

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

# **Temperaturabhängigkeit nativer erg-Kalium-Kanäle**

## **Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg vorgelegt von

Bastian Vonrath  
aus Hamburg

Hamburg

2009

Angenommen von der Medizinischen Fakultät  
der Universität Hamburg am: 1. 7. 2009

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen  
Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Christiane Bauer

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. J. R. Schwarz

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. D. Isbrandt

## Inhaltsverzeichnis

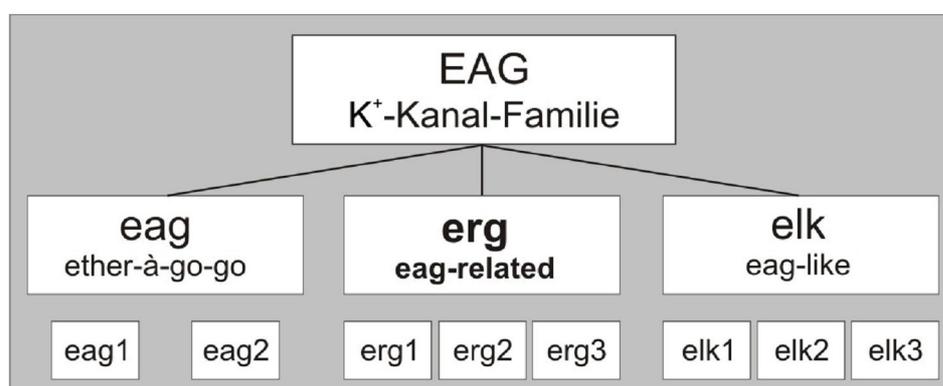
		Seite
<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>4</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>13</b>
<b>2.1</b>	<b>Zellkultur</b>	<b>13</b>
<b>2.1.1</b>	<b>Bulbus olfactorius-Primärkulturen</b>	<b>13</b>
<b>2.1.2</b>	<b>GH3/B6-Zellen</b>	<b>14</b>
<b>2.2</b>	<b>Lösungen und Chemikalien</b>	<b>15</b>
<b>2.3</b>	<b>Versuchsdurchführung</b>	<b>16</b>
<b>2.3.1</b>	<b>Die Patch-Clamp-Technik</b>	<b>16</b>
<b>2.3.2</b>	<b>Messprinzip</b>	<b>18</b>
<b>2.3.3</b>	<b>Arbeitsplatz</b>	<b>19</b>
<b>2.3.4</b>	<b>Patch-Pipetten und Badelektrode</b>	<b>20</b>
<b>2.3.5</b>	<b>Versuchsdurchführung</b>	<b>21</b>
<b>2.3.6</b>	<b>Datenerfassung und –auswertung</b>	<b>23</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>26</b>
<b>3.1</b>	<b>Verfügbarkeit</b>	<b>26</b>
<b>3.1.1</b>	<b>Spannungsabhängigkeit der Verfügbarkeit</b>	<b>28</b>
<b>3.1.2</b>	<b>Zeitkonstanten der Deaktivierung</b>	<b>32</b>
<b>3.1.3</b>	<b>Zeitkonstanten der Erholung von der Inaktivierung</b>	<b>35</b>
<b>3.1.4</b>	<b>Potentialabhängigkeit der „voll aktivierten“ erg-Kanäle</b>	<b>39</b>
<b>3.2</b>	<b>Inaktivierung</b>	<b>41</b>
<b>3.3</b>	<b>Spannungsabhängigkeit der Aktivierung</b>	<b>46</b>
<b>3.4</b>	<b>Zeitkonstante der Aktivierung</b>	<b>50</b>
<b>3.5</b>	<b>Steady-state Inaktivierung</b>	<b>52</b>
<b>3.6</b>	<b>Tabellarische Zusammenfassung</b>	<b>54</b>
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>56</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>65</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>67</b>
<b>7</b>	<b>Danksagung</b>	<b>73</b>
<b>8</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>74</b>
<b>9</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung</b>	<b>75</b>

## 1 Einleitung

Kaliumkanäle stellen die größte Gruppe der Ionenkanäle des Menschen dar und haben vielfältige physiologische Aufgaben im Körper. Sie sind unter anderem beteiligt an der Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials, der Signalübertragung an elektrisch erregbaren Membranen, der Rhythmik des Herzschlags in Form von Repolarisation nach Aktionspotentialen, der Regulation neuronaler Erregbarkeit, der Freisetzung von Hormonen und Transmittern, der Kalium-Homöostase, der Neurogenese und der Osmoregulation (Pongs, 1999).

Kaliumkanaluntereinheiten besitzen meist 2, 4 oder 6 Transmembrandomänen. Sie lagern sich in der Regel zu Tetrameren zusammen, um einen funktionsfähigen Kanal zu bilden. Sie lassen sich in einwärts- oder auswärtsrektifizierende, sowie spannungsabhängige und spannungsunabhängige Kanäle einteilen (Brandts und Pott, 2000).

Die hier untersuchten erg (ether-à-go-go related gene)-Kanäle sind spannungsabhängige, funktionell einwärts gleichrichtende Kaliumkanäle (Warmke und Ganetzky, 1994), die zur Familie der EAG (ether-à-go-go)-Kanäle gehören, zu der neben den 3 bisher bekannten erg-Kanälen (Shi et al., 1997) auch 2 eag-Kanäle (Ludwig et al., 1994) und 3 elk (ether-à-go-go like)-Kanäle (Engeland et al., 1998; Shi et al., 1998) gehören (Abb.1). Eag-Kanäle bilden die Kv10-Familie, erg-Kanäle die Kv11- und elk-Kanäle die Kv12-Familie. Der Name ether-à-go-go stammt von einer Mutante der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*, aus welcher der eag-Kanal zuerst kloniert wurde. Diese zeigte unter Äthernarkose Beinbewegungen, welche an Go-Go-Tänzerinnen erinnerten (Kaplan und Trout, 1968).

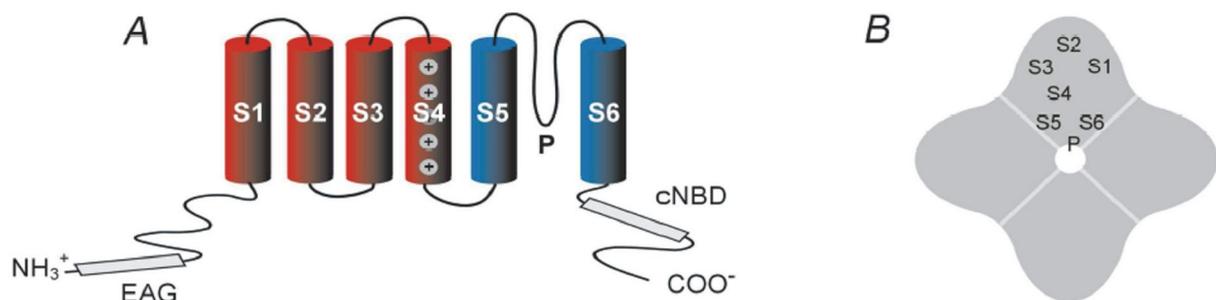


**Abbildung 1: Die EAG-Kanal-Familie**

Zu den Mitgliedern der EAG-Kanal-Familie gehören zwei eag-Kanäle, 3 erg-Kanäle und drei Unterformen der elk-Kanäle.

Erg-Kanäle bestehen aus vier Untereinheiten mit jeweils sechs Transmembrandomänen S1-S6, die sich zu einem Tetramer zusammenlagern (Abb. 2). Das vierte Transmembransegment fungiert als Hauptspannungssensor (Bauer & Schwarz, 2001). Die Porenregion, welche die

für die Kaliumkanäle wesentlichen Elemente der Ionenselektivität beinhaltet, befindet sich zwischen dem fünften und sechsten Segment. S1 bis S4 bilden die äußere Kanalwand. Lagern sich vier gleiche Untereinheiten zusammen erhält man ein Homomultimer, bei zwei bis vier unterschiedlichen Untereinheiten ein Heteromultimer. Die eag-Domäne befindet sich am N-Terminus der erg-Kanäle und kommt in keinen anderen Kaliumkanälen vor. Am C-Terminus befindet sich eine Bindungsstelle für zyklische Nukleotide, deren Funktion noch ungeklärt ist (Warmke & Garnetzky, 1994).



### Abbildung 2: Aufbau der eag-Kanäle

**A:** Eag-Kanaluntereinheiten bestehen aus sechs Transmembrandomänen S1 bis S6. Für nähere Informationen siehe Text.

**B:** Die erg-Untereinheiten lagern sich zu Tetrameren zusammen. Die äußere Kanalwand wird durch S1-S4 gebildet, die innere durch S5 und S6.

Der erste humane eag-Kanal in Homologie zur Drosophila-Mutante wurde 1994 kloniert und als humanes erg (herg) bezeichnet (Warmke und Garnetzky, 1994). Später wurden auch erg1-Varianten anderer Spezies wie der Ratte (rerg) kloniert (Bauer et al., 1998). 1997 wurden erg2 und erg3 der Ratte kloniert (Shi et al., 1997) und Splicevarianten von erg1 von Maus und Mensch entdeckt, welche als erg1b bezeichnet wurden (Lees-Miller et al., 1997; London et al., 1997). Erg1b fehlt ein großer Teil des N-Terminus. Stattdessen findet man dort einen kurzen, alternativen N-Terminus. Es fehlt jedoch die EAG-Domäne des eigentlichen N-Terminus. Verschiedene erg-Untereinheiten können sich zu funktionellen Kanälen zusammenlagern. Heteromultimere können aus unterschiedlichen Zusammensetzungen der Untereinheiten gebildet werden (Wimmers et al., 2001).

## **Aufgaben und Vorkommen im Körper**

Erg1 ist im Körper weit verbreitet (Bauer und Schwarz, 2001) und findet sich unter anderem in Muskelgeweben, in endokrinen Drüsen, im Hoden und der glatten Muskulatur vieler Organe, wie Oesophagus, Magen, Gallenblase, Jejunum und Colon, weniger stark auch in der Lunge. Erg-Kanäle fehlen hingegen in Milz und Leber. In der glatten Muskulatur besteht die Aufgabe des erg-Kanals wohl in der Regulation von Tonus, Peristaltik und Widerstand der Organwände. Gegenstand vieler Untersuchungen ist der erg-Kanal im Myokard. Der erg-Kanal repräsentiert hier den „schnell“ aktivierenden verzögert gleichrichtenden Auswärtsstrom. Erg2 und erg3 sind spezifische Kanäle des Nervensystems (Shi et al., 1997), in dem man aber auch erg1 findet. In der Hypophyse spielen erg-Kanäle eine entscheidende Rolle bei der TRH-abhängigen Prolaktinsekretion (Corrette et al., 1996), da TRH über ein G-Protein vermittelte Kaskade erg-Kanäle inhibieren kann. Im Gehirn findet man erg1 in nahezu allen Teilen. Erg3 ist ebenfalls weit verbreitet und am stärksten im Cortex und Hippocampus exprimiert. Erg2 findet man in Mitralzellen und der periglomerulären Schicht des Bulbus olfactorius deutlich exprimiert. Darüber hinaus findet man erg2 in paravertebralen Ganglien, wie den Ganglia coeliaca und dem Ganglion mesentericum superius, sowie in der Retina. Erg3 wird ebenfalls in prävertebralen Ganglien sowie, wenn auch nicht so stark, in der Retina exprimiert. In all diesen Geweben ist auch erg1 vertreten (Shi et al., 1997; Saganich et al., 2001). Erg-Kanäle spielen auch in der Entstehung und dem Wachstum von Tumoren eine Rolle (Wadhwa et al., 2008). Dabei bewirkt eine Inhibition der Kanäle eine Unterdrückung der Proliferation von Tumorzellen.

## **Kinetik von erg-Kanälen**

Bei negativen Potentialen befinden sich die erg-Kanäle im geschlossenen, deaktivierten Zustand. Selbst bei starker Depolarisation fließt nur ein kleiner Auswärtsstrom, der schnell auf einen kleinen stationären Strom abfällt, der auf der stationären Leitfähigkeit nicht inaktivierter Kanäle beruht. Erst bei der folgenden Repolarisation gibt es einen großen transienten Auswärtsstrom. Dieses Phänomen beruht darauf, dass die Inaktivierung viel schneller abläuft als die Aktivierung und die Erholung von der Inaktivierung schneller ist als die Deaktivierung (Shibasaki, 1987). Die Kanäle aktivieren langsam, inaktivieren nach Öffnung aber sofort wieder, so dass eine zeitliche Überlagerung entsteht, was zum verhältnismäßig kleinen Auswärtsstrom führt. Die langsame Deaktivierung bedingt den sehr

großen Strom nach der Erholung von der Inaktivierung. Durch die Deaktivierung gehen die Kanäle wieder in den geschlossenen Zustand über (Abb.3). Aufgrund der schnellen Inaktivierung ist der erg-Kanal ein funktioneller Einwärtsrektifizierer, welche durch zunehmend geringere Stromflüsse bei Depolarisation definiert sind. Erfolgt eine Repolarisation auf ein positiveres Potential als das Gleichgewichtspotential für Kalium, wird ein Auswärtsstrom erzeugt, hingegen ein Einwärtsstrom bei Repolarisation auf ein negativeres Potential.

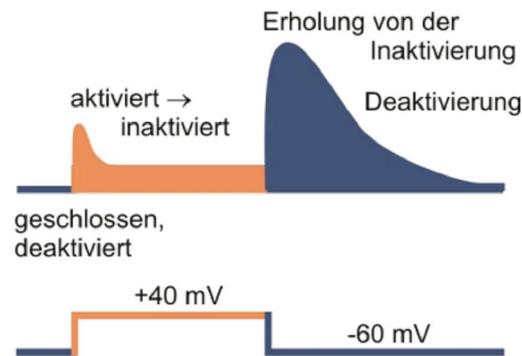
Angewendet auf das Aktionspotential im Myokard bedeutet dies, dass zu Beginn der Plateauphase nur ein kleiner Auswärtsstrom erfolgt, welcher sich im Verlauf der Repolarisation vergrößert und somit zur Rückkehr zum Ruhemembranpotential beiträgt (Sanguinetti et al., 1995). Somit kommt es bei einer Blockade, Mutation oder einem Ausfall des erg-Kanals im Herzen zu einer Verlängerung des Aktionspotentials, was zur Verlängerung der QT-Zeit im EKG, damit zum lebensgefährlichen long-QT-Syndrom mit Gefahr von Arrhythmien, Torsade-de-pointes-Tachykardien und dem plötzlichen Herztod führen kann (Curran et al., 1995; Vandenberg et al., 2004). Es existieren auch Mutationen, die entgegengesetzt zum short-QT-Syndrom führen.

### **Pharmakologie**

Der erg-Kanal schützt das Herz auch vor ektope Depolarisationen (Smith et al., 1996). Der erg-Kanal wird durch viele weit verbreitete Medikamente geblockt, wie z.B. Haloperidol und Fluvoxamin aus dem neuro-psychiatrischen Bereich (Suessbrich et al., 1997; Milnes et al., 2003), Histaminrezeptor-Antagonisten (Suessbrich et al., 1996), das Antidiabetikum Glibenclamid (Rosati et al., 1998), Sildenafil („Viagra“, Geelen et al., 2000), Amiodaron (Kiehn et al., 1998), Fungizide (Dumaine et al., 1998), das Anti-Malaria-Mittel Halofantrin (Tie et al., 2000), Kokain (O’Leary, 2002), einige Antibiotika aus der Gruppe der Makrolide (Volberg et al., 2002) und Fluorchinolone (Bischoff et al., 2000) und das Antiöstrogen Tamoxifen (Thomas et al., 2003). Somit besteht bei diesen Medikamenten die Gefahr eines Long-QT-Syndroms als schwerwiegende Nebenwirkung und Kontraindikation.

Erg-Kanäle haben weitere wichtige Funktionen im menschlichen Körper (Bauer und Schwarz, 2001). Sie steuern u.a. die Frequenzadaptation in Neuroblastomazellen (Chiesa et al., 1997) und stabilisieren das Ruhemembranpotential in laktotrophen Zellen (Barros et al., 1997). Aufgrund der Ähnlichkeit der EAG-Domäne zur PAS-Domäne, die sensitiv für Sauerstoff ist,

ist eine Einbeziehung des erg-Stroms in die O<sub>2</sub>-Sensitivität verschiedener Zellen möglich (Overholt et al., 2000).



### Abbildung 3: Schaltverhalten der erg-Kanäle

Beim Ruhemembranpotential liegen die Kanäle im geschlossenen, deaktivierten Zustand vor. Nach der Depolarisation beginnt die langsame Aktivierung, überlagert von der schnellen Inaktivierung. Nach der Repolarisation beginnen die schnelle Erholung von der Inaktivierung und die langsame Deaktivierung. Bei Repolarisation auf einen Wert positiv des Gleichgewichtspotentials von Kalium erfolgt ein großer transienter Auswärtsstrom.

### Gating

Bei Kaliumkanälen unterscheidet man eine C-Typ-Inaktivierung von einer N-Typ-Inaktivierung. Bei der N-Typ-Inaktivierung verlagert sich die N-Domäne in das Innere der Porenregion und verschließt diese somit für Kaliumionen. Bei der C-Typ-Inaktivierung verformt sich die äußere Porenregion. Die Inaktivierung der erg-Kanäle wird der C-Typ-Inaktivierung zugerechnet, obwohl sie merklich schneller als dafür typisch ist, was auf ihrer Spannungsabhängigkeit beruht (Sanguinetti et al., 1995; Trudeau et al., 1995). Wichtig für die Inaktivierung der erg-Kanäle sind die Transmembrandomäne 5 und die Porenregion (Herzberg et al., 1998; Ficker et al., 1998). Die Inaktivierung kann durch eine Mutation in der Porenregion unterbunden werden (Zou et al., 1998). Eine Deletion des N-Terminus bewirkt keine Blockade der Inaktivierung (Schönherr und Heinemann, 1996). Vermutet wird ein unabhängiger Spannungssensor für die Inaktivierung bei erg-Kanälen (Wang et al., 1996).

Erg-Kanäle deaktivieren bei Membranpotentialen negativer als ca.  $-50$  mV. Zellen mit erg-Kanälen besitzen somit ein System, das verhindert, dass sich das Membranpotential dem Kaliumruhepotential annähert. Eine Blockade von erg-Kanälen bewirkt demzufolge eine Depolarisation.

## **Erg-Untereinheiten**

Zwischen den einzelnen erg-Untereinheiten gibt es bedeutsame Unterschiede in ihren Eigenschaften. Erg2 ist der stärkste Einwärtsrektifizierer und aktiviert bei positiveren Potentialen als erg1. Erg3 ist der schwächste Einwärtsrektifizierer und aktiviert bei negativeren Potentialen als erg1 (Shi et al., 1997). Erg3 weist die schnellste Aktivierung auf, erg2 die deutlich langsamste. Gleiches gilt für die Erholung von der Inaktivierung. Die schnellste Zeitkonstante der Deaktivierung findet man bei erg1b, die langsamste bei erg1a und erg2. Erg3 weist die langsamste Zeitkonstante der Inaktivierung auf. (Hirdes et al., 2005, Schledermann et al., 2001; Wimmers et al., 2002). Erg1b fehlt wie oben erwähnt die EAG-Domäne am N-Terminus, die einen großen Einfluss auf die langsame Deaktivierung von erg1a hat. Dies führt zu einer beträchtlich schnelleren Deaktivierung von erg1b. Erg1a und erg1b bilden heteromere Kanäle und werden häufig gemeinsam exprimiert (Jones et al., 2004, Lees-Miller et al., 1997, London et al., 1997). Die Eigenschaften der heteromeren Kanäle unterscheiden sich deutlich von den homomeren Kanälen. Bezüglich der Aminosäuresequenz besteht zwischen h(uman)erg1, r(at)erg2 und r(eg)3 jeweils eine Übereinstimmung von etwa 60 Prozent. Die Übereinstimmung dieser Unterformen zu d(rosophila)erg beträgt etwa 40 Prozent. Zu m(ouse)eag und delk besteht eine Ähnlichkeit von jeweils ca. 30 Prozent (Shi et al., 1997).

## **Einflüsse von Ionen und Temperatur auf erg-Kanäle**

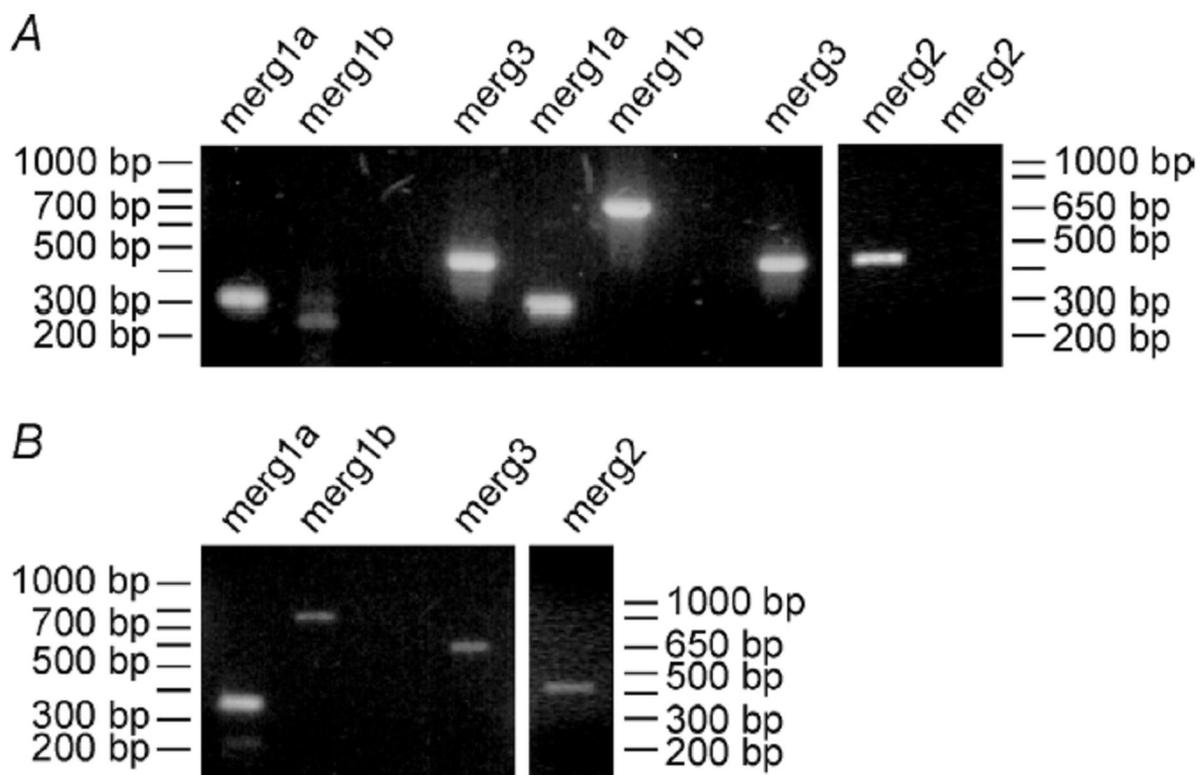
Die Untersuchung von erg-Kanälen ohne störende Überlagerung durch andere Kanäle wurde ermöglicht durch die Entdeckung spezifischer erg-Kanalblocker. Die meisten gehören zu den Klasse III-Antiarrhythmika. Als erg-Kanalblocker fungieren die Methansulfonanilide E-4031, WAY-123,389 und Dofetilid (Colatsky et al., 1994; Sanguinetti et al., 1995; Spector et al., 1996; Weinsberg et al., 1997), sowie ein Skorpiongift (Ergtoxin: Gurrola et al., 1999). Letzteres ermöglicht eine schnell reversible Blockung. Sehr gut für die spezifische Identifizierung von erg-Kanälen eignet sich E-4031, welches daher in dieser Arbeit verwendet wurde.

Die Eigenschaften von erg-Kanälen werden von der extrazellulären Konzentration von Ionen, v.a. Kalium und Calcium beeinflusst (Sanguinetti et al., 1995; Trudeau et al., 1995; Sturm et al. 2006). Veränderungen der extrazellulären Kalium- und Calciumkonzentrationen führen zur Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung und der Verfügbarkeit. Erhöhtes

Kalium führt zu einer Verlangsamung der Deaktivierung, der Inaktivierung und der Erholung von der Inaktivierung. Erhöhtes Kalium verringert die steady-state-Inaktivierung und erhöht die Leitfähigkeit für *erg*-Kanäle, was den Strom besser sichtbar macht, und so eine bessere Auswertung durch größere Ströme ermöglicht.

Untersuchungen des *erg*-Kanals wurden bisher in der Regel bei Raumtemperatur durchgeführt. Dies führt zu Abweichungen bezüglich Kinetik, Spannungsabhängigkeit und Amplituden im Vergleich zur menschlichen Körpertemperatur, die für die Charakteristik des Kanals eigentlich interessant ist. Temperaturexperimente sind in der Physiologie seit langem weit verbreitet. Bereits 1950 untersuchte Engelhardt die Temperaturabhängigkeit der Erregungsleitungsgeschwindigkeit im Kalt- und Warmblüternerven (Engelhardt 1950). Er fand unter anderem heraus, dass durch Temperaturschwankungen im peripheren Nerven Veränderungen hervorgerufen werden, die auf die Geschwindigkeit der Erregungsleitung Einfluss haben können. Engelhardt untersuchte den van't Hoffschen Quotienten, den  $Q_{10}$ -Wert, der angibt wie stark eine Kinetik bei einer Temperaturerhöhung um 10 °C beschleunigt oder verlangsamt wird. Er fand heraus, dass der  $Q_{10}$ -Wert temperaturabhängig ist. Er beobachtete einen bei steigender Temperatur kleiner werdenden Quotienten. Bei chemischen Reaktionen liegt der  $Q_{10}$  häufig zwischen 2 und 4, bei biologischen Vorgängen häufig unter 2. 1998 erschien ein erster Artikel über die Eigenschaften von *erg*-Kanälen bei physiologischer Temperatur von Zhou et al. HEK 293-Zellen wurden mit *erg1a*-Kanälen transfiziert. Dabei wurden deutliche Temperaturunterschiede verschiedener bedeutender Parameter gemessen. Vandenberg et al. untersuchten in einer Arbeit aus dem Jahr 2006 die Temperaturabhängigkeit von *erg*-Kanälen in CHO-Zellen, die mit *erg1a* transfiziert wurden (Vandenberg et al., 2006). Auch hier fand sich eine deutliche Abweichung zwischen den Messungen bei Raum- und Körpertemperatur mit inkonstanten  $Q_{10}$ -Werten für die unterschiedlichen Parameter. Bisher wurden allerdings immer nur Untersuchungen mit heterolog exprimierten Kanälen durchgeführt, also mit künstlich geschaffenen Zuständen.

In meiner Arbeit wird nun untersucht, inwieweit sich die Ergebnisse auf native *erg*-Kanäle übertragen lassen. Die Messungen wurden an zwei Zellarten durchgeführt: GH<sub>3</sub>/B<sub>6</sub>-Zellen der Ratte, eine permanente Hypophysenzelllinie, und Bulbus olfactorius-Neuronen der Maus in Primärkultur. In GH<sub>3</sub>/B<sub>6</sub>-Zellen findet man die Untereinheiten *erg1a* und *erg2* (Wulfsen et al., 2000; Kirchberger et al., 2006). In den Bulbus olfactorius-Neuronen *erg1a*, *erg1b*, *erg2* und *erg3* (Hirdes et al., 2008, Manuskript in Arbeit). In den Mitralzellen als Teil dieser Bulbus-Zellen, sind die selben Untereinheiten exprimiert (Abb.4). Für *erg*-Kanäle in beiden Zellarten wird vermutet, dass sie heteromultimer sind.



**Abbildung 4: *erg*-Untereinheiten in Bulbus olfactorius-Zellen (Schledermann et al.):**

Im oberen Bild sieht man die Ergebnisse einer RT-PCR von Mitralzellen, die zeigt, dass *erg1a*, *erg1b*, *erg2* und *erg3* in dieser Zellart exprimiert werden. Im unteren Bild wurden alle Zellen einer Bulbus-Kultur untersucht. Auch hier kommen alle Untereinheiten vor.

### Verwendete Zellarten

Der Bulbus olfactorius ist ein Teil des Systems der Geruchswahrnehmung. Hier enden die fila olfactoria, die Axone der Sinneszellen. Die auffälligsten Zellen des Bulbus olfactorius sind die Mitralzellen (Abb. 5), mit deren Dendriten die Axone der Riechzellen Synapsenfelder (Glomeruli) bilden. Beim Menschen enden die Axone vieler Riechzellen konvergent an den Dendriten einer Mitralzelle. Die Axone der Mitralzellen bilden den tractus olfactorius an der Basalfläche des Frontallappens. Der Bulbus olfactorius ist also die Schaltstelle zwischen den Rezeptoren und der Hirnrinde. Weiterhin kommen im Bulbus Körnerzellen vor, an denen Afferenzen aus verschiedenen Gebieten des ZNS enden.

GH<sub>3</sub>/B<sub>6</sub>-Zellen (Abb. 5; Gourdji et al., 1979) sind Hypophysentumorzellen. Die Hypophyse ist eine endokrine Drüse und steuert die hormonale Regulation vieler Körperfunktionen. Sie setzt in ihrem Hinterlappen (Neurohypophyse) die Hormone des Hypothalamus frei und bildet

in ihrem Vorderlappen (Adenohypophyse) selbst Hormone. Die Tätigkeit des Vorderlappens wird hormonell vom Hypothalamus geregelt. Die Hypophyse liegt in der fossa hypophysialis, gebildet durch die sella turcica des Keilbeinkörpers. Sie bildet somatotrope, mammatrope, gonadotrope, thyreotrope und kortikotrope Hormone. Entsprechend ihrer Benennung wirken die Hormone der Adenohypophyse auf Ovar, Hoden, Nebennierenrinde, Schilddrüse und Milchdrüse und spielen somit unter anderem eine wichtige Rolle bei der Eifollikelreifung, der Spermatogenese, dem Körperwachstum und der Proliferation und Sekretbildung der Milchdrüse, der Proteinsynthese und Proteolyse, der Lipolyse, dem Calciumstoffwechsel, der Entzündungshemmung, der Natrium- und Wasserretention, der Kalium- und Wasserstoffausscheidung, dem Wachstum der Sexualorgane und der Umwandlung der Uterusschleimhaut. Die Neurohypophyse gibt die Hormone Adiuretin und Oxytocin ab. Adiuretin (ADH) wirkt vasokonstriktorisch, somit blutdrucksteigernd und erhöht die Wasserrückresorption in der Niere, führt daher zur Harnkonzentrierung. ADH ist außerdem an der Regulation der ACTH-Freisetzung, des Trinkverhaltens und an Gedächtnis- und Lernleistungen beteiligt. Oxytocin fördert die Uteruskontraktion am Ende der Schwangerschaft und bedingt den Milchejektionsreflex, was zur Milchabgabe aus der Brustdrüse führt (Schiebler: „Anatomie“, 2005; Schmidt: „Neuro- und Sinnesphysiologie“, 2005).

GH<sub>3</sub>-Zellen wurden ursprünglich 1965 aus einem strahleninduzierten Hypophysenvorderlappentumor einer weiblichen Wistar/Fürth-Ratte gewonnen (Tashjian et al., 1968). Morphologisch sind sie epitheloide Zellen, die perlschnurartig und adhaerent wachsen. Sie haben somatomammatrope Eigenschaften und sezernieren Prolaktin und Wachstumshormon. Sie besitzen endogene Rezeptoren für Thyreotropin-Releasing-Hormon, vasoaktives intestinales Peptid, Cholezystokinin und Somatostatin. Desweiteren besitzen sie endogene erg-Kanäle (erg1a und erg2).

Der Subklon GH<sub>3</sub>/B<sub>6</sub>-Zellen wurde 1979 von Gourdji et al. beschrieben. Untersucht wurde die Empfindlichkeit dieser Zelllinie für das vasoaktive intestinale Peptid (VIP), mit dem Resultat, dass VIP ein direkter und starker Prolaktin freisetzender Faktor ist.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Zellkultur

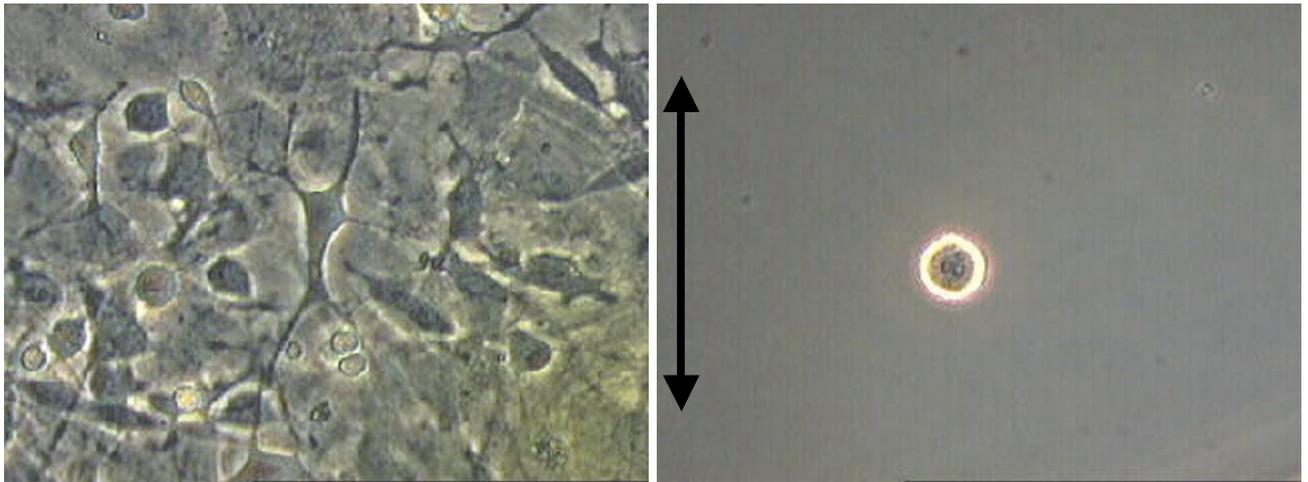
Die verwendeten Zellen wurden in einem Inkubator bei 37 °C, mit 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luft in wassergesättigter Atmosphäre gelagert.

#### 2.1.1 Bulbus olfactorius-Primärkulturen

Neugeborene Mäuse wurden unter Halothannarkose durch Dekapitation getötet. Zunächst wurden die Gehirne frei präpariert. Der Bulbus olfactorius wurde vom Rest abgetrennt und in Earle's balanced salt solution (EBSS, Gibco-Invitrogen, Karlsruhe) gespült. Es folgte eine Inkubation in einer Enzymlösung mit 0,5 Einheiten Papain (Worthington Biochemical Corporation, NJ, USA) pro Milliliter EBSS, die 0,1 mM EDTA und 0,2 mM Cystein beinhaltet. Die Inkubation erfolgte für 20 Minuten bei 37 °C. Der Reaktionsstop erfolgte im Anschluss mit 1 ml 0,25%iger Trypsininhibitorlösung für 5 Minuten. Die Zellen wurden vorsichtig mit einer Glaspipette durchmischt und die dissoziierten Zellen auf Glasplättchen mit 12 mm Durchmesser platziert. Die Glasplättchen waren mit Poly-L-Lysin und Laminin (Sigma, Taufkirchen) beschichtet.

Als Kulturmedium wurde zunächst Minimal Essential Medium (MEM; Gibco-Invitrogen), angereichert mit 10% Pferdeserum (Gibco-Invitrogen) und 6% Glucose, verwendet. Drei Stunden später wurden zwei Drittel des Mediums gegen normales Wachstumsmedium ausgetauscht. Als dieses diente MEM, angereichert mit 0,1% Ovalbumin, 5 µg/ml Insulin, 1 mM Pyruvat, 0,1 mM Putrescin, 0,02 µM Progesteron, 0,03 µM Selenium, 100 µg/ml humanem Transferrin und 6% Glucose. Das Neuronenmedium wurde etwa alle drei Tage, je nach Trübung des Mediums zur Hälfte ersetzt. Die Messungen erfolgten 9 bis 15 Tage nach Präparation.

Die Tierhaltung und -tötung wurde gemäß den Richtlinien der Tierschutzkommission des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf durchgeführt. Die Präparation erfolgte im Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg durch Dr. Michaela Schweitzer und Barbara Merz.



**Abbildung 5:** Typische Beispiele für eine Mitralzelle im Bulbus olfactorius (links) mit charakteristischem keulenförmigen Soma und für eine GH<sub>3</sub>/B<sub>6</sub>-Zelle (rechts). Der Pfeil entspricht einer Länge von 100 µm.

### 2.1.2 GH<sub>3</sub>/B<sub>6</sub>-Zellen

600 ml des verwendeten Mediums enthielten:

492 ml (82%) DMEM Med Nut Mix F12 Ham

90 ml (15%) Pferdeserum

15 ml (2,5%) fetales Kälberserum

3 ml (0,5%) 2 mM L-Glutamin

Die Zellen wurden mit 70% Medium, 20% fetalem Kälberserum, 10% DMSO mit ungefähr  $3 \cdot 10^6$  Zellen pro Ampulle eingefroren gelagert und bei Bedarf aufgetaut, damit die Passage nicht zu hoch wird, was die Messungen erschweren würde, da höhere Passagen zu geringeren und inkonstanteren Strömen mit veränderten Eigenschaften neigen. Die Zellen wurden ein Mal pro Woche passagiert. Bei der Umsetzung wurde zunächst das Medium abgesaugt, danach Trypsin-EDTA zugegeben, um die Zellen vom Boden zu lösen und zu vereinzeln. Es folgte, um den Vorgang zu stoppen, die Zugabe von frischem Medium. Durch Aufwirbeln mit einer Pasteurpipette wurden die Zellen vom Boden abgelöst und vereinzelt. Für die Messungen wurden ca.  $4 \cdot 10^4$  Zellen pro Milliliter, nach Abmessung in einer Zählkammer, auf Poly-D-Lysin-beschichtete Glasplättchen überführt, und danach in 35 mm-Zellkulturschalen der Firma Nunc im oben beschriebenen Medium gelagert. Die Experimente an den Zellen wurden ein bis drei Tage nach Passagierung durchgeführt.

## 2.2 Lösungen und Chemikalien

### Lösungen

Für die Patch-Clamp-Messungen wurde jeweils 1 bis 1,5 ml Extrazellulärlösung in eine Nunc-Schale gegeben. Bestandteile der Extrazellulärlösung waren:

100 mM NaCl

40 mM KCl

10 mM Hepes (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure)

5 mM Glucose

4 mM MgCl<sub>2</sub>

2,5 mM EGTA (Ethylenglykoltetraacid)

1 mM CaCl<sub>2</sub>

Die Lösung wurde mit NaOH auf einen pH-Wert von 7,3 titriert. Die Lösung wurde bei 4 °C gelagert.

In die Pipette wurden jeweils 5 bis 8 µl Pipettenlösung gefüllt. Die Pipettenlösung beinhaltete:

140 mM KCl

10 mM Hepes

2 mM MgCl<sub>2</sub>

1 mM CaCl<sub>2</sub>

2,5 mM EGTA

3 mM Mg-ATP

0,3 mM Na-GTP

Die Lösung wurde mit KOH auf einen pH-Wert von 7,3 titriert. Die Lagerung erfolgte aliquotiert im Tiefkühlschrank bei -20 °C.

Hepes diente als Puffer, um einen physiologischen pH-Wert zu erhalten. EGTA ist ein Calciumchelator, wodurch die freie Calciumkonzentration gering gehalten wurde (ca. 50 nM). Mg-ATP und Na-GTP dienten der Stabilisierung der Messung während des Versuchs. Die Messungen erfolgten bei 40 mM K<sup>+</sup>, da aufgrund der oben beschriebenen Abhängigkeit der Stromstärke von der extrazellulären Kaliumkonzentration größere Ströme als bei physiologischer Konzentration zu erwarten waren.

## E-4031

Um den erg-Strom zu isolieren, wurde mit dem erg-Kanal-Blocker E-4031 gearbeitet. E-4031 ist ein Klasse III-Antiarrhythmikum aus der Gruppe der Methansulfonanilide. Zunächst wurde der ungeblockte Strom gemessen. Danach wurde durch eine selbstgebaute Applikationsvorrichtung aus einer Spritze, einem Infusionsschlauch und einer Kanüle, 0,5 bis 1 ml E-4031 in das Wasserbad appliziert, bis auf dem Monitor der charakteristische erg-Haken während eines Testpulses verschwand und damit die vollständige Blockierung der Kanäle anzeigte. Daraufhin wurde der Membranstrom mit blockierten erg-Kanälen gemessen. Schließlich wurde letztere Messung von der Kontrollmessung subtrahiert, so dass der reine erg-Strom dargestellt wurde.

Eine E-4031 Stammlösung wurde in destilliertem Wasser angesetzt. Die Konzentration des Blockers in dieser Lösung betrug 10 mM. Diese Stammlösung wurde bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  in Aliquots gelagert. Vor der Messung wurde sie mit der Extrazellulärlösung auf eine Konzentration von  $10\text{ }\mu\text{M}$  verdünnt. Die verdünnte Lösung wurde jeweils einige Tage bis Wochen bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

## 2.3 Versuchsdurchführung

### 2.3.1 Die Patch-Clamp-Technik

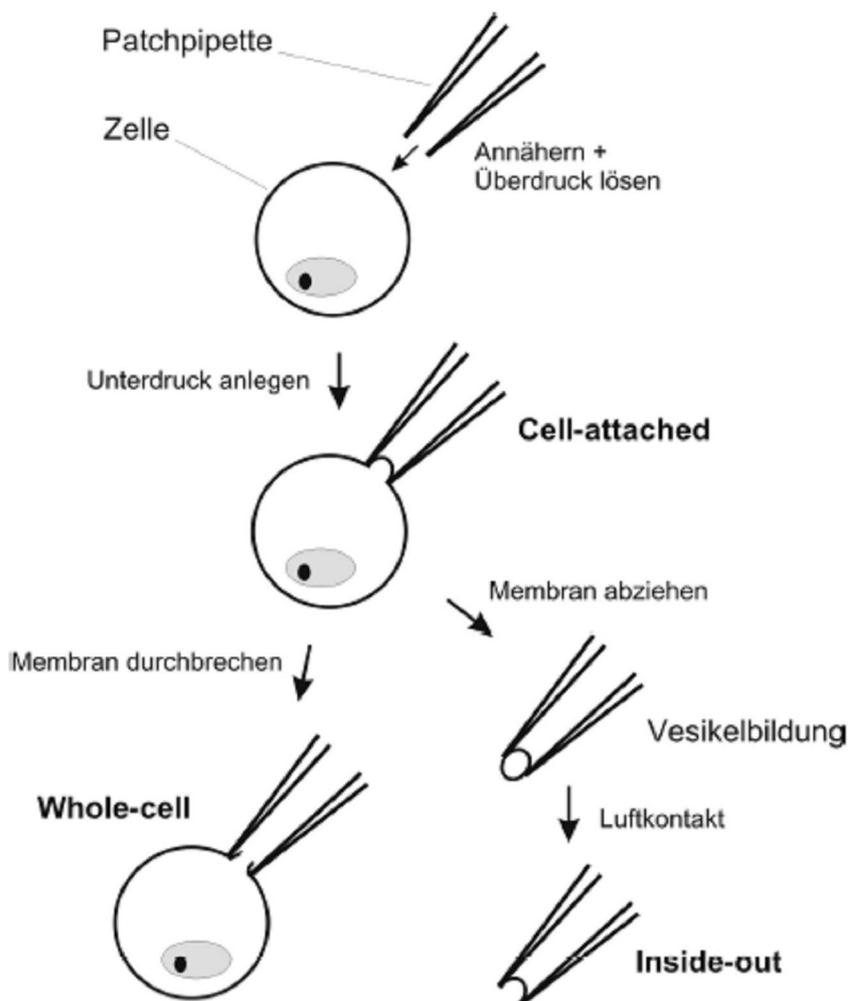
Alle Versuche wurden mit der Patch-Clamp-Technik durchgeführt. Sie wurde 1976 von Erwin Neher und Bert Sakmann entwickelt. Sie ist eine Abwandlung des Voltage-Clamp-Verfahrens, welches bereits Ende der dreißiger Jahre von Kenneth S.Cole und H.J.Curtis entwickelt wurde (Neher und Sakmann, 1976; Hamill et al., 1998).



**Abbildung 6:** An dieser Beispielszelle sieht man, wie die Pipette auf der Zelloberfläche aufliegt.

100  $\mu\text{m}$

Mit Hilfe der Patch-Clamp-Methode lassen sich einzelne Ionenkanäle detailliert untersuchen. Die Einzelkanalströme werden aus dem Hintergrundrauschen herausgelöst, indem ein kleiner Abschnitt der Zellmembran, der Patch, elektrisch von seiner Umgebung isoliert wird. Membranströme werden gegen die geerdete Badlösung gemessen. Eine dünne Glaspipette wird auf die Zellmembran aufgesetzt, so einzelnen Ionenkanälen übergestülpt (Abb. 6 und 7). Beim Kontakt der Pipette mit der Zelloberfläche wird ein leichter Unterdruck angelegt, so dass zwischen Bad und Pipette Abdichtwiderstände im Gigaohm-Bereich entstehen, welche als Gigaseal bezeichnet werden. Um zu verhindern, dass sich Partikel an der Pipettenspitze anlagern, muss vor dem Eintauchen ein leichter Überdruck an die Pipette angelegt werden.



**Abbildung 7: Whole-Cell-Konfiguration:** Zunächst nähert man die Pipette der Zelle an und löst den Überdruck. Nach Kontakt mit der Membran legt man einen Unterdruck an. In der nun folgenden Cell-attached-Konfiguration wird die Membran durch einen kurzen Saugpuls durchbrochen, um den Whole-Cell-Modus zu erhalten. Zieht man stattdessen die Membran ab, erhält man die Inside-out-Konfiguration.

Wenn die Membran an der Glaswand der Pipette klebt, werden verschiedene Manipulationen mit dem Membranfleck möglich, ohne dass die Verbindung abreißt. Neben der Messung von

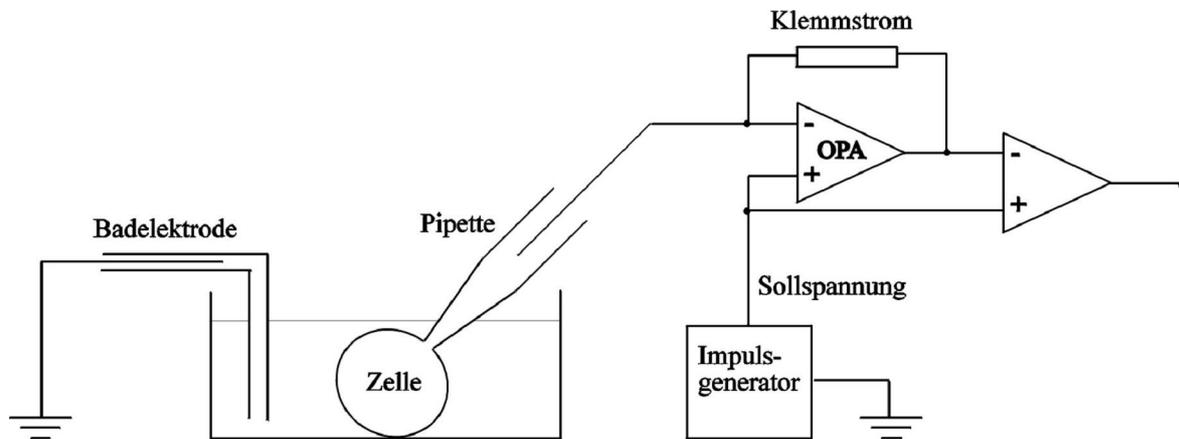
Kanalöffnungen in der cell-attached-Konfiguration (extrazelluläre Ableitung), ist es möglich, das Membranstück durch einen kurzen Saugpuls zu durchbrechen (Whole-cell-Konfiguration). So erhält man Zugang zum Zytoplasma, was der intrazellulären Ableitung entspricht. Ein Zurückziehen der Pipette ermöglicht das Herausreißen des Membranstücks aus der Zellmembran, um eine zellfreie Messung zu erhalten. Je nach Anordnung der Membranstücke zur Badlösung erhält man eine Inside-out- (Abb.7) oder eine Outside-out-Konfiguration.

Zwei Formen der Patch-Clamp-Technik werden benutzt. Mit der Spannungsklemme (Voltage-Clamp) legt man an der Membran ein bestimmtes Potential an, welches zum Öffnen von Ionenkanälen und damit zu Strömen führt. Dieses Membranpotential wird durch einen Verstärker erzeugt, indem ein dem Membranstrom entgegengerichteter Kompensationsstrom gemessen und analysiert wird. Dabei kann an der Zelle eine konstante Spannung aufrecht erhalten werden bzw. gemäß definierten Pulsprotokollen verändert werden. Anders als bei der klassischen Spannungsklemme wird mit nur einer einzigen Elektrode sowohl gemessen als auch Strom injiziert. Die Stromklemme (Current-Clamp) ermöglicht die Messung von Zeitverläufen von Membran- und Aktionspotentialen. Die Patch-Clamp-Technik wird inzwischen weltweit für wichtige Untersuchungen zu Ionenkanälen und Rezeptoren genutzt. Sie ist mittlerweile die meistverwendete Messmethode der Elektrophysiologie.

### 2.3.2 Messprinzip

Das Messprinzip beruht auf der Aufrechterhaltung einer konstanten Spannung über der Zellmembran und der Messung des dafür nötigen Kompensationsstroms. Der Vorverstärker beinhaltet einen Schaltkreis mit Operationsverstärker und Rückkopplungswiderstand. Er fungiert somit als Strom-Spannungs-Wandler. Der Operationsverstärker hat einen Widerstand von etwa  $10^{12}\Omega$ . Daher fließt nahezu kein Strom durch ihn. Er verstärkt die Differenz zwischen Pipettenspannung und der vorgegebenen Spannung. Die Spannung am Ausgang des Operationsverstärkers ist proportional der Differenz der beiden Eingangsspannungen. Parallel dazu ist ein Rückkopplungswiderstand mit geringerem Widerstand geschaltet, über den der Kompensationsstrom fließt, wenn Ionenströme über die Zellmembran zur Abweichung des Membranpotentials von der Sollspannung führen. Dies geschieht so lange bis die Pipetten- und die Kommandospannung gleich sind. Am Ausgang des Strom-Spannungs-Wandlers befindet sich ein Differenzverstärker, der die Sollspannung subtrahiert. So entsteht eine Spannung, die zum Stromfluss durch die Pipette proportional ist. Der Schaltkreis funktioniert

mit einer so großen Geschwindigkeit, dass an der Zelle praktisch immer die Kommandospannung anliegt. Die Badelektrode fungiert dabei als Referenz bzw. Erdung für die Messung (Abb. 8).



**Abbildung 8: Messprinzip der Patch-Clamp-Technik:** Erläuterungen findet man im Text. OPA= Operation Amplifier (Verstärker)

### 2.3.3 Arbeitsplatz

Um die Pipette präzise auf die Membran aufsetzen zu können, wurden die Messungen unter einem inversen Mikroskop (Axiovert 200, Zeiss) durchgeführt, welches für einschichtige kultivierte oder isolierte Zellen am besten geeignet ist. Das Objektiv ist nach oben gerichtet, so dass man von unten auf das Präparat sieht. Dies ermöglicht oberhalb der Zellschale viel Platz für Messpipette und Perfusionssystem. Gearbeitet wurde mit einem 32x-Objektiv. Zusätzlich war an das Mikroskop eine Videokamera angeschlossen, welche das Bild auf einen Monitor übertrug. So konnte der Zustand der Zelle während der Messung unkompliziert und berührungsfrei beobachtet werden und es bestand die Möglichkeit, Fotos von den Zellen zu machen.

Da selbst geringste Bewegungen zwischen Zelle und Pipette die Messungen durch Verlust des Gigaseals unbrauchbar machen können, befand sich das Mikroskop auf einem schwingungsgedämpften Tisch. Um die extrem kleinen Signale ohne elektrische Störsignale messen zu können, war der Messstand von einem Faraday-Käfig umgeben. Am Objektisch war ein elektrischer Mikromanipulator (Patchman, Eppendorf) befestigt. Der Messelektrodenhalter und der Vorverstärker waren auf diesem Mikromanipulator befestigt. Der Mikromanipulator war in drei Dimensionen und mit zwei Geschwindigkeiten beweglich.

An der Seite des Pipettenhalters war ein Schlauch angeschlossen, über den Über- oder Unterdruck auf das Pipetteninnere angelegt werden konnte. Am anderen Schlauchende diente eine Pipettenspitze als Mundstück. Über einen Dreiwegehahn wurde das Anlegen oder Ablassen des Drucks mit dem Mund gesteuert. Ein einfaches Manometer am Schlauch half beim Anlegen des geeigneten Druckes von etwa 2-3 cm Wassersäule. Als Messkammer wurde eine Petrischale (Nunc) im Objektisch platziert. Um die Messkammer herum befand sich eine Messingplatte, die mit Wasser gefüllt war. Die daran angeschlossenen Schläuche führten zu einer Colora-Wärme- und Kühlmaschine. Dort erfolgte eine Erhitzung bzw. Kühlung des Wassers. Mit Hilfe eines Thermometers (Votcraft K101 Digital), dessen Messfühler im Bad platziert wurde, konnte so die gewünschte Badtemperatur eingestellt werden. Als Zulauf für das E-4031 wurde eine nicht temperierte Konstruktion aus einer Spritze, einem Dreiwegehahn, einem Infusionsschlauch und einer Einmalkanüle verwendet.

Der Verstärker bestand aus einem Vorverstärker, der das Stromsignal misst und einem Nachverstärker, dem Hauptverstärker, der das Signal verstärkt und filtert und die Bedienoberfläche bietet. Wie oben erwähnt, wurde der Vorverstärker stabil und erschütterungsfrei am Mikromanipulator befestigt. Als Hauptverstärker wurde der computergesteuerte EPC-9 (Heka) mit Rückkopplungswiderstand und integriertem AD-Wandler verwendet.

Alle elektrischen Geräte waren am Faraday-Käfig oder dem Messtisch geerdet oder befanden sich außerhalb des Käfigs, um Störungen zu verhindern.

Die Messdaten wurden in Echtzeit betrachtet und auf einem PC gespeichert, wo sie aufgenommen, analysiert und dargestellt wurden. Am PC erfolgten auch die Steuerung des Verstärkers und die Potentialvorgabe durch zuvor erstellte Messprotokolle. Als Software diente Pulse Version 8.70 (Heka).

### **2.3.4 Patch-Pipetten und Badelektrode**

Die Pipetten bestanden aus Borosilikatglas. Benutzt wurden GB150T-8P-Pipetten (Science Products). Der Außendurchmesser betrug 1,5 mm, der Wanddurchmesser 0,15 mm. Mit Intrazellulärlösung gefüllt, betrug ihr Widerstand in der Extrazellulärflüssigkeit 2,5 bis 6 M $\Omega$ , was einem Öffnungsdurchmesser von etwa 0,5 bis 1  $\mu$ m entsprach. Die Herstellung der Pipetten für die Versuche erfolgte durch ein programmierbares Pipettenziehgerät (DMZ Universal Puller, Zeitz). Jede Pipette wurde nur einmal und in der Regel am Tag der Herstellung verwendet.

Der Kontakt der Badelektrode bestand ebenfalls aus Borosilikatglas und wurde mit Agarlösung (3% Agar Agar (Fluka Chemie AG) in 150 mM NaCl) gefüllt. Die differente Elektrode, der metallische Leiter, der den Vorverstärker mit der Pipettenlösung verband, bestand aus einem Silberdraht, der mit Silberchlorid überzogen war, nachdem der Draht in verflüssigtes Silberchlorid eingetaucht wurde.

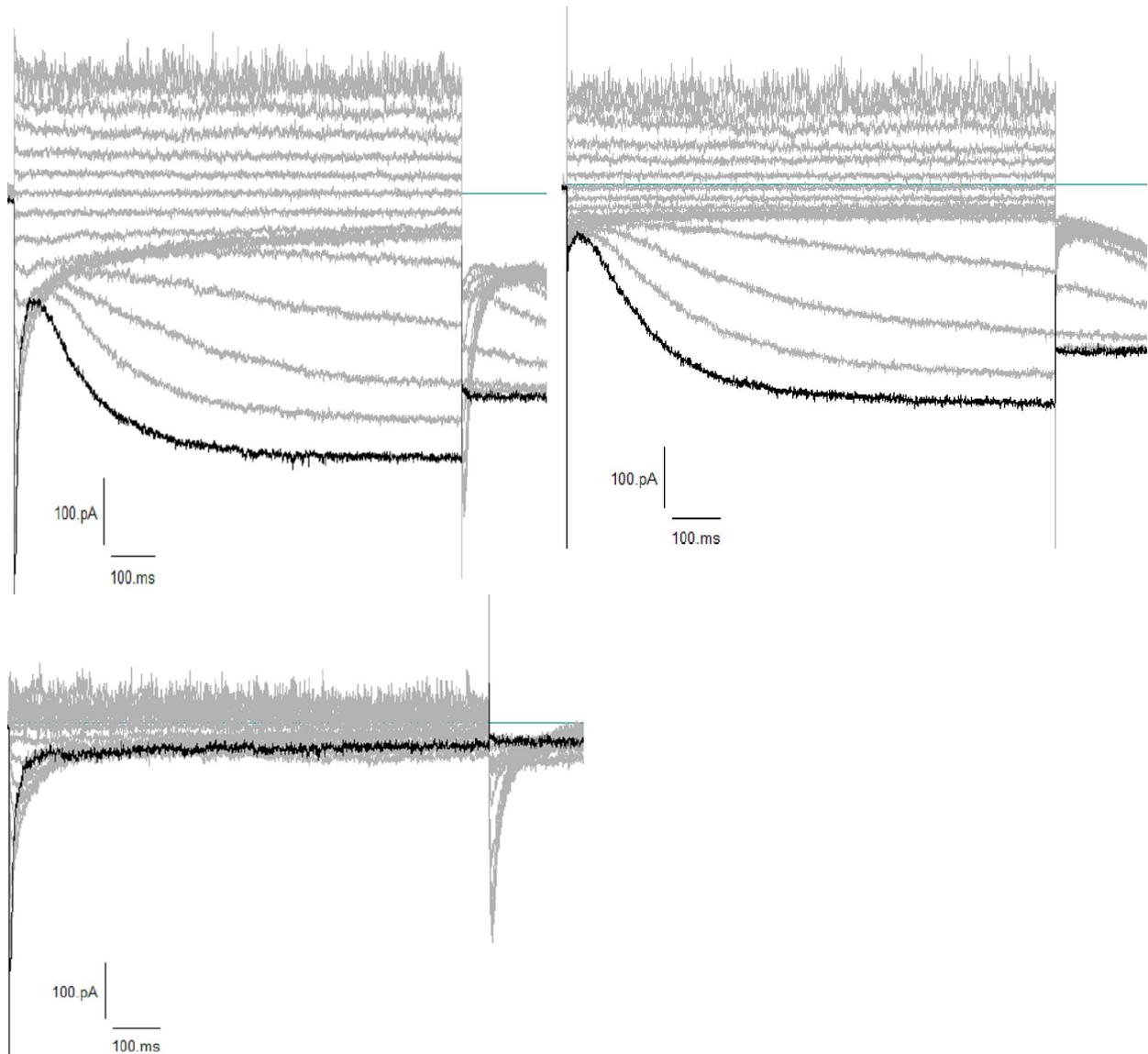
### 2.3.5 Versuchsdurchführung

Für die Arbeit wurden alle Messungen mit der Patch-Clamp-Technik durchgeführt. Alle Messungen waren Whole-Cell-Voltage-Clamp-Messungen.

Zunächst wurde eine geeignete Zelle ausgewählt. Als Kriterien dienten dabei vor allem eine mittlere Zellgröße, eine intakte Membran und die Form, bei GH<sub>3</sub>/B<sub>6</sub>-Zellen möglichst rund. Bei den Mitralzellen zeigten sich die stabilsten Messungen bei Zellen mit keulenförmigem, eher eckigem, homogenem Soma mit einem breiten, am Ende des Zellkörpers mittig gelegenen, verzweigten Primärdendriten (Abb. 4 und 5). Vor Versuchsbeginn wurde die Pipette für wenige Sekunden zum „tip-filling“ in die beschriebene Intrazellulärlösung getaucht, um Luftblasen an der Pipettenspitze zu vermeiden und danach von hinten mit etwa 6 µl der Lösung gefüllt. Nach der Befestigung am Vorverstärker wurde die Pipette mit dem Mikromanipulator unter Blick durch das Mikroskop an die Zelle geführt. Vor Eintauchen in die Badlösung wurde durch die Ventilvorrichtung ein leichter Überdruck auf das Innere der Pipette angelegt, damit die Pipettenspitze nicht durch Verunreinigung in der Badlösung kontaminiert wurde. Das Eintauchen in die Badlösung schloss den Stromkreis und ließ eine Anzeige des Pipettenwiderstands zu. Lag dieser im oben beschriebenen Fenster zwischen 2,5 und 6 MΩ wurde der Versuch fortgeführt. Das gesamte Offset-Potential an den Grenzflächen der Messelektrode und zwischen den unterschiedlich zusammengesetzten Intra- und Extrazellulärlösungen wurde kompensiert.

Nach Kontakt mit der Zellmembran, welcher sich durch Eindellung der Membran und Anstieg des Pipettenwiderstandes darstellte, wurde der Überdruck weggenommen und durch kurzes Saugen an dem mit dem Ventil verbundenen Schlauch ein Unterdrucks angelegt. So wurde ein Gigaseal zwischen Glas und Membran gebildet, gemessen zwischen differenter Elektrode in der Intrazellulärflüssigkeit und Badelektrode. Nach Kompensation der schnellen Kapazität, verursacht durch die Glaspipette in der Lösung, und Einstellung auf ein Potential von -30 mV, wurde durch einen kurzen Saugpuls das Membranstück durchbrochen, um eine Whole-Cell-Messung zu ermöglichen und Zugang zum Inneren der Zelle zu erlangen. Nach

Kompensation der langsamen Komponenten der Kapazität der Zellmembran und Kompensation des Serienwiderstandes zu 60% erfolgte die Ableitung der Ströme durch besondere, im Ergebnisteil beschriebene Puls-Protokolle. Der Serienwiderstand lag vor Kompensation bei allen erfolgreichen Messungen unter 20 M $\Omega$ . Seine Kompensation war erforderlich, da er einen Spannungsabfall verursacht, der zu Messfehlern führt.



**Abbildung 9: Beispiel für die Wirkung von E-4031:** Membranströme im Verfügbarkeitsprotokoll bei einer Messung einer GH<sub>3</sub>/B<sub>6</sub>-Zelle bei 37 °C: Links oben sieht man den nativen Strom mit einem langsam aktivierenden Einwärtsstrom bei Hyperpolarisation, einem so genannten „funny current.“ Rechts oben ist die Messung nach Applikation von E-4031 gezeigt, bei welcher der „funny current“ weiterhin sichtbar ist. Es fehlt jedoch die hakenförmige erg-Komponente zu Beginn der Potentialveränderungen, da der erg-Strom komplett geblockt wurde. Links unten sieht man das Resultat der Subtraktion des Stroms nach Blocker-Applikation vom Kontroll-Strom, den isolierten erg-Strom. Der „funny current“ ist verschwunden, der erg-„Haken“ gut dargestellt.

Die Messungen wurden bei 20 °C als Äquivalent für die Raumtemperatur und bei 37 °C, stellvertretend für die Körpertemperatur durchgeführt. Die Messung erfolgte jeweils an unterschiedlichen Zellen. Eine Messung an der selben Zelle bei zwei Temperaturen war nicht möglich, da einerseits die Zelle bei der Temperaturerhöhung zu sehr belastet wurde und andererseits die Benutzung des erg-Kanalblockers dies verhinderte, da die selben Zellen nach der Blockung bei einer Temperatur nicht bei einer anderen Temperatur erneut ohne Blockung gemessen werden konnten. Die Messung des Zeitgangs der Temperatur wurde somit auch durch die Irreversibilität des Blockers verhindert.

Die Einstellung der Temperatur auf 20 bzw. 37 °C erfolgte mit Hilfe der Colora-Wärme- und Kühlmaschine. Zunächst wurde der native Strom gemessen, danach 10 µM E-4031 mit einer Geschwindigkeit von 380 bis 430 µl pro Minute appliziert. Es folgte eine weitere Messung mit gleichem Pulsprotokoll mit geblocktem erg-Kanal. Schließlich wurde letztere Messung von der ersten Messung subtrahiert, so dass nur der E-4031-sensitive erg-Strom übrig blieb und ausgewertet werden konnte (Abb. 9).

Für den Temperaturvergleich wurden verschiedene später beschriebene Messprotokolle benutzt. Pro Protokoll, pro Temperatur und pro Zelllinie wurden jeweils 10 Zellen gemessen und verglichen.

### 2.3.6 Datenerfassung und –auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit Pulse Version 8.70 (Heka), PulseFit Version 8.65 (Heka), Igor Pro Version 4.0.4.0 (Wave Metrics) und Microsoft Excel durchgeführt. Für die Messungen wurden die im Ergebnisteil vorgestellten Messprotokolle verwendet.

Für die Auswertung der Tailstromamplituden, definiert als Maxima der Einwärtsströme als Resultat aus Erholung von der Inaktivierung und langsam nachfolgender Deaktivierung, im folgenden „tails“ genannt, des Verfügbarkeitsprotokolls und der Aktivierung wurde in Pulse der Mittelwert des Bereichs um das Maximum des erg-Hakens gegen die jeweilige Spannung aufgetragen und in Igor übertragen. Dort wurde eine sigmoidale Anpassung an die Datenpunkte („fit“) nach der Boltzmannfunktion:

$$f(x) = \text{base} + \text{max} / ( 1 + \exp ((V_{0,5} - x) / \text{rate} ))$$

durchgeführt. Die x-Achse gibt die Spannung, die y-Achse die Stromstärke an. „Base“ ist dabei die minimale Abweichung des Fits von der x-Achse. „Max“ entspricht der Amplitude zwischen dem kleinsten und größten y-Wert des Fits.  $V_{0,5}$  beschreibt den x-Wert, bei dem die halbmaximale Amplitude erreicht ist. Rate ist ein Wert für die Steigung und beschreibt die

Differenz der x-Werte die zu den y-Werten bei  $1/e$  (~37%) und  $1-1/e$  (~63%) gehören. Je kleiner der Wert, desto steiler ist die Funktion. Im angegebenen Bereich besteht die größte Dynamik der Kurve.

Zunächst wurde der „base“-Wert von den Datenpunkten abgezogen, um zu erreichen, dass der Graph bei  $y = 0$  startet. Darauf wurde der entstandene Wert durch den „max“-Wert geteilt. So erhielt man einen Graphen, der zwischen den y-Werten 0 und 1 verlief. Die Werte für Amplitude,  $x_{\text{half}}$  und rate wurden in Excel übertragen und dort für die verschiedenen Temperaturen verglichen. Zunächst wurden Mittelwert, Standardabweichung und Standardfehler für die jeweiligen Messreihen errechnet. Dann wurden beide Messreihen durch einen t-Test miteinander verglichen, um zu prüfen, ob statistisch signifikante Unterschiede vorlagen. Verwendet wurde ein heteroskedastischer (zwei Stichproben, ungleiche Varianz), zweiseitiger t-Test. Als signifikant wurden p-Werte kleiner als 0,05 betrachtet. In den Abbildungen findet man drei Signifikanzschranken von 0,05, 0,01 und 0,001, die mit einem bis drei Sternen angezeigt werden.

Beim „Envelope of tails“-Protokoll zur Ermittlung der Zeitkonstante bzw. des Zeitverlaufs der Aktivierung wurden ebenfalls die „tail“-Amplituden in Igor übertragen. Allerdings wurden die Maxima hier gegen die Zeitdauer des variablen Pulses aufgetragen (x-Achse: Zeit, y-Achse: Stromstärke). Es erfolgte ein exponentieller Fit nach der Formel:

$$f(t) = y_0 + A * \exp(-t / \tau).$$

Die Summe von  $y_0$  und A ergab die Abweichung des Graphen von der x-Achse. A entsprach der Amplitude vom niedrigsten zum höchsten Y-Wert.  $1/\tau$  war der Kehrwert der Zeitkonstante, die angibt zu welchem Zeitpunkt der Graph auf  $1/e$  des Ausgangswertes abgefallen ist. Zur Normierung wurde die Summe von  $y_0$  und A von den Daten subtrahiert, das Ergebnis danach durch  $-A$  geteilt. Die Zeitkonstanten wurden durch Kehrwertbildung von  $\text{invtau}$  errechnet und in Excel übertragen, dort wie oben beschrieben bearbeitet. Zusätzlich wurde der  $Q_{10}$ -Wert errechnet, der angibt wie stark sich ein Prozess bei einer Temperaturerhöhung um  $10^\circ\text{C}$  beschleunigt. Die Formel hierfür lautet:

$$Q_{10} = (\tau_1 / \tau_2)^{(10 / (T_2 - T_1))}.$$

$\tau_1$  und  $T_1$  waren jeweils Zeitkonstante und Temperatur für die Messungen bei  $20^\circ\text{C}$ ,  $\tau_2$  und  $T_2$  die Werte für die Experimente bei  $37^\circ\text{C}$ , so dass jeweils galt:

$$Q_{10} = (\tau_{20} / \tau_{37})^{(10 / 17)}.$$

Um die Zeitkonstanten von Deaktivierung, Inaktivierung und Erholung von der Inaktivierung zu erhalten, wurden die Kurven in Pulse fit jeweils mit einer Exponentialfunktion:

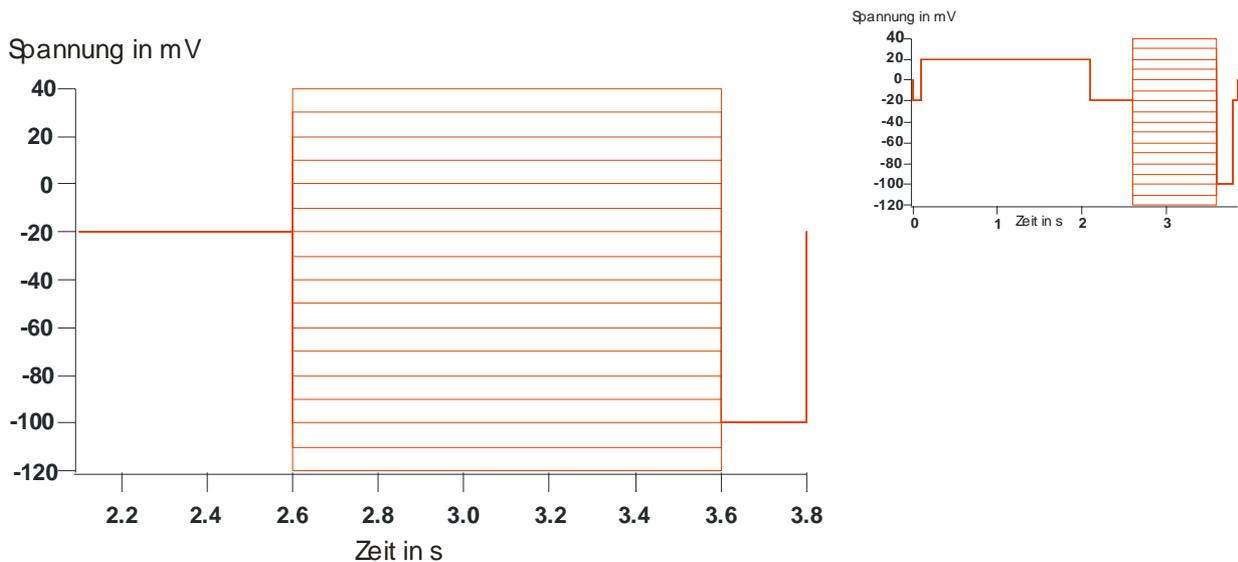
$$f(t) = I_{\text{min}} + I_{\text{max}} * \exp(-t/\tau)$$

gefittet. Für die Deaktivierung wurde der Bereich von kurz hinter dem Maximum des erg-Hakens bis zum Erreichen des stationären Stroms verwendet, für die Inaktivierung der Abschnitt vom Maximum bis zum Erreichen des stationären Stroms und für die Erholung von der Inaktivierung der Bereich nach der Kapazität vom Beginn des erg-Hakens bis zu seinem Maximum. Die Werte wurden in Igor graphisch dargestellt und in Excel wie oben beschrieben bezüglich Signifikanz und  $Q_{10}$ -Wert statistisch ausgewertet.

## 3 Ergebnisse

Die Untersuchung der Temperaturabhängigkeit verschiedener biophysikalischer Parameter erfolgte mithilfe spezieller Messprotokolle. Es wurden jeweils zehn Zellen pro Protokoll, Zellart und Temperatur verglichen.

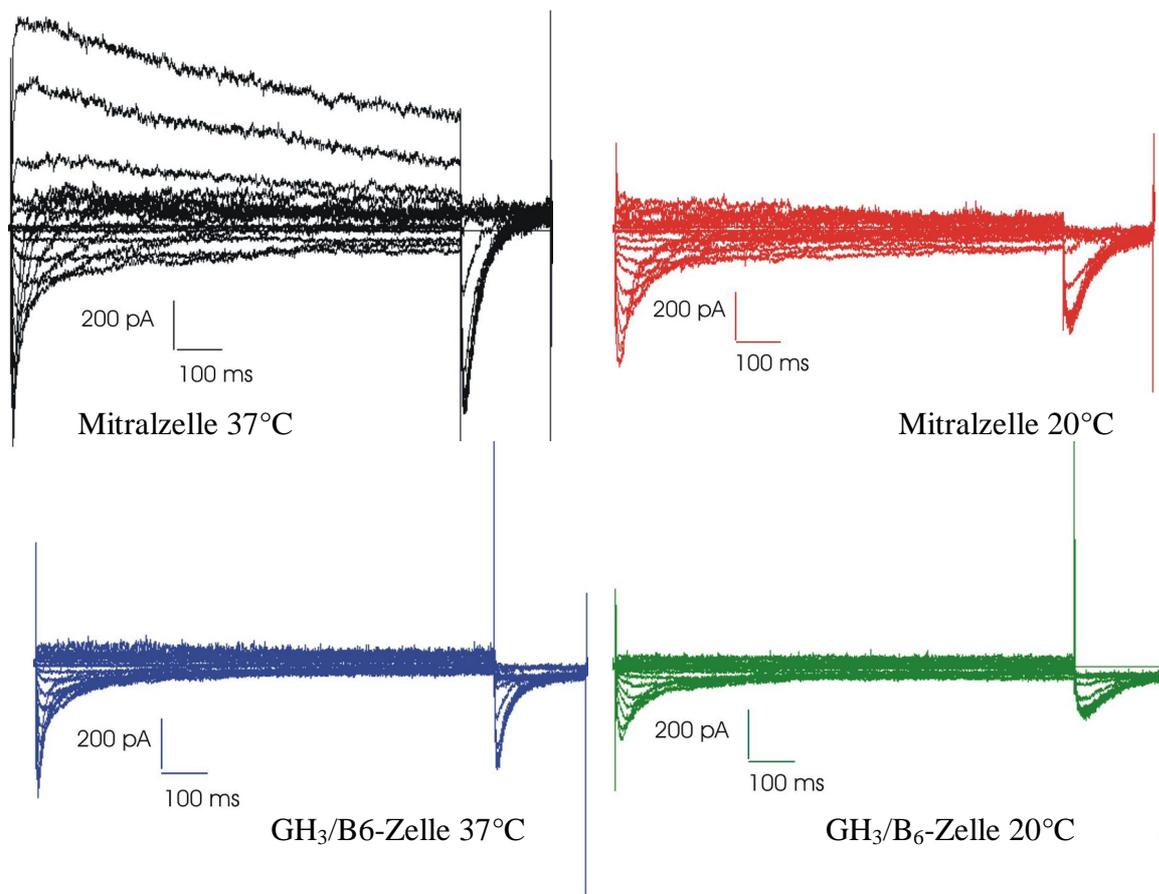
### 3.1 Verfügbarkeit



**Abbildung 10: Verfügbarkeitsprotokoll:** Das Haltepotential betrug  $-20$  mV. Zum Öffnen und Inaktivieren der Kanäle wurde für zwei Sekunden auf  $+20$  mV depolarisiert. Nach einem  $0,5$  s-Puls auf  $-20$  mV erfolgte der variable Puls, der jeweils eine Sekunde dauerte. Die Spannung der Testpulse wurde in  $10$  mV-Schritten zwischen  $+40$  und  $-120$  mV verändert. Die „tails“ wurden nach Beginn der abschließenden  $200$  ms dauernden Hyperpolarisation auf  $-100$  mV gemessen.

Zunächst wurde mit dem Verfügbarkeits-Protokoll gearbeitet (Abb. 10). Das Haltepotential zu Beginn der Messung betrug  $-20$  mV. Es folgte eine zwei Sekunden dauernde Depolarisation auf  $+20$  mV. Diese bewirkte die Aktivierung und anschließende Inaktivierung der erg-Kanäle. Da jedoch bei dieser Spannung andere endogene Kanäle ebenfalls öffnen, folgte ein  $0,5$  Sekunden dauernder Puls auf  $-20$  mV, bei welchem der vollaktivierte Status für erg-Kanäle, nicht jedoch für die meisten anderen Kanäle aufrecht erhalten wurde. Durch die schnelle Inaktivierung lag vor der folgenden Spannungsänderung nahezu kein erg-Strom mehr vor. Es folgte der eine Sekunde dauernde variable Puls auf ein Potential, das in  $10$  mV-Schritten zwischen  $+40$  und  $-120$  mV verändert wurde. Bei sehr negativen Spannungen ergab sich aufgrund der schnellen Erholung von der Inaktivierung ein Einwärtsstrom, wenn die

Spannung negativer als das Umkehrpotential war. Aufgrund der langsameren Deaktivierung fand sich hier der charakteristische erg-Haken. Je nach Temperatur und Zellart war die Deaktivierung bei sehr negativen Potentialen bereits nach weniger als 100 ms vollständig abgeschlossen, so dass sich bis zum Ende des Pulses ein stationärer Strom ergab. Die Hakenfigur war in der Regel nur im Bereich zwischen  $-70$  und  $-120$  mV vorhanden. Bei positiveren Werten ergab sich lediglich ein geringer E-4031-sensitiver Ein- bzw. Auswärtsstrom (Abb. 11).



**Abbildung 11:** Beispiele für typische Ableitungen mit dem Verfügbarkeitsprotokoll bei den unterschiedlichen Messreihen. Die Versuche mit den Bulbuszellen sind in schwarz (37°C) und rot (20°C), die Experimente mit den GH<sub>3</sub>/B<sub>6</sub>-Zellen in blau (37°C) und grün (20°C) dargestellt. Der Maßstab ist in allen Versuchen identisch. Die Aufzeichnung begann hier mit dem variablen Puls, nach dessen Beginn der Einwärtsstrom durch die Erholung von der vorhergehenden Inaktivierung erfolgte. Es folgte die langsamere Deaktivierung, für die Zeitkonstanten bestimmt wurden. Zum Ende des Pulses bestand bei manchen Potentialen ein stationärer Zustand. Am Ende der Stromspuren sieht man jeweils die Stromantwort auf die 200 ms dauernde Hyperpolarisation auf  $-100$  mV, bei welcher die erg-Stromamplitude gemessen wurden. Die hier ausgewählten typischen Beispiele zeigen deutlich, dass die Stromamplitude bei den Bulbuszellen größer ist und bei beiden Zellarten mit höherer Temperatur größer wird. Desweiteren sieht man durch die schnelleren Zeitkonstanten der Erholung von der Inaktivierung und der Deaktivierung wesentlich steiler abfallende Hakenfiguren bei den 37°C-Versuchen. Die großen Auswärtsströme bei der 37 °C-Bulbusmessung stellen ein Mess- bzw. Subtraktionsartefakt dar.

Auf den variablen Puls folgte für 200 ms ein konstanter Puls auf  $-100$  mV, bevor zum Haltepotential zurückgekehrt wurde. Der Puls auf  $-100$  mV führte bei den Potentialen, bei denen die erg-Kanäle noch nicht vollständig deaktivierten, zum erg-Haken mit Erholung von der Inaktivierung und Deaktivierung. Im Bereich um  $V_{0,5}$  galt: Je positiver, also depolarisierender, der variable Puls, desto größer war die Amplitude beim Abschlusspuls. Auf diesen Puls bezieht sich der Name des Protokolls, da dieses ersichtlich macht, wie viele erg-Kanäle nach dem variablen Puls noch verfügbar sind.

Es erfolgte alle fünf Sekunden ein Durchlauf des Protokolls, mit jeweils um 10 mV veränderter Spannung des variablen Pulses.

Bei etwa der Hälfte der Versuche bei  $37$  °C, fand sich bei beiden Zellarten beim ungeblockten Kontroll-Strom ein „funny current“, ein langsam aktivierender Einwärtsstrom, der bei hyperpolarisierenden Potentialen ab  $-80$  mV fließt. Dieser wurde allerdings beim sensitiven Strom subtrahiert und spielte für die Auswertung somit keine Rolle. Dieser Strom fand sich nicht bei  $20$  °C-Messungen bei  $\text{GH}_3/\text{B}_6$ -Zellen und nur bei zwei Messungen bei Bulbuszellen bei  $20$  °C.

### 3.1.1 Spannungsabhängigkeit der Verfügbarkeit

Um die Spannungsabhängigkeit der Verfügbarkeit auszuwerten, wurden die maximalen Amplituden der tail-Ströme während des Pulses auf  $-100$  mV gemessen und gegen die Spannung des vorangegangenen variablen Pulses aufgetragen. Es ergab sich jeweils eine sigmoidale Beziehung der Messdaten, die mit einer Boltzmann-Funktion gefittet wurden. Von jedem der zehn Versuche wurde so ermittelt, bei welchem Potential die halbmaximale Stromstärke vorlag, wie groß der Steigungsfaktor  $k$  war und welche Amplitude erreicht wurde. Es wurden für jede Messreihe ein Durchschnittswert und Standardfehler des Mittelwerts ermittelt. Für die graphische Darstellung erfolgten noch eine Normierung der Stromamplituden auf Werte zwischen 0 und 1 und ein „fit“ der Mittelwertskurve. In Klammern hinter den Durchschnittswerten ist jeweils der Standardfehler des Mittelwerts angegeben.

Bezüglich des  $V_{0,5}$ -Wertes, also der Spannung, bei der die Hälfte der Kanäle deaktiviert vorlag, ergab sich bei den  $\text{GH}_3/\text{B}_6$ -Zellen ein Unterschied von  $-61,18$  mV ( $\pm 1,71$  mV) bei  $20$  °C zu  $-51,58$  mV ( $\pm 1,71$  mV) bei  $37$  °C, also eine Differenz von  $9,60$  mV in depolarisierende Richtung. Der p-Wert, ermittelt im t-Test, betrug hierfür  $p = 8,90 \cdot 10^{-4}$ . Bei den Mitralzellen fanden sich bei  $20$  °C  $V_{0,5} = -64,12$  mV ( $\pm 0,99$  mV), bei  $37$  °C  $V_{0,5} = -56,18$  mV ( $\pm 1,01$  mV).

Die Differenz betrug hier 7,94 mV. Der p-Wert lag bei  $2,45 \cdot 10^{-5}$ . Bei beiden Zellarten fand sich somit bei den verschiedenen Temperaturen ein beträchtlicher, deutlich signifikanter Unterschied zwischen dem Potential der halbmaximalen Amplitude mit weniger negativen Werten bei höheren Temperaturen (Abb.12). Der Unterschied war bei GH<sub>3</sub>/B<sub>6</sub>-Zellen geringfügig größer als bei den Bulbuszellen. Wie bedeutsam die Verschiebung von V<sub>0,5</sub> für die Experimente ist, zeigt sich darin, dass bei Bulbuszellen bei einem Potential von -60 mV bei 20 °C nach einer Sekunde noch etwa 64% des Maximalstroms verfügbar sind, während bei 37 °C nur noch etwa 34% verfügbar sind. Bei GH<sub>3</sub>/B<sub>6</sub>-Zellen betragen diese Werte bei gleicher Spannung 55% bei 20 °C und 25% bei 37 °C. Misst man in diesem Bereich, liegt also mit einem Unterschied von 30 Prozentpunkten eine starke Temperaturabhängigkeit vor.

Nun wurde der Steigungsfaktor k untersucht. Bei GH<sub>3</sub>/B<sub>6</sub>-Zellen betrug er bei 20 °C  $k = 7,58$  mV ( $\pm 1,10$  mV), bei 37 °C  $k = 7,48$  mV ( $\pm 1,30$  mV). Der p-Wert betrug 0,87. Die Steigung war hier also nahezu identisch und wies für die zwei Temperaturen keinen signifikanten Unterschied auf. Bei den Bulbuszellen veränderte sich k von einem Wert von 5,66 mV ( $\pm 0,72$  mV) bei 20 °C auf  $k = 6,58$  mV ( $\pm 1,73$  mV) bei 37 °C. Dabei war  $p = 0,15$  und lag ebenfalls außerhalb des Signifikanzbereiches. Die Steigung der Spannungsabhängigkeit der Verfügbarkeit ist somit nicht temperaturabhängig. Auffällig ist die etwas steilere Steigung bei den Mitralzellen bei beiden Temperaturen gegenüber den GH<sub>3</sub>/B<sub>6</sub>-Zellen.

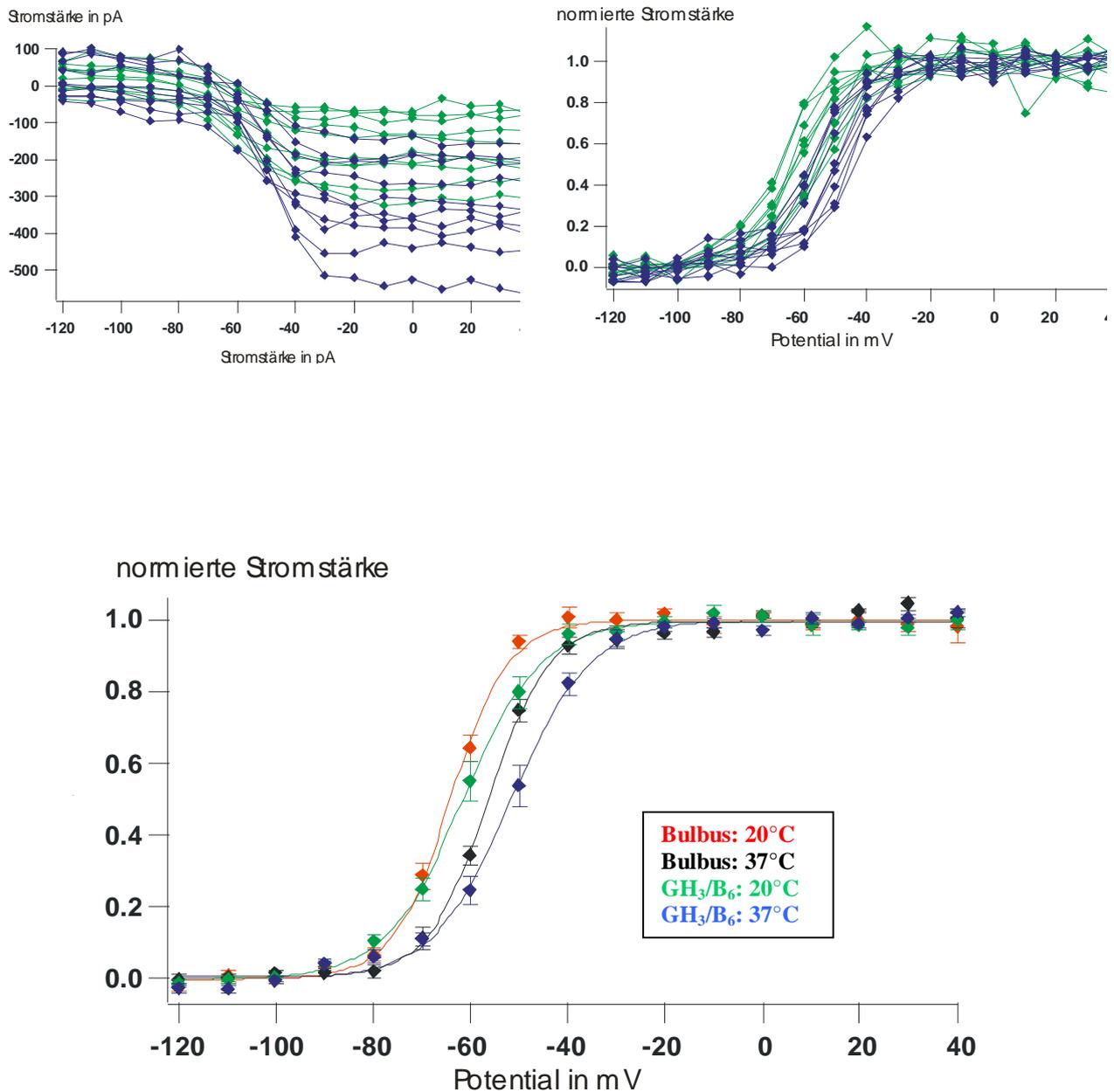
Der letzte beim „tail“ untersuchte Parameter war die Strom-Amplitude. Diese erzielte bei den GH<sub>3</sub>/B<sub>6</sub>-Zellen bei 20 °C einen Wert von 190 pA ( $\pm 22$  pA) und bei 37 °C einen Wert von 333 pA ( $\pm 34$  pA). Der Signifikanztest ergab  $p = 0,0032$ . Bei den Bulbuszellen ergaben sich generell größere Amplituden. Bei 20 °C wurde eine Amplitude von 421 pA ( $\pm 53$  pA), bei 37 °C von 675 pA ( $\pm 100$  pA) ermittelt. Hier war der Unterschied mit  $p = 0,042$  ebenfalls signifikant. In den Experimenten wiesen die GH<sub>3</sub>/B<sub>6</sub>-Zellen eine etwas stärkere Temperaturabhängigkeit der Amplitude der erg-Ströme auf. Bei 37 °C betrug die Amplitude das 1,75-fache des Wertes bei 20 °C, bei den Bulbuszellen betrug der Faktor 1,60.

Um die Ursache für die Erhöhung der Amplitude näher zu bestimmen, wurde eine Berechnung der Stromdichte vorgenommen, um auszuschließen, dass die Größe der gemessenen Zellen die Ursache darstellt. Dafür wurde die Amplitude durch die in 2.3.5 beschriebene langsame Kapazität der Zellmembran, die bei der Kompensation gemessen wurde, geteilt.

Dabei ergaben sich bei den GH<sub>3</sub>/B<sub>6</sub>-Zellen bei 20 °C eine Kapazität von 15,1 pF ( $\pm 1,0$  pF), und somit eine Stromdichte von 12,3 A/F ( $\pm 0,9$  A/F) und bei 37 °C eine Kapazität von 19,0 pF ( $\pm 2,3$  pF) und eine Stromdichte von 18,4 A/F ( $\pm 1,9$  A/F). Daraus ergab sich ein

signifikanter Anstieg der Stromdichte bei 37 °C gegenüber der Stromdichte bei 20 °C mit einem p-Wert von 0,013, so dass die Größe der Zellen nicht als Ursache für den Anstieg der Amplitude der Stromstärke angesehen werden kann.

Bei den Bulbuszellen erhielt man bei 20 °C eine Kapazität von 16,3 pF ( $\pm 1,3$  pF) und eine Stromdichte von 27,0 A/F ( $\pm 3,8$  A/F), bei 37 °C eine Kapazität von 22,1 pF ( $\pm 1,8$  pF) und eine Stromdichte von 29,8 A/F ( $\pm 2,9$  A/F). Bei einem Wert von  $p= 0,58$  gab es dadurch keinen signifikanten Anstieg der Stromdichte bei Bulbuszellen. Der Anstieg der Stromamplitude war folglich durch die Größe der Zellen mitbedingt, auch wenn die Stromdichte bei 37 °C trotzdem höher war als bei 20 °C.



**Abbildung 12: Spannungsabhängigkeit der Verfügbarkeit der erg-Ströme:** Die Maxima der tail-Ströme wurden gegen das Potential des variablen Pulses aufgetragen (Bild links oben). Zu sehen sind in der Abbildung jeweils 10 Messungen von GH<sub>3</sub>/B<sub>6</sub>-Zellen bei 20 °C (grün) und 37 °C (blau). Zu erkennen ist bereits die im Mittel größere Amplitude der Experimente bei höherer Temperatur. Danach wurden die Kurven auf Werte zwischen 0 und 1 normiert (oben rechts). Werte kleiner 0 und größer 1 sind durch die Normierung der Daten auf die fit-Werte zu erklären. Hier ist schon zu sehen, dass die Verfügbarkeitskurven bei 37 °C in depolarisierende Richtung verschoben sind und dass die Steigung sich nicht wesentlich unterscheidet.

Im unteren Bild sieht man die fits der Mittelwertkurven der verschiedenen Messreihen. Bemerkenswert ist in erster Linie die Temperaturabhängigkeit bei beiden Zellarten mit einer Rechtsverschiebung von  $V_{0,5}$ . Erkennbar ist ebenso ein Unterschied der Steigung zwischen den Zellarten, nicht jedoch zwischen den Temperaturen.

### 3.1.2. Zeitkonstanten der Deaktivierung

Um die Zeitkonstante der Deaktivierung, die Zeit nach welcher der maximale Strom auf  $1/e$  abgefallen ist, zu erhalten, wurde der Einwärtsstrom während der variablen Pulse ausgewertet. Je kleiner die Zeitkonstante, desto schneller ist die Kinetik. Es wurde jeweils eine Exponentialfunktion an die Stromspur vom Maximum des „Hakens“ bis zum Ende des Pulses angepasst und so die Zeitkonstante ermittelt. In der Literatur wurde die Zeitkonstante der Deaktivierung oft mit zwei Exponentialfunktion mit einer schnellen und einer langsamen Komponente ausgewertet (Rosati et al., 1998). Bei den vorliegenden Experimenten gab jedoch der fit mit nur einer Exponentialfunktion den Verlauf der Kurve besser wieder. Da nur bei Potentialen negativer als  $-60$  mV eine sichtbare Erholung von der Inaktivierung sowie eine deutliche Deaktivierung stattfand, wurde nur der Bereich zwischen  $-70$  und  $-120$  mV ausgewertet. In Abbildung 14 ist die Potentialabhängigkeit der Zeitkonstanten dargestellt. In der folgenden Tabelle (Tab. 1) sind die Mittelwerte der Zeitkonstanten mit ihren Standardfehlern bei den einzelnen Messreihen aufgeführt.

Potential [mV]	GH <sub>3</sub> /B <sub>6</sub> : 20 °C τ [ms]	GH <sub>3</sub> /B <sub>6</sub> : 37 °C τ [ms]	Mitralzellen: 20 °C τ [ms]	Mitralzellen: 37 °C τ [ms]
-120	49,1 (± 3,3)	20,2 (± 2,2)	32,2 (± 2,1)	17,2 (± 2,3)
-110	67,9 (± 4,2)	26,4 (± 2,0)	46,1 (± 2,2)	26,4 (± 3,1)
-100	97,4 (± 4,3)	38,7 (± 2,6)	70,4 (± 3,4)	39,2 (± 4,7)
-90	152,5 (± 6,9)	53,4 (± 4,7)	101,6 (± 5,9)	62,7 (± 8,7)
-80	260,7 (± 13,9)	93,3 (± 10,8)	173,6 (± 9,5)	104,5 (± 12,8)
-70	470,0 (± 35,5)	187,4 (± 27,6)	342,0 (± 19,4)	193,1 (± 19,0)

**Tabelle 1:** Potentialabhängigkeit der Zeitkonstanten der Deaktivierung der unterschiedlichen Messreihen. In Klammern ist jeweils der Standardfehler des Mittelwerts angegeben.

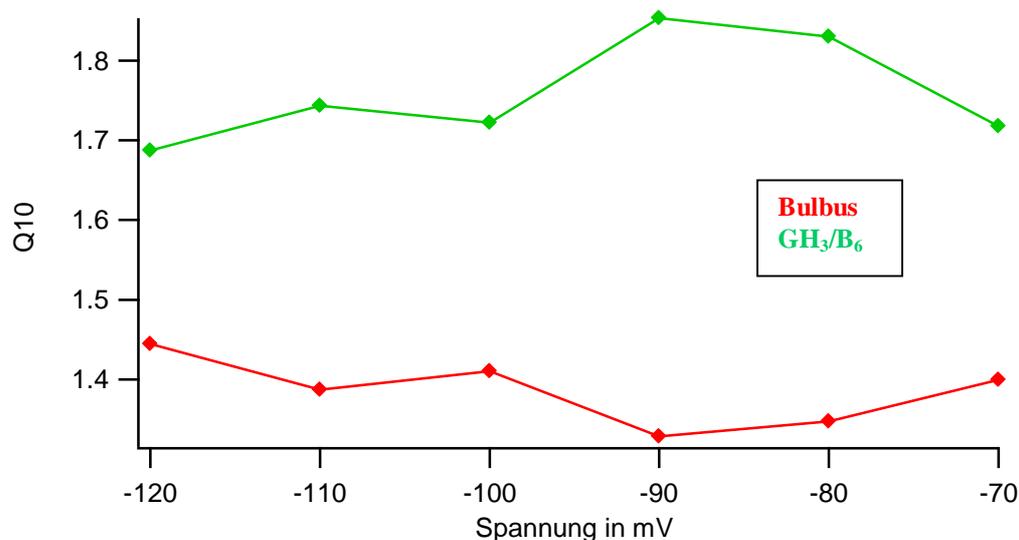
Je negativer das Potential während des variablen Pulses war, desto schneller war die Zeitkonstante, die im Vergleich zu der Spannung bei  $-120$  mV bei  $-70$  mV in jeder Versuchsreihe ungefähr zehn mal größer war. Der Wert der Zeitkonstanten stieg exponentiell an. Die Kinetik der Bulbuszellen erwies sich bei Raumtemperatur als signifikant schneller im Vergleich zu den GH<sub>3</sub>/B<sub>6</sub>. Bei 37 °C hingegen war die Zeitkonstante der GH<sub>3</sub>/B<sub>6</sub>-Zellen unwesentlich geringer. Bei beiden Zellarten ergab sich eine deutliche Beschleunigung der Deaktivierung bei Temperaturerhöhung. Um dies zu quantifizieren wurde der Q<sub>10</sub>-Wert

ausgerechnet und gegen das Potential aufgetragen. In der folgenden Tabelle (Tab. 2) findet man außerdem die p-Werte der Veränderung der Zeitkonstanten bei der jeweiligen Spannung.

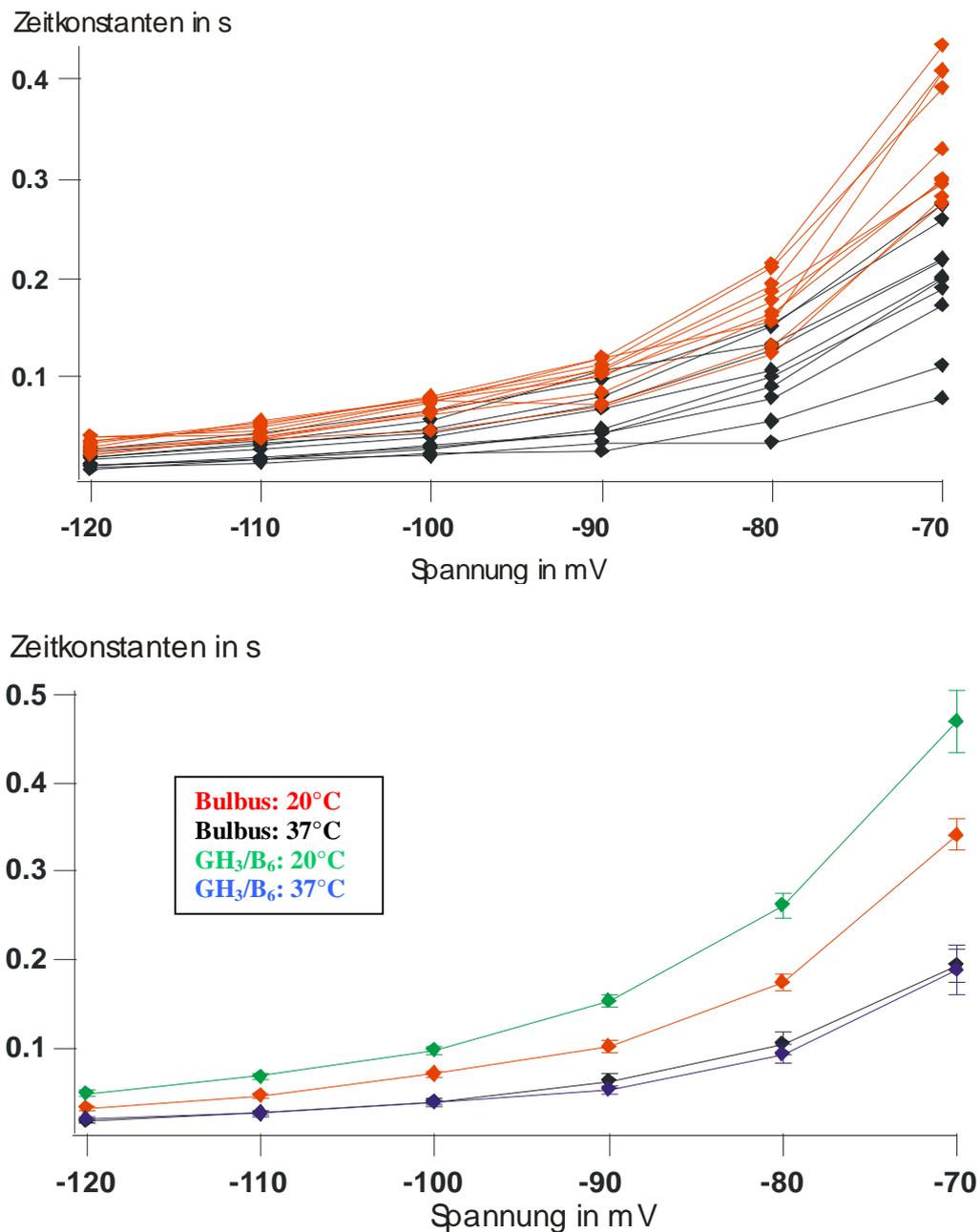
Potential [mV]	GH <sub>3</sub> /B <sub>6</sub> -Zellen: p-Werte	Mitralzellen: p-Werte	GH <sub>3</sub> /B <sub>6</sub> -Zellen: Q <sub>10</sub>	Mitralzellen: Q <sub>10</sub>
-120	$2,07 \cdot 10^{-6}$	$1,19 \cdot 10^{-4}$	1,69	1,45
-110	$7,58 \cdot 10^{-7}$	$9,16 \cdot 10^{-5}$	1,74	1,39
-100	$7,36 \cdot 10^{-9}$	$5,65 \cdot 10^{-5}$	1,72	1,41
-90	$2,53 \cdot 10^{-9}$	0,0019	1,85	1,33
-80	$3,30 \cdot 10^{-8}$	$4,73 \cdot 10^{-4}$	1,83	1,35
-70	$8,31 \cdot 10^{-6}$	$3,23 \cdot 10^{-5}$	1,72	1,40

**Tabelle 2:** p- und Q<sub>10</sub>-Werte für den Vergleich der Zeitkonstanten der Deaktivierung bei 20 ° und 37 °C für GH<sub>3</sub>/B<sub>6</sub>- und Mitralzellen

Es ergaben sich für beide Zellarten für alle Potentiale sehr kleine p-Werte, die eine eindrucksvolle Signifikanz belegen. Die Q<sub>10</sub>-Werte schwankten bei den GH<sub>3</sub>/B<sub>6</sub>-Zellen zwischen 1,69 und 1,85. Der Mittelwert ergab 1,76. Deutlich geringere Werte fanden sich bei den Mitralzellen mit Q<sub>10</sub>-Veränderungen zwischen 1,33 und 1,45, im Mittel 1,39 (Abb. 13). Wie sich schon durch die sehr ähnlichen Werte beider Zellarten bei 37 °C und der signifikant schnelleren Kinetik der Bulbuszellen bei 20 °C zeigte, war der Temperaturunterschied des Zeitgangs der Deaktivierung bei GH<sub>3</sub>/B<sub>6</sub>-Zellen deutlich größer. Die Q<sub>10</sub>-Werte zeigten sich weitgehend spannungsunabhängig.



**Abbildung 13:** Q<sub>10</sub>-Werte der Zeitkonstanten der Deaktivierung bei GH<sub>3</sub>/B<sub>6</sub>- (grün) und Bulbuszellen (rot) im Verhältnis zur Spannung.



**Abbildung 14:** Im oberen Bild sind die Zeitkonstanten der Deaktivierung der jeweils zehn Messungen pro Temperatur bei den Bulbuszellen gegen die Spannung aufgetragen. Man kann erkennen, dass die 37 °C-Messungen (schwarz) wesentlich kleinere Zeitkonstanten besitzen als die 20 °C-Messungen (rot). Im unteren Bild sind die Mittelwertskurven der vier Messreihen dargestellt. Bei 37 °C erkennt man keinen Unterschied zwischen GH<sub>3</sub>/B<sub>6</sub>- und Bulbuszellen. Bei 20 °C ist die Kinetik der GH<sub>3</sub>/B<sub>6</sub>-Zellen jedoch deutlich langsamer.

### 3.1.3. Zeitkonstanten der Erholung von der Inaktivierung

Ebenfalls aus dem Verfügbarkeitsprotokoll wurde die Zeitkonstante der Erholung von der Inaktivierung ausgewertet. Hierfür wurde zu Beginn des variablen Pulses der Bereich vom Beginn des Einwärtsstroms bis zu seinem Maximum mit einer Exponentialfunktion gefittet. Wie bei der Deaktivierung konnte nur der Bereich zwischen  $-70$  und  $-120$  mV ausgewertet werden, da bei kleineren Potentialen in der Regel die Erholung von der Inaktivierung nicht deutlich sichtbar war. Auch hier wurden die Zeitkonstanten gegen das variable Potential aufgetragen (Abb. 15). In der folgenden Tabelle (Tab. 3) erfolgt eine Zusammenstellung der Zeitkonstanten für die Erholung von der Inaktivierung der vier Messreihen.

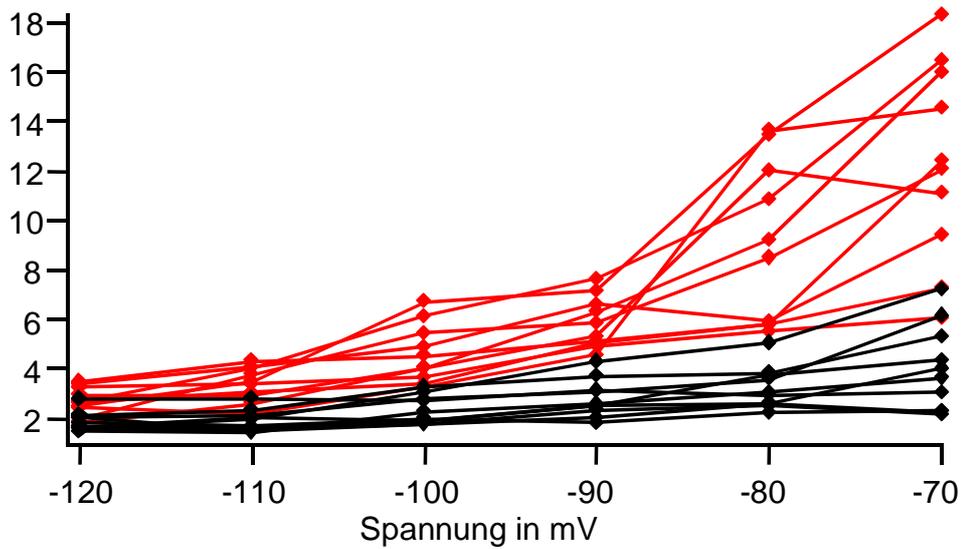
Potential [mV]	GH <sub>3</sub> /B <sub>6</sub> : 20 °C $\tau$ [ms]	GH <sub>3</sub> /B <sub>6</sub> : 37 °C $\tau$ [ms]	Mitralzellen: 20 °C $\tau$ [ms]	Mitralzellen: 37 °C $\tau$ [ms]
-120	3,80 ( $\pm$ 0,29)	1,52 ( $\pm$ 0,17)	2,73 ( $\pm$ 0,18)	1,88 ( $\pm$ 0,13)
-110	5,08 ( $\pm$ 0,48)	1,75 ( $\pm$ 0,20)	3,40 ( $\pm$ 0,22)	1,91 ( $\pm$ 0,14)
-100	6,80 ( $\pm$ 0,83)	2,07 ( $\pm$ 0,23)	4,62 ( $\pm$ 0,37)	2,35 ( $\pm$ 0,18)
-90	9,29 ( $\pm$ 1,40)	2,87 ( $\pm$ 0,25)	5,86 ( $\pm$ 0,33)	2,81 ( $\pm$ 0,24)
-80	11,85 ( $\pm$ 1,45)	3,42 ( $\pm$ 0,22)	9,08 ( $\pm$ 1,04)	3,23 ( $\pm$ 0,27)
-70	13,82 ( $\pm$ 1,70)	3,97 ( $\pm$ 0,30)	12,38 ( $\pm$ 1,28)	4,05 ( $\pm$ 0,55)

**Tabelle 3:** Potentialabhängigkeit der Zeitkonstanten der Erholung von der Inaktivierung für die unterschiedlichen Messreihen. In Klammern ist jeweils der Standardfehler des Mittelwerts angegeben.

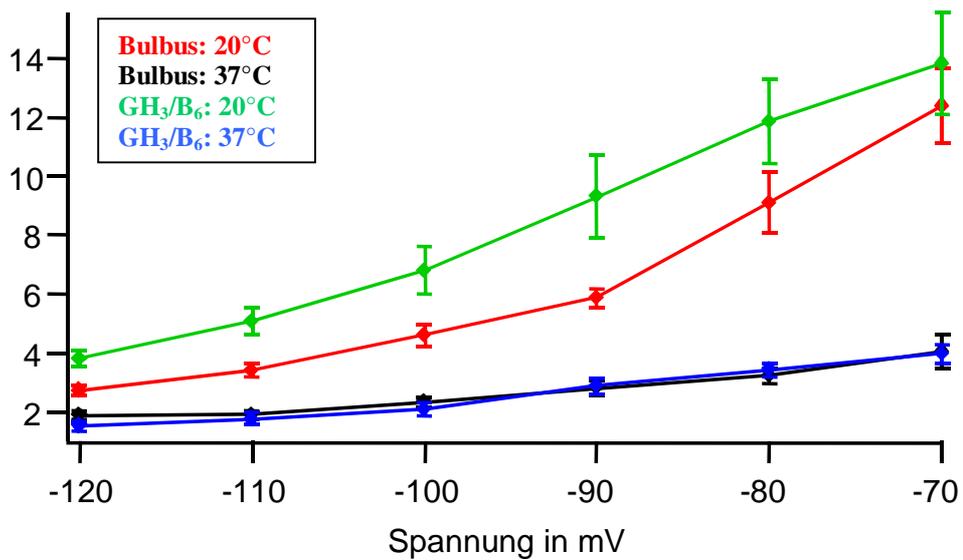
Wie bei der Deaktivierung verlangsamte sich die Kinetik mit zunehmend positiver Spannung, allerdings weniger stark und eher linear als exponentiell. Der Unterschied der Zeitkonstanten bei  $-120$  und bei  $-70$  mV war bei  $20$  °C größer als bei  $37$  °C. Für GH<sub>3</sub>/B<sub>6</sub>-Zellen betrug der Faktor 3,64 bei  $20$  °C im Vergleich zu 2,61 bei  $37$  °C. Bei den Bulbuszellen ergaben sich noch stärker abweichende Werte mit dem Faktor 4,54 bei  $20$  °C und 2,15 bei  $37$  °C.

Die Zeitkonstanten der Erholung von der Inaktivierung sind wie in der Literatur beschrieben und typisch für die erg-Kanäle mehr als zehn mal schneller als die Zeitkonstanten der Deaktivierung. Wie bei der Deaktivierung waren die Zeitkonstanten der Erholung von der Inaktivierung für die beiden Zellarten bei  $37$  °C einander ähnlicher als bei  $20$  °C. Auch hier war bei  $20$  °C die Kinetik der endogenen erg-Kanäle der GH<sub>3</sub>/B<sub>6</sub>-Zellen signifikant langsamer als die der Bulbuszellen. Bei Temperaturerhöhung ergab sich für beide Zellarten eine deutliche Beschleunigung der Kinetik. Die zugehörigen p- und Q<sub>10</sub>-Werte sind in Tabelle 4 angegeben.

Zeitkonstanten in ms



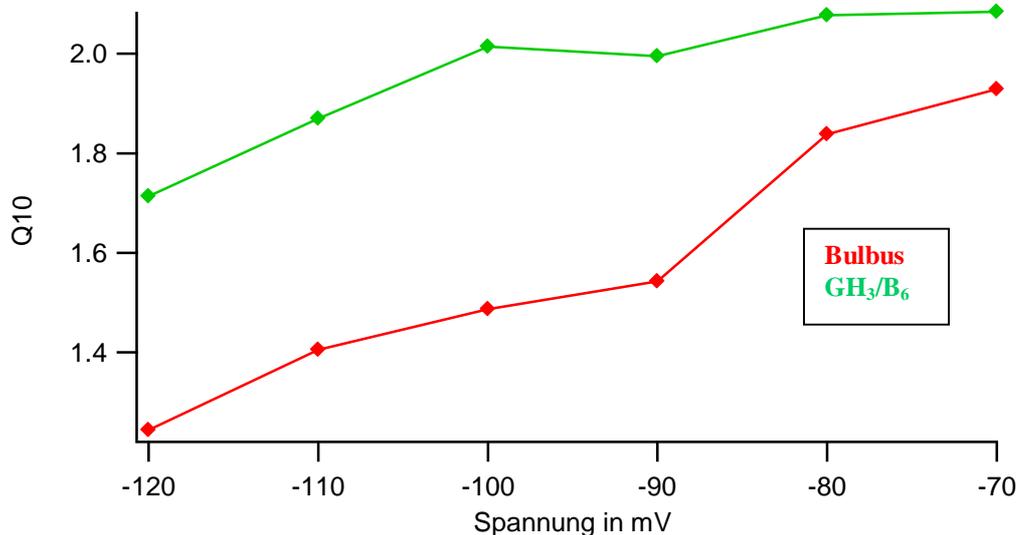
Zeitkonstanten in ms



**Abbildung 15:** Im oberen Bild sind die Zeitkonstanten der Erholung von der Inaktivierung für die endogenen erg-Ströme der Mitralzellen (jeweils zehn Messungen pro Temperatur) gegen die Spannung aufgetragen. Wie bei der Deaktivierung gibt es für 37° C-Messungen (schwarz) wesentlich kleinere Zeitkonstanten als für 20° C-Messungen (rot). Im unteren Bild sind die Mittelwertskurven der vier Messreihen dargestellt. Bei 37° C erkennt man keinen Unterschied zwischen GH<sub>3</sub>/B<sub>6</sub>⁻- und Bulbuszellen. Bei 20° C ist die Kinetik der GH<sub>3</sub>/B<sub>6</sub>⁻-Zellen deutlich langsamer.

Potential [mV]	GH <sub>3</sub> /B <sub>6</sub> -Zellen: p-Werte	Mitralzellen: p-Werte	GH <sub>3</sub> /B <sub>6</sub> -Zellen: Q <sub>10</sub>	Mitralzellen: Q <sub>10</sub>
-120	7,38*10 <sup>-6</sup>	0,013	2,09	1,93
-110	3,31*10 <sup>-5</sup>	3,47*10 <sup>-5</sup>	2,08	1,84
-100	2,25*10 <sup>-4</sup>	1,03*10 <sup>-4</sup>	2,00	1,54
-90	0,013	9,93*10 <sup>-7</sup>	2,01	1,49
-80	2,30*10 <sup>-4</sup>	2,52*10 <sup>-4</sup>	1,87	1,41
-70	2,29*10 <sup>-4</sup>	5,83*10 <sup>-5</sup>	1,71	1,24

**Tabelle 4:** p- und Q<sub>10</sub>-Werte für die Zeitkonstanten der Erholung von der Inaktivierung bei GH<sub>3</sub>/B<sub>6</sub>- und Mitralzellen



**Abbildung 16:** Q<sub>10</sub>-Werte der Zeitkonstanten der Erholung von der Inaktivierung bei GH<sub>3</sub>/B<sub>6</sub>- (grün) und Bulbuszellen (rot) im Verhältnis zur Spannung: Der Q<sub>10</sub>-Wert ist bei den GH<sub>3</sub>/B<sub>6</sub>-Zellen deutlich größer als bei den Bulbuszellen.

Die p-Werte für den Temperatureffekt der Erholung von der Inaktivierung waren deutlich signifikant. Die Q<sub>10</sub>-Werte für die GH<sub>3</sub>/B<sub>6</sub>-Zellen lagen zwischen 1,71 und 2,09, im Mittel bei 1,96. Bei den Bulbuszellen ergaben sich Q<sub>10</sub>-Werte von 1,24 bis 1,93, durchschnittlich 1,57 (Abb. 16). Die Q<sub>10</sub>-Werte der Erholung von der Inaktivierung waren somit größer als bei der Deaktivierung, was bedeutet, dass die Erholung von der Inaktivierung bei höheren Temperaturen gegenüber der Deaktivierung noch stärker überwiegt. Wieder war die Temperaturabhängigkeit bei den GH<sub>3</sub>/B<sub>6</sub>-Zellen größer. Die Q<sub>10</sub>-Werte für die Zeitkonstanten der Erholung von der Inaktivierung zeigten bei beiden Zelltypen eine Spannungsabhängigkeit und stiegen bei positiveren Potentialen an. Somit werden Ergebnisse bei Raumtemperatur

bezüglich der Erholungskinetik bei negativeren Potentialen weniger durch die Temperatur verfälscht als bei positiveren. Dieser Effekt zeigte sich stärker bei den Bulbuszellen, die bei -70 mV einen 0,55-fach höheren  $Q_{10}$ -Wert aufwiesen als bei -120 mV. Die Steigerung bei den  $\text{GH}_3/\text{B}_6$ -Zellen im gleichen Spannungsbereich wies nur den Faktor 1,22 auf. Bei -120 mV lag der  $Q_{10}$ -Wert der Mitralzellen im Vergleich deutlich unter dem der  $\text{GH}_3/\text{B}_6$ -Zellen. Je positiver das Potential wurde, desto mehr näherten sich die Resultate beider Zellarten an.

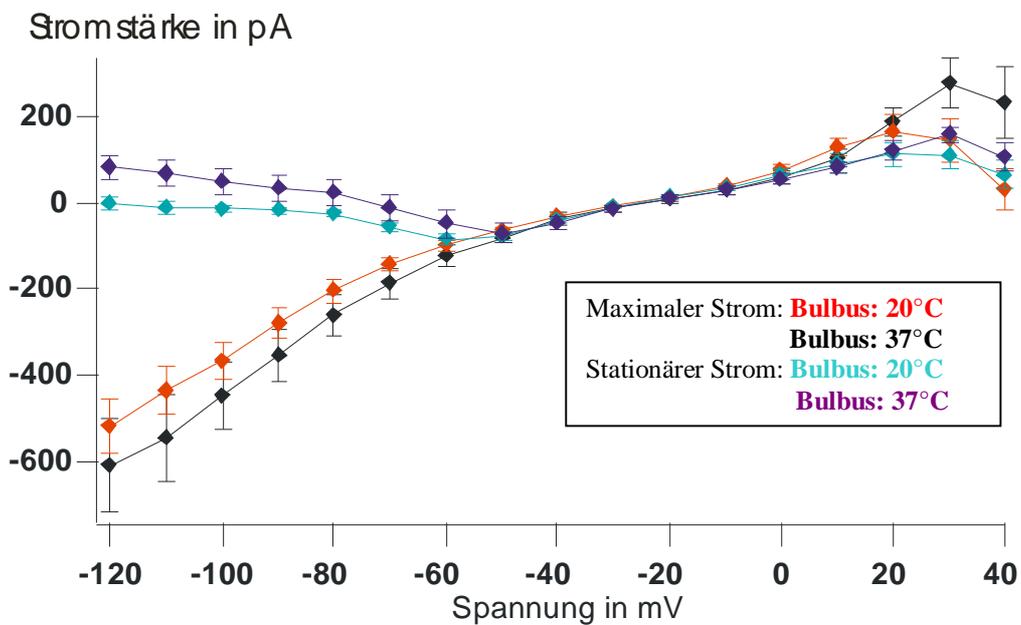
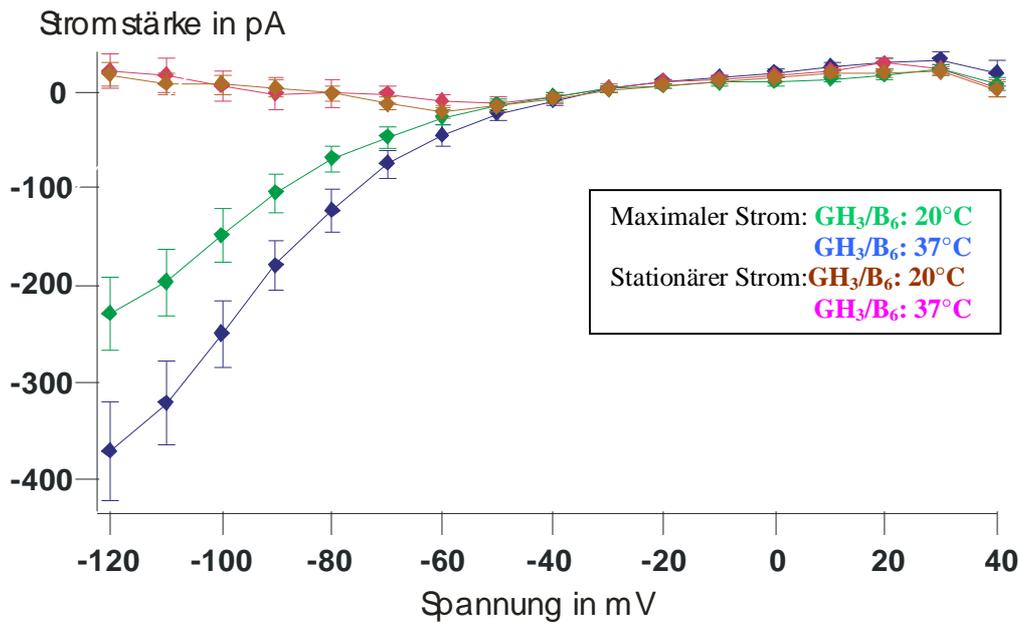
### 3.1.4. Potentialabhängigkeit der „voll aktivierten“ erg-Kanäle

Es wurde mit diesem Protokoll eine Beziehung zwischen maximalem und stationärem Strom hergestellt, indem die Maxima der transienten Ströme während des variablen Pulses und der stationäre Strom an dessen Ende gegen das Membranpotential aufgetragen wurden (Abb. 17). Erwartungsgemäß wurde der Maximalstrom bis etwa zum Gleichgewichtspotential, dem Durchgang durch die Nulllinie, bei dem aus dem Einwärts- ein Auswärtsstrom wurde, zunehmend geringer. Der Auswärtsstrom stieg bis etwa +20 mV geringfügig an und wurde danach wieder etwas kleiner. Bei den Bulbuszellen ergaben sich höhere Stromstärken, sowohl für die Einwärts- als auch für die Auswärtsströme. Die Ströme bei 37 °C waren größer als bei 20 °C, was dem Ergebnis der Untersuchung der Amplitude der „tails“ im Verfügbarkeits- und Aktivierungsprotokoll entspricht, so dass hier auf eine nähere Untersuchung verzichtet wurde. Das theoretische Gleichgewichtspotential wurde nach der Formel:

$$E = ( R \cdot T / ( z \cdot F ) ) * \ln ( [ K^+ \text{außen} ] / [ K^+ \text{innen} ] )$$

berechnet. Es betrug bei den hier vorliegenden Kaliumkonzentrationen von etwa 40 mM KCl außen und etwa 140 mM KCl innen (Abweichung durch Titration mit KOH) für 20 °C -31,64 mV und für 37 °C -33,48 mV. R steht in der Formel für die allgemeine Gaskonstante und hat einen Wert von 8,31 J / ( mol \* K ). T ist die Temperatur in Kelvin. z bedeutet die Ladungszahl bzw. die Ionenladung des zu transportierenden Teilchens, das für Kationen positiv und für Anionen negativ ist. F schließlich beschreibt die Faraday-Konstante und beträgt 96485 C/mol. Eine rechnerische Beziehung der Temperaturabhängigkeit ließ sich aufgrund von Abzugsartefakten, die im Bereich des geringen stationären Stroms zu stark zum Tragen kamen, nicht durchführen. Diese Beziehung wurde mit dem später beschriebenen Protokoll der „steady-state-Inaktivierung“ untersucht.

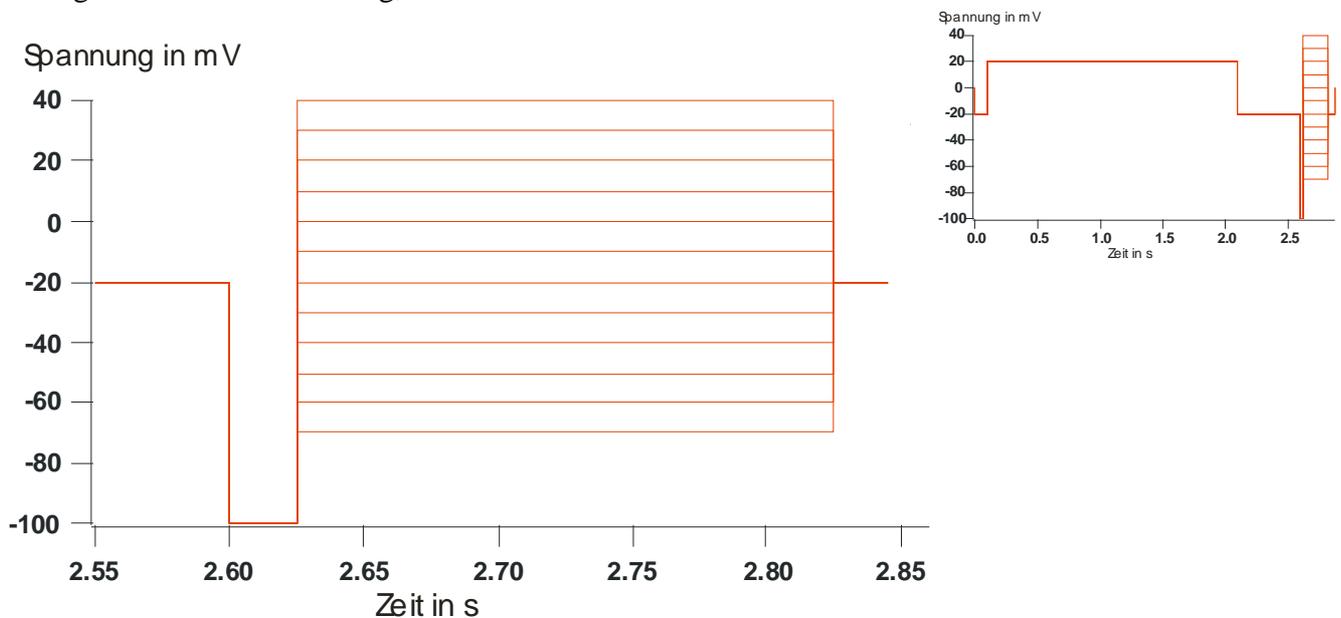
Durch das Gleichgewichtspotential ließ sich die Elektromotorische Kraft errechnen. Da das Gleichgewichtspotential für 37 °C sogar negativer war als das bei 20 °C, was auf geringere Amplituden schließen ließe, zeigte sich, dass die elektromotorische Kraft aus  $E - E_K$ , also in diesem Fall  $(-100 \text{ mV}) - (-31,64 \text{ mV}) = (-68,36 \text{ mV})$  für 20°C und  $(-100 \text{ mV}) - (-33,48 \text{ mV}) = (-66,52 \text{ mV})$  für 37 °C nicht der Grund für die größeren Amplituden war. Nach der Beziehung  $U = R \cdot I$  musste so bei konstanter Stromdichte eine Änderung des Widerstands der Membran ursächlich sein.,



**Abbildung 17:** Verhältnis des maximalen und stationären Stroms zur Spannung: Oben sind sowohl die maximalen, als auch die stationären Stromkurven der  $\text{GH}_3/\text{B}_6$ -Zellen, unten der Bulbuszellen dargestellt. Bei den Bulbuszellen erkennt man jeweils größere Ein- und Auswärtsströme.

### 3.2. Inaktivierung

Mit dem Inaktivierungsprotokoll (Abb. 18) wurde die Zeitkonstante der Inaktivierung untersucht. Wie beim Verfügbarkeitsprotokoll lag das Haltepotential bei  $-20$  mV. Auch hier erfolgte zunächst eine zweisekündige Depolarisation auf  $+20$  mV, um die Kanäle zu öffnen und zu inaktivieren, bevor für  $0,5$  s auf  $-20$  mV gesprungen wurde, um nicht-erg-Kanäle nicht mehr offenzuhalten. Es folgte eine kurze Hyperpolarisation auf  $-100$  mV, damit sich die erg-Kanäle von der Inaktivierung erholen konnten. Wichtig dabei war, dass der Puls kurz genug war, damit die Deaktivierung noch keinen starken Einfluss hat. Optimal wäre es, den Puls genau so lang zu halten, bis der maximale Einwärtsstrom erreicht wird. Dies wurde durch die bei jedem Potential unterschiedlichen Zeitkonstanten erschwert. Als bestmögliche Lösung erwies sich eine Zeitdauer von  $25$  ms bei  $20$  °C und, durch die schnellere Kinetik mit eher beginnender Deaktivierung, von  $8$  ms bei  $37$  °C.

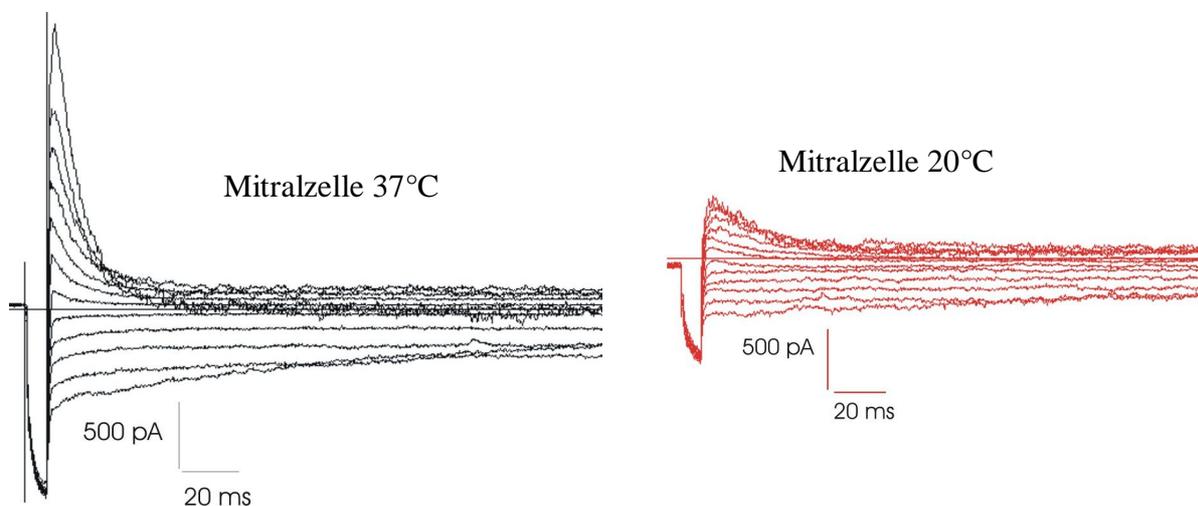


**Abbildung 18: Inaktivierungsprotokoll:** Das Haltepotential beträgt  $-20$  mV. Zum Öffnen und Inaktivieren der Kanäle wird für zwei Sekunden auf  $+20$  mV depolarisiert. Nach einem  $0,5$  s-Puls auf  $-20$  mV erfolgt für  $25$  ms bei  $20$  °C und für  $8$  ms bei  $37$  °C eine Hyperpolarisation auf  $-100$  mV. Während des folgenden  $200$  ms dauernden variablen Pulses zwischen  $+40$  und  $-70$  mV (in  $10$  mV-Schritten) wurde die Zeitkonstante der Inaktivierung ermittelt.

Darauf folgte der variable Puls für  $200$  ms. Die Spannung wurde in  $10$  mV-Schritten zwischen  $+40$  und  $-70$  mV verändert. Ein Durchlauf erfolgte alle fünf Sekunden. Zu Beginn des variablen Pulses trat bei den positiveren Potentialen ein Auswärtsstrom auf, der schnell abnahm. Bei den negativeren Potentialen wurde die Deaktivierung des vorhergehenden

Stromes fortgesetzt, so dass am Ende der Pulse nur ein geringer Strom vorhanden war (Abb. 19). Die Zeitkonstante der Inaktivierung wurde im Zeitbereich zwischen dem Strommaximum zu Beginn des variablen Pulses und dem Ende des Pulses bestimmt. Dabei wurde wieder eine Exponentialfunktion an die Daten angepasst. Auszuwerten war nur der Bereich zwischen +40 und -10 mV, da nur in diesem Bereich ausreichend große inaktivierende Ströme vorhanden waren. -20 mV liegt nahe dem Gleichgewichtspotential  $E_K$ . Bei negativeren Potentialen überlagerte die einsetzende Deaktivierung den Inaktivierungsprozess, so dass hier keine Daten erhoben werden konnten.

Die Zeitkonstanten der Inaktivierung sind in Tabelle 5 zusammengefasst.



**Abbildung 19:** Beispiele für typische erg-Ströme mit dem Inaktivierungsprotokoll bei Bulbuszellen bei 37 °C (schwarz) und 20 °C (rot). Der Maßstab ist bei beiden Versuchen identisch. Die Aufzeichnung beginnt hier mit dem hyperpolarisierenden Puls auf -100 mV, nach dessen Beginn der Einwärtsstrom durch die Erholung von der vorhergehenden Inaktivierung erfolgt. Bevor der Einwärtsstrom durch die Deaktivierung verringert wird, wird der variable Puls auf Werte zwischen +40 und -70 mV gestartet. So erhält man die maximalen Stromamplituden. Die Zeitkonstante der folgenden schnellen Inaktivierung war Gegenstand der Untersuchung. Bei 37 °C zeigt sich eine größere Stromamplitude bei stärkerer Erholung von der Inaktivierung. Desweiteren sieht man durch die schnelleren Zeitkonstanten der Inaktivierung einen steiler abfallenden Verlauf der Stromspuren bei den 37 °C-Versuchen. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde hier für beide Temperaturen eine 8 ms dauernde Hyperpolarisation gewählt.

Potential [mV]	GH <sub>3</sub> /B <sub>6</sub> : 20 °C τ [ms]	GH <sub>3</sub> /B <sub>6</sub> : 37 °C τ [ms]	Mitralzellen: 20 °C τ [ms]	Mitralzellen: 37 °C τ [ms]
+40	14,79 (± 1,89)	4,31 (± 0,30)	15,99 (± 1,63)	7,46 (± 0,65)
+30	19,36 (± 2,07)	5,87 (± 0,58)	18,49 (± 1,44)	8,15 (± 0,41)
+20	21,77 (± 1,07)	6,74 (± 0,61)	19,63 (± 2,56)	9,11 (± 0,60)
+10	23,39 (± 2,01)	7,73 (± 0,93)	21,87 (± 2,07)	10,81 (± 1,08)
0	26,21 (± 1,72)	7,92 (± 0,83)	20,37 (± 2,12)	9,60 (± 1,15)
-10	30,32 (± 2,89)	11,39 (± 2,05)	19,41 (± 2,42)	8,81 (± 0,71)

**Tabelle 5:** Potentialabhängigkeit der Zeitkonstanten der Inaktivierung für die unterschiedlichen Messreihen. In Klammern ist jeweils der Standardfehler des Mittelwerts angegeben.

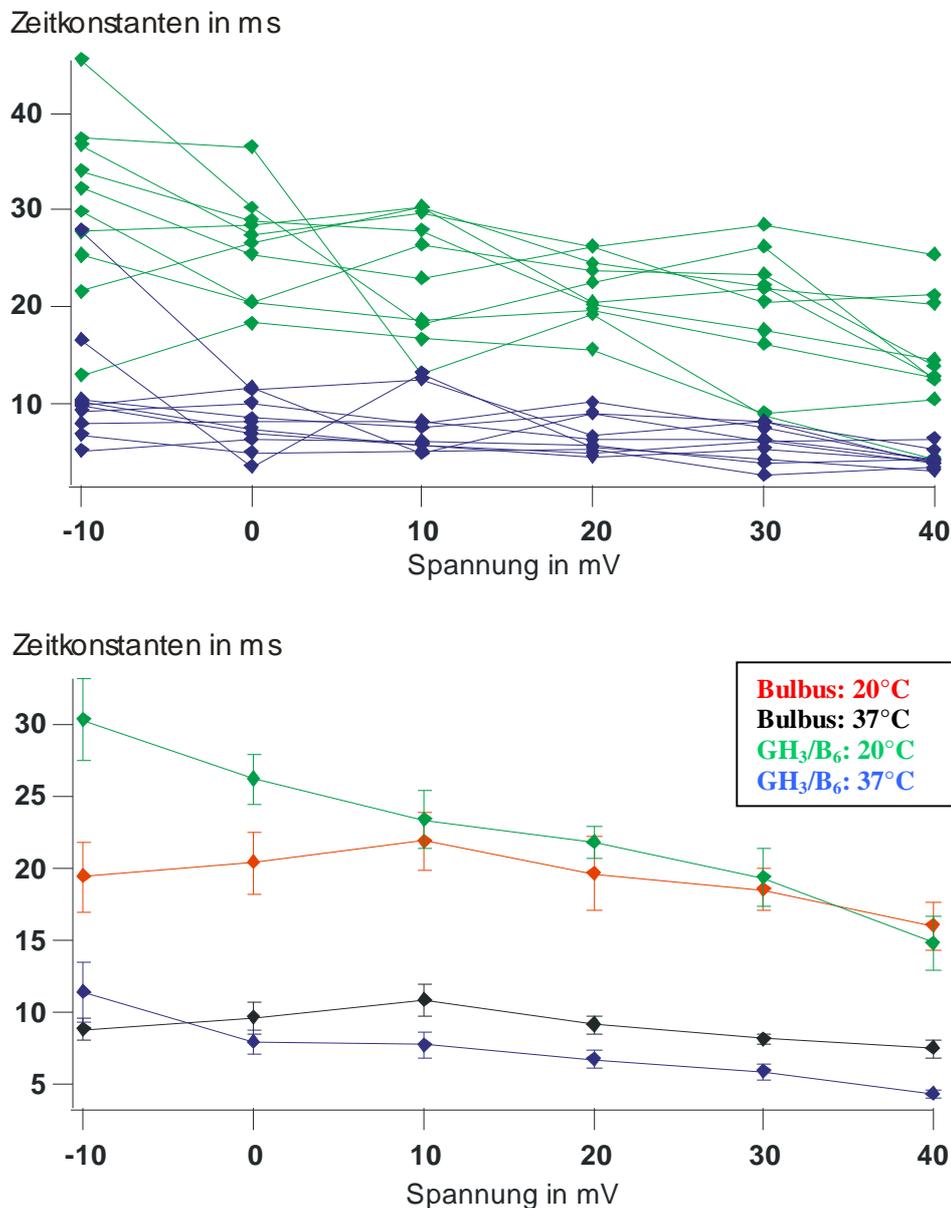
Je positiver die Spannung, desto schneller war die Inaktivierung. Bei den Bulbuszellen wurde die Zeitkonstante bei beiden Temperaturen bei 0 und -10 mV allerdings wieder geringfügig kleiner als bei +10 mV (Abb.20).

Auch bei der Zeitkonstanten der Inaktivierung trat eine deutliche Beschleunigung bei höheren Temperaturen auf. Dieser Effekt war wie bei den vorhergehenden Messungen bei GH<sub>3</sub>/B<sub>6</sub>-Zellen größer als bei Bulbuszellen. Ebenso ist die Verlangsamung der Kinetik bei negativer werdenden Potentialen bei GH<sub>3</sub>/B<sub>6</sub>-Zellen deutlich ausgeprägter: Bei -10 mV war τ bei beiden Temperaturen mehr als doppelt so groß wie bei +40 mV. Bei den Bulbuszellen veränderte sich dieser Wert auch durch den Wiederanstieg zwischen +10 und 0 mV kaum. Tabelle 6 stellt die zugehörigen p- und Q<sub>10</sub>-Werte dar.

Potential [mV]	GH <sub>3</sub> /B <sub>6</sub> -Zellen: p-Werte	Mitralzellen: p-Werte	GH <sub>3</sub> /B <sub>6</sub> -Zellen: Q <sub>10</sub>	Mitralzellen: Q <sub>10</sub>
+40	3,33*10 <sup>-4</sup>	4,01*10 <sup>-4</sup>	2,07	1,57
+30	7,72*10 <sup>-5</sup>	3,35*10 <sup>-5</sup>	2,02	1,62
+20	6,25*10 <sup>-9</sup>	0,0025	1,99	1,57
+10	9,62*10 <sup>-6</sup>	3,53*10 <sup>-4</sup>	1,92	1,51
0	3,01*10 <sup>-7</sup>	5,50*10 <sup>-4</sup>	2,02	1,56
-10	6,27*10 <sup>-5</sup>	0,0016	1,78	1,59

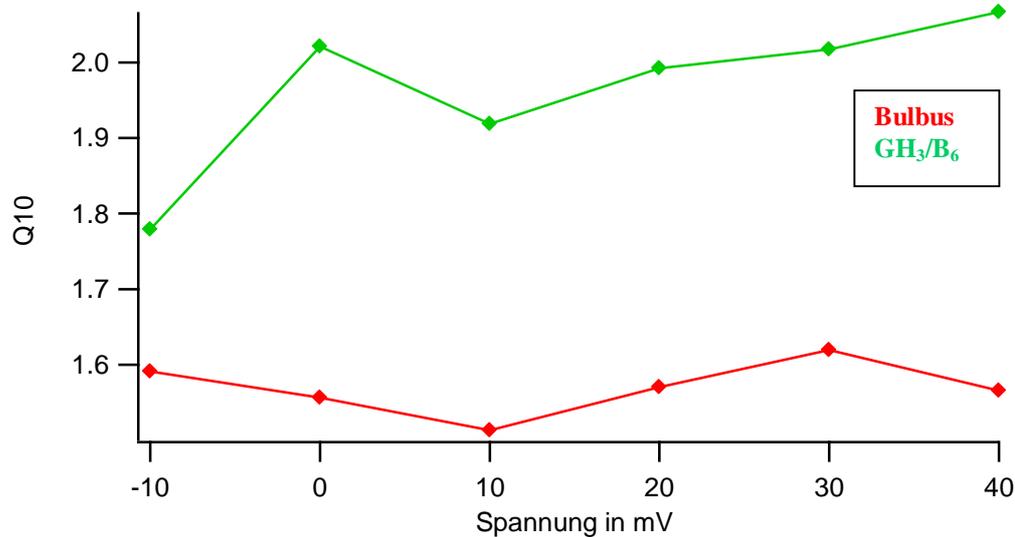
**Tabelle 6:** p- und Q<sub>10</sub>-Werte für den Vergleich der Zeitkonstanten der Inaktivierung

Auch bei der Inaktivierung ergaben sich deutlich signifikante p-Werte, die bei  $\text{GH}_3/\text{B}_6$ -Zellen noch niedriger als bei Bulbuszellen waren, allerdings gab es hier im Vergleich zu den Kinetiken der Deaktivierung und Erholung von der Inaktivierung einen deutlicheren Unterschied der Zeitkonstanten bei  $37^\circ\text{C}$ .



**Abbildung 20:** Im oberen Bild sind die Zeitkonstanten der Inaktivierung für die jeweils zehn Messungen pro Temperatur bei den  $\text{GH}_3/\text{B}_6$ -Zellen gegen die Spannung aufgetragen. Die  $37^\circ\text{C}$ -Messungen (blau) ergaben wesentlich kleinere Zeitkonstanten als die  $20^\circ\text{C}$ -Messungen (grün). Im unteren Bild sind die Mittelwertskurven der vier Messreihen dargestellt. Bei den Bulbuszellen fällt auf, dass die Zeitkonstanten bei negativeren Werten als  $+10\text{ mV}$  wieder kleiner wurden.

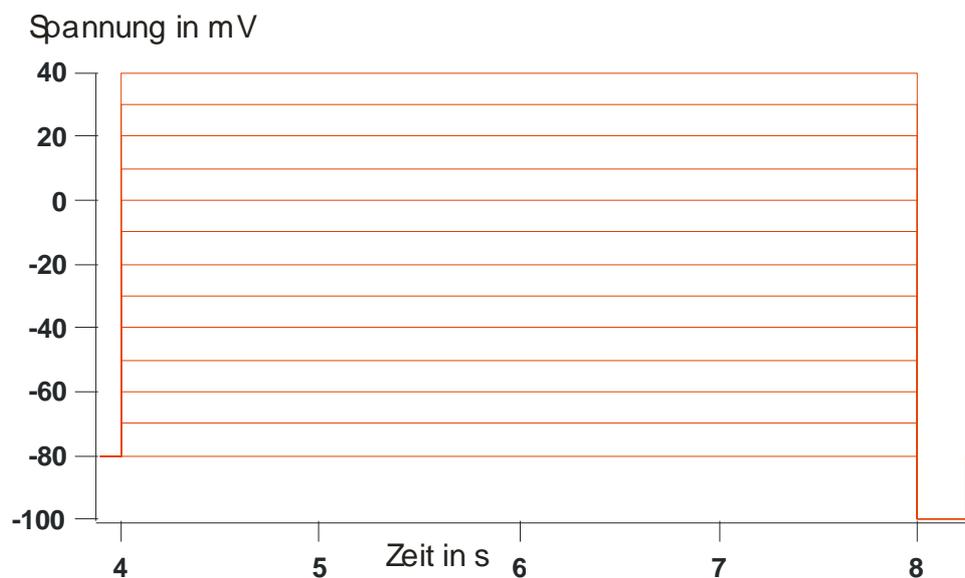
Die  $Q_{10}$ -Werte waren wieder bei  $\text{GH}_3/\text{B}_6$ -Zellen größer (Abb. 21) und lagen zwischen 1,78 und 2,07, im Mittel bei 1,97. Bei den Bulbuszellen lagen die Werte zwischen 1,51 und 1,62, im Mittel bei 1,57. Vor allem bei den Bulbuszellen waren die  $Q_{10}$ -Werte bei allen Spannungen sehr ähnlich. Die  $Q_{10}$ -Werte der Inaktivierungskinetik waren bei den  $\text{GH}_3/\text{B}_6$ -Zellen sehr ähnlich denen der Erholung von der Inaktivierung.



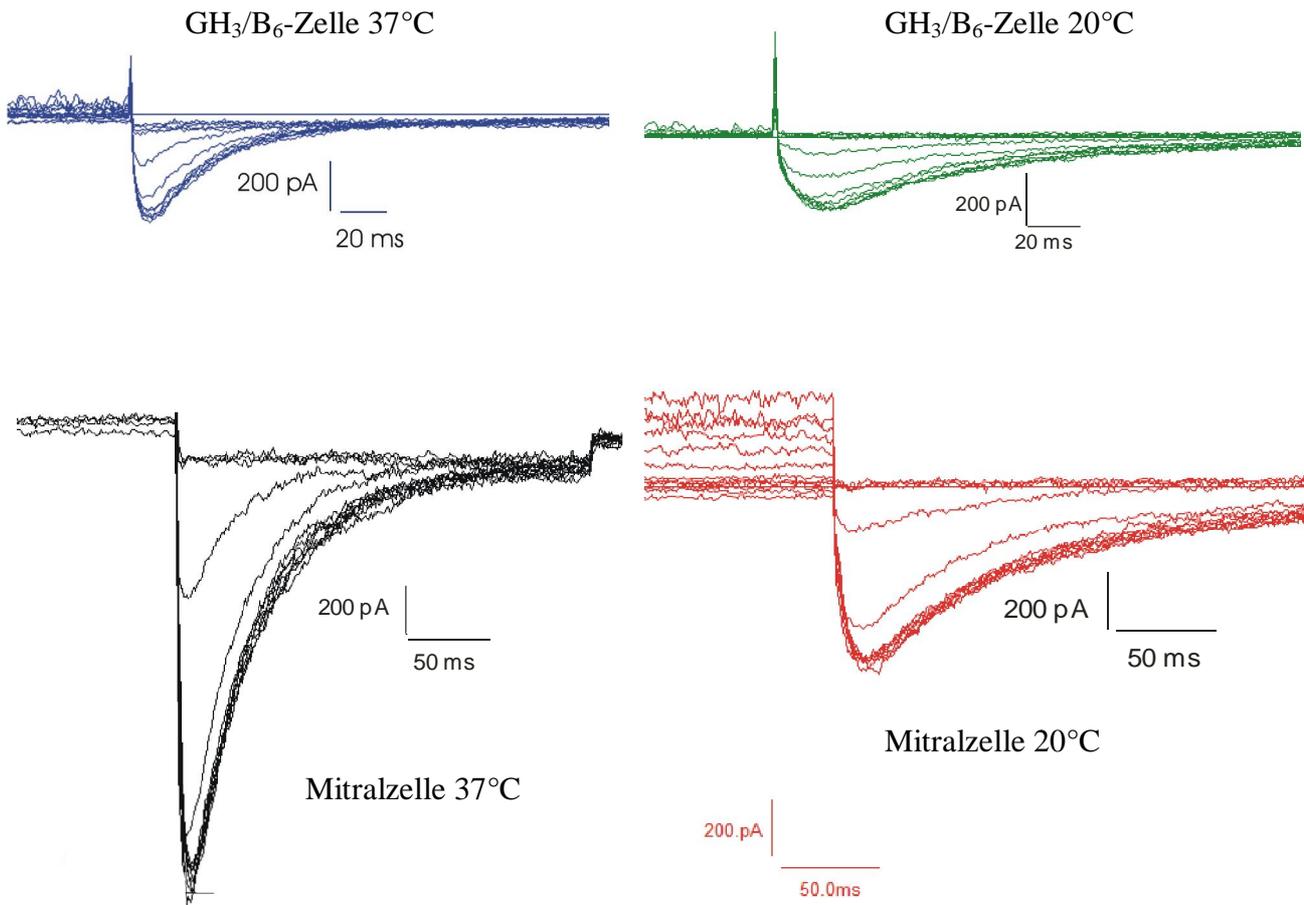
**Abbildung 21:**  $Q_{10}$ -Werte der Zeitkonstante der Inaktivierung bei  $\text{GH}_3/\text{B}_6$ - (grün) und Bulbuszellen (rot) im Verhältnis zur Spannung: Die Temperaturabhängigkeit der Zeitkonstanten der Inaktivierung ist bei den  $\text{GH}_3/\text{B}_6$ -Zellen deutlich stärker als bei den Bulbuszellen.

### 3.3. Spannungsabhängigkeit der Aktivierung

Für die Untersuchung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung wurde ein Aktivierungsprotokoll benutzt. Das Haltepotential lag bei  $-80$  mV, da bei diesem Potential alle Kanäle deaktiviert vorlagen. Zu Beginn erfolgte ein vier Sekunden dauernder Puls, dessen Potential in  $10$  mV-Schritten zwischen  $+40$  und  $-80$  mV variiert wurde. Die aktivierten Kanäle waren am Ende dieser vier Sekunden je nach Potential mehr oder weniger inaktiviert. Wie im Verfügbarkeitsprotokoll folgte eine  $250$  ms dauernde Hyperpolarisation auf  $-100$  mV, um zu prüfen, wie viele Kanäle sich am Ende der Depolarisation im aktivierten oder inaktivierten Zustand befanden (Abb. 22). Es konnten sich nur die Kanäle von der Inaktivierung erholen, die während des variablen Pulses inaktivierten. Voraussetzung für die Inaktivierung war die Aktivierung. Somit konnte durch die Erholung von der Inaktivierung auf die Aktivierung geschlossen werden. Je positiver der variable Puls, desto mehr Kanäle aktivieren und inaktivierten und desto größer war der Einwärtsstrom durch die Erholung von der Inaktivierung (Abb. 23). Ein Durchlauf erfolgte alle zehn Sekunden. Die „tails“ während der  $-100$  mV-Spannung wurden wie im Verfügbarkeitsprotokoll ausgewertet und ihre Stromamplitude gegen die Vorpuls-Spannung aufgetragen. Untersucht wurden die zur halbmaximalen Amplitude gehörende Spannung  $V_{0,5}$ , der Steigungsfaktor  $k$  und die Amplitude.



**Abbildung 22: Aktivierungsprotokoll:** Das Haltepotential beträgt  $-80$  mV, damit die Kanäle vollständig deaktiviert vorliegen. Der variable Puls legt für vier Sekunden Spannungen zwischen  $+40$  und  $-80$  mV an. Danach erfolgt eine  $250$  ms dauernde Hyperpolarisation auf  $-100$  mV, bei der die „tails“ durch die Erholung von der Inaktivierung gemessen werden.



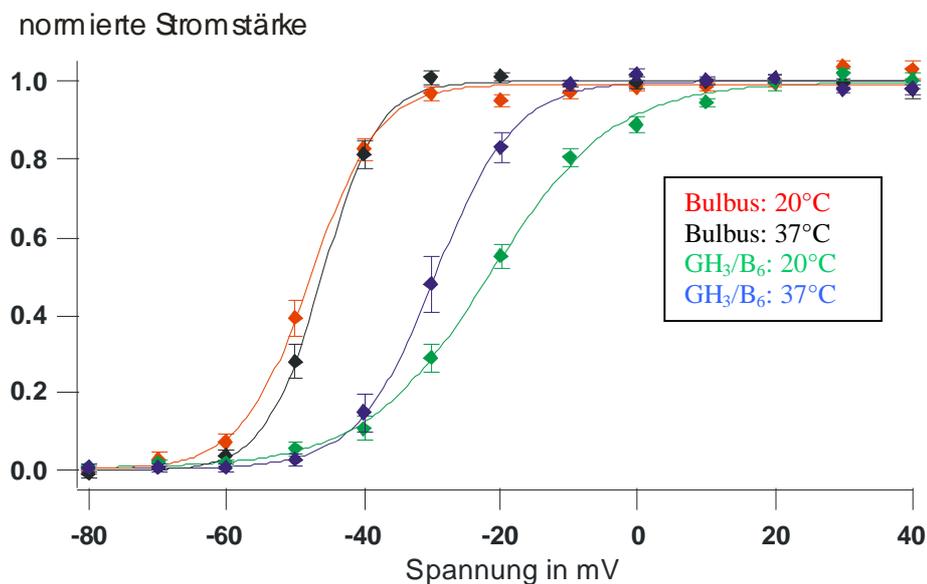
**Abbildung 23:** Beispiele für typische Tailströme bei den unterschiedlichen Messreihen im Aktivierungsprotokoll. Unten sind die Bulbus-Messungen bei 37 °C (schwarz) und 20 °C (rot) zu sehen. Oben findet man die GH<sub>3</sub>/B<sub>6</sub>-Messungen (blau= 37 °C; grün= 20 °C). Der Maßstab der Achse der Stromstärke ist bei den Vergleichen einer Zellart jeweils identisch. Die Amplitude der erg-Ströme war bei den Bulbuszellen deutlich größer. Ebenso war die Amplitude bei 37 °C größer. Desweiteren erfolgt der Abfall vom Maximum durch die schnellere Deaktivierung bei höheren Temperaturen schneller, so dass die Stromspur bei 37 °C steiler abnimmt als bei 20 °C. Aus Maßstabsgründen sind bei den Bulbus-Messungen bei 37 °C einige Spuren vor dem Tailstrom nicht dargestellt.

Bei den GH<sub>3</sub>/B<sub>6</sub>-Zellen ergab sich bei 20 °C ein  $V_{0,5}$ -Wert von  $-21,97$  mV ( $\pm 1,21$  mV). Bei 37 °C fand sich ein  $V_{0,5}$ -Wert von  $-29,64$  mV ( $\pm 1,69$  mV). Es resultierte somit im Mittel eine Differenz von 7,66 mV in hyperpolarisierende Richtung. Durch den t-Test wurde ein deutlich signifikanter p-Wert von 0,019 ermittelt. Beim Verfügbarkeitsprotokoll verschob sich  $V_{0,5}$  bei höheren Temperaturen um einen ähnlichen Wert, allerdings in depolarisierende Richtung. Bei einem Potential von  $-20$  mV waren bei 20 °C nur 55% der Kanäle aktiviert, während bei 37 °C bereits 83% aktiviert waren.

Bei den Bulbuszellen war die halbmaximale Aktivierung bei 20 °C bei  $-47,87$  mV ( $\pm 2,55$  mV) erreicht. Für 37 °C wurden  $-46,00$  mV ( $\pm 2,60$  mV) ermittelt (Abb. 24). Hier trat eine

deutliche Diskrepanz zu den GH<sub>3</sub>/B<sub>6</sub>-Zellen auf. Es gab bei Temperaturerhöhung keine signifikante Veränderung der halbmaximalen Aktivierung. Auffällig war weiterhin, dass die Bulbuszellen wesentlich negativere E<sub>0,5</sub>-Werte aufwiesen als die GH<sub>3</sub>/B<sub>6</sub>-Zellen, was durch die unterschiedliche Zusammensetzung der erg-Untereinheiten zu erklären sein dürfte.

Es folgte die Untersuchung des Steigungsfaktors k. Bei den GH<sub>3</sub>/B<sub>6</sub>-Zellen betrug k bei 20 °C 9,15 mV (±2,11 mV), bei 37 °C 5,15 mV (±0,46 mV). Der p-Wert hierfür lag bei 1,74\*10<sup>-4</sup>. Bei den Bulbuszellen ergab sich bei 20 °C k= 5,11 mV (±1,52 mV) und bei 37 °C k= 3,77 mV (±0,88 mV). Der p-Wert lag bei 0,030. k zeigte sich bei beiden Zellarten bei höheren Temperaturen als signifikant verringert. Beim Verfügbarkeitsprotokoll war die Steigung bei beiden Messreihen nicht signifikant verändert. In diesem Fall war der p-Wert bei den GH<sub>3</sub>/B<sub>6</sub>-Zellen wieder deutlich niedriger als der p-Wert der Bulbuszellen.



**Abbildung 24: Spannungsabhängigkeit der Aktivierung:** Bei den Bulbuszellen ist im Gegensatz zu den GH<sub>3</sub>/B<sub>6</sub>-Zellen keine Verschiebung der Aktivierungskurve sichtbar. Die Verschiebung erfolgt bei den GH<sub>3</sub>/B<sub>6</sub>-Zellen bei Temperaturerhöhung in hyperpolarisierende Richtung. Bei beiden Zellarten wird die Steigung bei höheren Temperaturen größer. Die Aktivierungskurven für die erg-Ströme der Bulbuszellen sind gegenüber denen der GH<sub>3</sub>/B<sub>6</sub>-Zellen deutlich nach links verschoben.

Die maximale Amplitude bei -100 mV der erg-Ströme in GH<sub>3</sub>/B<sub>6</sub>-Zellen lag bei 20 °C bei 223 pA (±27 pA) und bei 37 °C bei 388 pA (±37 pA). Der p-Wert betrug 0,0025. Für die Bulbuszellen ergab sich bei 20 °C eine Amplitude von 724 pA (±82 pA) und bei 37 °C von 1128 pA (±162 pA). Der p-Wert erreichte 0,043 und befand sich somit knapp unterhalb der Signifikanzschwelle von 5%. Somit kann man auch beim Aktivierungsprotokoll davon

sprechen, dass eine Erhöhung der Raumtemperatur auf Körpertemperatur einen Anstieg der Amplitude bewirkt. Der Effekt war bei den GH<sub>3</sub>/B<sub>6</sub>-Zellen stärker. Die Amplitude lag bei 37 °C bei den GH<sub>3</sub>/B<sub>6</sub>-Zellen um den Faktor 1,66 und bei den Bulbuszellen um den Faktor 1,56 höher als bei 20 °C. Insgesamt besaßen die Bulbuszellen höhere Stromamplituden als die GH<sub>3</sub>/B<sub>6</sub>-Zellen. Die Amplituden der Tailströme beider Zellarten waren größer als die, die bei den tails im Verfügbarkeitsprotokoll gemessen wurden.

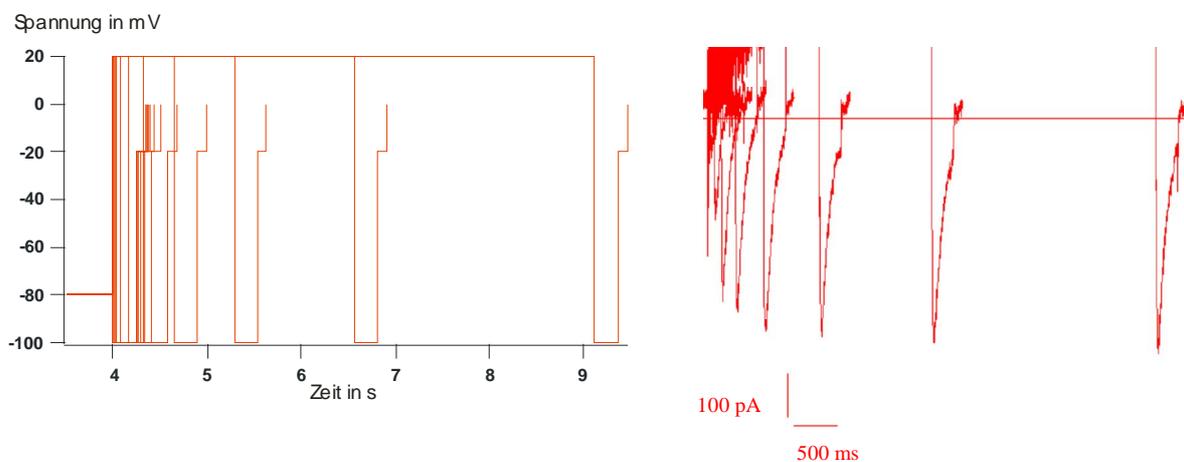
Wie bei der Deaktivierung wurde auch hier mit Hilfe der Kapazität die Stromdichte berechnet um die Zellgröße als Ursache für den Amplitudenanstieg auszuschließen. Für die GH<sub>3</sub>/B<sub>6</sub>-Zellen ergaben sich bei 20 °C eine Kapazität von 15,9 pF ( $\pm 1,3$  pF) und eine Stromdichte von 14,0 A/F ( $\pm 1,6$  A/F). Bei 37 °C betrug die Kapazität 16,3 pF ( $\pm 1,4$  pF) und die Stromdichte 25,2 A/F ( $\pm 3,3$  A/F). Der resultierende p-Wert von 0,01 zeigte einen signifikanten Anstieg der Stromdichte bei 37°C gegenüber der Stromdichte bei 20 °C.

Bei den Bulbuszellen ergaben sich bei 20 °C eine Kapazität von 18,2 pF ( $\pm 0,9$  pF) und eine Stromdichte von 40,7 A/F ( $\pm 5,1$  A/F). Bei 37 °C erhielt man eine Kapazität von 21,9 pF ( $\pm 1,9$  pF) und eine Stromdichte von 51,9 A/F ( $\pm 5,5$  A/F). Wie bei der Deaktivierung resultierte auch hier ein nicht signifikanter p-Wert von 0,15. Somit ist der Anstieg der Stromdichte bei 37 °C deutlich sichtbar, jedoch nicht signifikant.

Für die im Aktivierungsprotokoll größeren errechneten Stromdichten gegenüber dem Verfügbarkeitsprotokoll, war der Anstieg bei den GH<sub>3</sub>/B<sub>6</sub>-Zellen bei 20 °C mit  $p= 0,36$  und bei 37 °C mit  $p= 0,10$  nicht signifikant. Bei den Bulbuszellen hingegen ergaben sich signifikante p-Werte von 0,048 (20 °C) und 0,003 (37 °C).

### 3.4 Zeitkonstante der Aktivierung

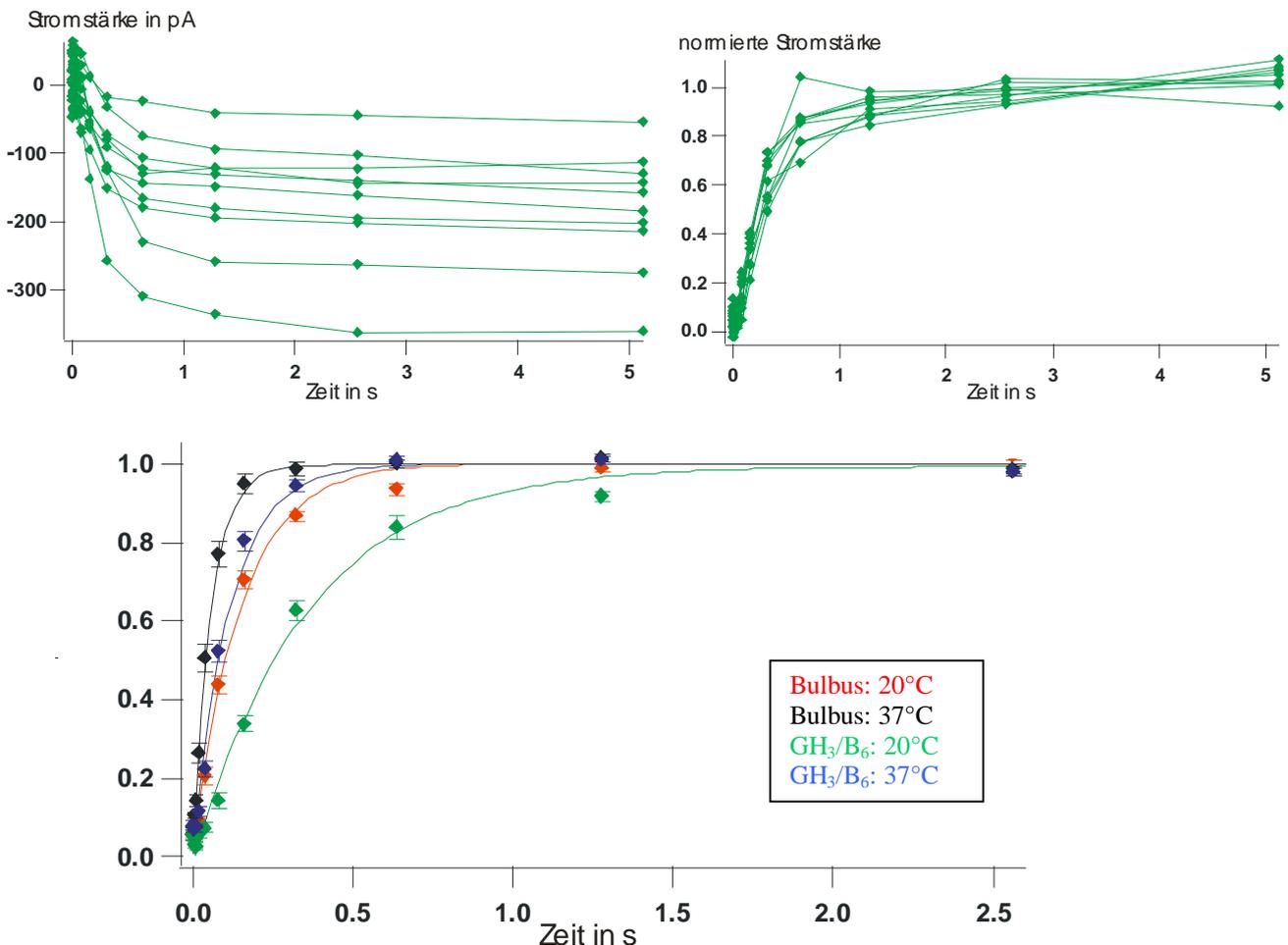
Für die Bestimmung der Zeitkonstante der Aktivierung wurde ein „Envelope of tail“-Protokoll verwendet. Das Haltepotential lag bei  $-80$  mV. Variiert wurde in diesem Fall nicht die Spannung, sondern die Dauer des depolarisierenden Testpulses auf  $+20$  mV, um den Zeitgang der Aktivierung der erg-Kanäle darzustellen. Begonnen wurde mit einer Dauer von einer Millisekunde. Im folgenden wurde die Zeit, die verlängert wurde (initial 5 ms), jeweils verdoppelt, so dass man insgesamt zwölf Messungen über Zeiträume von 6 ms, 11 ms, 21 ms, 41 ms usw. bis zu 5121 ms erhielt. Zu Beginn wurde zweimal um 5 ms verlängert. Es folgte die aus dem Verfügbarkeits- und Aktivierungsprotokoll bekannte Hyperpolarisation für 250ms auf  $-100$ mV. Dabei wurde wieder der „tail“-Strom gemessen, der um so größer war, je länger zuvor depolarisiert wurde. Ab einer bestimmten Zeitdauer, bei der die Aktivierung vollständig war, erfolgte keine Steigerung der Amplitude mehr (Abb. 25). Die maximale Amplitude der Einwärtsströme wurde gegen die Zeitdauer des variablen Pulses aufgetragen und die Daten mit einer Exponentialfunktion gefittet. So erhielt man die Zeitkonstante der Aktivierung.



**Abbildung 25:** „Envelope of tails“-Protokoll: Nach einer initialen vier Sekunden dauernden Hyperpolarisation auf  $-80$ mV waren alle Kanäle deaktiviert. Variiert wurde die Zeitdauer der folgenden Depolarisation auf  $+20$  mV. Die Dauer betrug 1 bis 5121 ms. Abschließend wurden die maximalen Tail- Amplituden während der 250 ms langen Hyperpolarisation auf  $-100$  mV gemessen. In der Abbildung rechts ist ein Beispielstrom einer Bulbuszelle bei  $20$  °C gezeigt.

Bei den  $\text{GH}_3/\text{B}_6$ -Zellen betrug  $\tau$  bei  $20$  °C  $381,9$  ms ( $\pm 28,9$  ms). Eine wesentliche Beschleunigung erfolgte bei  $37$  °C mit einer Zeitkonstanten von  $118,0$  ms ( $\pm 6,9$  ms). Der p-Wert hierfür erreichte einen Wert von  $4,57 \cdot 10^{-6}$ . Der  $Q_{10}$ -Wert ergab  $2,00$ . Bei den

Bulbuszellen erhielt man für 20 °C  $\tau = 149,6 \text{ ms}$  ( $\pm 8,6 \text{ ms}$ ) und für 37 °C  $\tau = 61,5 \text{ ms}$  ( $\pm 5,6 \text{ ms}$ ). Der p-Wert betrug  $2,64 \cdot 10^{-7}$ , der  $Q_{10}$ -Wert 1,69. Bei beiden Zellarten erfolgte eine stark signifikante Beschleunigung der Aktivierungskinetik bei Temperaturerhöhung (Abb. 26). Die Aktivierung war in allen Fällen beträchtlich langsamer als die Inaktivierung. Die  $Q_{10}$ -Werte jedoch bewegten sich in einem ähnlichen Bereich, so dass das Verhältnis der Aktivierung zur Inaktivierung wenig verändert wurde. Bei den Bulbuszellen war der  $Q_{10}$ -Wert der Aktivierung etwas größer als der Wert der Inaktivierung. Bei beiden Temperaturen war die Kinetik der Aktivierung des erg-Stroms bei den Bulbuszellen deutlich schneller als bei den GH<sub>3</sub>/B<sub>6</sub>-Zellen, bei 20 °C 2,55fach und bei 37 °C um den Faktor 1,92. Wie bei den anderen Zeitkonstanten war der Unterschied zwischen den erg-Strömen der beiden Zelltypen bei 20 °C größer als bei 37 °C. Bei diesem Protokoll zeigten sich ebenfalls bei 37 °C größere Amplituden als bei 20 °C.

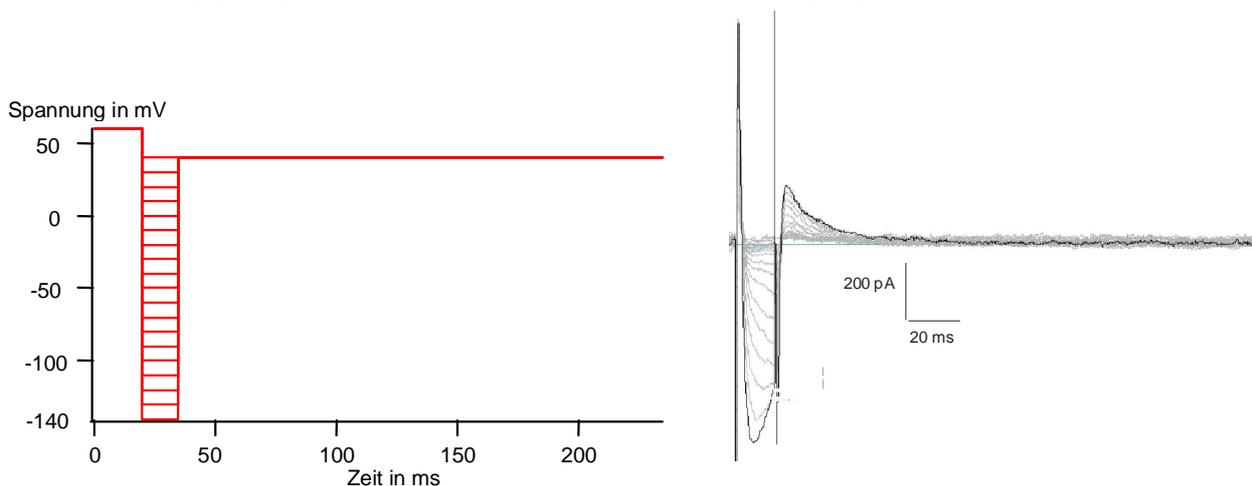


**Abbildung 26: Zeitkonstanten der Aktivierung:** Oben links sieht man die zehn Einzelmessungen der GH<sub>3</sub>/B<sub>6</sub>-Zellen bei 20° C, bei denen die Maxima der Stromstärke gegen die Zeit aufgetragen sind. Oben rechts wurden diese Kurven auf Werte zwischen 0 und 1 normiert.

Unten erfolgt der Vergleich zwischen den vier Messreihen. Die Kinetik der Bulbuszellen ist deutlich schneller als die der GH<sub>3</sub>/B<sub>6</sub>-Zellen. Bei höheren Temperaturen erfolgt eine Linksverschiebung der Kurven, also eine Beschleunigung der Aktivierung.

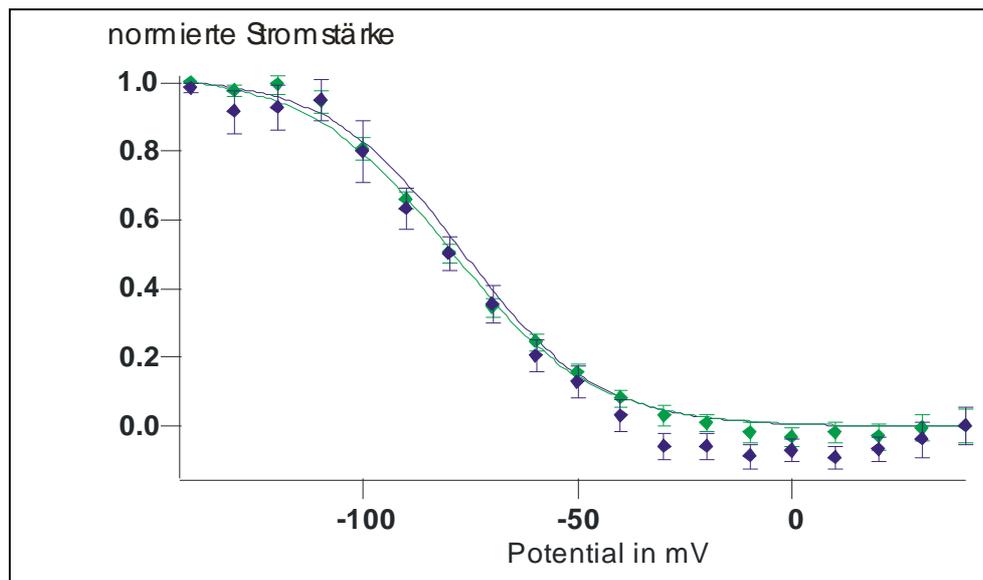
### 3.5. Steady-state Inaktivierung

Für die steady-state Inaktivierung wurde ein abgewandeltes Inaktivierungsprotokoll benutzt (Abb. 27). Das Haltepotential betrug  $-20$  mV. Es folgte zur vollständigen Aktivierung der Kanäle für eine Sekunde eine Depolarisation auf  $+60$  mV, an deren Ende eine komplette Inaktivierung vorliegen sollte. Anders als beim Inaktivierungsprotokoll, wo eine Hyperpolarisation auf  $-100$  mV stattfand, wurde hier der nun folgende Puls variiert. In  $10$  mV-Schritten wurde die Spannung zwischen  $+40$  und  $-140$  mV verändert. Wieder musste eine möglichst kurze Dauer gewählt werden, um zu gewährleisten, dass nach der Erholung von der Inaktivierung noch keine große Deaktivierung vorlag. Daher wurde eine Dauer von  $15$  ms für  $20$  °C-Messungen und von  $8$  ms bei  $37$  °C-Messungen gewählt. Zum Abschluss gab es eine erneute  $200$  ms dauernde Depolarisation auf  $+40$  mV. Dabei entstand ein Auswärtsstrom, dessen Maximum gemessen wurde und gegen die Spannung aufgetragen wurde. Je negativer der variable Puls wurde, desto größer wurde der maximale Auswärtsstrom, was dadurch bedingt war, dass bei negativen Potentialen die schnellste Erholung von der Inaktivierung vorlag, so dass mehr Kanäle aktivierten. Bei positiven Werten floss kein Strom, da die Kanäle durch die vorherige Depolarisation und fehlende Erholung davon nach wie vor inaktiviert waren, so dass hier der Zustand des stationären Stroms vorlag. Der Maximalstrom war abhängig von den zuvor offenen Kanälen und wurde durch die Inaktivierung geringer. Untersucht wurden  $V_{0,5}$  und der Steigungsfaktor  $k$ .



**Abbildung 27: steady-state Inaktivierungs-Protokoll:** Das Haltepotential beträgt  $-20$  mV. Zum Öffnen und inaktivieren der Kanäle wird für eine Sekunde auf  $+60$  mV depolarisiert. Es folgt ein Puls der für  $8$  ms bei  $37$  °C und  $15$  ms bei  $20$  °C zwischen  $+40$  und  $-140$  mV variiert. Gemessen wurden die Maxima zu Beginn des abschließenden Pulses auf  $+40$  mV. In der Abbildung rechts ist ein Beispielstrom einer  $GH_3/B_6$ -Zelle bei  $20$  °C gezeigt. Dargestellt sind nur der variable Puls und die folgende Depolarisation.

Der Versuch wurde zunächst für die GH<sub>3</sub>/B<sub>6</sub>-Zellen durchgeführt. Bei 20 °C wurde der halbmaximale Wert als -79,97 mV ( $\pm 2,25$  mV) ermittelt. Für 37 °C erhielt man -77,07 mV ( $\pm 3,38$  mV). Der zugehörige p-Wert lag bei 0,49. Der Steigungsfaktor ergab bei 20 °C  $k=17,88$  mV ( $\pm 1,99$  mV) und bei 37 °C  $k= 16,45$  mV ( $\pm 1,45$  mV). Der zugehörige p-Wert betrug 0,57. Beide Parameter waren somit nicht signifikant temperaturabhängig (Abb. 28). Da bei allen anderen Parametern festgestellt wurde, dass bei den GH<sub>3</sub>/B<sub>6</sub>-Zellen eine größere Temperaturabhängigkeit als bei den Bulbuszellen vorlag, wurde aus Zeitgründen auf die aufwändigen Messungen der steady-state Inaktivierung bei den Mitralzellen verzichtet.



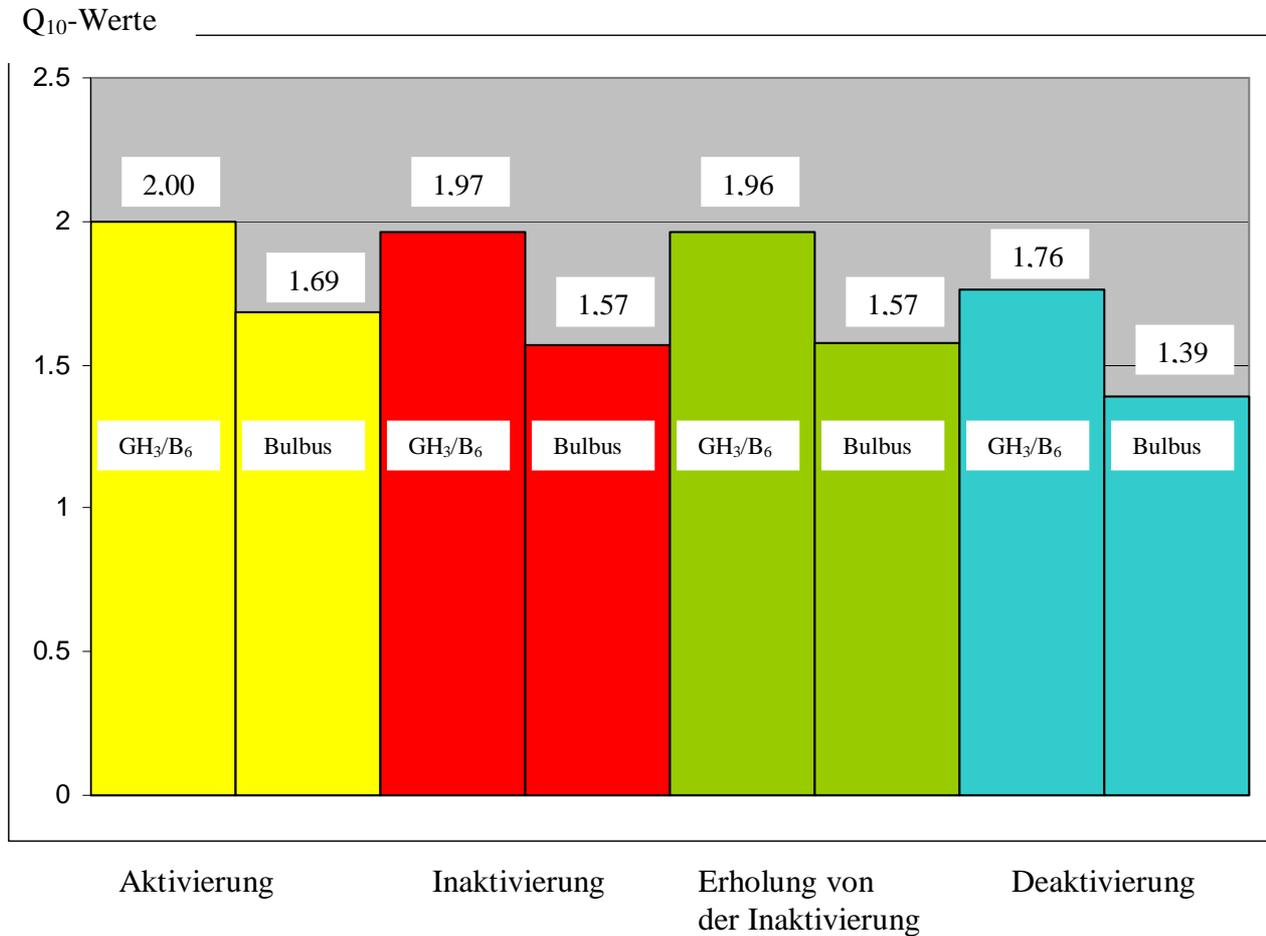
**Abbildung 28: steady-state-Inaktivierung:** Die Punkte entsprechen den normierten Mittelwertskurven der steady-state-Inaktivierung die Linien den gefitteten Kurven. Zwischen 20 und 37 °C ist kein signifikanter Unterschied zu erkennen

### 3.6. Tabellarische Zusammenfassung

Im folgenden werden zur Übersicht nochmals die Werte für  $V_{0,5}$ , den Steigungsfaktor  $k$  und die Amplitude in einer Tabelle zusammengefasst (Tab. 7). Danach folgt eine graphische Übersicht über die  $Q_{10}$ -Werte der Zeitkonstanten von Aktivierung, Inaktivierung, Erholung von der Inaktivierung und Deaktivierung (Abb. 29). Die Zeitkonstanten selbst sind bereits bei der Besprechung der Ergebnisse aufgeführt. Bei der Übersicht über die  $Q_{10}$ -Werte fällt auf, dass jeweils die Werte für die  $\text{GH}_3/\text{B}_6$ -Zellen deutlich größer als die der Bulbuszellen sind. Die  $Q_{10}$ -Werte für die unterschiedlichen Parameter sind sehr ähnlich. Eine Ausnahme stellt die Deaktivierung dar, die weniger temperaturabhängig ist. Die höchsten Werte weist jeweils die Aktivierung auf.

	$\text{GH}_3/\text{B}_6$ (20 °C)	$\text{GH}_3/\text{B}_6$ (37 °C)	Bulbus (20 °C)	Bulbus (37 °C)
Verfügbarkeit: $V_{0,5}$ in mV	-61,18 ( $\pm$ 1,71)	-51,58 ( $\pm$ 1,71)	-64,12 ( $\pm$ 0,99)	-56,18 ( $\pm$ 1,01)
Verfügbarkeit: $k$ in mV	7,58 ( $\pm$ 0,35)	7,48 ( $\pm$ 0,41)	5,66 ( $\pm$ 0,23)	6,58 ( $\pm$ 0,55)
Verfügbarkeit: $I_{\text{max}}$ in pA	190 ( $\pm$ 22)	333 ( $\pm$ 34)	421 ( $\pm$ 53)	675 ( $\pm$ 100)
Verfügbarkeit: Stromdichte in A/F	12,3 ( $\pm$ 0,9)	18,4 ( $\pm$ 1,9)	27,0 ( $\pm$ 3,8)	29,8 ( $\pm$ 2,9)
Aktivierung: $V_{0,5}$ in mV	-21,97 ( $\pm$ 1,21)	-29,64 ( $\pm$ 1,69)	-47,87 ( $\pm$ 0,81)	-46,00 ( $\pm$ 0,82)
Aktivierung: $k$ in mV	9,15 ( $\pm$ 0,67)	5,15 ( $\pm$ 0,15)	5,11 ( $\pm$ 0,48)	3,77 ( $\pm$ 0,28)
Aktivierung: $I_{\text{max}}$ in pA	223 ( $\pm$ 27)	388 ( $\pm$ 37)	724 ( $\pm$ 82)	1129 ( $\pm$ 162)
Aktivierung: Stromdichte in A/F	14,0 ( $\pm$ 1,6)	25,2 ( $\pm$ 3,3)	40,7 ( $\pm$ 5,1)	51,9 ( $\pm$ 5,5)
Inaktivierung: $V_{0,5}$ in mV	-79,97 ( $\pm$ 2,25)	-77,07 ( $\pm$ 3,38)		
Inaktivierung: $k$ in mV	-17,88 ( $\pm$ 1,99)	-16,45 ( $\pm$ 1,45)		

**Tabelle 7:** Zusammenfassung der Ergebnisse für  $V_{0,5}$ , den Steigungsfaktor  $k$  und die Amplitude  $I_{\text{max}}$  für die Verfügbarkeit, die Aktivierung und die Inaktivierung für die vier Messreihen. In Klammern ist jeweils der Standardfehler des Mittelwerts angegeben.



**Abbildung 29:** Übersicht über die Q<sub>10</sub>-Werte der Zeitkonstanten für Deaktivierung, Inaktivierung, Aktivierung und Erholung von der Inaktivierung. Die Q<sub>10</sub>-Werte für die GH<sub>3</sub>/B<sub>6</sub>-Zellen sind jeweils deutlich größer als die der Bulbuszellen. Die Werte für die Deaktivierung liegen unter denen der anderen Parameter.

## 4. Diskussion

Nachdem im Ergebnisteil die Unterschiede der biophysikalischen Eigenschaften nativer erg-Kanäle zwischen Raum- und Körpertemperatur dargestellt wurden, stellt sich die Frage, was dies für Messungen an erg-Kanälen bedeutet. Es ergaben sich deutliche Beschleunigungen aller Zeitkonstanten für Aktivierung, Inaktivierung, Erholung von der Inaktivierung und Deaktivierung. Bei 37 °C laufen die Vorgänge deutlich schneller ab als bei 20 °C. Bei höheren Temperaturen erfolgt der Übergang der Kanäle in den geöffneten Zustand schneller. Die Deaktivierung wies dabei die geringste Temperaturabhängigkeit auf, die Aktivierung die höchste. Desweiteren fand sich eine Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung in GH<sub>3</sub>/B<sub>6</sub>-Zellen, nicht aber in Bulbuszellen. Es fand sich kein Unterschied von V<sub>0,5</sub> der steady-state-Inaktivierung bei den GH<sub>3</sub>/B<sub>6</sub>-Zellen. Die Stromamplitude war bei den Versuchen mit 37 °C deutlich größer, jedoch bei GH<sub>3</sub>/B<sub>6</sub>-Zellen deutlicher als bei Bulbuszellen. Man erkennt also nicht nur eine Differenz zwischen den beiden untersuchten Temperaturen, sondern auch zwischen den beiden nativen erg-Strömen.

Die größere Amplitude bei 37 °C gegenüber 20 °C relativierte sich bei Errechnung der Stromdichte aus der Stromamplitude und der Kapazität der Zellmembran. Die Resultate zeigten, dass der Unterschied der Amplitude bei den Bulbuszellen durch die Größe der Zellen mitbedingt war, so dass keine signifikante Veränderung vorlag. Dass größere Zellen gemessen wurden, lässt sich dadurch erklären, dass größere Zellen stabilere Messungen erlaubten, so dass gerade bei 37 °C viele kleinere Zellen während der Messung zerstört wurden und somit nicht in die Auswertung gelangen konnten. Bei den GH<sub>3</sub>/B<sub>6</sub>-Zellen blieb der Unterschied der Amplitude auch nach Auswertung der Stromdichte signifikant.

### Vergleich mit anderen Arbeiten

Naheliegender ist zunächst ein Vergleich der Resultate dieser Arbeit mit denen von Vandenberg et al. und Zhou et al., die in der Einleitung bereits angesprochen wurden. Die erstgenannte Arbeitsgruppe nutzte stabil transfizierte CHO-Zellen mit erg1a-Kanälen und erzeugte so ein Modell, mit welchem die Temperaturabhängigkeit der Kanäle untersucht werden konnte. Ähnlich gingen auch Zhou et al. vor, die HEK 293-Zellen mit erg1a transfizierten. Vergleicht man beide Arbeiten mit meiner, ist es möglich abzuschätzen, wie nah die Messungen an transfizierten Zellen denen mit natürlichen Zellen kommen. Eine Untersuchung an einem realen Modell, wie in dieser Arbeit, ist in der Regel aufschlussreicher als an einem

konstruierten. Trotzdem kann man von vornherein große Übereinstimmungen nahe legen. Nachdem bisher nur Experimente zum Temperaturvergleich mit *erg1a* durchgeführt wurden, liegen mit meiner Arbeit nun erstmals Daten für native und höchstwahrscheinlich heteromultimere Kanäle vor. In  $\text{GH}_3/\text{B}_6$ -Zellen findet man die Untereinheiten *erg1a* und *erg2*. In Bulbuszellen findet man *erg1a*, *erg1b*, *erg2* und *erg3*. Vandenberg et al. benutzten verschiedene Temperaturdifferenzen, während Zhou et al. jeweils 23 und 35 °C verglichen.

Vandenberg et al. führten als Erklärung für die größeren Stromamplituden u.a. eine höhere Einzelkanalleitfähigkeit an, die zwischen 14 und 32 °C mit dem Faktor 1,44 größer wurde. Eine derartige Untersuchung wurde in dieser Arbeit nicht durchgeführt, da keine verbundenen Stichproben vorlagen und durch die Verwendung von E-4031 eine irreversible Blockierung der *erg*-Ströme vorgenommen wurde. Statt der Leitfähigkeit wurde die Stromdichte verglichen. Hierbei ergab sich bei den Bulbuszellen kein signifikanter Unterschied zwischen 20 und 37 °C. Vandenberg et al. verwendeten bei der Untersuchung der Einzelkanalleitfähigkeit den steady state-Auswärtsstrom. In meiner Arbeit war dies nicht möglich, da vor der Blockung kein isolierter *erg*-Strom vorlag und danach durch die Methode der Isolierung zu viele Artefakte durch andere Auswärtsströme bestanden.

Potentielle Unterschiede beruhen neben der unterschiedlichen Kanalart auch auf unterschiedlicher Methodik. So wurden z.B. verschiedene Lösungen benutzt, bei Vandenberg et al. z.B. nur 4,8 mM KCl und bei Zhou et al. 4 mM KCl im Vergleich zu 40 mM KCl in dieser Arbeit. 40mM KCl wurde gewählt um die Stromamplituden zu vergrößern. Auch waren die Protokolle nicht identisch, beispielsweise dauerte der variable Puls im Aktivierungsprotokoll bei Vandenberg et al. 30 Sekunden statt den hier benutzten vier Sekunden. Somit waren Vandenberg's Versuche näher am steady state-Zustand. Die kürzeren Pulse beeinflussten auch die Steigung der Versuche, da bei niedrigeren Temperaturen bei hohen Potenzialen eher ein steady state vorliegt und dieser bei niedrigen Potentialen durch kurze Pulse eher nicht erreicht wird. Dies führt zu einer geringeren Aussagekraft des Steigungsfaktors in meinen Versuchen.

In den Untersuchungen von Vandenberg et al. fand sich als erster großer Unterschied ein deutlich stärkerer Unterschied der Amplitude im Temperaturbereich zwischen 22 und 37 °C. Bei Erwärmung wurde  $I_{\text{max}}$  bis zu 4,7 mal größer. In meiner Arbeit erfolgte bei  $\text{GH}_3/\text{B}_6$ -Zellen ein etwa 1,75-facher Anstieg. Bei den Bulbuszellen ergab sich eine Erhöhung mit dem Faktor 1,6. Zhou et al. fanden im Vergleich zwischen 23 und 35° C einen Stromdichtenanstieg auf den Faktor 2,2.

Bei der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung fand sich bei Vandenberg et al. eine Verschiebung von  $-29,6$  mV bei  $14$  °C auf  $-44,2$  mV bei  $32$  °C. Zhou et al. fanden eine Verschiebung von  $-14,2$  mV auf  $-28,1$  mV. Die Werte ähneln denen bei den  $\text{GH}_3/\text{B}_6$ -Zellen, die einen Shift von  $-22,0$  auf  $-29,6$  mV ergaben. Zu bedenken ist dabei, dass es möglich ist, dass es im Bereich zwischen  $14$  und  $20$  °C bedeutsame Unterschiede gibt, welche die Vergleichbarkeit erschweren. Im Gegensatz zu den  $\text{GH}_3/\text{B}_6$ -Zellen und *erg1a* änderte sich  $V_{0,5}$  bei den Bulbuszellen mit Werten von  $47,9$  und  $46,0$  mV nicht signifikant. Alle vier Zellarten zeigen zudem unterschiedliche Spannungsbereiche, in denen  $V_{0,5}$  liegt, was zu einem großen Teil durch die unterschiedlichen *erg*-Untereinheiten bedingt sein dürfte. In der Literatur ist beschrieben, dass  $V_{0,5}$  der Aktivierung bei *erg3* deutlich negativere und bei *erg2* positivere Werte ergibt (Schledermann et al 2001, Shi et al. 1998, Wimmers et al. 2002). Dazu kommt zumindest im Vergleich zwischen den unterschiedlichen Arbeiten die angesprochene ungleiche Methodik mit anderen Ionenkonzentrationen intra- und extrazellulär. Bei den von mir untersuchten Zellen fanden sich für die Aktivierung differierende Steigungsfaktoren, was bei Vandenberg et al. nur für den Bereich zwischen  $14$  und  $22$  °C zu erkennen war, nicht jedoch für den Bereich zwischen  $22$  und  $32$  °C.

Vandenbergs Arbeitsgruppe maß die steady-state-Inaktivierung mit dem Verfügbarkeitsprotokoll, was methodisch nicht ganz korrekt ist, da hierbei eine Korrektur für die Deaktivierung geschätzt werden muss, da die Deaktivierung von der Erholung von der Inaktivierung überlagert wird. Die Amplitude wurde zum Zeitpunkt  $t = 0$  ms extrapoliert, obwohl ein lineares Modell vorlag. Vandenberg et al. nutzten eine Methode, die nicht berücksichtigte, dass vor der Deaktivierung eine Öffnung der Kanäle erfolgen muss. Die Deaktivierung wurde aus dem geschätzten Maximum zum Zeitpunkt  $t=0$  ermittelt, so dass ein zu hoher Wert für das Gesamtsystem bestimmt wurde. Dennoch bemerkenswert ist, dass es mit dieser Methode, die lediglich zu geringen Abweichungen führen sollte, eine Verschiebung von  $V_{0,5}$  von  $-95,6$  mV bei  $14$  °C auf  $-78$  mV bei  $32$  °C gab. Diese Verschiebung konnte bei  $\text{GH}_3/\text{B}_6$ -Zellen mit der oben beschriebenen Methode nicht belegt werden. Die Veränderung von  $-80$  mV auf  $-77$  mV konnte nicht als signifikant erachtet werden.

Größere Übereinstimmung gab es zwischen den  $Q_{10}$ -Werten der Zeitkonstanten zwischen den *erg1a*-Zellen und den  $\text{GH}_3/\text{B}_6$ -Zellen. Zwar waren die Resultate für Inaktivierung (2,5) und Erholung von der Inaktivierung (2,6) bei Vandenberg et al. größer, doch ähnelten sich die Werte für die Aktivierung (2,1 bei *erg1a*-Zellen gegenüber 2,0 bei  $\text{GH}_3/\text{B}_6$ ) und die Deaktivierung (*erg1a*:1,7,  $\text{GH}_3/\text{B}_6$ : 1,76) stark. Die  $Q_{10}$ -Werte der Bulbuszellen lagen jeweils deutlich unter denen des nativen *erg*-Stroms in  $\text{GH}_3/\text{B}_6$ -Zellen und *erg1a*. Übereinstimmend

ist in allen Fällen, dass die Beschleunigung durch Erwärmung bei der Deaktivierung am geringsten ausfällt. Der von Vandenberg et al. beobachtete geringere Wert bei der Aktivierung gegenüber Inaktivierung und Erholung von der Inaktivierung konnte hier nicht bestätigt werden. Bei den Bulbuszellen lag der  $Q_{10}$ -Wert sogar über diesen. Die Begründung dafür, dass der  $Q_{10}$ -Wert der Aktivierung in meiner Arbeit der größte war, dürfte darin liegen, dass der Prozess der Aktivierung der deutlich langsamste ist, was eine größere Möglichkeit zur Beschleunigung der Kinetik durch Temperaturerhöhung lässt als bei ohnehin schnellen Vorgängen.

Bei Zhou et al. beschleunigte sich die Zeitkonstante der Aktivierung bei 0 mV mit dem  $Q_{10}$ -Wert 6,25. In meiner Arbeit, bei allerdings anderen Protokollen, ergaben sich Werte von 2,00 für  $\text{GH}_3/\text{B}_6$  und 1,69 für die Mitralzellen, wobei die Zeitkonstante der Aktivierung bei Zhou et al. bei 23 °C mit 947 ms auch deutlich langsamer war als 382 ms ( $\text{GH}_3/\text{B}_6$ -Zellen) und 150 ms bei den Bulbuszellen, so dass eine insgesamt langsamere Kinetik durch die Temperaturerhöhung stärker beschleunigt wurde.

Auch die Zeitkonstante der Inaktivierung bei 0 mV erbrachte bei Zhou et al. einen höheren  $Q_{10}$ -Wert von 3,55 im Vergleich zu 1,97 bei  $\text{GH}_3/\text{B}_6$ -Zellen und 1,57 bei den Mitralzellen, wobei hier die Zeitkonstante der Inaktivierung bei 23 °C bei Zhou et al. mit 14,2 ms schneller war als die hier gemessenen 26,2 bzw. 20,4 ms. Ein sehr ähnliches Bild ergab sich bei der Erholung von der Inaktivierung. Zhou et al. fanden bei -50 mV einen  $Q_{10}$ -Wert von 3,65. Lediglich die Deaktivierung erbrachte bei Zhou et al. einen deutlich niedrigeren  $Q_{10}$ -Wert von 1,36 für die schnelle und 1,25 für die langsame Komponente der Deaktivierung im Vergleich zu meinen Ergebnissen, obwohl die Kinetik bei Zhou et al. langsamer war.

Insgesamt ergaben sich bei Zhou et al. abgesehen von der Deaktivierung wesentlich höhere  $Q_{10}$ -Werte als in Vandenberg's Arbeit und als bei den  $\text{GH}_3/\text{B}_6$ - und Mitralzellen. Ähnlich war in Bezug auf meine Resultate der geringste Temperatureffekt auf die Deaktivierung und der stärkste Temperatureffekt auf die Aktivierung.

Nach der Van't Hoff'schen Regel verdoppeln sich Reaktionsgeschwindigkeiten bei den meisten physiologischen Prozessen, wenn die Temperatur um 10 °C erhöht wird, was einem  $Q_{10}$ -Wert von 2 entspricht, wobei Werte zwischen 1,5 und 4 noch häufig sind. Die hier gemessenen Temperaturkoeffizienten liegen somit eher am unteren Ende des beschriebenen Bereiches, während die Ergebnisse von Zhou et al. am oberen Ende bzw. deutlich darüber liegen. Für die Leitfähigkeit von Kanälen sind in der Literatur  $Q_{10}$ -Werte von 1,2-1,5 angegeben (Hille: „Ionic Channels of Excitable Membranes“, 1984). Zum Vergleich zeigten sich in einer Arbeit über den Temperatureffekt auf Natriumströme zwischen 0 und 40 °C

(Schwarz, 1986) bei höheren Temperaturen niedrigere  $Q_{10}$ -Werte als bei niedrigen Temperaturen mit einem  $Q_{10}$ -Wert für die maximale Stromamplitude von 1,1 zwischen 20 und 40 °C und einem Wert von 1,9 °C zwischen 0 und 10 °C. Die Werte für time-to-peak und Zeitkonstanten der Aktivierung und Inaktivierung lagen zwischen 20 und 40 °C bei 1,8-2,1 und zwischen 0 und 19 °C bei 2,9-3,7. Die Werte zwischen 20 und 40 °C ähnelten somit den Werten in meiner Arbeit beim Vergleich von 20 und 37 °C.

Bei Shaker-Kalium-Kanälen (Rodriguez et al., 1998) wies der Zeitgang der Aktivierung einen  $Q_{10}$ -Wert von über 4 auf, während der Wert für die Leitfähigkeit lediglich 1,44 betrug. Für die Erholung von der Inaktivierung ergaben sich stark spannungsabhängige  $Q_{10}$ -Werte zwischen 1,2 und  $>4$ .

Bemerkenswert war, dass sich die Zeitkonstanten bei 37 °C bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Zellarten anglichen. Dieser Effekt fand sich vor allem bei der Deaktivierung und der Erholung von der Inaktivierung, in geringerem Ausmaße auch der Inaktivierung und der Aktivierung. Während man bei 20 °C eine deutlich schnellere Kinetik des erg-Stroms bei den Bulbuszellen gegenüber den  $\text{GH}_3/\text{B}_6$ -Zellen fand, ergab sich bei 37 °C nahezu kein Unterschied. In den oben abgebildeten Graphen (Abb. 14 u. 15) lagen die Kurven beider Zellarten bei 37 °C praktisch aufeinander. Erklären ließe sich dies einerseits mit dem unterschiedlichen Zelltyp, andererseits damit, dass Prozesse, die schon bei niedrigen Temperaturen schneller ablaufen, eine geringere Beschleunigung der Kinetik durch Temperaturerhöhung erfahren. Dies gilt jedoch nicht für die Deaktivierung, da die dort sehr langsame Zeitkonstante den geringsten  $Q_{10}$ -Wert aufweist. Ein mögliches technisches Problem ergibt sich bei der Auswertung sehr schneller Zeitkonstanten im Bereich von wenigen ms und darunter, wie bei der Erholung von der Inaktivierung, da die Auflösung der Bildpunkte zur korrekten Ermittlung der  $\tau$ -Werte sehr hoch gewählt werden muss.

Bei der Potenzialabhängigkeit der Zeitkonstanten der Erholung von der Inaktivierung ist deutlich zu erkennen, dass die  $Q_{10}$ -Werte bei positiver werdenden Potentialen größer werden. Bei -120 mV finden sich die kleinsten  $\tau$ -Werte, somit die schnellsten Prozesse, die somit weniger Möglichkeit zur Beschleunigung bieten. Bis -70 mV werden die Prozesse immer langsamer und die Veränderungen bei höherer Temperatur immer größer. Dieser Effekt fehlt bei der Deaktivierung. Die Deaktivierung läuft jedoch generell sehr viel langsamer ab als die Erholung von der Inaktivierung. Bei der Inaktivierung tritt oben genannter Effekt tendenziell bei den  $\text{GH}_3/\text{B}_6$ -Zellen, nicht jedoch bei den Bulbuszellen auf.

Im Mittel lag die Temperaturabhängigkeit der  $\text{GH}_3/\text{B}_6$ -Zellen zwischen den Resultaten von Vandenberg et al. und den von mir gemessenen Ergebnissen bei den Bulbuszellen. Beide

endogenen erg-Ströme wiesen eine deutlich geringere Veränderung auf als in der anderen Arbeit beschrieben. In den GH<sub>3</sub>/B<sub>6</sub>-Zellen finden sich die Untereinheiten erg1a und erg2, welche beide eher langsame Kinetiken aufweisen, so dass eine größere Ähnlichkeit gegenüber den Experimenten mit nur erg1a zu erwarten ist.

Auffällig war, dass die Amplituden bei den Messungen mit Bulbuszellen größer waren als bei den Experimenten mit GH<sub>3</sub>/B<sub>6</sub>-Zellen. Nach Ermittlung einer signifikant höheren Stromdichte der Bulbuszellen im Vergleich zu GH<sub>3</sub>/B<sub>6</sub>-Zellen ist die Größe der Zellen nicht allein für die Amplitudendifferenz ursächlich. Somit wären bei gleicher Leitfähigkeit mögliche Erklärungen eine größere Zahl Kanäle pro Membranfläche oder längere Offenzeiten der erg-Kanäle bei den Bulbuszellen.

Interessant wäre somit zu untersuchen, ob die unterschiedlichen Q<sub>10</sub>-Werte tatsächlich durch die unterschiedlichen erg-Untereinheiten in den gemessenen Zellen bedingt sind. Um für Klärung zu sorgen, wäre ein Folgeexperiment sinnvoll, in dem Zellen ohne erg-Strom mit jeweils einer Untereinheit und eventuell noch andere mit einer Kombination aus zwei oder mehreren Untereinheiten transfiziert werden. Den bisherigen Untersuchungen zufolge würde man vermuten, dass erg1a die größten Temperatureffekte aufweist und erg2 sich weniger stark verändert, da letzteres in den stärker temperaturabhängigen Versuchen bei Vandenberg et al. und Zhou et al. fehlte. Zu bedenken bliebe aber auch, dass heteromultimere Kanäle andere Eigenschaften aufweisen können als die einzelnen Untereinheiten und man aus Messungen der einzelnen erg-Untereinheiten nicht unbedingt darauf schließen kann, wie sie sich in der jeweiligen Kombination in den unterschiedlichen Zellarten verhalten (Wimmers et al. 2002).

Ein möglicher Fehler durch Temperaturschwankungen während der Versuche dürfte keinen Einfluss auf die Unterschiede zwischen den Temperaturen haben, da jeweils zu Beginn des Versuchs die Temperatur exakt eingestellt wurde und eine Veränderung während der Messung um mehr als 0,5 °C nicht zu erwarten ist. Ein möglicher Fehler ergab sich bei dem nicht temperierten Zulauf des E-4031. Durch die deutlich geringere zugeführte Menge im Vergleich zum Volumen der Messlösung waren die Schwankungen auch hier gering und bei allen Versuchsreihen gleich. Nach den Messungen wurde die Temperatur überprüft und entsprach bis auf maximal wenige Zehntel Abweichung dem vorgesehenen Wert. Ein weiterer möglicher Fehler liegt zudem in einer Temperaturdifferenz innerhalb der Messlösung zwischen Randbereich und Mitte der Messschale, so dass die Temperatur an der Zelle niedriger gewesen sein könnte als die gemessene. Daraus resultieren würde zwar kein Fehler im Vergleich zwischen GH<sub>3</sub>/B<sub>6</sub>-Zellen und Bulbuszellen, jedoch eine geringere

Temperaturabhängigkeit der Kanäle in meiner Arbeit gegenüber denen in den Arbeiten von Vandenberg et al. und Zhou et al..

### Fazit und Ausblick

Zur Diskussion steht nun, inwieweit man Messungen an erg-Kanälen zukünftig bei Körpertemperatur, und nicht bei Raumtemperatur durchführen sollte. Deutlich wurde ein Unterschied in den meisten Parametern, der jedoch nicht die Ausmaße annahm, die in der Arbeit von Vandenberg beobachtet wurden. Die Temperaturabhängigkeit des erg-Stroms der Bulbuszellen war noch deutlich geringer als diejenige des erg-Stroms der GH<sub>3</sub>/B<sub>6</sub>-Zellen. Trotzdem treten Unterschiede zwischen den Temperaturen auf. Dies allein betrachtet würde für eine generelle Empfehlung für Messungen bei Körpertemperatur sprechen, da diese Ergebnisse näher an der Realität liegen. Das Hauptargument dagegen ist die Problematik der Messungen bei 37 °C, die sich als sehr aufwändig erwiesen. Zunächst bedarf es der Einrichtung eines funktionierenden Systems zur Temperatureinstellung und der Kontrolle der Temperatur, was allein gesehen jedoch kein größeres Problem darstellen sollte. Problematisch ist mehr das Experiment selbst. Bei hohen Temperaturen zeigten sich die Experimente deutlich instabiler. Die Sealbildung war erschwert, da die Zellmembran sehr sensibel auf geringere Saugdrücke reagierte, so dass deutlich mehr Zellen bereits bei Versuchsbeginn zerstört wurden. Im Verlauf der Versuche ging wieder ein Teil der Zellen beim Durchbrechen des Membranstücks verloren, so dass es bereits einer deutlich größeren Zahl an Versuchen bedurfte, um überhaupt zu einer Messung zu gelangen. Je mehr Potentialsprünge das verwendete Protokoll aufwies und je negativer das Haltepotential war, desto mehr Zellen entwickelten während der Messung ein Leck in der Membran, was zum Absterben der Zelle führte. Bei einem Haltepotential von -20 mV beim Verfügbarkeits-, Inaktivierungs- und steady-state-Inaktivierungsprotokoll war eine gute Stabilität gewährleistet. Als deutlich problematischer gestalteten sich das Aktivierungs- und „envelope of tails“-Protokoll mit einem Haltepotential von -80mV, das die Zellen schon bei Raumtemperatur stärker belastet. Die nächste mechanische Belastung der Zellen erfolgte durch die Applikation von E-4031, auf die noch die Messung des E-4031 insensitiven Stroms folgten. Bei jeder neuen Belastung ergab sich eine weitere Möglichkeit zum Verlust der Zelle. Die Wahrscheinlichkeit des Scheiterns des Experiments war bei höheren Temperaturen ungleich größer. Bei Raumtemperatur gelangen nahezu alle Experimente auf Anhieb, während bei den -80 mV-Protokollen bei 37 °C teilweise mehr als zehn Versuche benötigt wurden, um eine brauchbare

Messung zu erhalten. Dies führte neben Frustration zu einer erheblichen zeitlichen Verzögerung, da zeitweise mehr als eine Woche keine brauchbaren Messungen entstanden. Daraus ließe sich schließen, Messungen bei Körpertemperatur aufgrund des erheblich größeren Aufwandes von Zeit und Arbeitskraft nur für ausgewählte Fragestellungen zu verwenden. Man sollte genau betrachten, was man mit einer Fragestellung zeigen möchte und wie sehr der Temperatureffekt die Ergebnisse verfälscht. Diese Arbeit zeigt, inwieweit die Temperatur Einfluss auf Experimente haben kann und dass sich somit Messungen im Labor bei Raumtemperatur nicht bedenkenlos auf den Zustand im menschlichen Körper übertragen lassen, da die Prozesse physiologisch vor allem schneller ablaufen. Nicht alle Schalt-Parameter weisen den gleichen  $Q_{10}$ -Wert auf, so dass sich Erg-Ströme mit anderen Charakteristika ergeben. Somit ist zumindest zu erwägen, dass jede Raumtemperaturmessung einen bestimmten Fehler beinhaltet, der auch Einfluss auf die Signifikanz von Ergebnissen haben kann. So ist jeweils im Einzelfall zu entscheiden, ob der gemessene Parameter ausreichend signifikant ist, dass er auch bei höherer Temperatur Bestand hätte und ob es sich lohnt, den Aufwand zu betreiben bei 37 °C zu messen.

In einer Arbeit über physiologische Eigenschaften von *herg1a/1b* im Zusammenhang mit dem long-QT-Syndrom (Sale et al., 2008) wurde bereits bei nahezu physiologischer Temperatur von 34 °C gemessen. Auch dort bestand das Problem von ungenügend stabilen Seals bei langen Messungen, so dass Versuche zur Medikamenten-Empfindlichkeit bei 22 °C durchgeführt wurden. In der gleichen Arbeit wurde *erg1a* mit *erg1a/1b* verglichen. Es zeigten sich beim multimeren Kanal größere Ströme und ein schneller erreichtes Maximum. Für  $V_{0,5}$  der Aktivierung und die Zeitkonstante der Inaktivierung gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den homomeren und den heteromeren Kanälen, jedoch deutlich schnellere Zeitkonstanten der Aktivierung und Deaktivierung. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch bei Vergleichen von homo- und heteromeren Kanälen bei Raumtemperatur (Kirchberger et al. 2006). Weiterhin erfolgte die Blockierung der heteromeren Kanäle mit E-4031 langsamer. In dieser Arbeit wurde nochmals der Unterschied zwischen den verschiedenen *erg*- Isoformen deutlich. Ein Vergleich zwischen verschiedenen Temperaturen fehlte jedoch.

Es stellt sich jeweils die Frage, wie vergleichbar die Versuche bei unterschiedlichen Temperaturen sind. Daher wäre es wünschenswert eine Möglichkeit zu erhalten, einen Umrechnungsfaktor zu benutzen. Aus den unterschiedlichen  $Q_{10}$ -Werten für die verschiedenen Parameter ließen sich theoretisch Modelle für physiologische Vorgänge bei Körpertemperatur ermitteln. Solche konnten zumindest aus den Daten dieser Arbeit nicht

erstellt werden. Zu komplex sind die Veränderungen, zudem verschieden zwischen den Zellarten. Fraglich ist somit, ob es zulässig wäre, zum Beispiel bei der Messung einer Zeitkonstante einfach eine der oben abgebildeten Tabellen zu nehmen und aus den zusammengehörigen Werten einen Faktor zu berechnen, um den der bei Raumtemperatur gemessene Wert für die Körpertemperatur korrigiert wird. Problematisch ist dabei auch das oben angesprochene Phänomen, dass ohnehin schnelle Vorgänge eventuell weniger empfindlich für Temperaturerhöhungen sind. Zudem werden die Experimente verschiedener Labore nicht standardisiert durchgeführt, da z.B. unterschiedliche Lösungen, Pipetten, Messtechniken und Protokolle benutzt werden.

Eine aktuelle Arbeit zeigte bereits, dass Erythromycin herg bei 37 °C signifikant stärker blockiert als bei 22 °C (Guo et al., 2005). Das Ausmaß der Blockierung stieg bei Erhöhung der Temperatur zwischen 36 und 42 °C linear an, was neben der Körpertemperatur den Zustand bei Fieber symbolisierte. Ähnliche Resultate erzielte eine weitere Arbeit (Kirsch et al., 2004), in der sich eine deutliche Temperaturabhängigkeit der Blockierung von herg durch Sotalol und Erythromycin ergab.

Als Botschaft aus dieser Arbeit sollte man zumindest mitnehmen, bei Messungen bei Raumtemperaturen einzubeziehen, dass ein Temperaturfehler vorliegt. Wie gravierend dieser ist, muss jeweils neu definiert werden. Auch zeigte sich, dass die Daten von erg1a-Kanälen nicht auf endogene Kanäle übertragbar sind. Um sicherer die Bedingungen im Körper zu reproduzieren, sollte man den Aufwand betreiben und bei 37 °C messen. Zum Preis einer zeitintensiveren und mühsameren Arbeit erhält man als Belohnung ein realitätsnäheres Ergebnis. Gerade bei Erprobung temperaturempfindlicher Medikamente könnte so ein Irrtum auf Kosten der Gesundheit von Patienten vermieden werden.

## 5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde mit der Patch-Clamp-Technik die Temperaturabhängigkeit von nativen erg-Kaliumkanälen in einer Hypophysenzelllinie sowie in Neuronen des Bulbus olfactorius untersucht. Die somatomammotropen GH<sub>3</sub>/B<sub>6</sub>-Zellen exprimieren die erg-Untereinheiten erg1a und erg2 und Mitralzellen die Untereinheiten erg1a, erg1b, erg2 und erg3. Die Experimente wurden bei 20 °C oder bei 37 °C durchgeführt, wobei die nativen erg-Ströme mit Hilfe des spezifischen Blockers E-4031 isoliert wurden. Der Vergleich der biophysikalischen Eigenschaften der erg-Ströme bei den verschiedenen Temperaturen erbrachte folgende Ergebnisse:

- Die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung veränderte sich bei den GH<sub>3</sub>/B<sub>6</sub>-Zellen mit  $V_{0,5}$  (Spannungswert für die halbmaximale Aktivierung) = -29,6 mV bei 37 °C im Gegensatz zu  $V_{0,5} = -22,0$  mV bei 20 °C. Das bedeutet, dass die erg-Kanäle bei 37 °C schon bei negativeren Membranpotentialen aktivieren und so beispielsweise einen größeren Beitrag zum Ruhemembranpotential leisten können. Bei den Bulbuszellen gab es keine signifikante Veränderung von  $V_{0,5}$ .
- Bei den GH<sub>3</sub>/B<sub>6</sub>-Zellen ergab sich im Gegensatz zu den Mitralzellen bei der höheren Temperatur eine signifikant höhere Stromdichte.
- Die Potentialabhängigkeit der stationären Inaktivierung wurde bei GH<sub>3</sub>/B<sub>6</sub>-Zellen untersucht und zeigte keine signifikanten Unterschiede..
- Die Zeitkonstanten aller gemessenen Parameter waren bei 37 °C im Vergleich zu 20 °C beschleunigt. Es zeigte sich für die Aktivierung ein  $Q_{10}$ -Wert von 2,00 (GH<sub>3</sub>/B<sub>6</sub>-Zellen) bzw. 1,69 (Mitralzellen), für die Zeitkonstante der Inaktivierung von 1,97 bei den GH<sub>3</sub>/B<sub>6</sub>-Zellen und 1,57 bei den Bulbuszellen, für die Deaktivierung von 1,76 (GH<sub>3</sub>/B<sub>6</sub>) bzw. 1,39 (Mitralzellen) und für die Erholung von der Inaktivierung von 1,96 (GH<sub>3</sub>/B<sub>6</sub>) bzw. 1,57 (Bulbus). Der  $Q_{10}$ -Wert war bei der Erholung von der Inaktivierung spannungsabhängig und wurde bei positiver werdenden Potenzialen größer.

Insgesamt zeigte sich eine signifikante Temperaturabhängigkeit der erg-Kanäle, die bei GH<sub>3</sub>/B<sub>6</sub>-Zellen deutlich stärker ausgeprägt war als bei Mitralzellen und weniger groß als in den Arbeiten von Vandenberg et al. (2006) und Zhou et al. (1998) an herg-transfizierten Zellen beschrieben. Daraus ergibt sich zumindest bei einigen Studien die Empfehlung zu Messungen bei Körpertemperatur, da sich die an homomultimeren Kanälen im heterologen

Expressionssystem gewonnenen Daten nicht unbedingt auf native heteromultimere erg-Kanäle übertragen lassen.

## 6. Literaturverzeichnis

- BARROS F., DEL CAMINO D., PARDO L.A., PALOMERO T., GIRALDEZ T., DE LA PENA P. (1997). Demonstration of an inwardly rectifying K<sup>+</sup> current component modulated by thyrotropin-releasing hormone and caffeine in GH<sub>3</sub> rat anterior pituitary cells. *European Journal of Physiology* **435**: 119-129
- BAUER C.K. (1998). The erg inwardly rectifying K<sup>+</sup> current and its modulation by thyrotrophin-releasing hormone in giant clonal rat anterior pituitary cells. *Journal of Physiology* **510.1**: 63-70
- BAUER C.K., ENGELAND B., WULFSEN I., LUDWIG J., PONGS O., SCHWARZ J.R. (1998). RERG is a molecular correlate of the inward-rectifying K<sup>+</sup> current in clonal rat pituitary cells. *Receptors and Channels* **6**: 19-29
- BAUER C.K., MEYERHOF W., SCHWARZ J.R. (1990). An inward-rectifying K<sup>+</sup> current in clonal rat pituitary cells and its modulation by thyrotrophin-releasing hormone. *Journal of Physiology* **429**: 169-189
- BAUER C.K., SCHWARZ J.R. (2001). Physiology of eag K<sup>+</sup> channels. *Journal of Membrane Biology* **182**: 1-15
- BISCHOFF U., SCHMIDT C., NETZER R., PONGS O. (2000). Effects of fluoroquinolones on hERG currents. *European Journal of Pharmacology* **406**: 341-343
- BRANDTS B.K., POTT L. (2000). Kaliumströme und die Repolarisation des Herzaktionspotentials. *Physiologie* **15**: 10-22
- CHIESA N., ROSATI B., ARCANGELI A., OLIVOTTO M., WANKE E. (1997). A novel role for hERG K<sup>+</sup> channels: Spike-frequency adaptation. *Journal of Physiology* **501**: 313-318
- COLATSKY T.J., ARGENTIERI T.M. (1994). Potassium channel blockers as antiarrhythmic drugs. *Drug Dev Research* **33**: 235-249
- CORRETTE B.J., BAUER C.K., SCHWARZ J.R. (1996). An inactivating inward-rectifying K<sup>+</sup> current present in prolactin cells from the pituitary of lactating rats. *Journal of Membrane Biology* **150**: 185-195
- CURRAN M.E., SPLAWSKI I., TIMOTHY K.W., VINCENT G.M., GREEN E.D., KEATING M.T. (1995). A molecular basis for cardiac arrhythmia: hERG mutations cause long QT syndrome. *Cell* **80**: 795-803
- DUMAINE R., ROY M.L., BROWN A.M. (1998). Blockade of hERG and Kv 1.5 by ketoconazole. *Journal of pharmacological experimental theory* **286**: 727-735

- ENGELAND B., NEU A., LUDWIG J., ROEPER J., PONGS O. (1998). Cloning and functional expression of rat ether-à-go-go-like K<sup>+</sup> channel genes. *Journal of Physiology* **513.3**: 647-654
- ENGELHARDT A. (1951). Die Temperaturabhängigkeit der Erregungsleitungsgeschwindigkeit im Kalt- und Warmblüternerven. *Zeitschrift für vergleichende Physiologie* **33**: 125-128
- FICKER E., JAROLIMEK W., KIEHN J., BAUMANN A., BROWN A.M. (1998). Molecular determinants of dofetilide block of HERG K<sup>+</sup> channels. *Circulation Research* **82**: 386-395
- GEELLEN P., DROLET B., RAIL J., BERUBE J., DALEAU P., ROUSSEAU G., CARDINAL R., O'HARA G.E., TURGEON J. (2000). Sildenafil (Viagra) prolongs cardiac repolarization by blocking the rapid component of the delayed rectifier potassium current. *Circulation* **102**: 275-277
- GOURDJI D., BATAILLE D., VAUCLIN N., GROUSELLE D., ROSSELIN G., TIXIER-VIDAL A. (1979). Vasoactive intestinal peptide (VIP) stimulates prolactin (PRL) release and cAMP production in a rat pituitary cell line (GH<sub>3</sub>/B<sub>6</sub>). Additive effects of VIP and TRH on PRL release. *FEBS Letter* **104**: 165-168
- GUO J., ZHAN S., LEES-MILLER J.P., TENG G., DUFF H.J. (2005). Exaggerated block of herg (KCNH2) and prolongation of action potential duration by erythromycin at temperatures between 37 °C and 42 °C. *Heart Rhythm* **2.8**: 860-866
- HAMILL O.P., MARTY A., NEHER E., SAKMANN B., SIGWORTH F.J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *European Journal of Physiology* **391**: 85-100
- HERZBERG I.M., TRUDEAU M.C., ROBERTSON G.A. (1998). Transfer of rapid inactivation and sensitivity to the class III antiarrhythmic drug E-4031 from herg to M-eag channels. *Journal of Physiology* **511**: 3-14
- HILLE, BERTIL (1984). „Ionic Channels of Excitable Membranes“, Sinauer Associates Inc.
- HIRDES W., SCHWEIZER M., SCHURICHT K.S., GUDDAT S.S., WULFSEN I., BAUER C.K., SCHWARZ J.R. (2005). Fast erg K<sup>+</sup> currents in rat embryonic serotonergic neurones. *Journal of Physiology* **564.1**: 33-49
- JONES E.M.C., ROTI E.C., WANG J., DELFOSSE S.A., ROBERTSON G.A. (2004). Cardiac I<sub>Kr</sub> channels minimally comprise herg 1a and 1b subunits. *Journal Biol. Chem.* **279.43**: 44690- 44694

- KAPLAN W.D., TROUT W.E. (1968). The behaviour of four neurological mutants of drosophila. *Genetics* **61**: 399-409
- KIEHN J., THOMAS D., KARLE C.A., SCHOLS W., KUBLER W. (1999). Inhibitory effects of the class III antiarrhythmic drug amiodarone on cloned hERG potassium channels. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacology* **359**: 212-219
- KIRCHBERGER N.M., WULFSEN I., SCHWARZ J.R., BAUER C.K. (2006). Effects of TRH on heteromeric rat erg1a/1b K<sup>+</sup> channels are dominated by the rerg1b subunit. *Journal of Physiology* **571.1.**: 27-42
- KIRSCH G.E., TREPAKOVA E.S., RIMECOMBE J.C., SIDACH S.S., ERICKSON H.D., KOCHAN M.C., SHYJKA L.M., LACERDA A.E., BROWN A.M. (2004). Variability in the measurement of hERG potassium channel inhibition: effects of temperature and stimulus pattern. *Journal of Pharmacological and Toxicological methods* **50.2**: 93-101
- LEES-MILLER J.P., KONDO C., WANG L., DUFF H.J. (1997). Electrophysiological characterization of an alternatively processed erg K<sup>+</sup> channel in mouse and human hearts. *Circulation Research* **81**: 719-726
- LONDON B., TRUDEAU M.C., NEWTON K.P., BEYER A.K., COPELAND N.G., GILBERT D.J., JENKINS N.A., SATLER C.A., ROBERTSON G.A. (1997). Two isoforms of the mouse ether-a-go-go-related gene coassemble to form channels with properties similar to the rapidly activating component of the cardiac delayed rectifier K<sup>+</sup> current. *Circulation Research* **81**: 870-878
- LUDWIG J., TERLAU H., WUNDER F., BRUGGEMANN A., PARDO L.A., MARQUARDT A., STUHMER W., PONGS O. (1994). Functional expression of a rat homologue of the voltage-gated ether-à-go-go family of potassium channels and comparison of its distribution with that of eag1. *Molecular Cellular Neuroscience* **16**: 59-70
- MILNES J.T., CROCIANI O., AREANGELI A., HANCOX J.C., WITCHEL H.G. (2003). Blockade of hERG potassium currents by fluvoxamine: incomplete attenuation by S6 mutations at F656 or Y652. *British Journal of Pharmacology* **139**: 887-898
- NEHER E., SAKMANN B. (1976). Single channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* **260**: 799-802
- O'LEARY M.E. (2002). Inhibition of hERG potassium channels by cocaethylene: a metabolite of cocaine and ethanol. *Cardiovascular Research* **53**: 59-67
- OVERHOLT J.L., FICKER E., YANG T., SHAMS H., BRIGHT J.R., PRABHAKAR N.R. (2000). Chemosensing at the carotid body. Involvement of a hERG-like potassium current in glomus cells. *Advanced experimental medicine biology* **475**: 241-248

- PONGS O. (1999). Voltage-gated potassium channels: from hyperexcitability to excitement. *FEBS Letter* **452**: 31-35
- RODRIGUEZ B.M., SIGG D., BEZANILLA F. (1998). Voltage Gating of Shaker K<sup>+</sup> Channels. The effect of Temperature on Ionic and Gating Currents. *Journal of general Physiology* **112**: 223-242
- ROSATI B., ROCCHETTI M., ZAZA A., WANKE E., (1998). Sulfonylureas blockade of neural and cardiac hERG channels. *FEBS Letter* **440**:125-130
- SAGANICH M.J., MACHADO E., RUDY B. (2001). Differential expression of genes encoding subthreshold-operating voltage-gated K<sup>+</sup> channels in brain. *Journal of Neuroscience* **21**: 4609-4624
- SALE H., WANG J., O'HARA T.J., TESTER D.J., PHARTIYAL P., HE J.-Q., RUDY Y., ACKERMAN M.J., ROBERTSON G.A. (2008). Physiological Properties of hERG 1a/1b Heteromeric Currents and a hERG1b-Specific Mutation Associated With Long-QT Syndrome *Circulation Research* **103** (7): e81-95
- SANGUINETTI M.C., JIANG C., CURRANN M.E., KEATING M.T. (1995). A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: hERG encodes the I<sub>Kr</sub> potassium channel. *Cell* **81**: 299-307
- SCHIEBLER T.H. (2005). „Anatomie“, Springer Verlag
- SCHLEDERMANN W., WULFSEN I., SCHWARZ J.R., BAUER C.K. (2001). Modulation of rat erg1, erg2, erg3 and hERG K<sup>+</sup> currents by thyrotropin-releasing hormone in anterior pituitary cells via the native signal cascade. *Journal of Physiology* **532.1.**: 143-163
- SCHMIDT R.F., SCHAIBLE H.-G. (2005) „Neuro- und Sinnesphysiologie“; Springer Verlag
- SCHÖNHERR R., HEINEMANN S.H. (1996). Molecular determinants for activation and inactivation of hERG, a human inward rectifier potassium channel. *Journal of Physiology* **493**: 635-642
- SCHWARZ J.R. (1986). The effect of temperature on Na currents in rat myelinated nerve fibres. *European Journal of Physiology* **406.4**: 397-404
- SCHWARZ J.R., BAUER C.K. (2004). Functions of erg K<sup>+</sup> channels in excitable cells. *Journal of Cellular Molecular Medicine* **8**: 22-30
- SHI W., WANG H.S., PAN Z., WYMORE R., COHEN I.S., MCKINNON D., DIXON J.E. (1998). Cloning of a mammalian elk potassium channel gene and eag mRNA distribution in rat sympathetic ganglia. *Journal of Physiology* **511.3**: 675-682

- SHI W., WYMORE R.S., WANG H.-S., PAN Z., COHEN I.S., MCKINNON D., DIXON J.E. (1997). Identification of two nervous system-specific members of the erg potassium channel gene family. *Journal of Neuroscience* **17**: 9423-9432
- SHIBASAKI T. (1987). Conductance and kinetics of delayed rectifier potassium channels in nodal cells of the rabbit heart. *Journal of Physiology* **387**: 227-250
- SMITH P.L., BAUKROWITZ T., YELLEN G. (1996). The inward rectification mechanism of the hERG cardiac potassium channel. *Nature* **379**: 833-836
- SPECTOR P.S., CURRAN M.E., KEATING M.T., SANGUINETTI M.C. (1996) Class III antiarrhythmic drugs block hERG, a human cardiac delayed rectifier K<sup>+</sup> channel. Open-channel block by methanesulfonanilides. *Circulation Research* **78**: 499-503
- SUESSBRICH H., SCHÖNHERR R., HEINEMANN S.H., ATTALI B., LANG F., BUSCH A.E. (1997). The inhibitory effect of the antipsychotic drug haloperidol on hERG potassium channels expressed in *Xenopus* oocytes. *British Journal of Pharmacology* **120**: 968-974
- SUESSBRICH H., WALDEGGER S., LANG F., BUSCH A.E. (1996). Blockade of hERG channels expressed in *Xenopus* oocytes by the histamine receptor antagonists terfenadine and astemizole. *FEBS Letter* **385**: 77-80
- TASHJIAN A.H. Jr, YASUMURA Y., LEVINE L., SATO G.H., PARKER M.L. (1968). Establishment of clonal strains of rat pituitary tumor cells that secrete growth hormone. *Endocrinology* **82**: 342-352
- THOMAS D., GUT B., KARSAI S., WIMMER A.B., WU K., WENDT-NORDAHL G., ZHANG W., KATHOFER S., SCHOELS W., KATUS H.A., KIEHN J., KARLE C.A. (2003). Inhibition of cloned hERG potassium channels by the antiestrogen tamoxifen. *Naunyn Schmiedeberg's Arch of Pharmacology* **368**: 41-48
- THOMAS D., WU K., KATHOFER S., KATUS H.A., SCHOELS W., KIEHN J., KARLE C.A. (2003). The antipsychotic drug chlorpromazine inhibits hERG potassium channels. *British Journal of Pharmacology* **139**: 567-574
- TIE H., WALKER B.D., SINGLETON C.B., VALENZUELA S.M., BURSILL J.A., WYSE K.R., BREIT S.N., CAMPBELL T.J. (2000). Inhibition of hERG potassium channels by the antimalarial agent halofantrine. *British Journal of Pharmacology* **130**: 1967-1975
- TRUDEAU M.C., WARMKE J.W., GANETZKY B., ROBERTSON G.A. (1995). Herg, a human inward rectifier in the voltage-gated potassium channel family. *Science* **269**: 92-95
- VANDENBERG J.I., VARGHESE A., LU Y., BURSILL J.A., MAHAUT-SMITH M.P., HUANG C.L.-H. (2006). Temperature dependence of human ether-à-go-go-related gene K<sup>+</sup> currents. *American Journal of Physiology* **291**:165-175

- VOLBERG W.A., KOCI B.J., SU W., LIN J., ZHOU J. (2002). Blockade of human cardiac potassium channel human ether-à-go-go-related gene (herg) by macrolide antibiotics. *Journal of pharmacological experimental Theory* **302**: 320-327
- WADHWA S., WADHWA P., DINDA A.K., GUPTA N.P. (2008). Differential expression of potassium ion channels in human renal cell carcinoma. *International Urology and Nephrology Online-Veröffentlichung*
- WANG S., LIU S., MORALES M.J., STRAUSS H.C., RASMUSSEN R.L. (1997). A quantitative analysis of the activation and inactivation kinetics of herg expressed in *Xenopus* oocytes. *Journal of Physiology* **502**: 45-60
- WANG S., MORALES M.J., LIU S.G., STRAUSS H.C., RASMUSSEN R.L. (1996). Time, voltage and ionic concentration dependence of rectification of herg expressed in *Xenopus* oocytes. *FEBS Letter* **389**: 167-173
- WARMKE J.W., GANETZKY B. (1994). A family of potassium channel genes related to eag in *Drosophila* and mammals. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **91**: 3438-3442
- WARMKE L., DRYSDALE R., GANETZKY B. (1991). A distinct potassium channel polypeptide encoded by the *Drosophila* eag locus. *Science* **252**:1560-1562
- WEINSBERG F., BAUER C.K., SCHWARZ J.R. (1997). The class III antiarrhythmic agent E-4031 selectively blocks the inactivating inward-rectifying potassium current in rat anterior pituitary tumor cells (GH<sub>3</sub>/B<sub>6</sub> cells). *European Journal of Physiology* **434**:1-10
- WIMMERS S., BAUER C.K., SCHWARZ J.R. (2002). Biophysical properties of heteromultimeric erg K<sup>+</sup> channels. *European Journal of Physiology* **445**: 423-430
- WIMMERS S., WULFSEN I., BAUER C.K., SCHWARZ J.R. (2001). Erg1, erg2 and erg3 K<sup>+</sup> channel subunits are able to form heteromultimers. *European Journal of Physiology* **441**: 450-455
- WULFSEN I., HAUBER H.-P., SCHIEMANN D., BAUER C.K., SCHWARZ J.R. (2000). Expression of mRNA for voltage-dependent and inward-rectifying K<sup>+</sup> channels in GH<sub>3</sub>/B<sub>6</sub> cells and rat pituitary. *Journal of Neuroendocrinology* **12**: 263-272
- ZHOU Z., GONG Q., YE B., FAN Z., MAKIELSKI J.C., ROBERTSON G.A., JANUARY C.T. (1998). Properties of herg channels stably expressed in HEK 293 cells studied at physiological temperature. *Biophysical Journal* **74**: 230-241
- ZOU A., XU Q.P., SANGUINETTI M.C. (1998). A mutation in the pore region of herg K<sup>+</sup> channels expressed in *Xenopus* oocytes reduces rectification by shifting the voltage dependence of inactivation. *Journal of Physiology* **509**: 129-137

## 7. Danksagung

Ich bedanke mich bei allen, die mir bei der Erstellung dieser Doktorarbeit geholfen haben. Insbesondere danke ich:

- Herrn Prof. Dr. Jürgen R. Schwarz dafür, dass er mir das Thema für diese Doktorarbeit anvertraute, mich in seinem Institut als Doktorand aufnahm, mit mir die Durchführung der Arbeit plante und auch nach seinem Ausscheiden aus dem Institut beratend tätig war.
- Frau Prof. Dr. Christiane K. Bauer dafür, dass sie nach dem Ausscheiden von Herrn Schwarz die Betreuung übernahm und immer für Fragen, Hilfe und Korrekturen zur Verfügung stand, sowie für die Begutachtung der Doktorarbeit.
- PD Dr. Robert Bähring, Dr. Günter Glassmeier und vor allem Dr. Wiebke Hirdes für ihre Unterstützung in der täglichen Laborarbeit und die Einarbeitung in die Patch-Clamp-Technik und die Software zur Auswertung der Daten.
- Ingeborg Blank, Anett Hasse, Waltraud Krüger und Christiane Reißmann für die Betreuung der Zellkultur und die Unterstützung beim Erstellen von Lösungen u.ä.
- der Laborgemeinschaft für die angenehme und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre
- meinen Eltern Marion und Manfred für die finanzielle und emotionale Unterstützung während des Studiums und neben der Arbeit im Labor.

## 8. Lebenslauf

Name: Bastian Vonrath

Geburtsdatum: 20.11.1981

Geburtsort: Hamburg

Schullaufbahn: 1987-1992 Westerschule Finkenwerder

1992-2001 Gymnasium Finkenwerder mit Abschluss Abitur

Zivildienst: 2001-2002 Wilhelmsburger Krankenhaus Groß-Sand

Studium: 2002-2004 vorklinischer Abschnitt des Medizinstudiums am  
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf mit Abschluss Physikum

2004-2007 klinischer Abschnitt des Medizinstudiums am  
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

2005 Famulaturen in der Neurochirurgie im AK Altona und in der  
medizinischen Notaufnahme im Klinikum Nord Heidberg

2006 Famulaturen in der Dermatologie im AK St.Georg und in der Inneren  
Medizin im AK Eilbek

2007-2008 Praktisches Jahr in der Neurologie im Albertinen Krankenhaus, in  
der Inneren Medizin im AK Altona und in der Chirurgie im AK Barmbek

2006-2009 Doktorarbeit im Institut für Angewandte/Vegetative Physiologie  
zum Thema: „Temperaturabhängigkeit nativer erg-Kanäle“

12/ 2008: Ende des Studiums mit Abschluss Staatsexamen

Berufliche Laufbahn: seit 1/09 Assistenzarzt in der medizinischen Klinik im Krankenhaus  
Reinbek

Weiteres: 2003-2007 Nebentätigkeit als Krankenpflegehilfe im Wilhelmsburger  
Krankenhaus Groß-Sand

2007: Vortrag über die Ergebnisse der Doktorarbeit auf dem Kongress der  
Ostseephysiologen in Kiel

Sprachkenntnisse: englisch, französisch, spanisch

## **9. 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 an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: .....