

# UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde

Direktor: Prof. Dr. Gisbert Richard

## **Einbau und Funktion künstlicher Gramacidin-A-Hybrid-Kanäle in CHO-Zellen**

### **Dissertation**

Zur Erlangung eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Ryszard Leszek Wesolowski  
aus Wrocław

Hamburg 2012

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 13.03.2013

Veröffentlicht mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr. R. Bähring

Prüfungsausschuss, 2 Gutachter/in: Prof. Dr. O. Strauß

Prüfungsausschuss, 3 Gutachter/in: Prof. Dr. H. Ehmke

Inhaltsverzeichnis

|       |  |    |
|-------|--|----|
|       | Arbeitshypothese und Fragestellung                       | 1  |
| 1     | Einleitung   | 2  |
| 1.1   | Transmembranäre Transportproteine                        | 2  |
| 1.2   | Exogene und künstliche transmembranäre Transportproteine | 7  |
| 1.2.1 | Exogene natürliche transmembranäre Transportproteine     | 7  |
| 1.2.2 | Künstliche transmembranäre Transportproteine             | 9  |
| 1.3   | Verwendete Substanzen                                    | 11 |
| 1.3.1 | Gramicidin A   | 11 |
| 1.3.2 | Valinomycin  | 14 |
| 1.3.3 | Substanz 1   | 15 |
| 1.3.4 | Substanz 2   | 18 |
| 1.3.5 | Substanz 3   | 19 |
| 2     | Material   | 22 |
| 2.1   | Chemikalien  | 22 |
| 2.2   | Verbrauchsmaterialien                                    | 22 |
| 2.3   | Geräte   | 23 |
| 2.4   | Zellen   | 24 |
| 2.5   | Lösungen   | 24 |
| 2.5.1 | Lösungen für Patch-Clamp-Experimente                     | 24 |
| 2.5.2 | Zellkulturmedium   | 26 |
| 2.5.3 | Lösungen für die Agarbrücke                              | 27 |
| 2.6   | Substanzen   | 27 |
| 3     | Methoden   | 28 |
| 3.1   | Zellkultur   | 28 |
| 3.2   | Die Patch-Clamp-Methode                                  | 28 |
| 3.2.1 | Der Verstärker   | 29 |
| 3.2.2 | Der Giga-Seal  | 30 |
| 3.2.3 | Die Patch-Clamp-Konfigurationen                          | 31 |

## Inhaltsverzeichnis

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 3.2.4 | Versuchsaufbau Whole-Cell-Messungen  | 33 |
| 3.2.5 | Versuchsaufbau Einzelkanalmessungen  | 38 |
| 3.2.6 | Auswertung und Analyse   | 39 |
| 3.3   | Volumenregulationsexperimente  | 40 |
| 3.3.1 | Versuchsaufbau   | 40 |
| 3.3.2 | Auswertung und Analyse   | 41 |
| 3.4   | Fluoreszenzmessungen   | 42 |
| 3.4.1 | Fluoreszenzmikroskopie   | 42 |
| 3.4.2 | Versuchsaufbau der Fluoreszenzmessungen  | 43 |
| 3.4.3 | Auswertung und Analyse   | 44 |
| 4     | Ergebnisse   | 45 |
| 4.1   | Kontrollmessungen mit DMSO   | 45 |
| 4.1.1 | Kontrollmessungen in Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -Bad- und mit K <sup>+</sup> -Pipettenlösung  | 46 |
| 4.1.2 | Kontrollmessungen in Cs <sup>+</sup> -Bad- und mit Cs <sup>+</sup> -Pipettenlösung   | 48 |
| 4.1.3 | Kontrollmessungen in Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -Bad- und mit K <sup>+</sup> -Pipettenlösung und anschließendem Wechsel zur K <sup>+</sup> -Badlösung | 51 |
| 4.1.4 | Kontrollmessungen in der Inside-Out-Patch-Konfiguration  | 54 |
| 4.1.5 | Kontrollmessungen in Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -Badlösung mit Badwechsel zu hypoosmotischer Lösung   | 55 |
| 4.2   | Wirkung von Gramicidin A   | 57 |
| 4.3   | Wirkung von Valinomycin  | 59 |
| 4.4   | Wirkung der Substanz <b>1</b>  | 61 |
| 4.4.1 | Wirkung von <b>1</b> unter physiologischen Bedingungen   | 61 |
| 4.4.2 | Wirkung von <b>1</b> in Cs <sup>+</sup> -Lösung intra- und extrazellulär   | 65 |
| 4.4.3 | Vergleich der einzelnen Messreihen   | 68 |
| 4.4.4 | Einzelkanalaufnahmen von <b>1</b> in der Inside-Out-Patch-Konfiguration  | 70 |
| 4.4.5 | Wirkung von <b>1</b> auf die Volumenregulation   | 71 |
| 4.5   | Untersuchungen des Einbaus der Substanz <b>2</b>   | 73 |
| 4.6   | Wirkung der Substanz <b>3</b>  | 75 |

## Inhaltsverzeichnis

|         |                                  |    |
|---------|----------------------------------|----|
| 5       | Diskussion                       | 79 |
| 5.1     | Kontrollmessungen                | 79 |
| 5.2     | Verwendete Substanzen            | 81 |
| 5.2.1   | Gramicidin A und Valinomycin     | 81 |
| 5.2.2   | Substanz <b>1</b>                | 82 |
| 5.2.2.1 | Whole-Cell-Patch-Clamp-Messungen | 82 |
| 5.2.2.2 | Inside-Out-Patch-Clamp-Messungen | 86 |
| 5.2.2.3 | Volumenregulationsversuche       | 86 |
| 5.2.3   | Substanz <b>2</b>                | 88 |
| 5.2.4   | Substanz <b>3</b>                | 88 |
| 5.3     | Zusammenfassung                  | 89 |
| 6       | Literaturverzeichnis             | 92 |
| 7       | Abkürzungsverzeichnis            | 95 |
| 8       | Danksagung                       | 96 |
| 9       | Lebenslauf                       | 97 |
| 10      | Eidesstattliche Versicherung     | 98 |

## Arbeitshypothese und Fragestellung

Ionenkanäle und Aquaporine gehören zu den wichtigsten Systemen des zellulären transmembranären Transportes. Sie sind an nahezu jeder Zellfunktion, wie Proliferation, Kontraktion, Nervensignalfortleitung, Sekretion, Transport und Migration beteiligt und sind damit unabdingbar für einen lebenden Organismus. In Form von Ionenkanalerkrankungen sowie der medikamentösen Beeinflussung der Aktivität von Ionenkanälen zur Therapie von Krankheiten, erlangen die Ionenkanäle eine wichtige Bedeutung für die heutige Medizin.

Substanzen, die die Funktion von natürlichen Ionenkanälen und Aquaporinen nachahmen, könnten defekte natürliche Ionenkanäle ersetzen oder über die Manipulation des elektrophysiologischen Verhaltens der Zellen als Medikamente eingesetzt werden.

Ausgehend von der Struktur des Ionophores Gramicidin A wurden in der Forschungsgruppe von Professor Ulrich Koert an dem Institut für Chemie der Philipps-Universität Marburg verschiedene Substanzen mit neuen Eigenschaften des Ionentransportes synthetisiert.

In elektrophysiologischen Untersuchungen unter nicht physiologischen Bedingungen konnte für einige der neuen Substanzen der Einbau sowie eine elektrophysiologische Aktivität in planaren Sojabohnenlecithin-Lipidmembranen (Black-Lipid-Bilayer) nachgewiesen werden.

In der folgenden Arbeit wurde die Wirkung von 3 der neuen Substanzen auf lebende CHO-Zellen untersucht, mit der Frage nach dem Einbau in Zellmembranen, der elektrophysiologischen Aktivität und der daraus resultierenden Konsequenzen für die betroffenen Zellen.

## 1 Einleitung

### 1.1 Transmembranäre Transportproteine

Die Lipiddoppelschicht einer Zellmembran bildet eine effiziente Diffusionsbarriere für Ionen sowie Wassermoleküle, was die Aufrechterhaltung von Ionengradienten zwischen Zytosol und Extrazellulärraum erlaubt. Um einen Stofftransport von Ionen und Wasser zwischen den beiden Kompartimenten zu ermöglichen, wird die Lipiddoppelschicht von integralen transmembranären Proteinen – wie Carrier, Pumpen, Ionenkanäle und Aquaporine – durchspannt.

Bei dem Transport über Pumpen und Carrier kommt es durch Bindung mit dem zu transportierenden Molekül zu einer Konformationsänderung des Carrier-Proteins. Dabei wird die zu transportierende Substanz durch die Zellmembran geschleust. Bei den Carriern wird von erleichterter Diffusion gesprochen, bei den Pumpen von aktivem Transport, bei dem Stoffe entgegen Konzentrationsgradienten oder Potentialgradienten transportiert werden. Die für den aktiven Transport benötigte Energie wird entweder aus ATP oder der durch parallelen Transport entlang eines Gradienten (Symport oder Antiport) frei werdenden Energie gewonnen. Der Vorgang erlaubt die Verschiebung von maximal einigen Tausend Molekülen pro Sekunde.

Der Transport durch Ionenkanäle und Aquaporine findet ausschließlich passiv statt (freie Diffusion). Als Triebkraft für den Durchtritt der Stoffe dient zum einen der Konzentrationsgradient als chemische Kraft, zum anderen der Ladungsgradient als elektrische Kraft geladener Teilchen.

Unter physiologischen Bedingungen besteht das Transportmaterial der Ionenkanäle aus anorganischen Ionen wie  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  sowie  $\text{Ca}^{2+}$ .

Über die Aquaporine werden Wassermoleküle,  $\text{CO}_2$  sowie kleine nicht geladene Teilchen wie zum Beispiel Glycerol transportiert.

Der passive Transport erlaubt in lebenden Zellen eine Verschiebung von bis zu  $10^8$  Molekülen pro Sekunde, was bei einer Ionenverschiebung einen Strom von wenigen pA erzeugen kann. Gegenüber dem aktiven Transport ergibt sich damit eine 1000fach höhere Effizienz.

Die natürlichen in Zellen vorkommenden Ionenkanäle und Aquaporine sind Makroproteine mit über 1000 Aminosäuren, die sich aus mehreren Untereinheiten zusammensetzen. Diese Untereinheiten bilden die Pore für die zu leitenden Ionen bzw. Wassermoleküle, die die Lipiddoppelschicht durchspannt. Die Untereinheiten lagern sich mit ihren hydrophoben Domänen nach außen gerichtet innerhalb der Lipiddoppelschicht längs aneinander, so dass eine zirkuläre Anordnung entsteht, die eine Pore bildet (Abb. 1.1 und 1.2).

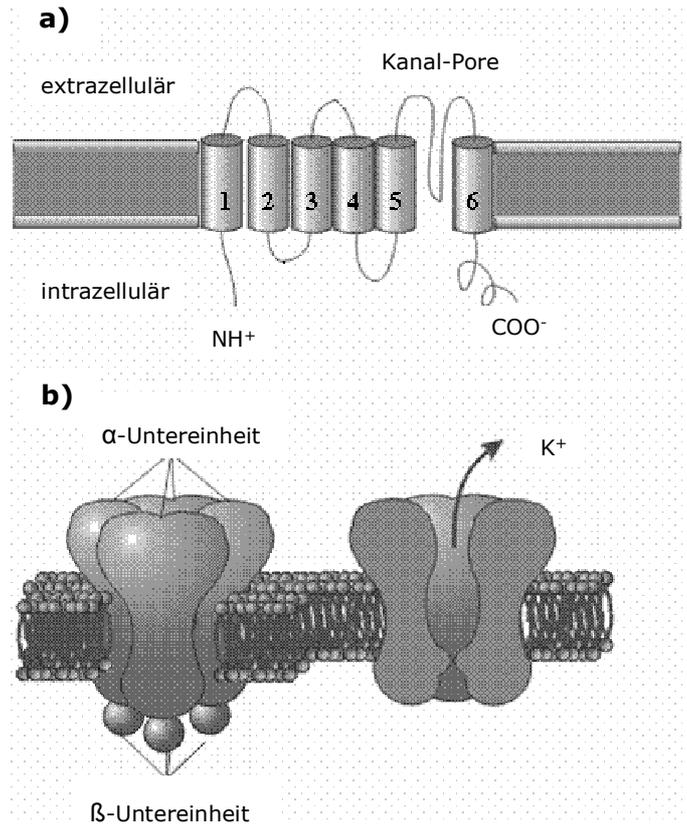
Die Struktur der Pore sowie die extramembranär gelegenen Bestandteile des Kanalproteins führen zu spezifischen Eigenschaften wie Ionenselektivität oder Potentialabhängigkeit.

Die charakteristischen Schlüsseleigenschaften eines Ionenkanals bzw. Aquaporins sind die Selektivität und das Gating.

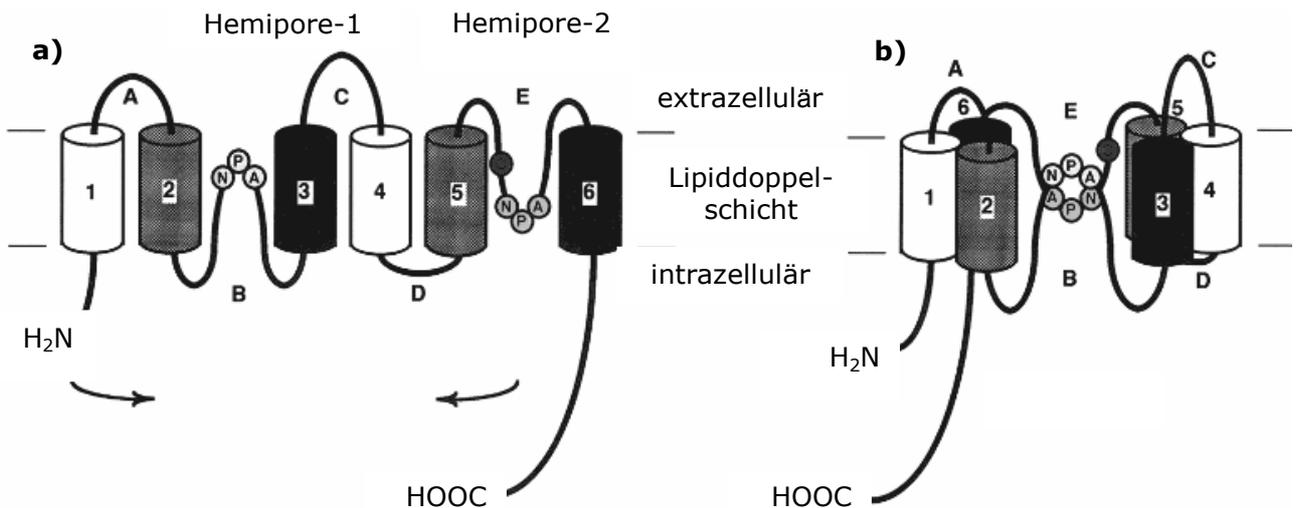
Die Selektivität resultiert aus den strukturellen Voraussetzungen der Pore, die den Durchtritt von bestimmten Ionen bzw. Wassermolekülen begünstigen oder verhindern. Ausschlaggebend ist dabei einerseits der Durchmesser der Pore, wodurch eine mechanische Selektion erfolgt, andererseits die in die Pore hineinragenden geladenen Aminosäurereste und deren Ausrichtung zueinander. Beim Ionentransport interagieren die geladenen Aminosäurereste mit dem Ion und können durch ihre Anordnung und Ausrichtung je nach Art die optimale Dehydratation des Teilchens katalysieren. Dabei werden die Wassermoleküle durch die Bindungsenergie der geladenen Aminosäurereste verdrängt. Durch das Weiterreichen des Ions von einem Aminosäurerest zum nächsten wird die Hydrathülle abgestreift und so der Durchtritt durch die Pore ermöglicht. Die Selektivität kann von wenig- bis hochselektiv reichen; sie bildet eines der Hauptmerkmale eines Ionenkanals.

Bei den Aquaporinen unterscheidet man zwischen jenen, die für Wassermoleküle und  $\text{CO}_2$  durchgängig sind und solchen, die auch kleine nichtgeladene Moleküle wie zum Beispiel Glycerol transportieren.

Die Aktivität eines Kanals (das Gating) wird gesteuert durch spezielle Untereinheiten oder die extramembranär gelegenen Anteile des Proteins (P-Loops, N- und C-Termini). Dabei führt eine Änderung der Konformation des Proteins zur Öffnung bzw. Verschluss der Pore. Eine quantitative Steuerung des einzelnen Kanals ist über das Protein nicht möglich. Die Stromstärke resultiert aus der Modulation der Offen-Wahrscheinlichkeit des Kanals. Je nach Kanal gibt es unterschiedliche Triggermechanismen, um den On-Off-Zustand zu beeinflussen. Dazu gehören Bindung von Liganden, Änderung der Spannung, Änderung der Konzentration von intrazellulären Messengern, pH-Änderungen oder Änderungen physikalischer Kräfte wie Temperatur, mechanische Einwirkung und Osmolarität. Eine Sonderform stellt die Blockade über niedermolekulare Blocker dar; diese führen zu einem mechanischen Verschluss der Pore, lassen die Konformation des Kanalproteins jedoch unverändert. (Schmidt et al., 2005; Klinker et al., 2005; Ackermann et al., 1997, Berg et al., 2003; Verkman et al., 2005)



**Abb. 1.1** Schematische Darstellung eines spannungsabhängigen Kaliumkanals als Beispiel für den Aufbau eines natürlichen Ionenkanals; a) gibt die Anordnung der  $\alpha$ -Untereinheit mit 6 transmembranären Domänen in der Zellmembran wieder, in b) richten sich vier  $\alpha$ -Untereinheiten zu einer Pore aus (angepasst aus Schmidt, 1998)



**Abb. 1.2** Schematische Darstellung des Aquaporins 1 (AQP1) als Beispiel für den Aufbau einer Wasserpore; a) gibt die Anordnung der Untereinheit mit 6 transmembranären Domänen in der Zellmembran wieder, b) zeigt die Zusammenführung der Untereinheiten zu einer Pore (angepasst aus Agre, 2002<sup>1</sup>)

## 2. Material

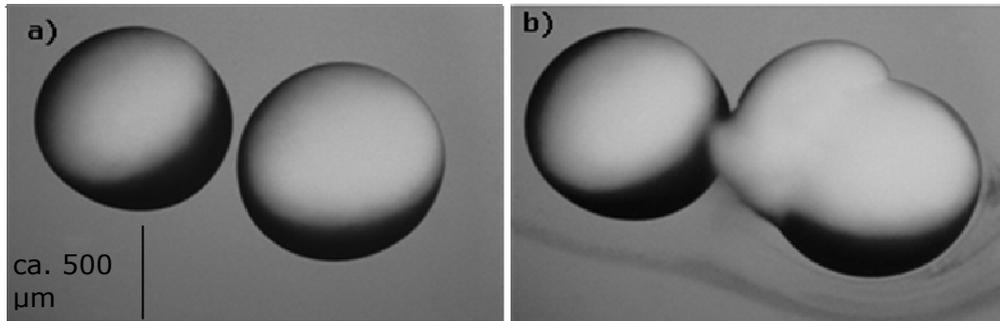
Ionenkanäle sind an nahezu jeder Zellfunktion, wie Proliferation, Kontraktion, Nervensignalfortleitung, Sekretion, Transport und Migration beteiligt und sind damit unabdingbar für einen lebenden Organismus. (Schmidt et al., 2005; Klinke et al., 2005; Ackerman et al., 1997). Anhand der angeborenen Ionenkanalerkrankungen (den sog. Channelopathies) lässt sich die Bedeutung der Ionenkanäle in der Medizin veranschaulichen. Dabei handelt es sich um Ionenkanaldysfunktionen, die auf Mutationen von Ionenkanalgenen basieren und zu Änderungen der Expression oder des Schaltverhaltens der Kanalproteine führen können. Dies kann eine Fehlfunktion am betroffenen Organ verursachen. Die bedeutendsten Manifestationen findet man am Auge als die angeborene unveränderliche Nachtblindheit, an der Skelettmuskulatur (z.B. als Myotonien, maligne Hyperthermie, hyperkaliämische periodische Paralyse), im zentralen Nervensystem (z.B. Ataxien, Migräne oder Epilepsien), am Herzen (Long-QT- oder Brugada-Syndrom), am Innenohr als angeborene Taubheit durch  $K^+$ -Kanaldysfunktion sowie an der Niere als Bartter-Syndrom und Dent-Krankheit (X-linked recessive nephrolithiasis) (Lerche et al., 2000; Ackermann et al., 1997; Lehmann-Horn et al., 1999).

Die klinische Relevanz wird noch deutlicher im Hinblick auf die Möglichkeit, biologische Prozesse durch externe Beeinflussung der Ionenkanalaktivität zu steuern. Auf diesem Prinzip basiert eine große Anzahl medikamentöser Therapien wie Antiarrhythmika (z.B. Antiarrhythmika der Klasse I, III, IV), Diuretika (z.B. Triamteren), Antihypertonika (wie Nifedipin) sowie die Therapie des Diabetes mellitus Typ II mit Sulfonylharnstoffen (Romero et al., 2003; Karow, 2005).

Die Aquaporine sind für einen Flüssigkeitstransport durch die Zellmembran unabdingbar (Abb. 1.3). Ihre Verteilung sowie Dichte in der Zellmembran sind je nach Organ und Zellart variabel. Es gibt Zellen, die kaum Wasserporen besitzen. Die Tubulusepithelzellen der Niere am dicken Teil der Henleschleife z.B. besitzen an der apikalen Membran kaum Aquaporine und sind damit fast wasserundurchlässig. Bei den Erythrozyten findet man wiederum eine hohe Dichte von Aquaporinen, die insbesondere dem  $CO_2$ -Austausch über die Membran dienen. Die physiologische und pathophysiologische Bedeutung lässt sich an den Hauptzellen des Sammelrohrs des Tubulussystems der Niere veranschaulichen. Dort wird die Konzentration des Harns über den Einbau von Aquaporinen in die luminale Seite der Zellmembran reguliert. Der Einbau wird über das Hypophysenhormon ADH (antidiuretisches Hormon) gesteuert. Bei Dysfunktionen des Aquaporin-2, z.B. durch Mutationen im Aquaporin-2-Gen, kann es durch fehlende Kontrolle der Wasserausscheidung zu der renalen Form des Diabetes insipidus kommen. Der Mangel an Aquaporinen in Linsenepithelzellen, die generell eine hohe Wasserpermeabilität aufweisen, scheint eine pathophysiologische Bedeutung in der Entstehung des Katarakts zu haben.

Anwendungen, die die Aktivität oder Expression von Aquaporinen beeinflussen, werden als mögliche Therapieoptionen bei Glaucom, Epilepsie, Hirnödemen, Adipositas, Tumorerkrankungen

oder als Diuretika diskutiert (Verkmann, 2005; L de Groot et al., 2005; Klinke et al., 2005; Ruiz-Ederra et al., 2006).



**Abb. 1.3** Darstellung der Funktion des Aquaporins 1 (AQP1) in Frosch-Oozyten; linke Zelle als Kontrolle mit gehemmter Expression des AQP1; a) in isotonischer Badlösung, b) 15 sec nach dem Wechsel der Badlösung zur hypoosmolarer Lösung (angepasst aus Agre, 1992)

1.2 Exogene und künstliche transmembranäre Transportproteine

1.2.1 Exogene natürliche transmembranäre Transportproteine

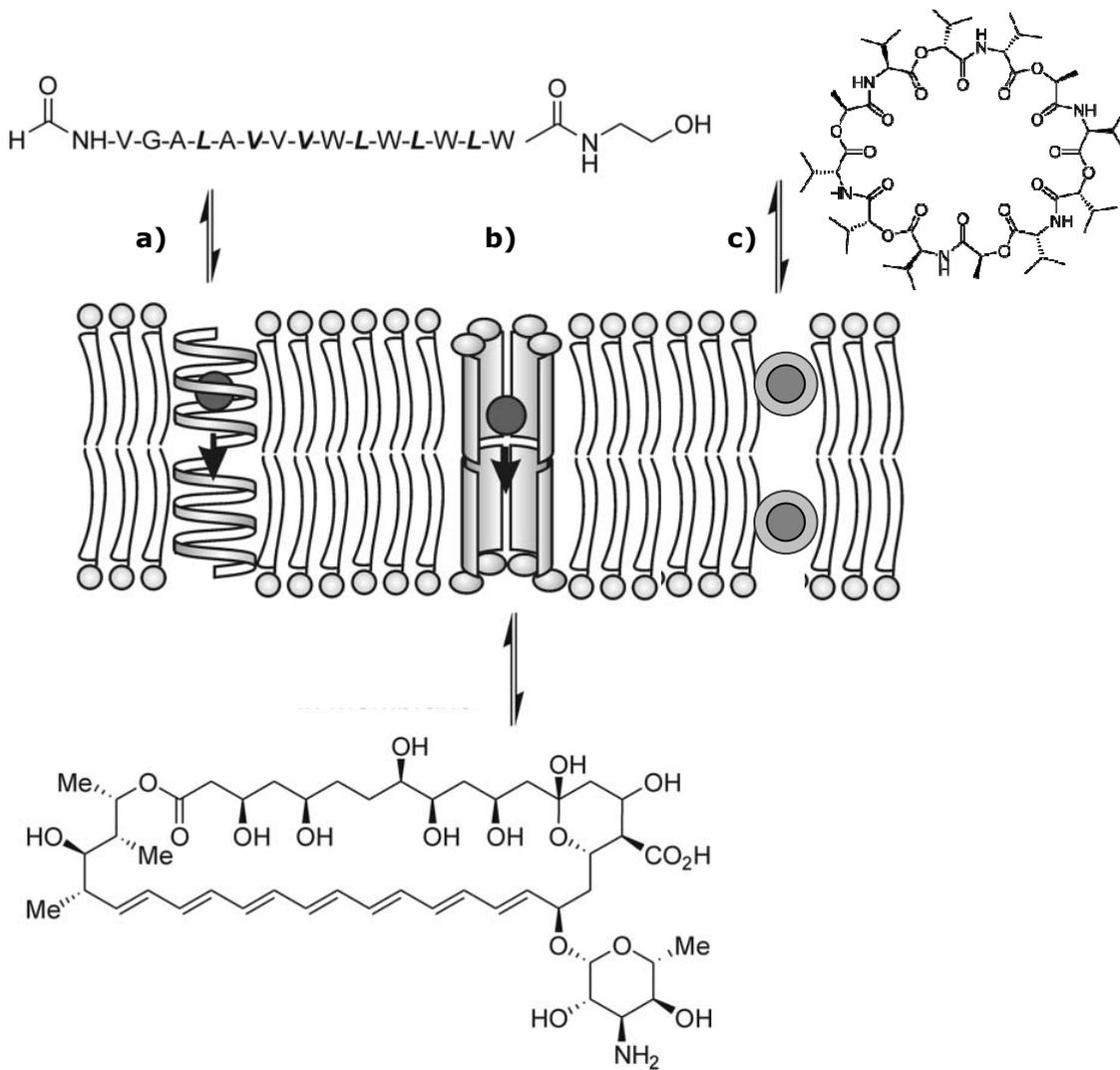
Neben den endogenen Transportproteinen kommen in der Natur noch weitere Eiweiße vor, die den Transport von Ionen über die Zellmembran möglich machen. So bildet das Komplementsystem des Immunsystems durch Anlagerung der Komplementfaktoren in der Membran von Fremdorganismen eine Pore. Die so entstehende Permeabilität für Ionen und Wasser führt bei den betroffenen Zellen zum Tod. Eine ähnliche Aufgabe haben die so genannten Ionophore. Das sind in der Regel kleine Proteine und Peptide, die von Bakterien und Pilzen synthetisiert und sezerniert werden. Durch den Einbau in die Zellmembran anderer Organismen und die Induktion einer hohen unkontrollierten Ionenleitfähigkeit, kommt es bei den betroffenen Zellen zur Störung des Elektrolythaushalts und als Folge zum Zelltod. Diese Stoffe wurden, noch bevor ihre elektrophysiologischen Eigenschaften bekannt waren, in erster Linie als Antibiotika und Antimykotika eingesetzt.

Bei den Ionophoren handelt es sich um eine heterogene Gruppe von Stoffen mit stark abweichenden Strukturen und Eigenschaften. Als Beispiel sei Valinomycin (*Streptomyces fulvissimus*), Amphotericin (*Streptomyces nodosum*) und das Gramicidin A (*Bacillus brevis*) erwähnt.

Valinomycin ist ein aus 12 Aminosäuren bestehendes zyklisches Peptid, welches  $K^+$ -Ionen hydrophob abschirmt, so dass diese die Membran passieren können (Abb.1.4).

Amphotericin ist ein Makrolakton, dessen molare Masse halb so groß ist wie beim Gramicidin. Durch Anlagerung von mehreren Molekülen aneinander (Abb. 1.4), ähnlich den Faktoren des Komplementsystems, wird eine transmembranäre wassergefüllte Pore gebildet, die den unselektiven Transport von hydroxylierten Ionen erlaubt.

Gramicidin A ist ein aus 15 Aminosäuren bestehendes Polypeptid, welches in einer Helixdimerform vorkommt, bei der sich in der Mitte des Peptides eine Pore bildet (Abb. 1.4). Durch hydrophile Aminosäurereste, die in die Pore hineinragen, kommt es zu einer Selektivität für Kationen (Fyles, 2006; Leevy et al., 2005; Gokel et al., 2001; Kidney International, 2004).



**Abb. 1.4** Schematische Darstellung des Transportmechanismus von Ionen durch die Lipiddoppelschichtmembran; a) gA, b) Amphotericin, c) Valinomycin, dazu die Strukturformel der jeweiligen Substanz. (angepasst aus Fyles, 2006)

### 1.2.2 Künstliche transmembranäre Transportproteine

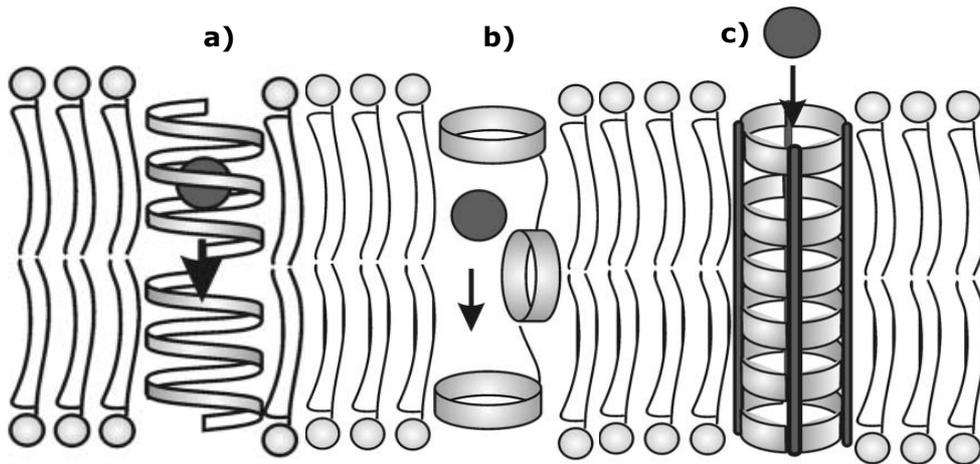
Anhand der Erfahrungen und Erkenntnisse mit natürlich vorkommenden Ionophoren lassen sich neue, modifizierte Substanzen künstlich herstellen, die neue Eigenschaften entwickeln und in der Lage sind, in ihrer Funktion die endogenen Ionenkanäle zu imitieren.

Die Motivation, immer neue ionotrope Substanzen mit neuen Eigenschaften herzustellen, basiert einerseits auf dem Wunsch, über das Modell der einfachen Peptide die Funktion der komplexen endogenen Ionenkanäle besser zu verstehen. Andererseits besteht die Hoffnung, langfristig neue Stoffgruppen mit neuem Wirkungsansatz für die medikamentöse Therapie von Krankheiten herzustellen. Dabei könnten solche Stoffe das elektrophysiologische Verhalten der Zellen manipulieren und damit ähnlich eingesetzt werden wie Medikamente, die die Funktion der endogenen Kanäle beeinflussen. Bei den Channelopathien könnte der Ersatz des defekten Ionenkanals im betroffenen Gewebe durch einen in der Funktion gleichen künstlichen Ionenkanal neue Therapieoptionen bieten.

Aktuell gibt es drei führende Modelle, auf deren Basis künstliche Ionenkanäle entwickelt werden (Abb. 1.5). Das am besten erforschte Modell im Bereich der Ionophore ist das Gramacidin A, welches als Leitstruktur für viele künstliche Ionenkanäle dient. Es wird im folgenden Kapitel näher vorgestellt.

Ein weiteres vielversprechendes Modell ist die Verbindung von drei zyklischen Kronenethern, die durch Hydrocarbonketten verknüpft sind (Abb. 1.5). Kronenether sind in der Lage, Kationen in Abhängigkeit von ihrem Durchmesser selektiv zu komplexieren. Sie weisen eine Komplexierungs- und Dekomplexierungsgeschwindigkeit von  $10^7$  Ionen pro Sekunde auf, die dem Ionenfluss durch einen Ionenkanal entspricht. In diesem Modell bilden die beiden äußeren Kronenether bei Integration in die Membran den Ein- bzw. Ausgang der Pore, während der mittlere Kronenether sich längst zur Pore stellt (Abb. 1.5) und so eine wichtige Funktion für das Durchschleusen der Ionen und die Selektivität einnimmt.

Die sog. Nanotubes sind Ionophore, die aus mehreren zyklischen Peptiden aus 8 oder 10 Aminosäuren in einer „head to head“-Anordnung bestehen. Diese Anordnung wird über ein Stützgerüst fixiert und bildet eine hydrophobe Pore (Abb. 1.5). Je nach Struktur der verwendeten Nanotubes können durch den Kanal Ionen und kleine Kohlenhydrate transportiert werden (Fyles, 2006; Leevy et al., 2004, Leevy et al., 2005; Sakai et al., 2003).



**Abb. 1.5** Schematische Darstellung des Funktionsprinzips von künstlichen Ionenkanälen; a) gA, b) Kronenetherkanal, c) Nanotube-Kanal (angepasst aus Fyles, 2006)

Es gibt aktuell nur wenige Veröffentlichungen, in denen die elektrophysiologischen Eigenschaften von künstlichen Ionenkanälen in lebenden Zellen beschrieben werden. In erster Linie ist hier die Beschreibung der Aktivität von  $\text{Cl}^-$ -selektiven Kanälen basierend auf Kronenethern in lebenden Zellen zu nennen sowie (von der gleichen Arbeitsgruppe veröffentlicht) die Beschreibung der Funktion eines ebenfalls auf Kronenether basierenden Kanals mit einer Selektivität für  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ - und  $\text{Cl}^-$  abhängig von den führenden chemoelektrischen Kräften (Schlesinger et al., 2002; Leevy et al., 2004; Leevy et al., 2005).

Ein Ansatz zur Verwendung von künstlichen Ionenkanälen in der medikamentösen Therapie wurde von Pawel Fidzinski an der Charité Berlin verfolgt. Mittels eines modifizierten Gramicidin-A-Moleküls (synthetisiert von der Forschungsgruppe von Professor Koert an der Philipps-Universität Marburg), bei dem die Aminosäuren mit Carbonylgruppen durch Tetrahydrofurane (also Ringmoleküle, die mit Kationen Komplexe eingehen) ersetzt wurden, wurde bei bovinen Trabekelwerkszellen des Auges eine Änderung der Membranleitfähigkeit hervorgerufen, ohne die Zellen zu töten. Mittels weiterer Modifikationen sollte im zweiten Schritt eine höhere Kaliumselektivität erreicht werden, so dass es durch eine höhere schließlich zu einer Hyperpolarisation kommen würde, was eine Relaxation der kontraktionsfähigen Zellen zur Folge hätte. Dadurch wäre ein besserer Abfluss des Kammerwassers in den Schlemmschenkanal gewährleistet und so eine Therapie des Glaukoms möglich (Fidzinski, 2006).

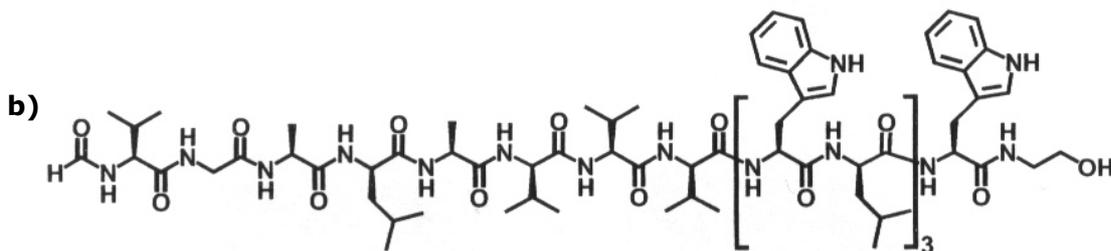
Um effektiv Ionophore zur Steuerung von biologischen Prozessen einsetzen zu können, müssen jedoch Eigenschaften wie Selektivität und „Gating“ in neuen Substanzen noch weitaus besser beherrscht werden.

### 1.3 Verwendete Substanzen

#### 1.3.1 Gramicidin A

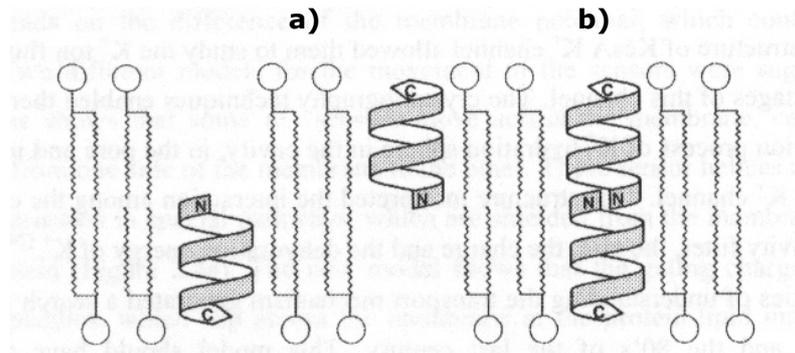
Wie im vorhergehenden Kapitel bereits erwähnt, ist Gramicidin A (gA) ein natürlich vorkommendes Ionophor, das von dem Bakterium *Bacillus brevis* gebildet wird. Es ist ein aus 15 Aminosäuren bestehendes Polypeptid (Abb. 1.6).

a) L-Val-Gly-L-Ala-D-Leu-L-Ala-D-Val-L-Val-D-Val-L-Trp-D-Leu-L-Trp-D-Leu-L-Trp-D-Leu-L-Trp-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH



**Abb. 1.6** Struktur des Gramicidin A Peptides; a) Aminosäuresequenz, b) Strukturformel

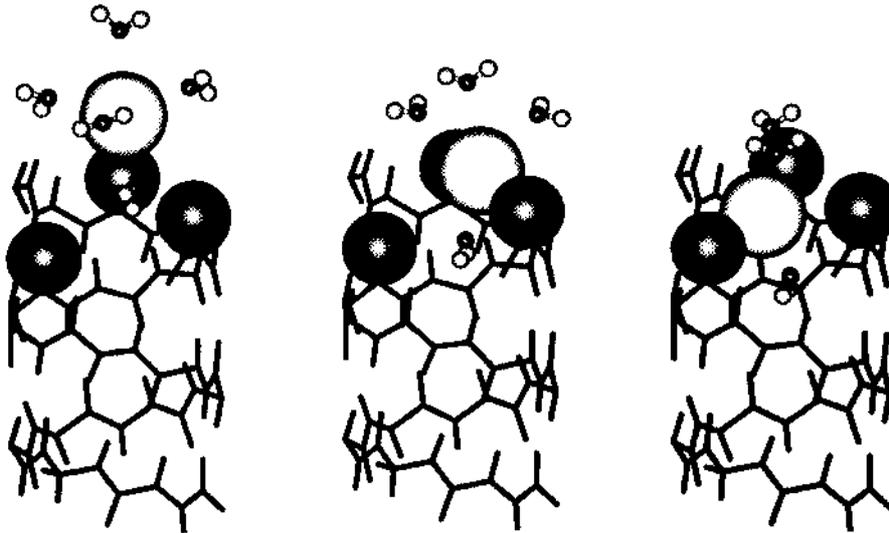
Die Sequenz von wechselnden linksdrehenden (L-) und rechtsdrehenden (D-)Aminosäuren (Abb. 1.6 a) führt zur Ausbildung einer  $\beta$ -helicalen Sekundärstruktur. In der Tertiärstruktur kommt gA in zwei Dimerformen vor, der Doppelhelix- (DH) und der Helixdimerform (HD). Die DH-Dimerform hat Ähnlichkeiten mit der DNA- $\alpha$ -Helix. Durch Anlagerung des Gramicidin A an Transkriptionsfaktoren wird die Proteinbiosynthese gehemmt, wodurch eine zusätzliche zytotoxische Wirkung entsteht. Die HD-Dimerform ist die für den Ionentransport aktive Form. Dabei stehen sich zwei  $\beta$ -Helices mit den N-Termini gegenüber und bilden die sog. „head to head“-Anordnung (Abb. 1.7), bei der sich in der Mitte des Peptides eine Pore bildet, deren Längsdurchmesser ausreicht, um die Lipiddoppelschicht zu durchspannen. Die Bindung zwischen den beiden Helices basiert auf Wasserstoffbrücken, die eine Dissoziation und erneute Assoziation der Monomere erlaubt, was der Pore einen Wechsel zwischen offenem und geschlossenem Zustand erlaubt (Abb. 1.7).



**Abb. 1.7** Anordnung zweier gA-Monomere in der HD-Dimerform in einer Lipiddoppelschichtmembran; a) dissoziiert mit geschlossener Pore; b) assoziiert mit offener Pore (angepasst aus Al-Momani 2004)

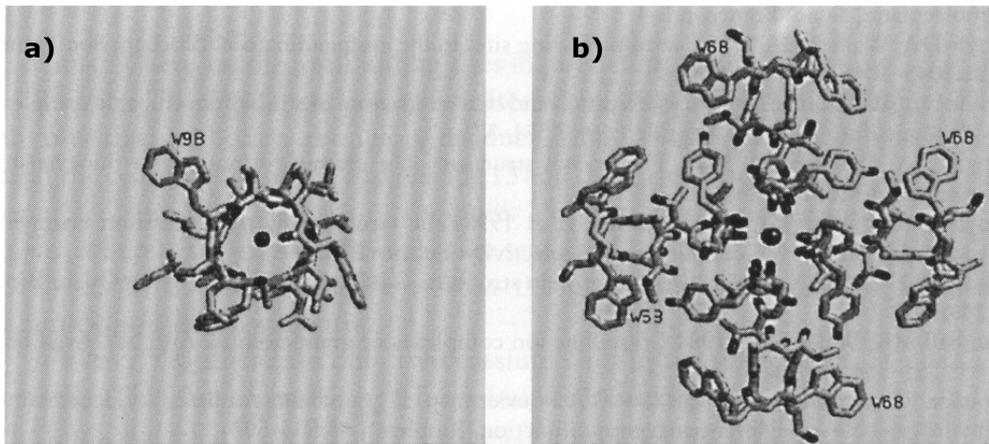
An dem Eingang der Pore befinden sich die Carbonylgruppen des Rückgrats der Aminosäure Leucin (Leu10, Leu12 und Leu14), wodurch eine Selektivität für Kationen entsteht.

Das Kation wird von den negativ geladenen Resten angezogen. Durch Weiterreichen von einer Carbonylgruppe zur nächsten wird das Kation in das Lumen gezogen (Abb. 1.8). Dabei wird die Hydrathülle des Ions abgestreift. Entscheidend für den Selektivitätsfilter der Pore ist die benötigte Dehydratationsenergie (und nicht der Durchmesser des Ions). Die aufgewendete Dehydratationsenergie am Kanaleingang wird zum Teil durch die infolge von Wechselwirkungen des Kations mit den Carbonylsauerstoffatomen freiwerdende Bindungsenergie ausgeglichen. Mit steigendem Energiebedarf sinkt die Permeabilität des Kanals für die Ionen, wodurch sich eine Eisenman-I-Selektivität (Selektivitätsreihenfolge:  $\text{NH}_4^+ = \text{Cs}^+ > \text{Rb}^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+$ ) ergibt. Die benötigte Energie für die Dehydratation zweifach geladener Kationen kann von dem gA-Kanal nicht katalysiert werden, so dass diese sich vor die Pore legen, jedoch nicht passieren können.



**Abb. 1.8** Schematische Darstellung der Dehydratation eines Kations beim Durchtritt durch die von gA gebildete Pore. Das Kation wird durch die Carbonylgruppe des Leucin an 14 Position angezogen und dann an das Leu 12 und Leu 10 weitergereicht. Der Austritt aus der Pore findet in umgekehrter Reihenfolge statt. (aus Novartis Foundation Symposium 1999)

Vergleicht man die Pore eines gA-Kanals mit der eines endogenen  $K^+$ -Kanals (Abb. 1.9), zeigt sich, dass beide Kanäle nach einem vergleichbaren Prinzip funktionieren. Die Anziehung, Dehydratation und Durchschleusung der Ionen wird von in die Pore hineinreichenden Carbonylresten der Aminosäure Glycin beim  $K^+$ -Kanal bzw. Leucin bei dem gA-Kanal gewährleistet. Die räumliche Anordnung der hydrophoben Reste bestimmt zusätzlich deren Selektivität. Diese Erkenntnis führt erneut die Relevanz des Ionophors als Model der Funktion endogener Ionenkanäle vor Augen (Wallace, 1998; Wallace, 2000; Novartis Foundation Symposium 1999; SIGMA productinformation for Gramicidin; Pfeifer, 2005).

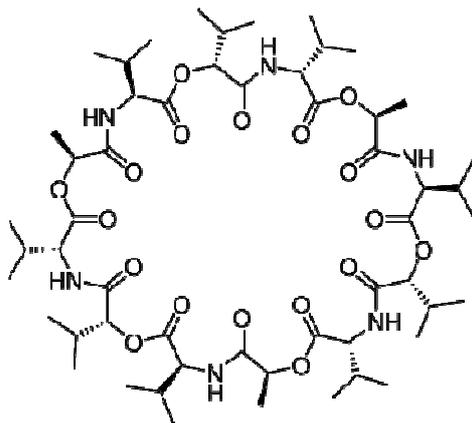


**Abb. 1.9** Vergleich der Ionenbindung a) eines gA-Kanals und b) eines bakteriellen endogenen  $K^+$ -Kanals, beide Ansichten von unten in die Ionenkanalpore (Wallace et al., 1999)

### 1.3.2 Valinomycin

Valinomycin ist ein zyklisches Peptid mit den Eigenschaften eines Ionophors. Es wird von verschiedenen Streptomyceten-Stämmen gebildet (z.B. *Streptomyces fulvissimus*). Es besteht aus drei Einheiten, die sich jeweils aus L-Valin, D-Hydroxyisovaleriansäure, D-Valin und L-Milchsäure zusammensetzen (Abb. 1.10).

Valinomycin bindet sehr spezifisch  $K^+$ -Ionen im polaren Inneren des zyklischen Moleküls, wobei das Äußere des Moleküls hydrophob bleibt. Die hydrophobe Abschirmung des Ions erlaubt dem Komplex den Durchtritt über die Lipiddoppelschichtmembran, wo das Ion wieder abgegeben werden kann. Somit funktioniert das Valinomycin als ein  $K^+$ -selektiver Carrier. Die Folge des Ionentransports durch die Membran ist ein für die Zelle tödlicher Zusammenbruch des Membranpotentials. Das Valinomycin ist ein in der Elektrophysiologie häufig eingesetztes Werkzeug zur Induktion einer  $K^+$ -Permeabilität (Bolkend et al., 2001; SIGMA productinformation for Valinomycin).



**Abb. 1.10** Strukturformel des Valinomycin-Rings mit hydrophilem Zentrum spezifisch bindend für  $K^+$  und hydrophobem Äußerem.

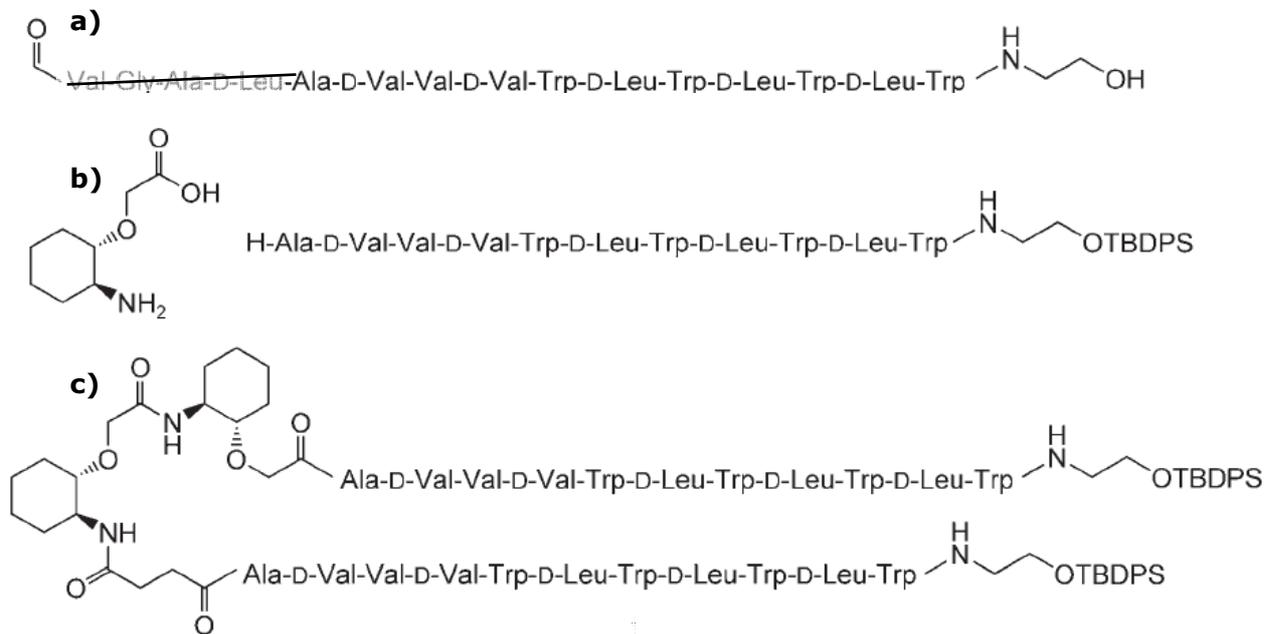
### 1.3.3 Substanz 1

In der Forschungsgruppe um Professor Ulrich Koert wurden in den letzten Jahren verschiedene Modifikationen an der Leitstruktur des gA-Peptides vorgenommen. In elektrophysiologischen Messungen an planaren Sojabohnenlecithin-Lipidmembranen (Black-Lipid-Bilayer) unter kontrollierten (nicht physiologischen) Bedingungen zeigten die hergestellten Substanzen neue Eigenschaften der Selektivität sowie mögliche Ansätze zur Steuerung der Offenwahrscheinlichkeit (Xie et al., 2005; Arndt et al., 2000; Arndt et al., 2001; Arndt et al., 2002; Koert et al., 2004).

Aus der Gruppe der neuen Substanzen zeigte bis auf das im Kapitel 1.2 erwähnte Tetrahydrofuran-gA-Hybrid die Substanz **1** als einzige Verbindung unter physiologischen Bedingungen in lebenden Zellen eine sicher nachweisbare elektrophysiologische Aktivität (Fidzinski, 2006; Sommer, 2003).

Substanz **1** kann in ihrer Struktur in drei Teile zerlegt werden (Abb. 1.11 b). Die Grundstruktur ist ein gA-Peptid, bei dem am N-Terminus vier Aminosäuren entfernt wurden, während die funktionell wichtigen Gruppen D-Leu und L-Trp erhalten geblieben sind, so dass ein sog. „Minigramicidin“ mit 11 Aminosäuren entstand (Abb. 1.11 a). Das Minigramicidin wurde im nächsten Schritt um eine Cyclohexyletheraminsäure am N-Terminus erweitert. Durch eine kovalente Bindung zwischen zwei Cyclohexyletheraminsäuren wurden zwei Monomere des neuen Ionenkanls in der „head to head“-Position fixiert (Abb. 1.11 c). Zuletzt wurden an den beiden C-Termini des Kanals *t*-Butyldiphenylsilyl-Gruppen (TBDPS) angehängt. Das TBDPS ist eine in der organischen Chemie

häufig verwendete Verbindung, die die freien Ethanolaminenden vor dem vorzeitigen Abbau über Peptidasen und Proteasen schützt.



**Abb. 1.11** a) Aminosäuresequenz des gA mit vier durchgestrichenen Aminosäuren am N-Terminus, die bei dem Minigamicidin entfernt wurden, b) Bausteine der Substanz **1** (Cyclohexyletheraminsäure links, Minigamicidin mit angehängter TBDPS-Schutzgruppe am C-Terminus rechts), c) Aminosäuresequenz von **1** zusammengesetzt mit kovalenter Bindung zwischen den beiden Etheraminsäuren

Neue Eigenschaften von Substanz **1** gegenüber dem gA sind der permanent erhaltene Offenzustand, die längere Halbwertszeit sowie eine höhere Selektivität. Der beim Einbau permanent erhaltene Offenzustand wird durch die neue kovalente Bindung der beiden Kanalmonomere gewährleistet, die eine Dissoziation in der Membran verhindern. Durch die angehängten Schutzgruppen wird die Lebensdauer der Substanz insbesondere in lebenden Organismen verlängert. Die neuen Etheraminosäuren führen zu der Positionierung von Sauerstoffatomen im Lumen der Pore. Anders als bei dem gA gibt es bei Substanz **1** zusätzlich zu den Carbonylgruppen am Ein- bzw. Ausgang jetzt im Zentrum hydrophile Reste, die als zusätzlicher Selektivitätsfilter fungieren. In den elektrophysiologischen Untersuchungen mit Sojabohnenlecithin-Lipidmembranen zeigte sich für Substanz **1** ebenfalls eine Eisenmann-I-Selektivität, jedoch mit einer um den Faktor drei bis vier im Vergleich zum gA höheren Selektivität (Tab. 1.1 und Abb. 1.12).

**Tab. 1.1** Permeabilität (P) bestimmt aus den Umkehrpotentialen von 1 mol/l MCL-Lösung (M = Li,Na,K,Rb,Cs,NH<sub>4</sub>,H) relativ zu einer 1 mol/l NH<sub>4</sub>CL-Lösung und Leitfähigkeiten ( $\Lambda$ ) in pS bestimmt aus der Steigung der Strom-Spannungs-Kurven für gA und **1** (aus Arndt, 2001)

| $M^+$                        | $P_{rel}(gA)$ | $P_{rel}(1)$ | $\Lambda(gA)$ | $\Lambda(1)$ |
|------------------------------|---------------|--------------|---------------|--------------|
| Li <sup>+</sup>              | 0,051         | 0,035        | 2,93          | -            |
| Na <sup>+</sup>              | 0,105         | 0,036        | 14,80         | -            |
| K <sup>+</sup>               | 0,248         | 0,078        | 26,0          | 1,06         |
| Rb <sup>+</sup>              | 0,401         | 0,122        | 43,1          | 2,38         |
| Cs <sup>+</sup>              | 0,507         | 0,273        | 43,6          | 6,48         |
| NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> | 1             | 1            | 43,3          | 7,43         |
| H <sup>+</sup>               | 3,99          | 4,77         | 561           | 90           |



**Abb. 1.12** Repräsentative Einzelkanal-Stromspuren von **1** in planaren Sojabohnenlecithin-Lipidmembranen bei einer angelegten Spannung von 200 mV; a) in 1 mol/l KCl-Lösung, b) in 1 mol/l CsCl-Lösung, c) in 1 mol/l NH<sub>4</sub>Cl-Lösung (angepasst aus Arndt, 2001)

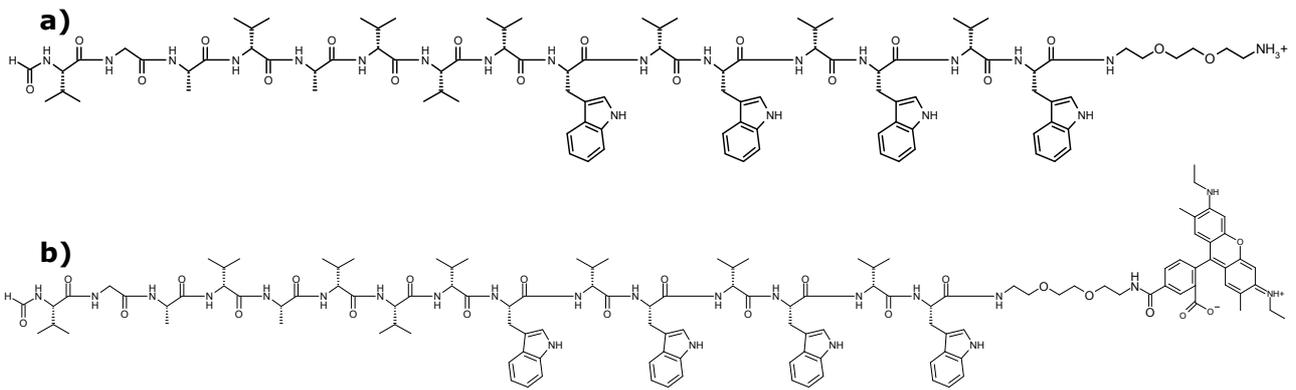
#### 1.3.4 Substanz **2**

Die Substanz **2** besteht aus einem gA-Peptid, an dem am C-Terminus über einen Dietherrest mit zwei Amidgruppen eine fluoreszierende Substanz mit einem Excitationsmaximum von 524 nm und einem Emissionsmaximum von 557 nm angehängt wurde (Abb. 1.13 b). Die Ausgangssubstanz war ein gA-Peptid, bei dem über den Dietherrest eine freie positiv geladene Stickstoffgruppe (ein Imin) angehängt wurde (Abb. 1.13 a). Die Idee hinter dieser Verbindung ist, dass die zusätzliche Kette, die sich extramembranär befindet, hin und her schwingt, wobei sich der NH<sub>3</sub><sup>+</sup>-Rest vor die Pore legen kann und diese im Sinne eines Gating-Mechanismus verschließt (Abb. 1.14). In den elektrophysiologischen Untersuchungen an planaren Membranen zeigte sich eine um 50 Prozent geringere Aktivität des Kanals gegenüber dem gA, was die Annahme eines Gating-Prozesses bekräftigt. (AL-Momani, 2004)

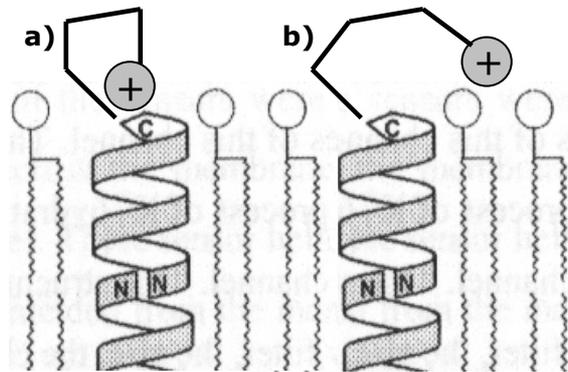
In den Untersuchungen an bovinen Trabekelwerkzellen konnte in Anwesenheit der Substanz mittels der Whole-Cell-Patch-Clamp-Methode keine zusätzliche elektrische Aktivität beobachtet werden (Sommer, 2003).

Damit stellte sich die Frage, ob der fehlende Einbau der Substanz in die Zellmembran oder eine nach dem Einbau entstehende Dysfunktion des Kanals für die fehlende Aktivität in lebenden Zellen verantwortlich ist. Zu diesem Zweck wurde die Substanz mit einer fluoreszierenden Gruppe verbunden, um eine zusätzliche optische Kontrolle der Patch-Clamp-Versuche zu gewährleisten.

## 2. Material



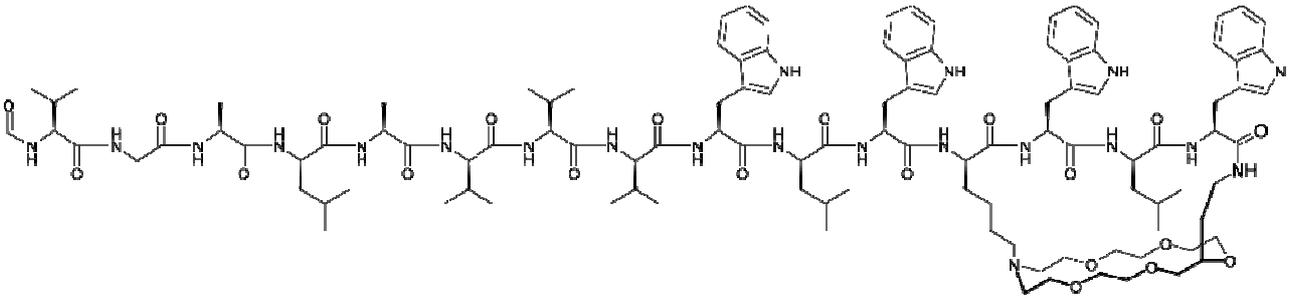
**Abb. 1.13** Strukturformel von **2**; a) Ausgangssubstanz mit positivem Stickstoffrest am C-Terminus über eine Dietherbrücke angehängt, b) **2** mit am Stickstoffrest angehängter fluoreszierender Gruppe



**Abb. 1.14** Schematische Darstellung des „Gating“-Prinzips von **2** ohne Fluoreszenzgruppe; a) geschlossener Kanal, b) offener Kanal (angepasst aus AL-Momani, 2004)

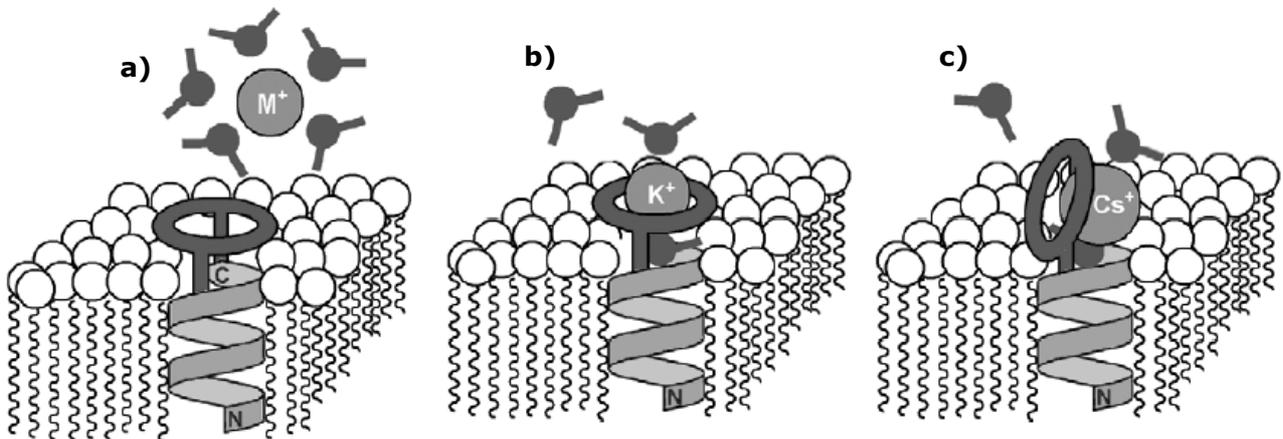
### 1.3.5 Substanz **3**

Wie im Kapitel 1.2 erwähnt, basiert die aktuelle Forschung an künstlichen Ionenkanälen auf dem Modell des Gramicidin A sowie der dreifachen Kronenetherkanäle. Bei Substanz **3** wurde versucht, die Eigenschaften beider Modelle zu nutzen. Durch das Anhängen eines Aza[18]kronen-6-Ethers an die äußeren Aminosäuren am C-Terminus der gA-Sequenz, wobei die letzten vier Aminosäuren gleichzeitig Bestandteil des Kronenether-Rings sind (Abb. 1.15), entstand ein Kronenether-Gramicidin-Hybrid mit einer reduzierten Porenöffnung von 260–320 pm Innendurchmesser.



**Abb. 1.15** Strukturformel von **3**, mit Einbezug der letzten vier Aminosäuren des C-Terminus der gA-Sequenz wurde ein Aza[18]kronen-6-Ether angebracht

Dadurch wurde zusätzlich zu dem Mechanismus der Dehydratation eine zweite Eigenschaft hinzugezogen, die die Selektivität der Pore beeinflusst, nämlich die der Größe des Kations. Dabei ist beispielsweise  $\text{Cs}^+$  mit einem Ionendurchmesser von 326–372 pm nicht in der Lage, den Kronenetherring zu passieren. Es besteht jedoch die Möglichkeit des energetisch ungünstigen Transports am Kronenether vorbei, so dass die Leitfähigkeit für Kationen  $>320$  pm nicht gleich Null ist (Abb. 1.16).



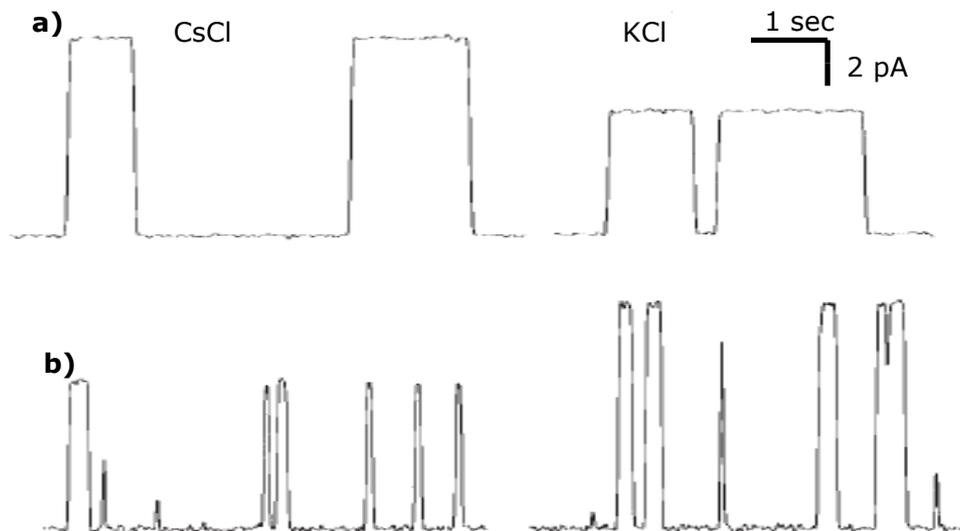
**Abb. 1.16** Schematische Darstellung des Eintritts eines solvatisierten Kations in den durch **3** gebildeten Kanal; a) Annäherung eines hydratisierten Kations, b) die unterstützende Dehydratation kann mittels Durchtritt durch den Kronenether oder c) Passage am Kronenether vorbei erfolgen (aus Pfeifer, 2005)

In den Untersuchungen an planaren Lipidmembranen zeigte sich für Substanz **3** abhängig von der Rigidität der verwendeten Membran eine bis zu 35 Prozent höhere Leitfähigkeit für  $\text{K}^+$  im Vergleich

zu gA, sowie eine bis zu 50 Prozent geringere Leitfähigkeit für Cs<sup>+</sup> (Tab. 1.2). Somit ist Substanz **3** die erste auf gA basierende Verbindung, die nicht die Eisenmann-I-Selektivitätsreihenfolge aufweist, sondern K<sup>+</sup>- und Na<sup>+</sup>-Ionen bevorzugt und damit für den Einsatz in lebenden Organismen wesentlich an Bedeutung gewinnt (Pfeifer, 2005).

**Tab. 1.2** Leitfähigkeiten in pS bestimmt aus der Steigung der Strom-Spannungs-Kurven für gA und **3** in a) DOPC-(1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholin) und b) DPhPC/DPhPG-(1,2-Diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholin; 1,2-Diphytanoyl-snglycero-3-[phospho-rac-(1-glycerin)]) Membranen (aus Pfeifer, 2005)

| $M^+$           | $\Lambda(gA)$ | a) | $\Lambda(3)$ | a) | $\Lambda(gA)$ | b) | $\Lambda(3)$ | b) |
|-----------------|---------------|----|--------------|----|---------------|----|--------------|----|
| Na <sup>+</sup> | 14,6          |    | 11,4         |    | 14,3          |    | 18,8         |    |
| K <sup>+</sup>  | 20,6          |    | 22,6         |    | 27,8          |    | 37,7         |    |
| Rb <sup>+</sup> | 38,4          |    | 27,0         |    | 47,2          |    | 55,8         |    |
| Cs <sup>+</sup> | 36,7          |    | 16,0         |    | 40,9          |    | 33,3         |    |



**Abb. 1.17** Repräsentative Einzelkanal-Stromspuren von a) gA und b) **3** in planaren Sojabohnenlecithin-Lipidmembranen bei einer angelegten Spannung von 200 mV in 1 mol/l KCl-Lösung und in 1 mol/l CsCl-Lösung (aus Pfeifer, 2005)

## 2. Material

### 2.1 Chemikalien

|                   |                   |                    |                  |
|-------------------|-------------------|--------------------|------------------|
| Aceton            | (Carl Roth GmbH)  | KCl                | (Carl Roth GmbH) |
| Agar              | (ICN Biomedicals) | MEM- $\alpha$      | (GIBCO)          |
| AgCl              | (SIGMA)           | MgCl <sub>2</sub>  | (F LUKA)         |
| Ampicilin         | (Carl Roth GmbH)  | NaCl               | (Carl Roth GmbH) |
| CaCl <sub>2</sub> | (FLUKA)           | NH <sub>4</sub> Cl | (F LUKA)         |
| CsCl              | (Riedel-de Haën)  | PBS                | (GIBCO)          |
| DMSO              | (SIGMA)           | SIGMAcote          | (SIGMA)          |
| EGTA              | (Carl Roth GmbH)  | Silanelösung       | (FLUKA)          |
| Ethanol           | (Carl Roth GmbH)  | Streptomycin       | (Invitrogen)     |
| FKS               | (PAA)             | Tris               | (SIGMA)          |
| Glucose           | (Carl Roth GmbH)  | Trypsin            | (GIBCO)          |

### 2.2 Verbrauchsmaterialien

|                     |   |
|---------------------|---|
| Eppendorfgefäß      | 1 ml; 0,5 ml, Cellstar                        |
| Faltenfilterpapier  | Schleicher&Schuell                            |
| Glasplättchen       | 10 mm, Zeiss Instrumente                      |
| Kapillaren          | GB150T- 8P, Science Products                  |
| Kunststoffschläuche | verschiedene Stärken, Tygon                   |
| Petrischalen        | 35x10 mm; 60x15 mm, Sarstedt                  |
| Pipetten einweg     | 5 ml, 10 ml, 20 ml, Falcon                    |
| Pipettenspitzen     | 0,5- 1000 $\mu$ l, Sarstedt                   |
| Spritzen            | 1 ml und 50 ml Omnifix, B Braun               |
| Spritzenaufsatz     | Microfil 34, World Precision Instrument       |
| Spritzenfilter      | für 1 ml Spritzen, World Precision Instrument |

## 2.3 Geräte

Für die Kultivierung der Zellen wurden folgende Geräte verwendet:

|                |                                      |
|----------------|--------------------------------------|
| Sterilbank     | BSB 4A, Gelaire                      |
| Inkubator      | Hera cell 240, Heraeus Instruments   |
| Wasserbad      | MT, Launda                           |
| Bunsenbrenner  | Flammy S, Schütt                     |
| Pipettensatz   | Referance, Eppendorf                 |
| Pipettierhilfe | Pipetus-akku, Hirschmann Laborgeräte |

Für die Patch-clamp-Experimente wurden folgende Geräte und Software verwendet:

|                             |   |
|-----------------------------|---|
| inverses Mikroskop          | Axiovert 40, Zeiss Instrumente          |
| Vor- u. Hauptverstärker     | EPC 9 und 10, HEKA Elektronik           |
| Patch-Clamp-Software        | TIDA 5, HEKA Elektronik                 |
| Mikromanipulator            | PatchMan NP2, Eppendorf                 |
| Puller                      | Universal Puller DMZ, Zeiss Instrumente |
| schwingungsgedämpfter Tisch | R-3-M5, Festo                           |
| Faraday-Käfig               | Eigene Produktion                       |
| Badelektrode                | ESP-F15N, Warner Instrument Corp.       |

## 2. Material

Für die Fluoreszenz- und Volumenregulationsexperimente wurden folgende Geräte und Software verwendet:

|                       |                                    |
|-----------------------|------------------------------------|
| inverses Mikroskop    | Axiovert 35, Zeiss Instrumente     |
| Software              | Metaflour 5.0, Imaging Corporation |
| Kamera                | Cool Snap, Visitron Systems        |
| Lichtfiltersatz       | Visitron Systems                   |
| Polychromator Einheit | 300-600 nm, Visitron Systems       |
| Objektmikrometer      | 2 mm /200 Teile, Zeiss Instrument  |

### 2.4 Zellen

Für alle Messungen wurden Zellen der CHO (Chinese Hamster Ovary)-Linie verwendet. Die Zellen wurden aus den vorrätigen Zellkulturen des Institutes für Elektrophysiologie von Prof. Schwarz bezogen.

### 2.5 Lösungen

#### 2.5.1 Lösungen für Patch-Clamp-Experimente

Für die Messungen wurden Lösungen mit physiologischen Salzkonzentrationen verwendet. Je nach Versuchsaufbau war der Hauptladungsträger  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , oder  $\text{Cs}^+$ . In den Versuchen mit  $\text{Cs}^+$  als Hauptladungsträger wurden in der Extrazellulärlösung alle einwertigen Kationen vollständig durch  $\text{Cs}^+$  ersetzt. Bei der Intrazellulärlösung führte der vollständige Kaliumentzug zu instabilen Messverhältnissen, weswegen eine geringe Menge von 5 mmol/l  $\text{K}^+$ -Ionen belassen wurde. Für die Versuche zur Regulation des Volumens der Zellen wurde zusätzlich eine hypoosmolare Lösung verwendet, bei der die  $\text{Na}^+$ -Konzentration um 35 mmol/l gegenüber den physiologischen Verhältnissen gesenkt wurde. Der pH-Wert wurde in allen Lösungen mit Tris auf einen Zielwert von 7,3 titriert.

Alle Lösungen wurden nach Zubereitung gefiltert. Die Badlösungen wurden im Kühlschrank bei +4 °C aufbewahrt und innerhalb von 4 Wochen verbraucht. Am jeweiligen Versuchstag erfolgte die

## 2. Material

Zugabe von Glucose. Pipettenlösungen wurden in 2 ml Aliquots überführt, bei -20 °C eingefroren und nach Bedarf aufgetaut. Vor Beginn des Experiments wurden sämtliche Lösungen auf Raumtemperatur gebracht. Folgende Lösungen wurden verwendet:

### Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>--Badlösung:

|                   |            |
|-------------------|------------|
| NaCl              | 135 mmol/l |
| KCl               | 5 mmol/l   |
| MgCl <sub>2</sub> | 2 mmol/l   |
| CaCl <sub>2</sub> | 2 mmol/l   |
| HEPES             | 10 mmol/l  |
| Glucose           | 5 mmol/l   |

### Cs<sup>+</sup>-Badlösung:

|                   |            |
|-------------------|------------|
| CsCl              | 135 mmol/l |
| MgCl <sub>2</sub> | 2 mmol/l   |
| CaCl <sub>2</sub> | 2 mmol/l   |
| HEPES             | 10 mmol/l  |
| Glucose           | 5 mmol/l   |

### K<sup>+</sup>-Badlösung:

|                   |            |
|-------------------|------------|
| KCl               | 135 mmol/l |
| MgCl <sub>2</sub> | 2 mmol/l   |
| CaCl <sub>2</sub> | 2 mmol/l   |
| HEPES             | 10 mmol/l  |
| Glucose           | 5 mmol/l   |

### Hypoosmolare Badlösung:

|                   |           |
|-------------------|-----------|
| NaCl              | 95 mmol/l |
| KCl               | 5 mmol/l  |
| MgCl <sub>2</sub> | 2 mmol/l  |
| CaCl <sub>2</sub> | 2 mmol/l  |
| HEPES             | 10 mmol/l |
| Glucose           | 5 mmol/l  |

K<sup>+</sup>Pipettenlösung :

|                   |            |
|-------------------|------------|
| KCl               | 140 mmol/l |
| MgCl <sub>2</sub> | 2 mmol/l   |
| CaCl <sub>2</sub> | 1 mmol/l   |
| HEPES             | 10 mmol/l  |
| EGTA              | 2,5 mmol/l |

Cs<sup>+</sup>Pipettenlösung

|                   |            |
|-------------------|------------|
| CsCl              | 135 mmol/l |
| KCl               | 5 mmol/l   |
| MgCl <sub>2</sub> | 2 mmol/l   |
| CaCl <sub>2</sub> | 2 mmol/l   |
| HEPES             | 10 mmol/l  |
| Glucose           | 5 mmol/l   |

2.5.2 Zellkulturmedium

Das Nährmedium wurde in 0,5l-Flaschen bei +4 °C aufbewahrt. Das FKS wurde bei -20 °C aufbewahrt. Vor dem Gebrauch wurde das fetale Kälberserum mit 56 °C über 30 min hitzeinaktiviert und in dem unten stehenden Verhältnis gemischt.

Folgendes Medium wurde verwendet:

MEM-α

10 % fetales Kälberserum

100 U/ml Ampicilin

100 µg/ml Streptomycin

### 2.5.3 Lösungen für die Agarbrücke

NaCl 150 mmol/l

Agar 1,5%

Zur Herstellung von Agarbrücken wurden Glaskapillaren mit 1,5%-igem Agar mit 150 mmol/l NaCl gefüllt. Gelagert wurden die Agarbrücken in 150 mmol/l NaCl Lösung bei 4-8 °C.

### 2.6 Substanzen

Alle Substanzen wurden in DMSO in einer Konzentration von  $4 \times 10^{-4}$  mol/l gelöst. Um eine Verdünnung der Lösung durch Kondenswasser bei häufigem Auftauen zu verhindern, wurde die Lösung direkt à 0,5 µl in 0,5ml-Eppendorfgefäßen portioniert und bei -20 °C aufbewahrt. Bei Bedarf wurden die Aliquots je nach Versuchsaufbau mit der entsprechenden Badlösung aufgefüllt. Folgende Substanzen wurden in ihrem Einfluss auf den Ladungstransport durch die Zellmembran untersucht.

#### *Ionotrope Substanzen:*

|              |   |
|--------------|---|
| <b>1</b>     | Institut für Chemie der Philipps-Universität<br>Marburg |
| <b>2</b>     | Institut für Chemie der Philipps-Universität<br>Marburg |
| <b>3</b>     | Institut für Chemie der Philipps-Universität<br>Marburg |
| Gramicidin A | SIGMA   |
| Valinomycin  | SIGMA   |

## 3 Methoden

### 3.1 Zellkultur

Die verwendeten CHO-Zellen wurden in T25-Flaschen für adhären wachsende Zellen mit 10 ml Kulturmedium kultiviert. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C in einer feuchtigkeitsgesättigten Atmosphäre von 95% Luft und 5% Kohlenstoffdioxid. Von konfluent gewachsenen Zellen wurde das Medium entfernt, die Flasche mit PBS gewaschen und die Zellen mit 1 ml Trypsinlösung für 3-5 min inkubiert, bis sich die Zellen vom Boden lösten. Durch Zugabe von 6 ml MEM- $\alpha$ -Medium wurde das Trypsin inaktiviert. Um die in größeren Verbänden schwimmenden Zellen voneinander zu lösen, wurde das Medium durch ein mehrfaches An- und Absaugen mit der Pipette gründlich gemischt bis eine homogene Suspension entstand. Für die weitere Kultivierung wurden 0,5 ml der Zellsuspension in eine neue T25-Flasche überführt und mit weiteren 12 ml Medium aufgefüllt. Für die Messungen wurden mehrere 10mm-Glasplättchen in einer Petrischale platziert und mit 0,5 ml Zellsuspension und 5 ml Medium aufgefüllt. Nach ca. einer Stunde hatten sich einzelne Zellen auf die Glasplättchen gesetzt und konnten in die Messkammer überführt werden.

### 3.2 Die Patch-Clamp-Technik

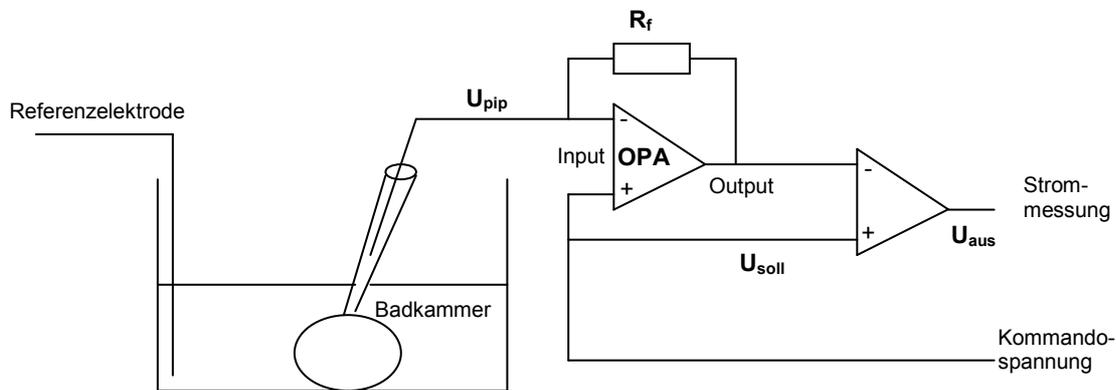
Die Patch-Clamp-Technik beruht auf dem Prinzip der Spannungsklemme, bestehend aus zwei Elektroden und der dazwischen liegenden Membran (dem „Patch“). Die Referenzelektrode befindet sich in der Badkammer, die Messelektrode in der Pipettenlösung, die durch die Glaskapillare/Pipette von der Badlösung elektrisch isoliert ist. Die Öffnung der Kapillare stellt die Verbindung zwischen Bad- und Pipettenlösung dar und schließt damit den Stromkreis. Im elektrisch dichten Abschluss der zu untersuchenden Zellmembran und der Patch-Pipette befindet sich die Membran im Stromkreis zwischen Mess- und Referenz-Elektrode und ist durch ihren elektrischen Widerstand ( $R$ ) bzw. ihre elektrische Leitfähigkeit ( $1/R$ ) für den Stromfluss entscheidend.

Mit der Spannungsklemme (Voltage-Clamp) wird eine festgelegte Spannung konstant gehalten. Fließt ein Strom über die Membran, ändert sich der Wert der Spannung am Referenzwiderstand. Über einen Rückkopplungsschaltkreis wird eine Kompensationsspannung aufgebaut, deren Wert proportional zum an der Membran geflossenen Strom ist. Nach erfolgter Umrechnung wird dann der über die Membran geflossene Strom gemessen.

Die Stromklemmenanordnung (Current-Clamp) misst dagegen bei konstant gehaltener Stromstärke das sich an der Membran einstellende Potential. Daraus lassen sich zum Beispiel Rückschlüsse auf das Ruhemembranpotential der Zelle herleiten oder Aktionspotentiale messen (vgl. Molleman, 2003; Numberger et al., 1996).

### 3.2.1 Der Verstärker

Das Prinzip des Patch-Clamp-Verstärkers beruht auf der Bestimmung des über die Membran fließenden Stroms. Die Bestimmung ergibt sich aus der Kompensationsspannung, die nötig ist, um die auf der Pipette angelegte Spannung konstant zu halten.



**Abb. 3.1** Schaubild eines Patch-Clamp-Verstärkers (angepasst aus Numberger et al., 1996)

Am Referenzwiderstand ( $R_f$ ) des Stromspannungswandlers wird eine einzustellende Sollspannung ( $U_{soll}$ ) konstant gehalten. Die Sollspannung wird als so genanntes Haltepotential von dem Experimentator festgelegt und kann im Rahmen eines Messprotokolls unterschiedliche Spannungssprünge machen. Änderungen der Sollspannung am  $R_f$  werden von dem Operationsverstärker (OPA) kompensiert (Abb. 3.1).

Der Operationsverstärker bekommt seinen Input einerseits von der Pipettenelektrode als  $U_{pip}$  und andererseits als Sollspannung ( $U_{soll}$ ). Das Output des OPA ergibt sich aus einer Verstärkung der Differenz zwischen  $U_{soll}$  und  $U_{pip}$ . Fließt Strom durch die Zellmembran, dann ändert sich die Spannung an der Pipettenelektrode und führt zu einer Änderung der Differenz zwischen  $U_{soll}$  und  $U_{pip}$ . Durch eine Verbindung zwischen dem Output des OPA und der Pipettenelektrode kommt es bei einer Spannungsdifferenz zu einem Stromfluss. Am Referenzwiderstand wird eine Spannung

aufgebaut. Diese Kompensationsspannung ( $U_{aus}$ ), die proportional zu dem an der Membran geflossenen Strom ist, wird von dem Stromspannungswandler gemessen und in Strom umgewandelt (Abb. 3.1). Für die Aufzeichnung wird im Ruhezustand ein Spannungsimpuls von -10 mV, 20 ms Dauer und einer Frequenz von 2-5-mal pro Sekunde verwendet. Bei einer Überlagerung der aufgezeichneten Stromantworten stellt sich auf dem Monitor ein Rechteckimpuls ein. Bei den Pulsprotokollen wird die entsprechende Spannungskaskade durchlaufen und entweder im zeitlichen Verlauf aneinander gereiht dargestellt oder die Stromantworten der Spannungssprünge werden übereinander gelegt dargestellt (vgl. Molleman, 2003; Numberger et al., 1996).

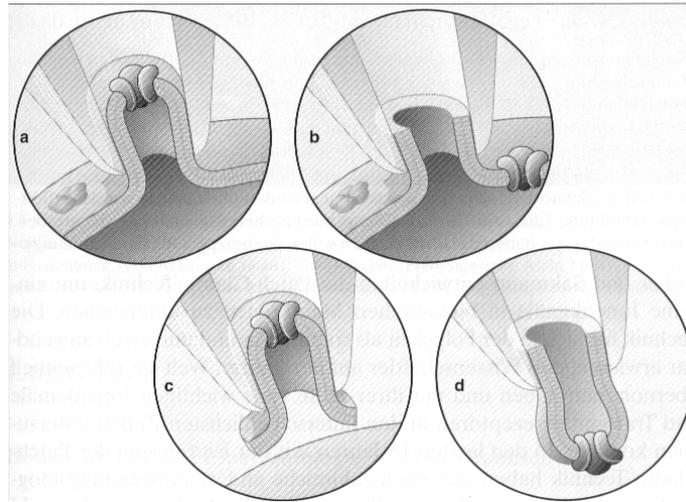
#### 3.2.2 Der Giga-Seal

Ein großes Problem der direkten Messung von elektrischen Strömen durch Ionenkanäle an biologischen Membranen ist das schwache Signal gegenüber den großen Ladungsbewegungen in der Umgebung. Deswegen ist die optimale Isolation durch Abdichtung der Membran gegen die Pipettenwand eine unbedingte Voraussetzung für die Messung. Eine solche Abdichtung wird als Giga-Seal bezeichnet und zeichnet sich durch einen elektrischen Widerstand aus, der bis in den Gigaohmbereich ( $G\Omega$ ) reicht.

Um ein Giga-Seal zu erreichen, wird die Pipette (Glaskapillare mit Pipettenlösung und Elektrode) in die Badkammer getaucht. Dabei wird ein leichter Überdruck auf der Pipette angelegt, um dem Sog der Kapillarkraft entgegenzuwirken und eine Verstopfung der Pipettenöffnung durch frei schwebende Teilchen zu verhindern. Unter optischer Kontrolle wird die Pipette an die sich in der Badkammer befindende Zelle gebracht. Sobald es zu einem Kontakt der Zellmembran mit der Pipette kommt – erkennbar am Anstieg des elektrischen Widerstandes – wird der Überdruck abgelassen. Die Membran legt sich an die Pipettenöffnung. Durch Anlegen eines leichten Unterdrucks kommt es zu einem engen Membran-Pipetten-Kontakt. Der Unterdruck wird so lange aufrechterhalten, bis der elektrische Widerstand einen Wert  $>1 G\Omega$  (Giga-Seal) erreicht. Der so erhaltene Seal ist mechanisch stabil und braucht keinen weiteren Unterdruck zu seiner Aufrechterhaltung. Aus dieser Konfiguration sind auf Grund der mechanischen Stabilität verschiedene Messkonfigurationen möglich (vgl. Molleman, 2003; Numberger et al., 1996).

## 3.2.3 Die Patch-Clamp-Konfigurationen

Ausgehend von einem Zellkontakt mit einem Giga-Seal gibt es verschiedene Möglichkeiten der weiteren Versuchskonfiguration. Man unterscheidet die Cell-Attached-, Whole-Cell-, Inside-Out- und die Outside-Out-Konfiguration (Abb. 3.2).



**Abb. 3.2** Patch-Konfigurationen; a) cell-attached, b) whole-cell, c) inside-out, d) outside-out (aus Molleman 2003)

Die in dieser Arbeit am häufigsten verwendete Messkonfiguration ist die Whole-Cell-Konfiguration (Abb. 3.2 b). Dabei wird durch einen erneut angelegten Unterdruck die Membran vor der Pipettenöffnung durchgesogen, ohne den Giga-Seal zu zerstören. Die Zelle wird geöffnet, so dass ein elektrischer Zugang ins Zellinnere hergestellt wird. Die Zellmembran der gesamten Zelle bildet dabei die Barriere zwischen der Pipetten- und der Referenzelektrode. Der nun gemessene Strom ist die Summe aller durch die ganze Zellmembran gehender Ionentransporte und ist abhängig von der Art und Anzahl der offenen Ionenkanäle.

Weitere Messungen wurden in der Inside-Out-Konfiguration durchgeführt (Abb. 3.2 c). Dabei wird die Pipette, sobald ein Giga-Seal erreicht ist, langsam von der am Boden haftenden Zelle weggezogen, bis ein Membranstück aus der Zelle ausreißt. Der hohe elektrische Widerstand muss dabei stets erhalten bleiben. Wenn das Manöver erfolgreich war, zeigt die Innenseite der Zellmembran nach außen zur Badlösung und die Außenseite zur Pipettenlösung. Im Vergleich zu der Whole-Cell-Ableitung ist bei dem Inside-Out-Patch die Membranfläche wesentlich kleiner. Der

### 3. Methoden

Gesamtstrom wird von den wenigen aktiven Ionenkanälen im so isolierten Stück Zellmembran gebildet, so dass nicht Summenaktivitäten, sondern Einzelkanalaktivitäten aufgezeichnet werden können.

Weiterhin können bei bestimmten Fragestellungen die Messkonfigurationen cell-attached (Abb. 3.2 a) und outside-out (Abb. 3.2 d) angewandt werden. Bei Cell-Attached-Konfigurationen werden die Daten direkt nach dem Erreichen des Giga-seals erhoben, ohne dabei die Membran zu beschädigen. Bei der Outside-Out-Konfiguration wird ausgehend von der Whole-Cell-Konfiguration die Pipette von der Zelle weggezogen, bis ein Stück aus der Membran ausreißt. Wenn der hohe elektrische Widerstand erhalten bleibt, geht man davon aus, dass sich die äußeren Rissränder wieder verschlossen haben, so dass ein kleines Stück Membran mit der Außenseite zur Badlösung an der Pipettenöffnung hängt. Beide Verfahren fanden in dieser Arbeit keine Anwendung (vgl. Molleman, 2003; Numberger et al., 1996).

#### 3.2.4 Versuchsaufbau Whole-Cell-Messungen

Alle Versuche wurden bei Raumtemperatur in einem Faraday-Käfig und auf einem schwingungsgedämpften Tisch durchgeführt.

Die Zellen wurden auf einem 10mm-Glasplättchen ausgesät und in eine mit Badlösung gefüllte Badkammer platziert. Die selbst angefertigte Badkammer aus Plexiglas hat ein Fassungsvermögen von 1,5 ml und verfügt über Zu- und Ablauf. Oberhalb der Badkammerebene wurde eine 50 ml-Spritze mit Badlösung aufgehängt. Über ein Kunststoffschlauchsystem wurde die Badkammer mit Badlösung aus der Spritze perfundiert. Der Zulauf konnte über einen vorgeschalteten Dreiwegehahn reguliert bzw. unterbrochen werden. Die überflüssige Badlösung lief über ein weiteres Schlauchsystem in eine sich unterhalb der Badkammer befindende Flasche ab (Abb. 3.3). Dabei wurde darauf geachtet, dass sich kein durchgehender Flüssigkeitsfilm zwischen der abgelaufenen Lösung und dem Schlauchsystem bildete, um kapazitive Aufladungen und damit ein stärkeres Rauschen oder höheres Offset-Potential zu verhindern. Aus den gleichen Gründen wurde auf eine Pumpe zur Perfusion der Kammer verzichtet.

Die Hauptladungsträger der verwendeten Lösungen waren je nach Versuchsaufbau  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  oder  $\text{Cs}^+$  als Kationen und  $\text{Cl}^-$  als Anion.

Vor der Applikation einer Substanz wurde die Perfusion stets unterbrochen. Die in 0,5 ml Badlösung gelöste Substanz wurde in einer Konzentration von  $4 \times 10^{-6}$  mol/l über den Rand der Badkammer mit einer Eppendorfpipette hinzugegeben, so dass sich eine Endkonzentration von  $10^{-6}$  mol/l ergab. Auf eine Perfusion der Badkammer mit in Badlösung gelöster Substanz wurde auf Grund des damit verbundenen hohen Verbrauchs der aufwendig hergestellten und gereinigten Substanzen verzichtet. Es wurde darauf geachtet, dass auch bei mehrfacher Applikation von in DMSO gelösten Substanzen die Gesamtkonzentration von DMSO stets 0,1% nicht überschritt. Bei den Kontrollexperimenten mit DMSO wurde eine Endkonzentration von 0,1% in der Badkammer erreicht.

Die Referenzelektrode war mit der Badlösung über eine NaCl-Agarbrücke verbunden. Der Agar befand sich in einer gebogenen Glaskapillare, die in eine vorgefertigte Elektrodenhalterung eingefasst war.

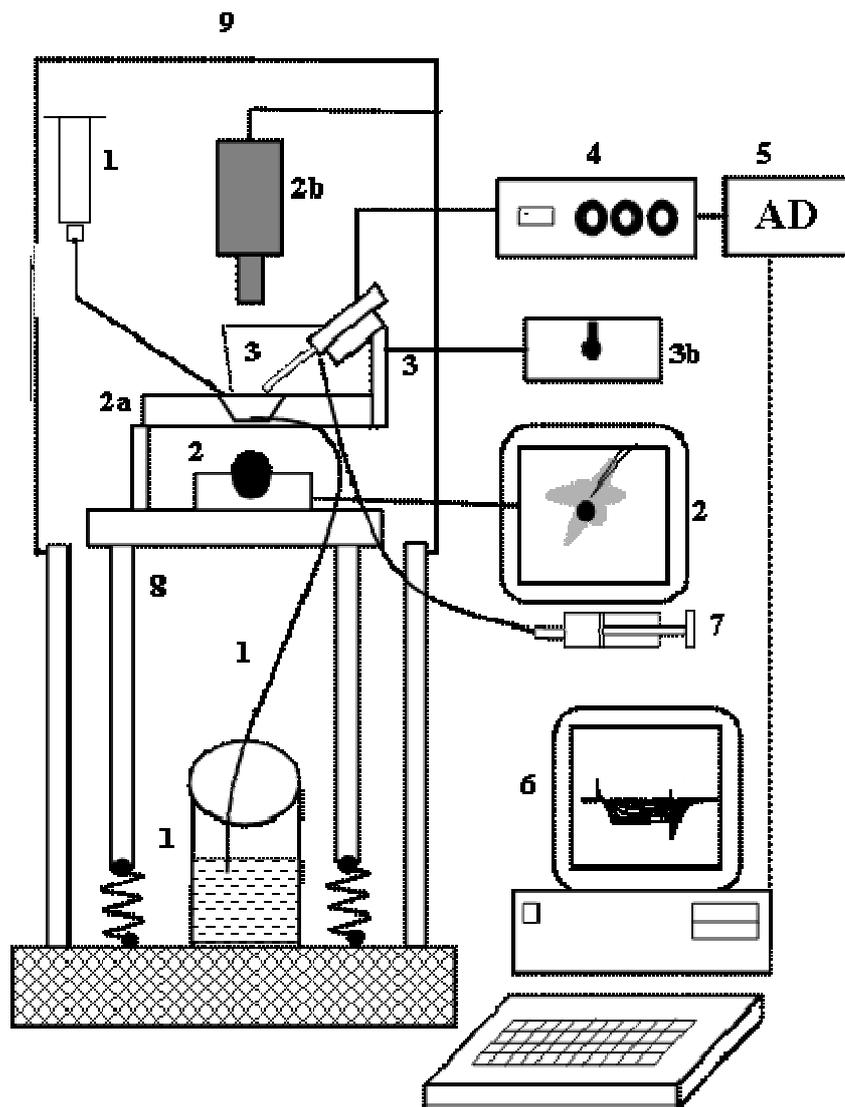
Die Pipettenelektrode bestand aus direkt am Vorverstärker angebrachter Pipettenhalterung mit einem chlorierten Silberdraht. Die ganze Vorrichtung konnte über einen Mikromanipulator beliebig in allen drei Ebenen bewegt werden. Der Silberdraht der Elektrode wurde in regelmäßigen

### 3. Methoden

Abständen mit einer neuen AgCl-Schicht überzogen. Eine beschädigte AgCl-Beschichtung zeichnete sich durch einen Anstieg bzw. durch starkes Schwanken des Offset-Potentials ab.

Die Glaspipetten wurden automatisch von einem Pipettenziehgerät (Puller) aus Borosilikatglaskapillaren hergestellt. Der Widerstand der Pipetten betrug 3-4 M $\Omega$ , was einem Öffnungsdurchmesser von 0,6-1  $\mu\text{m}$  entspricht (vgl. Molleman, 2003).

Die fertigen Pipetten wurden durch eine Mikrokanüle mit vorgeseztem Filter mit Pipettenlösung gefüllt. Die mit Lösung gefüllte Pipette wurde über den Silberdraht gestülpt und in die Pipettenhalterung eingefasst. Über die Pipettenhalterung und ein externes Schlauchsystem wurde vor dem Eintauchen der Pipette in die Badlösung ein Überdruck erzeugt.

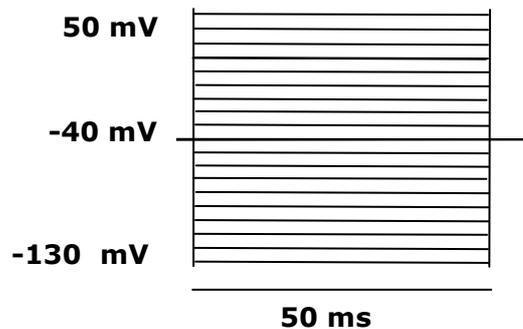


**Abb. 3.3** Vereinfachtes Schema des Patch-Clamp-Experimentaufbaus:  
 1) Perfusionssystem mit: frischer Badlösung, zuführendem Schlauch, abführendem Schlauch, benutzter Badlösung; 2) Invertmikroskop mit:  
 a) Perfusionskammer, b) Lichtquelle und Monitor;  
 3) Mikromanipulatoreinheit mit: Patchpipette, b) Mikromanipulator;  
 4) Patch-Clamp-Verstärker EPC-10; 5) AD/DA-Wandler; 6) Computer mit TIDA-Software zur Datenaufnahme und Analyse; 7) Schlauchsystem für Pipettendruck; 8) schwingungsgedämpfter Tisch; 9) Faradaykäfig.  
 (angepasst aus Rosenthal, 2000)

Nach Ausbildung der Whole-Cell-Konfiguration wurden die Daten mit Hilfe der Software TIDA 5.0 von HEKA erfasst. Über einen Digital-Analog-Wandler wurden von der Software Spannungskommandos an den Verstärker gegeben. Die bei der Stimulation erfassten Daten wurden wiederum von einem Analog-Digital-Wandler an den Computer weitergeleitet und mit Hilfe der Software aufgezeichnet.

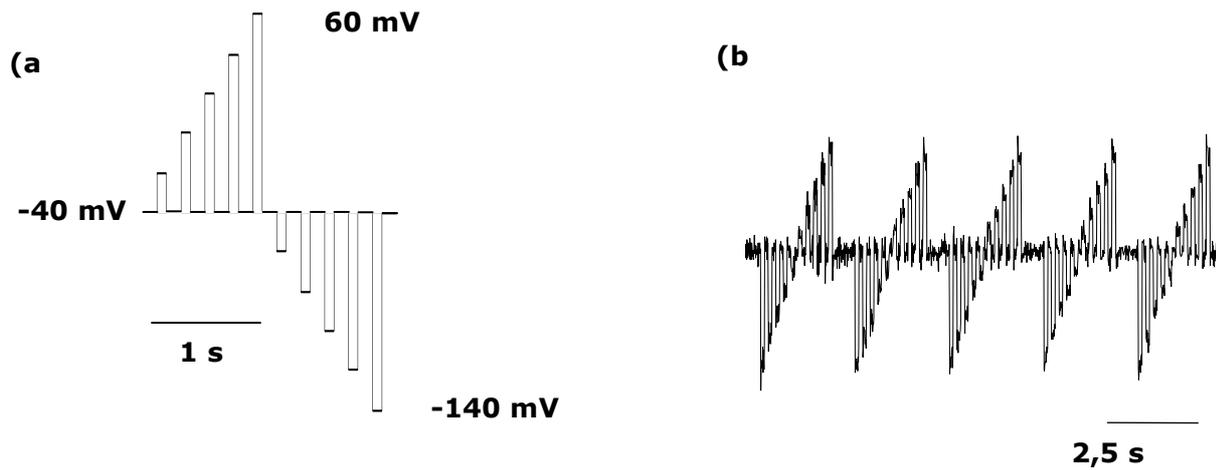
Für die Whole-Cell-Messungen wurden zwei Stimulations-Protokolltypen verwendet.

Das r50-Pulsprotokoll macht ausgehend von einer dauerhaft angelegten Spannung, dem Haltepotential (in unserem Fall stets  $-40\text{ mV}$ ), neun Spannungssprünge in  $10\text{ mV}$  Schritten in positiver Potentialrichtung und negativer Potentialrichtung. Jeder Impuls dauert dabei  $50\text{ ms}$  (Abb. 3.4). Die Auswertung der r50-Protokolle bildet die Grundlage der Daten der Whole-Cell-Messungen.



**Abb. 3.4** Schema eines r50-Pulsprotokolls, die Zahlen geben die maximalen Spannungsaussschläge und das Ausgangspotential an, die Dauer der Spannungsimpulse beträgt  $50\text{ msec}$

Das zweite verwendete Protokoll ist das Rev-Verlaufsprotokoll. Es macht ebenfalls ausgehend vom Haltepotential in  $2\text{ s}$  fünf Spannungssprünge mit  $20\text{ mV}$  Schritten in positiver und negativer Potentialrichtung. Diese Kaskade wird über  $125\text{ s}$  mit dazwischen liegenden  $0,5\text{ s}$  langen Ruhephasen im Haltepotential wiederholt (Abb. 3.5 a). Die einzelnen Aufzeichnungen können in zeitlicher Abfolge zusammengefügt werden (Abb. 3.5 b), so dass eine Überblickdarstellung des elektrischen Geschehens an der Zelle über die Gesamtdauer des Experimentes entsteht. Bei den durchgeführten Experimenten wurden im Wechsel ein r50-Pulsprotokoll und ein Rev-Verlaufsprotokoll aufgezeichnet. So konnte das auf eine im Rev-Verlaufsprotokoll erkennbare Veränderung folgende r50-Pulsprotokoll für die Auswertung herangezogen werden.



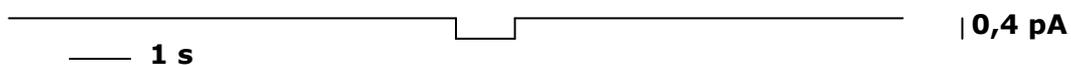
**Abb. 3.5** a) Schema eines Rev-Verlaufsprotokolls, b) vergrößerter Ausschnitt aus einer Aufzeichnung des Rev-Verlaufsprotokolls an einer CHO-Zelle in der Whole-Cell-Konfiguration.

Wegen des relativ hohen Widerstands der Zellmembran kommt es bei sprunghaften Potentialänderungen zunächst zu einer kapazitiven Aufladung der Zellmembran, bevor der Strom über die Zellmembran fließen kann. Je größer die Membranfläche ist, desto größer ist die Kapazität. Somit ist die Kapazität direkt proportional zu der Zelloberfläche. Diese Kapazität lässt sich über die Zeit berechnen, die der kapazitive Ladestrom braucht, bis er nach einer bestimmten Änderung der Spannung die Zellmembran umgeladen hat. Diese Berechnung wurde von der TIDA-Software durchgeführt und ergab in den ausgewerteten Versuchen eine mittlere Membrankapazität von  $13,15 \pm 3,6$  pF ( $n=47$ ) bei einem Zugangswiderstand (Serienwiderstand) von durchschnittlich  $8,4$  M $\Omega$ .

## 3.2.5 Versuchsaufbau Einzelkanalmessungen

Für die Einzelkanalmessungen wurde der Aufbau sowie die Durchführung der Patch-Clamp-Experimente der hohen Auflösung kleiner Stromamplituden angepasst. Bei allen Versuchen wurde die Cs<sup>+</sup>-Pipetten- und Cs<sup>+</sup>-Badlösung verwendet. Um die Wahrscheinlichkeit des Einbaus von Substanz **1** in die Membran zu erhöhen, wurde in beide Patch-Lösungen Substanz **1** in einer Konzentration von 10<sup>-6</sup> Mol/l beigemischt. Bei den Einzelkanalmessungen wurde ein höherer Pipettenwiderstand von 5 MΩ (ca. 0,5 μm) gewählt. Zur besseren elektrischen Isolierung der Pipetten wurden sie für die Einzelkanalmessungen zusätzlich mit hydrophoben Substanzen beschichtet. Dabei wurde der Pipettenschaft mit einer Silanisierungslösung (Dimethyldichlorsilane,-trichlorethan) beschichtet und die Pipettenspitze in eine Silikonlösung (Sigmacote®) getaucht. Nachdem der Patch von der Cell-Attached- in die Inside-Out-Konfiguration überführt wurde, wurde die Pipette bis dicht an die Oberfläche der Badlösung geführt. Damit konnte die Fläche zwischen der Pipette und Bad verkleinert werden, was die kapazitive Aufladung und damit auch das Rauschen verringerte. Mit diesen Maßnahmen konnte das Hintergrundrauschen auf <1 pA gesenkt werden.

Für die Einzelkanalmessungen wurde bei einer angelegten Spannung von -120 mV ohne zusätzliche Spannungssprünge für 15 s mit einer Frequenz von 10 kHz der Stromfluss aufgezeichnet und grafisch (pA/s) dargestellt (Abb. 3.6). Nachträglich wurde mit Hilfe der TIDA-0.5-Software die Aufzeichnung bei 3 kHz mit einem lowpass Besselfilter digital überarbeitet. Aus den Black-Lipid-Bilayer-Messungen wissen wir, dass Substanz **1** sehr lange Offenzeiten hat, weswegen hier mit einem so niedrigfrequenten Filter gemessen werden konnte. Die dadurch erreichte Auflösung erlaubte die Darstellung von Ereignissen in einer Größe bis zu 0,2 pA.



**Abb. 3.6** Schematische Darstellung einer Einzelkanalmessung mit einer Kanalöffnung

#### 3.2.6 Auswertung und Analyse

Die Stärke der gemessenen Stromantwort einer Zelle ist proportional zur ihrer Größe. Daher wurden zur Normierung der gemessenen Ströme auf die Zellgröße Stromdichten anstelle von Leitfähigkeiten herangezogen. Die Stromdichte wurde aus dem Quotienten des gemessenen Gesamtstroms und der Zellkapazität, die direkt proportional zur Zellgröße ist, berechnet ( $\text{pApF}^{-1}$ ). Zur genaueren Beurteilung wurden die Stromdichten von Auswärts- (I-aus) und Einwärtsströmen (I-ein) verglichen. Die Vorzeichen für die Stromrichtungen ergeben sich aus dem Aufbau des Messverstärkers: Ströme mit positiven Vorzeichen sind Kationenströme vom Elektrodendraht weg, das heißt in der Whole-Cell-Konfiguration aus der Zelle heraus.

Die Auswärtsstromdichte wurde aus der Stromantwort bei maximaler Depolarisation (+60 mV) und die Einwärtsstromdichte anhand der Stromstärke bei maximaler Hyperpolarisation (-140 mV) errechnet. Als Gesamtstromdichte (I-gesamt) wurde die Summe beider Werte betrachtet.

Zur Darstellung einer möglichen Spannungsabhängigkeit der Leitfähigkeit der Substanzen wurden die Einwärtsströme ins Verhältnis zu den Auswärtsströmen nach Substanzgabe gesetzt (I-ein/I-aus) und mit den DMSO-Kontrollen verglichen.

Zur Überprüfung der statistischen Signifikanz wurde der ungepaarte t-Test verwendet. Dabei wurden Stromdichtedifferenzen, die aus Experimenten mit in DMSO gelöster Substanz gewonnen wurden, Stromdichtedifferenzen aus Kontrolleexperimenten nur mit DMSO gegenüber gestellt. Die Differenz ergab sich aus der Subtraktion der Stromdichten vor und nach Applikation der Substanz bzw. DMSO. Je Experimentserie lag die Gesamtzahl (n) der untersuchten Zellen zwischen 6 und 9. Alle Ergebniswerte wurden, sofern nicht anders vermerkt, als Mittelwert mit Standardfehler (SEM) angegeben. Die geprüften Größen wurden als signifikant angesehen, wenn das Ergebnis des t-Tests (P-Wert) kleiner als 0.05 war. Abhängig vom P-Wert wurden drei Signifikanzlevel definiert: \* für  $p < 0.05$ , \*\* für  $p < 0.01$  sowie \*\*\* für  $p < 0.001$ .

Die Einzelkanalaufzeichnungen wurden mit der TIDA-Software digital bei einer Frequenz von 3 kHz mit einem lowpass Besselfilter überarbeitet. Aus den gefilterten Aufzeichnungen wurden Amplitudenhistogramme erstellt.

## 3.3 Volumenregulationsexperimente

### 3.3.1 Versuchsaufbau

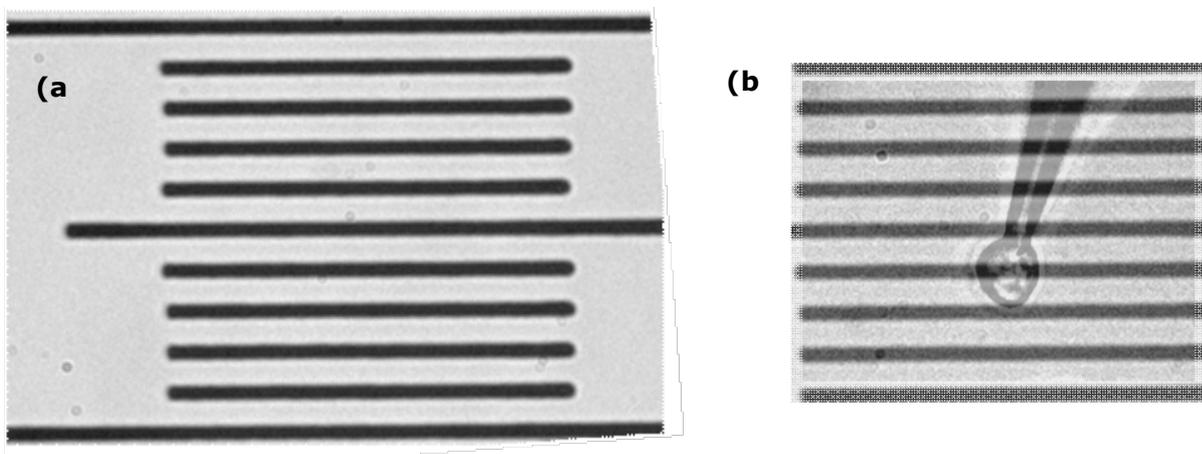
Der elektrophysiologische Teil der Volumenregulationsexperimente wurde entsprechend den oben beschriebenen Patch-Clamp-Experimenten durchgeführt. Nach dem erfolgreichen Übergang in den Whole-Cell-Modus wurde nach einer gewissen Latenzzeit ein Badwechsel über das Perfusionssystem zur hypoosmolaren Badlösung vorgenommen. Anschließend wurde erneut abgewartet. Bei stabilen Messbedingungen wurde Substanz **1** in einer Konzentration von  $10^{-6}$  mol/l dazugegeben. Besonders wichtig war bei diesen Experimenten, dass die Zellen 45 min bis 2 h nach der Behandlung mit Trypsin verwendet wurden. Der Grund dafür ist einerseits die dann noch erhaltene runde Form der Zellen, die wichtig für die genaue Auswertung der Messungen war. Andererseits besteht in diesem Zeitraum eine gewisse Resistenz gegen osmotische Änderungen der Badlösung. Bei Zellen, die eine längere Erholungsphase hatten, zeigten sich unter hypoosmolaren Bedingungen auch ohne Substanz **1** Volumenänderungen.

Die Aufnahme der Volumendaten erfolgte parallel zur Messung der Ionenströme in der Whole-Cell-Konfiguration über eine an das Mikroskop angebrachte Kamera, die in einem Abstand von 20 s und im Moment des akuten Geschehens 5 s Bilder von der gemessenen Zelle machte. Die Kontrollen wurden analog zu den Patch-Clamp-Experimenten mit DMSO ohne gelöste Substanz durchgeführt. Die aufgezeichneten Bilder wurden an den Computer weitergeleitet und von dem Programm Metaflour dargestellt und gespeichert.

## 3.3.2 Auswertung und Analyse

Zur Auswertung wurden pro Experiment drei Bilder ausgewählt. Dabei stellt das erste Bild die Zelle in physiologischer Badlösung ohne Substanz **1** bzw. DMSO dar. Das zweite Bild stellt die Zelle nach dem Badwechsel zu hypoosmolarer Lösung und das letzte nach Zugabe von **1** bzw. reinem DMSO dar. Ein in gleicher Vergrößerung aufgezeichnetes Bild von einem Objektmikrometer (2mm/200 Teile), wurde mit Hilfe der Metaflour-Software transparent über die Bilder der Zellen gelegt (Abb. 3.7). Der so bestimmte Durchmesser der runden Zellen wurde als Maß für die Volumenzunahme verwendet.

Zur Überprüfung der statistischen Signifikanz wurde der gepaarte t-Test verwendet. Dabei wurde der Zelldurchmesser vor dem Badwechsel dem Zelldurchmesser nach dem Badwechsel gegenüber gestellt sowie der Zelldurchmesser in hypoosmolarer Lösung vor gegenüber nach der Gabe von Substanz **1** bzw. reinem DMSO. Für jede Experimentserie lag die Gesamtzahl (n) der untersuchten Zellen bei 3. Die Ergebniswerte wurden, sofern nicht anders vermerkt, als Mittelwert mit Standardfehler (SEM) angegeben. Die geprüften Größen wurden als signifikant angesehen, wenn das Ergebnis des t-Tests (P-Wert) kleiner als 0.05 war. Abhängig vom P-Wert wurden drei Signifikanzlevel definiert: \* für  $p < 0.05$ , \*\* für  $p < 0.01$  sowie \*\*\* für  $p < 0.001$ .



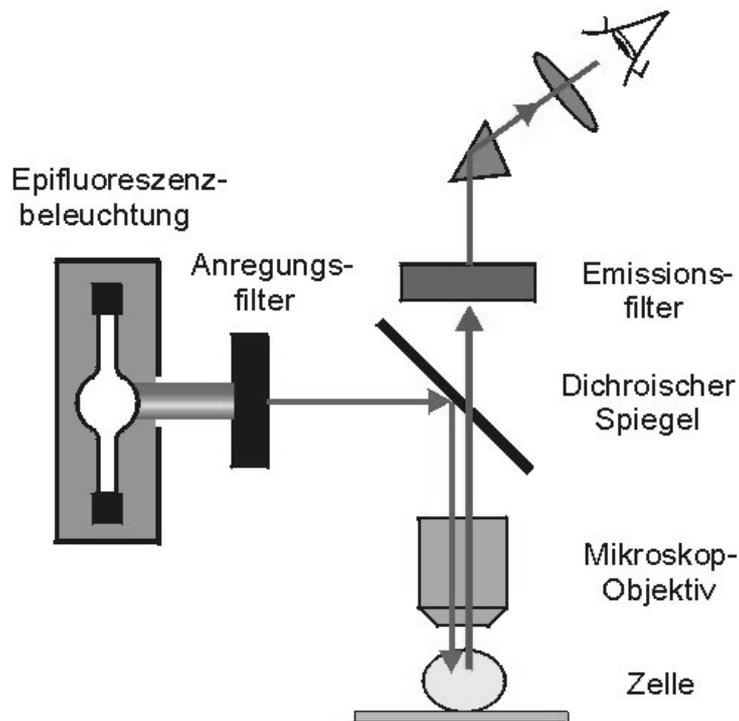
**Abb. 3.7** a) Objektmikrometer (Ausschnitt 100  $\mu\text{m}$  d.h. 10  $\mu\text{m}$  pro Teilstrich)  
b) eine CHO-Zelle im Raster des Objektmikrometers

#### 3.4 Fluoreszenzmessungen

##### 3.4.1 Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie erlaubt die selektive Darstellung der Anreicherung eines fluoreszierenden Stoffes in dem erfassten Gesichtsfeld. Der fluoreszierende Stoff wird durch Licht in einem bestimmten Wellenlängenbereich zur Emission (Fluoreszenz) angeregt. Dabei ist das Excitationsmaximum die Wellenlänge, mit der der Stoff maximal angeregt werden kann. Die Anregung führt zu Emission von Licht in einem anderen Wellenlängenbereich, dabei ist das Emissionsmaximum die Wellenlänge, die den größten Anteil an der Emission hat.

Das für die Fluoreszenzmikroskopie benötigte Licht mit dem gesamten sichtbaren Lichtspektrum sowie Licht im ultravioletten Bereich wird von der Quecksilberdampfampe emittiert. Das ausgestrahlte Licht kann dann über einen vorgesetzten Anregungsfilter auf die gewünschte frei wählbare Wellenlänge reduziert werden, die dem Excitationsmaximum des Fluoreszenzstoffes entsprechen sollte. Das gefilterte Licht wird in seinem weiteren Verlauf von einem dichroitischen Spiegel reflektiert und auf den Objektträger umgeleitet (Abb. 3.8). Der dichroische Spiegel besitzt die Eigenschaft, Licht unterhalb einer bestimmten Wellenlänge zu reflektieren, oberhalb dieser Wellenlänge jedoch durchlässig zu sein. Somit kann das von dem Fluoreszenzstoff emittierte Licht, wenn es oberhalb der Reflexionsgrenze liegt, den Spiegel passieren und Richtung Objektiv weiter laufen. Um das in das Objektiv einfallende Licht auf das von dem Fluoreszenzstoff ausgehende Licht zu reduzieren, wird erneut ein Filter für die Wellenlänge des Emissionsmaximums des Stoffes vorgesetzt. Das entstehende Bild kann mit einer Kamera erfasst und dann mit geeigneter Software qualitativ und quantitativ ausgewertet werden (vgl. Reymann et al., 2008).



**Abb. 3.8** Schematische Darstellung der Fluoreszenzmikroskopie (angepasst aus Frings, 2000)

### 3.4.2 Versuchsaufbau der Fluoreszenzmessungen

Um den Einfluss von Streulicht zu minimieren, wurden alle Versuche in einem abgedunkelten Raum durchgeführt. Die Emissions- und Excitationsfilter wurden so gewählt, dass die isolierten Wellenlängen sich so weit wie möglich im Bereich der Maxima befanden. Dabei wurde für die Anregung ein 480nm-Filter benutzt, der trotz der leichten Abweichung vom Excitationsmaximum (524 nm) immer noch zu einer ausreichenden Anregung führte. Für das emittierte Licht wurde ein 535nm-Filter benutzt bei einem Emissionsmaximum von 557 nm.

Die Zellen wurden mit physiologischer Badlösung perfundiert. Es wurde ein Gesichtsfeld gewählt, in dem sich mehrere der Form nach gesunde Zellen befanden. Eine der Zellen wurde nach der Methode der Patch-Clamp-Technik elektrophysiologisch abgeleitet. Dabei wurde der Pipettenlösung zusätzlich die Substanz **3** in einer Konzentration von  $10^{-6}$  mol/l beigegeben. Bei stabilen elektrophysiologischen Daten wurde Substanz **3** in DMSO gelöst über die Badkammerwand in einer Konzentration von  $10^{-6}$  mol/l dazugegeben. Die Aufnahme der Fluoreszenzdaten erfolgte über eine am Mikroskop angebrachte Kamera, die in einem Abstand von 20 s und im Moment des akuten Geschehens alle 5 s Bilder von dem gewählten Areal machte.

#### 3.4.3 Auswertung und Analyse

Die Bilder wurden mit der Software Metaflour von Universal Imaging aufgezeichnet und bearbeitet. Dabei wurden in dem ausgewählten Areal drei Flächen markiert, deren Emissionsstärke gegen die Zeit aufgezeichnet wurde. Eines der ausgewerteten Felder umfasste die Umrisslinie der Zellmembran einer freiliegenden Zelle und bildete das Maß für den Einbau von Substanz **3** bei einseitiger Anwendung von außen. Das zweite Feld umfasste die Umrisslinie der sich im Whole-cell-Modus befindenden Zelle und bildete das Maß für den Einbau von Substanz **3** bei doppelseitiger Anwendung. Für das dritte Feld wurde ein Bereich gewählt, in dem sich keine Zellen befanden, dieser galt als Kontrollfeld des Experimentes. Aus den erfassten Daten konnten drei Kurven erstellt werden, die bei einer Gegenüberstellung in einem gemeinsamen Diagramm eine Aussage über die Anreicherung von Substanz **3** in den Zellmembranen erlaubte.

### 4 Ergebnisse

Bei der Auswertung wurden nur Aufzeichnungen berücksichtigt, bei denen über die gesamte Dauer der Messung der Giga-Seal stabil blieb. Der Zugang zur Zelle in der Whole-Cell-Konfiguration konnte für eine maximale Dauer von ca. 40 min aufrechterhalten werden. Bei längerer Messdauer ist der hochohmige Zell-Pipettenwiderstand aufgebrochen mit der Folge, dass die weiteren Aufzeichnungen von Leckströmen überlagert wurden. Mit zunehmender Messdauer nahm auch die Anzahl der stabil gebliebenen Zellzugänge ab, was sich limitierend auf die Gesamtzahl der in die Auswertung eingeschlossenen Aufzeichnungen auswirkte.

Vor Applikation der Substanz wurden grundsätzlich Leeraufnahmen ohne Substanz aufgezeichnet und bei der späteren Auswertung zur Berechnung der Stromdichtezunahme herangezogen. Diese bildet in der vorliegenden Arbeit die wesentliche Größe zur Quantifizierung der elektrophysiologischen Wirkung der getesteten Substanzen.

Die mittlere Membrankapazität der untersuchten Zellen lag bei  $13,15 \pm 3,6$  pF ( $n=47$ ), der mittlere Zugangswiderstand bei  $8,4$  M $\Omega$ . Beide Widerstände wurden gegebenenfalls für Werte kleiner  $10$  M $\Omega$  von dem Patch-Clamp-Verstärker mit 60% kompensiert.

#### 4.1 Kontrollmessungen mit DMSO

Für die Kontrollmessungen wurde das Lösungsmittel Dimethyl-Sulfoxid (DMSO) in seiner maximalen Endkonzentration von  $10^{-3}$  mol/l verwendet. Die DMSO-Konzentration wurde entsprechend der Endkonzentration von DMSO bei Experimenten mit in DMSO gelösten Substanzen gewählt. Ziel der Experimente war eine mögliche Reaktion der Zellen auf das Lösungsmittel zu untersuchen und eine Kontrollgruppe zur Auswertung der Experimente mit porenbildenden Substanzen aufzustellen.

Im Weiteren werden die Ergebnisse der Kontrollmessungen in den unterschiedlichen Lösungen (siehe 2.5.1) vorgestellt.

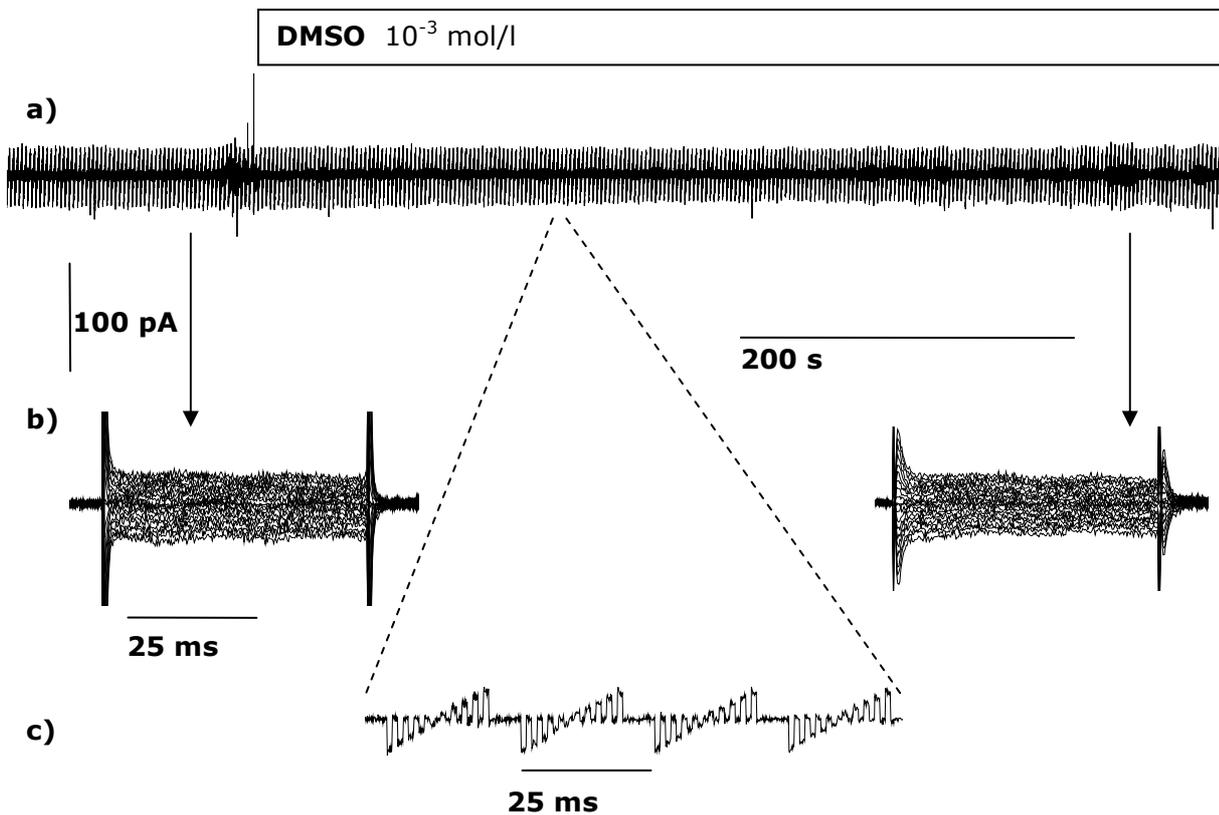
### 4.1.1 Kontrollmessungen in Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-Bad- und mit K<sup>+</sup>-Pipettenlösung

Die unter Verwendung der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-Bad- und K<sup>+</sup>-Pipettenlösung herrschenden Bedingungen entsprechen weitestgehend den physiologischen Bedingungen und erlauben so eine Abschätzung des Normalzustandes der Zellen. Abbildung 4.1 zeigt eine der in die Auswertung einbezogenen Messungen sowie Abbildung 4.2 die Strom-Spannungs-Kennlinien erstellt aus den in 4.1 abgebildeten r50-Protokollen.

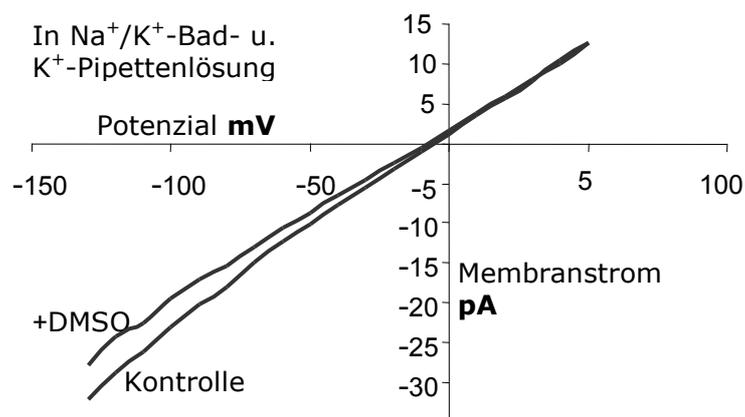
Bezogen auf die Spannungssprünge des r50-Protokolls wurde ein mittlerer Gesamtstrom von  $47,8 \pm 19,1$  pA (n=9) mit anteiligem Einwärtsstrom von  $-24,8 \pm 8,2$  pA (n=9) und Auswärtsstrom von  $22,4 \pm 9,9$  pA (n=9) gemessen (Abb. 4.3).

In der Gruppe der DMSO-Kontrollen in Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-Bad- und K<sup>+</sup>-Pipettenlösung zeigten die Zellen eine mittlere Membrankapazität von  $10,56 \pm 2,67$  pF (n=9). Daraus ergibt sich eine mittlere Stromdichte von  $4,66 \pm 1,74$  pApF<sup>-1</sup> (n=9) mit einer anteiligen Einwärtsstromdichte von  $-2,48 \pm 1,04$  pApF<sup>-1</sup> (n=9) und Auswärtsstromdichte von  $2,23 \pm 1,08$  pApF<sup>-1</sup> (n=9) für die Messungen vor der DMSO-Gabe. Die mittlere Gesamtstromdichte nach der DMSO-Gabe betrug  $4,64 \pm 1,66$  pApF<sup>-1</sup> (n=9) mit anteiliger Einwärtsstromdichte von  $2,08 \pm 0,88$  pApF<sup>-1</sup> (n=9) und einer Auswärtsstromdichte von  $-2,56 \pm 0,83$  pApF<sup>-1</sup> (n=9). Die Stromdichten vor und nach DMSO-Gabe ergaben keinen signifikanten Unterschied (Abb. 4.3).

#### 4. Ergebnisse

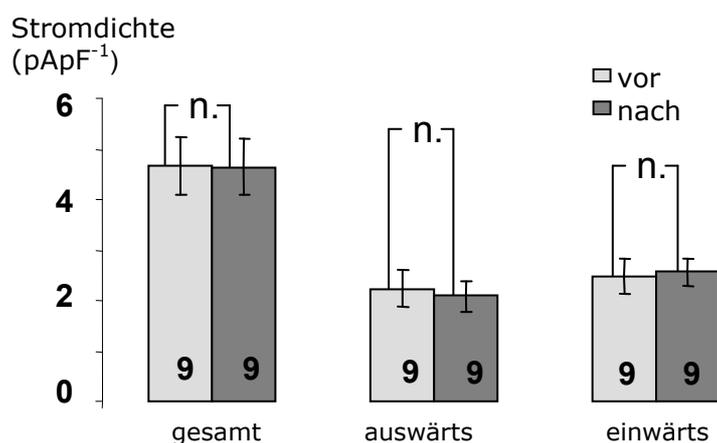


**Abb. 4.1** Elektrische Ableitung einer CHO-Zelle im Whole-Cell-Modus in  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Badlösung und  $\text{K}^+$ -Pipettenlösung in Gegenwart von DMSO  $10^{-3}$  mol/l; a) REV-Verlaufsprotokoll, b) r50-Pulsprotokoll vor der DMSO-Gabe (links) und nach der DMSO-Gabe (rechts), c) vergrößerter Ausschnitt aus dem Rev-Verlaufsprotokoll



**Abb. 4.2** Strom-Spannungs-Kennlinien erstellt aus den in Abb. 4.2 b) dargestellten r50-Protokollen

#### 4. Ergebnisse



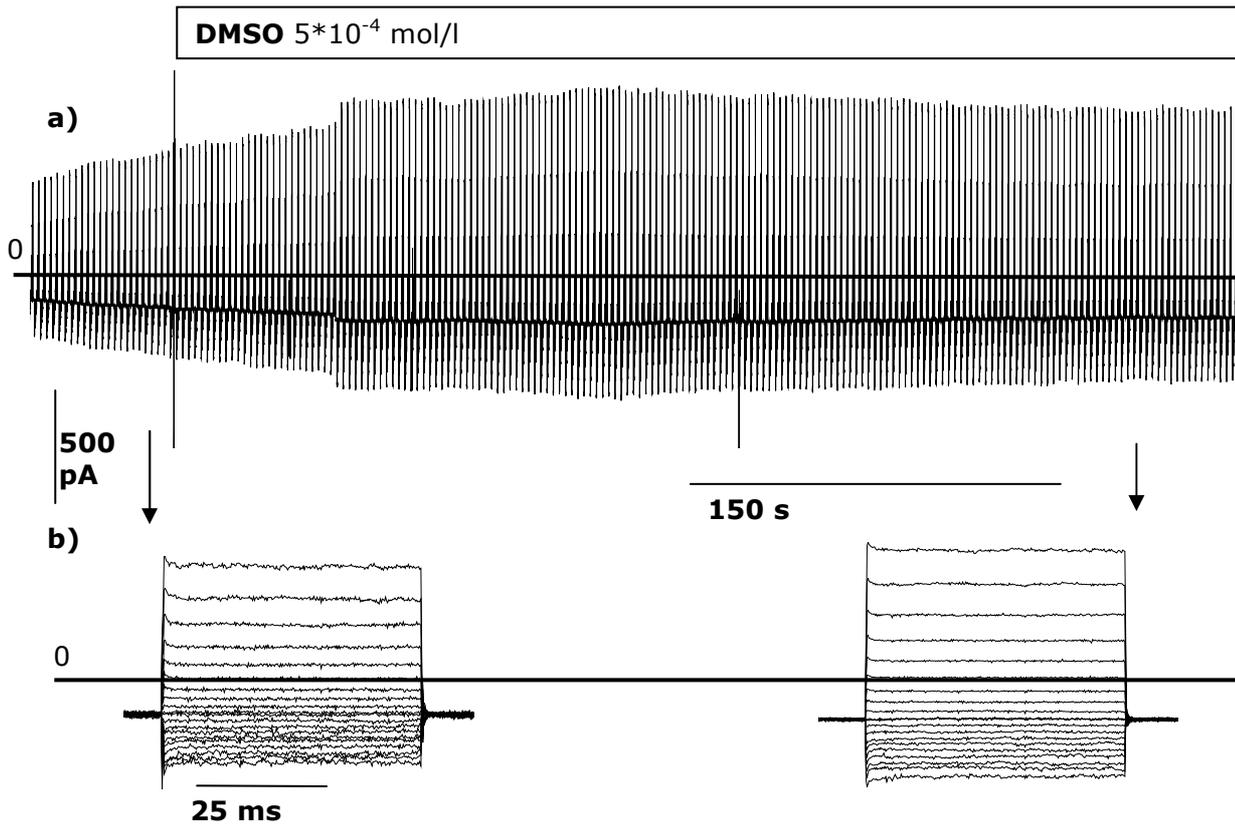
**Abb. 4.3** Gegenüberstellung der erfassten Stromdichten nach und vor der DMSO-Gabe in Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-Badlösung und K<sup>+</sup>-Pipettenlösung; mit Angabe des Fehlerindex als mittlere Standardabweichung und der Signifikanz mit n. p > 0,05 / \* p < 0,05 / \*\* p < 0,01; Zahl im Balken = n

#### 4.1.2 Kontrollmessungen in Cs<sup>+</sup>-Bad- und mit Cs<sup>+</sup>-Pipettenlösung

In den Experimenten mit Cs<sup>+</sup>-Bad- und Cs<sup>+</sup>-Pipettenlösung wurden die einwertigen Kationen nahezu komplett durch Cs<sup>+</sup> ersetzt. Das Einströmen der Cs<sup>+</sup>-Pipettenlösung in das Zytosol der Zellen löste einen spontanen Anstieg des Gesamtstromes aus mit einer überwiegenden Auswärtskomponente. Der gemessene Strom überschritt die unter physiologischen Bedingungen beobachteten Ströme um bis zu das 50-fache. Die Applikation von DMSO in der Konzentration von 10<sup>-3</sup> mol/l hatte keinen sichtbaren Einfluss auf den durch Cs<sup>+</sup> provozierten Stromanstieg. Abbildung 4.4 zeigt eine der in die Auswertung einbezogenen Messungen sowie Abbildung 4.5 die Strom-Spannungs-Kennlinien erstellt aus den in 4.4 abgebildeten r50-Protokollen.

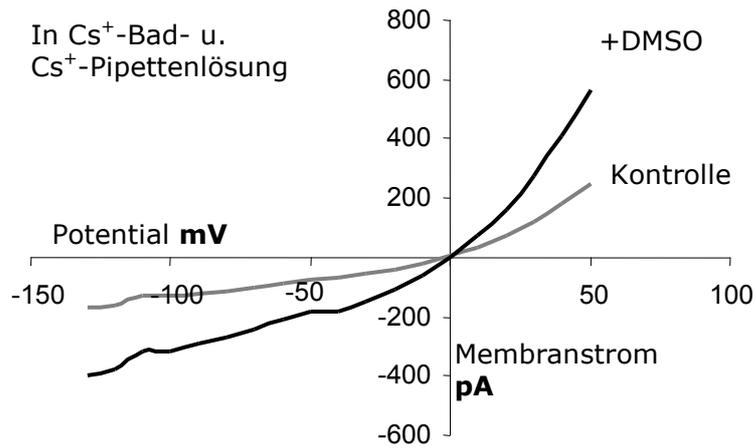
Aus den Spannungssprüngen des r50-Protokolls abgeleitet wurde nach wenigen Minuten der intrazellulären Cs<sup>+</sup>-Applikation ein mittlerer Gesamtstrom von 562,0 ± 398,6 pA (n=6) mit anteiligem Einwärtsstrom von -151,0 ± 95,7 pA (n=6) und Auswärtsstrom von 409,3 ± 305,0 pA (n=6) gemessen. Die mittlere Membrankapazität dieser Zellen lag bei 13,83 ± 2,79 pF (n=6). Die errechnete mittlere Gesamtstromdichte betrug 40,3 ± 29,9 pApF<sup>-1</sup> (n=6) mit einer anteiligen Einwärtsstromdichte von -10,8 ± 7,1 pApF<sup>-1</sup> (n=6) und Auswärtsstromdichte von 29,5 ± 22,9 pApF<sup>-1</sup> (n=6). Der Anteil des Auswärtsstromes am Gesamtstrom beträgt ca. zwei Drittel (Abb. 4.6).

#### 4. Ergebnisse

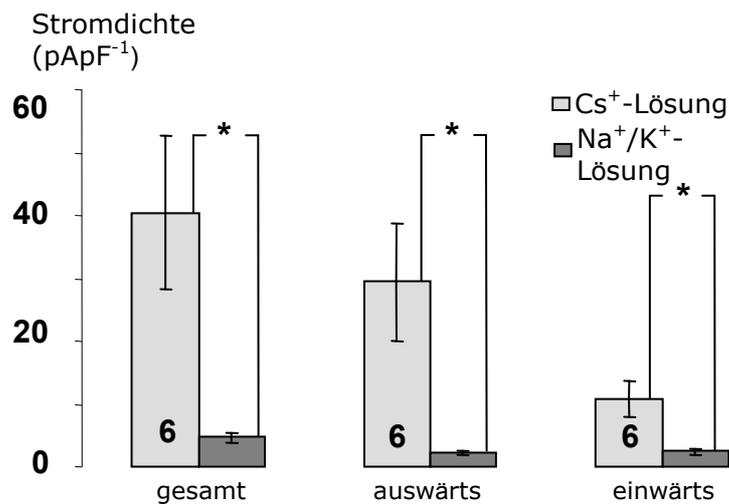


**Abb. 4.4** Elektrische Ableitung einer CHO-Zelle im Whole-Cell-Modus in  $\text{Cs}^+$ -Lösung intra- und extrazellulär und mit Applikation von 1. DMSO  $5 \cdot 10^{-4}$  mol/l,  
a) REV-Verlaufsprotokoll der gesamten Messung  
b) r50-Pulsprotokolle vor DMSO-Gabe (links), nach DMSO-Gabe (rechts)

#### 4. Ergebnisse



**Abb. 4.5** Strom-Spannungs-Kennlinien erstellt aus den in Abb. 4.4 b) dargestellten r50-Protokollen

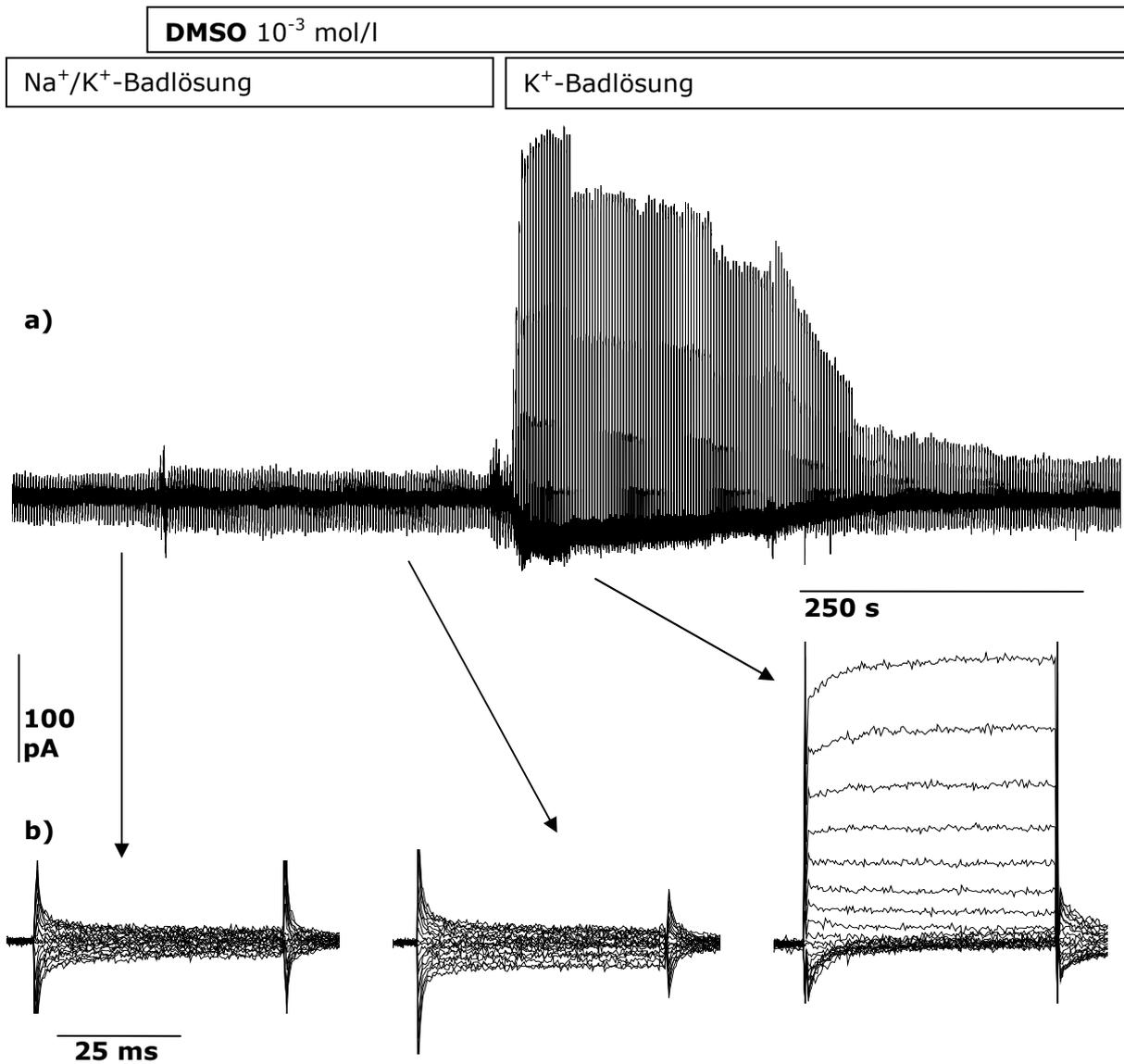


**Abb. 4.6** Gegenüberstellung der ermittelten Stromdichten in  $\text{Cs}^+$ -Lösung und die in  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Lösung ermittelten Stromdichten  $n=9$  (vgl. 4.1.1); mit Angabe des Fehlerindex als mittlere Standardabweichung und der Signifikanz mit  $n$ .  $p > 0,05$  / \*  $p < 0,05$  / \*\*  $p < 0,01$ ; Zahl im Balken =  $n$

### 4.1.3 Kontrollmessungen in Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-Bad- und mit K<sup>+</sup>-Pipettenlösung und anschließendem Wechsel zur K<sup>+</sup>-Badlösung

In den Experimenten mit Badwechsel von Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-Lösung zu K<sup>+</sup>-Lösung kam es beim Ersatz des extrazellulären Na<sup>+</sup> durch K<sup>+</sup> zu einem Anstieg des Gesamtstroms mit einer mehrfachen Auswärtsstromzunahme. Auch bei diesen Kontrollmessungen wurde DMSO in der üblichen Konzentration von 10<sup>-3</sup> mol/l hinzugegeben, um eine mögliche Wirkung des Lösungsmittels auf das elektrophysiologische Verhalten der Zellen zu untersuchen. Abbildung 4.7 zeigt eine der in die Auswertung einbezogenen Messungen sowie Abbildung 4.8 die Strom-Spannungs-Kennlinien erstellt aus den in 4.7 abgebildeten r50-Protokollen.

Der Gesamtstrom nach der extrazellulären K<sup>+</sup>-Exposition stieg auf einen mittleren Wert von 244,3 ± 58,5 pA (n=3) mit anteiligem Einwärtsstrom von -14,3 ± 8,9 pA (n=3) und Auswärtsstrom von 285,7 ± 41,3 pA (n=3). Die mittlere Membrankapazität der drei in die Auswertung einbezogenen Zellen lag bei 11,00 ± 2,65 pF (n=3). Die errechnete mittlere Gesamtstromdichte betrug 22,47 ± 4,31 pApF<sup>-1</sup> (n=3) mit einer anteiligen Einwärtsstromdichte von -1,18 ± 0,64 pApF<sup>-1</sup> (n=3) und Auswärtsstromdichte von 21,29 ± 3,98 pApF<sup>-1</sup> (Abb. 4.9).

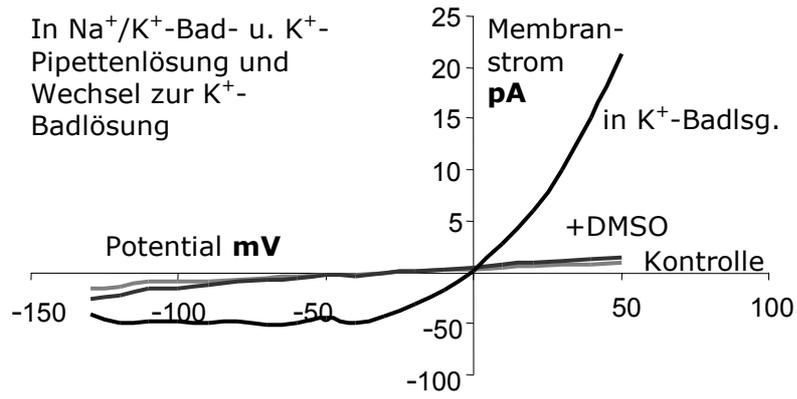


**Abb. 4.7** Elektrische Ableitung einer CHO-Zelle im Whole-Cell-Modus in Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-Badlösung mit Applikation von DMSO  $10^{-3}$  mol/l und anschließendem Badwechsel zur K<sup>+</sup>-Lösung

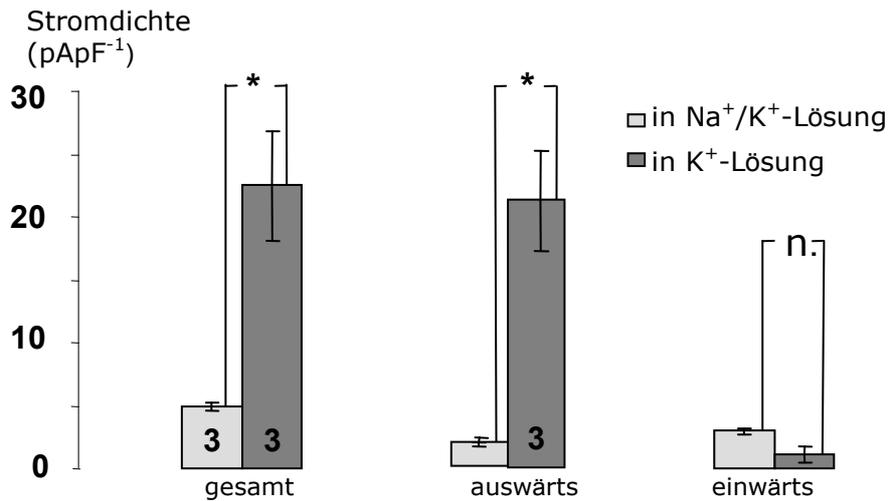
a) REV-Verlaufsprotokoll der gesamten Messung

b) r50-Pulsprotokolle vor DMSO-Gabe (links), nach DMSO-Gabe (mitte) und nach dem Badwechsel zur K<sup>+</sup>-Lösung (rechts)

4. Ergebnisse



**Abb. 4.8** Strom-Spannungs-Kennlinien erstellt aus den in Abb. 4.7 b) dargestellten r50-Protokollen

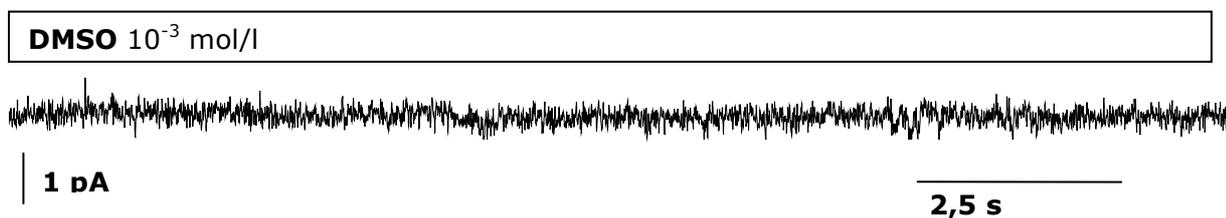


**Abb. 4.9** Gegenüberstellung der ermittelten Stromdichten in Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-Badlösung und nach dem Badwechsel zur K<sup>+</sup>-Lösung; mit Angabe des Fehlerindex als mittlere Standardabweichung und der Signifikanz mit n. p > 0,05 / \* p < 0,05 / \*\* p < 0,01; Zahl im Balken = n

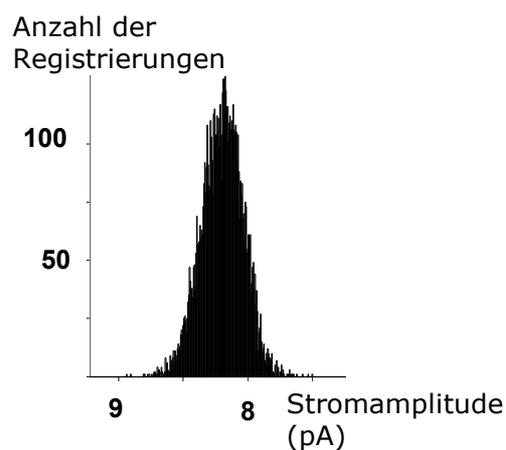
## 4.1.4 Kontrollmessungen in der Inside-Out-Patch-Konfiguration

Die Einzelkanalaufnahmen in Gegenwart von DMSO in einer Konzentration von  $10^{-3}$  mol/l bei einem Haltepotential von  $-120$  mV zeigten in der Inside-Out-Patch-Konfiguration keine Einzelkanalereignisse in dem Bereich von  $0,4$  pA. Vereinzelt wurden Einzelkanalereignisse endogener Kanäle aufgezeichnet, deren Amplitude lag stets oberhalb von  $0,5$  pA.

Die aus den Aufnahmen erstellten Amplitudenhistogramme zeigten eine Gauß'sche Normalverteilung um den Ampere-Wert, an dem sich die Basislinie der Aufnahme befand.



**Abb. 4.10** Ableitung in der Inside-Out-Patch-Konfiguration in  $\text{Cs}^+$ -Lösung beidseits bei einem Haltepotential von  $-120$  mV in Gegenwart von  $\text{DMSO } 10^{-3}$  mol/l; die Aufnahme wurde digital mit 3kHz und einem lowpass Besselfilter überarbeitet

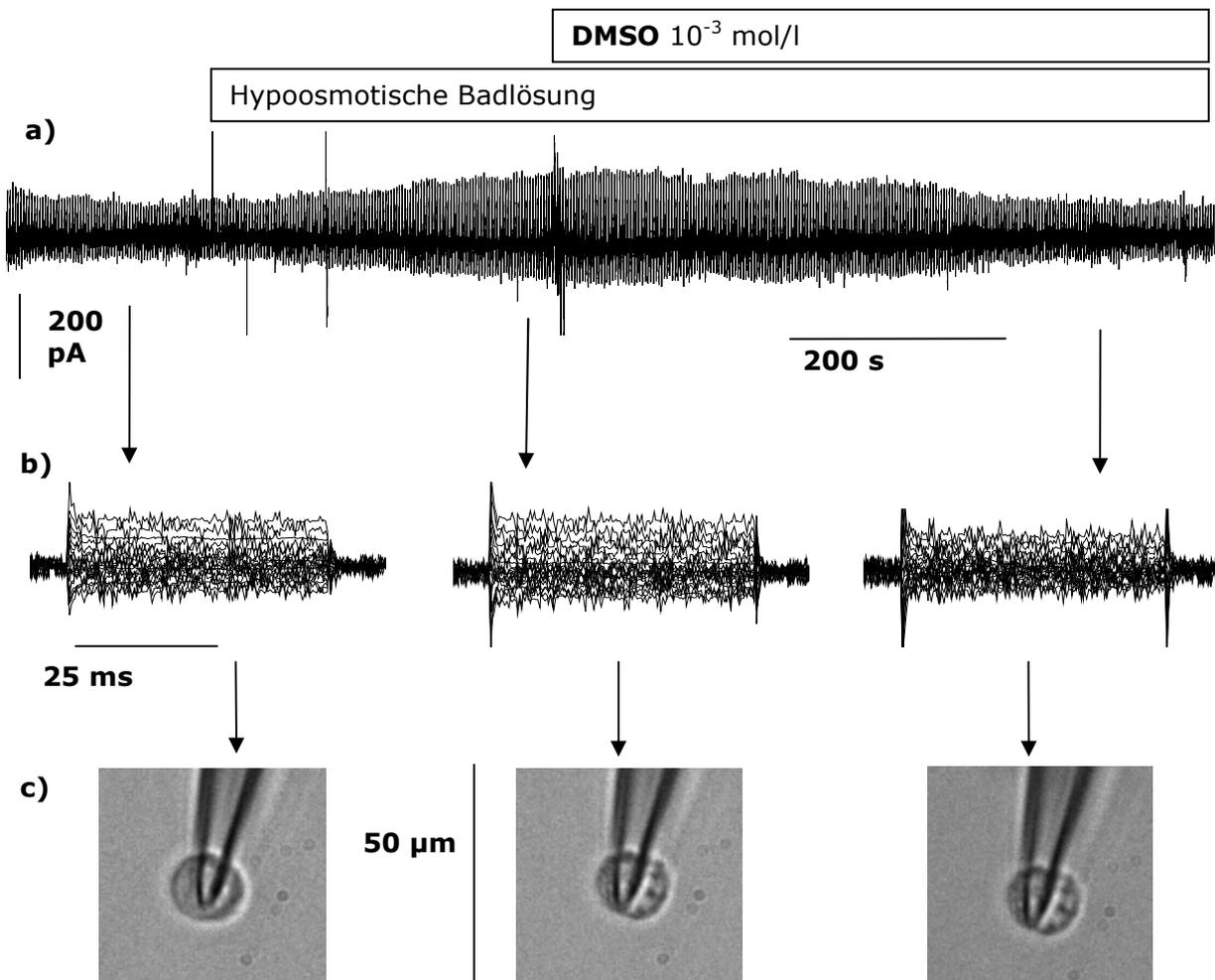


**Abb. 4.11** Amplitudenhistogramm erstellt aus der in Abb. 4.10 dargestellten Aufnahme

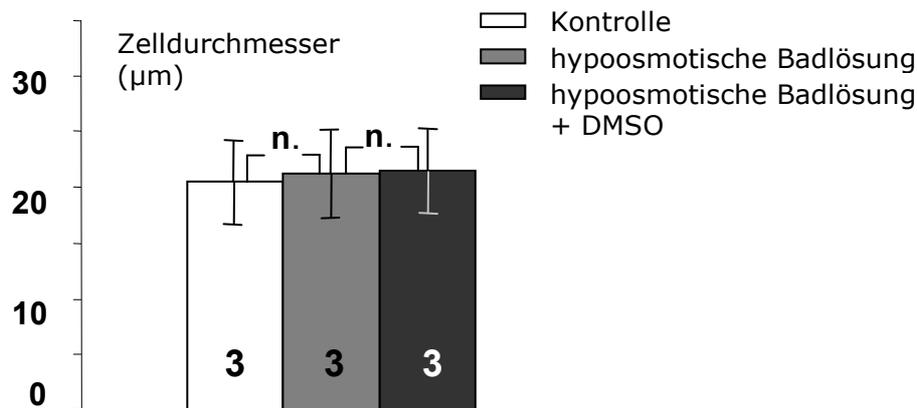
### 4.1.5 Kontrollmessungen in $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Badlösung mit Badwechsel zu hypoosmotischer Lösung

Zur Untersuchung der Reaktion der Zellen auf hypoosmotische Bedingungen wurde in den folgenden Versuchen ein Badwechsel von physiologischer Badlösung zu hypoosmolarer Lösung vorgenommen. Um eine mögliche Wirkung von DMSO auf die Volumenregulation zu untersuchen, wurde mehrere Minuten nach dem Badwechsel DMSO in einer Konzentration von  $10^{-3}$  mol/l zu der Badlösung beigegeben. Abbildung 4.12 zeigt eine der in die Auswertung einbezogenen Messungen.

Nach dem Badwechsel zu hypoosmolarer Badlösung konnte bei den untersuchten Zellen ein leichter Anstieg der Leitfähigkeit beobachtet werden. Die Applikation von DMSO führte zu keiner Änderung der Leitfähigkeit der Zellen. Die Zellgröße, erfasst als Zelldurchmesser runder Zellen, lag im Mittel bei  $20,3 \pm 7,4 \mu\text{m}$  ( $n=3$ ) und nahm nach dem Badwechsel geringfügig, auf einen mittleren Wert von  $21,3 \pm 6,9 \mu\text{m}$  ( $n=3$ ) zu. Die Zugabe von DMSO hatte auf die Größe der Zellen ebenfalls keine Wirkung. Der ermittelte mittlere Zelldurchmesser nach DMSO-Gabe lag bei  $21,6 \pm 6,8 \mu\text{m}$  ( $n=3$ ) (Abb. 4.13).



**Abb. 4.12** Aufzeichnung einer Messung in  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Badlösung mit Badwechsel zur hypoosmotischer Badlösung und anschließender Applikation von  $\text{DMSO } 10^{-3}$  mol/l  
a) REV-Verlaufsprotokoll der gesamten Messung,  
b) r50-Pulsprotokolle in  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ - Badlösung (links), in hypoosmotischer Badlösung (mitte) und nach DMSO-Gabe (rechts)  
c) Bilder aufgenommen nach Änderung der Versuchsbedingungen, in  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Badlösung (links), in hypoosmotischer Badlösung (mitte) und nach DMSO-Gabe (rechts)

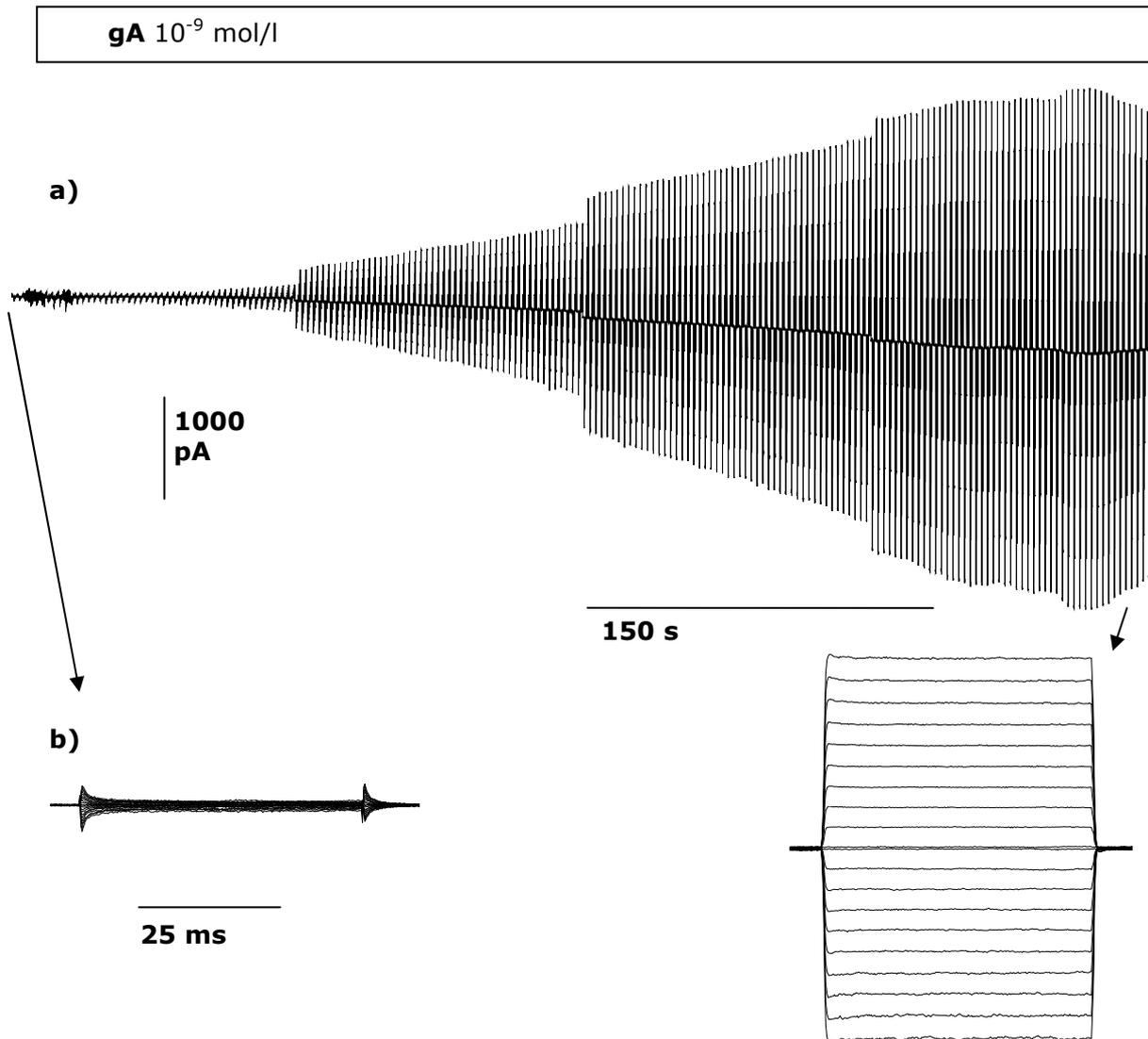


**Abb. 4.13** Zelldurchmesser unter sich ändernden Bedingungen des Experimentes; in  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Lösung, nach dem Badwechsel zur hypoosmotischen Badlösung und nach Zugabe von DMSO; mit Angabe des Fehlerindex als mittlere Standardabweichung und der Signifikanz mit n.  $p > 0,05$  / \*  $p < 0,05$  / \*\*  $p < 0,01$ ; Zahl im Balken = n

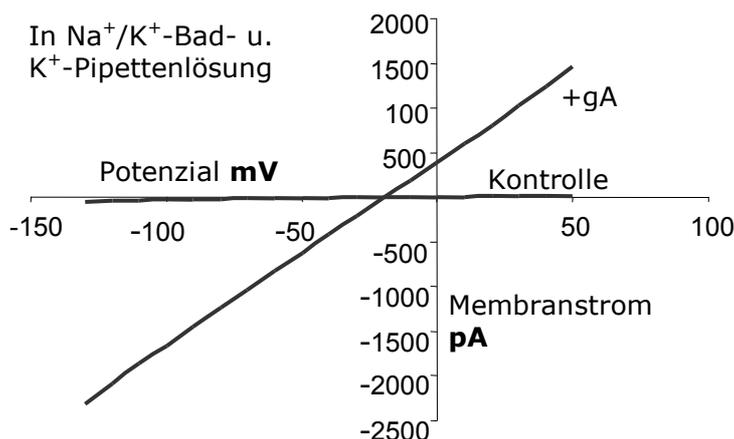
#### 4.2 Wirkung von Gramicidin A

In dem Experiment mit der Leitsubstanz Gramicidin A wurde deren Effekt auf die Leitfähigkeit der Zellmembran untersucht. Dabei wurde wenige Minuten nach dem Übergang in die Whole-Cell-Konfiguration Gramicidin A in einer Konzentration von  $10^{-9}$  mol/l zur Badlösung dazugegeben. Abbildung 4.14 zeigt die Messung und Abbildung 4.15 die Strom-Spannungs-Kennlinien erstellt aus den in 4.14 abgebildeten r50-Protokollen.

Es zeigte sich wenige Minuten nach der Gabe ein rapider Anstieg der Leitfähigkeit. Die Stromdichte stieg von  $2,3 \text{ pApF}^{-1}$  (einwärts  $-0,7 \text{ pApF}^{-1}$ ; auswärts  $1,5 \text{ pApF}^{-1}$ ) ( $n=1$ ) um über das 50-fache auf  $125,3 \text{ pApF}^{-1}$  (einwärts  $-63,3 \text{ pApF}^{-1}$ ; auswärts  $62,0 \text{ pApF}^{-1}$ ) ( $n=1$ ) an. Das Umkehrpotential der Zelle blieb vor und mehrere Minuten nach Applikation von Gramicidin A bei einem Wert von  $-20 \text{ mV}$  unverändert. Das Gramicidin A zeigte im Vergleich zu den anderen getesteten Substanzen die höchste Aktivität. Nach einer Einwirkungsdauer von ca. 10 min führte der massive Effekt von Gramicidin A zum Abriss der Zelle von der Pipette und damit auch zu ihrem Tod.



**Abb. 4.14** Elektrische Ableitung einer CHO-Zelle im Whole-Cell-Modus in  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Badlösung in Gegenwart gA  $10^{-6}$  mol/l;  
a) REV-Verlaufsprotokoll der gesamten Messung,  
b) r50-Pulsprotokolle vor gA-Gabe (links), nach gA-Gabe (rechts)



**Abb. 4.15** Strom-Spannungs-Kennlinien erstellt aus den in Abb. 4.14 b) dargestellten r50-Protokollen

### 4.3 Wirkung von Valinomycin

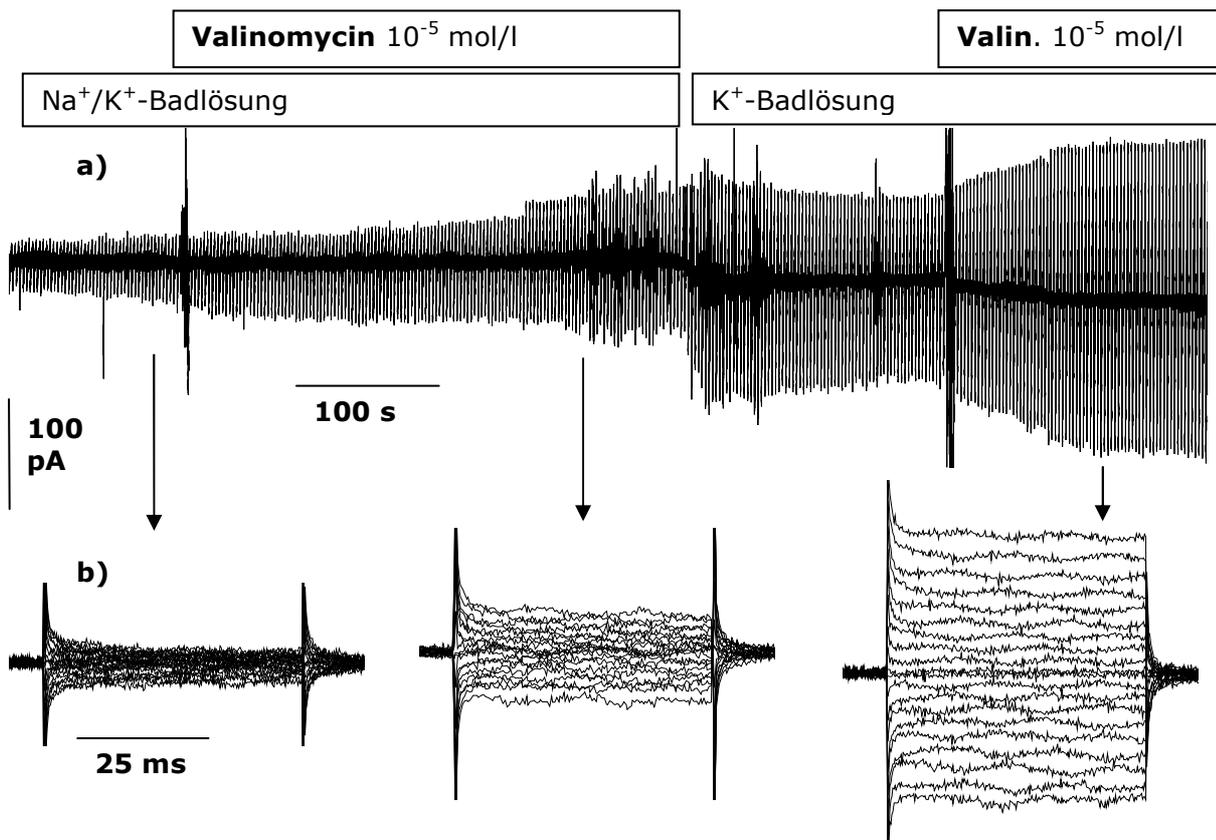
In den Experimenten mit Valinomycin wurde dessen Wirkung auf die Leitfähigkeit der Zellmembran unter physiologischen Bedingungen und unter Bedingungen mit  $K^+$  als einzigen einwertigem Kation untersucht. Da die Wirkung von Valinomycin als selektiver  $K^+$ -Transporter bereits gut bekannt ist, wurde in dieser Arbeit keine größere Messreihe zu deren Untersuchung angelegt. Die zwei Messungen, die durchgeführt wurden, sollten lediglich die Wirkung eines selektiven  $K^+$ -Transporters auf die CHO-Zellen veranschaulichen. Abbildung 4.16 zeigt eine der beiden Messungen sowie Abbildung 4.17 die Strom-Spannungs-Kennlinien erstellt aus den in 4.16 abgebildeten r50-Protokollen.

Bei beiden Messungen konnte nach Applikation von Valinomycin in einer Konzentration von  $10^{-5}$  mol/l eine Zunahme der Leitfähigkeit der Zellmembran beobachtet werden. Die Stromdichte stieg nach der Gabe von Valinomycin von  $4,7 \pm 0,22 \text{ pApF}^{-1}$  ( $n=2$ ) mit einer Einwärtsstromdichte von  $-3,0 \pm 0,39 \text{ pApF}^{-1}$  ( $n=2$ ) und Auswärtsstromdichte von  $1,7 \pm 0,17 \text{ pApF}^{-1}$  ( $n=2$ ) auf  $7,3 \pm 0,45 \text{ pApF}^{-1}$  ( $n=2$ ) mit einer Einwärtsstromdichte von  $-4,1 \pm 0,66 \text{ pApF}^{-1}$  ( $n=2$ ) und Auswärtsstromdichte von  $4,4 \pm 0,21 \text{ pApF}^{-1}$  ( $n=2$ ) an (Abb. 4.18). Somit lässt sich eine Zunahme des Auswärtsstromes auf das Doppelte des Ursprungswertes und eine Zunahme des Einwärtsstromes um den Faktor 0,25 beobachten. Der unter Valinomycin entstehende Auswärtsstrom führte zu einer Hyperpolarisation der Zellen um  $-11,5 \pm 2,12 \text{ mV}$  ( $n=2$ ).

#### 4. Ergebnisse

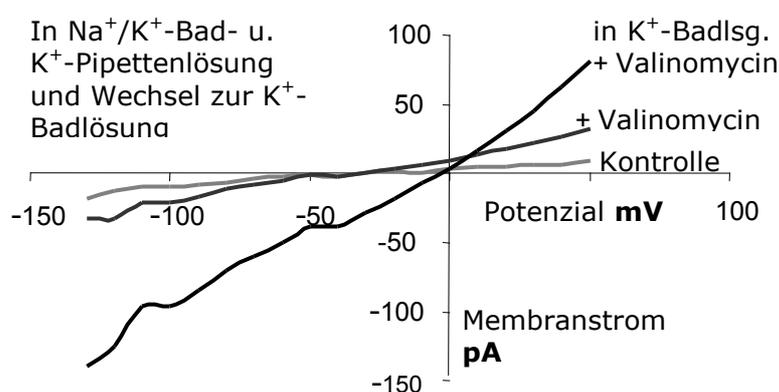
Der Badwechsel zur  $K^+$ -Lösung führte zu einem erneuten Stromanstieg mit einer Gesamtstromdichte von  $17,1 \pm 5,45 \text{ pApF}^{-1}$  ( $n=2$ ), einer Einwärtsstromdichte von  $-8,7 \pm 1,87 \text{ pApF}^{-1}$  ( $n=2$ ) und einer Auswärtsstromdichte von  $8,5 \pm 3,59 \text{ pApF}^{-1}$  ( $n=2$ ) (Abb. 4.18). Der Austausch der Kationen in der extrazellulären Lösung führte zum Verlust des Gradienten für  $K^+/Na^+$ , so dass die Hyperpolarisation aufgehoben wurde. Das Verhältnis der Einwärtsströme zu den Auswärtsströmen verhielt sich in der  $K^+$ -Badlösung ausgewogen.

Bei den Messungen mit Valinomycin konnte, anders als bei den DMSO-Kontrollversuchen, kein auswärtsrektifizierender Stromanstieg während des Badwechsels zur  $K^+$ -Lösung beobachtet werden.



**Abb. 4.16** elektrische Ableitung einer CHO-Zelle im Whole-Cell-Modus in  $Na^+/K^+$ -Badlösung und  $K^+$ -Pipettenlösung und anschließendem Badwechsel zu  $K^+$ -Badlösung in Gegenwart von Valinomycin  $10^{-5} \text{ mol/l}$   
a) REV-Verlaufsprotokoll der gesamten Messung  
b) r50-Pulsprotokolle vor Valinomycin-Gabe (links), nach Valinomycin-Gabe (mitte), nach dem Badwechsel zur  $K^+$ -Lösung (rechts)

#### 4. Ergebnisse



**Abb. 4.17** Strom-Spannungs-Kennlinien erstellt aus den in Abb. 4.16 b) dargestellten r50-Protokollen

#### 4.4 Wirkung der Substanz 1

Anhand von 4 unterschiedlichen Experimentanordnungen wurde in dieser Arbeit die Wirkung von Substanz 1 auf die Physiologie der CHO-Zellen untersucht. In den elektrophysiologischen Untersuchungen zeigten ca. 80% der unter stabilen Messbedingungen untersuchten Zellen eine Reaktion auf Substanz 1. In den folgenden Kapiteln werden die Ergebnisse der Untersuchungen vorgestellt.

##### 4.4.1 Wirkung von Substanz 1 unter physiologischen Bedingungen

In den Whole-Cell-Messungen unter physiologischen Bedingungen wurde nach einer gewissen Latenzzeit von ca. 3 min die Substanz 1 in einer Konzentration von  $10^{-6}$  mol/l zu der Badlösung beigegeben. 1-2 min nach Applikation von Substanz 1 konnte eine Zunahme des durch die Zellmembran fließenden Stromes beobachtet werden. Nach ca. 5 min erreichte der Stromanstieg seinen Höhepunkt und ging über in ein Plateau mit einem über den weiteren Verlauf konstanten Stromfluss (Abb. 4.18 und 4.20).

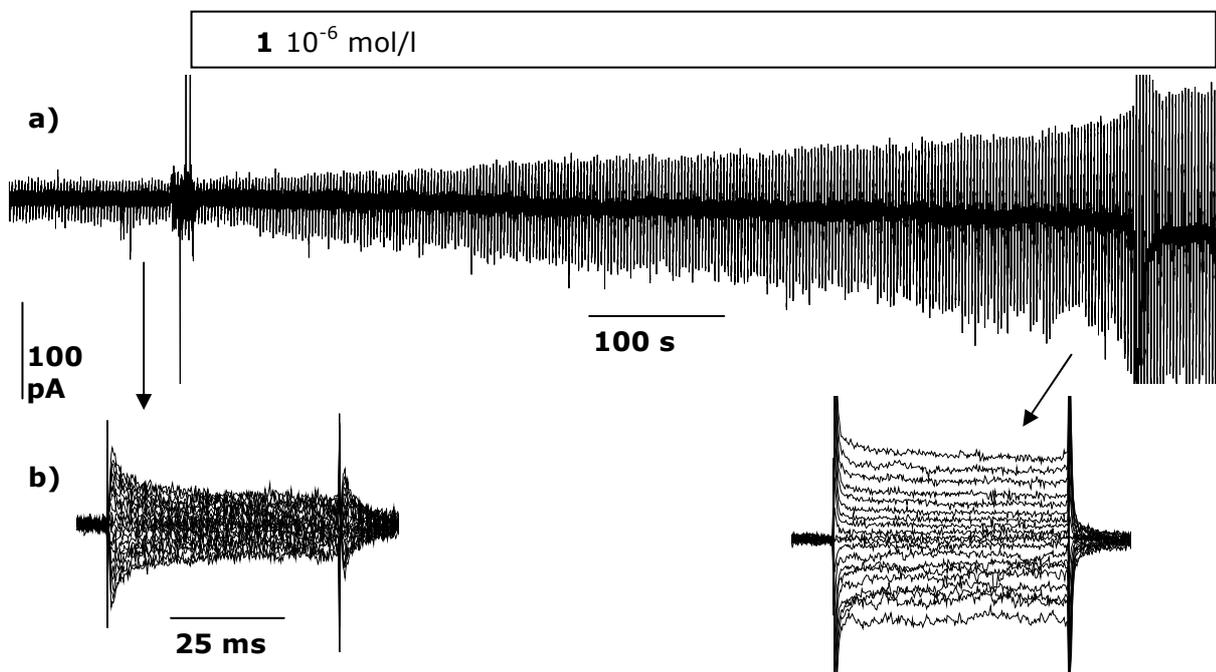
Die zu diesem Zeitpunkt aufgezeichneten r50-Pulsprotokolle wurden für die weitere Auswertung herangezogen. Die in die Auswertung einbezogenen Zellen zeigten eine mittlere Kapazität von  $13 \pm 4,3$  pF (n=9). Vor der Gabe von Substanz 1 wurde eine mittlere Stromdichte von  $2,90 \pm 1,88$  pApF<sup>-1</sup> (n=9) mit einer anteiligen Einwärtsstromdichte von  $-1,73 \pm 1,47$  pApF<sup>-1</sup> (n=9) und Auswärtsstromdichte von  $1,13 \pm 0,53$  pApF<sup>-1</sup> (n=9) ermittelt. Die mittlere Gesamtstromdichte nach der Gabe von Substanz 1 betrug  $7,624 \pm 4,83$  pApF<sup>-1</sup> (n=9) mit anteiliger Einwärtsstromdichte von

#### 4. Ergebnisse

$-3,87 \pm 2,62 \text{ pApF}^{-1}$  ( $n=9$ ) und einer Auswärtsstromdichte von  $3,63 \pm 1,99 \text{ pApF}^{-1}$  ( $n=9$ ). Daraus ergibt sich eine Zunahme der Stromdichte um den Faktor  $2,7 \pm 0,93$  ( $n=9$ ).

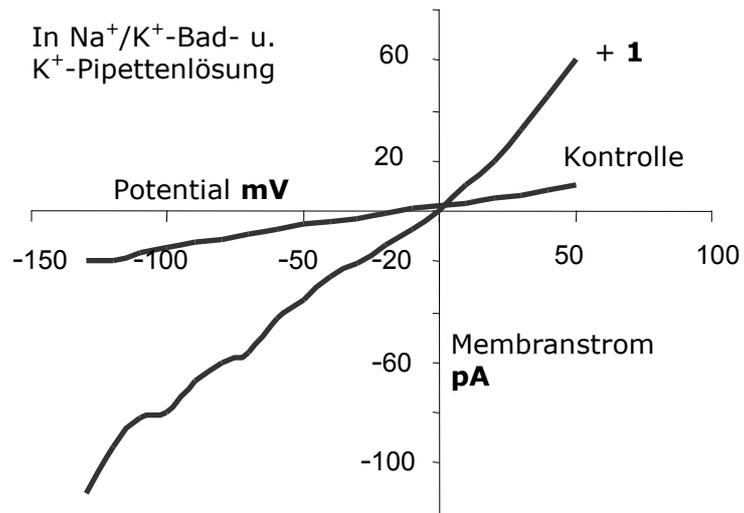
Das Verhältnis von Einwärtsstrom zum Auswärtsstrom in Gegenwart von Substanz **1** verhielt sich ausgewogen.  $I_{\text{einw.}}/I_{\text{ausw.}}$  ergab einen mittleren Wert von  $1,01 \pm 0,25$  ( $n=9$ ) (Abb. 4.22).

Die grafische Darstellung der Strom-Spannungs-Abhängigkeit zeigte einen nahezu linearen Anstieg der Kurve. In Gegenwart von Substanz **1** nahm der Steigungsgrad der Strom-Spannungs-Kennlinie zu (Abb. 4.19 und 4.21). Das Umkehrpotential, als Ausdruck der Spannung, bei der kein Strom durch die Membran floss, zeigte unter Substanz **1** keine signifikanten Änderungen. Das Umkehrpotential der Zellen lag bei  $-34 \pm 19 \text{ mV}$  ( $n=9$ ).

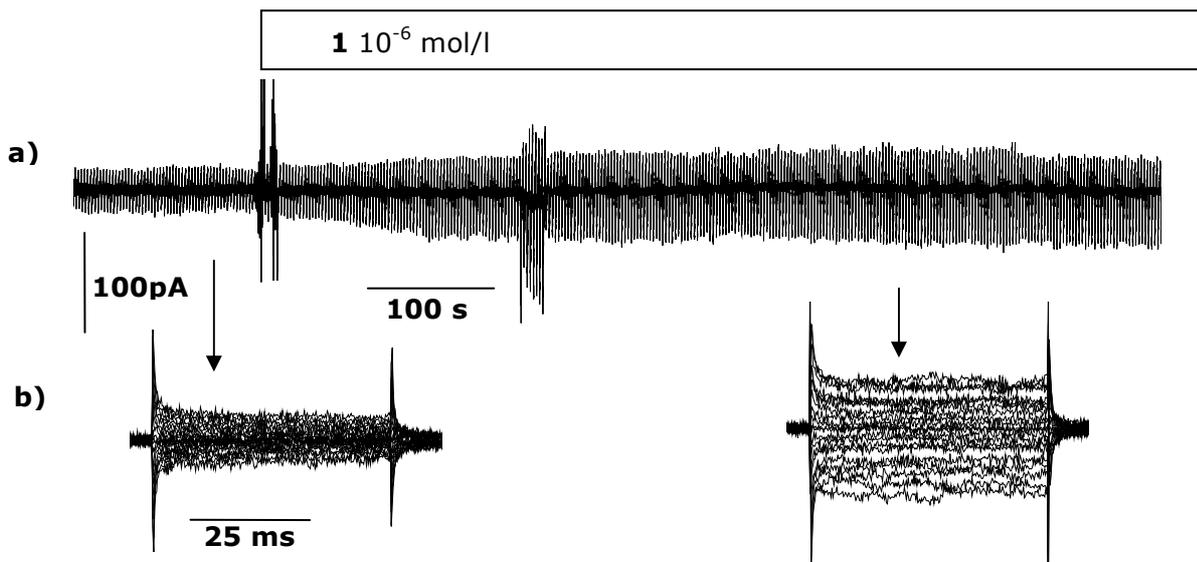


**Abb. 4.18** elektrische Ableitung einer CHO-Zelle im Whole-Cell-Modus in  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ - Badlösung und  $\text{K}^+$ -Pipettenlösung in Gegenwart von  $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol/l}$ ;  
a) REV-Verlaufsprotokoll der gesamten Messung,  
b) r50-Pulsprotokolle vor der Gabe von **1** (links), nach der Gabe von **1** (rechts)

#### 4. Ergebnisse



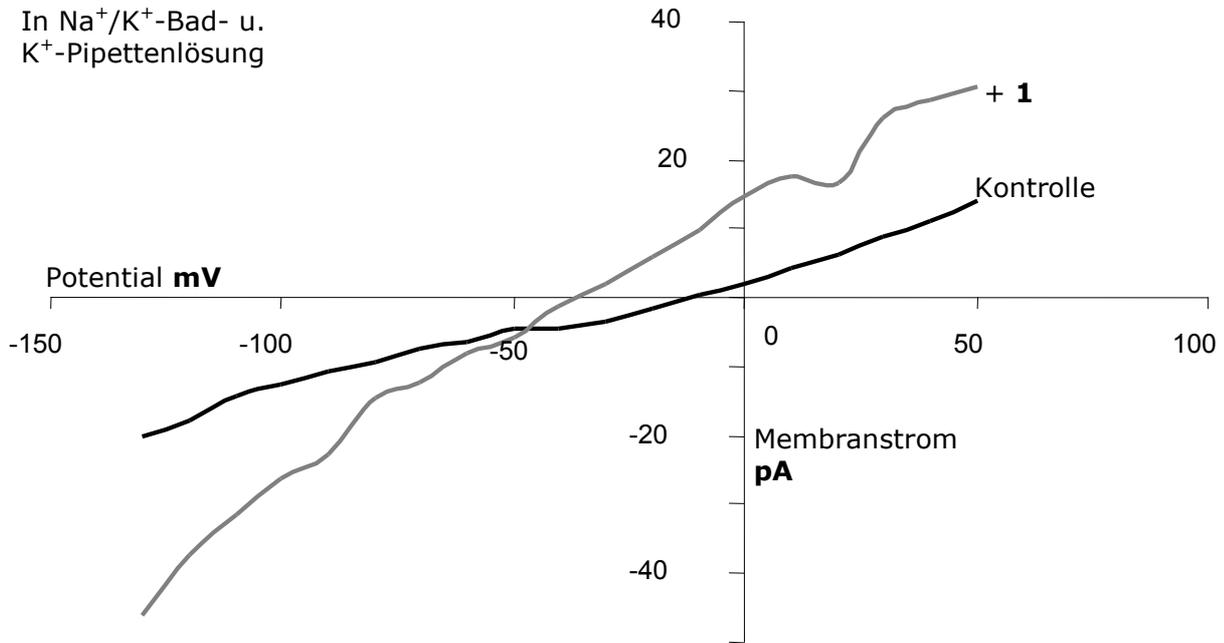
**Abb. 4.19** Strom-Spannungs-Kennlinien erstellt aus den in Abb. 4.18 b) dargestellten r50-Protokollen



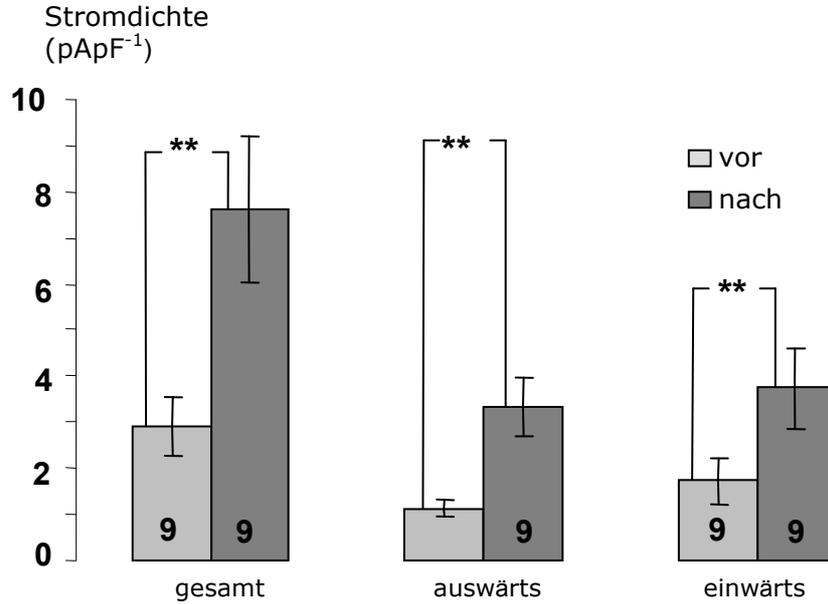
**Abb. 4.20** elektrische Ableitung einer CHO-Zelle im Whole-Cell-Modus in  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Badlösung und  $\text{K}^+$ -Pipettenlösung in Gegenwart von  $10^{-6} \text{ mol/l}$ ;  
a) REV-Verlaufsprotokoll der gesamten Messung,  
b) r50-Pulsprotokolle vor der Gabe von **1** (links), nach der Gabe von **1** (rechts)

4. Ergebnisse

In  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Bad- u.  
 $\text{K}^+$ -Pipettenlösung



**Abb. 4.21** Strom-Spannungs-Kennlinien erstellt aus den in Abb. 4.20 b) dargestellten r50-Protokollen



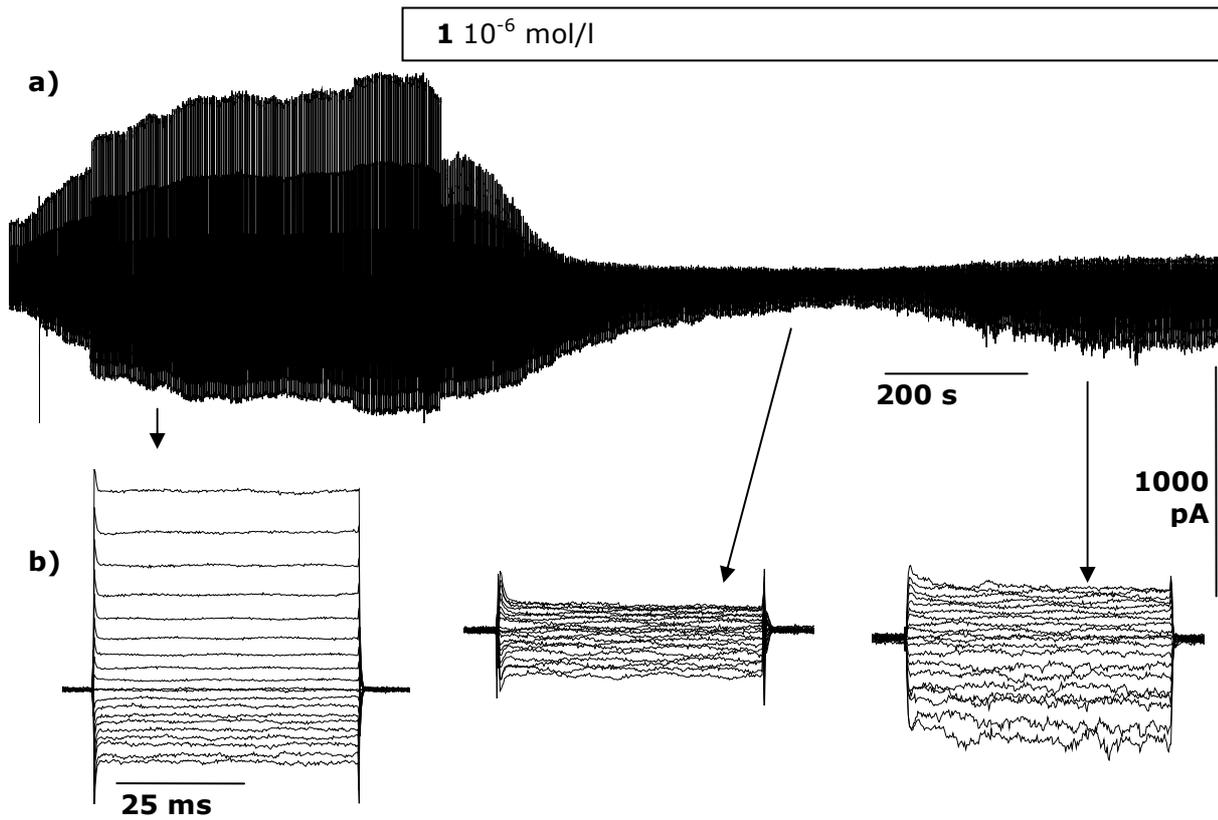
**Abb. 4.22** Gegenüberstellung der erfassten Stromdichten nach und vor der Zugabe von 1 in  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Badlösung und mit  $\text{K}^+$ -Pipettenlösung; mit Angabe des Fehlerindex als mittlere Standardabweichung und der Signifikanz mit n.  $p > 0,05$  / \*  $p < 0,05$  / \*\*  $p < 0,01$ ; Zahl im Balken = n

4.4.2 Wirkung von Substanz 1 in Cs<sup>+</sup>-Lösung intra- und extrazellulär

Wie schon in Kapitel 4.1.2 beschrieben, führte Cs<sup>+</sup> bei intrazellulärer Applikation zu einem Anstieg des Gesamtstromes mit überwiegender Auswärtskomponente. Die Zugabe von Substanz 1 dagegen führte zu einem rapiden Abfall des Stroms und hatte somit in erster Linie einen negativen Effekt auf den gemessenen Gesamtstrom. 3-5 min nach der Applikation von Substanz 1 erreichte die Membranleitfähigkeit sein Minimum. Im weiteren Verlauf konnte ein erneuter Anstieg der Membranleitfähigkeit beobachtet werden, der in seiner Art dem Effekt von Substanz 1 in Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-Badlösung ähnelte (Abb. 4.23 und 4.24).

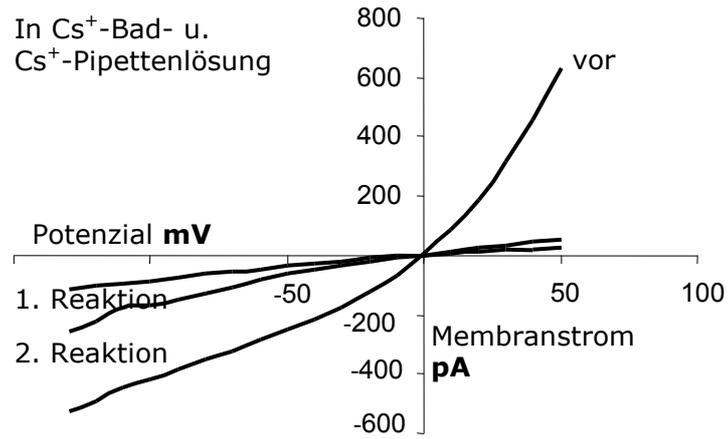
In dieser Messreihe konnte der Effekt von Substanz 1 auf die Physiologie der Zelle eindeutig beobachtet werden. Da jedoch der durch Cs<sup>+</sup> aktivierte Strom keinen Ausgangswert im Ruhezustand erlaubte, konnte der Effekt von Substanz 1 nicht im Sinne einer Vorher-Nachher-Gegenüberstellung quantifiziert werden. Zur Auswertung wurde somit der Zustand der Zellen am Ende des Experimentes herangezogen, da man davon ausgehen kann, dass zu diesem Zeitpunkt einerseits die Anzahl der eingebauten Kanäle am größten war und andererseits der durch das Cs<sup>+</sup> ausgelöste Effekt am geringsten.

Die Stromdichten ergaben als erste Reaktion auf Substanz 1 einen Abfall der Gesamtstromdichte von  $29,9 \pm 12,19 \text{ pApF}^{-1}$  (n=6) mit Einwärtsstromdichte von  $-7,1 \pm 2,88 \text{ pApF}^{-1}$  (n=6) und Auswärtsstromdichte von  $22,9 \pm 9,34 \text{ pApF}^{-1}$  (n=6) auf eine Gesamtstromdichte von  $7,3 \pm 6,16 \text{ pApF}^{-1}$  (n=6) mit Einwärtsstromdichte von  $-4,0 \pm 1,58 \text{ pApF}^{-1}$  und Auswärtsstromdichte von  $2,9 \pm 1,30 \text{ pApF}^{-1}$  (n=6). Der darauf folgende Stromanstieg ergab wiederum eine Gesamtstromdichte von  $12,3 \pm 6,17 \text{ pApF}^{-1}$  (n=6) mit Einwärtsstromdichte von  $-8,0 \pm 4,34 \text{ pApF}^{-1}$  (n=6) und Auswärtsstromdichte von  $4,4 \pm 1,93 \text{ pApF}^{-1}$  (n=6) (Abb. 4.25).

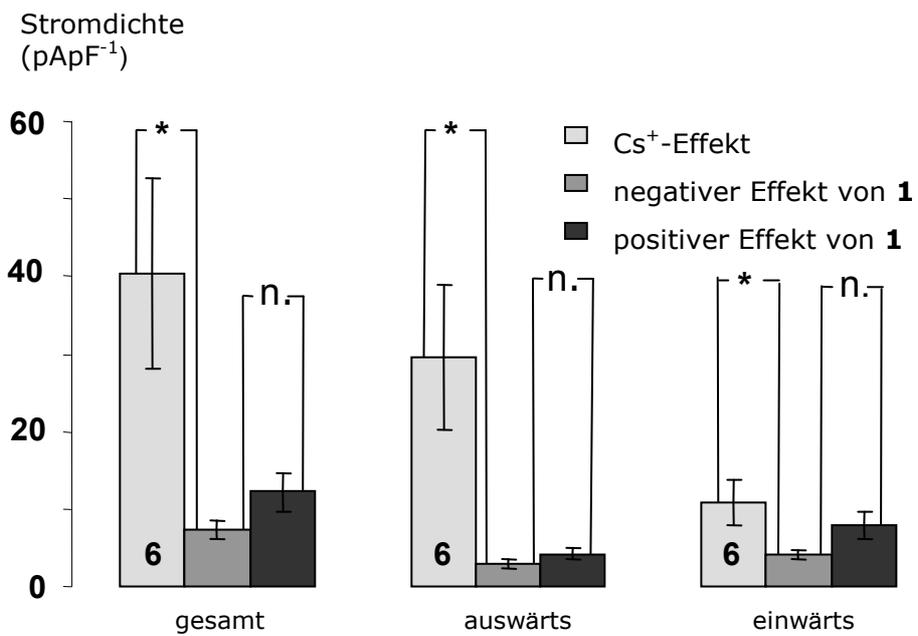


**Abb. 4.23** elektrische Ableitung einer CHO-Zelle im Whole-Cell-Modus mit  $\text{Cs}^+$ -Lösung intra- und extrazellulär in Gegenwart von  $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol/l}$ ; a) REV-Verlaufsprotokoll der gesamten Messung, b) r50-Pulsprotokolle vor 1 Gabe (links), nach dem Erreichen der minimalen Membranleitfähigkeit (mitte) und nach dem erneuten Anstieg der Leitfähigkeit

4. Ergebnisse



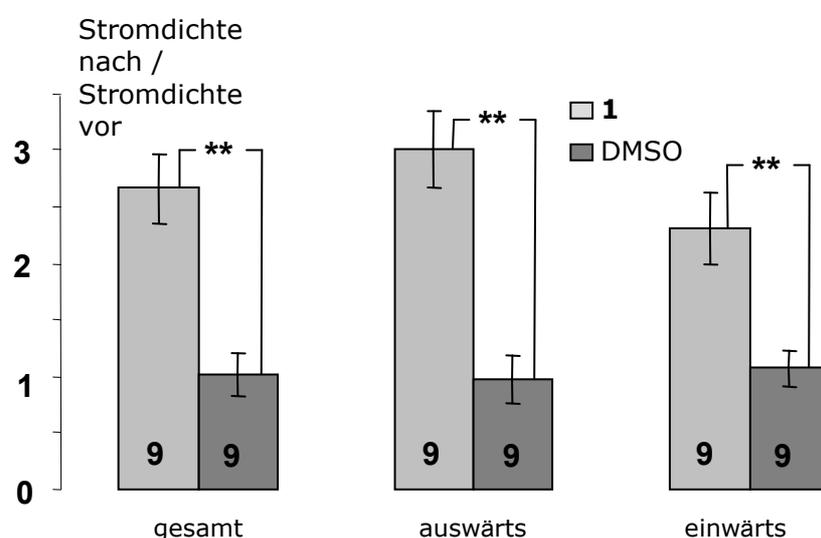
**Abb. 4.24** Strom-Spannungs-Kennlinien erstellt aus den in Abb. 4.23 b) dargestellten r50-Protokollen



**Abb. 4.25** Gegenüberstellung der mittleren Stromdichten mit Cs<sup>+</sup>-Lösung intra- und extrazellulär zu unterschiedlichen Momenten im Versuchsverlauf; mit Angabe des Fehlerindexes als mittlere Standardabweichung und der Signifikanz mit n.  $p > 0,05$  / \*  $p < 0,05$  / \*\*  $p < 0,01$ ; Zahl im Balken = n

## 4.4.3 Vergleich der einzelnen Messreihen

Nachfolgend werden die Ergebnisse aus den verschiedenen Messreihen ausgewertet. Die Ergebnisse aus den Messreihen in Gegenwart von Substanz **1** unter physiologischen Bedingungen wurden mit den DMSO-Kontrollen ebenfalls unter physiologischen Bedingungen verglichen (Abb. 4.26). Dabei wurden die Stromdichten nach der Zugabe von Substanz **1** bzw. DMSO durch die Stromdichten vor der Zugabe geteilt und gegenübergestellt. Während die Zunahme der Stromdichte in Gegenwart von Substanz **1** um den Faktor  $2,7 \pm 0,93$  ( $n=9$ ) stieg, blieb sie in den Kontrollmessungen mit DMSO annähernd gleich, so dass der Quotient einen Wert von  $1,0 \pm 0,05$  ( $n=9$ ) erreichte.



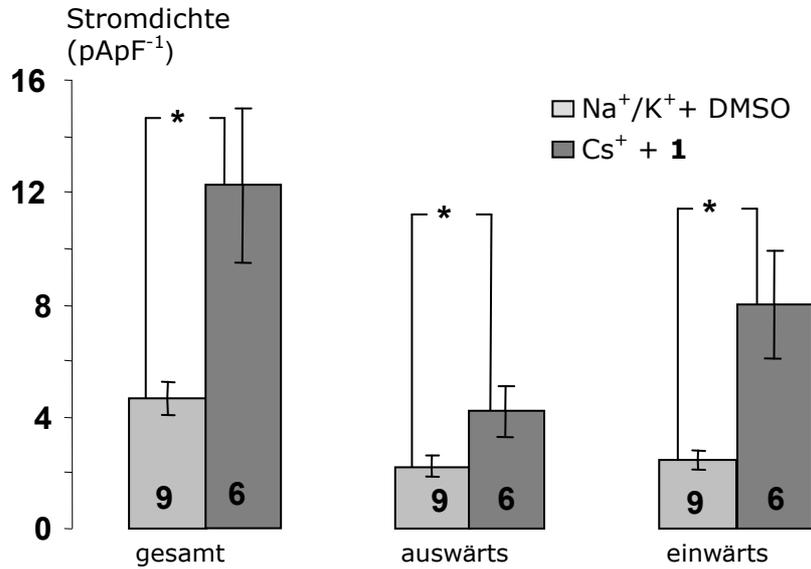
**Abb. 4.26** Darstellung des Verhältnisses der Stromdichten vor zu nach der Applikation von **1** bzw. DMSO mit Angabe des Fehlerindex als mittlere Standardabweichung und der Signifikanz mit  $n$ .  $p > 0,05$  / \*  $p < 0,05$  / \*\*  $p < 0,01$ ; Zahl im Balken =  $n$

Aufgrund der Schwierigkeiten der Quantifizierung der Wirkung von Substanz **1** innerhalb der  $\text{Cs}^+$ -Messreihe wurden die Ergebnisse mit den Daten aus den Messreihen unter physiologischen Bedingungen verglichen.

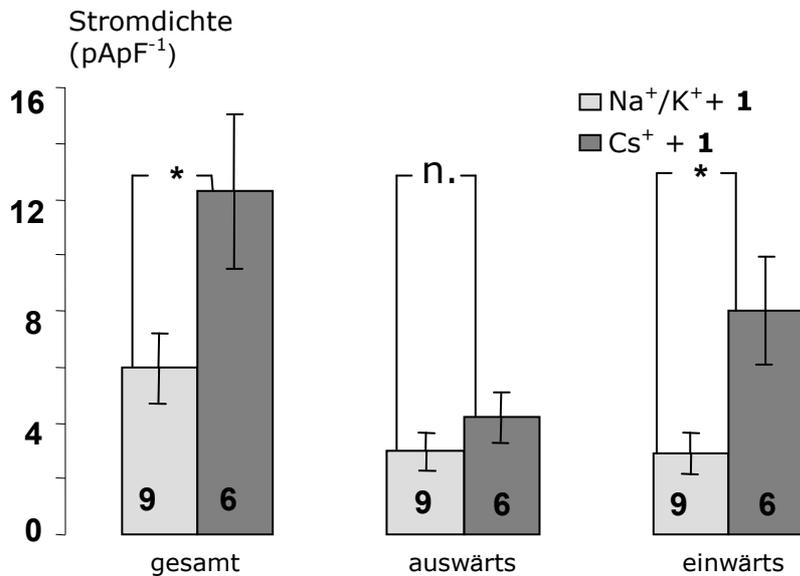
Es ergeben sich signifikant höhere Stromdichten mit  $\text{Cs}^+$  in Gegenwart von Substanz **1** im Vergleich zu den erfassten Stromdichten mit  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  in Gegenwart von DMSO (Abb. 4.27).

#### 4. Ergebnisse

Der Vergleich der Stromdichten unter  $\text{Cs}^+$  und  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  in Gegenwart von Substanz **1** ergab eine signifikant höhere Dichte für die Gesamt- und Einwärtsströme unter  $\text{Cs}^+$ , jedoch keinen signifikanten Unterschied für die Auswärtsströme (Abb. 4.28).



**Abb. 4.27** Gegenüberstellung der Stromdichten aus den Kontrollmessungen in  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Lösung und Messungen in  $\text{Cs}^+$ -Lösung nach Applikation von **1** bzw. DMSO mit Angabe des Fehlerindexes als mittlere Standardabweichung und der Signifikanz mit n.  $p > 0,05$  / \*  $p < 0,05$  / \*\*  $p < 0,01$ ; Zahl im Balken = n

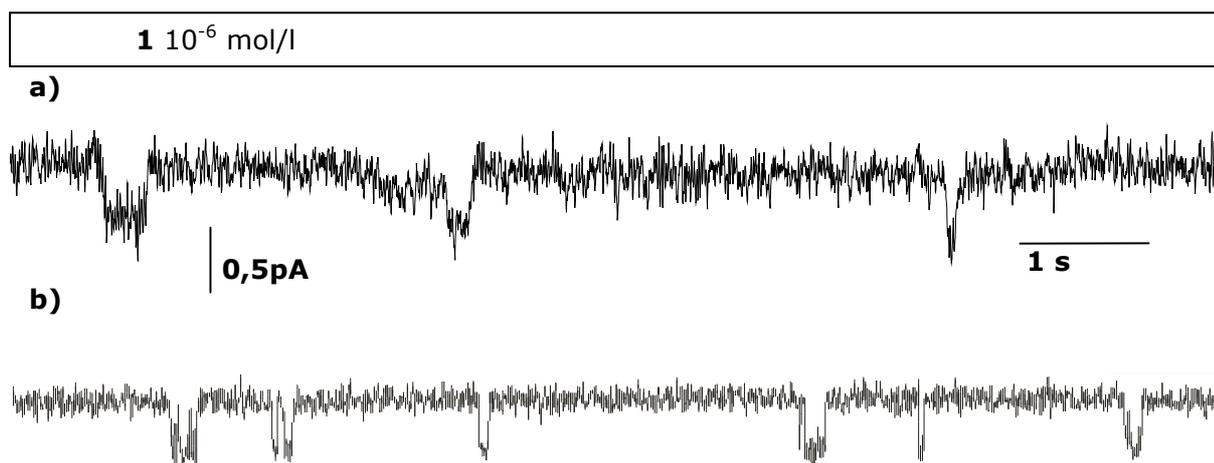


**Abb. 4.28** Gegenüberstellung der Stromdichten aus den Messungen in Gegenwart von **1** in  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Lösung und  $\text{Cs}^+$ -Lösung, mit Angabe des Fehlerindexes als mittlere Standardabweichung und der Signifikanz mit n.  $p > 0,05$  / \*  $p < 0,05$  / \*\*  $p < 0,01$ ; Zahl im Balken = n

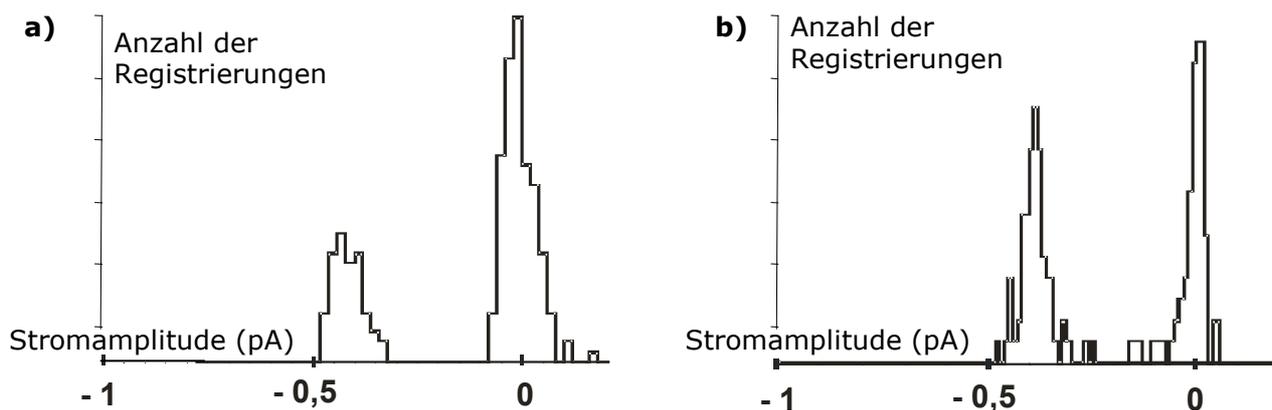
4.4.4 Einzelkanalaufnahmen von Substanz **1** in der Inside-Out-Patch-Konfiguration

In den Einzelkanalmessungen wurden in der Inside-Out-Patch-Konfiguration bei einem Potential von  $-120$  mV mit  $\text{Cs}^+$ -Bad- und Pipettenlösung Einzelkanalaktivitäten mit einer Amplitude von  $0,4 \pm 0,05$  pA ( $n=13$ ) aufgenommen (Abb. 4.29). Die Ereignisse waren ausschließlich in Gegenwart von Substanz **1** aufgetreten. Die mittlere Offenzeit betrug dabei  $0,35 \pm 0,1$  s ( $n=13$ ). Aus den Aufnahmestreifen mit Einzelkanalereignissen wurden nach der digitalen Filterung mit 3 kHz und einem lowpass Besselfilter All-Point-Amplitudenhistogramme erstellt. Diese zeigten zusätzlich zu der Gauß'schen Verteilung der Punkte um die Basislinie, die auch schon in den Kontrollen beobachtet wurde, eine zweite, kleinere Glockenverteilung. Die Scheitelpunkte der beiden Kurven waren dabei um  $0,4$  pA versetzt.

Zur weiteren Auswertung wurden analog zu den Einzelkanalexperimenten in der Inside-Out-Patch-Konfiguration von der Arbeitsgruppe von Prof. Koert am Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg Untersuchungen mit Black-Lipid-Layer-Membranen durchgeführt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die äußeren Umstände in beiden Untersuchungsmethoden identisch waren. Somit waren die Zusammensetzung der Lösungen, die angelegte Spannung und die Konzentration der Substanz **1** in beiden Messreihen identisch. Die aufgezeichneten Ereignisse zeigten einen hohen Grad an Übereinstimmung. So zeigten die Amplitudenhistogramme aus beiden Untersuchungsmethoden die gleiche Punktverteilung (Abb. 4.30). Die Offenzeiten stimmten ebenfalls mit den an den CHO-Zellmembranen ermittelten überein.



**Abb. 4.29** Aufnahmen mit Einzelkanalereignissen bei einem Potential von  $-120$  mV mit  $\text{Cs}^+$ -Bad- und Pipettenlösung in Gegenwart von  $1 \cdot 10^{-6}$  mol/l beidseits der Membranen; a) Ereignisse aufgenommen an der Membran einer CHO-Zelle mit der Inside-Out-Patch-Konfiguration, b) Ereignisse aufgenommen an einer Black-Lipid-Layer-Membran



**Abb. 4.30** Amplitudenhistogramme erstellt aus Aufnahmen mit Einzelkanalereignissen in der Gegenwart von  $1 \cdot 10^{-6}$  mol/l;  
 a) aufgenommen an der Membran einer CHO-Zelle im Inside-Out-Patch- Modus,  
 b) Ereignisse aufgenommen an einer Black-Lipid-Layer-Membran

#### 4.4.5 Wirkung von Substanz 1 auf die Volumenregulation

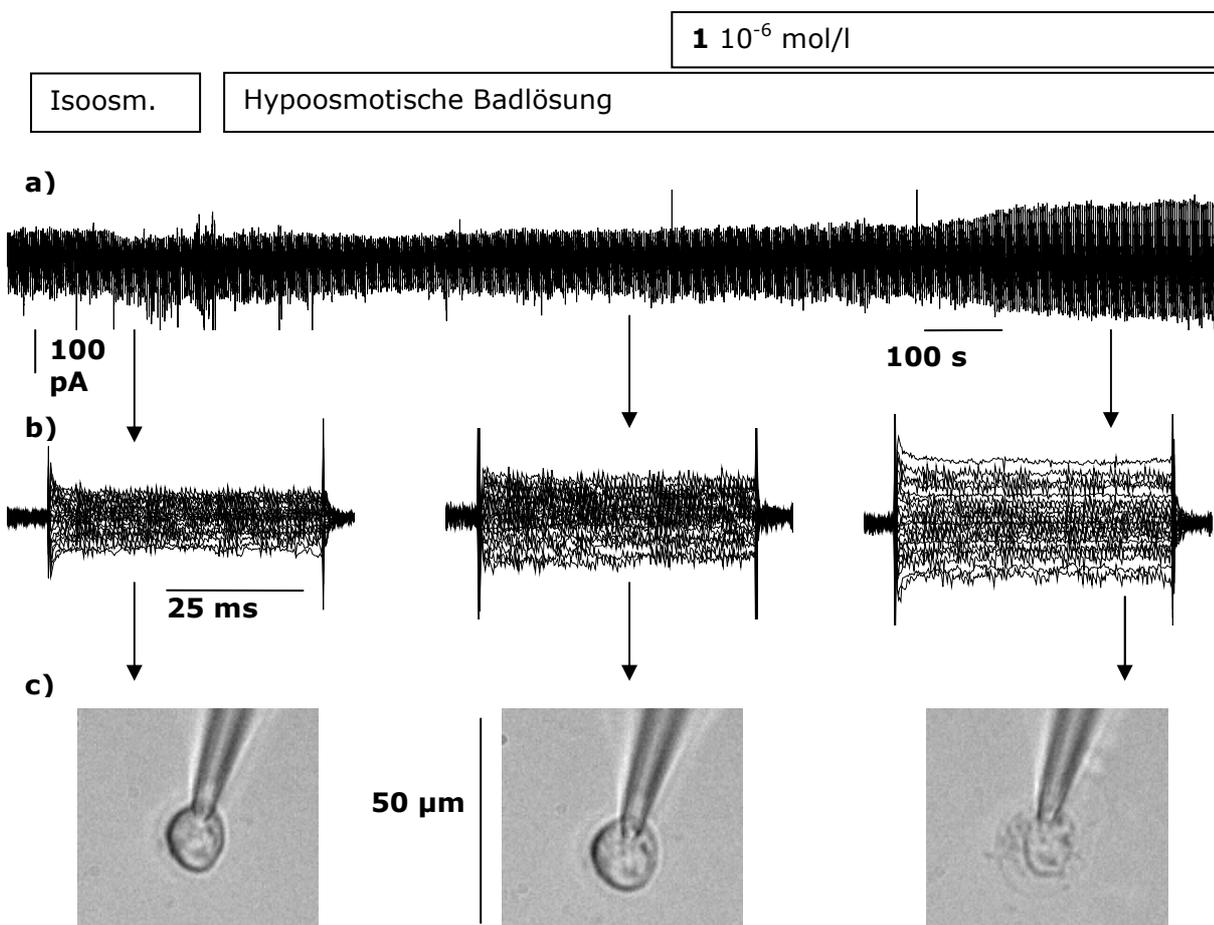
In den folgenden Experimenten wurde der Einfluss von Substanz 1 auf die Volumenregulation der CHO-Zellen untersucht. Im Verlauf des Experimentes wurde nach dem Badwechsel zur hypoosmolaren Badlösung in der Patch-Clamp-Ableitung im Whole-Cell-Modus ein geringfügiger Anstieg der Membranleitfähigkeit, ähnlich wie bei den DMSO-Kontrollen, beobachtet. Der Zelldurchmesser, der im Mittel  $18,7 \pm 0,7 \mu\text{m}$  ( $n=3$ ) betrug, blieb bei einem Wert von  $19,0 \pm 0,6 \mu\text{m}$  ( $n=3$ ) nahezu unverändert. Im weiteren Verlauf wurde Substanz 1 in einer Konzentration von  $10^{-6}$  mol/l zur Außenlösung dazugegeben. Daraufhin wurde nach wenigen Minuten ähnlich den Experimenten mit Substanz 1 in isoosmolarer Lösung eine Zunahme des durch die Zellmembran fließenden Stroms beobachtet. Die visuelle Überwachung des Experimentes zeigte zeitgleich mit dem Anstieg der Membranleitfähigkeit eine stetige Zunahme der Zellgröße auf einen mittleren Wert von  $27,7 \pm 2,7 \mu\text{m}$  ( $n=3$ ) (Abb. 4.31). Während der Stromanstieg nach einer gewissen Zeit stets ein konstantes Plateau erreichte, hat das Volumen der Zelle nach der Zugabe von Substanz 1 stetig zugenommen, bis in zwei von drei Fällen die Volumenresistenz der Zelle überschritten wurde und diese aufriss.

Bei den Volumenregulationsexperimenten trat erschwerend hinzu, dass die hochohmige Verbindung zwischen Pipette und Zellmembran über die gesamte Dauer des Experimentes stabil bleiben musste. Auch kleinste Lecks in dieser Verbindung, die häufig schon durch die entstehende

#### 4. Ergebnisse

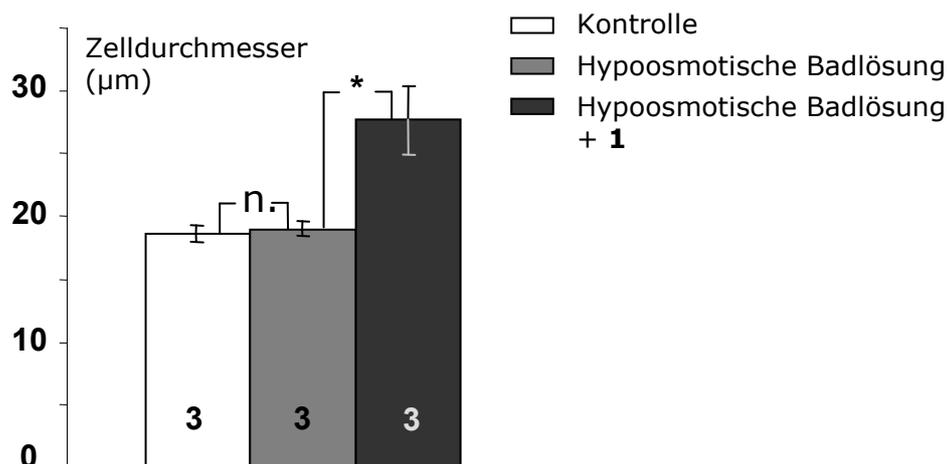
Bewegung beim Badwechsel auftreten, führten hier aufgrund des osmotischen Gradienten zu Einströmen der Badlösung in die Zelle mit nachfolgender Erweiterung des Lecks und schließlich dem Abriss der Zelle von der Pipette. So boten lediglich sechs Messungen, von denen drei der Kontrolle dienten, die nötige Stabilität. Diese wurden für die Auswertung herangezogen.

Für die Auswertung wurde der Durchmesser der Zellen in der isoosmolaren, in der hypoosmolaren Lösung und in der hypoosmolaren Lösung nach Zugabe von Substanz **1** bestimmt. Während es in Abwesenheit von Substanz **1**, wie schon in den Kontroll-Experimenten mit DMSO beobachtet, zu keiner signifikanten Zunahme des Zelldurchmessers kam, konnte in Gegenwart von Substanz **1** diese Signifikanz belegt werden (Abb. 4.32).



**Abb. 4.31** Aufzeichnung einer Messung in isoosmotischer Badlösung mit Badwechsel zur hypoosmotischer Badlösung und anschließender Applikation von  $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol/l}$ ; a) REV-Verlaufsprotokoll der gesamten Messung, b) r50-Pulsprotokolle in  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Badlösung (links), in hypoosmotischer Badlösung (mitte) und nach Zugabe von **1** (rechts) c) Aufnahmen der Zelle in  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Badlösung (links), in hypoosmotischer Badlösung (mitte) und nach Zugabe von **1** (rechts)

#### 4. Ergebnisse

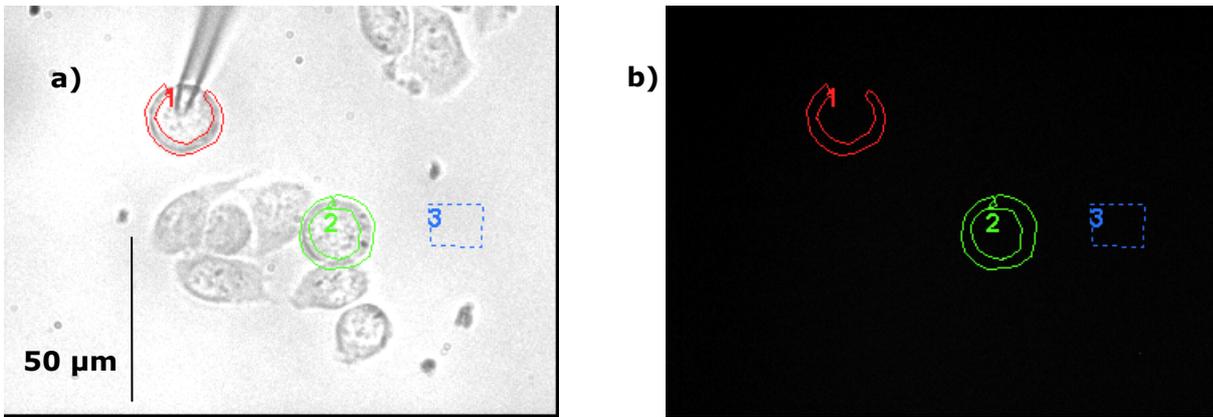


**Abb. 4.32** Zelldurchmesser unter sich ändernden Bedingungen des Experimentes; in isoosmotischer Lösung, nach dem Badwechsel zur hypoosmotischen Badlösung und nach Zugabe von **1**; mit Angabe des Fehlerindexes als mittlere Standardabweichung und der Signifikanz mit n.  $p > 0,05$  / \*  $p < 0,05$  / \*\*  $p < 0,01$ ; Zahl im Balken = n

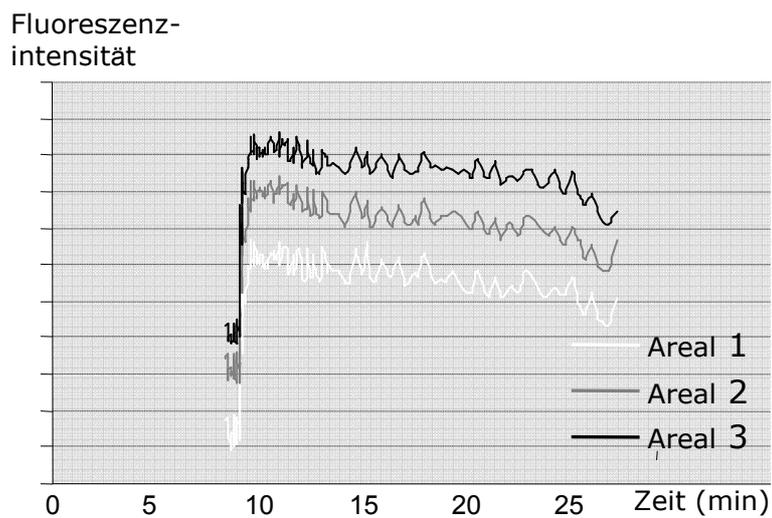
#### 4.5 Untersuchungen des Einbaus der Substanz **2**

Da in vorhergehenden Untersuchungen (vgl. Kapitel 1.3.4) der porenbildende Teil der Substanz **2** in biologischen Membranen als elektrophysiologisch unwirksam bewertet wurde, galt in diesen Experimenten das Interesse hauptsächlich der Fluoreszenzmessung und damit der Frage nach dem Einbau, nicht nach der Funktion. Die als Beobachtungsareale definierten Bereiche wurden nachträglich festgelegt. Das Areal 1 entspricht der Zellmembran, auf die Substanz **2** von beiden Seiten einwirken konnte (Abb. 4.33). Diese Zelle wurde auch elektrophysiologisch beobachtet. Das Areal 2 entspricht einer Zellmembran, auf die Substanz **2** von außen einwirkte. Das Areal 3 fungiert als Kontrolle ohne membranöse Zellbestandteile. Für die Auswertung wurden die Extinktionsintensitäten der drei Areale gegen die Zeit aufgezeichnet (Abb. 4.34). Dabei zeigte sich bei der Applikation von Substanz **2** in die Badlösung in allen drei Arealen ein sprunghafter Anstieg der Fluoreszenz. Die weitere Entwicklung der Kurven ergab einen parallelen, leicht absteigenden Verlauf, der in keinem der ausgewerteten Bereiche den Verdacht einer Konzentration von Substanz **2** nahe legte. Die elektrophysiologischen Aufnahmen boten ebenfalls keinen Anhalt für eine durch Substanz **2** hervorgerufene Änderung der Leitfähigkeit der Membran (Abb. 4.35).

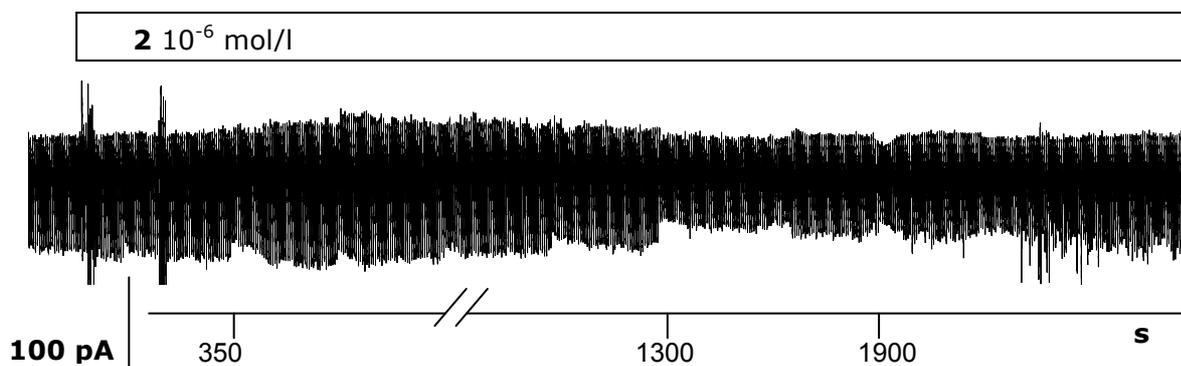
#### 4. Ergebnisse



**Abb. 4.33** Das im Experiment beobachtete Feld mit Markierung der ausgewerteten Areale; Areal 1: beidseitige Exposition mit **2**, Areal 2: **2** nur extrazellulär, Areal 3: Kontrollfeld ohne zelluläre Bestandteile  
a) Aufnahme belichtet vor Experimentbeginn  
b) Aufnahme unter Experimentbedingungen



**Abb. 4.34** Grafische Darstellung der Fluoreszenzintensität der in Abb. 4.5.1 dargestellten Areale gegen die Zeit; Excitation 480 nm; Emission 535 nm



**Abb. 4.35** REV-Verlaufsprotokoll einer Patch-Clamp-Messung im Whole-Cell-Modus in  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Badlösung und  $\text{K}^+$ -Pipettenlösung in Gegenwart von  $2 \cdot 10^{-6} \text{ mol/l}$  beidseits der Membran

#### 4.6 Wirkung der Substanz 3

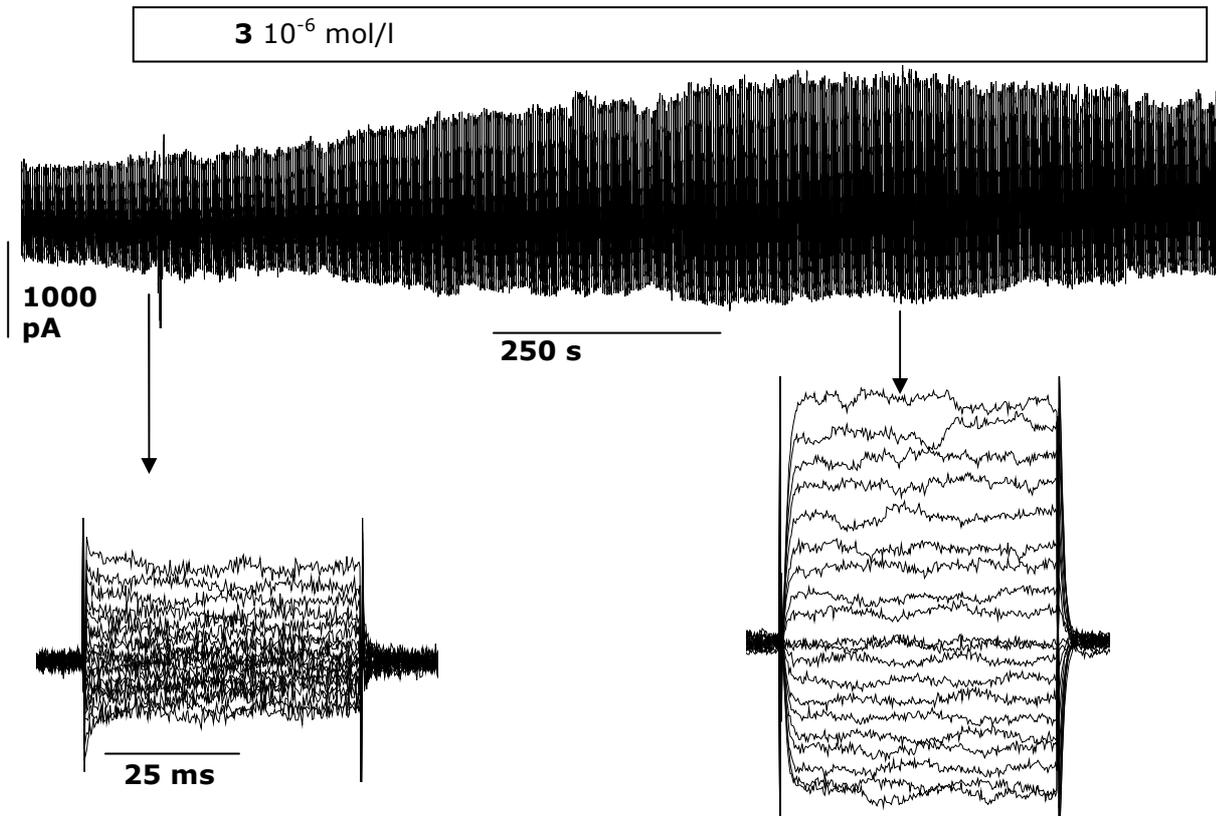
In den Experimenten mit der Substanz **3** wurde entsprechend den DMSO-Kontrollen und den Experimenten mit Substanz **1** wenige Minuten, nachdem die Whole-Cell-Konfiguration erreicht wurde, Substanz **3** in einer Konzentration von  $10^{-6} \text{ mol/l}$  zu der Badlösung dazugegeben. Dabei wurde bei 3 von 16 untersuchten Zellen ein Anstieg der Membranleitfähigkeit beobachtet (Abb. 4.36). Die drei Zellen, die eine mögliche Reaktion auf Substanz **3** zeigten, hatten eine mittlere Membrankapazität von  $25 \pm 13,2 \text{ pF}$  ( $n=3$ ) und lagen damit oberhalb der ermittelten mittleren Membrankapazität der anderen Experimente. Bei den drei reagierenden Zellen stieg die Gesamtstromdichte von  $3,5 \pm 2,18 \text{ pApF}^{-1}$  ( $n=3$ ) mit anteiliger Einwärtsstromdichte von  $-1,5 \pm 0,64 \text{ pApF}^{-1}$  ( $n=3$ ) und Auswärtsstromdichte von  $2,1 \pm 1,43 \text{ pApF}^{-1}$  ( $n=3$ ) auf eine Gesamtstromdichte von  $11,4 \pm 5,25 \text{ pApF}^{-1}$  ( $n=3$ ) mit anteiliger Einwärtsstromdichte von  $-4,8 \pm 2,18 \text{ pApF}^{-1}$  ( $n=3$ ) und Auswärtsstromdichte von  $6,6 \pm 3,15 \text{ pApF}^{-1}$  ( $n=3$ ) (Abb. 4.37).

Bei zwei der drei beschriebenen Zellen kam es gleichzeitig mit der Zunahme der Membranleitfähigkeit zu einer Hyperpolarisation mit einer Senkung des Umkehrpotentials von  $-15 \pm 10 \text{ mV}$  auf  $-36 \pm 7,07 \text{ mV}$  ( $n=3$ ) und einer Verschiebung der Basislinie in positiveren Bereich (Abb. 4.36 und 4.37).

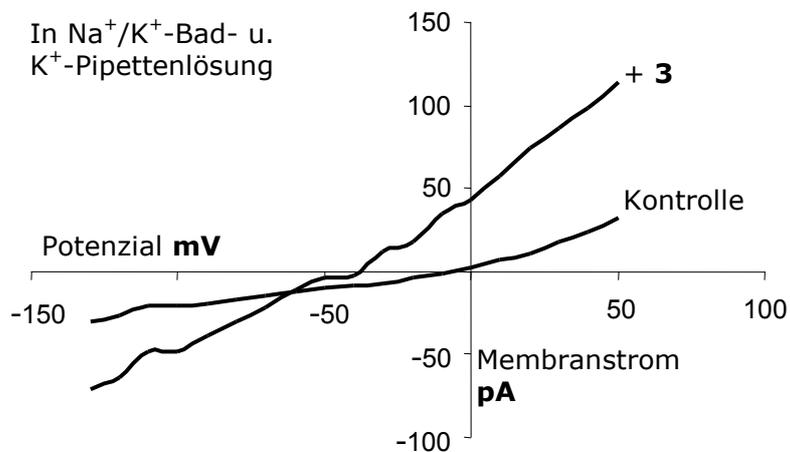
Bei einer der Zellen gelang es, nachdem eine Zunahme der Membranleitfähigkeit beobachtet wurde, einen Badwechsel zur  $\text{K}^+$ -Lösung vorzunehmen (Abb. 4.38). Dabei zeigte sich, wie zuvor in

#### 4. Ergebnisse

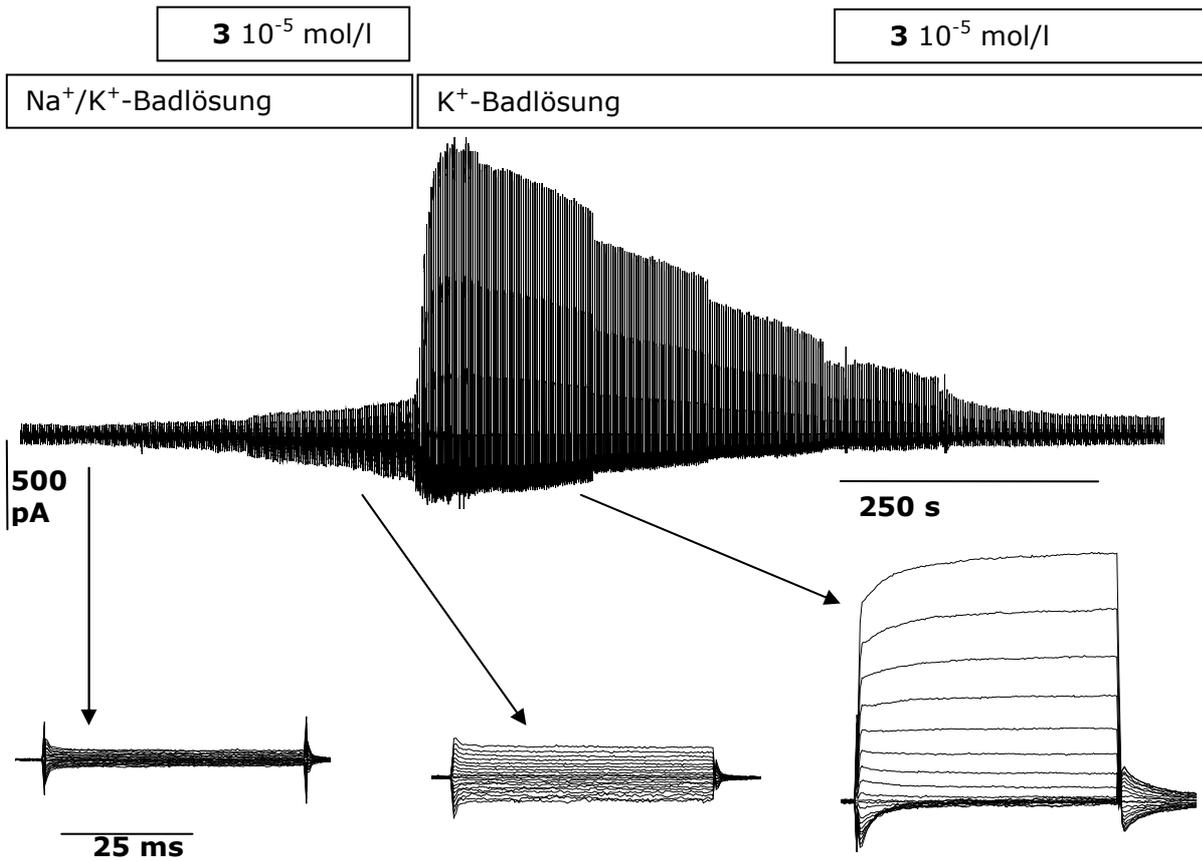
den DMSO-Kontrollen, ein spontan ansteigender Auswärtsstrom. Die erneute Gabe von Substanz **3** zeigte in der  $K^+$ -Lösung keinen sichtbaren Effekt.



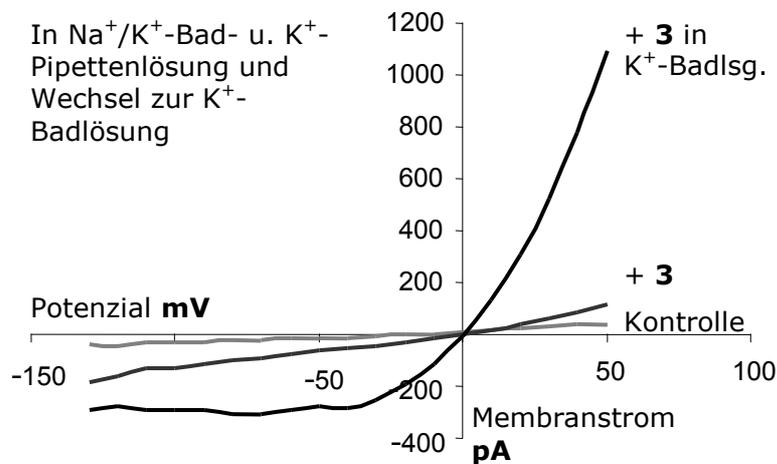
**Abb. 4.36** elektrische Ableitung einer CHO-Zelle im Whole-cell-Modus in  $Na^+/K^+$ -Lösung in Gegenwart von  $3 \cdot 10^{-6}$  mol/l; a) REV-Verlaufsprotokoll der gesamten Messung, b) r50-Pulsprotokolle vor Zugabe von **3** (links), nach Zugabe von **3** (rechts)



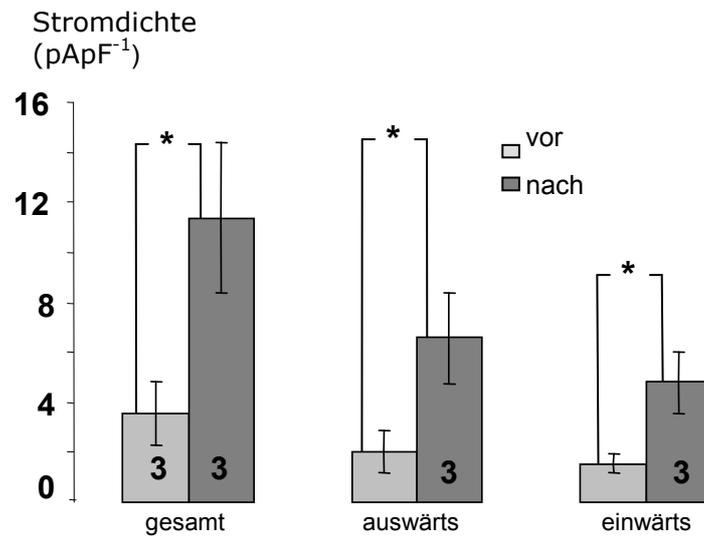
**Abb. 4.37** Strom-Spannungs-Kennlinien erstellt aus den in Abb. 4.35 b) dargestellten r50-Protokollen



**Abb. 4.38** elektrische Ableitung einer CHO-Zelle im Whole-Cell- mit K<sup>+</sup>-Pipettenlösung in Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-Badlösung und anschließendem Badwechsel zur K<sup>+</sup>-Lösung in Gegenwart von  $3 \cdot 10^{-6} \text{ mol/l}$ ; a) REV-Verlaufsprotokoll der gesamten Messung  
b) r50-Pulsprotokolle vor der Zugabe von **3** (links), nach der Zugabe von **3** (mitte), nach dem Badwechsel zu K<sup>+</sup>-Lösung (rechts)



**Abb. 4.39** Strom-Spannungs-Kennlinien erstellt aus den in Abb. 4.37 b) dargestellten r50-Protokollen



**Abb. 4.40** Gegenüberstellung der erfassten Stromdichten nach und vor der Zugabe von **3** in Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-Badlösung und mit K<sup>+</sup>-Pipettenlösung; mit Angabe des Fehlerindexes als mittlere Standardabweichung und der Signifikanz mit n. p > 0,05 / \* p < 0,05 / \*\* p < 0,01; Zahl im Balken = n

5 Diskussion

5.1 Kontrollmessungen

Der Entschluss, die CHO-Zellreihe für die Experimente zu verwenden, basierte in erster Linie auf der Eigenschaft dieser Zellen, unter physiologischen Bedingungen nur geringe endogene Ionenströme aufzuweisen. So zeigten auch die hier verwendeten CHO-Zellen in den Whole-Cell-Patch-Clamp-Ableitungen in der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Bad- und  $\text{K}^+$ -Pipettenlösung Gesamtströme um 50 pA und eine Stromdichte um  $5 \text{ pA pF}^{-1}$ . Dabei war das Verhältnis der Einwärts- gegenüber den Auswärtsströmen ausgewogen.

Damit waren gute Ausgangsbedingungen geschaffen, auch geringe durch äußere Manipulation bedingte Veränderungen der Leitfähigkeit der Zellenmembran aufzuzeichnen.

Unter der Änderung des physiologischen Milieus (im Sinne einer Änderung der Elektrolytzusammensetzung der intra- und/oder extrazellulären Flüssigkeit) sind die Ausgangsbedingungen bei der verwendeten Zellreihe leider nicht mehr so günstig. Wie an den hier vorliegenden Messergebnissen zu sehen ist, neigten die CHO-Zellen bei Änderung der Ionenzusammensetzung zur Aktivierung von endogenen Ionenkanälen, die in ihrer elektrophysiologischen Antwort die Ausgangsstromdichte um ein vielfaches überschritt. Damit wurden einerseits die Effekte der verwendeten ionotropen Substanzen überlagert, andererseits wurde der Vergleich der Ergebnisse innerhalb derselben Messung sowie der Messungen untereinander erschwert oder sogar unmöglich gemacht.

So zeigte insbesondere der intrazelluläre Einstrom von  $\text{Cs}^+$  einen Anstieg des gesamt gemessenen Stroms um bis zu das 50-fache mit einer Auswärtskomponente (wenn von der Induktion eines Kationentransports ausgegangen wird) von 2:1. Die Ursache für die Induktion der heftigen Zellantwort ist anhand der vorliegenden Daten nicht eindeutig nachzuvollziehen. Am wahrscheinlichsten erscheint jedoch, dass es durch die Eigenschaft von  $\text{Cs}^+$  als Kanalblocker – insbesondere unspezifisch von  $\text{K}^+$ -Kanälen (vgl. Cook et al., 1990) – zur Hemmung einer  $\text{K}^+$ -abhängigen Volumenkontrolle kam. Eine daraus resultierende Zellschwellung führt dabei zu einer Aktivierung endogener Kanäle zur Volumenkompensation über andere Leitonen, wie  $\text{Cl}^-$ . Am ehesten ist von einer Aktivierung der TRP-Kanäle -(transient receptor potential)- auszugehen, von denen etliche mechanisch aktivierbar sind. Die meisten TRP-Kanäle vermitteln eine unselektive Kationenpermeabilität. Es kommen aber auch  $\text{Ca}^{2+}$ -selektive Typen vor und solche, die nur für einwertige Kationen durchlässig sind. (vgl. Liedtke et al., 2005). Die TRP-Kanäle werden durch vielfältige Reize wie Wärme, Kälte, mechanische Kräfte und endogene Reize stimuliert. Vorliegend

wäre die Aktivierung durch eine mechanische Stimulation – die Zellschwellung – denkbar. Dabei ist eine direkte Aktivierung der Kanäle über das Zytoskelett oder über die mechanische Aktivierung einer intrazellulären Signalkaskade und einer sekundären Aktivierung des TRP-Kanals möglich.

Der Ersatz des extrazellulären  $\text{Na}^+$  gegen  $\text{K}^+$  führte ebenfalls zu der Induktion eines endogenen Auswärtsstromes (unter der Annahme eines Kationenstroms), der den Ausgangswert um ein Vielfaches überschritt. Anders als bei den  $\text{Cs}^+$ -Experimenten nahm der  $\text{K}^+$  induzierte Strom im Verlauf der Messung wieder ab, wobei sich das Verhältnis von Einwärts- zu Auswärtsstromdichte wieder ausglich. Auch hier ist eine Hemmung der Volumenregulation mit einer nachfolgenden Aktivierung von TRP-Kanälen wahrscheinlich.

In den Kontroll-Messungen in der Inside-Out-Patch-Konfiguration wurden keine Ereignisse beobachtet, die in der Morphologie (Amplitude und Offenzeit) Ähnlichkeiten mit den Aktivitäten von Substanz 1 in Black-Lipid-Layer-Membranen hatten. In den meisten untersuchten Membran-Patches der CHO-Zellen zeigten sich keine Einzelkanalereignisse, so dass die erstellten Amplitudenhistogramme eine Gauß'sche Verteilung um die Basislinie zeigten, was dem elektrischen Rauschen entspricht.

Die Experimente mit Wechsel der Badlösung zu hypoosmolarer Lösung zeigten die Zellen, die 45 min bis 2 h zuvor mit Trypsin behandelt wurden, keine relevante Reaktion im Sinne einer Volumenzunahme oder einer wesentlichen Zunahme der elektrophysiologischen Aktivität. Bei den CHO-Zellen, die eine längere Erholungszeit nach der Behandlung mit der Protease hatten, wurde nach dem Badwechsel eine stärkere Volumenzunahme sowie insbesondere eine Aktivierung von endogenen Ionenkanälen beobachtet, die als Kompensationsströme zum Ausgleich des osmotischen Gradienten zu verstehen sind. Das unterschiedliche Verhalten der Zellen unter variierenden Bedingungen lässt sich am ehesten durch eine Beeinflussung des Zytoskeletts erklären. Durch die Behandlung mit Trypsin lösen sich die Zellen vom Boden, wobei zum Teil auch Membranfragmente abgestoßen werden. Dabei bekommen die Zellen eine Kugelform. Dieser Prozess erfordert eine Umstrukturierung des Zytoskeletts, so dass dieses sich für eine gewisse Zeit in einem Ab- und erneutem Aufbau befindet. In dieser Zeit sind die an das Zytoskelett gebundenen Prozesse beeinträchtigt, weswegen es nicht zu einer Aktivierung von mechanisch gesteuerten Kanälen im gewohnten Ausmaß kommt. Dies könnte die unterschiedliche Empfindlichkeit der Zellen erklären, je nachdem ob sie kurz nach dem Trypsinieren (Kugelform) oder später (flache adhärente Form) untersucht wurden.

Die Zugabe von DMSO (Dimethyl-Sulfoxid) hatte in keinem der Kontrolleexperimente eine erkennbare Wirkung auf die Leitfähigkeit oder Volumenregulation der CHO-Zellen. Somit erscheint das DMSO als ein geeignetes Lösungsmittel für die verwendeten ionotropen Substanzen.

## 5.2 Verwendete Substanzen

### 5.2.1 Gramicidin A und Valinomycin

Das Gramicidin A zeigte wie schon aus der Literatur bekannt (vgl. Bean et al., 1969; Hladky et al., 1970; Wallace et al., 1999) wenige Minuten nach Gabe in die Badlösung einen massiven Anstieg von Strömen über der Zellmembran. Die gemessene Stromdichte stieg um das 50-fache des Ausgangswertes an. Das Verhältnis der Ein- und Auswärtsströme verhielt sich dabei linear. Die symmetrische Stromantwort lässt sich einerseits mit der symmetrischen Struktur des von Gramicidin A gebildeten Kanals erklären, der keine Präferenz für eine Richtung des Ionentransportes hat, andererseits durch die nahe beieinander liegenden Leitfähigkeitsniveaus für  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$  (vgl. Kapitel 1.3), wodurch die unterschiedlichen  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Konzentrationen der Bad- und Pipettenlösung keine relevante Bedeutung erlangen.

Die durch das Gramicidin A entstehende unkontrollierte Permeabilität für Kationen hat letztendlich eine zytotoxische Wirkung auf die Zelle. Gerade diese Eigenschaft der Leitsubstanz macht sie für den Einsatz als künstlicher Ionenkanal zur Manipulation von biologischen Prozessen in lebenden Zellen und Organen ungeeignet.

Zur Veranschaulichung der Wirkung einer induzierten  $\text{K}^+$ -selektiven Permeabilität auf die CHO-Zellen wurden Untersuchungen mit Valinomycin durchgeführt. Die Ergebnisse wurden für die Beurteilung der Reaktionen in Gegenwart von Substanz **3**, deren Leitfähigkeit für  $\text{K}^+$  ebenfalls am höchsten ist, herangezogen.

Nach der Gabe von Valinomycin in die Badlösung kam es unter physiologischen Bedingungen vor allem zu einer Zunahme der Auswärtsströme, was unter diesen Bedingungen für die Induktion einer  $\text{K}^+$ -selektiven Leitfähigkeit zu erwarten war. Diese Beobachtung lässt sich mit der höheren Konzentration an  $\text{K}^+$  in der Pipettenlösung im Vergleich zu der Badlösung erklären. Dabei führt die höhere Permeabilität der Zellmembran für  $\text{K}^+$  zu einem  $\text{K}^+$ -Ausstrom aus der Zelle entlang des Konzentrationsgradienten, der in der Patch-Clamp-Messung als Auswärtsstrom dargestellt wurde. Die für  $\text{K}^+$  selektive Änderung der Leitfähigkeit der Membran mit vermehrtem Verlust intrazellulärer positiver Ladungen, bedingt durch den Konzentrationsgradienten, führte zu einer leichten Hyperpolarisation der Zelle. Nach dem Wechsel der Badlösung mit Austausch des extrazellulären  $\text{Na}^+$  gegen  $\text{K}^+$  ging der Gradient für  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  verloren, was wiederum eine Depolarisation der Zelle sowie einen Ausgleich des Verhältnisses der Ein- und Auswärtsströme bei gleicher Konzentration von  $\text{K}^+$  intra- und extrazellulär verursachte.

Anders als bei den Kontrollexperimenten mit DMSO ohne ionotrope Substanzen wurde durch den Badwechsel zu  $K^+$ -Lösung kein endogener Auswärtsstrom aktiviert, was zu der Vermutung führt, dass der Reiz, der zur Aktivierung des nach außen rektifizierenden endogenen Stroms verantwortlich ist, durch die  $K^+$ -Permeabilität unterbunden wird.

### 5.2.2 Substanz 1

#### 5.2.2.1 Whole-Cell-Patch-Clamp-Messungen

In den Experimenten in Gegenwart von Substanz 1 kam es in 80% der Messungen zu einem signifikanten Anstieg der Stromdichte. 20% der untersuchten Zellen zeigten in den Whole-Cell-Patch-Clamp-Messungen keine elektrophysiologische Antwort auf Substanz 1. Die Beobachtung, dass nur ein Teil der Zellen der gleichen Zellreihe auf die künstlichen Ionenkanäle reagierte, wurde bereits bei anderen auf der gA-Struktur basierenden Substanzen beschrieben. So zeigten nur 70% der bovinen Trabekelwerkszellen eine Reaktion auf das im Kapitel 1.2 vorgestellte Tetrahydrofuran-Gramicidin-Hybrid (THF-gA), welches als erste Verbindung ausgehend von der gA-Struktur eine elektrophysiologische Wirkung an lebenden Zellen aufwies.

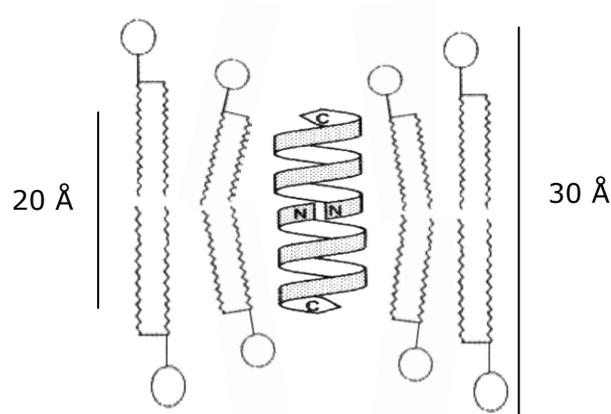
Lediglich 30% der Zellen zeigten eine Reaktion auf THF-gA-TBDPS, welches mit einer TBDPS-Schutzgruppe verbunden war. Die bedingte Ansprechbarkeit der Trabekelwerkszellen wurde einerseits auf einen erschwerten Einbau der THF-gA-TBDPS-Kanäle bedingt durch die Interaktion der hydrophoben TBDPS-Gruppe mit den hydrophilen Phospholipidköpfen der Zellmembran zurückgeführt, andererseits auf eine variierende Zusammensetzung der Zellmembran der Zellgruppe. Die Unterschiede in der Zusammensetzung der Membran sind durch unterschiedliche Differenzierungsstadien der untersuchten Zellen erklärt. Der Differenzierungsgrad führt zu Änderungen der integralen Membranproteine, der Beschaffenheit der Glykokalix sowie zu einer Änderung des Zytoskeletts und damit auch der Zellform (Fidzinski, 2006).

Da die Bedingungen für den Einbau und die Funktion von Substanz 1 mit denen für das THF-gA-TBDPS zu vergleichen sind, lässt sich die Nonresponder-Rate von 20% auf die gleichen Ursachen zurückführen.

Eine 80%-ige Responder-Rate ist sogar gegenüber einer 30%-igen Responder-Rate bei THF-gA-TBDPS saturierend. Der Unterschied kann zum einen mit der Struktur von Substanz 1 erklärt werden, bei der anders als bei dem THF-gA die Manipulation am N-Terminus vorgenommen

wurde und nicht an dem für die Fixierung in der Membran entscheidenden C-Terminus des Gramacidin-A-Peptides. Zum anderen könnte die Membranstruktur der unterschiedlichen Zellarten für die Einbaurrate und Funktion der Substanzen eine wesentliche Rolle spielen.

Eine nicht diskutierte Ursache für eine geringere Einbaurrate könnte auch eine je nach Zelle und deren Differenzierungsgrad variierende Dicke der Membran sein. Eine Untersuchung von Minigramicidin an unterschiedlich dicken Black-Lipid-Layer-Membranen zeigte, dass ab einer bestimmten Membrandicke der Einbau nicht mehr möglich ist, da die Länge der gebildeten Pore nicht mehr ausreicht, um die Membran zu durchspannen (Abb. 5.1). Eine gewisse Differenz zwischen der Membrandicke und einem geringeren Längsdurchmesser der Pore kann über einen sog. Mismatch-Effekt ausgeglichen werden, bei dem die Phosphorlipide hin zu dem Peptid gebogen werden. Die benötigte Energie für die Verformung der Membran ist ab einer bestimmten Differenz des Membran- und Kanaldurchmessers zu groß, so dass ein Einbau in die Membran nicht mehr möglich ist (vgl. Al-Momani, 2004, Arndt et al., 2001).



**Abb. 5.1** Schematische Darstellung des Mismatch-Effektes von Mini-gA mit Angabe der Membranspannweite und des Längsdurchmessers der Mini-gA-Pore in Å (angepasst aus Al-Momani 2004)

Vergleicht man die Umkehrpotentiale vor und nach Applikation von Substanz **1**, zeigen sich im Mittelwert (bei jedoch großer Streubreite der Einzelwerte) keine signifikanten Änderungen. In den Gramacidin-A-Messungen kam es nach gA-Gabe ebenfalls zu keiner signifikanten Änderung des Umkehrpotentials. Bei einem geringen Unterschied der spezifischen Leitfähigkeit für  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$ , wie es für Substanz **1** und gA in planaren Membranen belegt wurde (Abb. 1.9), wäre durch den Einbau der Substanzen in die Zellmembran prinzipiell der Verlust des Gradienten für  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  mit einer daraus resultierenden Depolarisation der Zelle zu erwarten. In unserem Versuchsaufbau sind jedoch die physiologischen Bedingungen nicht exakt nachgeahmt. So steht das Zytosol in einem ständigen Austausch mit der Pipettenlösung, deren Volumen und damit auch Reservoir an geflüßten Salzen im Hinblick auf den Austausch über die Zellmembran und die Dauer der Experimente nahezu unerschöpflich ist. Damit kommt es während der Versuchszeit zu keiner ausreichend großen Ionenverschiebung über die Zellmembran, um den Gradienten zwischen Badlösung und Pipettenlösung zu verändern. Demzufolge ist die Ionenkonzentration intra- und extrazellulär während der gesamten Versuchsdauer trotz des Ionentransportes über die Membran in beiden Kompartimenten konstant. Wenn man sich dann die Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung anschaut (Abb. 5.2), ist die einzige Variable, die das Membranpotential vorliegend beeinflussen kann, die relative Membranpermeabilität für  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$ , wenn keine zusätzlichen endogenen  $\text{Cl}^-$ -Kanäle aktiviert werden.

$$V_m = \frac{RT}{F} \ln \left( \frac{p_K [\text{K}]_o + p_{\text{Na}} [\text{Na}]_o + p_{\text{Cl}} [\text{Cl}]_i}{p_K [\text{K}]_i + p_{\text{Na}} [\text{Na}]_i + p_{\text{Cl}} [\text{Cl}]_o} \right)$$

**Abb. 5.2** Die Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung mit  $V_m$ =Membranpotential,  $R$ = Allgemeine Gaskonstante ( $8,3143 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ ),  $T$ = Temperatur in Kelvin,  $F$ = Faraday-Konstante ( $F = 96485 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$ ),  $P$ = relative Permeabilität,  $[X]_o$ = Außenkonzentration,  $[X]_i$ = Innenkonzentration, ( $X = \text{Na}^+, \text{K}^+, \text{Cl}^-$ )

Bei den Gramacidin A Experimenten und bei den Messungen in Gegenwart von Substanz **1** kam es zu keiner signifikanten Verschiebung des Umkehrpotentials. Daraus kann man schließen, dass sich für  $\text{K}^+$  und  $\text{Na}^+$  die natürliche Permeabilität der CHO-Zellen im gleichen Verhältnis befindet wie die Leitfähigkeitsniveaus von gA und Substanz **1**.

Das Verhältnis der Ein- und Auswärtsströme in Gegenwart von Substanz **1** ist – wie bei Gramacidin A – ausgeglichen. In dieser Eigenschaft verhält sich Substanz **1** anders als das THF-gA. Unter Anwesenheit von THF-gA wurden signifikant größere Auswärts- wie Einwärtsströme beobachtet. Diese Eigenschaft wurde auf die Asymmetrie der THF-gA-Struktur und deren Neigung zur

bevorzugten Ausrichtung in einer nicht symmetrischen Zellmembran (extrazelluläre Glykokalix, asymmetrische Verteilung der Membranproteine) zurückgeführt. Bei Substanz **1** handelt es sich jedoch um eine symmetrische Struktur, bei der die für die Verankerung in der Membran wesentlichen C-Termini mit der Gramicidin-A-Struktur identisch sind, so dass Substanz **1** wie das Gramicidin A keine Polarität aufweist. Dies scheint somit die für THF-gA-Kanäle vermutete Erklärung für die Rektifikation seiner Ströme zu bestätigen.

Der Vergleich der Ergebnisse der DMSO-Kontrollreihe mit den Ergebnissen der Messreihe mit einer Applikation von Substanz **1** zeigt in Gegenwart von Substanz **1** eine signifikante Stromdichtezunahme um den Faktor 2,7. Vergleicht man erneut die in planaren Membranen gemessenen Leitfähigkeiten für Substanz **1** und Gramicidin A (Abb. 1.9), sieht man, dass die Leitfähigkeiten von Substanz **1** für  $K^+$  und  $Na^+$  im Vergleich zu Gramicidin A um das 25- bis 40-fache geringer sind.

Die zusätzlichen Etheraminosäuren, die einerseits die Selektivität des Kanals erhöhen, führen andererseits zu einer Drosselung der absoluten Leitfähigkeit der Pore, so dass bei Substanz **1** auch in Zellmembranen im Vergleich zu Gramicidin A von einer geringeren Aktivität auszugehen ist. Somit kann die geringere Stromdichtezunahme in Gegenwart von Substanz **1** gegenüber Gramicidin A mit der geringeren absoluten Leitfähigkeit sowie mit der geringeren Einbaurrate bedingt durch z.B. die TBPDS-Schutzgruppe (wie oben diskutiert) erklärt werden.

In den Untersuchungen in Black-Lipid-Layer-Membranen zeigte sich für Substanz **1** eine 6-fach höhere Leitfähigkeit für  $Cs^+$  wie für  $K^+$  (vgl. Kapitel 1.3.3). In der  $Cs^+$ -Patch-Clamp-Messreihe wurden nahezu alle einwertigen Kationen durch  $Cs^+$  ersetzt. In Gegenwart von Substanz **1** mit  $Cs^+$  als Hauptladungsträger wurden signifikant größere Ströme als unter physiologischen Bedingungen erwartet.

Erschwerend kam es jedoch in  $Cs^+$ -Bad- und Pipettenlösung (wie schon im Kapitel 5.1 beschrieben) zur Aktivierung endogener Kanäle. Unter den Kontrollbedingungen blieb der Strom bei hoher Aktivität stabil.

In den Experimenten mit Substanz **1** zeigte sich jedoch einige Sekunden nach der Applikation eine rapide Deaktivierung des endogenen Stroms. Damit konnte eine direkte Wirkung von Substanz **1** auf das elektrophysiologische Verhalten der Zelle beobachtet werden. Es ist anzunehmen, dass durch die Änderung der Leitfähigkeit der Zellmembran bedingt durch den Einbau von Substanz **1** der Mechanismus, der zur Aktivierung des endogenen Stroms führte, unterbrochen wird.

Die Induktion endogener Ströme durch den Badwechsel von  $Na^+/K^+$ -Badlösung zur  $K^+$ -Badlösung wurde in den Kontrollexperimenten, nicht jedoch in Gegenwart von Valinomycin beobachtet. Daraus wird erkennbar, dass die Änderung der Permeabilität der Zellmembran eine Auswirkung auf die Aktivierung endogener Kanäle hat.

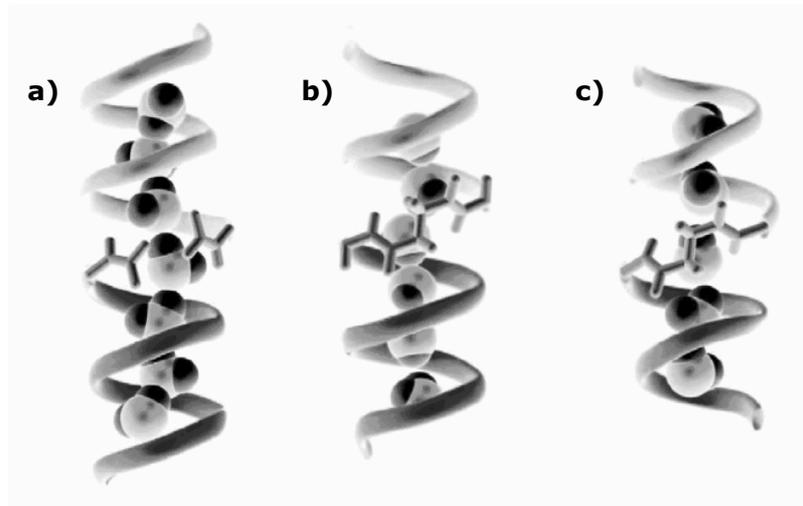
Aufgrund der Überlagerung der verschiedenen Ströme ist eine quantitative Zuordnung der Zellantwort auf Substanz **1** in Cs<sup>+</sup>-Lösung erschwert. Somit wurde zur quantitativen Auswertung der Bereich herangezogen, in dem die Cs<sup>+</sup> induzierte Reaktion nach der Gabe von Substanz **1** einen „steady-state“ erreichte. Die hier gemessenen Stromdichten wurden mit den Stromdichten verglichen, die bei der zweiten Reaktion mit erneutem Stromanstieg beobachtet wurden. So wurden zur quantitativen Auswertung die Stromdichten aus den Whole-Cell-Patch-Clamp-Messungen unter physiologischen Bedingungen herangezogen. Hier zeigten die Stromdichten der Cs<sup>+</sup>-Messreihe mit denen in Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-Lösung in fast allen Vergleichen signifikant höhere Werte, wie sie in Anbetracht der Selektivitätsreihenfolge von **1** mit Änderung der Leitfähigkeit der Membran zu erwarten waren.

### 5.2.2.2 Inside-Out-Patch-Clamp-Messungen

In den Inside-Out-Patch-Clamp-Messungen wurden Einzelkanalereignisse mit einer Amplitude von 0,4 pA und einer mittleren Offenzeit von 0,35 s beobachtet. Die Messungen in Black-Lipid-Layer-Membranen zeigten unter denselben Bedingungen sehr ähnliche Eigenschaften, so dass hier von der Aktivität desselben Ionenkanals gebildet durch Substanz **1** auszugehen ist. Damit gelang es erstmalig, die Messung der Aktivität eines künstlich hergestellten Ionenkanals als Einzelkanalereignis in tierischen Zellmembranen festzuhalten.

### 5.2.2.3 Volumenregulationsversuche

Anhand von Computersimulationen und anhand von Messungen an Black-Lipid-Layer-Membranen, bei denen die Änderungen der Osmolarität sowie der Ionenkonzentration aufgezeichnet wurden, konnte die Funktion der Gramicidin-A-Kanäle sowie der Linked-Mini-gA-Kanäle mit TBDPS-Schutzgruppen als Wasserpore nachgewiesen werden (vgl. Saparov et al., 2006).



**Abb. 5.3** Schematische Darstellung des Transportes von Wassermolekülen durch  
 a) zwei assoziierte gA-Monomere, b) über ein Linker kovalent verbundenes  
 Minigramicidin mit einem gA-Monomer und c) Link-Minigramicidin  
 (angepasst aus Saporov et al., 2006)

In den Experimenten mit hypoosmotischer Badlösung konnte erstmalig die Funktion eines auf der gA-Struktur basierenden künstlichen Kanals als ein Wasserkanal in lebenden Zellen nachgewiesen werden. Die Auswertung der Zelldurchmesser in Gegenwart von Substanz **1** in hypoosmotischer Badlösung ergab eine signifikante Zunahme der Zellgröße. Während die Zunahme der Leitfähigkeit der Membran nach einer gewissen Zeit ein Plateau ohne weitere Zunahme der Ströme erreichte, was die natürliche Fähigkeit der Zelle zur Volumenregulation unter diesen Bedingungen reflektiert, nahm die Zellschwellung kontinuierlich zu und führte in zwei von drei Fällen zum Platzen der Zellmembran. Dieser Effekt kann dadurch erklärt werden, dass der Einbau von Substanz **1** in die Zellmembran nach wenigen Minuten abgeschlossen ist bzw. sich in einem Gleichgewicht befindet, so dass die durch Substanz **1** veränderte Leitfähigkeit auf dem Niveau stabil bleibt. Ebenso ist der Mechanismus zur natürlichen Volumenregulation der Zelle aktiviert und bei gleichbleibenden Bedingungen stabil. Eine weitere Zunahme der Leitfähigkeit ist zu diesem Zeitpunkt nicht mehr zu erwarten. Die Zelle schwillt jedoch durch den anhaltenden Einstrom von Wasser über die neu eingebauten Wasserporen weiter an. Da die Zelle mit der Pipettenlösung in Verbindung steht, kommt es während der Versuchszeit trotz des einströmenden Wassers zu keinem Ausgleich des osmotischen Gradienten im Inneren der Zelle. Der permanente Wassereinstrom, der von der Zelle unter diesen Bedingungen nicht mehr kompensiert werden kann, führt zu einer Schwellung der Zelle bis zur Überschreitung der Aufnahmekapazität und dem Zerreißen der Zellmembran.

### 5.2.3 Substanz 2

In der Fluoreszenz-Messung gab es keinen Anhalt für den Einbau von Substanz **2** in die Membran der untersuchten CHO-Zellen. Obwohl ein robustes Fluoreszenzsignal aufgezeichnet werden konnte, ließ sich eine Anreicherung in der Zellmembran nicht nachweisen. Die elektrophysiologische Überwachung zeigte in Gegenwart von Substanz **2** ebenfalls keine Zunahme der Leitfähigkeit. Somit kann festgehalten werden, dass sich Substanz **2** nicht oder kaum in die Membran der CHO-Zellen einbaut. Sollte sich eine geringe, mit dem hier verwendeten Fluoreszenzverfahren nicht sichtbare Menge in die Membran einbauen, dann ist die Aktivität als Ionenkanal entweder nicht gegeben oder so gering, dass die Änderung der Leitfähigkeit mit der Whole-Cell-Patch-Clamp-Methode nicht wahrgenommen werden kann. Rückschlüsse auf die Ausgangssubstanz (vgl. Kap. 1.3.4) lassen sich nur bedingt treffen, da nicht klar ist, wie sich die relativ große angehängte Fluoreszenzgruppe auf den Einbau von Substanz **2** in die Membran auswirkt. Ein positiver Nachweis der Anreicherung von Substanz **2** in der Membran der CHO-Zellen hätte eine größere Aussagekraft. Mit einem positivem Ergebnis wäre die Vermutung eines Einbaus mit jedoch dem Verlust der ionotropen Eigenschaft der Ausgangssubstanz in lebenden Zellen bekräftigt.

Somit kann lediglich im Hinblick auf die Ausgangssubstanz von Substanz **2** gefolgert werden, dass der Einbau in die Membran als Ursache für die fehlende Funktion in lebenden Zellen wahrscheinlich ist.

### 5.2.4 Substanz 3

Substanz **3** ist, wie im Kapitel 1.3.5 beschrieben, ein Kronenether-gA-Hybrid mit einer höheren Selektivität für  $K^+$  als  $Cs^+$ , wobei die Leitfähigkeit und damit auch die Selektivität von der Beschaffenheit der Membran abhängig sind. Die höhere Leitfähigkeit für  $K^+$  gegenüber  $Na^+$  ist bei Substanz **3** stärker ausgeprägt als bei Gramicidin A und den anderen hier untersuchten porenbildenden Substanzen. Die absolute Leitfähigkeit von Substanz **3** in planaren Membranen ist für Kationen mit der von Gramicidin A vergleichbar (Pfeifer, 2005). In den hier durchgeführten Experimenten zeigten nur 18,75% der untersuchten Zellen eine mögliche Reaktion auf Substanz **3**. Damit ist Substanz **3** die Verbindung mit der geringsten Responder-Rate.

Bei einer in planaren Membranen dem Gramicidin A gleichwertiger absoluter Leitfähigkeit für Kationen, würde man bei einer Konzentration von Substanz **3** von  $10^{-6}$  mol/l einen ähnlich

fulminanten Stromanstieg wie bei den Gramacidin-Versuchen (vgl. Kap. 4.2) erwarten. Der hier beobachtete Effekt betrug jedoch nur 1/15 des Effekts von Gramacidin A bezogen auf die Zunahme der Gesamtstromdichte, trotz der höheren Konzentration von Substanz **3**. Somit muss davon ausgegangen werden, dass (unter der Annahme eines durch Substanz **3** verursachten Effektes) die absolute Leitfähigkeit in den Zellen im Vergleich zu planaren Membranen gedrosselt ist oder dass im Vergleich zu Gramacidin A eine geringere Menge von Kanälen in die Membran eingebaut wird.

Vergleicht man die Messungen in Gegenwart von Substanz **3** mit denen in Gegenwart von Valinomycin, zeigt sich in beiden Fällen insbesondere eine Zunahme der Auswärtsströme mit einer daraus resultierenden Hyperpolarisation der Zellen. Diese Beobachtung legt nahe, dass für diesen Effekt in beiden Fällen eine zusätzliche Permeabilität für  $K^+$  ursächlich ist, was zu den Eigenschaften von Substanz **3** als ein Kationenkanal mit höherer Selektivität für  $K^+$  als für  $Na^+$  passt. So beträgt die relative Permeabilität von  $K^+$  bezogen auf  $Na^+$  in DOPC-Membranen für Substanz **3** den Wert 1,98 während sie für gA bei 1,44 liegt, wobei die Permeabilitätsverhältnisse stark von der Beschaffenheit der Membran abhängen (vgl. Kapitel 1.3.5).

Bei dem Badwechsel zu  $K^+$ -Badlösung zeigte sich, wie bei den Kontrollmessungen mit DMSO, eine Aktivierung von endogenen Kanälen, die zu einem massiven Anstieg des Auswärtsstromes führte. Solch ein Ereignis wurde in Gegenwart von Valinomycin nicht beobachtet. Wie im Kapitel 5.2.1 diskutiert, ist höchst wahrscheinlich die zusätzliche Permeabilität der Membran für die Hemmung der Mechanismen verantwortlich. Unter dieser Annahme würde die Beobachtung der Aktivierung von endogenen Strömen gegen eine durch Substanz **3** verursachte Erhöhung der Permeabilität für  $K^+$  sprechen. Hierbei bleibt jedoch zu bedenken, dass Substanz **3** zwar eine höhere Selektivität für  $K^+$  als für  $Na^+$  besitzt. Diese ist aber nicht mit der hohen Selektivität für  $K^+$  von Valinomycin zu vergleichen, so dass auch hier nicht eine gleichwertige Reaktion zu erwarten ist.

### 5.3 Zusammenfassung

In Gegenwart von Substanz **1** konnten in drei verschiedenen Versuchsmodulen Änderungen des elektrophysiologischen Verhaltens der CHO-Zellen bzw. deren Membranleitfähigkeit beobachtet werden. Hieraus kann abgeleitet werden, dass Substanz **1** als ein künstlicher Ionenkanal in lebenden Zellen fungiert. Die höhere Selektivität, die durch die Etheraminsäuren erreicht wurde, hat unter physiologischen Bedingungen keine hohe Relevanz, da das Verhältnis der Leitniveaus für die wichtigsten einwertigen Kationen – nämlich  $Na^+$  und  $K^+$  – kaum verändert wurde. Die

Resultate dürften jedoch einen Erfahrungszugewinn auf dem Weg zur Entwicklung neuer Substanzen mit neuen Selektivitätseigenschaften bedeuten. Die herausragendste Eigenschaft von Substanz **1** ist die durch die Etheraminsäuren hervorgerufene Drosselung der absoluten Leitfähigkeit, was dazu führt, dass die durch Substanz **1** hervorgerufenen Änderungen an der Membranleitfähigkeit nicht zum Zelltod führen. Damit ist die zytotoxische Wirkung von Gramacidin A aufgehoben und der wichtigste Schritt zur Anwendung der Substanzen in der Medizin geschaffen. Durch die Funktion als Wasserpore ergeben sich neue Möglichkeiten für den Einsatz von porenbildenden gA-Derivaten. So wäre zum Beispiel denkbar, durch eine weitere Drosselung der absoluten Leitfähigkeit eine Verbindung herzustellen, die keine ionotrope Eigenschaft mehr besitzt und nur noch als Wasserpore funktioniert. Eine solche Substanz ist möglicherweise bereits synthetisiert. Im Rahmen der Entwicklung von Substanz **1** wurden auch Substanzen getestet, die 4 und 6 Etheraminosäuren in der Mitte der Pore besitzen. Für diese Substanzen konnte lediglich die Funktion als kurzlebiger Protonenkanal nachgewiesen werden (Arndt, 2001). Sollten die Verbindungen in lebenden Zellen ebenfalls als Wasserpore funktionieren, hätte man ein künstliches, von extrazellulär applizierbares Aquaporin zur Verfügung. Eine mögliche Anwendung einer solchen Verbindung ist zum Beispiel in der Dermatologie vorstellbar. So ist bekannt, dass insbesondere die Alterung der Haut und Schäden durch chronische Sonneneinstrahlung mit verringerter Expression von Aquaporinen einhergeht (Demus et al., 2007). Hier könnte der Verlust durch ein von extern applizierbares Aquaporin kompensiert werden. In der Augenheilkunde wird ebenfalls der Verlust von Aquaporinen in den Linsenepithelzellen mit der Entstehung des Katarakts diskutiert (Ruiz-Ederra et al., 2006). Auch hier wäre der Einsatz eines künstlichen Aquaporins vorstellbar.

Die hier durchgeführten Untersuchungen zur Klärung des Einbaus von Substanz **2** und dessen Ausgangssubstanz haben keine Ergebnisse geliefert, die eine zufriedenstellende Antwort bieten. Um zu klären, ob die fehlende Funktion der ionotropen Substanzen in lebenden Zellen durch den fehlenden Einbau oder durch deren Funktionsverlust bedingt ist, müssten noch weitere Untersuchungen folgen. Denkbar wäre zum Beispiel eine Darstellung von Membranfragmenten mittels eines Elektronenmikroskops, bei denen die verwendeten Polypeptide ggf. direkt in der Membran identifiziert werden könnten.

Bei der Substanz **3** gibt es Hinweise für deren Funktion als Ionenkanal mit einer gewissen  $K^+$ -Selektivität in lebenden Zellen. Des Weiteren gab es auch bei Substanz **3** keine Hinweise für eine Zytotoxizität. Damit könnte es sich um eine für die Elektrophysiologie sehr interessante Verbindung handeln, deren Hauptwirkungsspektrum sich im Bereich der natürlich vorkommenden Ionenzusammensetzung befindet. Aufgrund der geringen Responder-Rate müssten zur weiteren Klärung der Funktion größere Messreihen folgen.

## 5. Diskussion

Desweiteren sollte in neuen Experimenten geklärt werden, welche Eigenschaften der Zellmembran den Einbau bzw. die Funktion der Substanzen begünstigen. Die Erkenntnisse könnten dann genutzt werden, um die Wirkung einer Substanz auf bestimmte Zellen zu beschränken. So wäre zum Beispiel in der Medizin bei einer systemischen Gabe des Stoffes eine isolierte Wirkung am Zielorgan möglich.

**Tab. 5.1** Tabelle mit zusammengefassten Eigenschaften der verwendeten Substanzen

| Substanz    | Einbaurrate | Selektivität   | Zytotoxizität | Wasserpore |
|-------------|-------------|--|---------------|------------|
| gA          | 100%        | schwach<br>(Cs <sup>+</sup> >Rb <sup>+</sup> >K <sup>+</sup> >Na <sup>+</sup> >Li <sup>+</sup> ) | ja            | ja         |
| Valinomycin | 100%        | Sehr hoch<br>(K <sup>+</sup> )   | ja            | nein       |
| <b>1</b>    | 80%         | mittel<br>(Cs <sup>+</sup> >Rb <sup>+</sup> >K <sup>+</sup> >Na <sup>+</sup> >Li <sup>+</sup> )  | nein          | ja         |
| <b>2</b>    | 0%          | keine  | nein          | nein       |
| <b>3</b>    | 18,75%      | mittel – hoch<br>(Rb <sup>+</sup> >K <sup>+</sup> >Cs <sup>+</sup> >Na <sup>+</sup> )            | nein          | ?          |

Anhand der vorliegenden Forschungsergebnisse kann die Arbeit an künstlichen porenbildenden Substanzen als eine Grundlagenforschung betrachtet werden, die sich kurz vor dem Durchbruch zur praktischen Anwendung befindet. Somit sollte dem Forschungsgebiet eine weitere nachhaltige Aufmerksamkeit gewidmet werden.

## 6 Literaturverzeichnis

- Ackerman MJ & Clapham DE (1997) Ion channels--basic science and clinical disease. *N Engl J Med* 336: 1575–1586
- Agre P, King LS, Yasui M, Guggino WB, Ottersen OP, Fujiyoshi Y, Engel A & Nielsen S (2002) Aquaporin water channels--from atomic structure to clinical medicine. *J. Physiol. (Lond.)* 542: 3–16
- Agre P, Lee MD, Devidas S & Guggino WB (1997) Aquaporins and ion conductance. *Science* 275: 1490–author reply 1492
- al-Momani L (2004) Synthesis, Structural and Functional Analysis of Membrane Permanent Ion Channels. Dissertation am Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg
- Arndt H-D, Knoll A & Koert U (2001a) Cyclohexylether delta-Amino Acids: New Leads for Selectivity Filters in Ion Channels. *Angew Chem Int Ed Engl* 40: 2076–2078
- Arndt H-D, Vescovi A, Schrey A, Schrey A, Pfeifer JR & Koert U (2002) Solution phase synthesis and purification of the minigramicidin ion channels and a succinyl-linked gramicidin. *Tetrahedron* 58: 2789–2801
- Arndt HD, Knoll A & Koert U (2001b) Synthesis of minigramicidin ion channels and test of their hydrophobic match with the membrane. *ChemBioChem* 2: 221–223
- Berg JM, Tymoczko JL & Stryer L (2009) Stryer Biochemie (German Edition). 6th ed Spektrum Akademischer Verlag
- Cook NS (1990) Potassium Channels: Structure, Classification, Function and Therapeutic Potential (Ellis Horwood series in pharmaceutical technology). Ellis Horwood Ltd
- de Groot BL & Grubmüller H (2005) The dynamics and energetics of water permeation and proton exclusion in aquaporins. *Curr Opin Struct Biol* 15: 176–183
- Dumas M, Sadick NS, Noblesse E, Juan M, Lachmann-Weber N, Boury-Jamot M, Sougrat R, Verbavatz JM, Schnebert S & Bonté F (2007) Hydrating skin by stimulating biosynthesis of aquaporins. *J Drugs Dermatol* 6: s20–4
- Fidzinski P (2006) Elektrophysiologische Charakterisierung künstlicher Ionenkanäle in lebenden Zellen. Dissertation am Institut für Klinische Physiologie der Medizinischen Fakultät der Charité-Universitätsmedizin Berlin
- Frings S & Baumann R (2000) Vorlesungsskript Zoophysiologie. Institut für Biologische Informationsverarbeitung Forschungszentrum Jülich
- Fyles TM (2007) Synthetic ion channels in bilayer membranes. *Chem Soc Rev* 36: 335–347
- Garcia A & Lodish H (1989) Lysine-539 of Human Band-3 Is Not Essential for Ion-Transport or Inhibition by Stilbene Disulfonates. *Journal of Biological Chemistry* 264: 19607–19613
- Gerencser G, Robbins F, Zhang H & Ahearn G (2004) Electrogenic proton-regulated oxalate/chloride exchange by lobster hepatopancreatic brush-border membrane vesicles. *J Exp Biol* 207: 571–578

- Gokel GW, Ferdani R, Liu J, Pajewski R, Shabany H & Uetrecht P (2001) Hydrapile channels: models for transmembrane, cation-conducting transporters. *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* 7: 33–39
- Hotchkiss RD & Dubos RJ (1940) Fractionation of the bactericidal agent from cultures of a soil bacillus. *J Biol Chem* 132: 791
- Karow T & Lang-Roth R (2004) *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 13th ed. Pulheim: Dr med Thomas Karow
- Klinke R & Bauer C (2005) *Physiologie*. 5th ed Georg Thieme Verlag
- Koert U (2004) Synthetic ion channels. *Bioorg Med Chem* 12: 1277
- Leevy WM, Gammon ST, Levchenko T, Daranciang DD, Murillo O, Torchilin V, Piwnica-Worms D, Huettner JE & Gokel GW (2005) Structure-activity relationships, kinetics, selectivity, and mechanistic studies of synthetic hydrapile channels in bacterial and mammalian cells. *Org Biomol Chem* 3: 3544–3550
- Leevy WM, Huettner JE, Pajewski R, Schlesinger PH & Gokel GW (2004) Synthetic ion channel activity documented by electrophysiological methods in living cells. *J Am Chem Soc* 126: 15747–15753
- Lehmann-Horn F & Jurkat-Rott K (1999) Voltage-gated ion channels and hereditary disease. *Physiol Rev* 79: 1317–1372
- Lerche H, Mitrovic N, Jurkat-Rott K & Lehmann-Horn F (2000) Ionenkanalerkrankungen- allgemeine Charakteristika und Pathomechanismen. 26th ed Deutsches Ärzteblatt
- Liedtke W & Kim C (2005) Functionality of the TRPV subfamily of TRP ion channels: add mechano-TRP and osmo-TRP to the lexicon! *Cell Mol Life Sci* 62: 2985–3001
- Molleman A (2003) *Patch Clamping*. Wiley
- Novartis Foundation; Novartis Foundation Symposium (1999) *Gramicidin and Related Ion Channel-Forming Peptides* 1<sup>st</sup> ed. Wiley
- Numberger M & Draguhn A (1996) *Patch-Clamp-Technik*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag
- Pfeifer JR, Reiß P & Koert U (2006) Ionenkanäle aus Kronenether-Gramicidin-Hybriden: Ionenselektivität durch Unterstützung des Dehydratationsvorgangs. *Angewandte Chemie* 118: 515–518
- Reymann J, Baddeley D, Gunkel M, Lemmer P, Stadter W, Jegou T, Rippe K, Cremer C & Birk U (2008) High-precision structural analysis of subnuclear complexes in fixed and live cells via spatially modulated illumination (SMI) microscopy. *Chromosome Res.* 16: 367–382
- Romero M, Sánchez I & Pujol MD (2003) New advances in the field of calcium channel antagonists: cardiovascular effects and structure-activity relationships. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents* 1: 113–141
- Rosenthal R (2000) L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanal, FGF-Rezeptor 2 und Pathomechanismen der retinalen Dystrophie. Dissertation am Institut für Klinische Physiologie, Fachbereich Humanmedizin, Freien Universität Berlin
- Ruiz-Ederra J & Verkman AS (2006) Accelerated cataract formation and reduced lens epithelial water permeability in aquaporin-1-deficient mice. *Invest. Ophthalmol. Vis Sci* 47: 3960–3967

## 6. Literaturverzeichnis

- Sakai N & Matile S (2003) Synthetic multifunctional pores: lessons from rigid-rod beta-barrels. *Chem Commun (Camb)* 2514–2523
- Schlesinger P, Ferdani R, Liu J, Pajewska J, Pajewski R, Saito M, Shabany H & Gokel G (2002) SCMTR: A chloride-selective, membrane-anchored peptide channel that exhibits voltage gating. *J Am Chem Soc* 124: 1848–1849
- Schmidt K (1998) Charakterisierung spannungsabhängiger Kaliumkanäle an glialen Vorläuferzellen der Maus. Dissertation an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät, Institut für Biologie, Humboldt-Universität zu Berlin
- Schmidt RF, Lang F & Bücher MH (2004) *Physiologie des Menschen* 29th ed Springer Berlin Heidelberg
- SIGMA-Aldrich: Product information No. G 5002; GRAMICIDIN from *Bacillus brevis*
- SIGMA-Aldrich: Product information No. V 3639; Valinomycin Ready Made Solution
- Sommer A (2003) Erhobene Forschungsergebnisse zur Prüfung der elektrophysiologischen Wirkung von künstlichen Ionenkanälen auf bovine Trabekelwerkszellen; die Untersuchungen erfolgten am Institut der experimentellen Ophthalmologie der Universität Hamburg unter der Leitung von Prof Olaf Strauss. Ergebnisse sind zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit noch nicht veröffentlicht.
- The amphotericin B-cholesterol pore model (2004). *Kidney Int* 66: i–i
- Verkman AS (2005) More than just water channels: unexpected cellular roles of aquaporins. *J Cell Sci* 118: 3225–3232
- Wallace BA (1998) Recent Advances in the High Resolution Structures of Bacterial Channels: Gramicidin A. *J Struct Biol* 121: 123–141
- Wallace BA (2000) Common structural features in gramicidin and other ion channels. *Bioessays* 22: 227–234
- Xie X, Al-Momani L, Reiß P, Griesinger C & Koert U (2005) An asymmetric ion channel derived from gramicidin A. Synthesis, function and NMR structure. *FEBS J.* 272: 975–986

## 7 Abkürzungsverzeichnis

|                  |   |
|------------------|---|
| ADH              | Antidiuretisches Hormon   |
| AD/DA            | Analog-Digital / Digital-Analog                                       |
| AgCl             | Silberchlorid   |
| Ala              | Alanin  |
| ATP              | Adenosintriphosphat   |
| AQP1             | Aquaporins 1  |
| CHO              | Chinese Hamster Ovary   |
| DH               | Doppelhelix   |
| DOPC             | 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholin                               |
| DPhPC            | 1,2-Diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholin                            |
| DPhPG            | 1,2-Diphytanoyl-snglycero-3-[phospho-rac-(1-glycerin)]                |
| DNA              | Deoxyribonucleic Acid   |
| EGTA             | Ethylenglycol-bis( $\beta$ -aminoethylether)N,N,N',N'-tetraessigsäure |
| FKS              | Fetales Kälberserum   |
| gA               | Gramicidin A  |
| Gly              | Glycin  |
| G $\Omega$ -Seal | Gigaohm-Seal  |
| HD               | Helixdimer  |
| HEPES            | N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure                       |
| I                | Elektrischer Strom  |
| I-aus            | Auswärtsstrom   |
| I-ein            | Einwärtsstrom   |
| I-gesamt         | Gesamtstrom   |
| Leu              | Leucin  |
| MEM              | Modified Eagle's minimal essential medium                             |
| OPA              | Operationsverstärker  |
| PBS              | Phosphate buffered Saline   |
| PKA              | Proteinkinase A   |
| P <sub>rel</sub> | Relative Permeabilität  |
| R                | Elektrischer Widerstand   |
| QT               | Abstand im EKG zwischen der Q-Zacke und dem Ende der T-Welle          |
| SEM              | Standardfehler  |
| TBDPS            | <i>t</i> -Butyldiphenylsilyl  |
| THF              | Tetrahydrofuran   |
| THF-gram         | Tetrahydrofuran-Gramicidin-Hybrid                                     |
| TRIS             | Tris(hydroxymethyl)aminomethan  |
| TRP              | Tryptophan  |
| TRP              | transient receptor potential  |
| U                | Elektrische Spannung  |
| Val              | Valin   |
| Vol              | Volumen   |

8 Danksagung

Insbesondere möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Olaf Strauß für die Bereitstellung des Themas, die ausgezeichnete Betreuung während der gesamten Zeit und die freundschaftliche Atmosphäre, die stets vorherrschte, bedanken.

Einen großen Dank möchte ich auch an Dr. Robert Bähring richten, der sich bereit erklärte, den Vorsitz des Prüfungsausschusses zu übernehmen.

Desweiteren möchte ich einen Dank an die gesamte Arbeitsgruppe der Experimentellen Ophthalmologie aussprechen für die Unterstützung und Hilfsbereitschaft. Dabei gilt ein besonderer Dank Dr. Sönke Wimmers für die einwandfreie methodische Einarbeitung.

Für die Zusammenarbeit und Bereitstellung der gA-Hybrid-Kanäle möchte ich mich bei Prof. Ulrich Koert und seiner Arbeitsgruppe an der Philipps-Universität Marburg bedanken.

Prof. Jürgen Schwarz und seiner Arbeitsgruppe möchte ich für die Bereitstellung der in den Experimenten verwendeten CHO-Zellen danken.

Zuletzt gilt ein großer Dank meiner gesamten Familie, die mich stets und bis heute bei meinem Werdegang unterstützt.

## 9 Lebenslauf

Zur Person

---

Geburtsdatum: 09. April 1979  
 Geburtsort: Wroclaw / Polen  
 Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulische Ausbildung

---

1990-1999 Sachsenwald Gymnasium, Reinbek  
 1989-1990 Grundschule Klosterbergen, Reinbek  
 1986-1989 Grundschule, Wroclaw

Medizinstudium

---

06/2007 erfolgreich abgelegter zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
 2002-2007 klinischer Studienabschnitt  
 03/2002 erfolgreich abgelegter erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
 2000-2002 vorklinischer Studienabschnitt

Wissenschaftliche Arbeit

---

2004-2007 experimentelle Doktorarbeit an der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde,  
 Bereich Experimentelle Ophthalmologie  
 04/2007 Veröffentlichung der Forschungsergebnisse:  
 Wesolowski R, Sommer A, Arndt HD, Koert U, Reiss P,  
 Wimmers S, Strauss O.  
 Functional studies of synthetic gramicidin hybrid ion channels in CHO cells.  
 Chembiochem. 2007 Mar 26;8(5):513-20.

Berufstätigkeit

---

seit 01/2008 Assistenzarzt der kardiologischen Abteilung der Asklepios Klinik Nord Hamburg

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: .....