

Aus dem Institut für Vegetative Physiologie und Pathophysiologie
Zentrum für Experimentelle Medizin
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Direktor: Prof. Dr. med. Heimo Ehmke

**Ein nichtselektiver Kationenkanal großer Leitfähigkeit
mit Eigenschaften von Polycystin-2
in linksventrikulären Myozyten der Ratte**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Alexander Peter Schwoerer
aus Hannover

Hamburg, 2005

Angenommen von dem Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 25.01.2006

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuß, der/die Vorsitzende: *Prof. Ehmke*

Prüfungsausschuß, 2. Gutachter/in: *PD Dr. Bähring*

Prüfungsausschuß, 3. Gutachter/in: *Prof. Strauß*

Für Jenny

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	1
1.1. Autosomal Dominante Polyzystische Nierenerkrankung.....	1
1.2. Polycystine.....	2
1.2.1. Expressionsmuster von Polycystinen	2
1.2.2. Funktionen der Polycystine	4
1.2.3. Expression und Funktion von Polycystinen im Herzen	8
1.3. Kationenkanäle großer Leitfähigkeit (LCCs) im Herzen	8
1.4. Ziele dieser Arbeit	11
2. Material und Methoden	12
2.1. Einzelzell-RT-PCR.....	12
2.2. Die Patch-Clamp Technik	14
2.2.1. Die cell-attached Konfiguration	15
2.2.2. Die whole-cell Konfiguration.....	15
2.2.2.1. Die ruptured-patch Technik.....	16
2.2.2.2. Die perforated-patch Technik.....	16
2.2.3. Voltage-clamp und current-clamp	17
2.2.4. Elektrische Eigenschaften der whole-cell Konfiguration.....	17
2.2.4.1. Kompensation des Serienwiderstandes R_s	19
2.2.5. Übergangspotentiale und deren Korrektur	19
2.2.6. Vorzeichenkonventionen	20
2.3. Der Patch-Clamp Versuchsstand	21
2.3.1. Die mechanischen Komponenten	21
2.3.2. Die Versuchskammer	21
2.3.3. Versuchslösungen und Chemikalien	23
2.3.3.1. Versuchslösungen.....	23
2.3.3.2. Herkunft der verwendeten Chemikalien.....	25
2.3.4. Die elektronischen Komponenten	26
2.3.5. Die Patchpipetten.....	26
2.4. Isolation einzelner Kardiomyozyten von Sprague-Dawley Ratten	27
2.5. Durchführung der Patch-Clamp Experimente	28

2.6. Experimentelle Erhöhung der zytosolischen Calciumkonzentration.....	29
2.7. Auswertung der Experimente	30
2.7.1. Einlesen der Daten in den Computer und Auswertungsprogramme	30
2.7.2. Bestimmung von Einzelkanalstromamplituden.....	31
2.7.3. Bestimmung von Offenwahrscheinlichkeiten	31
2.7.4. Strom-Spannungsbeziehung	32
2.7.5. Umkehrpotential	32
2.7.6. Leitfähigkeit	33
2.7.7. Goldman-Hodgkin-Katz Gleichung	34
2.7.8. Dosis-Wirkungs-Kurve.....	35
2.7.9. Temperaturabhängigkeit – Q_{10}	36
3. Ergebnisse	37
3.1. Expression von PKD in Kardiomyozyten	37
3.2. Die Aktivierung eines Kanals großer Leitfähigkeit.....	39
3.3. Perforated-patch Versuche	41
3.4. Biophysikalische Eigenschaften	42
3.4.1. Strom-Spannungsbeziehung / Leitfähigkeit	42
3.4.2. Zustände verschiedener Leitfähigkeit.....	44
3.4.3. Temperaturabhängigkeit und extrazelluläre Azidifikation.....	46
3.4.4. Ionenselektivität.....	46
3.4.4.1. Permeabilität für monovalente Ionen	47
3.4.4.2. Permeabilität für divalente Kationen.....	51
3.4.5. Mechanismen der Aktivierung	52
3.4.5.1. Calcium.....	52
3.4.5.2. Coffein.....	56
3.4.6. Modulation der Kanaleigenschaften durch divalente Kationen	58
3.5. Pharmakologische Eigenschaften des LCCs	60
3.5.1. 18- α -Glycyrrhetinsäure	60
3.5.2. Ryanodin.....	61
3.5.3. Ruthenium-Rot	64
3.5.4. FK506	64
3.5.5. Lanthan, Gadolinium.....	65

3.5.6.	Nickel	65
3.5.7.	Flufenaminsäure	67
3.5.8.	Amilorid	67
3.5.9.	Zusammenfassung der pharmakologischen Ergebnisse	69
3.6.	Auswirkungen einer Aktivierung des LCCs auf das Membranpotential.....	70
4.	Diskussion.....	72
4.1.	Expression von Polycystinen in ventrikulären Kardiomyozyten der Ratte	72
4.2.	Existenz eines Kanals großer Leitfähigkeit in Kardiomyozyten der Ratte	74
4.2.1.	Biophysikalische Eigenschaften	74
4.2.1.1.	Leitfähigkeit	74
4.2.1.2.	Temperatur und extrazelluläre Azidifikation	76
4.2.1.3.	Ionenselektivität	76
4.2.1.4.	Mechanismen der Aktivierung	77
4.2.1.4.1.	Calcium.....	78
4.2.1.4.2.	Coffein.....	80
4.2.1.4.3.	Kontraktion.....	81
4.2.1.5.	Modulation der Kanaleigenschaften durch divalente Kationen	82
4.3.	Beziehung des LCCs zu anderen nichtselektiven Kationenkanälen im Herzen..	83
4.3.1.	Calciumaktivierte nichtselektive Kationenkanäle (CAN) im Herzen	83
4.3.2.	Dehnungsaktivierte Ionenkanäle	85
4.3.3.	Gap-Junction Halbkanäle	86
4.3.4.	Ryanodin-Rezeptor Kanäle	88
4.3.5.	Polycystin Kanäle	90
4.4.	Mögliche Bedeutungen der Polycystine im Herzen	92
5.	Zusammenfassung	95
6.	Literaturverzeichnis	96
7.	Abbildungsverzeichnis	109
8.	Tabellenverzeichnis	109
9.	Abkürzungsverzeichnis.....	110

10.	Danksagung.....	113
11.	Lebenslauf	114
12.	Eidesstattliche Versicherung	115

1. EINLEITUNG

1.1. Autosomal Dominante Polyzystische Nierenerkrankung

Die autosomal dominant vererbte polyzystische Nierenerkrankung (ADPKD) ist mit einer Inzidenz von weltweit etwa 1 : 1000 eine der häufigsten genetischen Erkrankungen [Wilson, 2001]. Sie ist charakterisiert durch die Bildung zahlreicher Zysten in verschiedenen Organen, vor allem in den Nieren. Die Zysten entstehen dort fokal aus den Epithelzellen der Tubuli sowie der Sammelrohre und verdrängen durch ihr Wachstum gesundes und funktionsfähiges Nierengewebe. Über einen Zeitraum von Jahren und Jahrzehnten entwickeln die Betroffenen eine zunehmende Niereninsuffizienz, so daß im Alter von 60 Jahren bei mehr als der Hälfte der Patienten eine terminale Niereninsuffizienz diagnostiziert wird [Arnaout, 2001]. Die ADPKD ist dabei die häufigste Manifestationsform aller polyzystischen Nierenerkrankungen und eine der führenden monokausalen Ursachen für eine terminale Niereninsuffizienz. So leiden etwa 10–15 % der terminal niereninsuffizienten Patienten an einer ADPKD [Arnaout, 2001].

Neben extrarenalen Zystenbildungen in der Leber und der Lunge kommt es bei dieser Erkrankung zu verschiedenen kardiovaskulären Manifestationen. Bei bis zu 25 % der Patienten treten Herzklappenfehler auf, wobei am häufigsten ein Mitralklappenprolaps diagnostiziert wird. Die Inzidenz intrakranieller Aneurysmen, Aortenwurzeldilatationen und Dissektionen von intrazerebralen und koronaren Gefäßen sowie der Aorta ist deutlich erhöht. Aneurysmen rupturieren dabei wesentlich früher als bei ansonsten gesunden Patienten [Arnaout, 2001; Igarashi et al., 2002]. Etwa 75 % der Patienten entwickeln bereits zu einem frühen Zeitpunkt des Krankheitsverlaufs einen schwer zu behandelnden arteriellen Hypertonus. Interessanterweise zeigt sich darüber hinaus bei einigen Patienten unabhängig vom Blutdruck eine Relaxationsstörung des Herzens, welche als diastolische Dysfunktion bezeichnet wird [Hossack et al., 1988].

Seit 1994 ist bekannt, daß die ADPKD durch Mutationen in den Polycystic-Kidney-Disease Genen (*PKD*) verursacht wird [EPKDC, 1994]. Die Patienten sind dabei heterozygote Träger von Mutationen in *PKD1* oder *PKD2*. Im Laufe ihres Lebens kommt es im Sinne der „second-hit“ Theorie zu einer zusätzlichen Mutation im gesunden Allel und damit zu einem Defekt in dem davon kodierten Protein in der

jeweiligen Zelle. Mutationen in *PKD1* sind für etwa 85 % der Fälle von ADPKD verantwortlich und gehen mit einem früheren Beginn und einem deutlich schwereren klinischen Verlauf einher als die Mutationen in *PKD2* [Wilson, 2001; Cantiello, 2004; Delmas et al., 2004b]. Für die ebenfalls in diese Genfamilie gehörenden Gene *PKDL* und *PKD2L2* konnten bisher keine ursächliche Beteiligung an der ADPKD gefunden werden [Nomura et al., 1998; Veldhuisen et al., 1999].

1.2. Polycystine

Polycystine (PC) sind die Proteine, welche von den *PKD* Genen kodiert werden. Sie sind inzwischen zu einer Proteinfamilie zusammengefaßt, die in Polycystin-1-ähnliche und Polycystin-2-ähnliche Proteine eingeteilt werden kann. Zu der ersten Gruppe gehört Polycystin-1 (PC1) und der „sea urchin Receptor for Egg Jelly“ (suREJ), zu der letzteren Polycystin-2 (PC2) und dessen Homologe Polycystin-L (PCL) bzw. Polycystin-2L2 (PC2L2). Aufgrund ihrer molekularen Struktur werden die Polycystin-2-ähnlichen Proteine darüber hinaus zu der Superfamilie der „Transienten Rezeptor Potential Kanäle“ („Transient Receptor Potential“, TRP) gezählt, in der sie die TRPP Kanalfamilie begründeten [Huang, 2004].

1.2.1. Expressionsmuster von Polycystinen

Polycystin-1, ein etwa 500 kD schweres Protein, wird durch *PKD1* kodiert und besitzt elf Transmembrandomänen. Dabei verfügt es über je ein extrazelluläres und ein zytoplasmatisches Ende [Igarashi et al., 2002]. Verschiedene Studien konnten eine Expression von PC1 in nahezu allen Organen – einschließlich Niere, Leber, Gehirn und Pankreas – belegen [Ong et al., 1999a; Wilson, 2001; Arnaout, 2001; Igarashi et al., 2002; Delmas et al., 2004b]. Auch in kardiovaskulären Strukturen gelang der Nachweis von PC1, so beispielsweise im Endo- und Myokard, in der Lamina Fibrosa aller Herzklappen und auch in glatten Muskel- und Endothelzellen von Gefäßen [Arnaout, 2001]. Interessanterweise scheint die Expression von PC1 dabei von der Entwicklungsphase abhängig zu sein. Sie nimmt mit zunehmendem Grad der

Ausdifferenzierung des Organs deutlich ab, kann aber bei Organverletzungen wieder zunehmen [Wilson, 2001; Arnaout, 2001; Igarashi et al., 2002].

Polycystin-2 wird von *PKD2* kodiert, ist etwa 100 kD schwer und bildet sechs Transmembrandomänen aus, wobei sich beide Enden intrazellulär befinden [Markowitz et al., 1999; Wilson, 2001; Igarashi et al., 2002; Delmas et al., 2004b]. Analog zu PC1 wird PC2 in zahlreichen Geweben wie Niere, Pankreas, Leber, Gehirn und Herz exprimiert [Markowitz et al., 1999; Wilson, 2001; Arnaout, 2001; Igarashi et al., 2002]. Die Expression von PC2 ist ebenso wie die von PC1 von der Entwicklungsphase abhängig, allerdings kommt es bei Erwachsenen nicht zu einer so stark ausgeprägten Herunterregulierung der Expression wie sie für PC1 beschrieben ist [Arnaout, 2001; Delmas et al., 2004b]. Polycystin-L, kodiert von *PKDL* (entspricht in der Nomenklatur *PKD2L1*), ließ sich im Herzen und den Nieren, embryonal darüber hinaus auch in der Leber und im Gehirn nachweisen [Nomura et al., 1998]. Polycystin-2L2, ein Protein mit höchstwahrscheinlich sieben Transmembrandomänen, wird von *PKD2L2* kodiert. Es wurde bisher nur im Hoden und im Herzen gefunden [Guo et al., 2000].

Offensichtlich werden Polycystine in genau den Organen bzw. den Gewebeanteilen exprimiert, die auch bei Vorliegen einer ADPKD betroffen sind. So ist es nicht überraschend, daß es bereits in verschiedenen Arbeiten gelang, bei Patienten mit ADPKD mutierte Polycystine in nahezu allen geschädigten Geweben nachzuweisen (siehe Übersichtsarbeit: [Arnaout, 2001]). Beispielsweise konnten defekte PC1 bzw. PC2 in den Gefäßwänden zerebraler Aneurysmen und in der Mehrzahl der Nierenzysten gefunden werden [Torres et al., 2001]. Darüber hinaus wurde interessanterweise eine koordinierte Präsenz bzw. ein Fehlen von PC1 und PC2 in Nierenzysten beobachtet; dies legt eine funktionelle Interaktion zwischen beiden Proteinen nahe [Geng et al., 1996; Ibraghimov-Beskrovnaya et al., 1997; Arnaout, 2001].

1.2.2. Funktionen der Polycystine

Analog zu der strukturellen Einteilung der Polycystine in PC1-ähnliche und PC2-ähnliche Proteine können Polycystine auch funktionell in Interaktionsproteine (PC1) und Kanalproteine (PC2-ähnliche) unterschieden werden (vgl. Tabelle 1, S. 7). Bei PC1 handelt es sich um ein plasmamembranständiges Protein, welches an Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Interaktionen und an der Regulation verschiedener Gene beteiligt ist. Bei den Interaktionsaufgaben scheint die Lokalisation des Proteins in der Zellmembran stark von dessen Aufgabe abzuhängen. Während PC1 embryonal vermehrt an Zell-Matrix-Grenzen zu finden ist, kommt es im Laufe der Entwicklung zu einer Verlagerung, so daß es schließlich bei adulten Geweben dann eher an Zell-Zell-Grenzen detektiert wird [Wilson, 2001]. Neben seiner bereits seit längerem bekannten Fähigkeit, verschiedene embryonale Gene zu regulieren, konnte kürzlich gezeigt werden, daß PC1 die calciumabhängige Signalkaskade über Calcineurin/NFAT aktivieren kann. Diese ist an verschiedenen Regelprozessen, interessanterweise auch an der Hypertrophieentwicklung des Herzens, beteiligt [Wilson, 2001; Puri et al., 2004].

PC2, PCL und PC2L2 weisen strukturelle Homologien zu Na⁺- und Ca²⁺-Kanälen auf [Wilson, 2001]. Tatsächlich konnte in verschiedenen Versuchsumgebungen für PC2 und PCL demonstriert werden, daß diese Proteine nichtselektive Kationenkanäle bilden. Im Einzelnen wurde sowohl für monovalente (Li⁺, Na⁺, K⁺, Rb⁺, Cs⁺) als auch für divalente (Mg²⁺, Ca²⁺, Sr²⁺, Ba²⁺) Kationen sowie für NH₄⁺ eine Permeabilität nachgewiesen. Die Leitfähigkeiten lagen dabei je nach gewählten Versuchsbedingungen und Ladungsträgern zwischen 32 und 530 pS. Auch wenn es teilweise widersprüchliche Befunde gibt, ist unstrittig, daß die Aktivität der durch PC2 und PCL geformten Kanäle durch divalente Kationen – vor allem Ca²⁺ – maßgeblich beeinflußt wird. So sind durch PC2 gebildete Kanäle beispielsweise als calciumaktivierte calciumfreisetzende Kanäle in der Membran des endoplasmatischen Retikulums beschrieben worden [Chen et al., 1999; Gonzalez-Perrett et al., 2000; Vassilev et al., 2001; Koulen et al., 2002; Liu et al., 2002; Cantiello, 2004; Delmas et al., 2004b] (Übersichtsartikel unter:[Igarashi et al., 2002]).

Weiterhin gibt es Hinweise, daß PC1 die Funktion der durch PC2 gebildeten Kanäle moduliert beziehungsweise ihre Funktion als Kanäle erst ermöglicht [Hanaoka et al., 2000; Guo et al., 2000; Nauli et al., 2003; Delmas et al., 2004a]. Expressionsversuche an CHO-Zellen und an Neuronen legten die Vermutung nahe, daß PC2 nur in Gegenwart von PC1 in die Zellmembran transportiert wird und dort dann zusammen mit PC1 einen funktionsfähigen Kanalkomplex bildet [Hanaoka et al., 2000; Delmas et al., 2004a].

Darüber hinaus zeigten Nauli et al. vor kurzem, daß PC1 und PC2 in den Zilien der Nierenepithelien co-lokalisieren, dort mechanische Stimuli an der Außenseite der Zelle aufnehmen und diese über einen Calciuminflux an intrazelluläre Calciumsignalwege koppeln [Nauli et al., 2003]. Bei diesem Prozeß fungiert das lange extrazelluläre Ende von PC1 als Mechanosensor und aktiviert durch Konformationsänderungen an dem eng assoziierten PC2 einen Calciumeinstrom, der intrazellulär wiederum eine calciumabhängige Calciumfreisetzung auslöst. Demnach kann in diesen Epithelzellen ein externer Stimulus wie beispielsweise eine Scherspannung über membranständige Polycystine calciumabhängige Signalkaskaden aktivieren, die an Genexpression, Wachstumsregulierung, Zelldifferenzierung oder Apoptose beteiligt sind. Die Autoren konnten zeigen, daß durch die Blockade von PC1 oder PC2 durch spezifische Antikörper die Zellen die Fähigkeit zur Aktivierung dieser Signalkaskade verlieren [Nauli et al., 2003].

Analog dazu muß davon ausgegangen werden, daß bei „loss-of-function“ Mutationen in *PKD1* oder *PKD2* dieser Kopplungsmechanismus defekt ist, und Zellen inadäquat auf externe Wachstumsstimuli reagieren. Bemerkenswert ist diese Schlußfolgerung deshalb, da genau von den Epithelzellen in den Nierentubuli das progressive Zystenwachstum bei der ADPKD ausgeht. Somit gibt dieser aufgezeigte Signalweg einen guten Erklärungsansatz für den Zusammenhang zwischen defekten Polycystinen einerseits und unregelmäßigem Zellwachstum und damit der Zystenbildung in epithelialen Organen andererseits [Delmas et al., 2004b].

Hinweise darauf, wie wichtig Polycystine für die regelrechte Entwicklung und für den langfristigen Erhalt von funktionsfähigen Geweben und Organen sind, finden sich sowohl am Krankheitsbild der ADPKD, bei der heterozygote Träger von *PKD* Mutationen im Laufe ihres Lebens zahlreiche Fehlbildungen in verschiedenen Geweben

entwickeln (vgl. Kapitel 1.1) als auch an einigen tierexperimentellen Beobachtungen. So zeigen selbst Mäuse, die Träger nur eines gesunden *PKD2* Allels sind ($PKD2^{+/-}$) einen erhöhten arteriellen Blutdruck, eine gestörte Calciumhomöostase in den glatten Gefäßmuskelzellen und letztlich eine deutlich reduzierte Lebenserwartung [Qian et al., 2003]. Homozygote Träger einer *PKD2* Null-Mutation ($PKD2^{-/-}$) hingegen sind nicht lebensfähig, sie versterben bereits intrauterin an schwersten kardialen und renalen Mißbildungen [Wu et al., 2000].

Autoren	PC	Expressionsmodell / Tier / Organ	Permeabilität	Leitfähigkeit
Hanaoka [Hanaoka et al., 2000]	Polycystin-1 + Polycystin-2	Ovarialzellen, Hamster (CHO-Zellen)	Na ⁺ , Cs ⁺	k.A.
Nauli [Nauli et al., 2003]	Polycystin-1 + Polycystin-2	Nierenzellen, Maus	Ca ²⁺	k.A.
Delmas [Delmas et al., 2004a]	Polycystin-1 + Polycystin-2	Neuronen, Ratte	Na ⁺ , K ⁺ , Ca ²⁺	90-110 pS
Vassilev [Vassilev et al., 2001]	Polycystin-2	Oocyten Xenopus laevis	Li ⁺ , Na ⁺ , K ⁺ , Rb ⁺ , Ca ²⁺ , Sr ²⁺ , Ba ²⁺ , NH ₄ ⁺	40-130 pS
Gonzalez-Perret [Gonzalez- Perrett et al., 2000]	Polycystin-2	Plazenta Membran, Mensch und Sf9-Zellen	Na ⁺ , K ⁺ , Cs ⁺ , Ca ²⁺ , Ba ²⁺	32-530 pS
Koulen [Koulen et al., 2002]	Polycystin-2	ER aus kultivierten Nierenzellen, Schwein	Mg ²⁺ , K ⁺ , Ca ²⁺ , Ba ²⁺	90-120 pS
Chen [Chen et al., 1999]	Polycystin-L	Oocyten Xenopus laevis	Na ⁺ , K ⁺ , Ca ²⁺ , Sr ²⁺ , Ba ²⁺	120-135 pS
Liu [Liu et al., 2002]	Polycystin-L	Oocyten Xenopus laevis	Na ⁺ , K ⁺ , Cs ⁺ , Ca ²⁺ , NH ₄ ⁺	150-366 pS

Tabelle 1: **Veröffentlichte Literatur über durch Polycystin gebildete Kanäle**

Diese Tabelle gibt einen Überblick über Publikationen, in denen Kanaleigenschaften von Polycystinen untersucht wurden. Ihr sind die jeweils untersuchten Polycystine, der verwendete Zelltyp, die Permeabilität für verschiedene Ionen und die beobachteten Leitfähigkeiten zu entnehmen. ER steht dabei für endoplasmatisches Retikulum.

1.2.3. *Expression und Funktion von Polycystinen im Herzen*

Proteine der Polycystinfamilie wurden in myokardialen und endokardialen Zellen sowohl embryonaler als auch adulter Mäuse und Menschen nachgewiesen [Nomura et al., 1998; Ong et al., 1999b; Guo et al., 2000; Igarashi et al., 2002]. Die Funktion der Polycystine im Herzen ist noch nicht identifiziert, aber die klinischen Manifestationen, die bei Mutationen in *PKD* beobachtet werden, deuten auf eine wichtige Rolle bei der Organentwicklung hin. Wie bereits ausgeführt, bilden Polycystin-2-ähnliche Proteine in anderen Geweben nichtselektive Kationenkanäle mit sehr distinktiven biophysikalischen Eigenschaften, wie beispielsweise einer außergewöhnlich großen Leitfähigkeit und einer Permeabilität für Calciumionen. Insgesamt liegt daher die Vermutung nahe, daß auch in Herzmuskelzellen derartige Kationenkanäle zu finden sind.

Im vergangenen Jahrzehnt wurde tatsächlich in einigen Arbeiten die Existenz von Kationenkanälen großer Leitfähigkeit („Large Conductance Nonselective Cation Channel“, LCC) in Herzmuskelzellen beschrieben (vgl. Tabelle 2, S. 10). Sowohl die molekulare Identität der jeweils beobachteten Kanäle als auch ihre Zuordnung zu funktionellen Ionenkanalgruppen blieb jedoch unklar.

1.3. *Kationenkanäle großer Leitfähigkeit (LCCs) im Herzen*

Mechmann und Pott dokumentierten erstmalig im Rahmen ihrer Identifikation des Natrium-Calcium-Austauscherstromes 1986 einen Kanal großer Leitfähigkeit in atrialen Myozyten [Mechmann et al., 1986]. 1990 charakterisierte die Arbeitsgruppe um Lutz Pott diesen LCC in isolierten atrialen Myozyten von Meerschweinchen dann ausführlich [Pott et al., 1990]. Der LCC wurde durch Calciumfreisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) mittels Coffein aktiviert und verfügte über eine maximale Einzelkanalleitfähigkeit von 280 pS für monovalente Kationen. Darüber hinaus zeigte dieser Kanal verschiedene Zustände geringerer Leitfähigkeit, eine Aktivierbarkeit durch β -adrenerge Stimulierung und war durch Oktanol inhibierbar. Die Autoren vermuteten, daß der beobachtete Kanal am ehesten der Familie der Gap-Junction Halbkanäle (Connexone) zuzuordnen sei. Sie wiesen aber gleichzeitig darauf

hin, daß es sich bei Oktanol um einen unspezifischen Inhibitor von Gap-Junction Halbkanälen handele und daß die LCCs unter Bedingungen beobachtet wurden, unter denen Connexone normalerweise geschlossen vorlägen. Somit konnte die Identität der Kanäle nicht zweifelsfrei aufgeklärt werden.

Pancrazio et al. beobachteten einen Kanal vergleichbarer Leitfähigkeit (310 pS) bei coffeininduzierter Calciumfreisetzung in ventrikulären Myozyten von Meerschweinchen [Pancrazio et al., 1994]. Diese Arbeit beschränkte sich darauf, die Abhängigkeit der Kanalaktivität von der zytosolischen Calciumkonzentration und von verschiedenen volatilen Anästhetika sowie Ryanodin zu beschreiben. Vorschläge zu der Identität des LCCs wurden keine gemacht.

In Ventrikelzellen von Kaninchen zeigten Kondo et al. einen calciumaktivierten nichtselektiven LCC mit einer Einzelkanalleitfähigkeit von 300-400 pS für monovalente Kationen [Kondo et al., 2000]. Die Autoren konnten den LCC aktivieren, indem sie Calciumionen mittels Coffein aus intrazellulären Calciumspeichern beziehungsweise mittels Photolyse aus Calciumkomplexen freisetzten. Die Leitfähigkeit des Kanals ließ sich in ihren Versuchen durch Ruthenium-Rot und Ryanodin beeinflussen. Die Autoren postulierten daher, daß die beobachteten Kanäle vermutlich mit Ryanodin-Rezeptor Kanälen verwandt seien. Offen blieb, wie diese normalerweise im sarkoplasmatischen Retikulum lokalisierten Kanäle zur Zellmembran transportiert und dort eingebaut werden.

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß eine Reihe von Arbeiten LCCs mit insgesamt durchaus vergleichbaren Eigenschaften in Herzmuskelzellen verschiedener Spezies nachweisen konnten. Diese Kanäle zeichnen sich durch eine große Einzelkanalleitfähigkeit im Bereich von 80-400 pS aus und sind durch eine Zunahme der zytosolischen Calciumkonzentration aktivierbar. Ferner sind sie nichtselektiv permeabel für monovalente und divalente Kationen, nicht jedoch für Anionen. Zusätzlich haben fast alle Autoren darüber hinaus auf die extrem niedrige Anzahl von maximal fünf beobachteten Kanälen pro Zelle hingewiesen. Äußerst unterschiedliche Angaben wurden hingegen über die Modulation der Kanalaktivität durch verschiedene Substanzen gemacht, wodurch die sichere Zuordnung der beobachteten Kanäle zu bekannten Kanalgruppen erschwert wird. Während Pott et al. Ähnlichkeiten zu Gap-Junction Halbkanälen sahen, interpretierten Kondo et al. die Kanäle aufgrund ihrer

Modulation durch Ruthenium-Rot und Ryanodin eher als Ryanodin-Rezeptor Kanäle. Pancrazio et al. machten keinen Vorschlag zu der Identität des beobachteten Kanals.

Autoren	Untersuchter Zelltyp	Mechanismen der Aktivierung	Modulation durch	Leitfähigkeit	Vorschlag zur Identität
Pott [Pott et al., 1990]	Atriale Myozyten, Meerschweinchen	Coffein, Ca^{2+}	Noradrenalin Oktanol	280 pS	Gap-Junction Halbkanäle
Pancrazio [Pancrazio et al., 1994]	Ventrikuläre Myozyten, Meerschweinchen	Coffein, Ca^{2+} , Halothan	Ryanodin, Halothan, $[Ca^{2+}]_i$	310 pS	Keiner
Kondo [Kondo et al., 2000]	Ventrikuläre Myozyten, Kaninchen	Coffein + Ca^{2+}	$[Ca^{2+}]_i$, Ryanodin, Ruthenium-Rot	300- 400 pS	Ryanodin-Rezeptor Kanäle

Tabelle 2: **Kationenkanäle großer Leitfähigkeit in Herzmuskelzellen**

Zusammenfassung der Veröffentlichungen über LCCs im Herzen (untersuchte Zellen, Mechanismen der Aktivierung, der Modulierung, die Leitfähigkeit und der von den jeweiligen Autoren gemachte Vorschlag zur Identität). $[Ca^{2+}]_i$ entspricht der freien zytosolischen Calciumkonzentration.

1.4. Ziele dieser Arbeit

Bemerkenswerterweise besitzen die von mehreren Autoren im Herzen verschiedener Spezies gefundenen calciumaktivierten nichtselektiven Kationenkanäle großer Leitfähigkeit in vielerlei Hinsicht ähnliche Eigenschaften wie die durch Polycystin gebildeten Kanäle. In der vorliegenden Arbeit soll daher untersucht werden, ob linksventrikuläre Kardiomyozyten der Ratte Polycystine exprimieren. Ferner soll elektrophysiologisch geklärt werden, ob in diesen Zellen Kationenkanäle großer Leitfähigkeit (LCC) identifizierbar sind und ob es sich bei diesen Kanälen um durch Polycystine gebildete Kanäle handelt. Abschließend soll eine mögliche (patho-)physiologische Rolle dieser LCCs in Kardiomyozyten untersucht werden.

Die Expression von PKD1-, PKD2-, PKDL- und PKD2L2-mRNA in Kardiomyozyten wurde mittels Einzelzell-RT-PCR (Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion) untersucht. Analog zu den bereits vorgestellten Arbeiten über LCCs im Herzen wurde geprüft, ob sich in Kardiomyozyten durch die Erhöhung der zytosolischen Calciumkonzentration mittels Applikation einer coffeinhaltigen Badlösung ein nichtselektiver Kationenkanal großer Leitfähigkeit aktivieren läßt. Um dann eine Zuordnung des LCCs zu einer bestimmten Kanalfamilie zu ermöglichen, wurden dessen biophysikalischen Eigenschaften wie beispielsweise Mechanismen der Aktivierung, Permeabilität und Leitfähigkeit und dessen Modulierung durch verschiedene Pharmaka charakterisiert.

Vor dem Hintergrund der bereits zitierten Arbeiten und den im Verlauf der Versuche gewonnenen Erkenntnisse wurde die Zugehörigkeit des LCCs nicht nur zu der Polycystin Kanalfamilie erwogen, sondern es wurden auch Kanalgruppen in Betracht gezogen, die vergleichbare Eigenschaften besitzen. Dazu zählten calciumaktivierte nichtselektive Kationenkanäle („Calcium Activated Nonselective Cation Channels“, CAN bzw. „Transient Receptor Potential Channels“, TRP), dehnungsaktivierte Kanäle („Stretch Activated Channels“, SAC), Gap-Junction Halbkanäle und Ryanodin-Rezeptor Kanäle.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Einzelzell-RT-PCR

Die molekularbiologischen Nachweise inklusive der Einzelzell-RT-PCR wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Jobst-H. Schultz in unserer Abteilung durchgeführt. Für die Einzelzell-RT-PCR Analyse einzelner Kardiomyozyten wurden diese bei 100-facher Vergrößerung aus der Versuchskammer in eine Kapillare eingesaugt. Der Kapillarinhalt wurde in ein RT-PCR Reaktionsgefäß expelliert. Um eine Degradation von mRNA durch Ribonukleasen zu verhindern, waren in dieses Gefäß Ribonuklease-Inhibitoren vorgelegt. Nach Zentrifugation, kurzem Einfrieren und Auftauen wurden durch reverse Transkription mit gen-spezifischen Primern komplementäre DNA Stränge (cDNA) synthetisiert. Anschließend wurden von dieser cDNA mittels PCR Fragmente des gesuchten Gens amplifiziert. Die verwendeten Primer waren dabei Intron-überspannend, um eine eventuelle Amplifikation genomischer DNA auszuschließen. Aufgrund der bei Einzelzelluntersuchung vorliegenden äußerst geringen Ausgangsmenge an mRNA waren zwei konsekutive Amplifikationen mit je 35 Zyklen notwendig. Dabei wurde die zweite PCR mit 1/10 des Produktes der ersten PCR mit genesteten Primern durchgeführt. Aufgrund der hohen Sensitivität der Einzelzell-RT-PCR können Kontaminationen sehr leicht auftreten. Um diese zu erkennen und entsprechende Proben verwerfen zu können, wurde für jeden PCR Ansatz eine Negativkontrolle mitamplifiziert, die sämtliche für die PCR notwendige Substanzen, jedoch keine cDNA enthielt. Die Nachweisgrenze für die jeweilige PCR Reaktion wurde mit Hilfe von Plasmid DNA untersucht, die niedrigste Konzentration lag hierbei durchgehend bei 0,1 fg Plasmid DNA. Ein Teil der amplifizierten PCR Produkte wurde auf Agarose-Gele aufgetragen und im elektrischen Feld aufgetrennt. Dabei wurde Ethidiumbromid in das Agarose-Gel einpolymerisiert, die so angefärbten DNA Amplifikate mit Hilfe von UV-Licht sichtbar gemacht und zur Dokumentation fotografiert. Die Identifizierung der Fragmente erfolgte durch Sequenzierung [Schultz et al., 2001].

Die PCR Primersequenzen für PKD1, PKD2, PKDL und PKD2L2 waren: PKD1 oberer Primer: 5'-GGA GCG CTG GCC GGA GAC CCT GG-3'; PKD1 unterer Primer: 5'-TGG AGA GGC AGG AAA GGT GTG-3'. PKD1 oberer genesteter Primer:

5'-CGA GTC TGC GCA TCC CGG CTG A-3'. PKD2 oberer Primer: 5'-GGG ACC CGC TGC ATC GCC ACC-3'; PKD2 unterer Primer: 5'-CTC ATA GAA AAT AAA GCT CCG GTT GTC AG-3'. PKD2 oberer genesteter Primer: 5'-CCG AGA GGC TGG TGC GAG GAC-3'. PKDL oberer Primer: 5'-GGC AGG CTC ACA AGC TAC AG-3'; PKDL unterer Primer: 5'-CTC TCC CAT CAG TCG GTT CAC-3'. PKDL oberer genesteter Primer: 5'-TTC AGG ATC CAG ACA AGC CAG-3'. PKD2L2 oberer Primer: 5'-GTC GTC CAC GCT ATC CCG CTG-3'; PKD2L2 unterer Primer: 5'-CAA CAC AGG AAC CAG CTA TGA CC-3'. PKD2L2 oberer genesteter Primer: 5'-AGC TTC GCC ATC ATG TTC TTC-3'.

Die Primersequenzen für die RT waren: PKD1: 5'-TGG AGA GGC AGG AAA GGT GTG-3'; PKD2: 5'-CGG CAC TCC TAG CAG CAG-3'; PKDL: 5'-ACG TGT CTG GCT GCT GTA GG-3'; PKD2L2: 5'-GTT GTG TGA AAT TTG TGA GCG-3'.

2.2. Die Patch-Clamp Technik

1976 publizierten Erwin Neher und Bert Sakmann aus Göttingen die Patch-Clamp Technik („patch“ = Membranfleck, „clamp“ = Klemme) [Neher et al., 1976]. Dieses Verfahren erlaubte erstmals, den Stromfluß von Ionen durch einzelne Kanäle in der Zellmembran zu messen, der im Bereich von wenigen Picoampere (pA) lag. Bei der Patch-Clamp Technik wird eine saubere und polierte Mikropipette aus Glas (die Patchpipette) mit einer Elektrolytlösung (Pipettenlösung) gefüllt und vorsichtig auf die Zellmembran gesetzt. Durch Anlegen eines leichten Unterdrucks saugt sich die Pipettenspitze an der Zellmembran fest und isoliert den darunter liegenden Membranfleck (das sogenannte „patch“) elektrisch von seiner Umgebung. Die Mechanismen, die im Einzelnen zu einer solchen Abdichtung (auch „seal“ genannt) führen, sind dabei noch weitgehend ungeklärt [Corey et al., 1983; Milton et al., 1990; Rae et al., 1992]. Seal-Widerstände im Bereich von mehreren Gigaohm werden als „Gigaseal“ bezeichnet und ermöglichen die Registrierungen von Stromsprüngen, welche durch einzelne Schaltvorgänge von Ionenkanälen verursacht werden [Hamill et al., 1981]. Bemerkenswerterweise ist die mechanische Belastbarkeit einer solchen Verbindung zwischen Pipette und Zelle sehr hoch, so daß Messungen an Herzmuskelzellen durchaus über einen Zeitraum von einer halben Stunde stabil vorgenommen oder Badlösungen während eines Experiments getauscht werden können.

Die direkt nach der Sealbildung vorliegende cell-attached Konfiguration stellt die Ausgangssituation für weitere Meßkonfigurationen („whole-cell“, „outside-out“, „inside-out“) dar. Da in der vorliegenden Arbeit alle Versuche in der whole-cell Konfiguration durchgeführt wurden, wird im folgenden nur auf die Herstellung und die Eigenschaften der cell-attached und der whole-cell Konfiguration eingegangen.

2.2.1. *Die cell-attached Konfiguration*

Nach Erreichen einer elektrischen Abdichtung befindet sich die Zelle in der sogenannten cell-attached Konfiguration. Es können Ströme gemessen werden, die durch den direkt unter der Pipette gelegenen Membranfleck fließen. Da die Zelle bei dieser Konfiguration intakt bleibt, können so z.B. durch Modifikationen in der extrazellulären Badlösung Ionenströme unter Wahrung der physiologischen Zellmechanismen untersucht werden. Dabei muß jedoch in Kauf genommen werden, daß weder das Zellmembranpotential noch die zytosolischen Ionenkonzentrationen genau bekannt sind und dementsprechend auch nicht definiert werden können. Die cell-attached Konfiguration ist darüber hinaus die Ausgangsposition für die Ganzzellkonfiguration („whole-cell Konfiguration“) [Hamill et al., 1981].

2.2.2. *Die whole-cell Konfiguration*

Die whole-cell Konfiguration zeichnet sich dadurch aus, daß ein direkter elektrischer Kontakt zwischen dem Pipetteninnenraum und dem Zellinneren besteht. Somit können Ströme gemessen werden, die über die gesamte Zellmembran fließen, und das Zellmembranpotential kann bestimmt und verändert werden.

Grundsätzlich gibt es zwei verschiedene Möglichkeiten, die cell-attached Konfiguration in eine whole-cell Konfiguration umzuwandeln. Einerseits kann die Zellmembran unter der Pipettenspitze mechanisch zerstört werden; dies wird als ruptured-patch Technik („rupture“ = zerreißen) bezeichnet. Andererseits können künstliche Poren in die Membran eingebaut werden, was dann der perforated-patch Technik („perforate“ = durchlöchern) entspricht.

Die in der whole-cell Konfiguration über die Zellmembran gemessenen Ströme bilden einen Summenstrom aus den Strömen aller in der Zellmembran befindlichen und aktiven Ionenkanäle. Da der Summenstrom in der Regel die Ströme einzelner Ionenkanäle bei weitem übersteigt und der Beitrag einzelner Kanäle verschiedener Gruppen variiert, wird so nur ein „makroskopisches“ Strommuster dieser Zelle gewonnen.

2.2.2.1. *Die ruptured-patch Technik*

Die übliche Methode, eine whole-cell Konfiguration zu erlangen, ist die ruptured-patch Technik. In der cell-attached Konfiguration wird zuerst die Zellmembran durch einen kurzen Strompuls (z.B. 900 mV für 0,1 s) destabilisiert und dann der Membranfleck unter der Patchpipette durch vorsichtige Applikation von Über- oder Unterdruckpulsen mechanisch zerstört.

Dies führt zu einer direkten Verbindung zwischen dem Pipetteninnenraum und dem Zellinneren. Es kommt nun zu einem Lösungsaustausch, wobei die Elektrolytzusammensetzung in der Zelle nach kurzer Zeit praktisch der verwendeten Pipettenlösung entspricht, da das Volumen der Patchpipette sehr viel größer ist als das der Zelle [Marty et al., 1995]. Bei dieser Technik kann nicht ausgeschlossen werden, daß durch die Druckpulse nicht-membranständige Zellorganellen in die Nähe der Zellmembran gebracht werden oder sogar mit dieser verschmelzen. Ein anderes Phänomen ist die zu beobachtende Aktivitätsabnahme einiger Kanäle, da durch das Auswaschen des Zytoplasmas Substanzen aus der Zelle entfernt werden können, die für die Aktivität von Kanälen von Bedeutung sein können (z.B. second messenger). Eine Möglichkeit, diese beiden Probleme weitgehend zu umgehen, stellt die perforated-patch Technik dar.

2.2.2.2. *Die perforated-patch Technik*

Bei der perforated-patch Technik wird der elektrische Zugang zu der Zelle durch den Einbau künstlicher Poren in die Zellmembran erreicht. So entsteht eine niederohmige Verbindung zum Zytoplasma, durch die jedoch keine größeren Moleküle diffundieren können. Hierzu werden die Antibiotika Nystatin [Horn et al., 1988] und Amphotericin B [Rae et al., 1991; Calaghan et al., 2001] verwendet. Diese Substanzen werden in die Pipettenlösung integriert, lagern sich nach dem seal-Vorgang an der Zellmembran an und formen dort kontinuierlich Poren. Diese besitzen einen Durchmesser von unter 0,8 nm und sind für größere Moleküle nicht passierbar, wodurch der Substanz Austausch zwischen Pipettenlösung und Zytoplasma sehr gering bleibt. Weiterhin sind diese Poren selektiv durchlässig für monovalente Kationen und

impermeabel für divalente Kationen sowie für Anionen. Die mechanische Belastung für die Zelle ist deutlich geringer als bei der ruptured-patch Methode. Da die verwendeten porenbildenden Substanzen die Ausbildung einer elektrischen Abdichtung jedoch erheblich erschweren, wird der vorderste Teil der Pipette (ca. 0,5 mm) mit einer antibiotikumfreien Lösung und nur der hintere Teil mit der antibiotikumhaltigen Pipettenlösung gefüllt (sogenanntes „back filling“). Durch den relativ langsamen Diffusionsvorgang des Antibiotikums zur Pipettenspitze hin steht genügend Zeit zur Verfügung, ein seal herzustellen, bevor das Antibiotikum die Pipettenspitze erreicht. Bedingt durch den im Vergleich zur ruptured-patch Technik hohen Serienwiderstand, die komplizierte Handhabung der porenbildenden Substanzen und die vergleichsweise geringe Erfolgsquote kam diese Methode in der vorliegenden Arbeit nur zur Beantwortung von speziellen Fragestellungen zum Einsatz.

2.2.3. *Voltage-clamp und current-clamp*

Ist ein elektrischer Zugang zu der Zelle gebildet, wird generell zwischen zwei elektrischen Registrierkonfigurationen unterschieden: bei der Spannungsklemme („voltage-clamp“) wird das Membranpotential festgelegt („geklemmt“) und die Ströme, die für die Aufrechterhaltung dieses Potentials notwendig sind, aufgezeichnet. Bei der Stromklemme („current-clamp“) hingegen wird der Gesamtstromfluß über die Zellmembran vorgegeben und das resultierende Membranpotential registriert. Als Sonderfall gilt die sogenannte Nullstromklemme. Hierbei wird der Gesamtstromfluß über die Zellmembran auf 0 pA geklemmt. Das dabei registrierte Membranpotential entspricht dem Ruhemembranpotential [Hamill et al., 1981].

2.2.4. *Elektrische Eigenschaften der whole-cell Konfiguration*

Bei der Ganzzelleableitung im voltage-clamp Verfahren wird das elektrische Potential zwischen der Meßelektrode und der in der Badlösung befindlichen Referenzelektrode durch die Kommandospannung V_{pip} definiert. Dabei entspricht V_{pip} nicht dem tatsächlich an der Zellmembran anliegendem Potential V_m . Die zwischen der Meßelektrode und der Referenzelektrode angelegte Spannung fällt an zwei in Serie

geschalteten Widerständen ab: dem Serienwiderstand (R_s) und dem Membranwiderstand (R_m).

Der Serienwiderstand (R_s) entspricht dem zwischen dem Silberdraht der Meßelektrode und dem Zytosol zu findenden elektrischen Widerstand. Idealerweise ist dieser genauso groß wie der elektrische Widerstand der Pipette (R_{pip}). Beim Rupturieren der Zelle können jedoch Membranbestandteile und auch Zellorganellen in den Mündungsbereich der Pipette gelangen, so daß sich der Zugangswiderstand meist auf das zwei- bis dreifache des Pipettenwiderstandes erhöht. Darüber hinaus kann sich der R_s im Verlauf des Versuchs ändern und muß daher ständig kontrolliert werden. Durch gezielte vorsichtige Überdruckpulse ist es möglich, die Pipettenspitze von Membranpartikeln und Organellen „freizuräumen“ und so einen zu hohen R_s wieder zu senken. R_s lag bei den mittels der ruptured-patch Technik eingeleiteten Versuchen üblicherweise unter $10\text{ M}\Omega$.

In Reihe zum Serienwiderstand liegt der Membranwiderstand (R_m), so daß für den Gesamtwiderstand R_{ges} insgesamt gilt: $R_{ges} = R_s + R_m$. Für die an der Membran effektiv anliegende Spannung V_m gilt dementsprechend (mit V_s als der am Serienwiderstand abfallenden Spannung): $V_m = V_{pip} - V_s$. Nur für den Fall, daß R_s deutlich kleiner ist als R_m , kann davon ausgegangen werden, daß der größte Teil der Kommandospannung an der Membran abfällt und das Zellmembranpotential tatsächlich V_{pip} entspricht. Steigt R_s hingegen stark an, so fällt die Kommandospannung im zunehmenden Maße daran ab, und V_m weicht immer mehr von V_{pip} ab.

2.2.4.1. *Kompensation des Serienwiderstandes R_s*

Wie in 2.2.4 beschrieben, fällt ein Teil der Kommandospannung immer am Serienwiderstand R_s ab, so daß an der Zellmembran eigentlich eine niedrigere Spannung anliegt als im Versuchsprotokoll geplant. Dieser Verlust läßt sich kompensieren, indem systematisch zu dem injizierten Strom eine zusätzliche Stromkomponente addiert wird, die einen großen Teil des erwarteten Spannungsverlustes ausgleicht. Dazu wird R_s regelmäßig im Versuchsverlauf durch einen geeigneten Testpuls ermittelt und der erwartete Verlust berechnet. Um positive Rückkopplungseffekte zu vermeiden, wurde in den vorliegenden Experimenten die Kompensation auf 85 % begrenzt.

2.2.5. *Übergangspotentiale und deren Korrektur*

An den Grenzflächen zwischen zwei verschiedenen Lösungen oder einer Lösung und einem Leiter kommt es aufgrund von Konzentrationsunterschieden zu Ionenverschiebungen. Dadurch entstehen elektrische Potentiale. Bei dem hier beschriebenen Versuchsaufbau muß vor allem an folgenden Übergängen mit solchen Potentialen gerechnet werden (betrachtet in der Reihenfolge von der Referenz- zur Meßelektrode):

- 1) zwischen der Silber/Silberchlorid-Meßelektrode im Referenzbad und der Pipettenlösung
- 2) zwischen der Pipettenlösung in der Agar-Brücke und der Badlösung („Liquid Junction Potential“)
- 3) zwischen der Badlösung und der Pipettenlösung in der Pipettenspitze (ebenfalls ein Liquid Junction Potential)
- 4) zwischen der Pipettenlösung und der Silber/Silberchlorid-Referenzelektrode des Verstärkers

Die Potentiale 1) und 4) entstehen beide durch Grenzflächen zwischen einer Silber/Silberchlorid-Elektrode und der Pipettenlösung. Sie sind vom Betrag her

idealerweise gleich groß und heben sich gegenseitig auf. Eventuelle Abweichungen wurden vor Versuchsbeginn bestimmt und kompensiert.

Die Übergangspotentiale 2) und 3) sind gleich groß und heben sich solange auf, wie die Pipettenöffnung frei in der Badlösung steht. Kommt es zu einer Abdichtung zwischen der Pipette und der Zelle, fällt die Grenzfläche zwischen der Bad- und der Pipettenlösung an der Pipettenspitze weg und somit auch dieses Potential. Das Liquid Junction Potential an der Grenzfläche zwischen der Agar-Brücke und der Badlösung (2) hingegen bleibt weiterhin erhalten. Dieses Grenzflächenpotential wurde für alle Versuchslösungen bestimmt und dann automatisch von der Steuersoftware des EPC-9 berücksichtigt. Typische Werte für das Liquid Junction Potential lagen bei Verwendung der *Standard-Badlösung* für die *Standard-Pipettenlösung* bei 3,2 mV und für die *K-Glutamat* Pipettenlösung bei 12,0 mV.

2.2.6. Vorzeichenkonventionen

Definitionsgemäß wird sowohl die Richtung des Stromflusses als auch das angelegte Haltepotential aus der Sicht der Zelle betrachtet. Dabei gilt, daß ein Einwärtsstrom durch den Fluß von positiven Ladungsträgern in die Zelle hinein bzw. von negativen Ladungsträgern aus der Zelle heraus hervorgerufen wird. Auswärtsströme werden dementsprechend durch den Fluß von negativen Ladungsträgern in die Zelle hinein bzw. von positiven Ladungsträgern aus der Zelle hinaus getragen. Weiterhin werden Einwärtsströme mit einem negativen Vorzeichen, Auswärtsströme mit einem positiven Vorzeichen versehen. In Abbildungen werden Einwärtsströme daher nach unten und Auswärtsströme nach oben aufgetragen.

Negative Haltepotentiale entsprechen einer Membranhyperpolarisation (das Zellinnere ist im Vergleich zum Extrazellulärraum negativ), positive Haltepotentiale einer Membrandepolarisation (das Zellinnere ist im Vergleich zum Extrazellulärraum positiv).

2.3. Der Patch-Clamp Versuchsstand

2.3.1. Die mechanischen Komponenten

Selbst geringste Relativbewegungen zwischen der Patchpipette und der Zelle stören Patch-Clamp Versuche. Daher wurde der Versuchsstand als Schutz gegen mechanische Erschütterungen auf einem auf Luftkissen gelagerten, schwingungsgedämpften Steintisch aufgebaut. Um die Meßapparatur gegen elektromagnetische Felder der Umgebung zu schützen, wurde der Versuchsstand von einem Faradaykäfig aus Eisen umgeben, der getrennt vom schwingungsgedämpften Tisch auf einem festen Übertisch stand.

Der Vorverstärker des Patch-Clamp Verstärkers, an dem auch die Pipettenhalterung befestigt war, wurde auf einem motorgetriebenen Mikromanipulator (HS6/3 Märzhäuser) montiert. Die eigentliche Versuchskammer war in den Kreuztisch des Mikroskops eingelassen. Bei dem Mikroskop (Zeiss Axiovert 25) handelte es sich um ein inverses Mikroskop, bei dem die Versuchskammer von oben beleuchtet wird und die Objektive von unten an die Versuchskammer herangeführt werden. Dadurch blieb oberhalb der Versuchskammer genügend Platz, um mit den Versuchsapparaturen zu arbeiten. Zur besseren Darstellung der Zelloberflächen wurden Varelkontrast-Objektive von Zeiss verwendet, die zusammen mit 10-fach vergrößernden Okularen eine 100- bzw. 400-fache Vergrößerung erlaubten. Eine an das Mikroskop angeschlossene CCD-Kamera (Sony) ermöglichte es, über einen Monitor die Zelle zu beobachten.

Der Pipettenhalter war mit einem Schlauch verbunden, über den sowohl mittels einer Glasspritze als auch eines Mundstückes Über- bzw. Unterdruck in der Patchpipette hergestellt werden konnte. Die Druckmessung erfolgte dabei über ein flüssigkeitsgefülltes, U-förmig geformtes Glasrohr.

2.3.2. Die Versuchskammer

Bei der Versuchskammer (Eigenbau der Werkstatt) handelte es sich um eine 6 x 7 cm große und 7 mm dicke Plexiglasscheibe, in die ein Versuchskanal, ein damit verbundener Absaugkanal und eine getrennte Kammer für die Referenzelektrode gefräst

waren. Der Boden der Kammer bestand aus einem aufgeklebten Deckglas. Hierdurch war es möglich, den geringen Arbeitsabstand der stark vergrößernden Objektivie einzuhalten. Der Versuchskanal war etwa 25 mm lang und 4 mm breit. Auf der rechten Seite war ein Einlaufstutzen befestigt, über den die Badlösungen appliziert werden konnten. Ein Tunnel auf der linken Seite verband den Versuchskanal mit dem parallel dazu verlaufenden Absaugkanal. Dieser war mit 35 mm Länge und 10 mm Breite etwas größer als der Versuchskanal.

Der Flüssigkeitspegel in der Versuchskammer wurde über eine Absaugpipette am rechten Rand des Absaugkanals eingestellt. Dazu wurde die Absaugung so positioniert, daß sie sich leicht oberhalb des gewünschten Flüssigkeitspegels befand. Wurde nun über den Zulauf eine Badlösung appliziert, so stieg der Flüssigkeitspegel, und überflüssige Badlösung wurde abgesaugt. Gleichzeitig kam es zu einem (unerwünschten) elektrischen Kontakt zwischen der Badlösung und der Absaugung. Stoppte der Flüssigkeitszulauf, so riß der Flüssigkeitsstrom zur Absaugung kurz darauf ab. Nunmehr bestand keine elektrisch leitende Verbindung mehr zwischen der Badlösung und der Absaugung. Unter Versuchsbedingungen befanden sich etwa 0,5 ml Badlösung in der Versuchskammer.

Die Kammer für die Referenzelektrode hatte eine Größe von ungefähr 7 x 14 x 7 mm und befand sich etwa 1 cm links neben dem Absaugkanal. Sie war während der Versuche mit der jeweiligen Pipettenlösung gefüllt und stand nur über eine mit Agar und Pipettenlösung gefüllte Glasbrücke mit der Versuchskammer in Verbindung.

Die Badlösungen wurden in bis zu sechs 50 ml fassende Vorratsbehälter gefüllt, die in einer Halterung ca. 40 cm oberhalb der Meßkammer angebracht waren. Über Perfusor[®]-Leitungen (Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) waren diese mit dem Einlaufstutzen in der Versuchskammer verbunden. Über einen Absperrhahn konnte der Zufluß reguliert werden. Bei einer vollständigen Öffnung des Zuflusses betrug die Stromstärke etwa 10 ml pro Minute, d.h. ein kompletter Lösungsaustausch in der Versuchskammer fand etwa in drei Sekunden statt. Für Versuche bei 37 °C wurden die Badlösungen unmittelbar vor den Experimenten auf 40 °C vorgewärmt und in die Vorratsbehälter gefüllt. Bei Erreichen der Versuchskammer hatten sie noch eine Temperatur von 37 °C.

2.3.3. Versuchslösungen und Chemikalien

2.3.3.1. Versuchslösungen

Die kardioplege Lösung enthielt (in mmol/l): NaCl 15, KCl 9, MgCl₂ 4, NaH₂PO₄ 0,33, CaCl₂ 0,015, Glukose 10, Mannitol 238; titriert auf pH 7,40 mit NaOH.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Pipetten- und Badlösungen sind in den beiden folgenden Tabellen zusammengestellt. Wenn im laufenden Text auf sie Bezug genommen wird, dann entweder über die Numerierung oder die Bezeichnung.

	Bezeichnung	Bestandteile (mmol/l)	Titriert mit
P-01	<i>Standard-Pipettenlösung</i>	CsCl 128, MgCl ₂ 5, EGTA 0,1, HEPES 20, Na-ATP 2, TEA-Cl 20	CsOH
P-02	<i>K-Glutamat</i>	NaCl 10, KCl 10, MgCl ₂ 1, CaCl ₂ 1, HEPES 5, Glutamat 110, Amphotericin-B 0,25	KOH
P-03	<i>148 CsCl + 10 EGTA</i>	CsCl 128, MgCl ₂ 5, EGTA 10, HEPES 20, Na-ATP 2, TEA-Cl 20	CsOH
P-04	<i>Cs₃-Citrat</i>	NaCl 2, CsCl 10, MgCl ₂ 5, HEPES 20, Na-ATP 4, Cs ₃ -Citrat 65	CsOH

Tabelle 3: **Verwendete Pipettenlösungen**

Zusammenfassung der verwendeten Pipettenlösungen. Der pH wurde jeweils mit der in der letzten Spalte aufgeführten Substanz auf 7,20 eingestellt. Amphotericin B ist nicht wasserlöslich und wurde daher in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. Die hergestellte Pipettenlösung ist sehr instabil, muß vor Licht geschützt und innerhalb einer Stunde aufgebraucht werden. EGTA entspricht Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraacetat, HEPES 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure und TEA-Cl Tetraethyl-Ammoniumchlorid.

	Bezeichnung	Bestandteile (mmol/l)	Titriert mit
B-01	<i>Standard-Badlösung</i>	NaCl 138, KCl 4, NaH ₂ PO ₄ 0,33, MgCl ₂ 1, CaCl ₂ 2, HEPES 10, Glucose 10	NaOH
B-02	<i>Natriumglutamat</i>	KCl 4, MgCl ₂ 1, CaCl ₂ 2, Na-Glutamat 138, HEPES 10, Glucose 10	NaOH
B-03	<i>NMDG + 70 NaCl</i>	NaCl 70, KCl 4, MgCl ₂ 1, CaCl ₂ 2, BaCl ₂ 0,1, HEPES 10, Glucose 10, NMDG 70, 4-AP 4	HCl
B-04	<i>NMDG + 0 NaCl</i>	KCl 4, MgCl ₂ 1, CaCl ₂ 2, BaCl ₂ 0,1, HEPES 10, Glucose 10, NMDG 140, 4-AP 4	HCl
B-05	<i>70 NaCl + 70 KCl</i>	NaCl 70, KCl 74, MgCl ₂ 1, CaCl ₂ 2, BaCl ₂ 0,1, HEPES 10, Glucose 10, 4-AP 4	TRIS
B-06	<i>70 NaCl + 70 CsCl</i>	NaCl 70, KCl 4, CsCl 70, MgCl ₂ 1, CaCl ₂ 2, BaCl ₂ 0,1, HEPES 10, Glucose 10, 4-AP 4	TRIS
B-07	<i>70 NaCl + 70 LiCl</i>	NaCl 70, KCl 4, LiCl 70, MgCl ₂ 1, CaCl ₂ 2, BaCl ₂ 0,1, HEPES 10, Glucose 10, 4-AP 4	TRIS
B-08	<i>97 NaCl + Saccharose</i>	NaCl 97, HEPES 10, Glucose 10, Saccharose 100	TRIS
B-09	<i>97 BaCl₂</i>	BaCl ₂ 97, HEPES 10, Glucose 10	TRIS
B-10	<i>97 CaCl₂</i>	CaCl ₂ 97, HEPES 10, Glucose 10	TRIS
B-11	<i>97 MgCl₂</i>	MgCl ₂ 97, HEPES 10, Glucose 10	TRIS
B-12	<i>10 CaCl₂</i>	NaCl 138, KCl 4, NaH ₂ PO ₄ 0,33, MgCl ₂ 1, CaCl ₂ 10, HEPES 10, Glucose 10	NaOH
B-13	<i>10 MgCl₂</i>	NaCl 138, KCl 4, NaH ₂ PO ₄ 0,33, MgCl ₂ 10, CaCl ₂ 1, HEPES 10, Glucose 10	NaOH
B-14	<i>10 BaCl₂</i>	NaCl 138, KCl 4, NaH ₂ PO ₄ 0,33, MgCl ₂ 1, BaCl ₂ 10, CaCl ₂ 1, HEPES 10, Glucose 10	NaOH

Tabelle 4: **Verwendete Badlösungen**

Zu den Badlösungen wurde, wenn nicht anders angegeben 10 mmol/l Coffein hinzugefügt und mit der in der letzten Spalte der Tabelle aufgeführten Substanz auf einen pH von 7,30 eingestellt. Die whole-cell Konfiguration wurde in einer coffeinfreien *Standard-Badlösung* hergestellt. Einige Badlösungen enthielten zur Hemmung von Kaliumströmen 4 mmol/l 4-Aminopyridin (4-AP) und 0,1 mmol/l BaCl₂. Für die Zellisolation wurde die *Standard-Badlösung* calciumfrei und mit 0,1 mmol/l Ca²⁺ verwendet (siehe Kapitel 2.4). NMDG entspricht N-Methyl-D-Glucamin, TRIS Tris(hydroxymethyl)-aminomethan.

2.3.3.2. Herkunft der verwendeten Chemikalien

Die Salze wurden von Sigma (CsCl, LiCl, LiOH, CsOH, Cs₃-Citrat, NiCl₂, GdCl₃, LaCl₃), Merck (HCl, KCl, KOH, LiCl, NaOH, BaCl₂, CaCl₂, MgCl₂) und J.T. Baker (NaCl) bezogen. In der nachfolgenden Tabelle sind die übrigen verwendeten Substanzen aufgeführt.

Substanz	Hersteller	Substanz	Hersteller
18- α -Glycyrrhetinsäure	SIGMA (G-8503)	Glutamat	Fluka
4-Aminopyridin	SIGMA (A-0152)	HEPES	SIGMA (H-3375)
Amilorid	SIGMA (A-7410)	Ionomycin	SIGMA (I-0634)
Amphotericin B	SIGMA (A-4888)	Kollagenase	Biochrom AG
ATP (Magnesium-Salz)	SIGMA (A-9187)	NMDG	Fluka
ATP (Natrium-Salz)	SIGMA (A-2383)	Protease	SIGMA (P-5147)
D-Mannitol	SIGMA (M-9546)	Ruthenium-Rot	Alomone
EGTA	Roth, Karlsruhe	Ryanodin	Alomone
FK506	Fujisava	Saccharose	IGN Biomedicals
Flufenaminsäure	SIGMA (F-9005)	TEA-Cl	SIGMA
Glucose	Merck	TRIS	Roth

Tabelle 5: **Herkunft verwendeter Substanzen**

2.3.4. Die elektronischen Komponenten

Der Patch-Clamp Verstärker besteht im Wesentlichen aus zwei Komponenten: dem Vorverstärker und dem Hauptverstärker. Der Vorverstärker mißt das Stromsignal und wandelt es in eine Meßspannung um. Der nachgeschaltete Hauptverstärker kann diese Spannung weiter verstärken und filtern und dient außerdem als Steuereinheit. Zur Anwendung kam bei diesen Versuchen ein EPC-9 (HEKA Electronic, Lambrecht, Deutschland). Er wurde digital von einem Apple PowerMacintosh 9500/200 angesteuert. Die Steuer- und Auswertesoftware („Pulse“, HEKA Electronic, Lambrecht, Deutschland) erlaubte die Sicherung der gewonnenen Versuchsdaten in Echtzeit auf die Festplatte. Strom- und Spannungssignale wurden zusätzlich auf einem digitalen Speicheroszilloskop (HM 407, HAMEG, Deutschland) dargestellt.

Die Referenzelektrode bestand aus einem Silber/Silberchlorid-Pellet und wurde in das Referenzbad getaucht. Die Meßelektrode des Vorverstärkers bestand aus einem Silberdraht, der zuvor in einer 100 mmol/l KCl-Lösung chloriert wurde. Sie wurde von hinten in die Patchpipette eingeführt. Die elektrische Verbindung zwischen der Meßelektrode und der Referenzelektrode in der Badlösung stellte eine Glasbrücke dar. Dazu wurde ein U-förmiges Glasröhrchen mit einem Durchmesser von 2 mm mit der jeweiligen Pipettenlösung, geliert mit zweiprozentigem Agar-Agar, gefüllt.

2.3.5. Die Patchpipetten

Die verwendeten Patchpipetten wurden mit einem Pipettenziehgerät Modell Flaming/Brown P-97 (Sutter Instruments Company, San Rafael, CA, USA) aus 7,5 cm langen Kapillaren aus Borosilikatglas mit einem Außendurchmesser von 1,5 mm und einem Innendurchmesser von 0,86 mm gezogen (GC150-15, Clark Electromedical Instruments, Harvard Apparatus Ltd., England). Das Ziehgerät war über die Parameter Heiztemperatur, max. Zuggeschwindigkeit, max. Zugkraft und Anzahl der Ziehstufen programmierbar. Die Kapillare wurde horizontal in das Ziehgerät eingespannt, durch einen mittig angebrachten Heizdraht aus Platinlegierung erhitzt, dadurch erweicht und gleichzeitig gezogen. Erreichte die Ausziehgeschwindigkeit den eingestellten Maximalwert, wurde der Zug unterbrochen und die Kapillare abgekühlt. Daraufhin

begann der nächste Zyklus mit erneutem Erhitzen. Nach sieben Durchgängen riß die Kapillare auseinander und es entstanden zwei ca. 4 cm lange, an der Spitze dünn ausgezogene Kapillaren, die Patchpipetten. Unmittelbar vor Versuchsbeginn wurde die Pipettenspitze mittels eines Heizdrahtes angeschmolzen, um Unebenheiten durch den Ziehvorgang zu beseitigen. Der durchschnittliche Pipettenwiderstand (R_{pip}) lag bei Verwendung der *Standard-Badlösung* für die *Standard-Pipettenlösung* bei $2,38 \pm 0,03 \text{ M}\Omega$ ($n = 709$), für die *Cs₃-Citrat* Pipettenlösung bei $2,97 \pm 0,2 \text{ M}\Omega$ ($n = 16$) und für die *K-Glutamat* Pipettenlösung bei $3,70 \pm 0,22 \text{ M}\Omega$ ($n = 20$).

2.4. Isolation einzelner Kardiomyozyten von Sprague-Dawley Ratten

Alle Untersuchungen wurden an Kardiomyozyten von weiblichen Sprague-Dawley Ratten durchgeführt. Für sämtliche Versuche lagen von den jeweils zuständigen Behörden entsprechende Genehmigungen vor. Die Isolation ventrikulärer Myozyten basierte auf der von Isenberg und Klöckner [Isenberg et al., 1982] publizierten Methode [Volk et al., 1999]. Die Ratten mit einem Gewicht zwischen 150 und 300 g wurden durch eine intraperitoneale Injektion von Thiopental-Natrium (100 mg/kg Körpergewicht) narkotisiert. Nach Erreichen einer ausreichenden Narkosetiefe wurde das Herz über eine paramediane Sternotomie zügig entnommen und in eine 4 °C kalte kardioplege Lösung überführt. Diese verhinderte ein Weiterschlagen des Herzens nach wenigen Schlägen. Das Herz wurde von umgebendem Binde- und Fettgewebe befreit, die Aorta freipräpariert, in Höhe des Aortenbogens eröffnet und mittels einer Glaskanüle kanüliert. An dieser wurde das Herz dann freihängend montiert und unter Verwendung einer Langendorff Apparatur anterograd über die Koronararterien mit einem Perfusionsdruck von 75 mmHg perfundiert. Alle Lösungen hatten dabei eine Temperatur von 37 °C und waren mit 100 % O₂ äquilibriert. Zunächst wurde das Herz für fünf Minuten mit einer Ca²⁺-freien *Standard-Badlösung* perfundiert. Es folgte eine Perfusion für weitere 15 Minuten mit der gleichen Lösung, die zusätzlich Kollagenase (Typ CLS II, 200 U/ml, Biochrom KG, Berlin, Deutschland) und Protease (Typ XIV, 0,7 U/ml, Sigma, München, Deutschland) enthielt. Um den Verdau zu stoppen, wurde anschließend für fünf Minuten mit einer Ca²⁺-freien *Standard-Badlösung* perfundiert. Nach Eröffnung des linken Ventrikels wurden aus der mittleren Region zwischen

Herzbasis und -spitze der freien Ventrikelwand kleine Gewebestücke mit feinen Pinzetten herausgetrennt. Diese wurden dann in einzelne Bechergläser, gefüllt mit jeweils 0,1 mmol/l Ca^{2+} enthaltender *Standard-Badlösung*, überführt. Die gewonnenen Zellverbände wurden zuerst durch Zupfen und anschließend durch sanftes Schwenken über mehrere Minuten weiter aufgelöst. Nach einer groben Filtration konnten die Zellen bei Zimmertemperatur über den gesamten Versuchstag aufbewahrt werden. Für die Untersuchungen wurden ausschließlich stäbchenförmige Myozyten mit deutlicher Querstreifung und ohne spontane Kontraktionen verwendet.

2.5. Durchführung der Patch-Clamp Experimente

Mit einer Pipette wurde etwa 0,1 ml der Zellsuspension aufgenommen und in die mit einer Badlösung gefüllte Versuchskammer transferiert. Nach etwa fünf Minuten hatten sich die Zellen auf dem Kammerboden abgesetzt. Bei 100-facher Vergrößerung wurde dann eine einzelne Zelle ausgewählt, die über die typische „Querstreifung“ verfügte und nicht spontan kontrahierte. Jetzt erst wurde die Patchpipette mit der entsprechenden Pipettenlösung gefüllt. Dazu wurde sie auf eine Einwegspritze aufgesetzt und mit angelegtem Unterdruck für einige Sekunden in ein mit Pipettenlösung gefülltes Becherglas eingetaucht. Dadurch füllte sich die Pipette in den vorderen 0,5 mm. Die restliche Pipette wurde von hinten mit einer Spinalkanalpunktionssnadel gefüllt. Dabei eventuell entstandene Luftblasen wurden durch leichtes Klopfen vorsichtig entfernt, vor Versuchsbeginn wurde die Pipette bis auf die vordersten 7 mm leergesaugt. So konnte sowohl ein Eindringen der Pipettenlösung in den Pipettenhalter verhindert als auch störendes elektrisches Rauschen minimiert werden. Wurde die Pipette so in den Pipettenhalter eingesetzt, ragte die Silber/Silberchlorid-Meßelektrode ca. 3-4 mm in die Pipettenflüssigkeit hinein.

Die Pipette konnte nun mit dem Mikromanipulator in die Badlösung gefahren werden. Dabei wurde darauf geachtet, daß ein leichter Überdruck in der Pipette anlag, um durch einen geringen Ausstrom von Pipettenlösung die Pipettenspitze frei von Verunreinigungen zu halten. Nach Eintauchen in die Badlösung wurde durch eine implementierte Routine des EPC-9 das gemessene Potential als Nullpunkt festgelegt. Dadurch wurden eventuell bestehende konstante Grenzschichtpotentiale (siehe

Kapitel 2.2.5) kompensiert. Die Pipette wurde sanft auf die Zelloberfläche aufgesetzt, der Überdruck aus der Pipette entfernt und ein leichter Unterdruck ausgeübt. Dies führte in über 50 % der Zellen zu einer Abdichtung zwischen Pipettenspitze und Zellmembran mit einem Widerstand von $> 1 \text{ G}\Omega$. Von der so erreichten cell-attached Konfiguration konnte nun in die whole-cell Konfiguration (siehe Kapitel 2.2.2) gewechselt werden. Nach Herstellen der whole-cell Konfiguration wurde mit automatischen Routinen des EPC-9 die Zellkapazität (C_m) und der Zugangswiderstand (R_s) bestimmt. R_s lag bei 751 Versuchen im Mittel bei $6,1 \pm 0,23 \text{ M}\Omega$ und wurde zu 85 % (siehe Kapitel 2.2.4.1) kompensiert. Bei maximal 1 nA großen Strömen ($V_{\text{pip}} = -90 \text{ mV}$) berechnet sich nach dem Ohmschen Gesetz damit der zu erwartende Meßfehler im Mittel auf 0,92 mV.

Nach Herbeiführen der whole-cell Konfiguration wurde die Kardiomyozyte in der Regel auf ihr zu erwartendes Ruhemembranpotential von -90 mV geklemmt, um eine Kontraktion zu verhindern.

2.6. Experimentelle Erhöhung der zytosolischen Calciumkonzentration

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, wurden in der vorliegenden Arbeit durch die extrazelluläre Applikation von Coffein (10 mmol/l) intrazellulär gespeicherte Calciumionen gezielt freigesetzt [Rousseau et al., 1989]. Wird Coffein über die Badlösung appliziert, diffundiert es durch die Zellmembran der Kardiomyozyten, bindet an die Ryanodin-Rezeptoren des sarkoplasmatischen Retikulums und fixiert diese in einem Offen-Zustand [Rousseau et al., 1989]. Dies führt zu einer schlagartigen Freisetzung nahezu aller im SR gespeicherten Ca^{2+} -Ionen und hebt die zytosolische Calciumkonzentration von 100 nmol/l auf schätzungsweise 1 $\mu\text{mol/l}$ an [Callewaert et al., 1989]. Calciumionen, welche durch Ca^{2+} -ATPasen in der SR-Membran in das sarkoplasmatische Retikulum zurücktransportiert werden, können dort wegen der dauerhaften Öffnung der Ryanodin-Rezeptoren nicht gespeichert werden, sondern werden sofort wieder freigesetzt. Dies hat zur Folge, daß in der Gegenwart von Coffein die zytosolische Calciumkonzentration nur durch den sarkolemmalen Na^+ - Ca^{2+} Antiporter effektiv gesenkt wird. Dieser transportiert – als sekundär-aktiver Transporter das Konzentrationsgefälle von Na^+ über die Plasmamembran nutzend – ein zweifach positiv geladenes Ca^{2+} -Ion im Austausch gegen drei einfach positiv geladene Na^+ -Ionen

aus der Zelle. Der daraus resultierende Netto-Einwärtsstrom kann wiederum als transienter Einwärtsstrom ($I_{Na/Ca}$) in der voltage-clamp Konfiguration elektrophysiologisch abgeleitet werden.

Die Verwendung von Coffein ermöglicht somit eine gezielte Erhöhung der zytosolischen Calciumkonzentration. Allerdings ist zu bedenken, daß eine Interaktion von Coffein mit weiteren zellulären Strukturen – wie beispielsweise dem hier charakterisierten LCC selber – nicht ausgeschlossen werden kann. Daher wurden Kontrollversuche durchgeführt, in denen die zytosolische Calciumkonzentration unabhängig von Coffein angehoben wurde. So wurde analog zu den von Pott et al. durchgeführten Experimenten die Inaktivierung der L-Typ Calciumkanäle durch Verwendung einer Cs_3 -Citrat Pipettenlösung verlangsamt [Pott et al., 1990]. Hierdurch kommt es auf eine Depolarisation hin zu einem erhöhten Calciuminflux und zu einer vermehrten Calciumbeladung des SR. Durch einen depolarisierenden Spannungssprung (250 ms auf $V_{pip} = 0$ mV) wurden diese Calciumionen dann freigesetzt und die Stromkurve bei $V_{pip} = -90$ mV kontinuierlich registriert. Diese Versuche werden im Ergebnisteil detailliert beschrieben.

2.7. Auswertung der Experimente

Alle angegebenen Werte entsprechen den arithmetischen Mittelwerten, Abweichungen werden als Standardfehler des Mittelwertes („Standard Error of the Mean“, SEM) angegeben. Signifikanzen wurden unter Verwendung eines zweiseitigen gepaarten oder ungepaarten Student t-Tests ermittelt. Als signifikant wurden dabei Unterschiede mit $p < 0,05$ gewertet. Für die Irrtumswahrscheinlichkeit p gilt dabei: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

2.7.1. Einlesen der Daten in den Computer und Auswertungsprogramme

Alle Meßdaten wurden während der Versuche von der Steuersoftware des EPC-9 „Pulse“ (HEKA Electronic, Lambrecht, Deutschland) auf der computerinternen Festplatte gespeichert und konnten später zur Auswertung wieder dargestellt werden. Bei einer Abtastrate von 5 kHz wurden die Versuchsdaten bereits im EPC-9 mittels der

eingebauten Bessel-Filter bei 1 kHz gefiltert. Die Einzelkanalauswertungen wurden nach einer erneuten Filterung nach Gauss mit 67 Hz mit „Patch“ (geschrieben von Dr. Bernd Letz, Deutschland) erstellt. Die statistischen Analysen wurden mit „Prism“ (Graphpad Software, San Diego, USA) durchgeführt.

2.7.2. Bestimmung von Einzelkanalstromamplituden

Innerhalb einer Stromregistrierung wurde anhand eines 10-30 Sekunden langen repräsentativen Ausschnittes in „Patch“ ein Amplitudenhistogramm erstellt, bei dem die Anzahl der registrierten Stromwerte gegen die jeweiligen Stromwerte aufgetragen wurden. In einem solchen Histogramm wurde die mittlere Größe der einzelnen Stromsprünge als Differenz zwischen den Häufigkeitsgipfeln abgelesen.

2.7.3. Bestimmung von Offenwahrscheinlichkeiten

Die Offenwahrscheinlichkeit eines Kanals beschreibt die Wahrscheinlichkeit, mit der dieser Kanal im Offenzustand angetroffen werden kann. Enthält die untersuchte Membranfläche nur einen Kanal, so ist dessen Offenwahrscheinlichkeit relativ einfach auszurechnen als die Zeit, in der sich der Kanal im Offenzustand befindet, dividiert durch den gesamten Beobachtungszeitraum.

Bei den hier untersuchten Kanälen kann jedoch nicht davon ausgegangen werden, daß sich jeweils nur ein einziger Kanal in der gesamten Zellmembran befindet. Daher wird zuerst das Integral über einen definierten Abschnitt der Stromkurve gebildet und dieses dann durch das Produkt aus der mittleren Einzelkanalamplitude und der Zeit geteilt. Diese Berechnungen wurden durch eine implementierte Routine von „Patch“ an Amplitudenhistogrammen durchgeführt. Diese Offenwahrscheinlichkeit wird als NP_0 im Text angegeben.

2.7.4. *Strom-Spannungsbeziehung*

Bei Kanälen wird zwischen sogenannten Ohmschen Kanälen und gleichrichtenden Kanälen unterschieden. Die ersteren verhalten sich ähnlich einem elektrischen Leiter: sie leiten einwärts wie auswärts gleich gut. Gleichrichtende Kanäle hingegen werden durch das Membranpotential entscheidend beeinflusst, ihre Leitfähigkeit ist also eine Funktion des Membranpotentials. So weisen manche Kanäle z.B. eine größere Auswärts- als Einwärtsleitfähigkeit auf, sogenannte Auswärtsgleichrichter.

Jeder Kanal besitzt für definierte Lösungen spezifische Strom-Spannungsbeziehungen. Solche Kennlinien werden bestimmt, indem für jede Membranspannung die Größe der Stromamplitude registriert und graphisch dargestellt wird. Die vorliegenden Strom-Spannungsdiagramme wurden mit Hilfe von „Patch“ erstellt. An die gemittelten Meßwerte wurden dabei mit eingebauten Routinen theoretische Kurven, entweder mittels linearer Regression oder auf der Basis der Goldman-Hodgkin-Katz Gleichung, angepaßt.

2.7.5. *Umkehrpotential*

In einem Strom-Spannungsdiagramm kann der Schnittpunkt der Kurve mit der Spannungsachse bestimmt werden. Bei diesem Membranpotential fließt demnach kein Strom – weder ein Einwärts- noch ein Auswärtsstrom – durch den untersuchten Kanal. Dieses Potential wird als Umkehrpotential bezeichnet. Es ist abhängig von der relativen Leitfähigkeit des Kanals für die vorhandenen Ionen bei der vorherrschenden Ionenkonzentrationen. Die Kenntnis des Umkehrpotentials eines Kanals unter gegebenen extra- und intrazellulären Ionenkonzentrationen erlaubt die Bestimmung seiner Ionenselektivität.

2.7.6. Leitfähigkeit

Die Leitfähigkeit ist eine weitere wichtige Kenngröße eines Kanals. Biophysikalisch betrachtet stellt ein Kanal, also die Pore in der Membran, durch die Ionen fließen, für diese Ionen einen Widerstand dar. Handelt es sich um einen Ohmschen Kanal, so kann dieser Widerstand (R) direkt aus der Steigung der Strom-Spannungskurve berechnet werden:

$$R = \frac{\Delta U}{\Delta I}$$

Dabei entspricht U der Spannung mit der Einheit Volt (V), I dem Strom mit der Einheit Ampere (A) und R dem Widerstand mit der Einheit Ohm (Ω). Soll hervorgehoben werden, daß es sich bei dem Kanal nicht um einen Widerstand, sondern um einen elektrischen Leiter handelt, so wird die Leitfähigkeit (g) dieses Kanals angegeben. Sie errechnet sich aus dem Kehrwert des Widerstandes und besitzt die Einheit Siemens (S):

$$g = \frac{1}{R} = \frac{\Delta I}{\Delta U}$$

Die angegebenen Leitfähigkeiten wurden anhand der Strom-Spannungskurven mit einer implementierten Routine von „Patch“ berechnet.

2.7.7. Goldman-Hodgkin-Katz Gleichung

Mithilfe der Goldmann-Hodgkin-Katz Gleichung kann das Membranpotential errechnet werden. Hierzu müssen intra- und extrazelluläre Konzentrationsverhältnisse der beteiligten Ionen (Na^+ , K^+ und Cl^-) und die Permeabilität für das jeweilige Ion bekannt sein. Die Formel lautet:

$$V_m = \frac{R \times T}{F} \times \ln \frac{p_{\text{Na}^+} \times [\text{Na}^+]_a + p_{\text{K}^+} \times [\text{K}^+]_a + p_{\text{Cl}^-} \times [\text{Cl}^-]_i}{p_{\text{Na}^+} \times [\text{Na}^+]_i + p_{\text{K}^+} \times [\text{K}^+]_i + p_{\text{Cl}^-} \times [\text{Cl}^-]_a}$$

V_m ist hierbei das Zellmembranpotential, R die allgemeine Gaskonstante ($8,314 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$), T die absolute Temperatur in Kelvin, F die Faraday-Konstante ($9,648 \cdot 10^4 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$) und p die Permeabilität des jeweiligen Ions. Im Index bezeichnet a die extra- und i die intrazelluläre Konzentration. Durch Umformung der Gleichung kann bei bekanntem Zellmembranpotential und bekannten Ionenkonzentrationen auf die verschiedenen Leitfähigkeiten zurückgeschlossen werden.

2.7.8. Dosis-Wirkungs-Kurve

In einer Dosis-Wirkungs-Kurve wird die Wirkung einer Substanz in Abhängigkeit von ihrer Dosis graphisch dargestellt. Sind wie z.B. bei in-vitro Versuchen die Konzentrationen der applizierten Substanz bekannt, so kann genauer von einer Konzentrations-Wirkungs-Kurve gesprochen werden. In solchen Abbildungen werden auf der Abszisse die verwendeten Konzentrationen, meist in logarithmierter Form, und auf der Ordinate die dadurch hervorgerufene spezifische Wirkung prozentual dargestellt.

Bei Substanzen, die ihre Wirkung durch die Bindung an eine spezifische Bindungsstelle eines Kanals erzielen, kann die Dosis-Wirkungs-Kurve mit Hilfe der Hill-Gleichung beschrieben werden:

$$Y = \min + \frac{\max - \min}{1 + 10^{\log(IC_{50}) - x \times HillKoeffizient}}$$

Min ist dabei der Y-Wert des unteren, *max* des oberen Plateaus und *IC50* der X-Wert genau bei der Hälfte zwischen dem oberen und unteren Plateau. Der *Hillkoeffizient* beschreibt die Steigung der Kurve.

Generell können aus einer Dosis-Wirkungs-Kurve unmittelbar folgende Informationen gewonnen werden:

- Wo liegt der Konzentrationsbereich, in dem für die Substanz eine Wirkung zu erwarten ist?
- Wie hoch ist der zu erwartende Maximaleffekt, die sogenannte intrinsische Aktivität?
- Wie steil verläuft die Kurve (Hill-Koeffizient)?
- Wie hoch ist die effektive Konzentration, bei der 50 % der maximal zu beobachtenden Wirkung eintritt (IC_{50}) ?

Dosis-Wirkungs-Kurven wurden mit „Prism“ erstellt.

2.7.9. Temperaturabhängigkeit – Q_{10}

Die Temperaturabhängigkeit einer biologischen Reaktion kann durch den Faktor, um den sich seine Eigenschaften, z.B. die Reaktionsgeschwindigkeit oder die Stromamplituden eines Kanals, bei einer Temperaturerhöhung um 10 °C verändern, angegeben werden. Dieser Faktor wird Q_{10} genannt und berechnet sich beispielsweise für die Temperaturabhängigkeit des Stromflusses durch einen Kanal aus:

$$Q_{10} = \frac{I_{(T+10)}}{I_{(T)}}$$

Hierbei ist $I_{(T)}$ die Stromamplitude bei einer bestimmten Temperatur (z.B. Zimmertemperatur) und $I_{(T+10)}$ die Stromamplitude bei einer um 10 °C höheren Temperatur.

3. ERGEBNISSE

3.1. *Expression von PKD in Kardiomyozyten*

Die Präsenz von mRNA von PKD1, PKD2 und dessen Homologen PKDL und PKD2L2 konnte bereits im Herzen des Menschen und der Maus nachgewiesen werden [Nomura et al., 1998; Markowitz et al., 1999; Ong et al., 1999a; Guo et al., 2000]. Um einen Nachweis für diese vier mRNA bei der Ratte zu führen, wurde in der vorliegenden Arbeit eine RT-PCR mit spezifischen Primern für PKD1-, PKD2-, PKDL- und PKD2L2-mRNA auf den gesamten linken Ventrikel durchgeführt. Abbildung 1 A zeigt Agarose-Gele der PCR Produkte mit spezifischen Banden für PKD1-, PKD2-, PKDL- und PKD2L2-mRNA und jeweils einer Negativkontrolle. Die Banden wiesen die erwartete Länge auf, die Identität der PCR Produkte wurde darüber hinaus zusätzlich durch Sequenzierung gesichert. Diese PCR Ergebnisse bestätigen, daß auch im linken Ventrikel der Ratte alle vier getesteten PKD-mRNAs exprimiert sind. Allerdings lassen sie die Frage unbeantwortet, ob die nachgewiesene mRNA tatsächlich aus Kardiomyozyten oder beispielsweise aus Bindegewebs-, Nerven- oder Gefäßzellen stammt. Um die genaue Herkunft näher zu bestimmen, wurde mittels der Einzelzell-RT-PCR die Gegenwart von PKD1-, PKD2-, PKDL- und PKD2L2-mRNA in individuell eingesaugten Herzmuskelzellen untersucht.

Abbildung 1 B und C zeigen jeweils Agarose-Gele, die das Vorhandensein von PKD2- beziehungsweise PKD2L2-mRNA in jeweils drei von fünf untersuchten Zellen bestätigen. Insgesamt waren für PKD2-mRNA 35 % (n = 20) und für PKD2L2-mRNA 30 % (n = 20) der untersuchten Zellen positiv für eine Expression der entsprechenden mRNA. PKD1 (n = 70) und PKDL-mRNA (n = 20) hingegen wurde in keiner der untersuchten Kardiomyozyten nachgewiesen. Um auszuschließen, daß dieser Negativbefund auf zu geringe mRNA-Mengen zurückzuführen war, wurden unter optischer Kontrolle jeweils fünf bis zehn einzelne Zellen eingesaugt und einer identischen RT-PCR zugeführt (n = 5). Auch unter diesen Bedingungen ließ sich in keiner der RT-PCRs PKD1- beziehungsweise PKDL-mRNA nachweisen.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, daß PKD2- und PKD2L2-mRNA in einzelnen linksventrikulären Kardiomyozyten von Ratten exprimiert wird. PKD1- und PKDL-mRNA konnte hingegen zwar im Herzen, nicht jedoch in den einzelnen Muskelzellen nachgewiesen werden. Sie werden vermutlich im Nicht-Muskel-Gewebe des Herzens exprimiert.

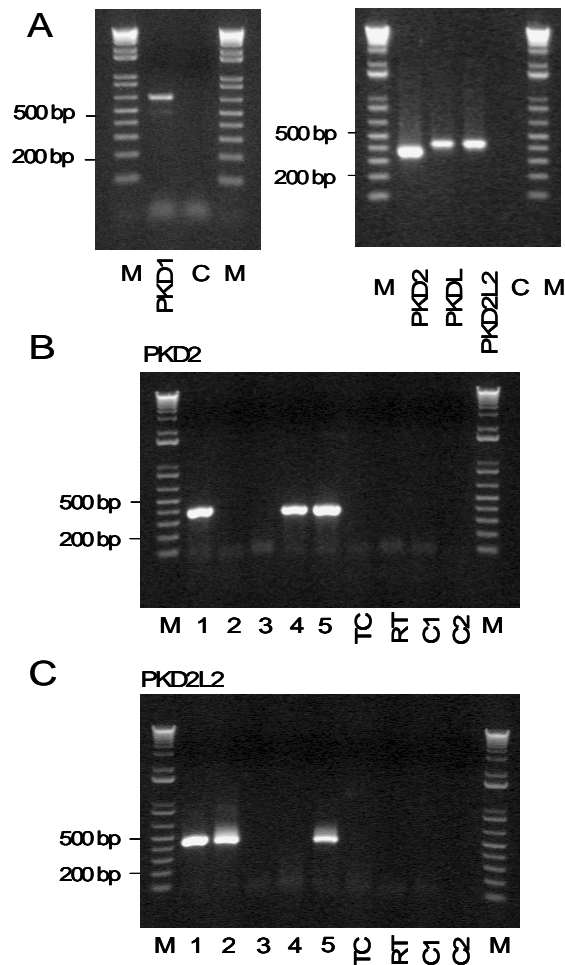


Abbildung 1: **Expression von Polycystin**

(A) Mit Ethidiumbromid gefärbte Gele mit RT-PCR Produkten, die aus Gesamt-RNA des linken Ventrikels mit spezifischen Primern für PKD1, PKD2, PKDL bzw. PKD2L2 amplifiziert wurden. C entspricht dabei den Negativkontrollen der jeweiligen PCR, M zeigt die Größenmarker, 200 bzw. 500 entsprechen Banden mit 200 bzw. 500 Basenpaaren des Größenmarkers.

(B,C) Mit Ethidiumbromid gefärbte Gele mit RT-PCR Produkten von einzelnen Kardiomyozyten (1-5) mit spezifischen Primern für PKD2 (B) bzw. PKD2L2 (C). C1 und C2 entsprechen Kontrollen für jede einzelne Runde der RT-PCR, RT der Kontrolle der reversen Transkription und TC der Kontrolle des umgebenden Gewebes.

3.2. Die Aktivierung eines Kanals großer Leitfähigkeit

Zur Herstellung einer whole-cell Konfiguration wurden Kardiomyozyten in der *Standard-Badlösung* aufbewahrt. Zur intrazellulären Ca^{2+} -Freisetzung wurde dann die untersuchte Zelle mit einer coffeinhaltigen (10 mmol/l) *Standard-Badlösung* superfundiert. Abbildung 2 zeigt typische Verläufe der registrierten Membranstromkurven bei voltage-clamp Versuchen in der whole-cell Konfiguration ($V_{\text{pip}} = -90$ mV) bei drei verschiedenen Myozyten. In Abbildung 2 A wird ein Versuch dargestellt, bei dem fünf Sekunden nach Applikation von Coffein die Aktivierung eines transienten Einwärtsstromes beobachtet werden konnte. Dieser Strom war durch 5 mmol/l Ni^{2+} blockierbar oder auch in Anwesenheit von intrazellulären Calciumpuffern wie beispielsweise EGTA nicht nachweisbar, was ihn als $I_{\text{Na/Ca}}$ identifiziert [Mechmann et al., 1986; Callewaert et al., 1989]. Abbildung 2 B zeigt zusätzlich zu $I_{\text{Na/Ca}}$ unmittelbar nach dessen Aktivierung das Auftreten von diskreten einwärts gerichteten Stromsprüngen wie sie durch Schaltvorgänge einzelner Kanäle verursacht werden. In diesem Versuch konnte für die Größe der einzelnen Stromamplituden der vergleichsweise hohe Wert von jeweils etwa 30 pA bestimmt werden. Mit Abklingen von $I_{\text{Na/Ca}}$ wurde eine Abnahme der Aktivität der Schaltvorgänge auf ein niedrigeres Niveau beobachtet. Als Beispiel für die gleichzeitige Aktivierung einer Mehrzahl solcher Kanäle ist in Abbildung 2 C ein Versuch dargestellt, bei dem mindestens drei Kanäle gleicher Stromamplitude durch die Gabe von Coffein provoziert wurden. Auch bei diesem Versuch erreichte die Aktivität der Schaltvorgänge direkt nach Beginn von $I_{\text{Na/Ca}}$ ein Maximum und fiel über den Beobachtungszeitraum kontinuierlich ab. Bei Versuchen an insgesamt 651 Herzmuskelzellen ließen sich bei 56 % der Zellen die Aktivierung eines solchen Kanals beobachten. In 35 % aller Zellen wurde dabei ein Kanal, in 21 % der Zellen mehr als ein Kanal gleichzeitig registriert. Die maximale Anzahl gleichzeitig beobachteter Kanäle lag bei sechs. Der prozentuale Anteil der jeweils aktivierten Kanäle ist in Abbildung 3 dargestellt.

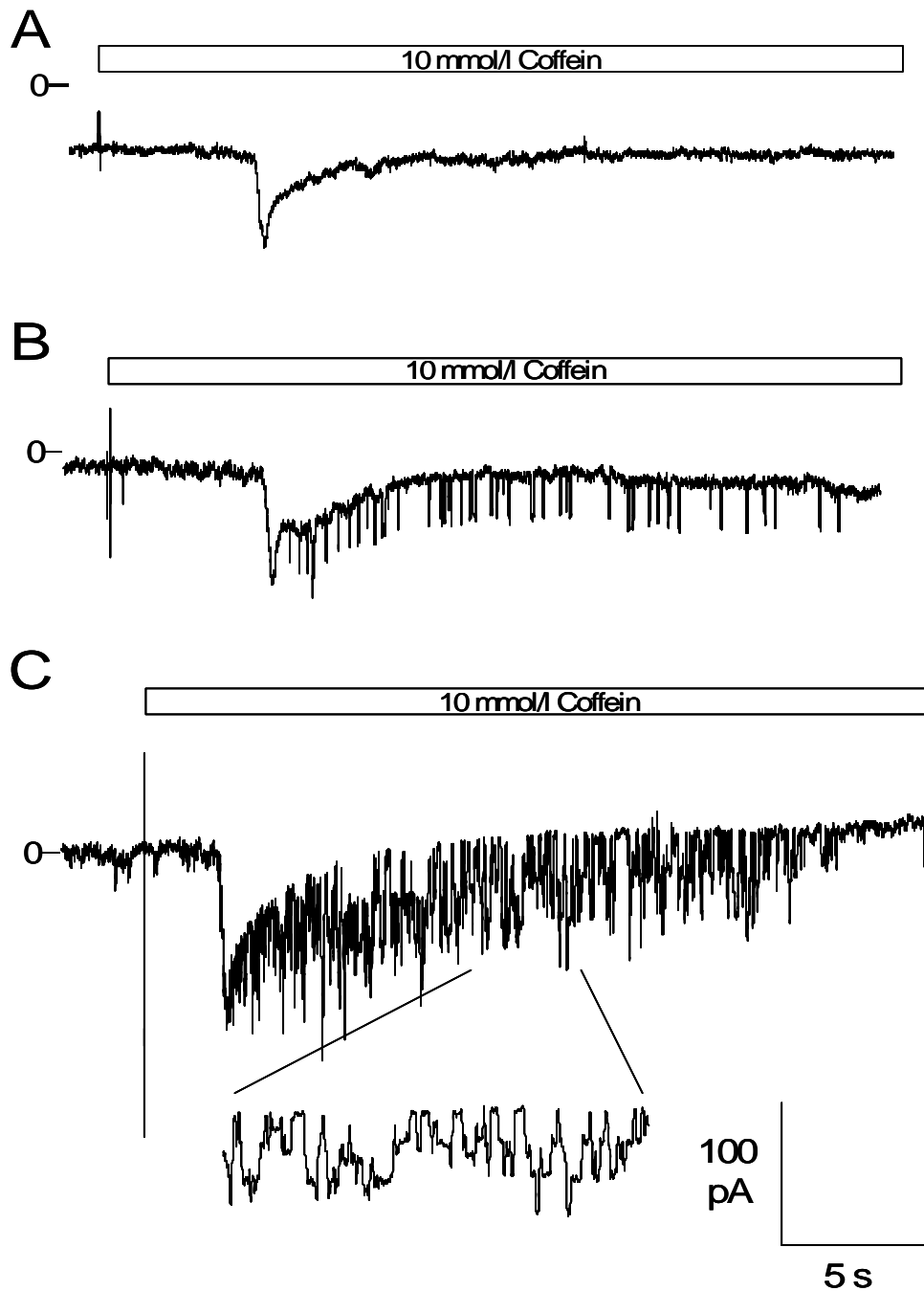


Abbildung 2: Aktivierung eines Kanals großer Leitfähigkeit

(A-C) Auswirkung von Coffeingabe (10 mmol/l) auf den Ganzzellstrom von drei verschiedenen Kardiomyozyten bei $V_{\text{pip}} = -90$ mV. Die Pipettenlösung enthielt CsCl mit 0,1 mmol/l EGTA (P-01), die Badlösung (B-01) 4 mmol/l 4-AP und 0,1 mmol/l BaCl₂. (A) zeigt einen Versuch, bei dem fünf Sekunden nach Applikation von 10 mmol/l Coffein ein transienter Einwärtsstrom aktivierte, der durch $I_{\text{Na/Ca}}$ verursacht wurde. (B) stellt zusätzlich unmittelbar nach Aktivierung dieses Einwärtsstromes das Auftreten von diskreten Schaltvorgängen dar. In (C) ist ein Beispiel für das gleichzeitige Aktivieren von mindestens drei Kanälen abgebildet.

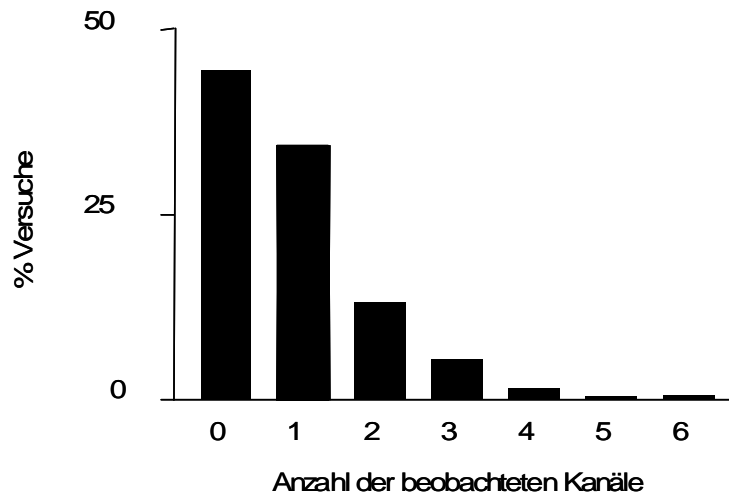


Abbildung 3: **Häufigkeitsverteilung der beobachteten Kanäle**

Diese Abbildung zeigt die prozentuale Verteilung von gleichzeitig beobachteten LCCs. In 44 % aller untersuchter Zellen ($n = 651$) wurde kein Kanal, dementsprechend in 56 % mindestens ein Kanal dokumentiert. Die maximale Anzahl gleichzeitig aufgetretener LCCs lag bei sechs.

3.3. *Perforated-patch Versuche*

Im Herzen kommt das sarkoplasmatische Retikulum mit seinen Zisternen sehr eng an den transversalen Einstülpungen der Zellmembran (den T-Tubuli) zum Liegen. Treten zwei solcher Erweiterungen des sarkoplasmatischen Retikulums an einen transversalen Tubulus heran, spricht man von einer Triade. Infolge ihrer Lage befinden sich in jedem Sarkomer zwei Triaden. Im Zusammenhang mit dieser anatomischen Anordnung ist es bei den Überdruckpulsen während der Herstellung der ruptured-patch Konfiguration durchaus vorstellbar, daß es zu einer Zerstörung einer Triade kommt. Hierbei ist dann auch denkbar, daß Teile der SR-Membran, unter Umständen einschließlich der beinhalteten Kanalproteine, mit der Zellmembran verschmelzen. Um diese Manipulationen und somit auch die Wahrscheinlichkeit einer Translokation von Kanälen in die Zellmembran, die dort nicht primär lokalisiert waren, auf ein nicht zu vermeidendes Mindestmaß zu reduzieren, wurden Versuche mit der perforated-patch Technik (Pipette: P-02) durchgeführt.

Dabei konnte in insgesamt sieben von acht durchgeführten Versuchen nach Applikation von Coffein das Auftreten eines LCCs beobachtet werden. Dies deutet stark

darauf hin, daß die Zerreißung der Membran mit Druckpulsen keine notwendige Voraussetzung für die Bildung bzw. Aktivierung des Kanals darstellt und läßt somit den Schluß zu, daß mit großer Wahrscheinlichkeit der hier beobachtete Kanal auch unter normalen Umständen in der Zellmembran vorkommt.

3.4. Biophysikalische Eigenschaften

3.4.1. Strom-Spannungsbeziehung / Leitfähigkeit

Abbildung 4 A zeigt verschiedene Stromkurven mit Kanalaktivität des LCCs, die durch vorhergehende Coffeinapplikation aktiviert und an einer einzelnen Zelle registriert wurden. Die Myozyte wurde dafür jeweils für mindestens zehn Sekunden auf Membranpotentiale zwischen -10 mV und -80 mV geklemmt. Die Pipette enthielt die *Standard-Pipettenlösung* (P-01), die Zelle befand sich in der *Standard-Badlösung* (B-01). Die Größe der einzelnen Stromamplituden nahm dabei mit zunehmender Hyperpolarisation zu. Die Strom-Spannungskurve in Abbildung 4 B stellt die in diesem Versuch gewonnenen Stromamplituden in Abhängigkeit von den eingestellten Membranpotentialen dar. Sie zeigt einen linearen Verlauf mit einem extrapolierten Umkehrpotential bei ungefähr 0 mV. Die Steigung der mittels linearer Regression angepaßten Ausgleichskurve entspricht der Leitfähigkeit und betrug in diesem Experiment 274 pS. Mit diesem Versuchsprotokoll konnten keine Schaltvorgänge bei positiven Membranpotentialen beobachtet werden, da Herzmuskelzellen bei solchen Haltepotentialen durch den depolarisationsaktivierten Calciumstrom sehr stark kontrahieren und schließlich von der Patchpipette abreißen.

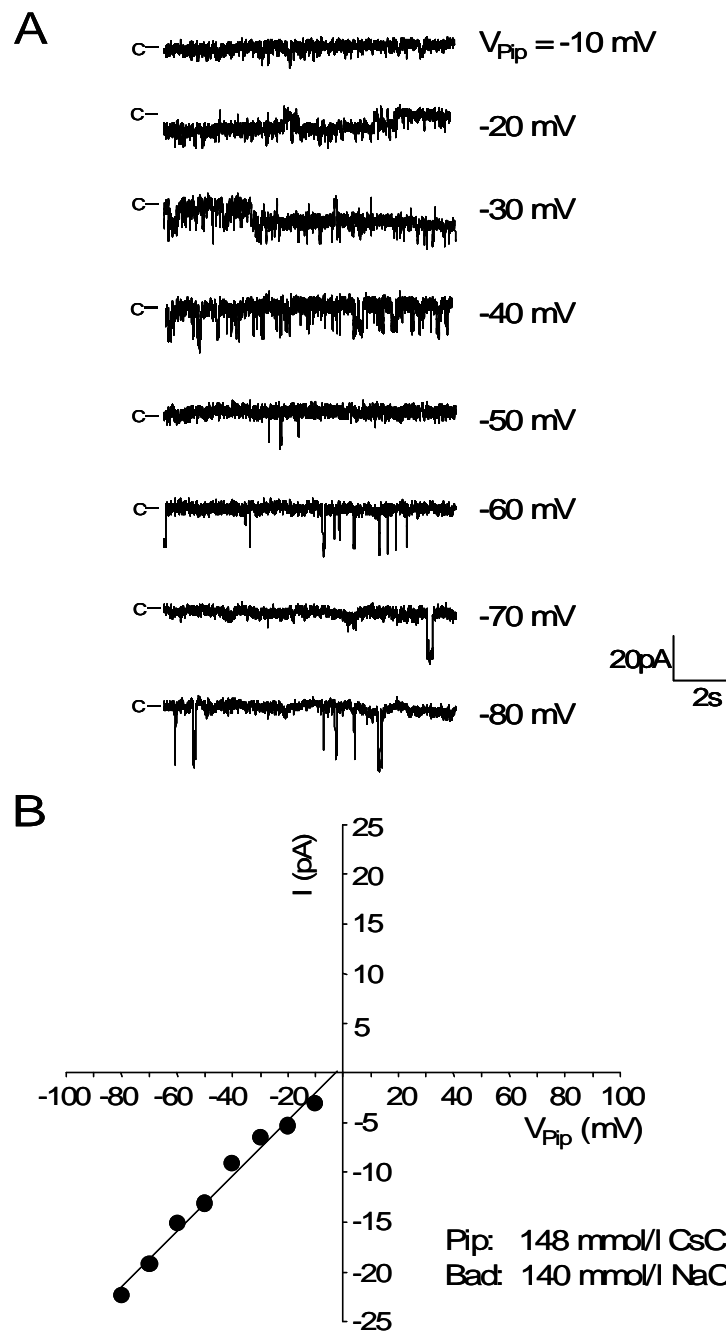


Abbildung 4: **Strom-Spannungsbeziehung ohne intrazelluläre Calciumpufferung**

(A) zeigt Einzelkanal-Schaltvorgänge bei einer einzelnen Kardiomyozyte bei verschiedenen Haltepotentialen von $V_{Pip} = -10$ bis -80 mV.

(B) stellt die so registrierten Stromamplituden in Abhängigkeit von den verwendeten Membranpotentialen dar. Schaltvorgänge bei positiven Membranpotentialen konnten aufgrund der Kontraktion der Zelle nicht gewonnen werden (siehe Text). Aus diesem Versuch läßt sich eine Leitfähigkeit von 274 pS berechnen. Verwendet wurden die Pipettenlösung P-01 und die Badlösung B-01.

Um das Problem der Kontraktion bei positiven Membranpotentialen zu umgehen, wurde die elektromechanische Kopplung in der Zelle durch Pufferung freier Calciumionen unterbrochen. 10 mmol/l EGTA in der Pipettenlösung (P-03) konnte eine Kontraktion bei Depolarisation effektiv verhindern und ermöglichte so die Beobachtung von Schaltvorgängen bei Membranpotentialen zwischen +30 und +90 mV. Die Mittelwerte von insgesamt 31 Versuchen führten zu der in Abbildung 5 A dargestellten nahezu linear verlaufenden Strom-Spannungsbeziehung, die ein Umkehrpotential von ca. 0 mV und eine Leitfähigkeit von etwa 300 pS aufweist.

3.4.2. Zustände verschiedener Leitfähigkeit

Die weitaus am häufigsten beobachtete Stromamplitude betrug bei einer Haltespannung von -90 mV mit der *Standard-Pipettenlösung* und der *Standard-Badlösung* ca. 28 pA ($27,19 \pm 0,8$ pA, n = 142). Daneben kamen auch regelmäßig Schaltvorgänge mit $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$ oder $\frac{3}{4}$ der normalen Amplituden, d.h. mit ca. 7 pA, 14 pA oder 21 pA vor. In Abbildung 5 B ist beispielhaft ein Versuch abgebildet, bei dem neben Stromsprüngen von 30,8 pA, auch solche von 15,4 pA auftraten.

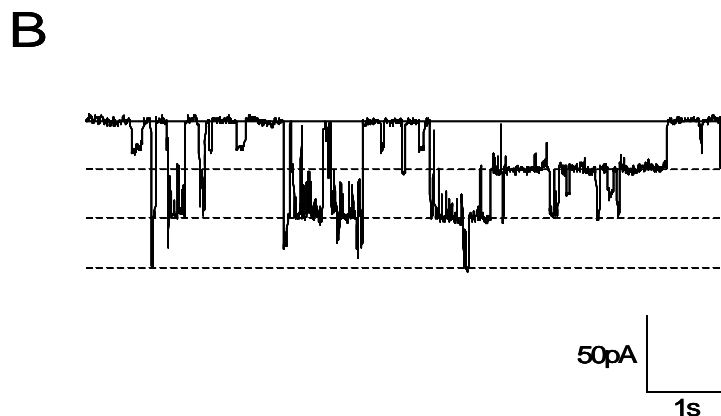
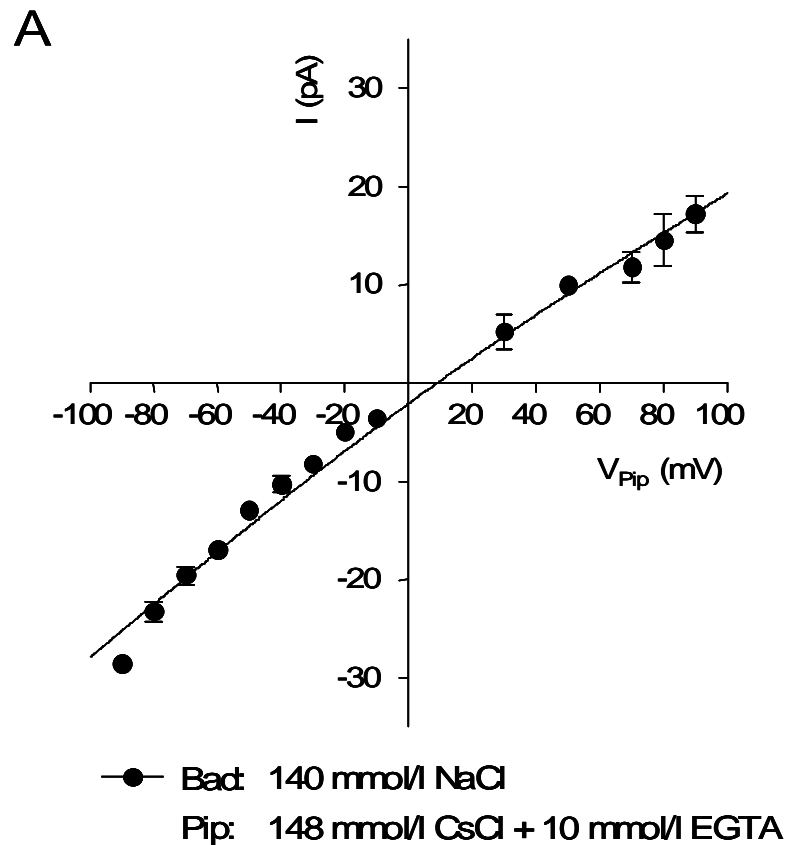


Abbildung 5: **Strom-Spannungsbeziehung bei intrazellulärer Calciumpufferung**

In (A) sind die maximalen Stromamplituden in Abhängigkeit vom Membranpotential dargestellt, wie sie in 31 Experimenten mit einer 10 mmol/l EGTA-haltigen Pipettenlösung (P-03) gewonnen wurden. Es ergibt sich eine nahezu lineare Strom-Spannungsbeziehung mit einer Leitfähigkeit von etwa 300 pS.

Abbildung (B) illustriert das gleichzeitige Auftreten von Stromamplituden verschiedener Größe in einer Zelle bei einem Haltepotential von $V_{\text{Pip}} = -90$ mV. So traten in diesem Versuch neben Stromsprüngen von 30,8 pA auch solche von 15,4 pA auf (Pipette: P-01; Bad: B-01).

3.4.3. Temperaturabhängigkeit und extrazelluläre Azidifikation

Um die Temperaturabhängigkeit des Kanals zu bestimmen, wurde die Größe der Stromamplituden in *Standard-Badlösung* und *Standard-Pipettenlösung* bei einer Haltespannung von $V_{\text{pip}} = -90$ mV und einer Umgebungstemperatur von 37 °C mit denen bei Raumtemperatur verglichen. Die mittlere Stromamplitude bei 37 °C betrug $42,2 \pm 2$ pA ($n = 5$). Hieraus und aus der bei 22 °C bestimmten Amplitude von $27,19 \pm 0,8$ pA ($n = 142$) kann Q_{10} auf 1,3 berechnet werden.

Darüber hinaus wurden die Auswirkungen einer Erniedrigung des extrazellulären pH-Wertes auf die biophysikalischen Eigenschaften des Kanals untersucht. Dafür wurde der LCC mittels Coffeingabe in Gegenwart der *Standard-Badlösung* (pH = 7,30) ausgelöst und diese durch eine *Standard-Badlösung*, die auf einen pH von 6,0 eingestellt war, ausgetauscht. Dabei konnte in keinem von neun Versuchen eine Veränderung der Offenwahrscheinlichkeit oder der Größe der Stromamplituden beobachtet werden.

3.4.4. Ionenselektivität

Unter den bisher gewählten Bedingungen (intrazellulär: 148 mmol/l Cs^+ , 4 mmol/l Na^+ , 158 mmol/l Cl^- ; extrazellulär: 140 mmol/l Na^+ , 148 mmol/l Cl^-) gibt es zwei Erklärungsmöglichkeiten für eine Strom-Spannungsbeziehung mit einem Umkehrpotential von 0 mV. Einerseits ist es denkbar, daß der Kanal nur für Kationen permeabel ist, wobei hauptsächlich Na^+ bei negativen beziehungsweise Cs^+ und Na^+ bei positiven Membranspannungen die Ladungsträger wären. Andererseits kommt eine Anionen-Selektivität in Frage, bei der der Strom dann von Cl^- als Ladungsträger getragen würde. Um diese Frage zu klären, wurden verschiedene Ionen-Austauschversuche durchgeführt.

3.4.4.1. Permeabilität für monovalente Ionen

Für die Permeabilitätsuntersuchungen wurde der Kanal durch Coffeingabe aktiviert und danach die *Standard-Badlösung* gegen eine Lösung ausgetauscht, in der die Konzentration einer Ionenart verändert war. Die übrigen Versuchsbedingungen wurden konstant gehalten.

Zuerst wurde in vier Versuchen die Permeabilität des Kanals für Kationen bzw. Anionen untersucht. Hierzu wurde nach Auslösen des LCCs in der *Standard-Badlösung* extrazelluläres NaCl durch Natriumglutamat (B-02) ersetzt und somit die extrazelluläre Chloridkonzentration von 148 mmol/l auf 10 mmol/l gesenkt. In Abbildung 6 ist die resultierende Strom-Spannungsbeziehung bei verschiedenen negativen Membranpotentialen und zum Vergleich eine unter Standardbedingungen dargestellt. Bei einer signifikanten Chloridleitfähigkeit wäre in der nahezu chloridfreien *Natriumglutamat-Badlösung* bei $V_{\text{pip}} = -10$ mV eine größere Schaltamplitude als unter Standardbedingungen zu erwarten. Wie aus der Abbildung erkennbar, gibt es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Amplituden bei den verwendeten Membranpotentialen. Die Aussagekraft dieser Versuche ist jedoch dadurch limitiert, daß der zu erwartende Unterschied selbst bei einer hohen Permeabilität für Cl^- bei negativen Membranpotentialen eher gering ausfällt. Die Meßwerte deuten zwar darauf hin, daß für Na^+ eine höhere Permeabilität besteht als für Cl^- , für eine genauere Einschätzung wären jedoch Messungen bei positiven Membranpotentialen notwendig. Aufgrund der bereits erwähnten Kontraktionen der Kardiomyozyten im positiven Membranpotentialbereich sind solche Versuche jedoch schwierig. Daher wurde die Selektivität des Kanals anhand von Na^+ -Austauschversuchen weiter untersucht.

Extrazelluläres Na^+ wurde äquimolar gegen N-Methyl-D-Glucamin (NMDG) ausgetauscht. Hierbei handelt es sich um ein großes organisches Kation, für welches die meisten Kanäle impermeabel sind. Eine Reduktion der extrazellulären Na^+ -Konzentration von 140 mmol/l auf 70 mmol/l (Bad: B-03) führte bei $V_{\text{pip}} = -90$ mV zu einer Reduktion der Stromamplituden von 30 pA (Abbildung 7 A oben) auf 13 pA (Abbildung 7 A Mitte). Wurde extrazelluläres Na^+ komplett durch NMDG (Bad: B-04) ersetzt, waren keine Schaltvorgänge mehr nachweisbar (Abbildung 7 A unten). Dabei kam es innerhalb sehr kurzer Zeit zu einer irreversiblen Hyperkontraktur der

untersuchten Zellen. Vermutlich wurde diese durch die Aktivierung des Na^+ - Ca^{2+} -Austauschers im „reverse mode“ ausgelöst; dies bedeutet, daß intrazelluläres Na^+ dem Konzentrationsgefälle entsprechend aus der Zelle und im Gegenzug Ca^{2+} in die Zelle transportiert wird.

In Abbildung 7 B ist die Größe der Stromamplituden in Abhängigkeit von der Membranspannung für eine extrazelluläre Natriumkonzentration von 140 mmol/l ($n = 24$, gefüllte Kreise) bzw. 70 mmol/l ($n = 4$, offene Kreise) dargestellt. Es wurde jeweils eine Kurve nach der Goldman-Hodgkin-Katz Gleichung unter Annahme der Permeabilität für monovalente Kationen erstellt und an die Strom-Spannungswerte angepaßt. Bei der reduzierten extrazellulären Natriumkonzentration zeigen sich über den gesamten beobachteten Membranpotentialbereich hinweg deutlich geringere Stromamplituden und damit auch eine geringere Leitfähigkeit als in den Kontrollversuchen.

Diese Abhängigkeit der Stromamplituden von der extrazellulären Natriumkonzentration deutet sehr stark darauf hin, daß der Kanal hochselektiv für Na^+ gegenüber Cl^- permeabel ist.

Analog zu den eben beschriebenen Experimenten wurden in weiteren Versuchsreihen jeweils 70 mmol/l des extrazellulären Na^+ durch andere monovalente Kationen ersetzt. Abbildung 8 faßt die gewonnenen Ergebnisse zusammen. Bei einer Haltespannung von $V_{\text{pip}} = -90$ mV fanden sich für K^+ (Bad: B-05) Stromamplituden mit $29,6 \pm 0,6$ pA ($n = 5$), für Cs^+ (Bad: B-06) mit $25,2 \pm 0,4$ pA ($n = 14$) und für Li^+ (Bad: B-07) mit $23,1 \pm 0,8$ pA ($n = 14$). Für K^+ bestanden somit mit Na^+ vergleichbare, für Cs^+ und Li^+ hingegen signifikant niedrigere Stromamplituden.

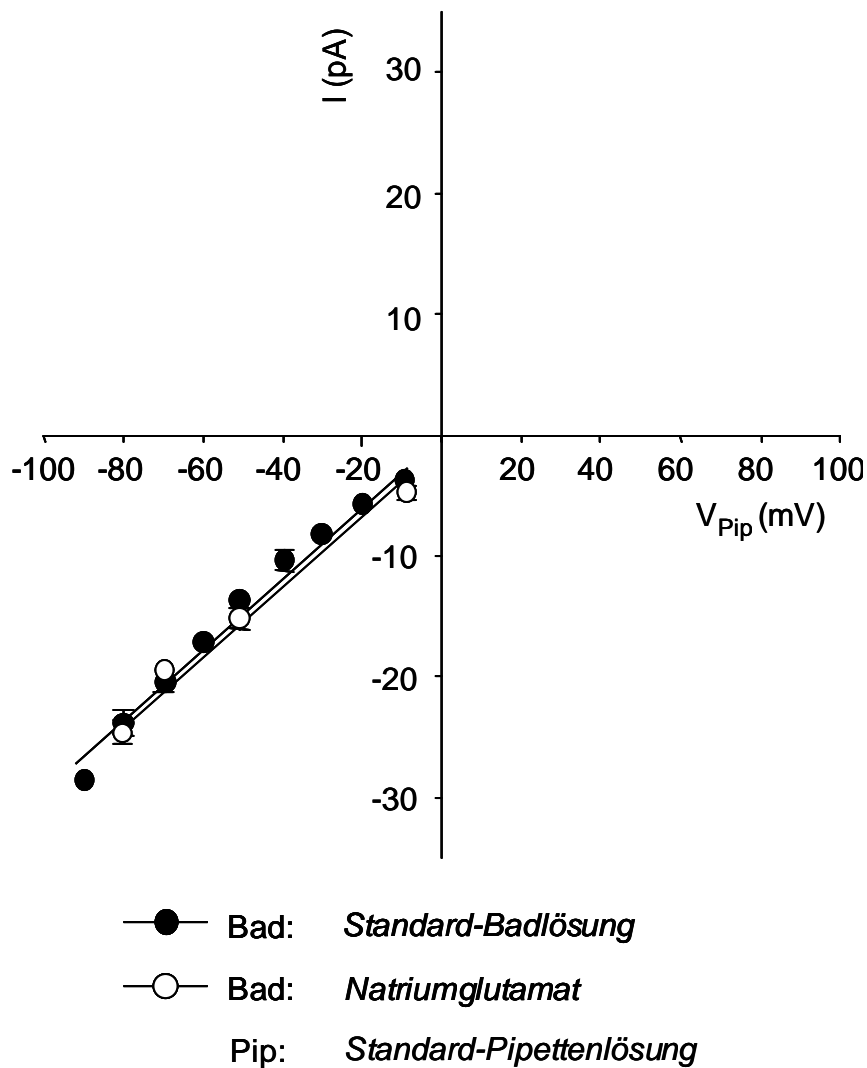
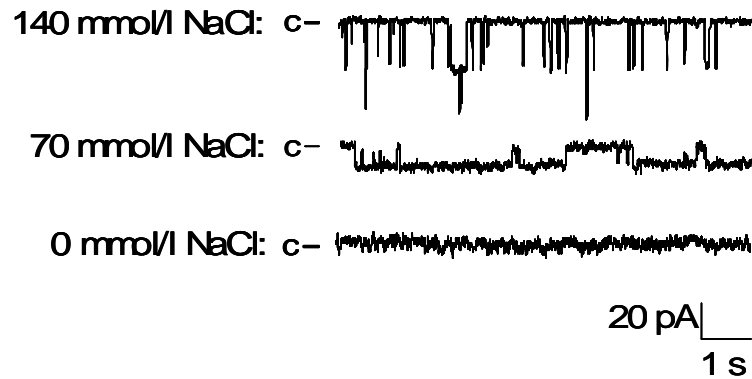


Abbildung 6: Bestimmung der Chloridpermeabilität

Diese Abbildung zeigt die Strom-Spannungsbeziehungen für die *Standard-Badlösung* (148 mmol/l Cl^- , gefüllte Kreise, $n = 24$) bzw. für die *Natriumglutamat-Badlösung* (10 mmol/l Cl^- , offene Kreise, $n = 4$). Als Pipettenlösung wurde jeweils die *Standard-Pipettenlösung* verwendet. Das Liquid Junction Potential für Natriumglutamat wurde nachträglich in der Analyse korrigiert. Unter beiden Versuchsbedingungen ergibt sich eine nahezu lineare Strom-Spannungsbeziehung ohne signifikante Unterschiede.

A



B

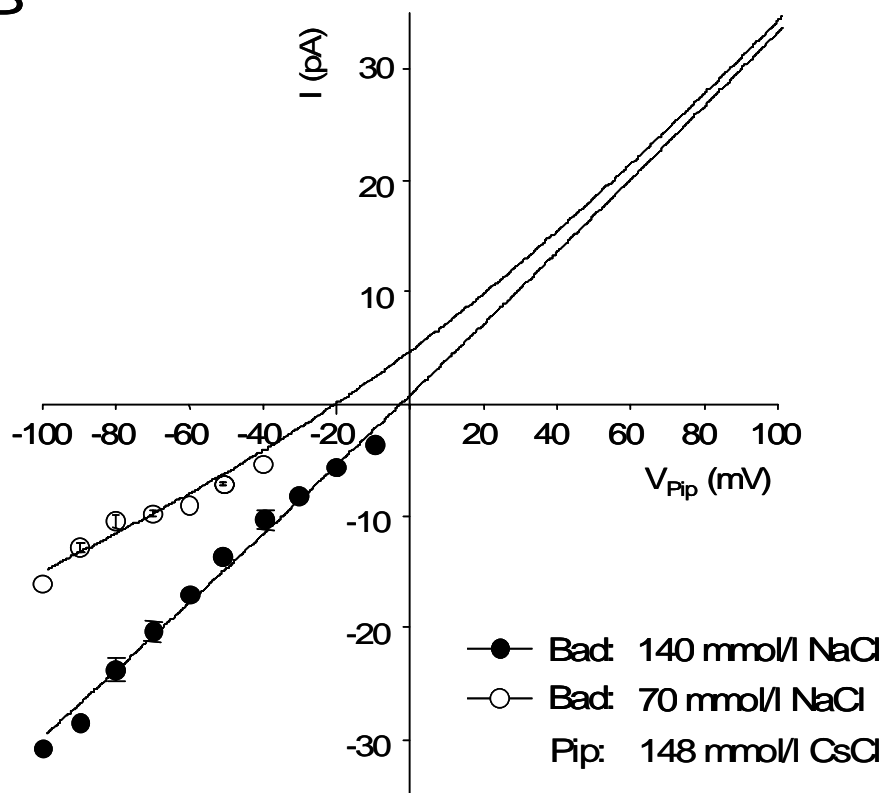


Abbildung 7: Bestimmung der Natriumpermeabilität

(A) zeigt Stromkurven bei einem Haltepotential von $V_{Pip} = -90$ mV mit einer Badlösung mit 140 mmol/l Na^+ (B-01), 70 mmol/l Na^+ (B-03) bzw. 0 mmol/l Na^+ (B-04); jeweils in Verbindung mit der *Standard-Pipettenlösung*.

In (B) sind die resultierende Strom-Spannungsbeziehungen für 140 mmol/l NaCl (gefüllte Kreise, $n = 24$) bzw. 70 mmol/l NaCl (offene Kreise, $n = 4$) in der Badlösung dargestellt. Für beide Versuchsbedingungen wurde jeweils eine Kurve nach der Goldman-Hodgkin-Katz Gleichung erstellt und an die Meßwerte angepaßt.

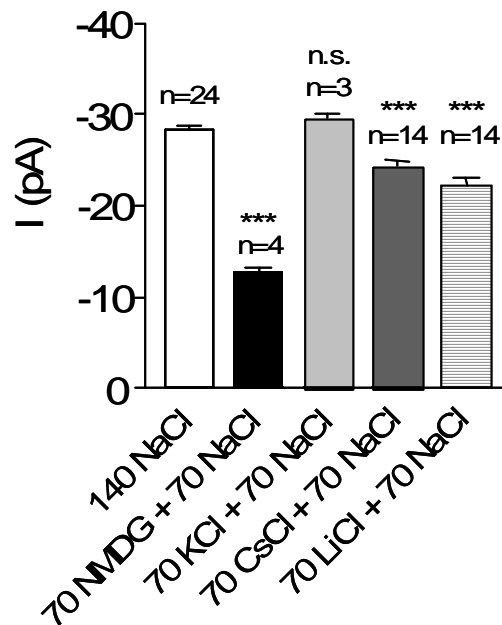


Abbildung 8: **Permeabilität monovalenter Kationen**

Zusammenfassung der Einzelkanalamplituden bei $V_{pip} = -90$ mV mit 140 mmol/l Na^+ in der Badlösung bzw. nach dem Austausch von 70 mmol/l $NaCl$ gegen 70 mmol/l NMDG-Cl (B-03), KCl (B-05), CsCl (B-06) oder LiCl (B-07). Die Pipettenlösung enthielt CsCl (P-01). Der Kanal ist im Vergleich zu Na^+ für K^+ gleich gut, für Cs^+ und Li^+ signifikant schlechter permeabel.

*** entspricht $P < 0,001$, n.s. bedeutet nicht signifikant (jeweils gegen 140 mmol/l $NaCl$ getestet).

3.4.4.2. Permeabilität für divalente Kationen

Die Permeabilität der divalenten Kationen Ba^{2+} , Ca^{2+} und Mg^{2+} wurde bestimmt, indem deren extrazelluläre Konzentration von 0 bzw. 1 mmol/l auf 97 mmol/l erhöht und sämtliche monovalenten Kationen aus der Badlösung entfernt wurden. Die Osmolarität wurde dabei durch den Zusatz von 100 mmol/l Saccharose konstant gehalten. Um eine Aktivierung des Na^+ - Ca^{2+} -Austauschers im „reverse mode“ zu verhindern, wurde darüber hinaus in der Pipettenlösung auf Na^+ komplett verzichtet und das sonst verwendete Na^+ -ATP gegen Mg^{2+} -ATP ausgetauscht. In der Kontroll-Badlösung mit 97 mmol/l Na^+ (B-08) lagen die Stromamplituden bei $V_{pip} = -90$ mV bei $23,0 \pm 0,6$ pA ($n = 8$). In der Gegenwart von 97 mmol/l Ba^{2+} in der Badlösung (B-09)

verringerten sich diese auf $20,2 \pm 1,1$ pA ($n = 8$). Um eine Kontraktion bei einem Wechsel auf 97 mmol/l Ca^{2+} in der Badlösung (B-10) zu verhindern, wurde eine 10 mmol/l EGTA enthaltende Pipettenlösung (P-03) verwendet. Im Mittel lagen die Stromamplituden dann bei $17,2 \pm 0,27$ pA ($n = 3$). Schaltvorgänge waren hingegen überhaupt nicht mehr nachweisbar, wenn die Badlösung 97 mmol/l Mg^{2+} (B-11) enthielt.

Zusammenfassend ist der Kanal demnach permeabel für die monovalenten Kationen Na^+ , K^+ , Li^+ und Cs^+ , wobei eine leichte Selektivität für Na^+ und K^+ gegenüber den letzteren beiden besteht. Für die divalenten Kationen Ba^{2+} und Ca^{2+} konnte eine Permeabilität nachgewiesen werden, nicht jedoch für Mg^{2+} . Für das Anion Cl^- konnte ebenfalls keine Permeabilität nachgewiesen werden.

3.4.5. Mechanismen der Aktivierung

3.4.5.1. Calcium

Die engen zeitlichen Beziehungen zwischen Beginn von $I_{\text{Na/Ca}}$ und der Aktivierung des Kanals großer Leitfähigkeit einerseits und zwischen dem Abklingen von $I_{\text{Na/Ca}}$ und der sinkenden Offenwahrscheinlichkeit des Kanals andererseits legten die Vermutung nahe, daß Ca^{2+} maßgeblich an der Regulation dieses Kanals beteiligt ist. Um dies näher zu untersuchen, wurden Versuchsreihen durchgeführt, in denen die zytosolische und extrazelluläre Calciumkonzentrationen direkt oder indirekt beeinflusst wurden. So wurde zum einen das zytosolische freie Ca^{2+} durch Verwendung einer Calciumpufferlösung auf ein Minimum gesenkt und zum anderen die extrazelluläre Calciumkonzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_a$) durch Verwendung einer modifizierten Badlösung erhöht. Eine weitere Versuchsreihe sollte darüber hinaus zeigen, ob in Abwesenheit von Coffein die alleinige Erhöhung der zytosolischen Calciumkonzentration ausreicht, um den Kanal zu aktivieren.

EGTA bildet Komplexe mit divalenten Kationen, vor allem mit Ca^{2+} -Ionen. Die in der *Standard-Pipettenlösung* enthaltene Konzentration von 0,1 mmol/l EGTA stellt die zytosolische freie Calciumkonzentration auf $1,95 \times 10^{-9}$ mol/l ein. In der Gegenwart

von 10 mmol/l EGTA in der Pipettenlösung (P-03) hingegen sinkt $[Ca^{2+}]_i$ auf $1,87 \times 10^{-11}$ mol/l (beide Konzentrationsangaben wurden für einen pH von 7,20 mit „WebmaxC“ von Patton berechnet [Patton et al., 2004]). Liegt EGTA hochkonzentriert (10 mmol/l) in der Pipette vor, bindet es darüber hinaus Calciumionen so effizient, daß es selbst bei einer maximalen Calciumfreisetzung aus dem SR (z.B. durch Coffein) zu keinem nennenswerten Anstieg von $[Ca^{2+}]_i$ und damit auch zu keiner Kontraktion und zu keiner Aktivierung von $I_{Na/Ca}$ mehr kommt. Abbildung 9 A zeigt den Verlauf der Stromkurve eines Versuches mit einer 10 mmol/l EGTA enthaltenen Pipettenlösung (P-03). Nach der Applikation von Coffein fällt neben der fehlenden Aktivierung von $I_{Na/Ca}$ die zwar vorhandene, im Vergleich zu den bereits gezeigten Versuchen jedoch deutlich reduzierte Schaltaktivität des Kanals großer Leitfähigkeit auf. Von 29 durchgeführten Versuchen lag die Offenwahrscheinlichkeit bei den 13 Versuchen, in denen der Kanal aktivierbar war, über einen beobachteten Zeitraum von 30 s ($NP_O = 0,009 \pm 0,003$; $n = 13$) um den Faktor 30 unter der NP_O bei Kontrollversuchen mit *Standard-Pipettenlösung* ($NP_O = 0,310 \pm 0,06$; $n = 39$; $p < 0,001$).

Ferner ergaben die Versuche, in denen die Abhängigkeit der Kanalaktivität von der extrazellulären Calciumkonzentration durch Anhebung von $[Ca^{2+}]_a$ von 1 mmol/l auf 10 mmol/l (Bad: B-12) untersucht wurde, eine Zunahme der NP_O um den Faktor 17,5 ($n = 19$; $p < 0,05$).

1990 beobachteten Pott et al. bei Verwendung einer Cs_3 -Citrat Pipettenlösung ohne Applikation von Coffein einen Kanal großer Leitfähigkeit in Kardiomyozyten von Meerschweinchen [Pott et al., 1990]. Für Cs_3 -Citrat ist bekannt, daß es die Inaktivierung von L-Typ Ca^{2+} -Kanälen verlangsamt. Somit kommt es in der Gegenwart von Cs_3 -Citrat in der Pipettenlösung bei einer Depolarisation zu einem vermehrten Calciumeinstrom, einer stärkeren Füllung des sarkoplasmatischen Retikulums und bei der nächsten Depolarisation oder bei spontanen Calciumfreisetzungen zu einer vermehrten Calciumfreisetzung aus dem SR [Lipp et al., 1987]. Um zu prüfen, ob der hier beschriebene Kanal auch in Abwesenheit von Coffein durch die Erhöhung der zytosolischen Calciumkonzentration aktivierbar ist, wurde in einigen Versuchen eine *Cs₃-Citrat Pipettenlösung* (P-04), wie sie auch von Pott et al. benutzt wurde, verwendet.

Die jeweils untersuchte Zelle wurde mehrfach für 250 ms auf $V_{\text{pip}} = 0$ mV depolarisiert, so daß ein maximaler Calciumeinstrom über die L-Typ Ca^{2+} -Kanäle und eine maximale Calciumbeladung des SR erzielt wurde. Im Anschluß daran wurde sie auf $V_{\text{pip}} = -90$ mV geklemmt und die Stromkurve kontinuierlich registriert. Abbildung 9 B zeigt beginnend von der letzten Depolarisation das verwendete Haltespannungsprotokoll und darüber eine typische Membranstromkurve. Die Aktivierung eines Kanals großer Leitfähigkeit ist deutlich erkennbar. So ließ sich bei drei von insgesamt zehn untersuchten Zellen der LCC unabhängig von Coffein aktivieren.

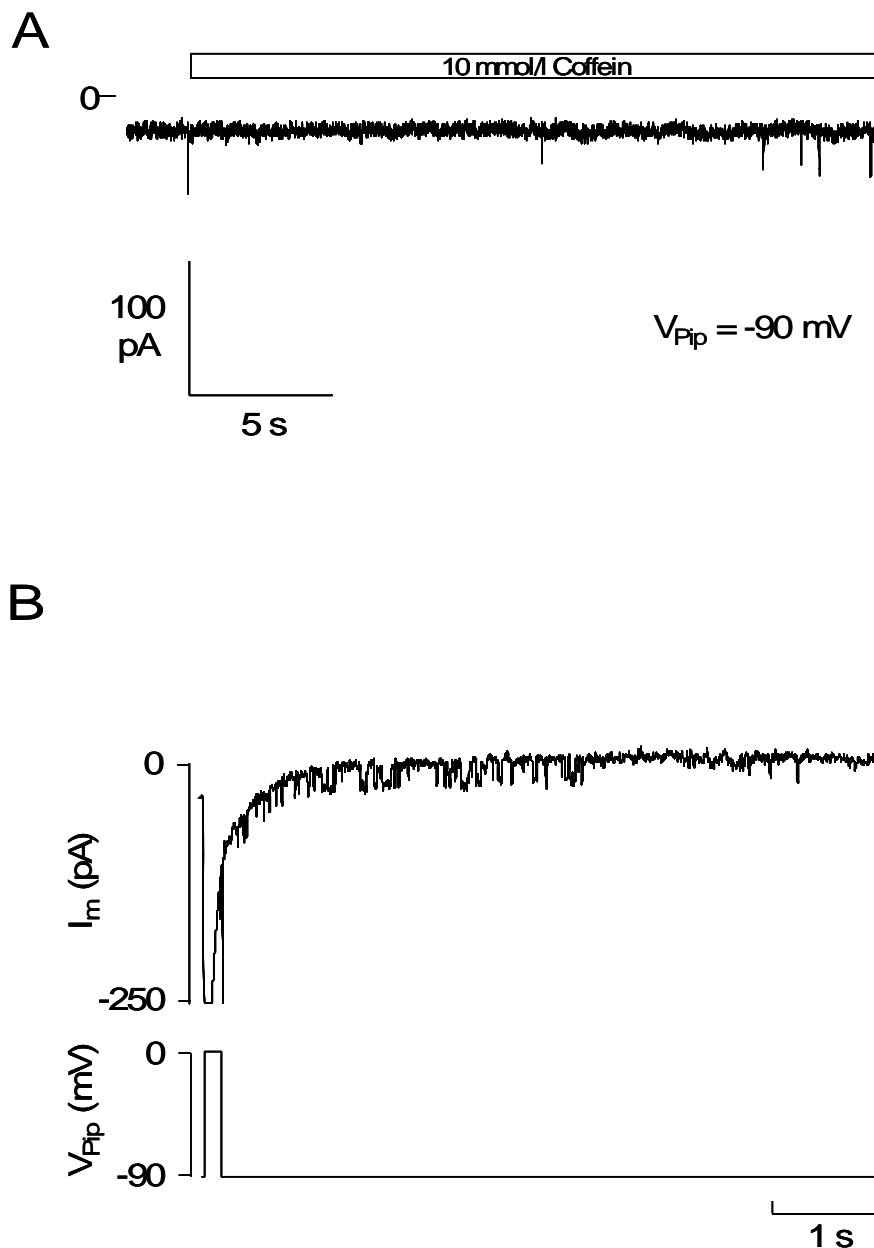


Abbildung 9: **Die Kanalaktivität ist abhängig von $[Ca^{2+}]_i$**

(A) zeigt die Stromkurve bei Applikation einer coffeinhaltigen Badlösung auf eine Kardiomyozyte unter Verwendung von 10 mmol/l EGTA in der Pipette (P-03). Neben dem Fehlen von $I_{Na/Ca}$ fällt die Aktivierung eines LCCs mit sehr geringer Aktivität auf. Bei 13 Versuchen lag die NP_O um den Faktor 30 unter der bei Kontrollversuchen mit 0,1 mmol/l EGTA.

(B) Bei Verwendung einer auf CS_3 -Citrat basierenden Pipettenlösung (P-04) und der *Standard-Badlösung* konnte der LCC durch wiederholte Depolarisationen (250 ms) auf $V_{Pip} = 0$ mV ausgelöst werden. Beginnend von der letzten Depolarisation ist unten das verwendete Spannungsprotokoll und darüber die resultierende Membranstromkurve abgebildet.

3.4.5.2. *Coffein*

Wie bereits beschrieben, konnte der Kanal regelmäßig durch die Gabe von 10 mmol/l Coffein aktiviert werden. Darüber hinaus wurde häufig beobachtet, daß die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals (NP_0) kurz nach der Aktivierung von $I_{Na/Ca}$ ein Maximum besaß und danach kontinuierlich absank. Bei einigen Versuchen blieb der Kanal dann über einen längeren Zeitraum auf einem niedrigeren Aktivitätsniveau spontan aktiv, bei anderen wiederum inaktivierte er vollständig. Wurde Coffein aus der Badlösung entfernt, so inaktivierte der Kanal vollständig. Abbildung 10 zeigt stellvertretend einen typischen Versuchsverlauf bei wiederholtem Ein- und Auswaschen von Coffein. Die initiale Applikation von Coffein führte zu der gleichzeitigen Aktivierung von insgesamt sechs Kanälen großer Leitfähigkeit. Durch das Auswaschen von Coffein wurde die NP_0 innerhalb von 15 Sekunden von 1,33 auf 0,13 gesenkt. Die darauffolgende erneute Superfusion mit Coffein führte wieder zu einer erneuten Zunahme der Kanalaktivität ($NP_0 = 0,55$). Das anschließende Auswaschen von Coffein senkte die NP_0 wieder innerhalb von 15 Sekunden auf 0,09 herab.

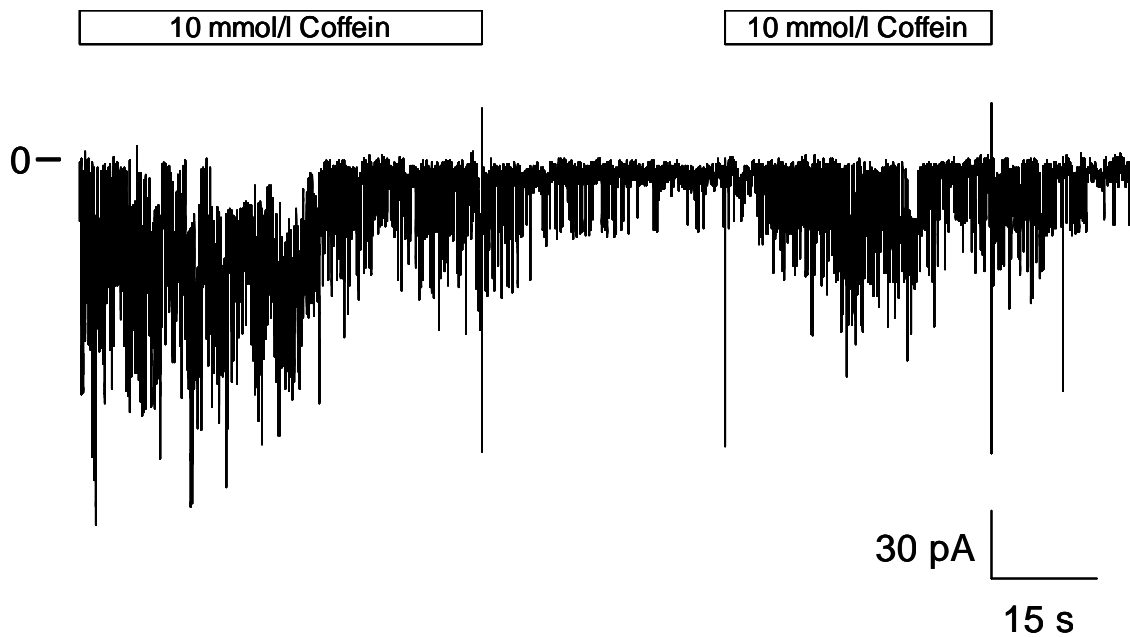


Abbildung 10: **Coffein moduliert die Kanalaktivität des LCCs**

Bei einem Haltepotential von $V_{\text{pip}} = -90$ mV wurde bei einer Kardiomyozyte mit einer coffeinhaltigen Badlösung (B-01) der LCC aktiviert. Nach etwa 45 Sekunden wurde das Coffein aus der Badlösung entfernt, nach weiteren 30 Sekunden erneut ein- und dann wieder ausgewaschen. Die Aktivität des LCCs nahm nach jedem Auswaschen von Coffein deutlich ab und stieg nach erneutem Überspülen wieder an. Die Pipettenlösung enthielt CsCl (P-01).

3.4.6. Modulation der Kanaleigenschaften durch divalente Kationen

Für Polycystin-2 Kanäle ist in der Literatur eine Modulation der Permeabilität für monovalente Kationen durch divalente Kationen beschrieben worden [Hanaoka et al., 2000]. Um den hier charakterisierten Kanal auf eine solche Eigenschaft hin zu untersuchen, wurde die Größe der Stromamplituden bei extrazellulären Konzentration von Mg^{2+} , Ca^{2+} und Ba^{2+} von jeweils 10 mmol/l gegen die bei Verwendung der *Standard-Badlösung* getestet. Abbildung 11 stellt repräsentativ die für Mg^{2+} gewonnenen Ergebnisse dar. So zeigt Abbildung 11 A Stromamplituden von 29 pA bei *Standard-Badlösung* mit 1 mmol/l Mg^{2+} (B-01) und $V_{pip} = -90$ mV. Ein Wechsel auf 10 mmol/l Mg^{2+} (B-13) verringerte die Amplitude um fast die Hälfte auf 17 pA (siehe Abbildung 11 B). Im Mittel nahmen bei acht Versuchen die Stromsprünge von $28,9 \pm 0,4$ pA auf $17,8 \pm 0,7$ pA ab ($p < 0,0001$). Im unteren Teil der Abbildung 11 A und B sind Histogramme für die jeweiligen Aufzeichnungen abgebildet. Analog dazu fielen die Versuche bei der Erhöhung der extrazellulären Ca^{2+} - bzw. Ba^{2+} -Konzentration aus. So bewirkte 10 mmol/l Ca^{2+} (B-12) eine Erniedrigung der Stromsprünge von $27,5 \pm 0,9$ pA auf $19,8 \pm 1,1$ pA ($n = 12$; $p < 0,0001$). In Gegenwart von 10 mmol/l Ba^{2+} (B-14) sanken die Stromamplituden von $28,3 \pm 0,4$ pA auf $19,1 \pm 1,2$ pA ($n = 5$; $p < 0,01$).

Eine Erhöhung der extrazellulären Konzentration der divalenten Kationen Mg^{2+} oder Ca^{2+} von 1 auf 10 mmol/l bzw. von Ba^{2+} von 0 auf 10 mmol/l hemmt demnach jeweils signifikant die Permeabilität für monovalente Kationen.

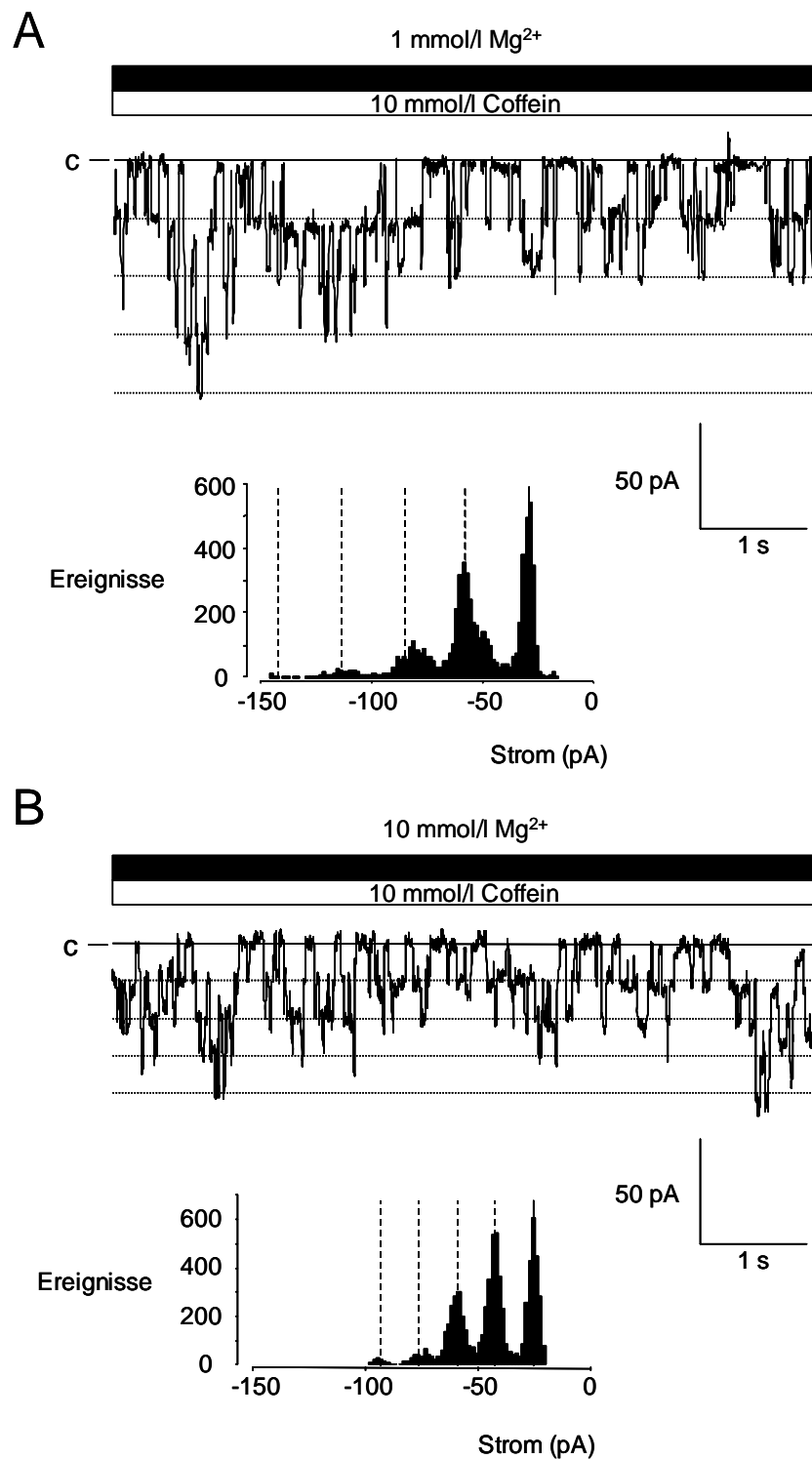


Abbildung 11: Divalente Kationen modulieren die Stromamplitude

(A,B) Schaltvorgänge mehrerer gleichzeitig aktivierter LCCs bei $V_{pip} = -90$ mV in der Gegenwart von 1 mmol/l (A) bzw. 10 mmol/l (B) Mg^{2+} in der Badlösung (B-01 bzw. B-13). Die Pipette enthielt *Standard-Pipettenlösung*. Die Amplitudenhistogramme wurden jeweils über den gesamten Zeitraum der abgebildeten Aufzeichnung erstellt. Über acht Versuche gemittelt waren die einzelnen Stromamplituden in Gegenwart von 10 mmol/l Mg^{2+} signifikant niedriger als in Gegenwart von 1 mmol/l Mg^{2+} .

3.5. Pharmakologische Eigenschaften des LCCs

Die Pharmaka, deren Effekt auf den hier vorgestellten Kanal untersucht wurden, wurden nach den in der Einleitung ausgeführten Überlegungen ausgewählt (vgl. Kapitel 1.4). An dieser Stelle sollen die Versuchsergebnisse nach den verwendeten Substanzen sortiert vorgestellt werden. Die Pharmaka wurden in der *Standard-Badlösung* oder in der *Standard-Pipettenlösung* gelöst. Der Kanal wurde – wenn nicht anders angegeben – zuerst unter Standardbedingungen mit 10 mmol/l Coffein aktiviert und die Einstellung einer konstanten Aktivität abgewartet. Die zu testende Substanz wurde dann bei kontinuierlicher Registrierung der Stromkurve über die Badlösung ein- und dann wieder ausgewaschen. Am Ende dieses Kapitels findet sich Tabelle 6 (Seite 69) mit einer Zusammenfassung der pharmakologischen Ergebnisse.

3.5.1. 18- α -Glycyrrhetinsäure

Pott et al. schlugen aufgrund der von ihnen beobachteten Eigenschaften vor, daß der von ihnen beschriebene LCC in isolierten atrialen Myozyten von Meerschweinchen mit Gap-Junction Halbkanälen verwandt ist [Pott et al., 1990]. Gap-Junctions ermöglichen eine elektrotonische Kopplung und einen eingeschränkten Substanztausch zwischen zwei aneinanderliegenden Zellen. Gebildet werden sie durch jeweils zwei Halbkanäle (Connexone), die in der Zellmembran benachbarter Zellen verankert sind und bei der Trennung der Zellen eventuell weiterhin funktionsfähige Halbkanäle bilden können [Pott et al., 1990; Contreras et al., 2002].

Als spezifischer Blocker für Gap-Junction Halbkanäle wird 18- α -Glycyrrhetinsäure angesehen [Contreras et al., 2002]. In insgesamt 11 Versuchen der vorliegenden Arbeit konnte ein signifikanter Effekt von 20 μ mol/l 18- α -Glycyrrhetinsäure weder auf die Offenwahrscheinlichkeit ($NP_O = 0,32 \pm 0,08$; $n = 8$ gegenüber $NP_O = 0,78 \pm 0,33$; $n = 6$ in der Kontrolle) noch auf die Stromamplituden ($28,22 \pm 0,75$ pA; $n = 7$ gegenüber $28,92 \pm 1,26$; $n = 5$ in der Kontrolle) bei $V_{pip} = -90$ mV nachgewiesen werden. Abbildung 12 A stellt einen typischen Versuch dar: nach Aktivierung des Kanals mit Coffein und Erreichen einer

konstanten Aktivität wurde 20 $\mu\text{mol/l}$ 18- α -Glycyrrhetinsäure ohne sichtbaren Effekt über die Badlösung ein- und nach etwa 15 Sekunden wieder ausgewaschen.

Das Fehlen eines Effektes in den hier vorgestellten Versuchen auf die Offenwahrscheinlichkeit und die Stromamplitude spricht somit eher gegen die Zugehörigkeit dieses Kanals zu der Familie der Gap-Junction Halbkanäle.

3.5.2. *Ryanodin*

Ryanodin-Rezeptor Kanäle (RyR Kanäle) kommen in verschiedenen Isoformen in zahlreichen Geweben vor [Sutko et al., 1996]. Im Herzen sind sie wesentlich für die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum. Der Effekt des Alkaloids Ryanodin auf RyR Kanäle wurde in verschiedenen Arbeiten wie folgt beschrieben: im mikromolaren Bereich erhöht es die Offenwahrscheinlichkeit, während gleichzeitig die Stromamplituden konzentrationsabhängig gesenkt werden [Rousseau et al., 1987; Sitsapasan et al., 1990]. Kondo et al. beobachteten für 25 $\mu\text{mol/l}$ Ryanodin in der Pipette in allen Versuchen eine Reduktion der Leitfähigkeit auf 44 % und bei 0,01-1 mmol/l Ryanodin in der Badlösung in 20 % der untersuchten Zellen eine ebensolche Abnahme [Kondo et al., 2000].

In eigenen Versuchen führte die Applikation von 10 $\mu\text{mol/l}$ Ryanodin über die Badlösung zu keiner Veränderung der Stromamplituden ($n = 13$). Auch eine Inkubationszeit von bis zu 3 Minuten ($n = 8$) veränderte diesen Parameter nicht. In einer zweiten Versuchsreihe wurde Ryanodin intrazellulär in einer Konzentration von 25 $\mu\text{mol/l}$ über die Pipettenlösung appliziert. In 32 Versuchen konnte dabei ebenfalls kein Effekt verzeichnet werden. Abbildung 12 B zeigt hierfür einen repräsentativen Versuch, bei dem der Kanal erst vier Minuten nach Herstellen der whole-cell Konfiguration ausgelöst wurde, um eine ausreichende Inkubation des Zellinneren mit Ryanodin zu gewährleisten. Die Einzelkanalamplitude erreichte in dem abgebildeten Zeitraum 30 pA und wich damit nicht von der unter Kontrollbedingungen bestimmten Größe ab. Das Fehlen eines Effektes von Ryanodin auf die Stromamplitude des hier beschriebenen Kanals spricht dagegen, daß es sich bei LCC um RyR Kanäle handelt. Die Präsenz und die Wirksamkeit von Ryanodin im Zytoplasma wurde dabei über die

deutlich reduzierte Kontraktion der Zelle und den nahezu fehlenden Natrium-Calcium-Austauscherstrom auf die Coffeinapplikation hin verifiziert.

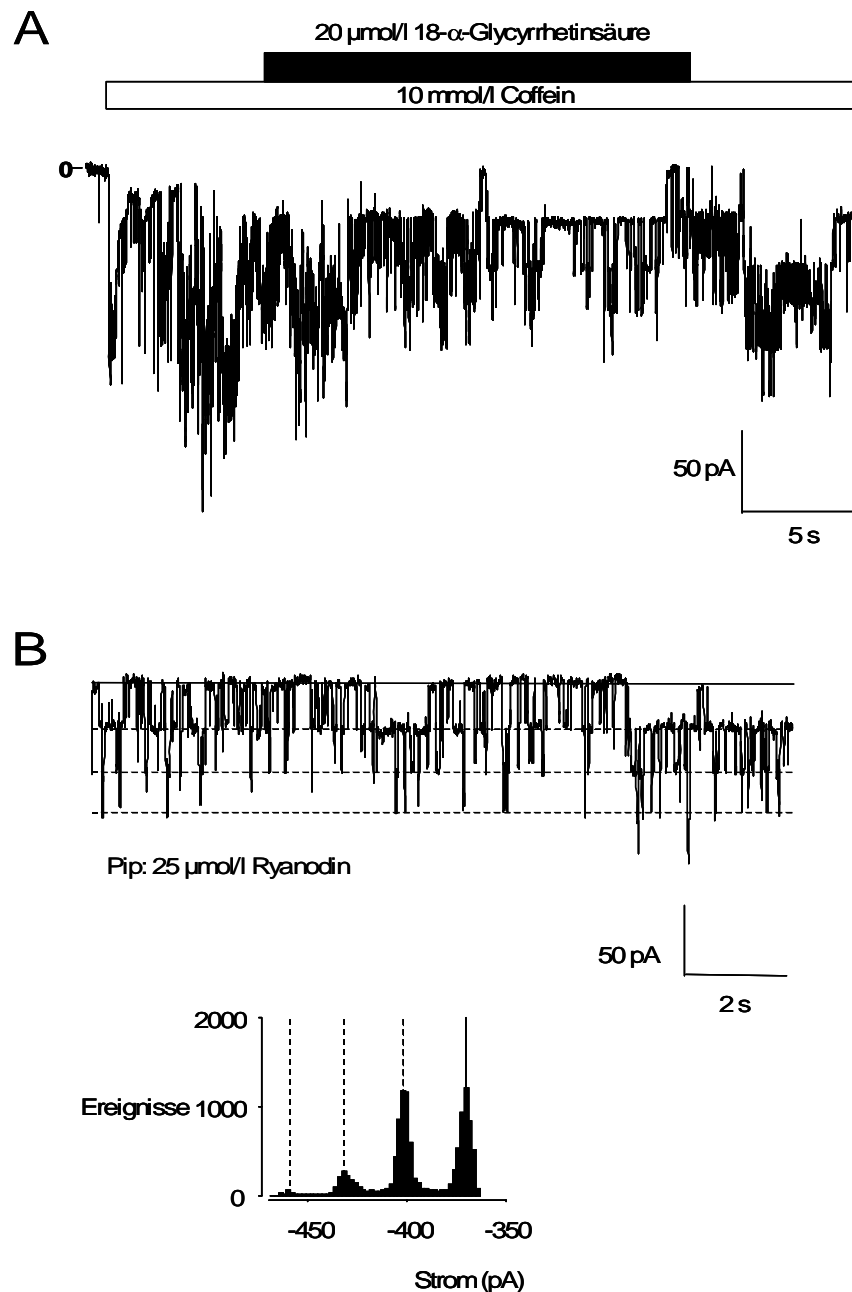


Abbildung 12: **Effekt von 18- α -Glycyrrhetinsäure und Ryanodin**

(A) 20 $\mu\text{mol/l}$ 18- α -Glycyrrhetinsäure, ein Blocker für Gap-Junction Halbkanäle, wurde nach Aktivierung mehrerer LCCs über die Badlösung ($V_{\text{pip}} = -90$ mV, B-01, P-01) appliziert. In insgesamt 11 Versuchen konnte im Vergleich zu den Standardbedingungen weder ein signifikanter Effekt auf die Offenwahrscheinlichkeit noch auf die Stromamplitude festgestellt werden.

(B) stellt Schaltvorgänge des LCCs in der Gegenwart von 25 $\mu\text{mol/l}$ Ryanodin in der Pipettenlösung (B-01, P-01, $V_{\text{pip}} = -90$ mV) dar. Diese Aufzeichnung entstand nach vierminütiger Inkubation mit Ryanodin. Dabei wurde das unten abgebildete Amplitudenhistogramm berechnet. Die einzelnen Amplituden erreichten eine Größe von 30 pA und wichen damit nicht von der Kontrollgruppe ab.

3.5.3. Ruthenium-Rot

Ruthenium-Rot ist sowohl als ein wirksamer Inhibitor von Ryanodin-Rezeptor Kanälen [Rousseau et al., 1987; Sitsapesan et al., 1990; Zucchi et al., 1997] als auch von anderen nichtselektiven Kationenkanälen [Dray et al., 1990] bekannt. Die Arbeitsgruppe um Kondo beschrieb einen LCC in der Kardiomyozytenmembran von Hasen dessen Stromamplituden durch Ruthenium-Rot (1-10 $\mu\text{mol/l}$) deutlich reduziert wurde [Kondo et al., 2000]. In 15 von 16 eigenen Versuchen führte eine Applikation von 10 $\mu\text{mol/l}$ Ruthenium-Rot über die Badlösung zu keiner Veränderung im Schaltverhalten des Kanals. Lediglich in einem Versuch konnte ein Wechsel auf einen Zustand verringerter Leitfähigkeit beobachtet werden.

3.5.4. FK506

Ryanodin-Rezeptor Kanäle bilden im Herzen Komplexe mit dem „FK506 Binding Protein“ FKBP12.6 [Marks, 2000; Eisner et al., 2000; Marx et al., 2000]. Diese Einheiten ermöglichen das gekoppelte Schaltverhalten von Ryanodin Kanälen. Eine Dissoziation von FKBP12.6 von den RyR Kanälen führt zu einer Destabilisierung des Kanalkomplexes und damit zu einer Reduktion der einzelnen Stromamplituden. FK506 erhöht die Rate der Dissoziation deutlich [Xiao et al., 1997]. In Versuchen, in denen 15 $\mu\text{mol/l}$ ($n = 3$), 50 $\mu\text{mol/l}$ ($n = 5$) oder 100 $\mu\text{mol/l}$ ($n = 5$) FK506 nach der Aktivierung des Kanals durch Coffein über die Badlösung appliziert wurde, konnte über einen Beobachtungszeitraum von bis zu 15 Minuten keine Veränderung des Schaltverhaltens, insbesondere der Größe der Stromamplituden, beobachtet werden. Wurden die Zellen vor der Gabe von Coffein bis zu drei Minuten mit 15 $\mu\text{mol/l}$ FK506 inkubiert, konnte der Kanal in neun von 12 Fällen mit normalen Stromamplituden ausgelöst werden.

Für sich genommen kann die ausbleibende Wirkung von FK506 dadurch erklärt werden, daß es sich bei dem Kanal zwar um den RyR Kanal handelt, jedoch FKBP12.6 nicht an diesem gebunden ist und dementsprechend nicht abdissoziieren kann. Es wäre ebenfalls möglich, daß FKBP12.6 aus unbekanntem Gründen nicht abdissoziiert oder es sich gar nicht um einen RyR Kanal handelt. Vor dem Hintergrund der bereits

beschriebenen Versuchsergebnisse für Ruthenium-Rot und Ryanodin hingegen machen die Negativbefunde für FK506 jedoch eine Verwandtschaft des Kanals mit den RyR Kanälen eher unwahrscheinlich.

3.5.5. *Lanthan, Gadolinium*

Sowohl für La^{3+} als auch für Gd^{3+} ist eine dosisabhängige Hemmung der Kanaloffenwahrscheinlichkeit von dehnungsaktivierten Kanälen [Yang et al., 1989; Hu et al., 1997], von Gap-Junction Halbkanälen [Eskandari et al., 2002], von Polycystin Kanälen [Chen et al., 1999; Gonzalez-Perrett et al., 2000; Hanaoka et al., 2000] und von TRP Kanälen [Kunze et al., 1997; Ohki et al., 2000] beschrieben worden. Dabei hemmten bereits Dosen im mikromolaren Bereich dehnungsaktivierte Kanäle und Gap-Junction Halbkanäle, allerdings erst Dosen im millimolaren Bereich TRP Kanäle. Die verwendeten Dosen für eine effiziente Hemmung der Polycystin Kanäle durch La^{3+} und Gd^{3+} lagen zwischen 0,1 mmol/l [Chen et al., 1999] und 0,5 mmol/l [Hanaoka et al., 2000].

In einer Konzentration von 0,1 mmol/l konnte weder für La^{3+} noch für Gd^{3+} ein signifikanter Effekt auf die Offenwahrscheinlichkeit oder die Leitfähigkeit nachgewiesen werden ($n = 10$ bei La^{3+} ; $n = 4$ bei Gd^{3+}). In einer Konzentration von 1 mmol/l hingegen reduzierten beide Substanzen irreversibel die NP_O auf 0 ($n = 6$ bzw. $n = 8$).

3.5.6. *Nickel*

Für Ni^{2+} ist bekannt, daß es in verschiedenen Konzentrationen Calciumkanäle [Martínez et al., 1999; Cribbs et al., 2001], epitheliale Natriumkanäle [Sheng et al., 2004], Kaliumkanäle [Perchenet et al., 2001] und darüber hinaus den Na^+ - Ca^{2+} -Austauscher [Callewaert et al., 1989] blockiert.

In den vorliegenden Versuchen reduzierte Ni^{2+} in einer Konzentration von 5 mmol/l in der Badlösung die Offenwahrscheinlichkeit des hier untersuchten Kanals um $73 \pm 9\%$ ($n = 12$). In Abbildung 13 ist exemplarisch ein solcher Versuch dargestellt. Nach Aktivierung des Kanals wurden 5 mmol/l Ni^{2+} in die Badlösung gegeben und etwa

40 Sekunden später ausgewaschen. Ni^{2+} führte dabei zu einer Reduktion der NP_O von 0,6 auf 0,07 (Reduktion um 88,3 %). Nach Auswaschen von Ni^{2+} stieg die NP_O erneut auf 0,3 an.

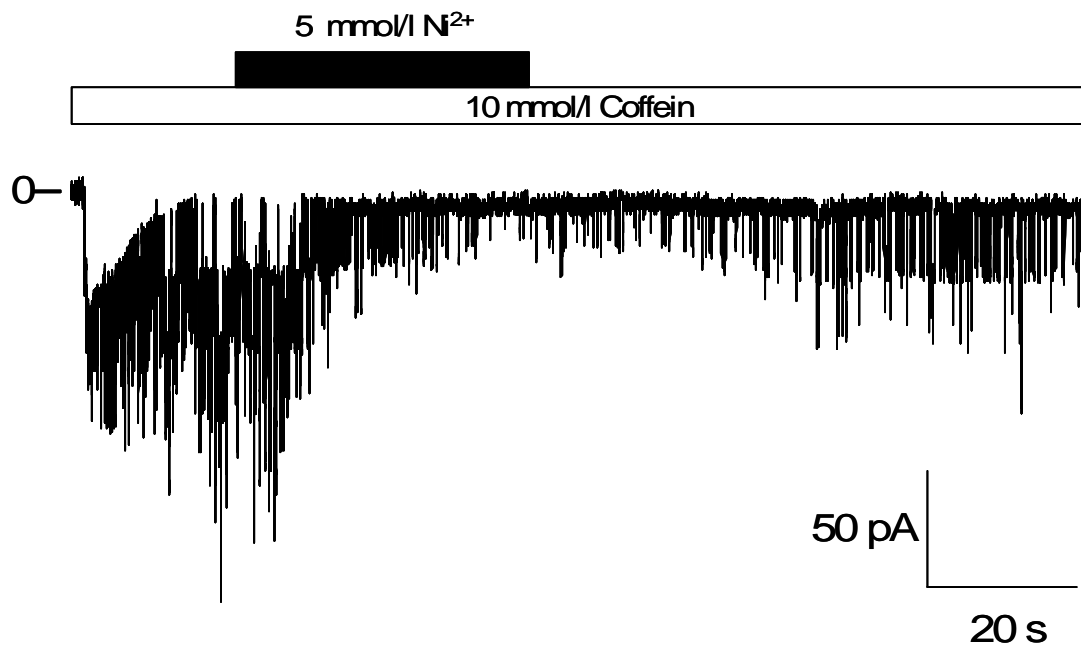


Abbildung 13: **Effekt von Nickel**

Etwa 20 Sekunden nach Auslösung des LCCs wurde Ni^{2+} in einer Konzentration von 5 mmol/l über die Badlösung (B-01) appliziert. Die Pipettenlösung enthielt CsCl (P-01), die Haltespannung lag bei $V_{\text{pip}} = -90$ mV. Bei insgesamt 12 Versuchen bewirkte die Applikation von 5 mmol/l Ni^{2+} eine Reduktion der Offenwahrscheinlichkeit um 73 ± 9 %.

3.5.7. Flufenaminsäure

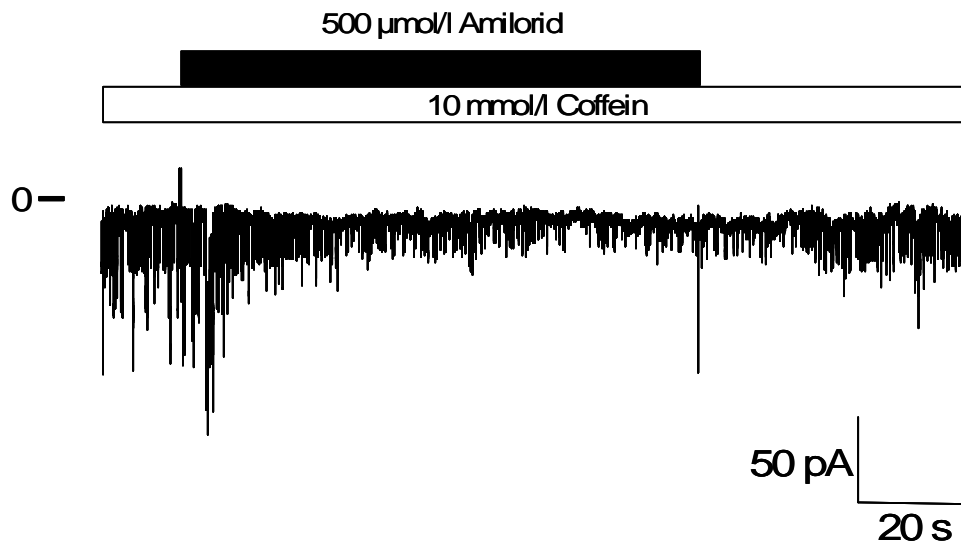
Das nichtsteroidale Antiphlogistikum Flufenaminsäure verändert in einer Konzentration von 50-100 $\mu\text{mol/l}$ die Aktivität von verschiedenen Kanälen. So ist eine aktivierende Wirkung auf TRPC6, aber eine inhibierende auf TRPC3, TRPC7 und auf Gap-Junction Kanäle beschrieben worden [Tsfai et al., 2001; Inoue et al., 2001; Eskandari et al., 2002; Lee et al., 2003; Bengtson et al., 2004].

Untersucht wurde hier die Wirkung von 100 $\mu\text{mol/l}$ Flufenaminsäure in der Badlösung. In sieben Versuchen konnte keine Veränderung der Kanalaktivität und der Einzelkanalamplitude nachgewiesen werden.

3.5.8. Amilorid

Für das Diuretikum Amilorid konnte gezeigt werden, daß es neben epithelialen Natriumkanälen [Canessa et al., 1993; Korbmacher et al., 1995] auch durch Polycystine geformte Kanäle [Gonzalez-Perrett et al., 2000; Delmas et al., 2004a] hemmt. In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von Amilorid in der Badlösung bei verschiedenen Konzentrationen untersucht. 50 $\mu\text{mol/l}$ reduzierte die NP_O im Vergleich zu den Standardbedingungen auf $84,12 \pm 5,3 \%$ ($n = 4$), 100 $\mu\text{mol/l}$ auf $64,0 \pm 18,4 \%$ ($n = 4$) und 500 $\mu\text{mol/l}$ auf $3,26 \pm 3,17 \%$ ($n = 4$). Die Einzelkanalleitfähigkeit blieb bei allen Versuchen unverändert. Abbildung 14 A zeigt stellvertretend die Reduktion des NP_O um 72 % durch die Applikation von 500 $\mu\text{mol/l}$ Amilorid. Nach Auswaschen der Substanz stieg die NP_O nahezu wieder auf den Ausgangswert an. Die Dosis-Wirkungs-Beziehung ließ sich gut mit Hilfe einer Hill-Gleichung beschreiben und zeigt eine halbmaximale Hemmdosis von 134 $\mu\text{mol/l}$ (Abbildung 14 B). Diese Dosis paßt zu der von Gonzalez-Perret et al. für PC2 Kanäle beschriebenen IC_{50} von etwa 80 $\mu\text{mol/l}$ [Gonzalez-Perrett et al., 2000].

A



B

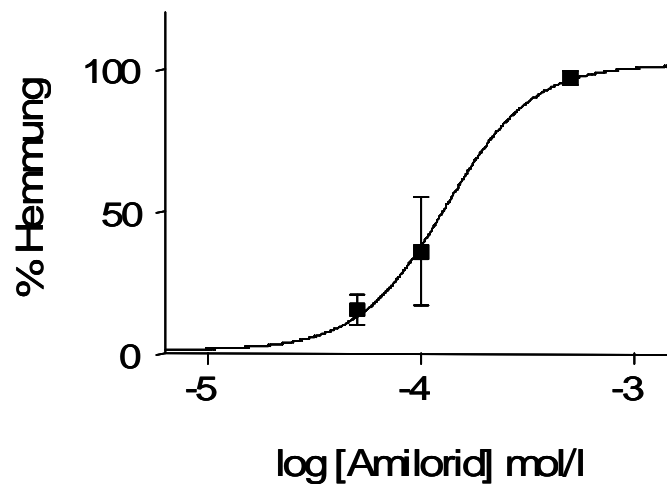


Abbildung 14: Effekt von Amilorid

(A) 20 Sekunden nach Aktivierung des LCCs wurde 500 µmol/l Amilorid über die *Standard-Badlösung* appliziert und nach etwa 80 Sekunden wieder ausgewaschen (B-01, P-01, $V_{\text{pip}} = -90$ mV). Die Offenwahrscheinlichkeit sank durch Amilorid um 72 % und erreichte am Ende des Versuches nahezu den Ausgangswert.

(B) stellt die Dosis-Wirkungs-Beziehung für Amilorid dar. Die Versuchsergebnisse lassen sich gut durch eine Hill-Kurve beschreiben, die halbmaximale Hemmdosis liegt bei 134 µmol/l.

3.5.9. Zusammenfassung der pharmakologischen Ergebnisse

Substanz	Bekannt als Modulator von	Applikation über	Konzentration	Beobachtung
18- α -Glycyrrhetinsäure	Gap-Junction Halbkanäle	Badlösung	20 $\mu\text{mol/l}$	Kein Effekt
Ryanodin	RyR Kanäle, LCC	Badlösung	10 $\mu\text{mol/l}$	Kein Effekt
		Pipettenlösung	25 $\mu\text{mol/l}$	Kein Effekt
Ruthenium-Rot	RyR Kanäle, nichtselektive Kationenkanäle, LCC	Badlösung	10 $\mu\text{mol/l}$	Kein Effekt
FK506	RyR Kanäle	Badlösung	15 $\mu\text{mol/l}$ 100 $\mu\text{mol/l}$	Kein Effekt
La^{3+} , Gd^{3+}	Dehnungsaktivierte Kanäle, Gap-Junction Halbkanäle, Polycystin Kanäle, TRP Kanäle, Nichtselektive Kationenkanäle	Badlösung	0,1 mmol/l	Kein Effekt
			1 mmol/l	Irreversible Hemmung
Ni^{2+}	Epitheliale Natriumkanäle, Na^+ - Ca^{2+} -Austauscher, Calciumkanäle, Kaliumkanäle	Badlösung	5 mmol/l	Reversible Hemmung
Flufenaminsäure	Gap-Junction Halbkanäle, TRP Kanäle, Nichtselektive Kationenkanäle	Badlösung	100 $\mu\text{mol/l}$	Kein Effekt
Amilorid	Epitheliale Natriumkanäle, Polycystin Kanäle	Badlösung	50 $\mu\text{mol/l}$ 100 $\mu\text{mol/l}$ 500 $\mu\text{mol/l}$	Reversible Hemmung ($\text{IC}_{50} = 134 \mu\text{mol/l}$)

Tabelle 6: Ergebnisse der pharmakologischen Experimente

Diese Tabelle faßt die in dieser Arbeit untersuchten Pharmaka zusammen. Aufgeführt sind für die jeweilig getestete Substanz die Kanäle, für die eine Modulation durch diese bekannt sind, der gewählte Applikationsweg, die verwendete Konzentration und schließlich die beobachteten Auswirkungen auf den LCC.

3.6. Auswirkungen einer Aktivierung des LCCs auf das Membranpotential

Die Auswirkungen einer Aktivierung eines Kanals dieser Leitfähigkeit auf das Membranpotential von Herzmuskelzellen wurden in der Stromklemme untersucht. Dazu wurde eine Kardiomyozyte zuerst auf einem Membranstromfluß von 0 pA gehalten, wodurch die Zelle ihr Ruhemembranpotential einstellte, und dann die Aktivierung einzelner Kanäle großer Leitfähigkeit simuliert. Der Stromfluß über die Zellmembran wurde hierfür in Schritten von 30 pA, der typischen Stromamplitude bei Ruhemembranpotential und Raumtemperatur, alle 500 ms erhöht. In Abbildung 15 ist unten das verwendete Versuchsprotokoll und oben der hierdurch hervorgerufene Verlauf des Membranpotentials dargestellt. Es zeigte sich bei diesem repräsentativen Versuch, daß nach der dritten Erhöhung des injizierten Stromes der Grenzwert für ein Aktionspotential überschritten wurde. In insgesamt 10 untersuchten Zellen lag diese Schwelle im Mittel bei 96 ± 14 pA; bei 37 °C lag sie im Mittel bei 158 ± 14 pA ($n = 4$).

Sowohl bei Raum- als auch bei Körpertemperatur kann demnach ausgehend vom Ruhemembranpotential die zeitnahe Aktivierung von nur drei bis vier Kanälen eine einzelne Kardiomyozyte soweit depolarisieren, daß ein Aktionspotential ausgelöst wird.

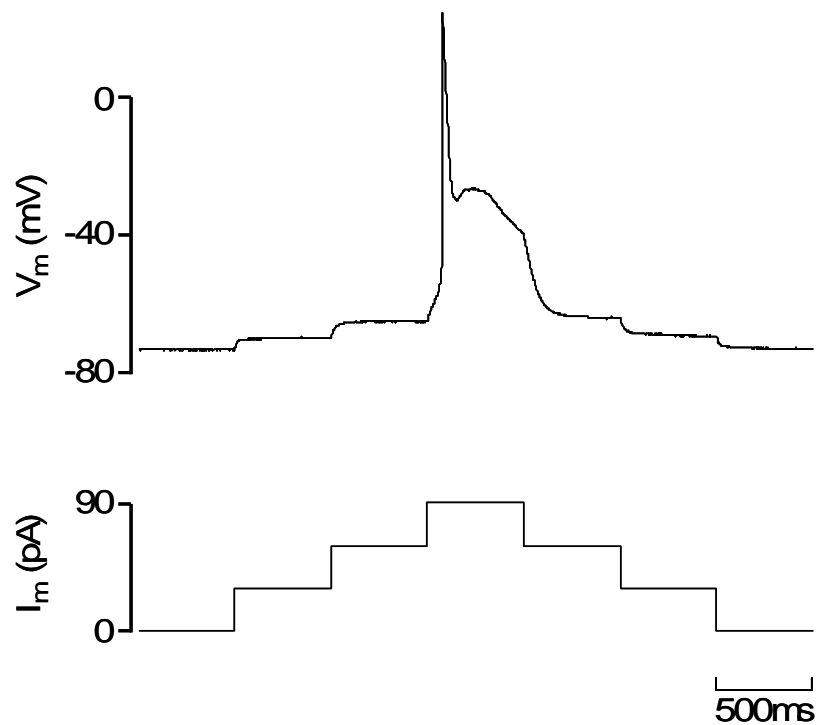


Abbildung 15: **Auswirkungen auf das Membranpotential**

Mithilfe der Stromklemme wurde der Strom, der über die Zellmembran einer Kardiomyozyte fließt, in Schritten von 30 pA (ausgehend von 0 pA) erhöht. Bei einem Einwärtsstrom von 90 pA wurde die Schwelle für die Auslösung eines Aktionspotentials überschritten. Unten ist das verwendete Stromprotokoll für die Stromklemme, darüber das aufgezeichnete Membranpotential dargestellt.

4. DISKUSSION

4.1. Expression von Polycystinen in ventrikulären Kardiomyozyten der Ratte

Für PKD1 [Ong et al., 1999a], PKD2 [Markowitz et al., 1999], PKDL [Nomura et al., 1998] und PKD2L2 [Guo et al., 2000] konnte bereits eine Expression der zugehörigen Proteine im Herzen von Maus und Mensch nachgewiesen werden. Fraglich blieb dabei jedoch, ob diese Expression in den Kardiomyozyten oder aber in dem umgebenden Gewebe wie beispielsweise Nervenzellen, Gefäßen oder Bindegewebe stattfindet. So beschrieben Basora et al. in einer aktuellen Arbeit die Expression von PKDL-mRNA im Epikard und in ventrikulären Blutgefäßen, nicht jedoch in einzelnen Kardiomyozyten bei Mäusen [Basora et al., 2002].

In der vorliegenden Arbeit konnte die mRNA aller vier *PKD* Gene im linken Ventrikel der Ratte detektiert werden. Darüber hinaus gelang mittels Einzelzell-RT-PCR, einer Technik, bei der unter optischer Kontrolle einzelne Kardiomyozyten eingesaugt und einer RT-PCR zugeführt werden, der Nachweis von PKD2- und PKD2L2-mRNA in Kardiomyozyten direkt. PKD1- und PKDL-mRNA konnte hingegen in einzelnen Herzmuskelzellen nicht nachgewiesen werden. Um auszuschließen, daß dies an einer zu geringen mRNA Menge bzw. an einer zu geringen Sensitivität der Methode lag, wurde die RT-PCR nicht nur auf einzelne, sondern auch auf eine Gruppe von bis zu zehn Myozyten angewandt. Da auch hierbei kein Nachweis gelang, muß davon ausgegangen werden, daß PKD2 und PKD2L2 tatsächlich in Kardiomyozyten, PKD1 und PKDL hingegen im Nicht-Muskelgewebe des Herzen exprimiert werden. Wie beispielsweise von Dixon et al. [Dixon et al., 1994] und Martina et al. [Martina et al., 1998] gezeigt werden konnte, besteht eine Korrelation zwischen dem Nachweis von Kanal kodierender mRNA mittels Einzelzell-RT-PCR und dem Vorhandensein funktioneller Ionenkanäle. Somit ist es sehr wahrscheinlich, daß PC2 und PC2L2 in ventrikulären Kardiomyozyten vorliegen.

Auf Proteinebene gelang bisher der Nachweis von PC2 im Herzen von menschlichen Embryonen [Ong et al., 1999b], während er im Herzen von Ratten [Obermüller et al., 1999] mißlang. Ob in letzterer Arbeit methodische Probleme einen Nachweis verhinderten oder die Proteine tatsächlich nicht in dem untersuchten Gewebe vorlagen, blieb offen. Über die intrazelluläre Lokalisation von PC2 und dessen

Transport in die Zellmembran liegen widersprüchliche Angaben vor. So wiesen zahlreiche Publikationen PC2 primär in der Membran des endoplasmatischen Retikulums nach [Cai et al., 1999; Obermüller et al., 1999; Vassilev et al., 2001; Koulen et al., 2002]. Passend dazu waren bei Expressionsversuchen Kationenkanäle großer Leitfähigkeit in der Zellmembran nur dann zu finden, wenn PC1 zusammen mit PC2 exprimiert wurde [Hanaoka et al., 2000] oder wenn Transportmechanismen zur Zellmembran aktiviert wurden [Vassilev et al., 2001]. In anderen Arbeiten war jedoch die Expression von PCL [Chen et al., 1999] beziehungsweise von PC2 [Gonzalez-Perrett et al., 2000] alleine ausreichend, um funktionelle Kanäle in der Zellmembran zu bilden.

Zusammengenommen zeigen diese Arbeiten, daß PC2 Kanäle bildet, die vermutlich primär im endoplasmatischen Retikulum vorkommen, jedoch in die Zellmembran transportiert werden können. Ob hierzu in allen Zellen PC1 notwendig ist oder ob auch andere Mechanismen diesen Translokationsprozeß fördern können, bleibt vorerst offen.

In der vorgelegten Arbeit gelang in Übereinstimmung mit der vorgestellten Literatur der Nachweis von mRNA aller vier *PKD* Gene in der gesamten RNA, die aus dem linken Ventrikel der Ratte isoliert wurde. Darüber hinaus konnte erstmalig die Expression von PKD2- und PKD2L2-mRNA in einzelnen Kardiomyozyten nachgewiesen werden. Folglich ist es wahrscheinlich, daß PC2 und PC2L2 in Herzmuskelzellen vorliegen und somit vorstellbar, daß diese in der Zellmembran Kanäle bilden.

4.2. Existenz eines Kanals großer Leitfähigkeit in Kardiomyozyten der Ratte

In der vorliegenden Arbeit konnte ein LCC in der Zellmembran isolierter Kardiomyozyten der freien Wand des linken Ventrikels der Ratte identifiziert werden. Dies steht im Einklang mit den in der Einleitung vorgestellten Arbeiten, die einen LCC in atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten anderer Tierspezies (Meerschweinchen bzw. Kaninchen) demonstrierten [Pott et al., 1990; Pancrazio et al., 1994; Kondo et al., 2000]

Bei 56 % der hier untersuchten Zellen gelang mittels verschiedener Methoden die Aktivierung des LCCs. In der überwiegenden Mehrzahl der Fälle (35 %) wurde die Aktivierung eines einzigen Kanals beobachtet, bei etwa 21 % aller Zellen von mehr als einem Kanal gleichzeitig (vgl. Abbildung 3, S. 41). Dabei lag die höchste Anzahl in einer Zelle dokumentierter Kanäle bei sechs, was sich insgesamt ebenfalls gut mit den Arbeiten von Pott et al. und Kondo et al. deckt, die jeweils maximal vier bis fünf Kanäle beobachteten [Pott et al., 1990; Kondo et al., 2000].

Im folgenden sollen die wichtigsten biophysikalischen Eigenschaften des hier gefundenen LCCs zusammengefaßt und diskutiert werden. Auf die Ergebnisse der pharmakologischen Untersuchungen wird im Rahmen von Kapitel 4.3 näher eingegangen.

4.2.1. Biophysikalische Eigenschaften

4.2.1.1. Leitfähigkeit

In Versuchen, in denen der Kanal über einen längeren Zeitraum aktiv war, gelang unter Standardbedingungen (*Standard-Pipettenlösung* und *Standard-Badlösung*) die Darstellung einzelner Schaltvorgänge bei verschiedenen negativen Membranpotentialen. Dabei ließ sich ein lineares Schaltverhalten mit einem errechneten Umkehrpotential von etwa 0 mV und einer errechneten Leitfähigkeit von 274 pS beobachten (vgl. Abbildung 4, S. 43). Wurde zytosolisches Ca^{2+} gepuffert, um eine Kontraktion zu verhindern, konnten darüber hinaus auch Schaltvorgänge bei positiven

Membranpotentialen dokumentiert werden. Die mittlere Leitfähigkeit betrug in diesen Fällen ca. 300 pS (vgl. Abbildung 5, S. 45).

Diese Leitfähigkeit stimmt sowohl sehr gut mit den für Polycystin Kanäle (40-530 pS) [Gonzalez-Perrett et al., 2000; Vassilev et al., 2001; Liu et al., 2002] als auch mit den für nichtselektive Kationenkanäle im Herzen (280-400 pS) [Pott et al., 1990; Pancrazio et al., 1994; Kondo et al., 2000] veröffentlichten Leitfähigkeiten überein. Auch für TRPC Kanäle (25-110 pS) [Kunze et al., 1997; Petersen, 2002; Huang, 2004] und mechanosensitive Kanäle (10-200 pS) [Hu et al., 1997; Hamill et al., 2001] finden sich in der Literatur Leitfähigkeiten in vergleichbarer Größenordnung.

Neben der hier am häufigsten beobachteten Leitfähigkeit von etwa 300 pS traten auch Zustände reduzierter Leitfähigkeit auf. Bei einem Haltepotential von $V_{\text{pip}} = -90$ mV wurde in der Regel eine Stromamplitude von etwa 28 pA beobachtet. Daneben kamen regelmäßig – wie beispielhaft in Abbildung 5 B dargestellt – Schaltvorgänge mit $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$ oder $\frac{3}{4}$ dieser Amplitude vor (7, 14 oder 21 pA). Da solche verringerten Stromamplituden nicht für alle Membranpotentialbereiche dokumentiert werden konnten, konnte die Leitfähigkeit für diese Subzustände nicht genau berechnet werden. Allerdings kann eine Leitfähigkeit von etwa 70, 150 bzw. 210 pS abgeschätzt werden.

Zustände verringerter Leitfähigkeiten wurden auch von anderen Autoren für Polycystin Kanäle [Gonzalez-Perrett et al., 2000] und nichtselektive Kationenkanäle am Herzen dokumentiert. Pott et al. beschrieben beispielsweise für LCC am Herzen das regelmäßige Auftreten von Schaltvorgängen mit 50 % und das gelegentliche Auftreten von Schaltvorgängen mit 25 % der üblichen Leitfähigkeit [Pott et al., 1990]. Kondo et al. beobachteten bei dem Kanal, den sie als einen RyR Kanal identifizierten, daß Ryanodin ihn langfristig in einen Zustand reduzierter Leitfähigkeit (50 % der Ausgangsleitfähigkeit) schaltete [Kondo et al., 2000]. Für TRP und mechanosensitive Kanäle sind solche Zustände verringerter Leitfähigkeit hingegen nicht regelmäßig beschrieben worden.

4.2.1.2. *Temperatur und extrazelluläre Azidifikation*

In der Regel wurden die Versuche bei einer Temperatur von 22 °C durchgeführt. In einigen Versuchen wurde die Umgebungstemperatur ungefähr auf Körpertemperatur (37 °C) erhöht und die Kanalampplituden bestimmt. Bei 37 °C lagen die einzelnen Stromampplituden um den Faktor 1,6 über denen bei Raumtemperatur, woraus sich ein Q_{10} von etwa 1,3 berechnen läßt. Dieser Wert ist in der Literatur für nichtselektive Kationenkanäle beschrieben [Siemen, 1993], während sich weder für Polycystin Kanäle noch für die nichtselektiven LCCs am Herzen diesbezüglich Angaben finden. Versuche zu den beiden zuletzt genannten Kanalfamilien wurden in der vergleichbaren Literatur bei Raumtemperatur durchgeführt [Pott et al., 1990; Pancrazio et al., 1994; Chen et al., 1999; Gonzalez-Perrett et al., 2000; Kondo et al., 2000; Vassilev et al., 2001].

Eine Abhängigkeit der Leitfähigkeit oder der Offenwahrscheinlichkeit vom extrazellulären pH-Wert konnte in den hier durchgeführten Experimenten nicht belegt werden. Eine Erniedrigung des pH-Wertes der Badlösung von 7,3 auf 6,0 führte zu keiner Veränderung der Offenwahrscheinlichkeit oder der Stromampplituden. Weder für Polycystin Kanäle noch für die aufgeführten LCCs am Herzen konnte in der Literatur eine Abhängigkeit der Kanalfunktion von dem extrazellulären pH-Wert gefunden werden. Allerdings wurde gezeigt, daß eine Erhöhung des intrazellulären pH-Werts PC2 aktivieren, eine Erniedrigung ihn hingegen hemmen kann [Gonzalez-Perrett et al., 2002]. Eine Veränderung der einzelnen Stromampplituden konnte Gonzalez-Perrett ebenfalls nicht beobachten.

4.2.1.3. *Ionenselektivität*

Experimente zur Prüfung der Permeabilität zeigten, daß der hier beschriebene LCC permeabel für die monovalenten Kationen Na^+ , K^+ , Li^+ und Cs^+ und für die divalenten Kationen Ba^{2+} und Ca^{2+} , nicht jedoch für Cl^- und Mg^{2+} ist. Bei den monovalenten Kationen besteht dabei eine leichte Selektivität für Na^+ und K^+ gegenüber Cs^+ und Li^+ (vgl. Abbildung 8, S. 51). Vergleichbare Arbeiten über Polycystin Kanäle beschrieben ebenfalls eine Permeabilität für mono- und divalente Kationen. Unter den monovalenten Kationen bestand dabei keine Selektivität, allerdings für divalente

Kationen wie Ca^{2+} und Ba^{2+} gegenüber monovalenten Kationen [Chen et al., 1999; Gonzalez-Perrett et al., 2000; Vassilev et al., 2001]. Auch für die am Herzen beobachteten LCC wurde eine nichtselektive Permeabilität für monovalente und divalente Kationen beschrieben [Pott et al., 1990; Kondo et al., 2000]. TRP und SAC Kanäle sind allgemein ebenfalls nichtselektiv für Kationen permeabel, wobei für einige Isoformen unterschiedliche Permeabilitäten für divalente Kationen – besonders für Ca^{2+} – beschrieben wurden [Hu et al., 1997; Huang, 2004].

Der hier vorgestellte LCC ist nichtselektiv permeabel für Kationen und impermeabel für Anionen, eine Eigenschaft, die für die meisten vergleichbaren Kanäle in der Literatur beschrieben wurde. Bemerkenswert ist jedoch seine Permeabilität für Calciumionen, da dies auf eine mögliche Beeinflussung der Regulation der zytosolischen Calciumkonzentration hinweist. Hierauf soll im Rahmen von Kapitel 4.4 näher eingegangen werden.

4.2.1.4. *Mechanismen der Aktivierung*

Der beschriebene LCC wurde standardmäßig aktiviert, indem die untersuchte Zelle mit einer 10 mmol/l Coffein enthaltenden Badlösung überspült wurde. Wie in Kapitel 2.6 ausgeführt, führt eine solche Superfusion zu einer vollständigen und schlagartigen Freisetzung von Ca^{2+} aus dem sarkoplasmatischen Retikulum und einer dadurch initiierten Kontraktion der Zelle (siehe auch [Rousseau et al., 1989]). Die maximale zytosolische Calciumkonzentration erreicht dabei etwa 1 $\mu\text{mol/l}$ und wird über verschiedene Mechanismen, von denen in Gegenwart von Coffein der Na^+ - Ca^{2+} -Austauscher den größten Stellenwert einnimmt, effektiv auf das Ruhenniveau (100 nmol/l) abgesenkt [Callewaert et al., 1989]. Wurde in einer untersuchten Zelle ein LCC beobachtet, so aktivierte dieser direkt nach der Gabe von Coffein und damit dem Beginn der Ca^{2+} Freisetzung aus dem SR und der Kontraktion der Zelle. In den meisten Fällen bestand auch nach Abklingen von $I_{\text{Na/Ca}}$ – und damit der Rückkehr von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ auf den Ausgangswert – eine Spontanaktivität in Gegenwart von Coffein. Die hohe zeitliche Korrelation während der Aktivierung legt die Vermutung nahe, daß entweder der Anstieg von $[\text{Ca}^{2+}]_i$, Coffein selber, die Kontraktion der Zelle oder eine Kombination dieser Faktoren den Kanal aktivieren kann.

4.2.1.4.1. Calcium

Die wohl wichtigste Rolle bei der Aktivierung des LCCs spielt die zytosolische Calciumkonzentration. Dafür sprechen einerseits die Aktivierung des Kanals direkt zum Zeitpunkt der höchsten zytosolischen Calciumkonzentration sowie die nachlassende Offenwahrscheinlichkeit mit Absinken von $[Ca^{2+}]_i$ und andererseits die Ergebnisse der Versuche, in denen auf die intra- oder extrazelluläre Calciumkonzentration Einfluß genommen wurde.

So wurden in einigen Experimenten freie Calciumionen durch EGTA in der Pipettenlösung gebunden, um einen Anstieg von $[Ca^{2+}]_i$ durch die coffeininduzierte Freisetzung von Ca^{2+} aus dem SR zu verhindern. In der verwendeten Konzentration von 10 mmol/l EGTA wird dabei $[Ca^{2+}]_i$ von $\sim 2 \times 10^{-9}$ mol/l auf $\sim 2 \times 10^{-11}$ mol/l gesenkt [Patton et al., 2004]. Eine solche Pufferlösung in der Pipette verhinderte die Kontraktion der Zelle auf Applikation von Coffein; dies wiederum zeigt, daß Calciumionen im Zellinneren tatsächlich fast vollständig gebunden werden. Nur in wenigen Versuchen konnte eine schwache Kontraktion der Zelle beobachtet werden, die vermutlich durch Coffein selber bewirkt wird [O'Neill et al., 1990]. Bei einer solchen Pufferung zytosolischer Calciumionen lag die Offenwahrscheinlichkeit um den Faktor 30 unter der bei ungepufferten Bedingungen. Im Gegenzug dazu bewirkte eine Erhöhung der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration eine deutliche Steigerung der Offenwahrscheinlichkeit um den Faktor 17,5. Dies könnte einerseits direkt von der erhöhten $[Ca^{2+}]_a$ bewirkt werden. Andererseits ist auch denkbar, daß eine Erhöhung von $[Ca^{2+}]_a$ und damit eine Erhöhung des transmembranösen Calciumgradienten einen verstärkten Ca^{2+} -Einstrom über Calciumkanäle (wie beispielsweise den beschriebenen Kanal selber) verursacht und $[Ca^{2+}]_i$ dadurch dauerhaft erhöht wird. Im letzteren Szenario würde die extrazelluläre Calciumkonzentration im Endeffekt über einen Anstieg der zytosolischen einen aktivierenden Einfluß ausüben.

Insgesamt stimmen diese Beobachtungen gut mit den Arbeiten von Pancrazio und Pott überein, die beide die Aktivierung des von ihnen beschriebenen LCCs bei ansteigendem $[Ca^{2+}]_i$ darlegten [Pott et al., 1990; Pancrazio et al., 1994]. Darüber hinaus haben Pancrazio et al. ebenfalls eine deutlich verringerte Offenwahrscheinlichkeit des Kanals bei reduziertem $[Ca^{2+}]_i$ durch potente zytosolische Calciumpufferung oder durch

Vorbehandlung der Zellen mit Ryanodin zur Begrenzung des SR-Calciumgehalts dokumentiert [Pancrazio et al., 1994]. Auch Kondo et al. fanden eine deutliche Abhängigkeit der Offenwahrscheinlichkeit des LCCs von der zytosolischen Calciumkonzentration. So stieg in ihren Versuchen die Offenwahrscheinlichkeit signifikant bei Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$, auch wenn ihnen keine Aktivierung des Kanals durch Ca^{2+} alleine gelang [Kondo et al., 2000].

Für Polycystin Kanäle findet sich in der Literatur übereinstimmend eine Aktivierung durch die Erhöhung der zytosolischen Calciumkonzentration [Delmas et al., 2004b]. In der TRP Superfamilie wurden sowohl calciumaktivierte als auch calciuminhibierte Kanäle beschrieben [Huang, 2004].

In der vorliegenden Arbeit kann allerdings die Regulation der Offenwahrscheinlichkeit des Kanals nicht ausschließlich durch eine Erhöhung der zytosolischen Calciumkonzentration erklärt werden. So konnte der LCC als aktivierter Kanal in der Regel über mehrere Minuten hinweg mit einer konstanten Offenwahrscheinlichkeit beobachtet werden. Dies ist ein Zeitraum, bei dem davon ausgegangen werden muß, daß der zytosolische Calciumtransient aufgrund der Eliminierung von Ca^{2+} über $I_{Na/Ca}$ bereits beendet und $[Ca^{2+}]_i$ auf ihr Ausgangsniveau zurückgekehrt ist. Wurde bei einem solchen Versuch allerdings das Coffein ausgewaschen konnten innerhalb kurzer Zeit keine Schaltvorgänge mehr beobachtet werden. Dies legt zwei Schlußfolgerungen nahe: einerseits ist es denkbar, daß Coffein die Aktivierungsschwelle des Kanals für Ca^{2+} soweit senkt, daß auch die zytosolische Calciumkonzentration in Ruhe ausreicht, den Kanal aktiviert zu halten. Ein Entfernen von Coffein hätte dann eine Abnahme der Aktivität zur Folge. Andererseits kann ein direkter Effekt von Coffein am Kanalprotein selber, der den Prozeß der Aktivitätsabnahme verhindert oder zumindest stark verlangsamt, nicht ausgeschlossen werden.

4.2.1.4.2. *Coffein*

Für eine Beteiligung von Coffein an der Aktivierung des Kanals sprechen Versuche, in denen nach initialer Auslösung des LCCs Coffein wiederholt ein- und ausgewaschen wurde. Dabei sank die Aktivität des beobachteten Kanals mit Entfernen von Coffein und stieg erneut an, sobald Coffein wieder eingewaschen wurde (vgl. Abbildung 10, S. 57). Wurde Coffein langfristig entfernt, inaktivierte der Kanal vollständig. In dieselbe Richtung deuten die Ergebnisse der Versuche, bei denen trotz effektiver Pufferung der zytosolischen Calciumionen durch Coffeingabe der LCC ausgelöst werden konnte. So wurden – wie in Kapitel 4.2.1.4.1 bereits ausgeführt – einige Versuche in Gegenwart einer hochkonzentrierten EGTA-Pipettenlösung (P-03) durchgeführt. Trotz dieser effektiven Senkung der zytosolischen Calciumkonzentration und Verhinderung einer Kontraktion konnte durch die Coffeingabe ein LCC ausgelöst werden (vgl. Abbildung 9, S. 55). Die dabei beobachtete Offenwahrscheinlichkeit lag jedoch um den Faktor 30 unter der bei Kontrollversuchen. Gerade die Tatsache, daß der Kanal großer Leitfähigkeit trotz Pufferung der freien zytosolischen Calciumionen durch Applikation von Coffein aktiviert werden konnte, läßt die Schlußfolgerung zu, daß Coffein den Kanal entweder direkt aktiviert oder dessen Aktivierungsschwelle so weit senkt, daß bereits niedrigere Calciumkonzentrationen eine Aktivierung des Kanals bewirken.

Diese Beobachtungen decken sich mit denen von Kondo et al [Kondo et al., 2000]. Einerseits gelang den Autoren die Aktivierung des LCCs durch photolytische Freisetzung von Ca^{2+} aus Calciumkomplexen nur in Gegenwart von Coffein. Andererseits konnten sie zeigen, daß der Kanal nach Entfernen von Coffein inaktivierte. Sie interpretierten dies so, daß die Kanäle aktiviert werden, sobald eine bestimmte zytosolische Calciumkonzentration überschritten wird. Diese könne jedoch nicht durch die Photolyse allein, sondern nur in Kombination mit der zusätzlichen Freisetzung von Ca^{2+} aus dem SR z.B. mittels Coffein erreicht werden. Darüber hinaus sei für die Aufrechterhaltung der Kanalaktivität die Gegenwart von Coffein erforderlich.

In den weiteren Publikationen über LCCs im Herzen [Pott et al., 1990; Pancrazio et al., 1994] finden sich keine expliziten Aussagen über die direkte Aktivierung des

jeweils beschriebenen Kanals durch Coffein; ebensowenig in der Literatur über Polycystin, TRP oder SAC Kanäle.

Gegen die Bedeutung von Coffein für die Aktivierung des hier vorgestellten Kanals im Sinne einer *conditio sine qua non* sprechen jene Versuche, bei denen eine Aktivierung des LCCs in Abwesenheit von Coffein gelang. Analog zu den von Pott et al. an atrialen Myozyten von Meerschweinchen durchgeführten Versuchen wurde dabei durch Verwendung einer Ca^{2+} -Citrat Pipettenlösung die Inaktivierung der L-Typ Calciumkanäle verlangsamt [Pott et al., 1990]. Dies hat einen erhöhten Calciuminflux und damit auch eine vermehrte Calciumbeladung des sarkoplasmatischen Retikulums auf eine Depolarisation der Zelle hin zur Folge. Durch die erhöhte Calciumbeladung des SR werden bei einer weiteren Depolarisation deutlich mehr Calciumionen freigesetzt als bei einer „normalen“ Beladung. In solchen Versuchen konnte in 30 % der untersuchten Zellen durch depolarisierende Strompulse alleine – und damit in Abwesenheit von Coffein – ein LCC ausgelöst werden (vgl. Abbildung 9, S. 55).

4.2.1.4.3. Kontraktion

Auf den Stellenwert der Kontraktion für die Aktivierung des LCCs kann mittels der hier durchgeführten Versuche nur indirekt geschlossen werden. So ist zu bedenken, daß keine Versuche durchgeführt werden konnten, in denen eine Kontraktion unabhängig von Coffein und einem zytosolischen Calciumgradienten ausgelöst wurde. Hinweise geben jedoch die Experimente, bei denen trotz einer effektiven Verhinderung der Kontraktion durch die Pufferung zytosolischer Calciumionen mittels EGTA der Kanal großer Leitfähigkeit beobachtet wurde. So scheint zwar eine einzig mechanische Aktivierung des LCCs durch eine Kontraktion, wie sie beispielsweise für einige mechanosensitive Kanäle (SACs) bekannt ist [Hu et al., 1997], ausgeschlossen zu sein. Allerdings muß in Betracht gezogen werden, daß die Kontraktion zumindest teilweise einen aktivierenden Einfluß auf den Kanal haben kann. So lag die bestimmte Offenwahrscheinlichkeit des LCCs in diesen Experimenten um den Faktor 30 unter der bei den Kontrollversuchen. Es ist jedoch nicht möglich, kausal zwischen der Reduktion der $[Ca^{2+}]_i$ und der nicht erfolgten Kontraktion zu trennen.

Die Bedeutung der Kontraktion selber für die Aktivierung wurde in den Publikationen über Polycystine, TRP Kanäle und LCCs im Herzen nicht diskutiert und kann auch in der vorliegenden Arbeit nicht abschließend geklärt werden.

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß der hier charakterisierte Kanal durch eine Erhöhung der zytosolischen Calciumkonzentration aktiviert werden kann. Darüber hinaus scheint Coffein über einen weiteren Mechanismus die Aktivierungsschwelle des Kanals für Ca^{2+} zu senken oder den Kanal direkt zu aktivieren. So bewirkte eine Aktivierung des Kanals durch eine coffeininduzierte Calciumfreisetzung eine deutlich höhere Offenwahrscheinlichkeit als eine Aktivierung durch Coffein oder durch eine Erhöhung von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ allein. Letztendlich deutet die Aktivierbarkeit des Kanals durch eine Erhöhung der zytosolischen Calciumkonzentration genauso wie auch seine bereits diskutierte Permeabilität für Ca^{2+} (vgl. Kapitel 4.2.1.2) auf eine Beteiligung des LCCs an der Regulation der zytosolischen Calciumkonzentration hin.

4.2.1.5. *Modulation der Kanaleigenschaften durch divalente Kationen*

Für den hier vorgestellten Kanal konnte gezeigt werden, daß eine Erhöhung der extrazellulären Konzentration von Mg^{2+} und Ca^{2+} (von 1 auf 10 mmol/l) bzw. von Ba^{2+} (von 0 auf 10 mmol/l) zu einer signifikanten Reduzierung der Leitfähigkeit um $\frac{1}{3}$ führte (vgl. Abbildung 11, S. 59). Dieser Effekt ist für Polycystin Kanäle beschrieben worden [Chen et al., 1999; Hanaoka et al., 2000], während für die SACs und LCCs am Herzen keine Hinweise für eine solche Beeinflussung vorliegen [Pott et al., 1990; Pancrazio et al., 1994; Hu et al., 1997; Kondo et al., 2000].

4.3. Beziehung des LCCs zu anderen nichtselektiven Kationenkanälen im Herzen

Vor dem Hintergrund der bereits diskutierten Eigenschaften des hier vorgestellten calciumaktivierten LCC soll nun eine mögliche Zuordnung zu bereits bekannten Gruppen untersucht werden. Nachfolgend werden dazu die Kanalfamilien, die aufgrund ähnlicher biophysikalischer Eigenschaften in Frage kommen (vgl. Kapitel 1.4), mit ihren entscheidenden Charakteristika kurz vorgestellt und mit den gewonnenen Versuchsergebnissen verglichen.

4.3.1. Calciumaktivierte nichtselektive Kationenkanäle (CAN) im Herzen

In enzymatisch isolierten Kardiomyozyten verschiedener Spezies wurden in den letzten Jahrzehnten eine Reihe von calciumaktivierten nichtselektiven Kationenkanälen („Calcium Activated Nonselective Cation Channels“; CAN) beschrieben [Colquhoun et al., 1981; Ehara et al., 1988; Zhainazarov, 2003]. Trotz ihrer weiten Verbreitung sind deren molekulare Identität, ihre Eigenschaften und nicht zuletzt auch ihre Funktionen weitgehend ungeklärt. Vor kurzem wurde vorgeschlagen, daß einige CAN Kanäle zu der Superfamilie der „Transienten Rezeptor Potential Kanälen“ („Transient Receptor Potential“, TRP) gehören [Petersen, 2002].

Die erste Beschreibung von TRP Kanälen fand in Nervenzellen von *Drosophila melanogaster* statt [Cosens et al., 1969]. Mittlerweile umfaßt diese Superfamilie sechs Unterfamilien: TRPC (umfaßt TRP1 bis TRP7 nach der alten Nomenklatur), TRPV, TRPM und neuerdings auch die entfernter Verwandten TRPP, TRPML und TRPN [Montell et al., 2002a; Montell et al., 2002b; Huang, 2004]. Die Mitglieder dieser Superfamilie wurden ausschließlich aufgrund ihrer strukturellen Homologien und nicht aufgrund ihrer Eigenschaften zusammengefaßt. Sie unterscheiden sich erheblich in ihrem biophysikalischen Verhalten. An dieser Stelle soll auf die klassischen TRPC (für „TRP Canonical“) Kanäle eingegangen werden. Eine mögliche Verwandtschaft zu der TRPP (für „TRP Polycystin“) Familie wird in Kapitel 4.3.5 über Polycystine diskutiert.

TRPC Kanäle bilden sowohl nichtselektive als auch calciumselektive rezeptorgesteuerte Kationenkanäle. Sie wurden inzwischen in zahlreichen Geweben, so auch im Herzen von Säugetieren, nachgewiesen [Freichel et al., 1999; Hofmann et al.,

2000; Montell et al., 2002a; Clapham et al., 2003; Huang, 2004]. Allerdings liegen die für die TRPC Kanäle beschriebenen Einzelkanalleitfähigkeiten mit 25-110 pS [Kunze et al., 1997; Petersen, 2002] unter der an den hier untersuchten Zellen berechneten Leitfähigkeit (etwa 300 pS). Auch wurden in der Regel andere pharmakologische Eigenschaften und Mechanismen der Aktivierung beschrieben [Kunze et al., 1997; Hofmann et al., 2000; Ohki et al., 2000; Petersen, 2002]. Darüber hinaus konnte in keinem der hier durchgeführten Experimente die für einige TRPC Kanäle beschriebene modulierende Wirkung von Flufenaminsäure nachgewiesen werden [Tesfai et al., 2001; Inoue et al., 2001; Lee et al., 2003; Bengtson et al., 2004].

Ebenfalls bedacht werden muß, daß CAN bzw. TRP Kanäle [Petersen, 2002; Zhainazarov, 2003] so zahlreich auf der Zelloberfläche vorkommen, daß an isolierten Membranflecken Einzelkanalmessungen möglich sind. Von dem hier beschriebenen Kanal wurden allerdings maximal sechs aktivierte Kanäle gleichzeitig in der gesamten Zelle beobachtet. Dies macht es nahezu unmöglich, zufällig einen solchen Kanal in einem Membranflecken direkt unter der Pipette zu finden und somit Einzelkanalmessungen durchzuführen. Die hier durchgeführten Ergebnisse lassen eine Zugehörigkeit dieses LCCs zu der Gruppe der TRPC Kanäle unwahrscheinlich erscheinen.

4.3.2. *Dehnungsaktivierte Ionenkanäle*

Da nicht ausgeschlossen werden kann, daß der in dieser Arbeit beschriebene LCC zumindest zu einem gewissen Grad durch eine Kontraktion der Zelle aktiviert wird, sind die mechanosensitiven Kanäle eine weitere Kanalfamilie, die bei der Frage um die Kanalidentität in Betracht gezogen werden können. Diese Kanäle lassen sich in dehnungsaktivierte („Stretch Activated Channels“, SAC) und dehnungsinaktivierte Kanäle („Stretch Inactivated Channels“, SIC) einteilen. Momentan wird davon ausgegangen, daß verschiedene Mitglieder dieser mechanosensitiven Kanalfamilie beispielsweise im Herzen an der Zellvolumenregulation und in den Gloma carotica et aortica an der Vermittlung des Barorezeptorreflex beteiligt sind (Übersichtsarbeiten unter: [Hu et al., 1997; Hamill et al., 2001]). Dehnungsaktivierte Kanäle sind nichtselektiv permeabel für Kationen und besitzen Leitfähigkeiten zwischen 10 und 200 pS. Bisher sind für diese heterogene Kanalgruppe keine spezifischen Hemmstoffe bekannt. Etwa die Hälfte der zur Zeit bekannten mechanosensitiven Kanäle lassen sich durch Gd^{3+} inhibieren. Für diese gadoliniumsensiblen SACs wurde von mehreren Autoren eine inhibierende Wirkung von Gd^{3+} im mikromolaren Konzentrationsbereich beschrieben [Hu et al., 1997; Zhang et al., 2000; Hamill et al., 2001].

Der in der vorliegenden Arbeit beschriebene LCC konnte durch Gd^{3+} erst in einer deutlich höheren Konzentration von 1 mmol/l blockiert werden. In dieser vergleichsweise hohen Konzentration hingegen hemmt Gd^{3+} bereits andere Kanäle wie beispielsweise TRP Kanäle und epitheliale Natriumkanäle [Kunze et al., 1997; Ohki et al., 2000; Awayda et al., 2004]. Es kommt also bereits zu kanalunspezifischen Reaktion. Weiterhin soll nochmals erwähnt werden, daß der hier charakterisierte LCC auch bei Versuchen nachgewiesen werden konnte, in denen die Kontraktion durch eine effiziente Calciumpufferung verhindert wurde (vgl. Kap. 4.2.1.4). Beide Beobachtungen sprechen somit gegen die Identifikation dieses LCCs in ventrikulären Myozyten der Ratte als ein Mitglied der dehnungsaktivierten nichtselektiven Kationenkanäle.

4.3.3. *Gap-Junction Halbkanäle*

Der hier vorgestellte Kanal großer Leitfähigkeit ist in seinen biophysikalischen Eigenschaften mit dem von Pott und Mechmann 1990 beschriebenen Kanal vergleichbar [Pott et al., 1990]. Die Autoren charakterisierten in atrialen Kardiomyozyten von Meerschweinchen einen calciumaktivierten nichtselektiven Kationenkanal mit einer Einzelkanalleitfähigkeit von 280 pS. Dabei dokumentierten sie eine Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit durch Noradrenalin und eine Inhibierung durch Oktanol (100 $\mu\text{mol/l}$). Aufgrund der biophysikalischen Eigenschaften und des Effekts von Oktanol und Noradrenalin formulierten die Autoren unter Vorbehalt die Hypothese, daß der von ihnen beobachtete LCC den Gap-Junction Halbkanäle zuzuordnen sei. Während der enzymatischen Isolation von ventrikulären Myozyten ist es denkbar, daß Gap-Junction Kanäle, die in der Zellmembran normalerweise zwei aneinanderliegende Zellen verbinden, auseinandergerissen und so Gap-Junction Halbkanäle freigelegt werden. Ausgehend von der Hypothese, daß diese Halbkanäle nicht abgebaut werden, sondern in der Zellmembran verbleiben, ist es dann vorstellbar, daß sie unter bestimmten Bedingungen aktiviert werden können. Die von Pott und Mechmann beschriebenen Eigenschaften wie die Leitfähigkeit, die unselektive Permeabilität und Mechanismen der Aktivierung lassen sich gut mit den für Gap-Junction Kanäle publizierten Charakteristika in Einklang bringen [Pott et al., 1990; Spray et al., 1990; van Veen et al., 2001]. John et al. konnten an transfizierten HEK293 Zellen demonstrieren, daß Gap-Junction Halbkanäle (Connexin-43) durch die Reduktion der extrazellulären Calciumkonzentration aktiviert und durch Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentration sowie durch Oktanol, 18- α -Glycyrrhetinsäure und La^{3+} blockiert werden [John et al., 1999; John et al., 2003]. Diese Beobachtung wurde von Contreras et al. mittels Farbstoffindikatorenmethode an kultivierten Astrozyten bestätigt [Contreras et al., 2002].

Einschränkend muß festgestellt werden, daß Oktanol kein spezifischer Blocker von Gap-Junction Kanälen oder Halbkanälen ist. Diese Beobachtung formulierten Pott et al. selber; sie zeigten in ihrer Arbeit, daß sowohl der schnelle Natriumkanal als auch L-Typ Calciumkanäle in den untersuchten Zellen durch Oktanol signifikant gehemmt wurden. In der vorliegenden Arbeit wurde daher der Einfluß von

18- α -Glycyrrhetinsäure (20 μ M) auf den LCC untersucht, einer Substanz, die in dieser Konzentration im Vergleich zu Oktanol als spezifischer beschrieben wurde [Contreras et al., 2002]. Dabei konnte keine signifikante Veränderung der Offenwahrscheinlichkeit oder der Leitfähigkeit belegt werden (vgl. Abbildung 12, S. 63). Auch Flufenaminsäure (100 μ M), für das ebenfalls eine hemmende Wirkung auf Gap-Junction Kanäle bekannt ist [Eskandari et al., 2002], beeinflusste in den hier durchgeführten Versuchen die Kanalaktivität nicht. Des weiteren gelang mit Gd^{3+} , welches Gap-Junction Halbkanäle in einer Konzentration von 3 μ mol/l inhibiert [Eskandari et al., 2002], in der vorliegenden Arbeit eine Hemmung erst mit einer Konzentration von 1 mmol/l. Der hier vorgestellte LCC konnte darüber hinaus durch eine Erhöhung – und nicht wie für Gap-Junction Kanäle bekannt durch eine Reduktion – der extrazellulären Calciumkonzentration aktiviert werden. Zusammenfassend sprechen diese Versuchsergebnisse somit stark gegen die Zugehörigkeit des LCCs zu den Gap-Junction Halbkanälen.

4.3.4. Ryanodin-Rezeptor Kanäle

Die Arbeitsgruppe von Kondo beschrieb 2000 einen LCC in ventrikulären Kardiomyozyten von Meerschweinchen mit ähnlichen Eigenschaften zu dem hier vorgestellten [Kondo et al., 2000]. Die Autoren konnten den LCC durch die Applikation von 10 mmol/l Coffein aktivieren. Der Kanal zeigte eine Einzelkanalleitfähigkeit von 300-400 pS und eine Permeabilität für Na^+ , Cs^+ und Ba^{2+} . 25 $\mu\text{mol/l}$ Ryanodin in der Pipettenlösung schalteten den Kanal in einen Zustand reduzierter Leitfähigkeit, während Ruthenium-Rot (1-10 $\mu\text{mol/l}$) und Oktanol die Offenwahrscheinlichkeit konzentrationsabhängig erniedrigten. Wie bereits in Kapitel 4.2.1.1 erwähnt, erhöhte darüber hinaus eine Anhebung von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ die Offenwahrscheinlichkeit. Die Autoren schlossen aus ihren Versuchsergebnissen, daß es sich bei dem von ihnen beobachteten Kanal um einen Ryanodin-Rezeptor Kanal handelt. Sie spekulierten, daß die RyR Kanäle fälschlicherweise (im Sinne von „Protein-Misstrafficking“) in die Zellmembran eingebaut werden. Es wurde offen gelassen, wie ein solcher Einbau vermittelt wird, und welche Funktionen ein RyR Kanal dort übernehmen könnte.

RyR Kanäle konnten in nahezu allen Geweben einer Vielzahl von Vertebraten nachgewiesen werden [Sutko et al., 1996]. Im Herzen kommt die Isoform RyR2 in der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums vor. RyR Kanäle sind Kationenkanäle, welche für monovalente und divalente Kationen permeabel sind, durch Ca^{2+} und Coffein aktiviert werden und eine Einzelkanalleitfähigkeit, je nach Versuchsparametern, von 90 bis 900 pS besitzen [Sitsapesan et al., 1990; Lindsay et al., 1991; Tinker et al., 1992; Zucchi et al., 1997]. Das pflanzliche Alkaloid Ryanodin bindet hochspezifisch an RyR Kanäle, aktiviert diese und reduziert gleichzeitig die einzelnen Stromamplituden [Rousseau et al., 1987]. Ruthenium-Rot reduziert je nach Applikationsform die Offenwahrscheinlichkeit oder die Stromamplituden der RyR Kanäle [Xu et al., 1999]. Ryanodin-Rezeptoren bilden in der Membran Komplexe mit FKBP12.6. Dieses Protein moduliert die Offenwahrscheinlichkeit und die Leitfähigkeit des RyR Kanals. Dissoziiert es von dem Kanal, so reduziert sich die Aktivität und die Leitfähigkeit des RyR Kanals [Marx et al., 2000]. FK506 verstärkt den Prozeß der Destabilisierung dieses Proteinkomplexes und führt so zu einer deutlichen Reduktion der einzelnen Stromamplituden [Xiao et al., 1997; Marks, 2000; Marx et al., 2000].

Bezüglich der Leitfähigkeit und der Permeabilität lassen sich deutliche Parallelen zu dem hier beschriebenen Kanal ziehen. Entscheidend gegen die Identifizierung des LCCs in dieser Arbeit als RyR Kanal sprechen jedoch die fehlenden Effekte von Ryanodin und Ruthenium-Rot. So konnte in keinem der durchgeführten Versuche, in denen Ryanodin über die Badlösung oder über die Pipettenlösung appliziert wurde, ein Zustand reduzierter Leitfähigkeit, wie ihn Kondo et al. beobachteten, dokumentiert werden (vgl. Abbildung 12, S. 63). Auch Ruthenium-Rot beeinflusste weder die Stromamplitude noch die Offenwahrscheinlichkeit des untersuchten Kanals großer Leitfähigkeit. Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit ebenfalls gezeigt werden, daß FK506 keine Wirkung auf diese beiden biophysikalischen Parameter des LCCs hat. Dieser fehlende Effekt von FK506 ließe sich dadurch erklären, daß es sich bei dem Kanal nicht um einen RyR Kanal handelt. Allerdings muß auch die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, daß zwar RyR Kanalproteine, nicht jedoch FKBP12.6, in die Zellmembran eingebaut werden. In diesem Fall würde die Gabe von FK506 auch keine Wirkung auf die biophysikalischen Eigenschaften des Kanals haben. Zusammenfassend sprechen die Ergebnisse der pharmakologischen Eigenschaften, vor allem die fehlende Wirkung von Ryanodin und Ruthenium-Rot, gegen eine Zugehörigkeit des hier vorgestellten LCCs zu den RyR Kanälen.

4.3.5. Polycystin Kanäle

Von den existierenden Isoformen der Polycystine sind für PC2 und PCL Kanaleigenschaften detailliert beschrieben worden (vgl. Tabelle 1, S. 7). Für PC2L2 sind solche aufgrund der Strukturanalysen vorausgesagt, konnten aber noch nicht im Versuch belegt werden. Bei PC2 und PCL handelt es sich um nichtselektive Kationenkanäle mit einer Einzelkanalleitfähigkeit von 40-530 pS. Sie sind für mono- und divalente Kationen permeabel, für Anionen hingegen undurchlässig. Ferner ist bekannt, daß sie durch Ca^{2+} aktiviert und durch Amilorid, La^{3+} , Gd^{3+} und intrazelluläre Ansäuerung inhibiert werden. Weiterhin wurde für PC2 gezeigt, daß Ryanodin keinen Effekt auf dessen Kanaleigenschaften ausübt [Chen et al., 1999; Gonzalez-Perrett et al., 2000; Vassilev et al., 2001; Koulen et al., 2002; Delmas et al., 2004a]. PC1 hingegen ist ein Interaktionsprotein ohne eigene Kanaleigenschaften, welches jedoch die Funktion von PC2 modulieren kann.

Bei dem in dieser Arbeit charakterisierten Kanal handelt es sich um einen nichtselektiven Kationenkanal großer Leitfähigkeit (~300 pS), der durch Ca^{2+} und Coffein aktiviert und durch Amilorid, La^{3+} , Gd^{3+} und Ni^{2+} inhibiert wird. Für Amilorid liegt hier die halbmaximale Hemmdosis (IC_{50}) bei 134 $\mu\text{mol/l}$ und damit sehr nah an der in einer Arbeit von Gonzalez-Perrett et al. über PC2 bestimmten IC_{50} von 80 $\mu\text{mol/l}$ [Gonzalez-Perrett et al., 2000]. In der Literatur finden sich wiederholt Hinweise, daß Polycystin Kanäle durch La^{3+} bzw. Gd^{3+} in Konzentrationen zwischen 0,1 und 0,5 mmol/l inhibiert werden [Chen et al., 1999; Gonzalez-Perrett et al., 2000; Hanaoka et al., 2000]. In der vorliegenden Arbeit gelang sowohl mit La^{3+} als auch mit Gd^{3+} in einer Konzentration von 0,1 mmol/l keine, in einer Konzentration von 1 mmol/l hingegen eine vollständige Inhibition des untersuchten Kanals. In dieser Konzentration hemmen beide Substanzen, wie bereits ausgeführt, weitere Kanäle, so daß hier nicht von einem spezifischen Effekt gesprochen werden kann. Eine intrazelluläre Ansäuerung, welche Polycystin Kanäle inhibiert [Gonzalez-Perrett et al., 2000], wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht, bei einer extrazellulären Azidifikation hingegen ließ sich keine Beeinflussung der Kanaleigenschaften feststellen.

Die biophysikalischen Eigenschaften, vor allem die Leitfähigkeit (mit Zuständen reduzierter Leitfähigkeit), die Ionenselektivität, die Mechanismen der Aktivierung und die Wirkung von Amilorid, La^{3+} und Gd^{3+} als Blocker sprechen, ebenso wie die fehlende Wirkung von Ryanodin, für eine Identität des hier vorgestellten Kanals mit einem durch Polycystine gebildeten Kanal.

In der vorliegenden Arbeit gelang in isolierten Kardiomyozyten der Nachweis von PKD2- und PKD2L2-mRNA. Für PC2 ist hinreichend bekannt, daß es sich um ein Kanalprotein handelt. Bei PC2L2 hingegen wird zwar aufgrund struktureller Analysen davon ausgegangen, daß dieses einen Kanal bildet, ein Nachweis ist bisher jedoch nicht gelungen. Somit kann die Frage, ob der hier beobachtete LCC durch PC2 oder durch PC2L2 gebildet wird, an dieser Stelle nicht beantwortet werden.

4.4. Mögliche Bedeutungen der Polycystine im Herzen

Die physiologische Bedeutung von Polycystinen im Herzen ist bisher weitgehend ungeklärt. Es gibt jedoch mehrere Hinweise darauf, daß Polycystine eine wichtige Rolle bei der regelrechten Gewebeentwicklung und Organentstehung spielen. Wie bereits in der Einleitung ausgeführt, leiden Patienten mit Mutationen in *PKD* Genen an übermäßigem Zystenwachstum in diversen Organen, an Gefäßveränderungen, die zu Bildung von Aneurysmen und schließlich deren Ruptur führen, aber auch vermehrt an Herzklappenfehlern und Septumdefekten (Übersichtsartikel siehe: [Wu et al., 2000; Arnaout, 2001; Igarashi et al., 2002]). Auch die Tatsache, daß Polycystine in embryonalen und in verletzten Geweben deutlich stärker exprimiert werden als in ausdifferenzierten, deutet auf eine entsprechende Rolle während des Wachstums hin [Markowitz et al., 1999; Wilson, 2001; Arnaout, 2001; Igarashi et al., 2002; Delmas et al., 2004b].

Analog dazu finden sich bei heterozygoten $PKD2^{+/-}$ knockout-Mäusen eine gestörte Vasokonstriktion, Herzklappenfehler, Zystenwachstum, Bluthochdruck und letztlich eine reduzierte Lebenserwartung [Cantiello, 2004]. Homozygote $PKD2^{-/-}$ knockout-Mäuse weisen schwerste Fehlbildungen an Herz und Nieren auf und versterben bereits intrauterin [Wu et al., 2000].

Verschiedene Arbeiten beschreiben, daß PC2 unter normalen Bedingungen intrazellulär in der Membran des ERs, nicht jedoch in der Zellmembran vorkommt. Erst die Gegenwart von PC1, eine erhöhte Transportaktivität oder chemische Substanzen scheinen einen Transport in das Plasmalemm zu ermöglichen [Hanaoka et al., 2000; Nauli et al., 2003; Delmas et al., 2004b]. Vor diesem Hintergrund und aufgrund der Tatsache, daß ein Nachweis von PKD1-mRNA in den Kardiomyozyten nicht gelang, kann die äußerst geringe Anzahl von Kanälen, die hier in den untersuchten Zellen beobachtet wurde, erklärt werden. In diesem Zusammenhang ist erwähnenswert, daß auch in Versuchen, in denen die whole-cell Konfiguration mithilfe der perforated-patch Technik etabliert wurde, die Aktivierung von Polycystin Kanälen in der Zellmembran gelang. Dies macht es unwahrscheinlich, daß die Kanäle artifiziell, beispielsweise durch den bei der ruptured-patch Methode auftretenden Überdruckpuls, in die Zellmembran eingebaut werden. Somit kann davon ausgegangen werden, daß in den Kardiomyozyten

PC2-ähnliche Kanäle unter physiologischen Bedingungen nicht nur in intrazellulären Membranen, sondern auch in der Zellmembran vorkommen.

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, daß PC2 Kanäle an intrazellulären calciumregulierten Signalkaskaden beteiligt sind. Es handelt sich bei diesen Kanälen demnach neben Ryanodin-Rezeptor Kanälen und IP₃-Rezeptor Kanälen um einen weiteren Eintrittsweg für extrazelluläres Ca²⁺, über den eine Calciumfreisetzung aus intrazellulären Calciumspeichern induziert werden kann [Chen et al., 2001; Koulen et al., 2002; Delmas et al., 2004b]. Die zytosolische Calciumkonzentration und die calciuminduzierte Calciumfreisetzung sind in allen Zellen, speziell in Herzmuskelzellen, sehr eng reguliert (für Übersichtsartikel siehe: [Cantiello, 2004; Delmas et al., 2004b]). Calciumgradienten in einer Zelle können allgemein betrachtet sowohl kurz- als auch langfristige Konsequenzen haben. So werden in Muskelzellen über einen Calciumeinstrom unmittelbar Kontraktionen ausgelöst, während derselbe Einstrom gleichzeitig längerfristig einen Stimulus für das Zellwachstum darstellt. Im Rahmen von akuten Ereignissen wie Zellkontraktionen ist eine physiologische Rolle eines Kanals solch einer großen Leitfähigkeit und gleichzeitig einer so geringen Präsenz in der Zellmembran schwer vorstellbar. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß ausgehend vom Ruhemembranpotential die gleichzeitige Öffnung von nur drei bis vier dieser Kanäle ausreicht, um eine einzelne Kardiomyozyte so weit zu depolarisieren, daß ein Aktionspotential ausgelöst wird. Um die mögliche Folge einer solchen Depolarisation abzuschätzen, muß bedacht werden, daß der hier vorgestellte Kanal durch eine Erhöhung der zytosolischen Calciumkonzentration aktiviert wird wie sie normalerweise nur während der Systole vorkommt. In diesem Herzzyklusabschnitt bliebe allerdings eine theoretische Depolarisation der Zelle mit einem eventuell folgenden Aktionspotential unbemerkt, da das gesamte Gewebe ohnehin depolarisiert ist. Eine Aktivierung des Kanals in der Diastole hingegen könnte ventrikuläre Extrasystolen und somit auch Kammerflimmern auslösen.

Der relativ lange Zeitraum, über den der Kanal nach seiner Auslösung aktiv bleibt, macht seine Beteiligung an langfristigen Regelprozessen denkbar. So ist es durchaus vorstellbar, daß durch gelegentliche Aktivierung dieses Kanals die mittlere zytosolische Calciumkonzentration über einen längeren Zeitraum gesteigert wird. Auf diesem Wege könnte der Kanal zur Hypertrophieentstehung beitragen.

Zusammenfassend bleibt die Rolle, die ein Kationenkanal solch großer Leitfähigkeit unter physiologischen Bedingungen in der Zellmembran von Kardiomyozyten spielen könnte, spekulativ. Eine Beteiligung an der Einstellung der langfristigen zytosolischen Calciumkonzentration und damit an der Regulation des Zellwachstums scheint wahrscheinlicher als eine Beteiligung an akuten Prozessen. Untersuchungen der Calciumhomöostase in Myozyten von heterozygoten und homozygoten PKD2 knockout-Mäusen könnten hier zur Klärung beitragen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die autosomal dominant vererbte polyzystische Nierenerkrankung (ADPKD) wird durch Mutationen im *PKD1* oder *PKD2* Gen verursacht und ist charakterisiert durch progressives Zystenwachstum in verschiedenen Organen, vor allem der Niere. Hinzu kommen zahlreiche extrarenale Manifestationen wie beispielsweise Gefäßfehlbildungen, arterielle Hypertonie und Herzklappenfehler. Polycystine, die von *PKD* kodierten Proteine, wurden in nahezu allen Organen, darunter auch im Herzen nachgewiesen. Das membranständige Polycystin-1 ist an Interaktionen zwischen Zellen und an verschiedenen intrazellulären Signalwegen beteiligt. Polycystin-2 (PC2) und dessen Homologe Polycystin-L und Polycystin-2L2 (PC2L2) hingegen sind calciumaktivierte nichtselektive Kationenkanäle.

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, auf molekularer und funktioneller Ebene Kanäle in linksventrikulären Kardiomyozyten der Ratte nachzuweisen, die mit Mitgliedern der Polycystin Familie verwandt sind. Darüber hinaus wurden deren biophysikalischen Eigenschaften charakterisiert. Mit Hilfe von Einzelzell-RT-PCR Analysen konnte aus einzelnen isolierten Kardiomyozyten *PKD2*- und *PKD2L2*-mRNA amplifiziert werden. In elektrophysiologischen Untersuchungen in der Ganzzellkonfiguration wurden bei 365 von insgesamt 651 untersuchten isolierten linksventrikulären Kardiomyozyten Kanäle großer Leitfähigkeit (LCCs) gefunden. Die LCCs waren für mono- und divalente Kationen mit einer leichten Selektivität für Na^+ und K^+ gegenüber Cs^+ und Li^+ permeabel. Die Einzelkanalleitfähigkeit für monovalente Kationen lag bei etwa 300 pS, wobei auch Zustände reduzierter Leitfähigkeit dokumentiert wurden. Eine Erhöhung der zytosolischen Calciumkonzentration aktivierte, Amilorid, La^{3+} , Gd^{3+} und Ni^{2+} inhibierten den LCC. Diese biophysikalischen und pharmakologischen Eigenschaften stimmen nahezu vollständig mit den bekannten Charakteristika der durch Polycystine gebildeten Kanäle überein.

Diese Ergebnisse legen nahe, daß Kardiomyozyten der Ratte PC2 und PC2L2 auf ihrer Zelloberfläche exprimieren, welche dort Kanäle bilden, die dem hier beschriebenen LCC zugrunde liegen. Ihre physiologische Funktion ist noch unklar; sie könnte in einer Beteiligung an der Regulation langfristiger Prozesse wie der Calciumhomöostase und des Zellwachstums bestehen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Arnaout,M.A. (2001). Molecular genetics and pathogenesis of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Annu Rev Med*, **52**, 93-123.

Awayda,M.S., Shao,W., Guo,F., Zeidel,M. and Hill,W.G. (2004). ENaC-membrane interactions: regulation of channel activity by membrane order. *J Gen Physiol*, **123**, 709-727.

Basora,N., Nomura,H., Berger,U.V., Stayner,C., Guo,L., Shen,X. and Zhou,J. (2002). Tissue and Cellular Localization of a Novel Polycystic Kidney Disease-Like Gene Product, Polycystin-L. *J Am Soc Nephrol*, **13**, 293-301.

Bengtson,C.P., Tozzi,A., Bernardi,G. and Mercuri,N.B. (2004). Transient receptor potential-like channels mediate metabotropic glutamate receptor EPSCs in rat dopamine neurones. *J Physiol*, **555**, 323-330.

Cai,Y., Maeda,Y., Cedzich,A., Torres,V.E., Wu,G., Hayashi,T., Mochizuki,T., Park,J.H., Witzgall,R. and Somlo,S. (1999). Identification and characterization of polycystin-2, the PKD2 gene product. *J Biol Chem*, **274**, 28557-28565.

Calaghan,S.C., Le Guennec,J.Y. and White,E. (2001). Modulation of Ca²⁺ signaling by microtubule disruption in rat ventricular myocytes and its dependence on the ruptured patch-clamp configuration. *Circ Res*, **88**, E32-E37.

Callewaert,G., Cleemann,L. and Morad,M. (1989). Caffeine-induced Ca²⁺ release activates Ca²⁺ extrusion via Na⁺-Ca²⁺ exchanger in cardiac myocytes. *Am J Physiol*, **257**, C147-C152.

Canessa,C.M., Horisberger,J.D. and Rossier,B.C. (1993). Epithelial sodium channel related to proteins involved in neurodegeneration. *Nature*, **361**, 467-470.

Cantiello,H.F. (2004). Regulation of calcium signaling by polycystin-2. *Am J Physiol Renal Physiol*, **286**, F1012-F1029.

Chen,X.Z., Segal,Y., Basora,N., Guo,L., Peng,J.B., Babakhanlou,H., Vassilev,P.M., Brown,E.M., Hediger,M.A. and Zhou,J. (2001). Transport function of the naturally occurring pathogenic polycystin-2 mutant, R742X. *Biochem Biophys Res Commun*, **282**, 1251-1256.

Chen,X.Z., Vassilev,P.M., Basora,N., Peng,J.B., Nomura,H., Segal,Y., Brown,E.M., Reeders,S.T., Hediger,M.A. and Zhou,J. (1999). Polycystin-L is a calcium-regulated cation channel permeable to calcium ions. *Nature*, **401**, 383-386.

Clapham,D.E., Montell,C., Schultz,G. and Julius,D. (2003). International Union of Pharmacology. XLIII. Compendium of voltage-gated ion channels: transient receptor potential channels. *Pharmacol Rev*, **55**, 591-596.

Colquhoun,D., Neher,E., Reuter,H. and Stevens,C.F. (1981). Inward current channels activated by intracellular Ca in cultured cardiac cells. *Nature*, **294**, 752-754.

Contreras,J.E., Sanchez,H.A., Eugenin,E.A., Speidel,D., Theis,M., Willecke,K., Bukauskas,F.F., Bennett,M.V. and Saez,J.C. (2002). Metabolic inhibition induces opening of unapposed connexin 43 gap junction hemichannels and reduces gap junctional communication in cortical astrocytes in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 495-500.

Corey,D.P. and Stevens,C.F. (1983). Science and technology of patch-recording electrodes. In Sakmann,B. and Neher,E. (Eds.), *Single-channel Recordings*, Plenum Press, New York and London, pp. 53-68.

Cosens,D.J. and Manning,A. (1969). Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature*, **224**, 285-287.

- Cribbs,L.L., Martin,B.L., Schroder,E.A., Keller,B.B., Delisle,B.P. and Satin,J. (2001). Identification of the t-type calcium channel (Ca(v)3.1d) in developing mouse heart. *Circ Res*, **88**, 403-407.
- Delmas,P., Nauli,S.M., Li,X., Coste,B., Osorio,N., Crest,M., Brown,D.A. and Zhou,J. (2004a). Gating of the polycystin ion channel signaling complex in neurons and kidney cells. *FASEB J*, **18**, 740-742.
- Delmas,P., Padilla,F., Osorio,N., Coste,B., Raoux,M. and Crest,M. (2004b). Polycystins, calcium signaling, and human diseases. *Biochem Biophys Res Commun*, **322**, 1374-1383.
- Dixon,J.E. and McKinnon,D. (1994). Quantitative analysis of potassium channel mRNA expression in atrial and ventricular muscle of rats. *Circ Res*, **75**, 252-260.
- Dray,A., Forbes,C.A. and Burgess,G.M. (1990). Ruthenium red blocks the capsaicin-induced increase in intracellular calcium and activation of membrane currents in sensory neurones as well as the activation of peripheral nociceptors in vitro. *Neurosci Lett*, **110**, 52-59.
- Ehara,T., Noma,A. and Ono,K. (1988). Calcium-activated non-selective cation channel in ventricular cells isolated from adult guinea-pig hearts. *J Physiol*, **403**, 117-133.
- Eisner,D.A., Choi,H.S., Diaz,M.E., O'Neill,S.C. and Trafford,A.W. (2000). Integrative analysis of calcium cycling in cardiac muscle. *Circ Res*, **87**, 1087-1094.
- EPKDC (1994). The polycystic kidney disease 1 gene encodes a 14 kb transcript and lies within a duplicated region on chromosome 16. The European Polycystic Kidney Disease Consortium. *Cell*, **77**, 881-894.
- Eskandari,S., Zampighi,G.A., Leung,D.W., Wright,E.M. and Loo,D.D. (2002). Inhibition of gap junction hemichannels by chloride channel blockers. *J Membr Biol*, **185**, 93-102.

Freichel,M., Schweig,U., Stauffenberger,S., Freise,D., Schorb,W. and Flockerzi,V. (1999). Store-operated cation channels in the heart and cells of the cardiovascular system. *Cell Physiol Biochem*, **9**, 270-283.

Geng,L., Segal,Y., Peissel,B., Deng,N., Pei,Y., Carone,F., Rennke,H.G., Glucksmann-Kuis,A.M., Schneider,M.C., Ericsson,M., Reeders,S.T. and Zhou,J. (1996). Identification and localization of polycystin, the PKD1 gene product. *J Clin Invest*, **98**, 2674-2682.

Gonzalez-Perrett,S., Batelli,M., Kim,K., Essafi,M., Timpanaro,G., Moltabetti,N., Reisin,I.L., Arnaout,M.A. and Cantiello,H.F. (2002). Voltage dependence and pH regulation of human polycystin-2-mediated cation channel activity. *J Biol Chem*, **277**, 24959-24966.

Gonzalez-Perrett,S., Kim,K., Ibarra,C., Damiano,A.E., Zotta,E., Batelli,M., Harris,P.C., Reisin,I.L., Arnaout,M.A. and Cantiello,H.F. (2000). Polycystin-2, the protein mutated in autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD), is a Ca^{2+} -permeable nonselective cation channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 1182-1187.

Guo,L., Schreiber,T.H., Weremowicz,S., Morton,C.C., Lee,C. and Zhou,J. (2000). Identification and characterization of a novel polycystin family member, polycystin-L2, in mouse and human: sequence, expression, alternative splicing, and chromosomal localization. *Genomics*, **64**, 241-251.

Hamill,O.P. and Martinac,B. (2001). Molecular basis of mechanotransduction in living cells. *Physiol Rev*, **81**, 685-740.

Hamill,O.P., Marty,A., Neher,E., Sakmann,B. and Sigworth,F.J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch*, **391**, 85-100.

Hanaoka,K., Qian,F., Boletta,A., Bhunia,A.K., Piontek,K., Tsiokas,L., Sukhatme,V.P., Guggino,W.B. and Germino,G.G. (2000). Co-assembly of polycystin-1 and -2 produces unique cation-permeable currents. *Nature*, **408**, 990-994.

Hofmann,T., Schaefer,M., Schultz,G. and Gudermann,T. (2000). Transient receptor potential channels as molecular substrates of receptor-mediated cation entry. *J Mol Med*, **78**, 14-25.

Horn,R. and Marty,A. (1988). Muscarinic activation of ionic currents measured by a new whole-cell recording method. *J Gen Physiol*, **92**, 145-159.

Hossack,K.F., Leddy,C.L., Johnson,A.M., Schrier,R.W. and Gabow,P.A. (1988). Echocardiographic findings in autosomal dominant polycystic kidney disease. *N Engl J Med*, **319**, 907-912.

Hu,H. and Sachs,F. (1997). Stretch-activated ion channels in the heart. *J Mol Cell Cardiol*, **29**, 1511-1523.

Huang,C.L. (2004). The transient receptor potential superfamily of ion channels. *J Am Soc Nephrol*, **15**, 1690-1699.

Ibraghimov-Beskrovnaya,O., Dackowski,W.R., Foggensteiner,L., Coleman,N., Thiru,S., Petry,L.R., Burn,T.C., Connors,T.D., Van Raay,T., Bradley,J., Qian,F., Onuchic,L.F., Watnick,T.J., Piontek,K., Hakim,R.M., Landes,G.M., Germino,G.G., Sandford,R., and Klinger,K.W. (1997). Polycystin: in vitro synthesis, in vivo tissue expression, and subcellular localization identifies a large membrane-associated protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 6397-6402.

Igarashi,P. and Somlo,S. (2002). Genetics and pathogenesis of polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*, **13**, 2384-2398.

Inoue,R., Okada,T., Onoue,H., Hara,Y., Shimizu,S., Naitoh,S., Ito,Y. and Mori,Y. (2001). The transient receptor potential protein homologue TRP6 is the essential component of vascular alpha(1)-adrenoceptor-activated Ca²⁺-permeable cation channel. *Circ Res*, **88**, 325-332.

Isenberg,G. and Klöckner,U. (1982). Calcium tolerant ventricular myocytes prepared by preincubation in a "KB medium". *Pflügers Arch*, **395**, 6-18.

John,S., Cesario,D. and Weiss,J.N. (2003). Gap junctional hemichannels in the heart. *Acta Physiol Scand*, **179**, 23-31.

John,S.A., Kondo,R., Wang,S.Y., Goldhaber,J.I. and Weiss,J.N. (1999). Connexin-43 hemichannels opened by metabolic inhibition. *J Biol Chem*, **274**, 236-240.

Kondo,R.P., Weiss,J.N. and Goldhaber,J.I. (2000). Putative ryanodine receptors in the sarcolemma of ventricular myocytes. *Pflügers Arch*, **440**, 125-131.

Korbmacher,C., Letz,B., Ackermann,A. and Volk,T. (1995). Sodium channels and non-selective cation channels in the cortical collecting duct. *Nephrol Dial Transplant*, **10**, 1546-1550.

Koulen,P., Cai,Y., Geng,L., Maeda,Y., Nishimura,S., Witzgall,R., Ehrlich,B.E. and Somlo,S. (2002). Polycystin-2 is an intracellular calcium release channel. *Nat Cell Biol*, **4**, 191-197.

Kunze,D.L., Sinkins,W.G., Vaca,L. and Schilling,W.P. (1997). Properties of single Drosophila TRPL channels expressed in Sf9 insect cells. *Am J Physiol*, **272**, C27-C34.

Lee,Y.M., Kim,B.J., Kim,H.J., Yang,D.K., Zhu,M.H., Lee,K.P., So,I. and Kim,K.W. (2003). TRPC5 as a candidate for the nonselective cation channel activated by muscarinic stimulation in murine stomach. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **284**, G604-G616.

Lindsay,A.R., Manning,S.D. and Williams,A.J. (1991). Monovalent cation conductance in the ryanodine receptor-channel of sheep cardiac muscle sarcoplasmic reticulum. *J Physiol*, **439**, 463-480.

Lipp,P., Mechmann,S. and Pott,L. (1987). Effects of calcium release from sarcoplasmic reticulum on membrane currents in guinea pig atrial cardioballs. *Pflügers Arch*, **410**, 121-131.

Liu,Y., Li,Q., Tan,M., Zhang,Y.Y., Karpinski,E., Zhou,J. and Chen,X.Z. (2002). Modulation of the human polycystin-L channel by voltage and divalent cations. *FEBS Lett*, **525**, 71-76.

Markowitz,G.S., Cai,Y., Li,L., Wu,G., Ward,L.C., Somlo,S. and D'Agati,V.D. (1999). Polycystin-2 expression is developmentally regulated. *Am J Physiol*, **277**, F17-F25.

Marks,A.R. (2000). Cardiac intracellular calcium release channels: role in heart failure. *Circ Res*, **87**, 8-11.

Martina,M., Schultz,J.H., Ehmke,H., Monyer,H. and Jonas,P. (1998). Functional and molecular differences between voltage-gated K⁺ channels of fast-spiking interneurons and pyramidal neurons of rat hippocampus. *J Neurosci*, **18**, 8111-8125.

Martínez,M.L., Heredia,M.P. and Delgado,C. (1999). Expression of T-type Ca²⁺ channels in ventricular cells from hypertrophied rat hearts. *J Mol Cell Cardiol*, **31**, 1617-1625.

Marty,A. and Neher,E. (1995). Tight-seal whole-cell recording. In Sakmann,B. and Neher,E. (Eds.), *Single-Channel Recordings*, Plenum Press, New York and London, pp. 31-51.

Marx,S.O., Reiken,S., Hisamatsu,Y., Jayaraman,T., Burkhoff,D., Rosembliit,N. and Marks,A.R. (2000). PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell*, **101**, 365-376.

Mechmann,S. and Pott,L. (1986). Identification of Na-Ca exchange current in single cardiac myocytes. *Nature*, **319**, 597-599.

Milton,R.L. and Caldwell,J.H. (1990). How do patch clamp seals form? A lipid bleb model. *Pflügers Arch*, **416**, 758-762.

Montell,C., Birnbaumer,L. and Flockerzi,V. (2002a). The TRP channels, a remarkably functional family. *Cell*, **108**, 595-598.

Montell,C., Birnbaumer,L., Flockerzi,V., Bindels,R.J., Bruford,E.A., Caterina,M.J., Clapham,D.E., Harteneck,C., Heller,S., Julius,D., Kojima,I., Mori,Y., Penner,R., Prawitt,D., Scharenberg,A.M., Schultz,G., Shimizu,N. and Zhu,M.X. (2002b). A unified nomenclature for the superfamily of TRP cation channels. *Mol Cell*, **9**, 229-231.

Nauli,S.M., Alenghat,F.J., Luo,Y., Williams,E., Vassilev,P., Li,X., Elia,A.E., Lu,W., Brown,E.M., Quinn,S.J., Ingber,D.E. and Zhou,J. (2003). Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells. *Nat Genet*, **33**, 129-137.

Neher,E. and Sakmann,B. (1976). Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature*, **260**, 799-802.

Nomura,H., Turco,A.E., Pei,Y., Kalaydjieva,L., Schiavello,T., Weremowicz,S., Ji,W., Morton,C.C., Meisler,M., Reeders,S.T. and Zhou,J. (1998). Identification of PKDL, a novel polycystic kidney disease 2-like gene whose murine homologue is deleted in mice with kidney and retinal defects. *J Biol Chem*, **273**, 25967-25973.

- O'Neill,S.C., Donoso,P. and Eisner,D.A. (1990). The role of $[Ca^{2+}]_i$ and $[Ca^{2+}]$ sensitization in the caffeine contracture of rat myocytes: measurement of $[Ca^{2+}]_i$ and $[caffeine]_i$. *J Physiol*, **425**, 55-70.
- Obermüller,N., Gallagher,A.R., Cai,Y., Gassler,N., Gretz,N., Somlo,S. and Witzgall,R. (1999b). The rat *pkd2* protein assumes distinct subcellular distributions in different organs. *Am J Physiol*, **277**, F914-F925.
- Ohki,G., Miyoshi,T., Murata,M., Ishibashi,K., Imai,M. and Suzuki,M. (2000). A calcium-activated cation current by an alternatively spliced form of TRP3 in the heart. *J Biol Chem*, **275**, 39055-39060.
- Ong,A.C., Harris,P.C., Biddolph,S., Bowker,C. and Ward,C.J. (1999a). Characterisation and expression of the PKD-1 protein, polycystin, in renal and extrarenal tissues. *Kidney Int*, **55**, 2091-2116.
- Ong,A.C., Ward,C.J., Butler,R.J., Biddolph,S., Bowker,C., Torra,R., Pei,Y. and Harris,P.C. (1999b). Coordinate expression of the autosomal dominant polycystic kidney disease proteins, polycystin-2 and polycystin-1, in normal and cystic tissue. *Am J Pathol*, **154**, 1721-1729.
- Pancrazio,J.J. and Lynch,C.3. (1994). Differential anesthetic-induced opening of calcium-dependent large conductance channels in isolated ventricular myocytes. *Pflügers Arch*, **429**, 134-136.
- Patton,C., Thompson,S. and Epel,D. (2004). Some precautions in using chelators to buffer metals in biological solutions. *Cell Calcium*, **35**, 427-431.
- Perchenet,L. and Clement-Chomienne,O. (2001). External nickel blocks human Kv1.5 channels stably expressed in CHO cells. *J Membr Biol*, **183**, 51-60.
- Petersen,O.H. (2002). Cation channels: homing in on the elusive CAN channels. *Curr Biol*, **12**, R520-R522.

Pott,L. and Mechmann,S. (1990). Large-conductance ion channel measured by whole-cell voltage clamp in single cardiac cells: modulation by beta-adrenergic stimulation and inhibition by octanol. *J Membr Biol*, **117**, 189-199.

Puri,S., Magenheimer,B.S., Maser,R.L., Ryan,E.M., Zien,C.A., Walker,D.D., Wallace,D.P., Hempson,S.J. and Calvet,J.P. (2004). Polycystin-1 activates the calcineurin/NFAT (nuclear factor of activated T-cells) signaling pathway. *J Biol Chem*, **279**, 55455-55464.

Qian,Q., Li,M., Cai,Y., Ward,C.J., Somlo,S., Harris,P.C. and Torres,V.E. (2003). Analysis of the polycystins in aortic vascular smooth muscle cells. *J Am Soc Nephrol*, **14**, 2280-2287.

Rae,J., Cooper,K., Gates,P. and Watsky,M. (1991). Low access resistance perforated patch recordings using amphotericin B. *J Neurosci Methods*, **37**, 15-26.

Rae,J.L. and Levis R.A. (1992). Glass technology for patch-clamp electrodes. In Rudy,B. and Iverson,L.E. (Eds.), *Ion channels*, . Academic Press, Inc., Sand Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto, pp. 66-92.

Rousseau,E. and Meissner,G. (1989). Single cardiac sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -release channel: activation by caffeine. *Am J Physiol*, **256**, H328-H333.

Rousseau,E., Smith,J.S. and Meissner,G. (1987). Ryanodine modifies conductance and gating behavior of single Ca^{2+} release channel. *Am J Physiol*, **253**, C364-C368.

Schultz,J.H., Volk,T. and Ehmke,H. (2001). Heterogeneity of Kv2.1 mRNA Expression and Delayed Rectifier Current in Single Isolated Myocytes From Rat Left Ventricle. *Circ Res*, **88**, 483-490.

Sheng,S., Perry,C.J. and Kleyman,T.R. (2004). Extracellular Zn^{2+} activates epithelial Na^{+} channels by eliminating Na^{+} self-inhibition. *J Biol Chem*, **279**, 31687-31696.

Siemen,D. (1993). Nonselective cation channels. In Siemen,D. and Hescheler,J.K.J. (Eds.), *Nonselective cation channels: Pharmacology, Physiology and Biophysics*, Birkhäuser Verlag, Basel, pp. 3-25.

Sitsapesan,R. and Williams,A.J. (1990). Mechanisms of caffeine activation of single calcium-release channels of sheep cardiac sarcoplasmic reticulum. *J Physiol*, **423**, 425-439.

Spray,D.C. and Burt,J.M. (1990). Structure-activity relations of the cardiac gap junction channel. *Am J Physiol*, **258**, C195-C205.

Sutko,J.L. and Airey,J.A. (1996). Ryanodine receptor Ca^{2+} release channels: does diversity in form equal diversity in function? *Physiol Rev.*, **76**, 1027-1071.

Tesfai,Y., Brereton,H.M. and Barritt,G.J. (2001). A diacylglycerol-activated Ca^{2+} channel in PC12 cells (an adrenal chromaffin cell line) correlates with expression of the TRP-6 (transient receptor potential) protein. *Biochem J*, **358**, 717-726.

Tinker,A. and Williams,A.J. (1992). Divalent cation conduction in the ryanodine receptor channel of sheep cardiac muscle sarcoplasmic reticulum. *J Gen Physiol*, **100**, 479-493.

Torres,V.E., Cai,Y., Chen,X., Wu,G.Q., Geng,L., Cleghorn,K.A., Johnson,C.M. and Somlo,S. (2001). Vascular expression of polycystin-2. *J Am Soc Nephrol*, **12**, 1-9.

Van Veen,A.A., van Rijen,H.V. and Opthof,T. (2001). Cardiac gap junction channels: modulation of expression and channel properties. *Cardiovasc Res*, **51**, 217-229.

Vassilev,P.M., Guo,L., Chen,X.Z., Segal,Y., Peng,J.B., Basora,N., Babakhanlou,H., Cruger,G., Kanazirska,M., Ye,C., Brown,E.M., Hediger,M.A. and Zhou,J. (2001). Polycystin-2 is a novel cation channel implicated in defective intracellular Ca^{2+} homeostasis in polycystic kidney disease. *Biochem Biophys Res Commun*, **282**, 341-350.

Veldhuisen,B., Spruit,L., Dauwerse,H.G., Breuning,M.H. and Peters,D.J. (1999). Genes homologous to the autosomal dominant polycystic kidney disease genes (PKD1 and PKD2). *Eur J Hum Genet*, **7**, 860-872.

Volk,T., Nguyen,T.H.D., Schultz,J.H. and Ehmke,H. (1999). Relationship between transient outward K^+ current and Ca^{2+} influx in rat cardiac myocytes of endo- and epicardial origin. *J Physiol*, **519**, 841-850.

Wilson,P.D. (2001). Polycystin: new aspects of structure, function and regulation. *J Am Soc Nephrol*, **12**, 834-845.

Wu,G., Markowitz,G.S., Li,L., D'Agati,V.D., Factor,S.M., Geng,L., Tibara,S., Tuchman,J., Cai,Y., Park,J.H., van Adelsberg,J., Hou,H., Kucherlapati,R., Edelmann,W. and Somlo,S. (2000). Cardiac defects and renal failure in mice with targeted mutations in Pkd2. *Nat Genet*, **24**, 75-78.

Xiao,R.P., Valdivia,H.H., Bogdanov,K., Valdivia,C., Lakatta,E.G. and Cheng,H. (1997). The immunophilin FK506-binding protein modulates Ca^{2+} release channel closure in rat heart. *J Physiol*, **500 (Pt 2)**, 343-354.

Xu,L., Tripathy,A., Pasek,D.A. and Meissner,G. (1999). Ruthenium red modifies the cardiac and skeletal muscle Ca^{2+} release channels (ryanodine receptors) by multiple mechanisms. *J Biol Chem*, **274**, 32680-32691.

Yang,X.C. and Sachs,F. (1989). Block of stretch-activated ion channels in *Xenopus* oocytes by gadolinium and calcium ions. *Science*, **243**, 1068-1071.

Zhainazarov,A.B. (2003). Ca^{2+} -activated nonselective cation channels in rat neonatal atrial myocytes. *J Membr Biol*, **193**, 91-98.

Zhang,Y.H., Youm,J.B., Sung,H.K., Lee,S.H., Ryu,S.Y., Ho,W.K. and Earm,Y.E. (2000). Stretch-activated and background non-selective cation channels in rat atrial myocytes. *J Physiol*, **523 Pt 3**, 607-619.

Zucchi,R. and Ronca-Testoni,S. (1997). The sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} channel/ryanodine receptor: modulation by endogenous effectors, drugs and disease states. *Pharmacol Rev*, **49**, 1-51.

7. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Expression von Polycystin	38
Abbildung 2: Aktivierung eines Kanals großer Leitfähigkeit	40
Abbildung 3: Häufigkeitsverteilung der beobachteten Kanäle	41
Abbildung 4: Strom-Spannungsbeziehung ohne intrazelluläre Calciumpufferung 43	
Abbildung 5: Strom-Spannungsbeziehung bei intrazellulärer Calciumpufferung . 45	
Abbildung 6: Bestimmung der Chloridpermeabilität	49
Abbildung 7: Bestimmung der Natriumpermeabilität	50
Abbildung 8: Permeabilität monovalenter Kationen	51
Abbildung 9: Die Kanalaktivität ist abhängig von $[Ca^{2+}]_i$	55
Abbildung 10: Coffein moduliert die Kanalaktivität des LCCs	57
Abbildung 11: Divalente Kationen modulieren die Stromamplitude	59
Abbildung 12: Effekt von 18-α-Glycyrrhetinsäure und Ryanodin	63
Abbildung 13: Effekt von Nickel	66
Abbildung 14: Effekt von Amilorid	68
Abbildung 15: Auswirkungen auf das Membranpotential	71

8. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Veröffentlichte Literatur über durch Polycystin gebildete Kanäle	7
Tabelle 2: Kationenkanäle großer Leitfähigkeit in Herzmuskelzellen	10
Tabelle 3: Verwendete Pipettenlösungen	23
Tabelle 4: Verwendete Badlösungen	24
Tabelle 5: Herkunft verwendeter Substanzen	25
Tabelle 6: Ergebnisse der pharmakologischen Experimente	69

9. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

$[Ca^{2+}]_a$	Extrazelluläre Calciumkonzentration
$[Ca^{2+}]_i$	Zytosolische Calciumkonzentration
°C	Grad Celsius
A	Ampere
Abb.	Abbildung
ADPKD	„Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease“, Autosomal dominant vererbte polyzystische Nierenerkrankung
ATP	Adenosintriphosphat
C	Coulomb
CAN	„Calcium Activated Nonselective Cation Channels“, Calciumaktivierte nichtselektive Kationenkanäle
C_m	Zellkapazität
cm	Centimeter
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	„et alii“, und weitere
g	Gramm
GΩ	Gigaohm
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino-1-ethansulfonsäure
I	Strom
IC_{50}	Inhibitorkonzentration bei halbmaximaler Inhibition
$I_{Na/Ca}$	Na^+ - Ca^{2+} -Austauscherstrom
IP_3	Inositol 1,4,5-Triphosphat
J	Joule
K	Grad Kelvin
k.A.	Keine Angabe
Kap.	Kapitel

kg	Kilogramm
l	Liter
LCC	„Large Conductance Nonselective Cation Channel“, Nichtselektiver Kationenkanal großer Leitfähigkeit
mA	Milliampere
mg	Milligramm
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
µmol/l	Mikromol pro Liter
mmol/l	Millimol pro Liter
mRNA	Messenger RNA
mV	Millivolt
MΩ	Megaohm
nA	Nanoampere
n.s.	Nicht signifikant
NMDG	N-Methyl-D-Glucamin
NP _o	Offenwahrscheinlichkeit
pA	Picoampere
PC	Polycystin
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PKD	„Polycystic-Kidney-Disease“, Polyzystische Nierenerkrankung
pS	Picosiemens
R	Widerstand
R _m	Membranwiderstand
RNA	Ribonukleinsäure
R _{Pip}	Pipettenwiderstand
R _S	Serienwiderstand
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion

RyR	Ryanodin-Rezeptor
s	Sekunde
SAC	„Stretch Activated Channels“, Dehnungsaktivierte Kanäle
SEM	„Standard Error of the Mean“, Standardfehler des Mittelwertes
SIC	„Stretch Inactivated Channels“, Dehnungsinaktivierte Kanäle
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
suREJ	„sea urchin Receptor for Egg Jelly“
TEA-Cl	Tetraethyl-Ammoniumchlorid
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRP	Transientes Rezeptor Potential
U	Units
V	Spannung
V _m	Zellmembranpotential
V _{pip}	Kommandospannung, Pipettenpotential
V _s	Am Serienwiderstand abfallende Spannung
Ω	Ohm

10.DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die mir bei der Erstellung dieser Arbeit hilfreich zur Seite standen.

Prof. Dr. med. Heimo Ehmke danke ich herzlich für die Überlassung des Themas, die stets freundliche Betreuung und besonders für das entgegengebrachte Vertrauen in meine Person.

Mein ganz besonderer Dank gilt Prof. Dr. med. Tilmann Volk für die exzellente Betreuung, die unermüdliche Motivation und nachhaltige akademische Förderung. Seine umfassende Vorbildfunktion und sein unerschöpflicher Reichtum an Wissen hat mein Interesse für das Fach Physiologie geweckt und damit meine berufliche Wahl maßgeblich beeinflusst. Darüber hinaus entwickelte sich eine bereichernde Freundschaft, die auch nach Abschluß dieser Arbeit fortbesteht.

Dr. Jobst-H. Schultz gilt mein Dank für die unkomplizierte Zusammenarbeit in der Molekularbiologie sowie ganz besonders für intensive, über das Berufliche hinausgehende, weiterführende Gespräche und Anregungen.

Bei allen Mitarbeitern des Instituts für vegetative Physiologie möchte ich mich für die selbstverständliche Aufnahme, die angenehme Zusammenarbeit und nicht zuletzt die gemütlichen Kaffeepausen mit Gelegenheit zu nicht nur fachbezogenem, sondern auch zwischenmenschlichem Gedankenaustausch bedanken.

Ich danke meinen Eltern für das Ermöglichen meiner Ausbildung. Insbesondere meine Mutter unterstützte mich bei meinem Werdegang durch ihr dauerhaftes Interesse an meinem Fortkommen sowie langjährigen liebevollen Zuspruch. Herzlichen Dank für unermüdliches Daumendrücken, für das Vertrauen in meinen Erfolg und die Liebe auch in schwierigen Zeiten!

Schließlich möchte ich meiner Freundin für ihre Liebe und die große Hilfe bei der Vollendung dieser Arbeit danken und ihr diese Arbeit widmen.

11. LEBENSLAUF

Angaben zur Person:

Name: Alexander Peter Schwoerer
Anschrift: Kegelhofstrasse 65, 20251 Hamburg
Geburtsdatum: 04.11.1975
Geburtsort: Hannover
Eltern: Dr. med. Gudrun Schwoerer, geb. Grass
Dr. med. Detlef Schwoerer

Schulbildung:

08/1982 – 06/1986 Grundschule Kirchrode, Hannover
08/1986 – 06/1988 Orientierungsstufe Luerstrasse, Hannover
08/1988 – 05/1995 Ratsgymnasium, Hannover, Abschluß: Abitur

Zivildienst:

09/1995 – 09/1996 Rettungs-/Krankentransport ASB Hannover

Berufsausbildung:

04/1997 Beginn des Studiums der Humanmedizin, Universität Hamburg
04/1999 Physikum
04/2000 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/2002 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
09/2002 – 09/2003 Praktisches Jahr
10/2003 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/2004 Erteilung der Approbation

Praktisches Jahr:

1. Terial: Traumatologie, Groote Shuur Hospital, Kapstadt, Südafrika
2. Terial, 1. Hälfte: Anästhesie, Royal Prince Albert Hospital, Hobart, Australien
2. Terial, 2. Hälfte: Anästhesie, Concord Repatriation Hospital, Sydney, Australien
3. Terial: Innere Medizin, Universitätsspital Zürich, Schweiz

Beschäftigung:

seit 12/2003 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Vegetative
Physiologie und Pathophysiologie, UKE

12.EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Ich versichere ausdrücklich, daß ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, daß ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Alexander Peter Schwoerer

Die vorliegende Arbeit wurde in Teilen in folgender Publikation veröffentlicht:

Volk,T., Schwoerer,A.P., Thiessen,S., Schultz,J.-H. and Ehmke,H. (2003). A polycystin-2-like large conductance cation channel in rat left ventricular myocytes. *Cardiovasc Res*,**58**,76-88.