

2. Material

2.1 Kardiomyozytenpaare

Es wurden Herzmuskelzellpaare von männlichen erwachsenen Meerschweinchen, Stamm: „Bunte“ (Firma Hundepohl, Hasbergen, Germany) mit einem Körpergewicht zwischen 250 – 350g verwendet.

2.2 Substanzen

Im Rahmen der Doktorarbeit fanden folgende Substanzen Verwendung:

Adenosintriphosphat, Magnesiumsalz (Mg-ATP)	MG = 507,2 (Sigma, Deisenhofen)
Adenosintriphosphat, di-Natriumsalz (Na ₂ -ATP)	MG = 551,1 (Sigma, Deisenhofen)
Antiarrhythmisches Peptid 10 (AAP10) (NH ₂ -Gly-Ala-Gly-4Hyp-Pro-Tyr-COOH)	MG = 575,6 (Eigensynthese)
Bariumchlorid (BaCl ₂ * 2H ₂ O)	MG = 244,3 (Sigma, Deisenhofen)
Bovine Serum Albumin (BSA)	(Sigma, Deisenhofen)
Cäsiumchlorid (CsCl)	MG = 168,36 (Merck, Darmstadt)
Cäsiumhydroxid (CsOH * H ₂ O)	MG = 167,9 (Sigma, Deisenhofen)
Calciumchlorid (CaCl ₂)	MG = 147,02 (Merck, Darmstadt)
CGP 54345	MG = 317,2 (Novartis, Basel)
Dimethylsulfoxid (DMSO, 99,5%)	MG = 78,13 (Merck, Darmstadt)
3,6-Dioxaoctanethylendinitrilotetraessigsäure (EGTA, =Titriplex 4)	MG = 380,35 (Merck, Darmstadt)
Ethanol (C ₂ H ₅ OH, 99,6%)	MG = 46,07 (Roth, Karlsruhe)

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	MG = 292,2 (Sigma, Deisenhofen)
D(+) Glucose-Monohydrat (C ₆ H ₁₂ O ₆ * H ₂ O)	MG = 198,17 (Merck, Darmstadt)
L-Glutaminsäure, Kaliumsalz (C ₅ H ₈ NO ₄ K)	MG = 185,2 (Sigma, Deisenhofen)
Guanosintriphosphat, di-Natriumsalz (Na ₂ -GTP)	MG = 603,18 (Fluka, Buchs)
Heparin-Natrium	169.000 I.E./g (Serva, Heidelberg)
2,2',3,3',4,4'-Hexahydroxy-1,1'-biphenyl-6,6'-dimethanol- dimethylether (HBDDE)	MG = 338,3 (Biomol, Hamburg)
(N-[2-Hydroxyethyl]piperazinyl-N'-[2-ethansulfonsäure]) (HEPES)	MG = 260,28 (Merck, Darmstadt)
Kaliumchlorid (KCL)	MG = 74,56 (Merck, Darmstadt)
Kollagenase (Typ CLS II)	331 U/mg (Biochrom, Berlin)
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	MG = 203,3 (Merck, Darmstadt)
Methanol (CH ₃ OH, 99,9%)	MG = 32,04 (Fluka, Buchs)
Monensin, Natriumsalz	MG = 692,9 (Sigma, Deisenhofen)
Natriumchlorid (NaCl)	MG = 58,44 (Merck, Darmstadt)
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	MG = 137,99 (Merck, Darmstadt)
Natriumhydroxid (NaOH)	MG = 40,0 (Merck, Darmstadt)
Salzsäure (HCL, 37%)	MG = 36,46 Merck, Darmstadt)
Sauerstoff für medizinische Zwecke (O ₂ , 100%)	(Messer Griesheim GmbH Frankfurt am Main)

2.3 Lösungen

Die zur Durchführung der Experimente hergestellten Lösungen hatten folgende Zusammensetzungen:

2.3.1 Lösungen zur Isolierung von Kardiomyozytenpaaren

Tyrodellösung mit Calcium (pH 7,4)

135mM NaCl	7,889g/l
4mM KCL	298mg/l
2mM CaCl ₂	294mg/l
1mM MgCl ₂	203mg/l
0,33mM NaH ₂ PO ₄	46mg/l
10mM HEPES	2,603g/l
10mM Glucose	1,982g/l

Die Lösung wurde wöchentlich neu angesetzt und bei 4°C aufbewahrt.

Tyrodellösung ohne Calcium (pH 7,4)

135mM NaCl	7,889g/l
4mM KCl	298mg/l
1mM MgCl ₂	203mg/l
0,33mM NaH ₂ PO ₄	46mg/l
10mM HEPES	2,603g/l
10mM Glucose	1,982g/l

Die Lösung wurde wöchentlich neu angesetzt und bei 4°C aufbewahrt.

Kaliumglutamatlösung (pH 7,4)

120mM K-Glutamat	22,232g/l
20mM NaCl	1,169g/l
1mM MgCl ₂	203mg/l
10mM HEPES	2,603g/l
10mM Glucose	1,982g/l

Die Lösung wurde wöchentlich neu angesetzt und bei 4°C aufbewahrt.

Kollagenaselösung

70ml Kaliumglutamatlösung wurden mit :

70mg BSA (1mg/ml)
 6000 IU Kollagenase (18mg von 331 U/mg Kollagenase)
 25 μ M CaCl₂ (17,5 μ l vom 100mM CaCl₂-Stamm) versetzt.
 Die Lösung wurde vor jedem Versuch neu angesetzt.

Heparin-Natrium-Lösung

147,92mg der Substanz wurden in 25ml 0,9% NaCl-Lösung gelöst. Dies entsprach einer Konzentration von 1000 I.E./ml. Die Lösung wurde wöchentlich neu angesetzt und bei 4°C aufbewahrt.

CaCl₂-Stamm 100mM

Es wurden 147mg CaCl₂ in 10ml Aqua dest. gelöst. Die Lösung wurde wöchentlich neu angesetzt und bei 4°C aufbewahrt.

2.3.2 Extrazelluläre Badlösung für Patch-Clamp (pH 7,4)

135mM NaCl	7,889g/l
4mM KCL	298mg/l
2mM CaCl ₂	294mg/l
1mM MgCl ₂	203mg/l
0,33mM NaH ₂ PO ₄	46mg/l
10mM HEPES	2,603g/l
10mM Glucose	1,982g/l
1mM BaCl ₂	244mg/l

Die Lösung wurde wöchentlich neu angesetzt und bei 4°C aufbewahrt.

2.3.3 Intrazelluläre Pipettenlösung für Patch-Clamp (pH 7,2)

125mM CsCl	21,045g/l
8mM NaCl	468mg/l
1mM CaCl ₂	147mg/l
10mM EGTA	3,804g/l
10mM HEPES	2,603g/l
2mM Na ₂ ATP	1,102g/l
3mM MgATP	1,522g/l
0,1 mM Na ₂ GTP	60mg/l

Die Pipettenlösung wurde bei -21°C aufbewahrt.

2.4 Pharmaka

In Abhängigkeit des Versuchsprotokolls wurde der Pipettenlösung der entsprechende Inhibitor folgendermaßen zugesetzt:

HBDDE	Endkonzentration: $50\mu\text{M}$ blockiert isoformspezifisch die $\text{PKC}\alpha$ (IC_{50} : $43\mu\text{M}$) und die $\text{PKC}\gamma$ (IC_{50} : $50\mu\text{M}$) [Kashiwada et al. 1994] Stammlösung: 1mM (1mg in $2,9\text{ml}$ Aqua dest. gelöst) Mischungsverhältnis mit der Pipettenlösung: 1:20
CGP 54345	Endkonzentration: $10\mu\text{M}$ blockiert isoformspezifisch die $\text{PKC}\alpha$ (IC_{50} : $5,8\mu\text{M}$) [Zimmermann et al. 1994, Hofmann 1997] Stammlösung 10mM (10mg in $3,1\text{ml}$ DMSO gelöst) Mischungsverhältnis mit der Pipettenlösung: 1:1000
Monensin	Endkonzentration: $2\mu\text{M}$ blockiert die Transportvesikel des trans-Golgi-Apparates und verhindert somit den Einbau von Proteinen in die Zellmembran [Puranam et al. 1993] Stammlösung: 1mM (1mg in $1,4\text{ml}$ DMSO gelöst) Mischungsverhältnis mit der Pipettenlösung: 1:500

2.5 Aufbau des Patch-Clamp-Meßstandes

Aus der Abbildung 3 ist ersichtlich, daß der Patch-Clamp-Meßstand aus verschiedenen Komponenten zusammengesetzt war. Zwei Elektroden sind für die Bestimmung des Membranpotentials notwendig. Die Badelektrode verband die Badlösung mit dem Erdleiter und definierte somit das Potential des Bades als das Potential Null. Die Elektrode am Pipettenhalter verband die Pipettenlösung mit dem hochempfindlichen Vorverstärker („headstage“), und stellte somit den elektrischen Kontakt zur Zellmembran her. Der Vorverstärkerausgang war mit dem „headstage input“ des Hauptverstärkers (SEC-05L, NPI electronics GmbH, Tamm, Germany) verbunden. Es ist zu beachten, daß je Zelle des zu messenden Zellpaares mit einer eigene Elektrode, Vorverstärker und Hauptverstärker verbunden war, und somit diese Komponenten doppelt vorhanden waren. Ein Computer war über eine NI-DAQ Schnittstelle (enthält den AD/DA-Wandler und ein Zeitgeber) (Lab-PC+, National Instruments, Austin, USA) mittels einer „Breakout Box“ (INT 10, NPI electronics

GmbH, Tamm, Germany) mit dem Meßsetup verbunden. Der Computer arbeitete mit zwei speziellen Patch-Clamp-Programmen und erfüllte somit mehrere Aufgaben:

1. Speicherung der digitalisierten Meßwerte auf Festplatte
2. Sicherung der digitalisierten Meßwerte auf Zipdiskette (Z100P2, Iomega, Dublin, Irland)
3. Auswertung der Meßwerte mit Hilfe der Patch-Clamp-Software (Egg Works Reader 302, NPI electronics GmbH, Tamm, Germany)
4. Erzeugung programmierter Spannungspulse (Stimulationsgerät) mit Hilfe der Patch-Clamp-Software (Egg Works 302, NPI electronics GmbH, Tamm, Germany)
5. Triggerquelle für Speicheroszilloskope

Zur Visualisierung der Signale standen insgesamt drei Oszilloskope zur Verfügung: zwei Speicheroszilloskope (TDS 210, Tektronix, Beaverton, USA) für Spannungs- und Strommessung beider Zellen, und ein konventionelles Oszilloskop (OS-9020G Goldstar, Korea) für die Darstellung der Elektrodenpotentiale.

Die Perfusion des Bades erfolgte mittels einer Peristaltikpumpe (VP, Ismatec, Zürich, Schweiz), die den Zufluß, und den an der gegenüberliegenden Seite gelegenen Abfluß, regelte. Die Temperatur des Perfusats konnte durch ein temperierbares Wasserbad am Thermostat (MT/2, Lauda, Königshofen, Germany) auf einen gewünschten Wert voreingestellt werden.

Die Benutzung einer hochauflösenden Optik und die Steuerung der Pipetten durch Mikromanipulatoren waren Voraussetzung für ein exaktes Plazieren der Pipette auf der Zellmembran. Dafür wurde ein inverses Lichtmikroskop (maximal 400fache Vergrößerung) (Axiovert, Zeiss, Jena, Germany) mit einer Phasenkontrasteinrichtung verwendet.

Mikromanipulatoren ermöglichten die Steuerung der Pipette in drei Richtungen des Raumes. Die Horizontale und die Tiefe wurden manuell, mit mechanisch arbeitenden Mikromanipulatoren eingestellt. Die vertikale Ebene wurde für das „Andocken“ der Pipette an die Zellmembran, mit ferngesteuerten, elektrisch arbeitenden Mikromanipulatoren mit Stellmotor (Mini 25, Luigs+Neumann, Ratingen, Germany) angefahren.

Wegen des sehr erschütterungsempfindlichen Kontaktes zwischen Zellmembran und Pipette (Seal), wurde der Mikroskopisch mit seinen Aufbauten auf einer gummipuffergelagerten massiven Betonplatte montiert.

Die hochempfindlichen elektronischen Komponenten (headstages) sind gegenüber externen elektrischen Störsignalen sehr empfindlich (rauschen und brummen). Aus diesem Grund umgab ein Faradayscher Käfig den Mikrospektisch. Alle elektronischen Teile waren geerdet.

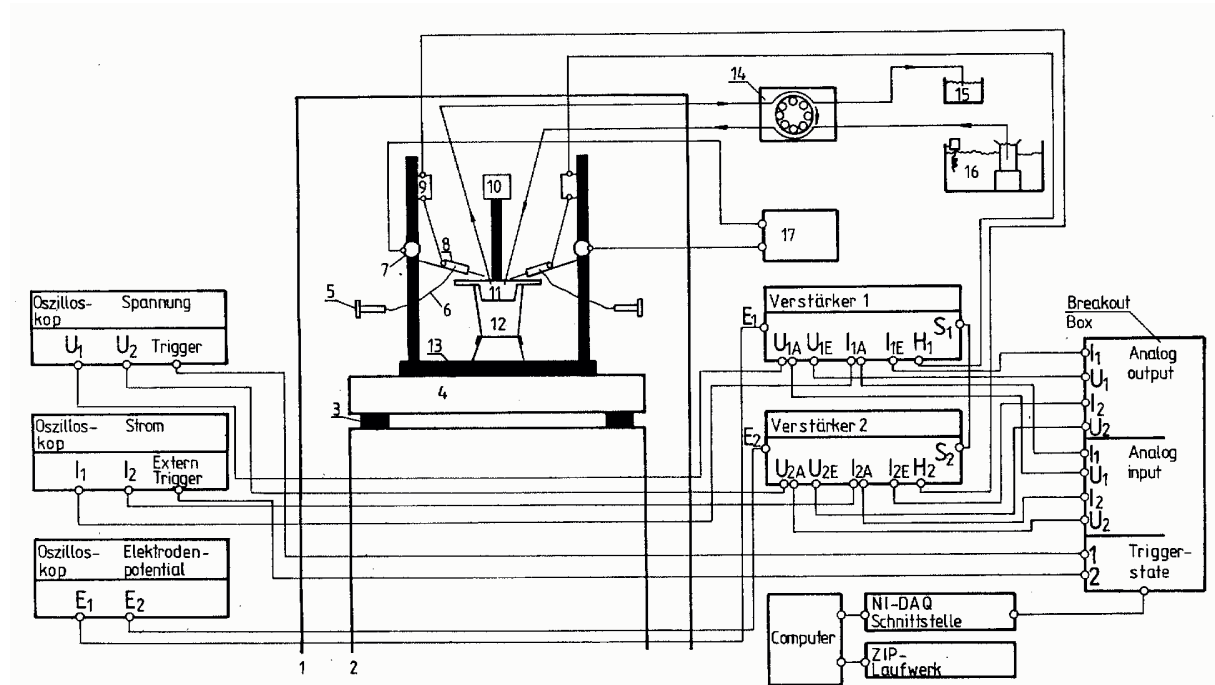


Abb. 3: Aufbau des Patch-Clamp-Standes zur Messung von Gap-Junction-Strömen
 (1) Faraday-Käfig, (2) Ständer, (3) Gummipuffer, (4) massive Betonplatte, (5) Kolbenspritze, (6) Luftdruckleitung, (7) Mikromanipulator, (8) Pipettenhalter mit Elektrode, (9) Vorverstärker, (10) Kondusor mit Phasenkontrasteinrichtung, (11) Organbad, (12) inverses Mikroskop, (13) Mikrospektisch, (14) Rollerpumpe, (15) Auffanggefäß, (16) temperierbares Wasserbad, (17) Steuereinheit für Mikromanipulator

Verstärkeranschlüsse: E=Elektrodenpotential, U_A =Potential output, U_E =Vc command input, I_A =current output, I_E =current stimulus input, H=Headstage input, S=Switching frequency

1=die Zelle 1 betreffend, 2=die Zelle 2 betreffend