorliegenden Arbeit bestimmten Werte könnten deshalb annähernd Durchschnittswerte für die Bindung an (netto) geladene und ungeladene Phospholipide darstellen. Dabei überwiegen in der Membran die ungeladenen Lipide erheblich (ca. 90 %, vgl. Post et al., 1988). Es soll aber ausdrücklich festgestellt werden, dass es sich bei den hier gezeigten K_d -Werten nur um apparente Konstanten handelt, die erheblich von den tatsächlichen Konstanten abweichen können.

8.1.2. Gibt es weitere Effekte von divalent positiv geladenen Ionen auf den Calcium-Einwärts-Strom von Herzmuskelzellen?

Zusätzlich zur Änderung der Strom-Spannungs-Beziehung durch divalent positiv geladene Ionen wurde auch deren Einfluss auf eine weitere Kenngröße des Calcium-Einwärts-Stroms, nämlich die Inaktivierungsgeschwindigkeit untersucht. Mathematisch kann die Inaktivierungskinetik, wie bereits vorgestellt, mit einer doppelt exponentiellen Funktion beschrieben werden:

$$y(x) = A \cdot e^{-\frac{x}{\tau_1}} + B \cdot e^{-\frac{x}{\tau_2}} + C$$

Hier wird der zeitliche Verlauf des Abklingens des Calcium-Einwärts-Stroms nach Erreichen des Spitzenstroms beschrieben. τ_1 und τ_2 stellen die Inaktivierungs-Zeitkonstanten der beiden Inaktivierungsfunktionen dar, aus welchen sich die Gleichung zusammensetzt. τ_1 beschreibt die Konstante der sog. „schnellen Komponente“ der Inaktivierungsfunktion und τ_2 die „langsame Komponente“. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, führt eine Erhöhung der extrazellulären Calcium-Konzentration zu einer Steigerung des Calcium-Spitzenstroms und damit zu einer Steigerung des Calcium-Influx in die Zelle. Aus den hier gezeigten Ergebnissen geht aber auch hervor, dass der Calcium-Strom bei Erhöhung der extrazellulären Calcium-Konzentration schneller inaktiviert, d.h. dass die Zeitkonstante der raschen Inaktivierung des Calcium-Stroms mit Erhöhung der extrazellulären Calcium-Konzentration abnimmt, während die Zeitkonstante der langsamen Komponente zunimmt. Die Abnahme der Zeitkonstante für die schnelle Komponente war in der vorliegenden Untersuchung auf Grund der relativ starken Streuung der Werte allerdings nicht signifikant. Sie entspricht aber

der Calcium-abhängigen Inaktivierung des Calcium-Stroms am Herzmuskel, die auch von anderen Autoren beschrieben wurde. In diesen früheren Untersuchungen wurden aber häufig nur der Unterschied zwischen Calcium und anderen Kationen (z.B. Barium) aufgezeigt. Wenn die Calcium-Konzentration variiert wurde, dann wurden im allgemeinen nur wenige Konzentrations-Schritte verwendet und teilweise auch nur Einzelversuche durchgeführt.

Ausgehend von Untersuchungen an Neuronen (Eckert und Tillotson, 1981) wurde gezeigt, dass auch in Herzmuskelzellen der Calcium-Strom bei Erhöhung der extrazellulären Calcium-Konzentration schneller abklingt (Kass und Sanguinetti, 1984; Mentrard et al., 1984; Lee et al., 1985), wodurch die Gesamtmenge des einströmenden Calciums weniger stark ansteigt als man bei Betrachtung des Spitzenstroms vermuten würde. Man nimmt an, dass diese Calcium-abhängige Beschleunigung der Inaktivierung des Calcium-Kanals einen negativen Rückkopplungsmechanismus repräsentiert, der die Zelle vor Calcium-Überladung schützen soll. Die Beschleunigung der Kanal-Inaktivierung ist spezifisch für Calcium. Sie ist nur gering ausgeprägt, wenn man statt Calcium z.B. Barium als Ladungsträger verwendet.

Nach den bisherigen Erkenntnissen wird die Inaktivierung des Calcium-Kanals in erster Linie durch intrazelluläres Calcium verursacht. Deshalb führt auch eine verstärkte Calcium-Freisetzung aus dem SR zu einer beschleunigten Inaktivierung. Als Mechanismus wird angenommen, dass eine Bindung von intrazellulärem Calcium (eingeströmt oder freigesetzt) an Calmodulin erfolgt, das dann mit der $\alpha 1$ -Untereinheit des Calcium-Kanals interagiert. Diese Interaktion erfolgt mit dem C-terminalen Ende der $\alpha 1$ -Untereinheit (Zühlke und Reuter, 1998; Qin et al., 1999; Zühlke et al., 1999; Xiong et al., 2005).

Möglicherweise spielen bei der Calcium-abhängigen Inaktivierung aber auch noch andere Mechanismen eine Rolle. So wurde festgestellt, dass offensichtlich das Ansprechen des Spannungssensors des Kanals durch Calcium verstellt wird, wodurch es zu einer Änderung des "Gatings" (Öffnen und Schließen) des Kanals kommt. Es wird vermutet, dass hierbei die Bindung von Calcium an Bindungsstellen im Kanal maßgebend ist (Isaev et al., 2004).

Bei Betrachtung der in der vorliegenden Arbeit aufgestellten Beziehungen zwischen extrazellulärer Calcium-Konzentration und den Zeitkonstanten des Abklingens zeigt sich ein anscheinend linearer Zusammenhang.

Auch eine Änderung der extrazellulären Magnesium-Konzentration führt zu einer Änderung der Zeitkonstanten des Abklingens. Die Zeitkonstante der langsamen Komponente nimmt wie bei Calcium durch Erhöhung der Magnesium-Konzentration zu. Aber auch bei der schnellen Komponente kommt es zu einer Zunahme der Zeitkonstante, d.h. bei steigenden Magnesium klingt der Calcium-Strom langsamer ab. Auch diese Zunahme scheint linear von der Magnesium-Konzentration abzuhängen. Die Steigung der Beziehung entspricht (bei umgekehrtem Vorzeichen) der von Calcium. Eine Zunahme der Zeitkonstanten bei Erhöhung der Magnesium-Konzentration von 1,8 auf 10 mmol/l war bereits früher am Froschherzen beobachtet worden (Mentrard et al., 1984). Die einfachste Erklärung für die Verlangsamung der frühen Abklingphase wäre, dass Magnesium den Calcium-Einstrom in die Zelle vermindert und dadurch die Interaktion von Calcium mit Calmodulin oder von Bindungsstellen im Kanal vermindert.

Magnesium unterscheidet sich hier deutlich von organischen Calcium-Kanal-Blockern wie Phenylalkylaminen (wie z.B. D600) oder Dihydropyridinen (wie z.B. Nitrendipin), die trotz Minderung des Calcium-Stroms zu keiner Verzögerung des Abklingens führen und diese sogar beschleunigen können (Kohlhardt und Mních, 1978; Lee und Tsien, 1983; Shen et al., 2000). Dies dürfte ein Grund dafür sein, dass eine Erhöhung der extrazellulären Magnesium-Konzentration trotz Minderung des Calcium-Stroms keine Verkürzung der Aktionspotential-Dauer bewirkt, während dies z.B. für Dihydropyridine typisch ist (siehe z.B. Sensch et al., 2000). Eine Verkürzung der Aktionspotentialdauer kann wegen der damit einhergehenden Verkürzung der Refraktärzeit begünstigend für die Entstehung von kardialen Arrhythmien wirken.

8.2. Werden auch andere potentialabhängige Ionenkanäle durch divalent positiv geladene Ionen beeinflusst?

Die nun folgende Betrachtung soll zeigen, dass auch Kanäle für andere Ionenarten im Verhalten der Strom-Spannungs-Beziehung durch divalent positiv geladene Ionen beeinflusst werden. Dieser Effekt ist bereits in der Literatur beschrieben (z.B. Weidmann, 1955; Frankenhaeuser und Hodgkin, 1957; Hagiwara und Naka, 1964; Hille, 1968; Gilbert und Ehrenstein, 1969; Hahn und Campbell, 1983) und zwar für mehrere spannungsabhängige Kanalarten in allen bisher untersuchten Geweben.

In dieser Arbeit wurde exemplarisch das Schwellenpotential der Natrium-Kanäle der ventrikulären Herzmuskelzellen bei 1 mmol/l und 10 mmol/l Magnesiumionen-Konzentration gemessen. Das weitere Ionenmilieu blieb gleich. Hier zeigte sich, dass sich die Potentiale bei der Aktivierungsschwelle des Natrium-Stroms im angegebenen Intervall von $-50,2$ mV bei 1,0 mmol/l Magnesiumionen auf $-44,0$ mV bei 10 mmol/l, also um 6,2 mV erhöhen. Also ist auch an Natrium-Kanälen ein ähnlicher Effekt auf die Strom-Spannungs-Beziehung zu beobachten wie bei den Calcium-Kanälen.

Dies liegt nahe, denn die spannungsabhängigen Natrium-Kanäle sind, wie bereits beschrieben, ähnlich aufgebaut wie die Calcium-Kanäle des ventrikulären Myokards. Das bedeutet, dass auch hier der Spannungssensor intramembranär im Segment S4 zu liegen kommt. Also können die positiven Ionen, welche sich an die negativen Oberflächenladungen in der näheren Umgebung der Spannungssensoren anlagern bzw. dort eine Bindung eingehen, einen ähnlichen Effekt auf die Strom-Spannungs-Beziehung erzielen.

Allerdings ist die Verschiebung der Schwelle in diesem Intervall mit 6,2 mV geringer als die beim Calcium-Einwärts-Strom, welche aus der erhaltenen Gleichung mit 10,31 mV errechnet wurde. Grund hierfür scheint am ehesten eine etwas veränderte Gruppierung der negativen Ladungen um den Natrium-Kanal zu sein. Diese ist vermutlich durch die unterschiedliche Proteinzusammensetzung der Kanalproteine bedingt.

Zusammenfassend lässt sich sagen: Auch in den gewählten relativ kleinen Konzentrations-Intervallen lässt sich ein Effekt von divalent positiv geladenen Ionen am Beispiel Magnesium- und Calciumionen mit der Patch-Clamp-Methode in der Ganzzell-Messung nachweisen. Bei steigenden Konzentrationen verschieben sie die Strom-Spannungs-Beziehungen des Calcium-Stroms an ventrikulären Kardiomyozyten zu positiveren Potentialen hin. Darüber hinaus kann für die jeweilige Ionenart eine Konzentrations-Wirkungs-Beziehung aufgezeigt werden. Diese lässt die Verschiebung von $V_{1/2}$ in den gewählten Konzentrations-Intervallen relativ gut mit einer einfachen Sättigungsfunktion beschreiben. Daraus ergibt sich, dass Calcium hier eine etwa doppelt so große Wirkstärke aufweist wie Magnesium. Dieser Effekt lässt sich am ehesten dadurch erklären, dass die divalent positiv geladenen Ionen u.a. Ionenbindungen mit den Ladungen der Zelloberfläche eingehen und dabei verschiedene Dissoziationskonstanten aufweisen. Weiterhin wurde versucht die erhaltenen Ergebnisse in das mathematische Modell von Gilbert und Ehrenstein (1969) einzuarbeiten. Die erhaltenen Resultate unterscheiden sich etwas von denen, die bereits von anderen Autoren in früheren Arbeiten erhalten wurden. Dies liegt vermutlich daran, dass zur mathematischen Angleichung an die gewonnenen Messdaten einige Parameter aus der Arbeit von Gilbert und Ehrenstein übernommen wurden. Dies kann aber problematisch sein, da in dieser Arbeit andere Gewebe, andere Spezies und andere Kanaltypen untersucht wurden. Deshalb kann eine Bestätigung oder Widerlegung des mathematischen Modells nicht eindeutig erfolgen. Ein gleichsinniger Effekt kann auch an anderen Kanalarten (hier Natrium-Kanälen) beobachtet werden. Es scheint auch möglich, dass nicht nur die Strom-Spannungs-Beziehung durch positive divalente Ionen beeinflusst wird, sondern auch die Inaktivierung des Calcium-Stroms. Die Veränderung der langsamen Inaktivierungskomponente scheint potentialabhängig, die der schnellen Komponente abhängig vom jeweiligen Ion zu sein.

9. ZUSAMMENFASSUNG

1. In der vorliegenden Arbeit wurden Konzentrations-Wirkungs-Kurven für die Verschiebung der Strom-Spannungs-Beziehung des Calcium-Einwärts-Stroms durch divalente Kationen erstellt. Der Calcium-Einwärts-Strom von ventrikulären Herzmuskelzellen von Meerschweinchen wurde mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik bei verschiedenen Potentialen registriert. Es wurde sowohl die Verschiebung durch Variation der Magnesiumionen-Konzentration bei konstantem Calcium als auch die durch Variation der Calciumionen-Konzentration bei konstantem Magnesium erfasst. Um Änderungen im bzw. nahe dem physiologischen Konzentrationsbereich der Kationen möglichst genau bestimmen zu können, erfolgte die Konzentrationsänderung in relativ kleinen Schritten. Es zeigte sich, dass Calciumionen nahezu doppelt so stark wirksam sind wie Magnesiumionen. Dies beruht wahrscheinlich auf einer Interaktion der positiven Ionen mit negativ geladenen Gruppen der Zelloberfläche. Dabei könnte eine Ionen-Bindung eine wesentliche Rolle spielen. Wahrscheinlich verändern die positiven Ionen auf Grund ihrer Ladung die Potentialverteilung innerhalb der Zellmembran und beeinflussen so den intramembranären Spannungssensor der Calcium-Kanäle.
2. In der Versuchsreihe mit variabler Magnesiumionen-Konzentration wurden Konzentrationen von 0 bis 10 mmol/l verwendet. Ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV wurde zunächst auf -30 mV zur Inaktivierung der Natrium-Kanäle vordepolarisiert. Mit dem nächsten Depolarisationsschritt konnte dann der Calcium-Strom ausgelöst werden. Dazu wurden Potentiale zwischen -30 und $+40$ mV gewählt und das Potential in Schritten von 5 mV variiert. So erhielt man die Strom-Spannungs-Beziehung bei der jeweiligen Ionen-Konzentration. Bei steigender Magnesiumionen-Konzentration konnte man eine Verschiebung der Kurve der Strom-Spannungs-Beziehung zu weniger negativen oder stärker positiven Potentialen hin beobachten. Der maximal erreichbare Calcium-Einwärts-Strom verringerte sich mit steigender Magnesiumionen-Konzentration. Da die genaue Bestimmung des Potentials, das für einen Maximalstrom nötig war, sich als schwierig erwies, wurden zunächst die Potentiale ermittelt, die für einen Strom, der 50 % des Maximalstroms ($V_{1/2}$) betrug, notwendig waren. Aus der Magnesium-abhängigen Änderung von $V_{1/2}$ ergab sich dann die Konzentrations-Wirkungs-Beziehung.
3. Bei Verwendung des gleichen Depolarisationsprotokolls wurden ebenso Strom-Spannungs-Beziehungen für den Calcium-Einwärts-Strom bei verschiedenen Calciumionen-Konzentrationen (1 bis 5 mmol/l) erstellt. So konnte auch für Calciumionen eine Konzentrations-Wirkungs-Beziehung bzgl. $V_{1/2}$ ermittelt werden. Anzumerken sei, dass der Konzentrationsbereich bei Calcium enger gewählt wurde wie bei Magnesium. Dies war sinnvoll, da bei sehr niedrigen Calcium-Konzentrationen die Ströme zu instabil wurden, um

eine hinreichend artefaktfreie Messung zu erhalten und bei hohen Konzentrationen die Zelle durch Calcium-Überladung geschädigt wurde.

4. An die erhaltenen $V_{1/2}$ -Werte wurden Sättigungsfunktionen mathematisch angepasst (gefittet). Die Ergebnisse zeigen, dass die Strom-Spannungs-Beziehungen bei veränderter Magnesium- bzw. Calciumionen-Konzentration in den verwendeten Intervallen gut durch diese Funktionen beschrieben werden können. Weiterhin wird deutlich, dass Calciumionen die Strom-Spannungs-Beziehung des Calcium-Einwärts-Stroms etwa doppelt so stark verschieben wie Magnesiumionen. Der apparente K_d -Wert beträgt für Magnesiumionen 23,81 mmol/l, der für Calciumionen 10,93 mmol/l. Die theoretisch maximal erreichbare Verschiebung von $V_{1/2}$ für den Calcium-Einwärts-Stroms liegt bei der Versuchsreihe mit variabler Magnesiumionen-Konzentration bei 40,7 mV und bei der mit variabler Calciumionen-Konzentrationen bei 46,2 mV. Das gesamte veränderliche (extrazelluläre) Oberflächenpotential der Zelle dürfte nach den vorliegenden Ergebnissen bei 40 bis 50 mV liegen.
5. An die erhaltenen Strom-Spannungs-Beziehungen wurden zusätzlich mit Hilfe mathematischer Annäherungsalgorithmen Chebychev-Polynome angepasst. So sollte eine genauere bzw. objektivere Ermittlung von V_{max} (Potential bei maximalem Calcium-Strom) möglich sein. Auch an diese V_{max} -Werte wurden die Sättigungsfunktionen angepasst. Die sich ergebenden Parameter für die Sättigungsfunktionen bei Verwendung der berechneten V_{max} -Werte stimmten gut mit den Parametern überein, die sich bei Verwendung der graphisch ermittelten Werte von $V_{1/2}$ ergaben.
6. Exemplarisch wurde versucht die Ergebnisse der Messreihe mit veränderlicher Magnesiumionen-Konzentration und einer konstanten Calciumionen-Konzentration durch mathematische Annäherungsalgorithmen mit der Formel von Gilbert und Ehrenstein (1969) zu beschreiben. Diese Formel basiert auf der Theorie, dass Ionen in der extrazellulären Lösung mit den negativen Oberflächenladungen der Zellmembran interagieren. Für divalente positive Ionen wird einerseits ein elektrostatischer Effekt, andererseits ein gewisser Effekt der Bindung der Ionen an negativ geladene Bindungsstellen der Zelloberfläche berücksichtigt. Mit Hilfe der Formel kann die Dichte der negativen Ladungen an der Zelloberfläche abgeschätzt werden. Die Formel enthält mehrere unbekannte Parameter. Ein Teil der Parameter wurde aus dem Modell von Gilbert und Ehrenstein übernommen. Dieses Modell beruht aber auf Messungen an Tintenfischaxonen und ist deshalb nur mit großen Vorbehalten auf die Verhältnisse am Säugerherzen übertragbar. Die Versuchsbedingungen differieren zu unseren nicht nur hinsichtlich der verwendeten Spezies und des Gewebes, sondern auch des untersuchten Kanals (Kalium-Kanal) und des extrazellulären Milieus (imitiertes Meerwasser). Auf Grund der Ergebnisse der vorliegenden

Arbeit ergab sich für den mittleren Abstand der negativen Ladungen an der Zelloberfläche ein Wert von 1,5 nm. Dieser Abstand ist etwas größer als der von Gilbert und Ehrenstein bestimmte.

7. Zusätzlich wurde der Einfluss der divalenten Kationen auf die Inaktivierung der Calcium-Ströme untersucht. Diese Ströme wurden durch eine Depolarisation auf 0 mV bei unterschiedlichen Magnesium- und Calciumionen-Konzentrationen ausgelöst. Die Auswertung erfolgte mittels Annäherung einer doppelt exponentiellen Funktion an die Strom-Zeit-Beziehung bei Abklingen des Stroms nach Erreichen des Maximums. Es ergaben sich zwei Inaktivierungs-Zeitkonstanten τ_1 und τ_2 . τ_1 repräsentiert die schnelle Komponente der Inaktivierungsfunktion und τ_2 die langsame Komponente. Die Beeinflussung von τ_1 durch Magnesium und Calcium ist unterschiedlich. So erhöht eine steigende Magnesiumionen-Konzentration und vermindert eine steigende Calciumionen-Konzentration den Wert von τ_1 . τ_2 nimmt sowohl bei steigender Calcium- als auch bei steigender Magnesiumionen-Konzentration zu. Aus den Ergebnissen kann der Schluss gezogen werden, dass τ_1 sich durch die einströmenden Ionen, abhängig von der Ionenart, ändert, während τ_2 weitgehend unabhängig von der Ionenart durch die Änderung des Oberflächenpotentials beeinflusst wird.
8. Ergänzend wurde auch die Verschiebung der Aktivierungsschwelle des Natrium-Einwärts-Stroms bei steigender Magnesiumionen-Konzentration untersucht. Es wurden nur zwei Konzentrationen gewählt, nämlich 1 mmol/l und 10 mmol/l. Ebenso wie beim Calcium-Einwärts-Strom zeigte sich hier eine Verschiebung zu weniger negativen bzw. stärker positiven Potentialen und zwar im Mittel von -50,2 mV auf -44,0 mV, also um 6,2 mV. Diese Verschiebung ist geringer als die beim Calcium-Strom mit 10,3 mV. Grund hierfür scheint eine andere Verteilung der negativen Oberflächenladungen im Bereich der Natrium-Kanalproteine zu sein, vermutlich bedingt durch die unterschiedliche Struktur der Kanalproteine.
9. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass in der vorliegenden Arbeit Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen für die Verschiebung der Potentialabhängigkeit des Calcium-Einwärts-Stroms an ventrikulären Herzmuskelzellen durch Magnesium- und Calciumionen erstellt wurden. Die Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen lassen sich mit Hilfe von einfachen Sättigungsfunktionen beschreiben. Hierbei wird deutlich, dass Calciumionen die Kurve der Strom-Spannungs-Beziehung nahezu doppelt so stark verschieben wie Magnesiumionen. Bei der Interpretation des Effektes wird davon ausgegangen, dass die divalenten positiven Ionen mit negativ geladenen Gruppen der Zelloberfläche interagieren. Die unterschiedlichen K_d -Werte für die jeweilige Ionenart lassen sich durch die Annahme erklären, dass der Interaktion mit der Oberflächenladung nicht nur eine elektrostatische Anlagerung sondern auch eine Ionenbindung zugrunde liegt. In der vorliegenden Arbeit wurde auch gezeigt, dass

die divalent positiven Ionen zusätzlich auch die Inaktivierung des Calcium-Einwärts-Stroms beeinflussen. Dabei wird die langsame Phase der Inaktivierung gleichsinnig durch Calcium und Magnesium verändert, während bei der schnellen Komponente gegensinnige Effekte auftreten. Demnach könnte bei der langsamen Komponente unspezifisch die Potentialabhängigkeit durch die Ionen verändert worden sein, während bei der schnellen Komponente ein spezifischer Effekt der jeweiligen Ionenart auf die Kanalaktivität erkennbar wird. Ähnlich wie bei der Strom-Spannungs-Beziehung für den Calcium-Strom wurde auch eine deutliche Verschiebung der Strom-Spannungs-Beziehung für den Natrium-Einwärts-Strom durch die divalenten Kationen beobachtet. Der Effekt scheint hier aber etwas schwächer ausgeprägt zu sein. Möglicherweise beruht dieser Unterschied auf einer unterschiedlichen Verteilung der negativen Ladungen an der Membranoberfläche im Bereich der Kanäle. Am ehesten könnten dafür Unterschiede in der Proteinstruktur der Ionenkanäle verantwortlich sein, da der Spannungssensor, der das intramembranäre Potential misst, nur durch Oberflächenladungen beeinflusst werden kann, die am Kanal oder in enger Nachbarschaft dazu liegen.

LITERATURVERZEICHNIS

- Baker, P.F., Blaustein, M.P., Hodgkin, A.L., Steinhardt, R.A.: The effect of sodium concentration on calcium movements in giant axons of *Loligo forbesi*. *J. Physiol.* 192: 43-44, 1967.
- Bendukidze, Z., Isenberg, G., Klöckner, U.: Ca-tolerant guinea-pig ventricular myocytes as isolated by pronase in the presence of 250 μM free calcium. *Basic Res. Cardiol.* 80, Suppl. 1: 13–18, 1985.
- Benninghoff, A.: Anatomie Band. 1. 15. Aufl.; Urban und Schwarzenberg; München, Wien; Baltimore, 1994.
- Bernstein, J.: Untersuchungen zur Thermodynamik der bioelektrischen Ströme. Erster Theil. *Pflügers Arch.* 82: 521, 1902.
- Bödding, M.: Die Patch-Clamp-Technik und angrenzende Messverfahren. *Pharmazeutische Zeitung*, 48: 11–28, 1996.
- Breuer, H.: dtv-Atlas zur Chemie, Band 1. 6. Aufl.; Deutscher Taschenbuch-Verlag, München, 1992.
- Brink, F.: The role of calcium ions in neuronal processes. *Pharmacol. Rev.* 6: 24–298, 1954.
- Campbell, D.T.: Sodium gating current in frog skeletal muscle. *J. Gen. Physiol.* 82: 679–701, 1983.
- Caroni, P., Carafoli, E.: The regulation of Na^+ and Ca^{2+} exchanger of heart sarcolemma. *Eur. J. Biochem.* 132: 451-460, 1983.
- Cha, A., Ruben, P.C., George, A.L., Fujimoto, E., Bezanilla, F.: Voltage sensors in domains III and IV, but not I and II, are immobilized by Na^+ fast inactivation. *Neuron* 22: 73-87, 1999.
- Chapman, D.L.: A contribution on the theory of electrocapillarity. *Phil. Mag.* 25: 475–481, 1913.
- Cohen, L., Kitzes R.: Magnesium sulphate and digitalis induced arrhythmias. *J. Am. Assoc.* 249: 2808-2810, 1983.
- Cole, K.S., Curtis, H.J.: Electric independence of the squid giant axon during activity. *J. Gen. Physiol.* 22: 649–670, 1939.

- Cribbs, L.L., Lee, J-H., J., Satin, J., Zhang, Y., Daud, A., Barklay, J., Williamson, M.P., Fox, M., Rees, M., Perez-Reyes, E.J.: Cloning and characterisation of $\alpha 1H$ from human heart, a type of the T-Type Ca^{2+} channel gene family. *Circ. Res.* 83: 103-109, 1998.
- Dichtl, A., Vierling, W.: Inhibition by magnesium of calcium inward current in heart ventricular muscle. *Europ. J. Pharmacol.* 204: 243–248, 1991.
- Dudel, S.J.: Informationsvermittlung durch elektrische Erregung. In: Schmidt Thews *Physiologie des Menschen*, 24. Auflage; Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1990.
- Eckert, R., Tillotson, D.L.: Calcium-mediated inactivation of the calcium conductance in caesium-loaded giant neurones of *Aplysia californica*. *J. Physiol.* 314: 265-280, 1981.
- Edes, I., Chu, G., Kranias, E.G.: Sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} transport. In: *heart physiology and pathophysiology*. 4th Edition; Academic Press, Elsevier, Philadelphia: 447–459, 2001.
- Enselberg, C. D., Simmons, H. G., Mintz A. A.: The effects of magnesium on cardiac arrhythmias. *Am. Heart J.* 39: 703-712, 1950.
- Frankenhaeuser, B., Hodgkin, A.L.: The action of calcium on the electrical properties of squid axons. *J. Physiol.* 137: 218–244, 1957.
- Ghani, F. M., Rabah, M.: Effect of magnesium chloride on electrical stability of the heart. *Am. Heart J.* 94: 600-602, 1977.
- Gilbert, D.L., Ehrenstein, G.: Effect of divalent cations on potassium conductance of squid axons: Determination of surface charge. *Biophys. J.* 9: 447–463, 1969.
- Goedecke, T.: Untersuchung von der Wirkung von (-)-Menthol auf den glattmuskulären und cardialen Calciumkanal nativer Herzmuskelzellen und transfizierter CHO-Zellen mit der Patch-Clamp-Technik. Vergleich von Cumarinen und anderen Pflanzeninhaltsstoffen. Dissertation, Fakultät für Chemie und Pharmazie, Ludwig-Maximilians Universität, München, 1997.
- Gouy, G.: Sur la constitution de la charge électrique à la surface d' un électrolyte. *J. Physiol. (Paris)* 9: 457–468, 1910.
- Grahame, D.C.: The electrical double layer and the theory of electrocapillarity. *Chem. Rev.* 41: 441–501, 1947.

- Hagiwara, S., Naka, K.I.: The initiation of spike potential in barnacle muscle fibres under low intracellular Ca^{++} . *J. Gen. Physiol.* 48: 141–62, 1964.
- Hahin, R., Campbell, D.T.: Simple shift in the voltage dependence of sodium channel gating caused by divalent cations. *J. Gen. Physiol.* 82: 785–802, 1983.
- Hall, S.K., Fry, C.H.: Magnesium affects excitation, conduction and contraction of isolated mammalian cardiac muscle. *Am. J. Physiol., Heart Circ. Physiol.* 263: H622-H633, 1992.
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., Sigworth, F.J.: Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.* 391: 85–100, 1981.
- Hauser, H., Darke, A., Phillips, M.C.: Ion-binding to phospholipids. Interaction of calcium with phosphatidylserine. *Eur. J. Biochem.* 62: 335-344, 1976.
- Hauser, H., Phillips, M.C., Levine, B.A., Williams, R.J.: Ion-binding to phospholipids. Interaction of calcium and lanthanide ions with phosphatidylcholine (lecithin). *Eur. J. Biochem.* 58: 133-144, 1975.
- Herold, G.: *Innere Medizin 2003*; Selbstverlag, Köln, 2003.
- Hille, B.: *Ionic Channels of Excitable Membranes*. 3rd Edition; Sinauer Associates Inc., Sunderland, Mass., USA, 2001.
- Hille, B.: Charges and potentials at the nerve surface: Divalent ions and pH. *J. Gen. Physiol.* 51: 221–236, 1968.
- Hodgkin, A.L., Huxley A.F.: A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.* 117: 500–544, 1952.
- Isaev, D., Solt, K., Gurtovaya, O., Reeves, J.P., Shirokov, R.: Modulation of the voltage sensor of L-type Ca^{2+} channels by intracellular Ca^{2+} . *J. Gen. Physiol.* 123: 555-571, 2004.
- Junqueiro, L.C., Carneiro, J.: *Histologie*. 3. Aufl.; Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1996.
- Kass, R.S., Krafte, D.S.: Negative surface charge density near heart calcium channels. Relevance to block by dihydropyridines. *J. Gen. Physiol.* 89: 629-644, 1987.
- Kass, R.S., Sanguinetti, M.C.: Inactivation of calcium channel current in the calf cardiac Purkinje fiber. Evidence for voltage- and calcium-mediated mechanisms. *J. Gen. Physiol.* 84: 705-726, 1984.

- Katzka, D.A., Cox, R., Davidoff, A.J., Morad, M.: Permeation of divalent cations through the Ca^{2+} -channel of rabbit portal vein myocytes. *Am. J. Physiol.* 262: H326-H330, 1992.
- Kimura, J.: Cardiac Na^+ - Ca^{2+} Exchanger: Pathophysiology and Pharmacology. In: *Heart physiology and pathophysiology*. 4th Edition; Academic Press, Elsevier, Philadelphia: 417 – 422, 2001.
- Kiyosue, T., Arita, M.: Magnesium restores high K-induced inactivation of the fast Na channel in guinea pig ventricular muscle. *Pflügers Arch.* 395: 78-80, 1982.
- Kiziltepe, U., Eyileten, Z. B., Sirlak, M., Tasoç, R., Aral, A., Eren, N. T., Uysalel, A., Akalin, H.: Antiarrhythmic effect of magnesium sulphate after open heart surgery: effect of blood level. *Int. J. Cardiol.* 89: 153-158, 2003.
- Klugbauer, N., Marais, E., Lacinová, L., Hofmann, F.: A T-type calcium channel from brain. *Pflügers Arch.* 437: 710-715, 1999.
- Koch, S.: Die Einwärtsstrom-induzierte Calcium-Freisetzung in der Herzmuskelzelle (ICICR). Dissertation, Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München, 2000.
- Kohlhardt, M., Mnich, Z.: Studies on the inhibitory effect of verapamil on the slow inward current in mammalian ventricular myocardium. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 10: 1037-1052, 1978.
- Lacinová, L., Hofmann, F.: Voltage-Dependent Calcium Channels. In: *heart physiology and pathophysiology*. 4th Edition; Academic Press, Elsevier, Philadelphia: 247–257, 2001.
- Lee, K.S., Marban, E., Tsien, R.W.: Inactivation of calcium channels in mammalian heart cells: joint dependence on membrane potential and intracellular calcium. *J. Physiol.* 364: 395-411, 1985.
- Lee, K.S., Tsien, R.W.: Mechanism of calcium channel blockade by verapamil, D600, diltiazem and nitrendipine in single dialysed heart cells. *Nature* 302: 790-794, 1983.
- Li, H.Y., Quamme, G.A.: Caffeine decreases intracellular free Mg^{2+} in isolated adult rat ventricular myocytes. *Biochem. Biophys. Acta* 1355: 61-68, 1997.
- Lüllmann, H., Mohr, K., Ziegler, A.: Taschenatlas der Physiologie. Thieme-Verlag, Stuttgart, New York, 1996.

- Mentrard, D., Vassort, G., Fischmeister, R.: Calcium-mediated inactivation of the calcium conductance in cesium-loaded frog heart cells. *J. Gen. Physiol.* 83: 105-131, 1984.
- Moczydlowski, E., Alzarez, O., Vergara, C., Latorre, R.: Effect of phospholipid surface charge on the conductance and gating of a Ca^{2+} -activated K^+ channel in planar lipid bilayers. *Membr. Biol.* 83: 273–282, 1985.
- Mozhayeva, G.N., Naumov, A.P.: Effect of surface charge on the steady-state potassium conductance of nodal membrane. *Nature* 228: 164–165, 1970.
- Mozhayeva, G.N., Naumov, A.P.: Influence of the surface charge on the steady potassium conductivity of the membrane of a node of Ranvier. III. Effect of bivalent cations. *Biofizika* 17: 801–808, 1972.
- Muller, R. U., Finkelstein, A.: The effect of surface charge on the voltage-dependent conductance induced in thin lipid membranes by monacomycin. *J. Gen. Physiol.* 60: 285-306; 1972.
- Mutschler, E., Schäfer-Korting, M.: *Arzneimittelwirkungen*. 7. Auflage; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 1996.
- Neher, E., Sakmann, B.: Single-channel currents recorded from membranes of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260: 799–802, 1976.
- Nernst, W.: Die elektromotorische Wirksamkeit von Ionen. *Z. Physik. Chem.* 4: 129-181, 1889.
- Ono, K., Arita, A.: Sodium Channels. In: *heart physiology and pathophysiology*. 4th Edition; Academic Press, Elsevier, Philadelphia: 229–243, 2001.
- Post, J.A., Langer, G.A., Op den Kamp, J.A., Verkleij, A.J.: Phospholipid asymmetry in cardiac sarcolemma. Analysis of intact cells and 'gas-dissected' membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* 943: 256-266, 1988.
- Petrides E.P., Löffler G.: *Biochemie und Pathobiochemie*. 6. Auflage; Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1998.
- Qin, N., Olcese, R., Bransby, M., Lin, T., Birnbaumer, L.: Ca^{2+} -induced inhibition of the cardiac Ca^{2+} channel depends on calmodulin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 2435-2438, 1999.
- Rasmussen, H. S., McNair, P., Norregard, P., Backer, V., Lindberg, O., Balslev, S.: Intravenous magnesium in acute myocardial infarction. *Lancet* 8475: 234-236, 1986.

- Reuter, H., Beeler, G.W.: Calcium current and activation of contraction in ventricular myocardial fibres. *Science* 163: 399-401, 1969.
- Ringer, S.: A further contribution regarding the influence of different constituents of the blood on the contraction of the heart. *J. Physiol.* 4: 29, 1883.
- Rüegg, J.C. in Schmidt, R., Thews, G.: *Physiologie des Menschen*. 24. Auflage; Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1990.
- Schatzmann, H.J., Vincenzi, F.F.: Calcium movements across the membrane of human red cells. *J. Physiol.* 201: 369-395, 1969.
- Schiebler, T.H.: Junqueira, L.C., Carneiro, J.: *Histologie*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1996.
- Schmidt, R., Thews, G.: *Physiologie des Menschen*. 24. Auflage; Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1990.
- Sensch, O.: Direkte und indirekte Bestimmung der Wirkung von Calcium-Kanalblockern durch Spannungs-Klemm-(Patch-Clamp-)Technik, Fluoreszenzmikroskopie und Kontraktionsmessung: Einfluss von Phenylpropan-Derivaten, Sesquiterpenen und einem 1,4-Dihydropyridin. Dissertation, Fakultät für Chemie und Pharmazie, Ludwig-Maximilians-Universität, München, 1995.
- Sensch, O., Vierling, W., Brandt, W., Reiter, M.: Effects of inhibition of calcium and potassium currents in guinea-pig cardiac contraction: comparison of beta-caryophyllene oxide, eugenol, and nifedipine. *Br. J. Pharmacol.* 131: 1089-1096, 2000.
- Shechter, M., Hod, H., Marks, N., Behat, S., Kaplinsky, E., Rabinowitz, B.: Beneficial effect of magnesium sulphate in acute myocardial infarction. *Am. J. Cardiol.* 66: 271-274, 1990.
- Shen, J.B., Jiang, B., Pappano, A.J.: Comparison of L-type calcium channel blockade by nifedipine and/or cadmium in guinea pig ventricular myocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 294: 562-570, 2000.
- Speziale, G., Ruvolo, G., Fattouch, K., Macrina, F., Tonelli, E., Donnetti, M., Marino, B.: Arrhythmia prophylaxis after coronary artery bypass grafting: regimens of magnesium sulfate administration. *Thorac. Cardiovasc. Surg.* 48: 22-26, 2000.
- Stegemann, M., Meyer, R., Haas, H.G., Robert-Nicoud, M.: The cell surface of isolated cardiac myocytes – a light microscope study with use of fluorochrome-coupled lectins. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 22: 787–803, 1990.

- Stimers, J.R.: Cardiac Na⁺/K⁺ pump. In: Heart Physiology and Pathophysiology. 4th Edition; Academic Press, Elsevier, Philadelphia: 407–414, 2001.
- Strauss, H.C., Morales, M.C., Wang, S., Brahmajoti, M.V., Campbell, D.I.: Voltage dependent K⁺ channels. In: heart physiology and pathophysiology. 4th Edition; Academic Press, Elsevier, Philadelphia: 259–276, 2001.
- Stryer, L.: Biochemie. 2. korr. Nachdruck; Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, Oxford, 1994.
- Tanemoto, M., Fujita, A., Kurachi, Y.: Inward rectifying K⁺ channels in the heart. In: Heart Physiology and Pathophysiology. 4th Edition; Academic Press, Elsevier, Philadelphia: 281–303, 2001.
- Tzivoni, D., Banai, S., Schuger, C., Benhorin, J., Keren, A., Gottlieb, S., Stern, D.: Treatment of torsade des pointes with magnesium sulfate. *Circulation* 77: 392-397, 1988.
- Vierling, W., Stampfl, A.: Magnesium-dependent calcium efflux in mammalian heart muscle. *Cell Calcium* 15: 175-182, 1994.
- Weidmann, S.: The effects of calcium ions and local anesthetics on electrical properties of Purkinje fibres. *J. Physiol.* 129: 568–582, 1955.
- Xiong, L., Kleerekoper, Q.K., He, R., Putkey, J.A., Hamilton, S.L.: Sites on calmodulin that interact with the C-terminal tail of Cav1.2 channel. *J. Biol. Chem.* 280: 7070-7079, 2005.
- Zühlke, R.D., Pitt, G.S., Deisseroth, K., Tsien, R.W., Reuter, H.: Calmodulin supports both inactivation and facilitation of L-type calcium channels. *Nature* 399: 159-162, 1999.
- Zühlke, R.D., Reuter, H.: Ca²⁺-sensitive inactivation of L-type Ca²⁺ channels depends on multiple cytoplasmic amino acid sequences of the alpha1C subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 3287-3294, 1998.
- Zwillinger, L.: Über die Magnesiumwirkung auf das Herz. *Klin. Wochenschr.* 14: 1429-1433, 1935.

DANKSAGUNG

Zu ganz besonderem Dank bin ich Herrn Professor Dr. W. Vierling verpflichtet für die Anregung dieser Arbeit sowie für sein großes Interesse, die tatkräftige Unterstützung und die Leitung dieser Arbeit, außerdem möchte ich mich für die vielfachen Anregungen und die interessanten Diskussionen bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. F. Hofmann bedanke ich mich ganz herzlich dafür, dass ich am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Technischen Universität München, dem er als Direktor vorsteht, diese Arbeit durchführen konnte, weiterhin bedanke ich mich für die Diskussionen und sehr hilfreichen Anregungen.

Herrn Volker Beckmann vom NASA space flight center, Washington, USA möchte ich herzlich für die Unterstützung bei der Bearbeitung von mathematischen und statistischen Problemstellungen zur Integration biophysikalischer Modelle in diese Arbeit meinen Dank aussprechen.

Weiterhin gebührt mein Dank meinen Angehörigen und meiner lieben Lebensgefährtin Uta Hinkel für die tatkräftige Hilfe beim Korrekturlesen.

Außerdem gilt mein herzlichster Dank:

Herrn Stampfl für wissenschaftliche Ratschläge.

Frau Apostolopoulos und Herrn Heumann für die Unterstützung bei der Laborarbeit.

Herrn Ertl, Herrn Stitzelsberger und Herrn Kerner für die ausgezeichnete technische Unterstützung bei der Realisierung der Laboruntersuchungen.

Frau Günther und Herrn Kufner für die maßgebliche praktische Unterstützung.