

3. Methoden

3.1 Isolation von Meerschweinchenkardiomyozytenpaaren

Das verwendete Isolationsprotokoll wurde erstmalig durch die Arbeitsgruppe Powell et al. [1980] beschrieben, und anschließend von Metzger und Weingart [1985] modifiziert.

Zuerst erfolgte die Heparinisierung des Meerschweinchens (1000 IU/kg Körpergewicht), um der Bildung von Koronarthromben vorzubeugen. Fünfzehn Minuten danach wurde das Meerschweinchen durch Genickschlag getötet, und durch Eröffnung der Karotiden entblutet. Nach der anschließenden Thorakotomie konnte das Herz freipräpariert und dargestellt werden. Die Aorta ascendens wurde aufgesucht, inzidiert, kanüliert, und sofort perfundiert (Tyrodelösung mit Calcium, 10 Minuten, 6°C). Danach konnte das Herz aus der Brusthöhle entnommen, und an eine Langendorff-Apparatur überführt werden. Es erwies sich als günstig, das restliche Perikard zu entfernen.

Bei der Perfusion war zu beachten, daß keine Luftblasen in die Herzkranzgefäße gelangten, denn eine Luftembolie hätte das Lumen der Kapillaren verschlossen, und die Oxygenierung des Herzmuskels verschlechtert. Außerdem mußte die Zeit zwischen Genickschlag und Perfusion so kurz wie möglich gehalten werden (ca. 1 min), da sofort nach Tötung des Tieres die Zeit der Ischämie beginnt, die durch einen Verbrauch energiereicher Substanzen (ATP, GTP), sowie intrazellulärer Steigerung der H⁺- und Ca²⁺-Konzentrationen gekennzeichnet ist.

Danach folgte eine zweiminütige Perfusion mit einer Calcium-freien Tyrodelösung bei 37°C, die anschließend durch eine Kaliumglutamatlösung (2 Minuten, 37°C), ersetzt wurde. Zuletzt erfolgte die Gabe der Kollagenaselösung (37°C) für eine Zeit zwischen 15 bis 30 Minuten, die nach den ersten 35ml rezirkulierend gegeben wurde. Alle Perfusionslösungen wurden während ihrer Gabe mit 100% Sauerstoff begast.

Aus dem zunehmenden Verdau der Kollagenaselösung resultierte eine gesteigerte Perfusionsrate, die auf 5 bis 10 Tropfen pro Minute gedrosselt wurde. Nach ca. fünfundzwanzigminütiger Kollagenaseperfusion stellte sich das Herz leicht glasig und transparent dar. Dann konnte das Herz von der Langendorff-Apparatur abgenommen, und in eine mit Kollagenaselösung gefüllte Petrischale überführt werden. Nach erfolgter Trennung der Vorhöfe von den Ventrikeln konnten die Ventrikel mit zwei Skalpelle zerkleinert werden. Anschließend wurde die Zellsuspension mit 100% Sauerstoff begast, vorsichtig gerührt

(Nachverdau), und durch einen Nylonfilter (250 μm Porengröße) filtriert. Das Filtrat wurde in zwei Falconröhrchen aufgenommen, bei 400rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen, mit 20ml Kaliumglutamatlösung resuspendiert und erneut bei 400rpm zentrifugiert. Dadurch konnte die Aktivität der Kollagenase gestoppt werden.

Das Zellpellet in Röhrchen A wurde erneut in Kaliumglutamatlösung resuspendiert und später als Zellreserve genutzt. Das Zellpellet in Röhrchen B wurde in 20ml calciumfreier Tyrodelösung resuspendiert. Anschließend erfolgte die schrittweise Anpassung der Calciumkonzentration an physiologische Verhältnisse (Endkonzentration 2mmol/l). Die Zellsuspension enthielt einen hohen Anteil an Zellpaaren, die für Patch-Clamp-Experimente benutzt wurden.

3.2 Patch-Clamp-Technik

Die Patch-Clamp-Technik stellt ein spezielles Voltage-Clamp-Verfahren dar. Ende der dreißiger Jahre entwickelten Cole und Curtis das Verfahren der Spannungsklemme. Bei dieser Technik wurden zwei Elektroden für eine Zelle verwendet. Eine Elektrode diente der Spannungsklemme, die andere der Spannungsaufzeichnung. Mit diesem Verfahren konnten Cole und Curtis eine Membranleitfähigkeitsänderung einer Nervenzelle bei Erregung nachweisen und damit Bernsteins Hypothese (1912) bestätigen. Das Problem bestand darin, daß die Elektroden in die Zelle eingestochen wurden. Deshalb traten zwischen Pipette und Zellmembran hohe Leckströme auf. Das verursachte ein hohes Hintergrundrauschen, welches 100 mal größer war als der Strom durch einen einzelnen Kanal. Außerdem tolerierten die Zellen diese Methode schlecht und kollabierten oft.

1970 beschlossen Neher und Sakmann die winzigen Einzelkanalströme ($\approx 1\text{pA}$) aus dem Hintergrundrauschen herauszulösen. Dazu mußten sie einen kleinen Abschnitt der Zellmembran vom Rest elektrisch isolieren, indem sie eine Glaskapillare über einen kleinen Membranfleck stülpten. Somit wurde die grundlegende Idee der Patch-Clamp-Technik geschaffen. Neher und Sakmann reduzierten weiter das Hintergrundrauschen, indem sie eine sehr dichte Verbindung zwischen Zellmembran und Pipette schufen. 1976 entwickelten sie ein Verfahren um Muskelzellen enzymatisch von ihren bindegewebigen Anteilen zu befreien. Dadurch erreichten sie Abdichtwiderstände zwischen 10 bis 50M Ω . Das Hintergrundrauschen verringerte sich, aber Kanäle mit niedriger Leitfähigkeit wurden noch nicht sichtbar. Vier Jahre später (1980) fanden Neher und Sakmann heraus, daß saubere unbenutzte Pipetten den Sealwiderstand nochmals deutlich erhöhten. Dadurch waren Abdichtwiderstände bis 100 G Ω (Gigaseal) möglich. Das Hintergrundrauschen wurde

weitestgehend eliminiert und Einzelkanalströme mit einer guten Auflösung wurden sichtbar. Nun wurden Patch-Clamp-Verstärker entwickelt, die hinsichtlich ihrer Bandbreite und ihres elektrischen Rauschverhaltens verbessert wurden. 1981 gelang es der Arbeitsgruppe Spray et al. [1981] eine Methode zur Voltage-Clamp-Messung von Zellpaaren auszuarbeiten. Die Patch-Clamp-Technik etablierte sich zu einer häufig verwendeten Meßmethode der Elektrophysiologie. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden alle Versuche mittels einer modifizierten Patch-Clamp-Technik, der sogenannten Switch-Clamp-Technik, durchgeführt. Das Meßprinzip beider Verfahren wird im nächsten Abschnitt näher erläutert.

3.2.1 Meßprinzip des Patch-Clamp-Verstärkers

In diesem Kapitel soll zunächst das Arbeitsprinzip eines konventionellen Patch-Clamp-Verstärkers beschrieben werden, um dann vergleichend die Vorteile der Arbeitsweise eines diskontinuierlichen Patch-Clamp-Verstärkers (dSEVC-amplifier = discontinuous single-electrode-voltage-clamp-amplifier), darzulegen.

Die Hauptaufgabe eines Patch-Clamp-Verstärkers ist es, das Membranpotential (U_m) der Zelle auf das vom Experimentator vorgegebene Potential (U_{Soll}) zu klemmen, und den dafür notwendigen Strom zu messen. Der Patch-Clamp-Verstärker arbeitet nach dem Grundprinzip der negativen Rückkopplung. Das Membranpotential wird gemessen und mit der eingestellten Sollspannung verglichen. Differenzen aktivieren einen Regler, der den Kompensationsstrom solange fließen läßt, bis die Differenz zwischen Sollspannung und Pipettenpotential ausgeglichen ist. Differenzen können entstehen, wenn die Kommandospannung durch den Experimentator verändert wird, oder wenn sich die Leitfähigkeit der Zellmembran (g_j) ändert. Im letzten Fall ist der Kompensationsstrom genauso groß wie der Strom durch die Zellmembran, diesem aber entgegengesetzt. Dieser gemessene Kompensationsstrom ist direkt proportional zur Leitfähigkeit der Membran. Demzufolge läßt sich die Leitfähigkeit der Membran berechnen. Sie ist Ausdruck des Zustandes aller auf der Membran befindlichen Kanäle und Transporter. Spannungsmessung und Strominjektion erfolgt mit nur einer Pipette. Das ist möglich durch den Aufbau eines Schaltkreises, der als Strom-Spannungswandler bezeichnet wird. Er befindet sich direkt hinter der Pipette im Vorverstärker (headstage), und stellt das Herzstück eines jeden Patch-Clamp-Verstärkers dar. Ein vereinfachtes Schaltbild eines konventionellen Patch-Clamp-Verstärkers ist in der Abbildung 4 dargestellt.

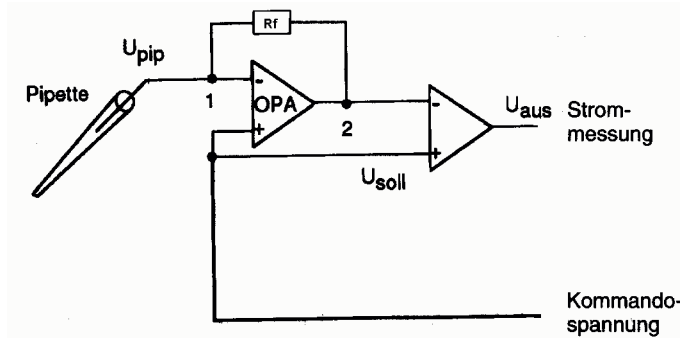


Abb. 4: Vereinfachtes Schaltbild eines konventionellen Patch-Clamp-Verstärkers, nach Numberger und Draguhn [1996]. (OPA) Operationsverstärker, (R_f) Rückkopplungswiderstand, (U_{soll}) Sollspannung, (U_{pip}) Pipettenpotential (U_{aus}) Ausgangsspannung, proportional zum Strom

Die wichtigsten Elemente eines Vorverstärkers sind:

1. der Operationsverstärker (OPA)
2. der Rückkopplungswiderstand (R_f)

Am (-)Eingang des OPA liegt das Pipettenpotential (U_{pip}), am (+)Eingang die Kommandospannung = Sollspannung (U_{soll}), an. Nimmt man den Fall an, daß zwischen Pipettenspannung und Sollspannung eine Differenz besteht, so entsteht am Ausgang des OPA eine Spannung, die der Differenz der Eingangsspannungen proportional und extrem verstärkt ist. Es kommt zu einer Potentialdifferenz zwischen Punkt 2 und Punkt 1 (siehe Abb. 4). Deswegen fließt über den Rückkopplungswiderstand (R_f) ein Strom. Dabei entsteht am Rückkopplungswiderstand eine Spannung die, entsprechend des Ohmschen Gesetzes ($U_f = R_f \cdot I$), proportional zum durchfließenden Strom ist. Diese Spannung wird dem Hauptverstärker zugeführt, und kann nach erfolgter Kalibrierung am Oszilloskop als Stromkurve sichtbar gemacht werden. Daraus erklärt sich der Name „Strom-Spannungswandler“.

Der Strom, der durch den Rückkopplungswiderstand (R_f) fließt, kann nur in die Pipette fließen, da der Eingangswiderstand des OPA sehr hoch ist (ca. $10^{12}\Omega$). Der Strom ändert das Membranpotential und wird solange fließen, bis das Pipettenpotential gleich der Sollspannung ist. In diesem Fall entsteht keine Spannung am Ausgang des OPA, folglich besteht keine Potentialdifferenz zwischen Punkt 1 und Punkt 2, weswegen kein Strom fließt.

Die soeben beschriebene Darstellung der Spannungskontrolle über die Zelle ist eine starke Vereinfachung und berücksichtigt nicht die Besonderheiten der Ganzzellkonfiguration, wodurch sich Probleme bei der Messung ergeben. Wie bereits beschrieben, liefert der

(-)Eingang des OPA die Spannung der Elektrodenspitze (U_{pip}), aber nicht das Membranpotential der Zelle (U_m). Die Ursache ist in der Abbildung 5 erkennbar.

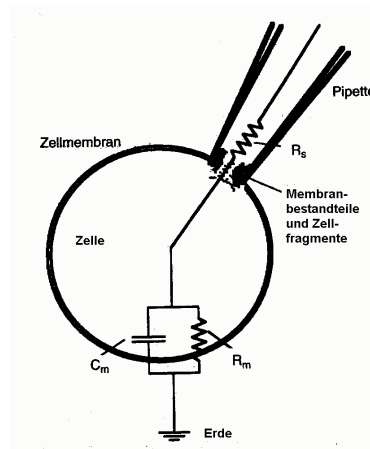


Abb. 5: Ersatzschaltbild der Whole-Cell-Konfiguration (Ganzzelleableitung), nach Numberger und Draguhn [1996]. Membranfragmente werden in den Öffnungsbereich der Pipette gesaugt und erhöhen so den Serienwiderstand (R_s). (R_m) Membranwiderstand, (C_m) Membrankapazität

Während der Ausbildung zur Ganzzellkonfiguration entsteht ein zusätzlicher Widerstand, der zwischen Silberdraht und Zellsoma liegt. Der sogenannte Serienwiderstand (R_s) entspricht nur im theoretisch idealen Fall dem Pipettenwiderstand (R_{pip}). Der Pipettenwiderstand wird vor jeder Messung ermittelt und über einen speziellen Schaltkreis (bridge balance) kompensiert. Beim Öffnen der Zelle lagern sich Membranfragmente und zum Teil auch Zellorganellen in den Mündungsbereich der Pipette an, so daß oft eine Verdopplung des reinen Pipettenwiderstandes (R_{pip}) erreicht wird, der im Verlauf eines Experimentes noch deutlich zunehmen kann. Dieser zusätzliche Widerstand ist nicht exakt zu bestimmen und kann deswegen nicht korrekt kompensiert werden. Das hat für die Spannungskontrolle der Zelle gravierende Folgen:

1. Je größer der Serienwiderstand ist, desto langsamer wird die gewünschte Kommandospannung an der Zelle aufgebaut.
2. Je größer der Serienwiderstand ist, desto langsamer wird eine Leitfähigkeitsänderung der Membran ausgeglichen.
3. Je größer der Serienwiderstand ist, desto mehr weicht das Membranpotential von der Kommandospannung ab, weil die Kommandospannung am gesamten Widerstand (Serienwiderstand und Membranwiderstand) abfällt. Sie bilden einen Spannungsteiler. Nur im idealen Fall, wenn $R_m \gg R_s$, liegt das Kommandopotential annähernd an der Membran an. In einem extremen Fall, wenn $R_m = R_s$, wird nur die Hälfte der Kommandospannung an der Membran aufgebaut. Die andere Hälfte fällt am

Serienwiderstand ab. Dadurch kann die Messung des Kompensationsstromes stark verfälscht sein und zu erheblichen Meßfehlern führen.

Die Lösung des Problems besteht darin, das Membranpotential (U_m) nur dann zu messen, wenn über den Serienwiderstand kein Strom fließt ($R_s=0$). Ein solches Prinzip liegt dem diskontinuierlich arbeitenden single-electrode-voltage-clamp-amplifier (dSEVC-amplifier) zugrunde, indem er zyklisch zwischen Strominjektion und Spannungsmessung (kein Stromfluß) mit einer hohen Frequenz ($f_{sw} = 35\text{kHz}$) hin und her wechselt. Nun soll die Funktionsweise eines dSEVC-Verstärkers mit Hilfe eines vereinfachten Schaltbildes in der Abbildung 6a, und einem Schema der Arbeitsweise in der Abbildung 6b erläutert werden.

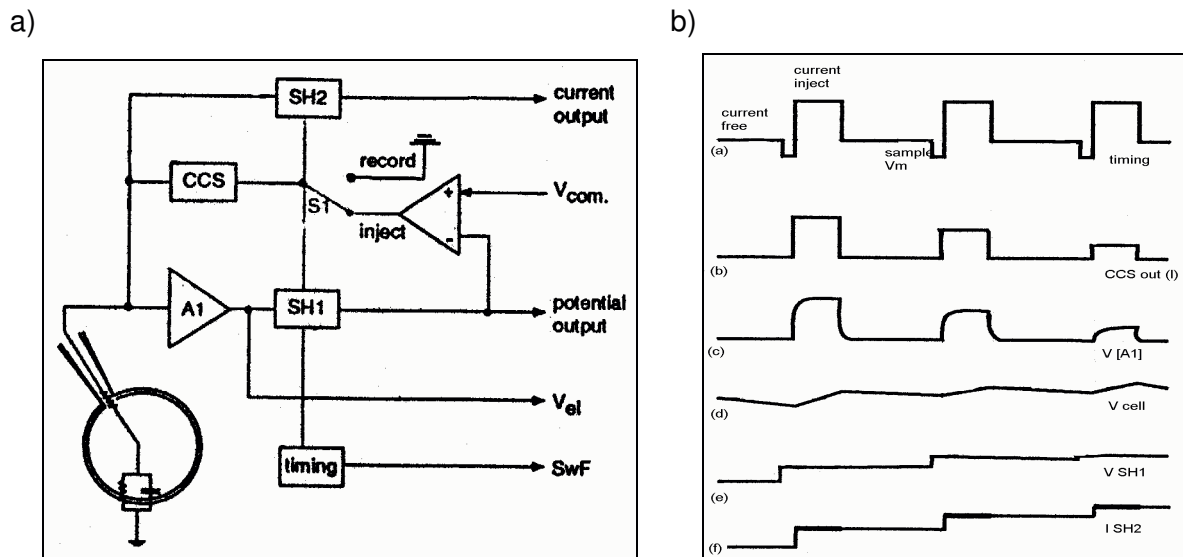


Abb. 6: (a):Ersatzschaltbild eines discontinuous single-electrode-voltage-clamp-amplifier (dSEVC-Verstärker), nach Polder [1996]: (A1) Operationsverstärker, (SH1/2) Sammel- und Speichereinheit, (A2) Differentialverstärker, (CCS) kontrollierte Stromquelle, (S1) Schalter zwischen record und inject, (timing) Zeiteinheit, (Vcom) Kommandopotential, (Vel) Elektrodenpotential, (SwF) Switching-Frequenz
 (b): Arbeitsprinzip eines dSEVC-Verstärkers nach Polder [1996]: (a)zeitabhängiger Rechteckpuls der Zeiteinheit, (b) Strom am Ausgang der kontrollierten Stromquelle CCS, (c) gemessene Spannung am Operationsverstärker A1, (d) Membranpotential, (e) Spannung an der Sammel- und Speichereinheit-1-, (f) Strom an der Sammel- und Speichereinheit-2-

Die Elektrode ist mit dem Zellsoma leitend verbunden (Ganzzelleableitung). Der Zyklus beginnt am Ende eines stromfreien Intervalls. An diesem Punkt wird das Membranpotential durch einen Operationsverstärker (A_1) aufgenommen und im „sample and hold amplifier“ (SH_1) zwischengespeichert. Der Schalter (S_1) wechselt in den Modus „Strominjektion“ und

verbindet den Ausgang des Differentialverstärkers (A_2) mit dem Eingang der spannungskontrollierten Stromquelle (CCS). Jetzt liegt das Membranpotential am (-)Eingang des Differentialverstärkers (A_2) an. Am (+)Eingang liegt die Kommandospannung (U_{Soll}) an. Der Differentialverstärker (A_2) vergleicht das Membranpotential mit der Kommandospannung und berechnet die Differenz. Die Differenz liegt nun am Ausgang des Differentialverstärkers (A_2) an und steuert die spannungskontrollierte Stromquelle (CCS). Diese liefert einen Strom, der in seiner Größe proportional zur gebildeten Differenz ($U_m - U_{\text{Soll}}$) ist. Der Strom fließt in die Pipette und verursacht am Serienwiderstand einen steilen Spannungsanstieg. Danach fließt der Strom in die Zelle und gleicht langsam das Membranpotential an die Kommandospannung an. Die Größe der Amplitude der Strominjektion wird durch den „sample and hold amplifizier“ (SH_2) aufgenommen und gespeichert. Danach kann das Signal am „current output“ abgelesen werden. Anschließend wechselt der Schalter (S_1) in den Modus „Potentialmessung“, so daß die Verbindung zur spannungskontrollierten Stromquelle (CCS) unterbrochen ist. Ein neuer Zyklus beginnt, indem erneut das Membranpotential am Ende eines stromfreien Intervalls gemessen wird.

Das Potential am Operationsverstärker (A_1) ist nicht nur das Membranpotential allein, sondern es addiert sich das Elektrodenpotential (U_{Pip}) dazu. Zwischen beiden Potentialen besteht ein wesentlicher Unterschied, welchen man sich für die exakte Spannungsmessung (U_m) zunutze macht. Das Elektrodenpotential fällt nach jeder Strominjektion extrem schnell ab (1-3 μ s, Müller et al. 1999), wenn die Elektrodenkapazität zuvor exakt kompensiert wurde. Im Verhältnis dazu fällt das Membranpotential sehr langsam ab. Wenn das Elektrodenpotential komplett gefallen ist ($R_s=0$), also am Ende des stromfreien Intervalls, wird das Membranpotential durch den Operationsverstärker (A_1) aufgenommen, in SH_1 zwischengespeichert, und kann am „potential output“ ausgelesen werden. Voraussetzung für eine fehlerfreie Spannungsmessung ist die genaue Kompensation der Elektrodenkapazität. Nur so wird ein schnellstmöglicher Abfall der Elektrodenspannung ermöglicht. Dabei muß darauf geachtet werden, daß der Zeitraum zwischen Strominjektion und Spannungsmessung lang genug ist, damit die Elektrodenspannung komplett abfallen kann. Der Zeitraum darf aber auch nicht zu lang gewählt werden, damit ein zu starkes abweichen des Membranpotentials (Richtung Ruhemembranpotential) von der Kommandospannung verhindert wird.

Anhand der Kapazitätskompensation der Elektrode, die mit sehr kurzen Reaktionszeiten auf Stromimpulse reagiert, wurde die obere Grenzfrequenz der Elektrode ermittelt ($\tau = 2\text{-}3\mu\text{s}$, $f_e = 80\text{-}160\text{kHz}$). Aus dieser Erkenntnis wurde eine Formel entwickelt (Müller et al. 1999), die

eine Relation zwischen der Elektrodenzeitkonstante (f_e), der switching frequency (f_{sw}), der sampling frequency (f_s), der oberen Grenzfrequenz des Tiefpaßfilters (f_f) und der Zeitkonstante der Membran (f_m) angibt:

$$f_e > 3f_{sw}, f_{sw} > 2f_s, f_s > 2f_f > f_m$$

Ziel dieser Formel ist es, das ursprüngliche bioelektrische Signal so wenig wie möglich zu verändern, um die volle Aussagekraft zu erhalten. In der folgenden Tabelle sind die optimal berechneten Werte, den tatsächlich eingestellten Werten gegenüber gestellt:

	optimal, berechnet	am dSEVC eingestellt
switching frequency (f_{sw})	30 – 50 kHz	35 kHz
sampling rate (f_s)	5 – 10 kHz	5 kHz
Filterfrequenz (f_f)	1 – 2 kHz	2 kHz

Tab. 2: Darstellung der optimal berechneten Werte und der am dSEVC-Verstärker eingestellten Werte der switching frequency, sampling rate, und der Filterfrequenz

3.2.2 Eichen der Patch-Clamp-Verstärker

Bevor man mit den Messungen beginnen kann, muß der „headstage-bias-current“ kontrolliert und gegebenenfalls beseitigt werden. Das ist ein Leckstrom der materialbedingt und temperaturabhängig am Vorverstärker auftritt [Horowitz und Hill. 1993]. Dieser Strom wird an die Zelle weitergegeben und verändert somit das Membranpotential, so daß eine Differenz zwischen Membranpotential und Sollspannung entsteht. Falsche Meßergebnissen wären die Folge.

Dazu wurde der Verstärker in „bridge mode“ gestellt und der Verstärkereingang geschlossen („oscillation shutoff“, LED: rot), um ankommende Signale aus der „current-stimulus-unit“ zu vermeiden. Der Elektrodenverstärkereingang wurde über einen kleinen elektrischen Widerstand (10-100k Ω) geerdet. Danach wurde das Voltmeter mit dem Offsetpotentiometer auf 0mV gesetzt. Nun wurde der Widerstand durch einen größeren Widerstand (1G Ω) ersetzt. Das abzulesende Potential am Voltmeter ist nach dem Ohmschen Gesetz proportional zum „headstage bias current“. Das „headstage-bias-current“-Potentiometer wurde so eingestellt, daß Voltmeter und Amperemeter kein Potential mehr anzeigten. Die Eichung des Meßstandes wurde regelmäßig kontrolliert, besonders wenn die Raumtemperatur stark schwankte.

3.2.3 Kontrolle des Meßfehlers anhand eines Doppelzellmodells

Die Bestimmung des Meßfehlers der junctionalen Strommessung beider Verstärker wurde anhand eines Doppelzellmodells (NPI electronics GmbH, Tamm, Germany) durchgeführt. Das Doppelzellmodell besteht aus dem Zellmodell1 (entspricht der Zelle1 mit R_{m1} und C_{m1}), und dem Zellmodell2 (entspricht der Zelle2 mit R_{m2} und C_{m2}), die durch den junctionalen Widerstand (R_j) gekoppelt sind. Somit simuliert der elektronische Schaltplan des Doppelzellmodells (Abb. 7) beiden Verstärkern (Verstärker1 für Zellmodell1 und Verstärker2 für Zellmodell2) ein gekoppeltes Zellpaar im Whole-Cell-Modus mit folgenden Parametern:

1. Membranwiderstand ($R_{m1,2}$) = $100\text{M}\Omega$
2. junctionaler Widerstand (R_j) = $10\text{M}\Omega$
3. Membrankapazität ($C_{m1,2}$) = 100pF

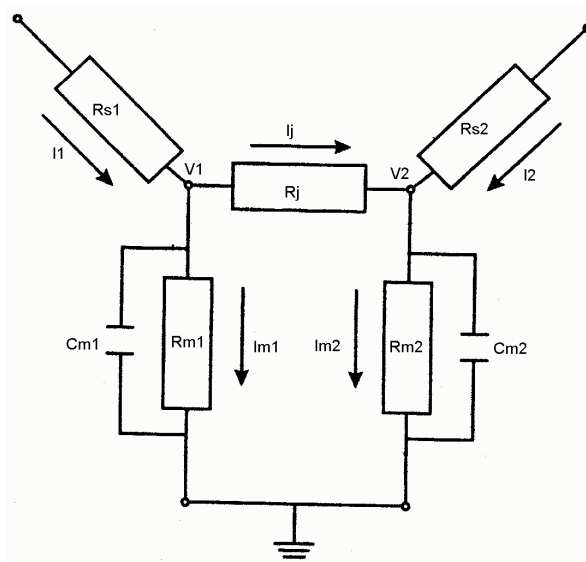


Abb. 7: Ersatzschaltplan des Doppelzellmodells, nach Müller et al. [1999]. Die Pfeile zeigen die Richtung des Stromflusses (I). (V) Spannung, (R_s) Serienwiderstand, (R_m) Membranwiderstand, (R_j) junctionaler Widerstand, (C_m) Membrankapazität

Die Meßwerte wurden mit den vorgegebenen Parametern des Doppelzellmodells verglichen, und der resultierende Meßfehler des junctionalen Widerstandes bestimmt. Dazu wurde das Doppelzellmodell mit den Vorverstärkern verbunden und geerdet. An beiden Verstärkern wurde die „bridge balance“ und die Kapazitätskompensation justiert. Weiterhin wurde der Wert der Verstärkung ($\text{Gain} = 1$) und der Tiefpaßfilter (2kHz) eingestellt.

Zur Bestimmung des Membranwiderstandes (R_m) wurde an beiden Zellmodellen ein 30ms langer Spannungssprung von -40 auf -50 mV (Spannungsdifferenz $U_{\text{Diff}} = 10\text{mV}$) angelegt

(Abb. 8a), und der fließende Strom über dem Membranwiderstand gemessen (Abb. 8b). Der Membranwiderstand konnte dann nach dem Ohmschen Gesetz ($R_m = U_{\text{Diff}}/I_m$) berechnet werden. In einer Kontrollmessung zur Bestimmung des Membranwiderstandes konnte für das Zellmodell1 ein Strom von 99pA, und für das Zellmodell2 ein Strom von 102pA bestimmt werden. Somit betrug der Membranwiderstand für das Zellmodell1 $R_{m1} = 101\text{M}\Omega$, und für das Zellmodell2 $R_{m2} = 98\text{M}\Omega$. Bei einem vorgegebenen Sollwert von $100\text{M}\Omega$ lag der Fehler unter 5%.

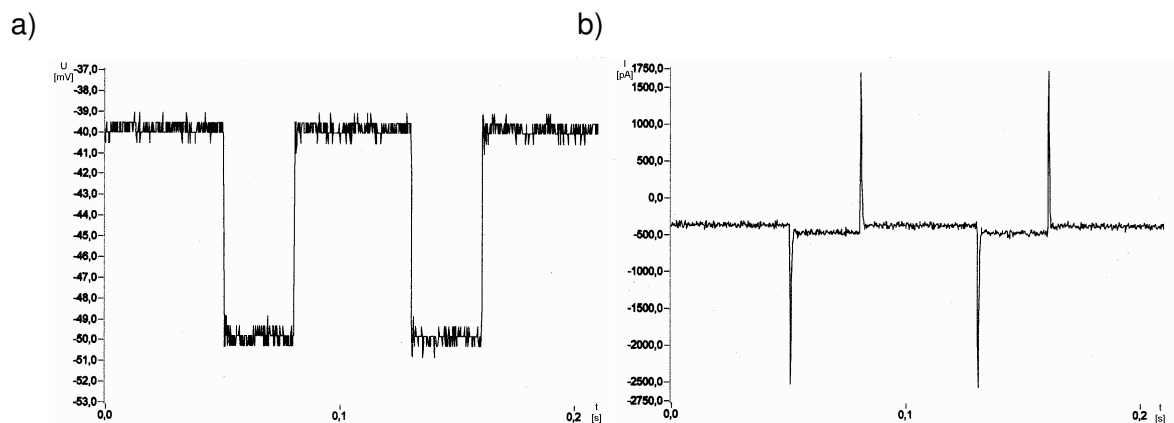


Abb. 8: Originalregistrierung am Zellmodell1, von dem angelegten Spannungspuls $-40/-50\text{mV}$ (a) und der resultierenden Stromantwort (b) zur Berechnung des Membranwiderstandes (R_{m1}). Der Haltestrom des Haltepotentials (-40mV) betrug -366pA , und für die Klemmspannung (-50mV) konnten -465pA ermittelt werden. Aus der Stromdifferenz von 99pA konnte der Membranwiderstand berechnet werden. ($R_{m1} = 101\text{M}\Omega$, vorgegeben $100\text{M}\Omega$)

Anschließend wurde die Membrankapazität (C_m) nach der Formel $C_m = I_{\text{max}} \cdot \tau / U_{\text{Diff}}$ für beide Zellmodelle bestimmt. Der maximal fließende Strom (I_{max}) stellt die Amplitude des kapazitiven Ladestromes dar. Die Zeitkonstante (τ) wurde graphisch ermittelt (Abb. 9) und gibt die Zeit an, in der die maximale Stromamplitude (I_{max}) auf $1/e$ abgefallen ist. Die Spannung (U_{Diff}) ergab sich aus der angelegten Spannungsdifferenz des Pulses $-40/-50\text{mV}$ und betrug somit 10mV . In einer Kontrollmessung zur Bestimmung der Membrankapazität konnte, nach Einsetzen der Werte in die Formel, eine Membrankapazität für das Zellmodell1 (C_{m1}) von $103,2\text{pF}$ und für das Zellmodell2 (C_{m2}) von $105,4\text{pF}$ ermittelt werden. Bei einem vorgegebenen Wert von 100pF betrug der Fehler $\leq 5\%$.

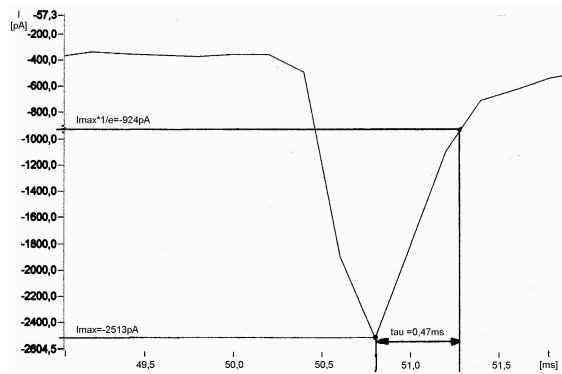


Abb. 9: Gespreizter Ausschnitt des kapazitiven Ladestromes der Abb. 8b zur Berechnung der Membrankapazität des Zellmodells1 (C_{m1}). Die Zeitkonstante (τ) wurde graphisch ermittelt und betrug 0,47ms. Die Kapazität des Zellmodells1 betrug 103,2pF. (vorgegeben 100pF)

Die anschließenden Messungen sollten den Fehler der Messung des Gap-Junction-Widerstandes (R_j) ermitteln. Dazu wurde an beiden Zellmodellen ein Haltepotential von -40mV angelegt. An Zellmodell2 wurde der Puls zur Bestimmung des Gap-Junction-Stromes aktiviert (-50mV bis +50mV in 10mV Schritten für 200ms (Abb. 10a), und das Potential an Zellmodell1 auf -40mV konstant gehalten (Abb. 10b). Die Spannungsdifferenzen über dem Gap-Junction-Widerstand führten zu einem Stromfluß, der gemessen wurde (Abb. 10c). Aus den Stromwerten und den dazugehörigen transjunctionalen Spannungen (U_{transj}) wurde eine Strom/Spannungskurve erstellt, deren Steigung die transjunctionale Leitfähigkeit (g_j) und somit den Widerstand (R_j), berechnete (Abb.10d).

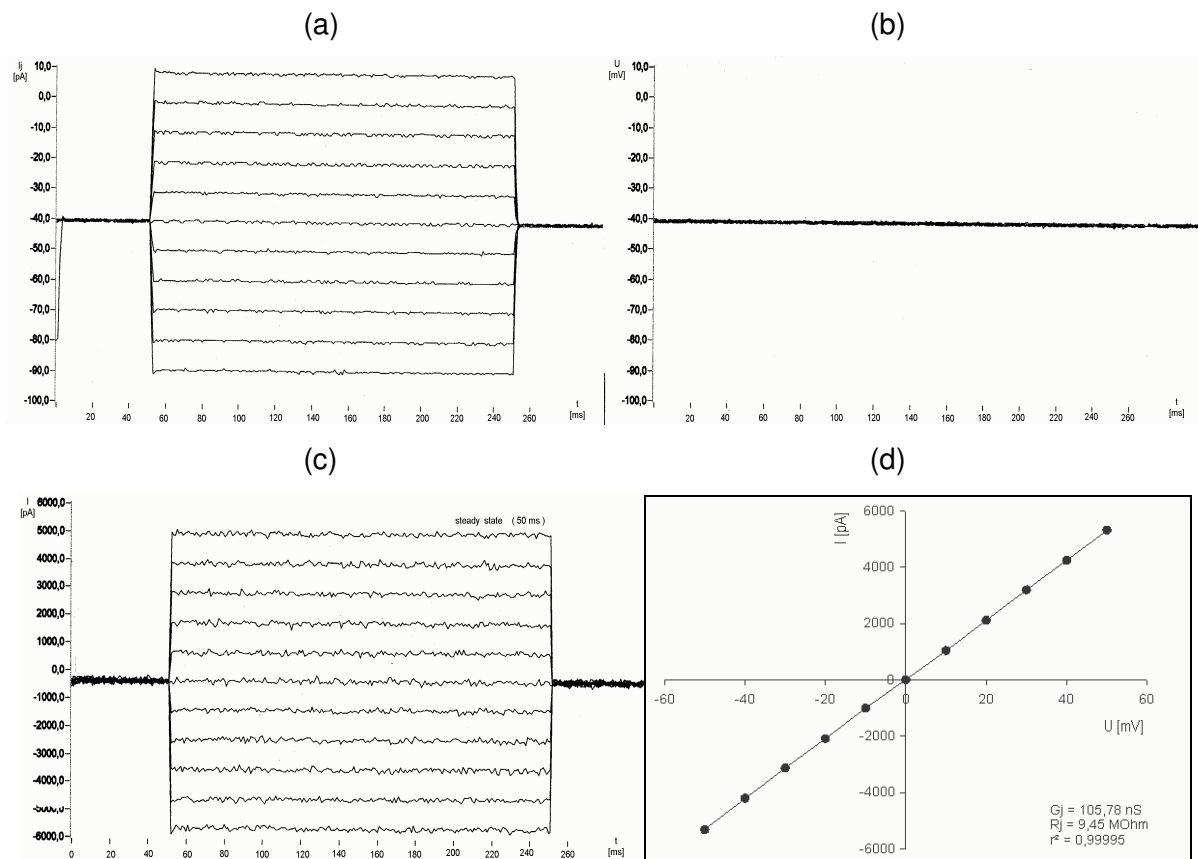


Abb. 10: Originalregistrierung am Doppelzellmodell von der transjunctionalen Spannungstreppe (-50 bis 50 mV in 10mV Schritten) in Zellmodell2 (a), des Haltepotentials (-40mV) in Zellmodell1 (b), sowie der transjunctionale Strom, gemessen in Zellmodell1 (c). Aus dem Bereich des „steady state“ wurde der Mittelwert aus den einzelnen Stromwerten gebildet, und in einer Strom/Spannungskurve übertragen. Aus der Steigung der Geraden wurde der junctionale Widerstand ($R_j = 9,45\text{M}\Omega$, vorgegeben $10\text{M}\Omega$) und die Leitfähigkeit ermittelt ($g_j = 105,78\text{nS}$).

Es wurden insgesamt sieben Kontrollmessungen zu unterschiedlichen Zeiten durchgeführt. Die gemessenen Kontrollwerte mit ihren Meßfehlern sind in der Tabelle 3 zusammengefaßt:

Versuch Nr.	Gap-Junction-Widerstand in $\text{M}\Omega$	Fehler in %
1	10,59	5,9
2	10,59	5,9
3	10,61	6,1
4	10,51	5,1
5	10,87	8,7
6	10,97	9,7
7	9,45	5,5

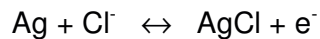
Tab. 3: Kontrollmessungen des Gap-Junction-Widerstandes mit ihren Meßfehlern.

Der Mittelwert der Gap-Junction-Widerstände aller Kontrollmessungen (n=7) ergab einen Wert von 10,51M Ω und entsprach somit einen Fehler von 5,1%. Der Fehler liegt sehr viel günstiger als der Fehler mit konventioneller Patch-Clamp-Technik bei der Messung von Gap-Junction-Strömen. (bis zu 100% Fehler [Weingart 1986], 70% Fehler [van Rijen et al. 1998])

3.2.4 Chlorieren der Silberdrähte

Potentialdifferenzen zwischen den Elektroden (zwei Pipettenelektroden, eine Badelektrode) sollen immer Null betragen, wenn sie in Chloridlösung derselben Konzentration getaucht werden. Das wird erreicht durch die Benutzung von gleichmäßig chlorierten Silberdrähten (Elektroden). Weisen die Elektroden Defekte der Chloridschicht auf, kommt es zu Potentialdifferenzen zwischen den Elektroden, die sich auf das Membranpotential aufaddieren können.

Dazu wurde die Oberfläche der Elektroden mit feinem Sandpapier abgeschliffen, in Alkohol gereinigt und getrocknet. Anschließend wurde der Silberdraht an die Anode einer 4,5V Batterie angeschlossen. Anode mit Silberdraht und Kathode der Batterie wurden nun in eine 3% KCl-Lösung getaucht. Durch Abzug von Elektronen verschiebt sich das Reaktionsgleichgewicht auf die rechte Seite. Am Silberdraht der Anode bildet sich eine Silberchloridschicht.



Gleichmäßig chlorierte Elektroden besaßen einen matt-grauen Überzug. Alle Elektroden wurden einmal pro Monat neu chloriert.

3.2.5 Herstellung der Patchpipetten

Patchpipetten sind durch ihre Wandstärke und ihren spezifischen elektrischen Widerstand charakterisiert. Der Widerstand ist abhängig von der Pipettenspitzenöffnung und der Form der Flanken [Numberger und Draguhn 1996]. Diese Parameter müssen beachtet werden, wenn Pipetten mit speziellen Eigenschaften für ihre Anwendungsgebiete hergestellt werden sollen. Für die Ganzzelleableitung ist es erforderlich, Pipetten mit einem elektrischen Widerstand zwischen 2-5M Ω und guten Sealeigenschaften herzustellen.

Deshalb wurden mittelharte Borsilikatglasrohlinge mit Filament (GB150F-8P, Science Products GmbH, Hofheim, Germany) zur Herstellung der Pipetten verwendet. Sie haben ihren Schmelzpunkt bei 700-800°C. Der Rohling wurde in ein vorgewärmtes

Pipettenziehgerät (Puller PIP 5, Heka, Lambrecht, Germany) eingespannt, und durch zwei Ziehschritte in zwei Pipetten geteilt. Die Temperatur der Heizspirale läßt sich durch die Größe der Stromzufuhr regeln. Der erste Schritt erfolgte bei 1400°C und zog den Rohling bis auf 1cm aus, so daß sich der Teil des Rohlings innerhalb der Heizspirale verjüngte. Danach wurde der Rohling neu eingespannt, so daß die verjüngte Stelle direkt innerhalb der Heizspirale saß. Der zweite Schritt ist verantwortlich für die Form, und bestimmt somit die Eigenschaften der Pipette. In Abhängigkeit der Raumtemperatur wurde eine Temperatur der Heizspirale zwischen 700-800°C eingestellt. Bei dieser Temperatur zog sich die verjüngte Stelle des Rohlings soweit aus, bis sie riß. Man erhielt zwei gleichwertige Pipetten.

Vor jedem Experiment wurden die Pipetten neu gezogen. Anschließend wurden die Pipetten in einer geschlossenen Box gelagert, damit sie nicht von Staub und Schmutz verunreinigt werden konnten.

3.2.6 Versuchsdurchführung und Meßprotokoll

Vorbereitung

Alle Messungen wurden an frisch isolierten Kardiomyozytenpaaren (Kap. 3.1) vorgenommen. Dazu mußten ca. 6 Tropfen der fertigen Zellsuspension in die Meßkammer überführt werden. Anschließend wurden die Zellen mit Tyrodelösung + Calcium superfundiert (5min bei 2ml/min). Die Meßkammer enthielt gerade soviel Flüssigkeit, daß Zellen und Elektroden mit Lösung bedeckt waren (ca. 2ml). Durch ein Überfüllen der Meßkammer würde es zu einem größeren Kontakt zwischen Pipette und Badlösung kommen, so daß eine Zunahme der Streukapazitäten die Folge wäre. Nach ca. 5 bis 10 Minuten setzten sich die Zellen am Boden der Meßkammer ab.

Die neu gezogenen Pipetten (Kap. 3.2.5) wurden mit Pipettenlösung gefüllt. Dabei hatte der Silberdraht so wenig wie möglich Kontakt zur Pipettenflüssigkeit, damit die Gesamtkapazität der Pipette möglichst gering gehalten wurde. Luftblasen mußten durch beklopfen der Pipette entfernt werden, da sie den Pipettenwiderstand extrem erhöhten. Danach wurde die Pipette in den Pipettenhalter eingesetzt, und mittels einer Kolbenspritze ein leichter Überdruck auf die Pipettenflüssigkeit gegeben, so daß ständig etwas Pipettenlösung aus der Pipettenöffnung ausströmte. So konnte ein Zusetzen der Pipettenöffnung mit Dreck und Proteinen beim Eintauchen der Pipette in das Bad verhindert werden. Beide Pipetten wurden in das Bad gebracht und durch Mikromanipulatoren dicht über die Zellen positioniert.

Verstärker abgleichen

Messungen an Zellpaaren müssen mit einer hohen Genauigkeit durchgeführt werden, weil die gemessenen Ströme sehr gering sind. Die Meßapparatur reagiert sehr empfindlich auf Störquellen, wodurch fehlerhafte Meßergebnisse resultieren können. Darum müssen mögliche Fehlerquellen erkannt, und durch das Abgleichen der Verstärker beseitigt werden.

Dazu gehört:

1. Korrektur des Offsetpotentials
2. Kontrolle des Pipettenwiderstandes
3. Kompensation des Pipettenwiderstandes
4. Kapazitätskompensation

Offsetpotentiale sind Spannungen die an Übergängen innerhalb der Meßkette Silberdraht – Pipettenlösung – Badlösung - Erde entstehen. Dafür können im wesentlichen zwei Ursachen verantwortlich sein. Zum einen sind es Polarisierungen zwischen der Silber-Silberchloridelektrodenschicht, zum anderen sind es Übergangspotentiale zwischen Badlösung und Pipettenlösung. Offsetpotentiale haben die Eigenschaft sich auf das Potential der Zelle zu addieren, und führen somit zu einer fehlerhaften Spannungskontrolle der Zellmembran. Bei der Justierung des Offset definiert man den Nullpunkt als das Potential, an dem zwischen Pipette und Bad kein Strom fließt. Dazu wurde der Verstärker in „bridge mode“ geschaltet. Das Offsetpotentiometer wurde so eingestellt, daß am Voltmeter des Verstärkers 0mV angezeigt wurde.

Anschließend wurde der Pipettenwiderstand (R_{Pip}) bestimmt. Für Ganzzelleableitungen soll er zwischen 2 bis $5\text{M}\Omega$ betragen, und wird entscheidend durch den Ziehvorgang bestimmt (Kap. 3.2.5). Dafür wurde der Verstärker in die entsprechende Betriebsart geschaltet. Der Verstärker legt eine definierte Spannung über die Pipette an und mißt den durchfließenden Strom. Nach dem Ohmschen Gesetz wird der Pipettenwiderstand durch den Verstärker berechnet, und konnte am Display abgelesen werden. Lag der Wert nicht im zulässigen Bereich ($2 - 5\text{M}\Omega$) wurde die Pipette ausgetauscht.

Danach wurde der Pipettenwiderstand kompensiert. Ohne Kompensation würde bei jeder Strominjektion ein Teil der Sollspannung schon am Pipettenwiderstand abfallen, und sich dadurch eine zu geringe Spannung an der Membran aufbauen. Der Spannungsverlust wird kompensiert, indem zur Kommandospannung eine Spannung dazu addiert wird, die proportional zum gerade eingespeisten Strom ist. Das Umladen der Zellmembran wird beschleunigt. Dazu wurde der Verstärker in den „bridge mode“ geschaltet. Softwaregesteuert

wurde ein repetitiver Strom (1nA; 30ms) in das Bad appliziert. Die dadurch entstandene Spannung an der Pipette wurde durch das „bridge-balance“-Potentiometer auf 0mV korrigiert. Somit nahm der Pipettenwiderstand keinen Einfluß mehr auf die nachfolgenden Messungen.

Zum Schluß wurde die Kapazität der Stromleiter kompensiert. Bei jeder Änderung der Kommandospannung kommt es, hervorgerufen durch die Kapazität, zunächst zu einem Umladeprozess der Stromleiter. Bei rechteckigen Sprüngen der Kommandospannung kommt es zu exponentiell ansteigenden und abfallenden Strömen. Der Verstärker kann bei der Injektion der hohen kapazitiven Ströme in die Sättigung getrieben werden. Dazu wurde der Verstärker in den „current-clamp“-Modus geschaltet. Es wurde ein Strom von 150nA Größe bei einer „switching frequency“ von 1kHz aktiviert. Der applizierte Strom ist ein Rechtecksignal und soll am Oszilloskop des Elektrodenpotentials ein rechteckiges Potential hervorrufen. In diesem Fall wird die Kapazität durch die elektronische Schaltung kompensiert. Dafür bietet der Verstärker zwei Kompensationsmechanismen an. Die grobe Einstellung erfolgte am „headstage“, und nimmt eine Anpassung der Zeitkonstantenbandbreite an die verwendete Pipette vor. Die Feinjustierung der Kapazitätskompensation erfolgte am Verstärker. Diese Methode beruht auf einer konventionellen Feedback-Kompensation. Danach wurde die „switching frequency“ auf 35kHz eingestellt. Die Kapazitätskompensation wurde nochmals kontrolliert und gegebenenfalls korrigiert. Nur bei korrekter Kompensation der Kapazität mißt der Verstärker am Ende eines stromfreien Intervalls das wahre Membranpotential. Das Potential, daß durch die vorangegangene Strominjektion entstanden war, ist zu diesem Zeitpunkt abgeklungen. Durch eine fehlerhafte Kompensation würde sich das strominjektions-induzierte Potential nicht schnell genug abbauen, und sich zum Zeitpunkt der Potentialmessung auf das Membranpotential dazu addieren. Die gewünschte Kommandospannung würde nicht an der Membran anliegen. Nach Abgleichung der Verstärker konnten die Pipetten in Kontakt zur Zellmembran gebracht werden.

Herstellung der Cell-Attached-Konfiguration

Die Cell-Attached-Konfiguration bezeichnet eine Meßanordnung, bei der zwischen Zellmembran und Pipette ein sehr dichter Kontakt entsteht, so daß der elektrische Widerstand mehrere Gigaohm beträgt. Die Membran unter der Zelle bleibt intakt, wird aber durch Unterdruck in den Öffnungsbereich der Pipette gesaugt. Ist der Abdichtwiderstand zu gering ($<1\text{G}\Omega$) entstehen Leckströme (I_{offset}). Sie verursachen erhöhte Meßwerte und ein zunehmendes elektrisches Hintergrundrauschen. Deshalb soll der Sealwiderstand über $1\text{G}\Omega$ betragen. Dazu wurde der Verstärker in den Voltage-Clamp-Modus geschaltet. Softwaregesteuert wurde ein repetitiver Puls (10mV, 20ms) aktiviert. Am Potentiometer

„gain“ wurde der optimale Verstärkungsfaktor gewählt. Mit Hilfe der elektrisch fernsteuerbaren Mikromanipulatoren wurde der letzte Schritt der Annäherung der Pipette an die Zellmembran durchgeführt, indem die Pipetten langsam durch ein Fingerrad gesteuert, senkrecht auf die Zellen herabgelassen wurden. Dieser Schritt mußte sehr langsam und vorsichtig erfolgen, da die Zellmembran sehr empfindlich auf mechanische Reize reagiert. Die Entfernung der Pipettenspitze von der Zellmembran konnte durch zwei charakteristische Phänomene bestimmt werden. Zum einen mußte das Stromsignal beobachtet werden. Je enger der Kontakt zwischen Pipette und Membran war, desto kleiner wurde das Stromsignal. Wenn das Stromsignal auf 2/3 des ursprünglichen Wertes abgefallen war, durfte die Pipette nicht weiter abgesenkt werden. Zum anderen mußte die Oberfläche der Membran beobachtet werden. Wenn die Pipette sehr dicht an der Membran war, konnte ein leichtes Auseinanderweichen der Querstreifung, und ein charakteristischer Lichtreflex beobachtet werden. Diese Phänomene entstanden, wenn der Strahl der Pipettenlösung, durch den Überdruck, die Zellmembran eindellte. Das waren sichere Zeichen den Überdruck zu entlasten, und eventuell einen sehr geringen Unterdruck an die Pipette durch vorsichtiges saugen anzulegen. Die Membran stülpte sich dann in den Öffnungsbereich der Pipette und bildete einen festen Seal aus, daß durch ein oszillierendes Stromsignal am Oszilloskop angezeigt wurde. Nachdem der „gain“ zurückgenommen wurde, konnte man das charakteristische Stromsignal der Cell-Attached-Konfiguration erkennen. Die zwei kapazitiven Artefakte zeigten den Umladeprozess der Zellmembran innerhalb der Pipettenöffnung an. Der Offsetstrom zwischen den beiden kapazitiven Artefakten gab Aufschluß wie groß der Strom war, der seitlich am Seal vorbei in das Bad floß (Leckstrom). Aus ihm ließ sich der Sealwiderstand bestimmen. Der Unterdruck wurde nun abgelassen, um die Membran mechanisch zu schonen, und ein Aktivieren von mechanosensitiven Kanälen zu verhindern.

Herstellung der Whole-Cell-Konfiguration

Die Whole-Cell-Konfiguration ist dadurch charakterisiert, daß die Membran unter der Pipette aufgebrochen ist. Dadurch wird eine Spannungskontrolle über die gesamte Zellmembran möglich. Nach kurzer Zeit tauscht sich das Zytoplasma mit der Pipettenlösung aus. Wegen dem viel größeren Volumen der Pipettenlösung im Verhältnis zum Volumen des Zytoplasmas werden klar definierte, aber auch artifizielle Verhältnisse des intrazellulären Milieus geschaffen. Dabei ist das Einwaschen von Wirkstoffen wie HBDDE, CGP54345 und Monensin möglich. Außerdem ist von Bedeutung, daß energiereiche Substanzen wie ATP und GTP ausgewaschen werden. Sie sind für die Funktion der Kanäle unerlässlich, und können bei zu niedriger intrazellulärer Konzentration für einen verstärkten „run down“ der

Kanäle verantwortlich sein [Sugiura et al. 1990, Verrecchia et al. 1999]. Deshalb wurde ATP und GTP der Pipettenlösung substituiert.

Um die Whole-Cell-Konfiguration zu etablieren, wurde am Verstärker der Puls $-80/-40\text{mV}$ aktiviert (Voltage-Clamp-Modus). Dabei wurde ein sich wiederholender Spannungssprung von -80mV auf -40mV an die Membran innerhalb der Pipette angelegt. Durch pulsierendes Anlegen eines Unterdrucks (saugen und entlasten) wurde die Membran unter der Pipettenöffnung durchbrochen. Das Stromsignal änderte sich dabei schlagartig. Die kapazitiven Ladeströme und der Offsetstrom nahmen stark zu. An das Zellpaar wurde ein negatives Haltepotential von -40mV angelegt, um die Na^+ -Kanäle zu inaktivieren. Danach wurde die Tyrodelösung durch extrazelluläre Badlösung (enthält 1mM Bariumchlorid, Perfusion 5min bei 2ml/min) ausgetauscht. Barium hat die Eigenschaft K^+ -Kanäle zu blockieren, und erhöht somit den Membranwiderstand. Dadurch verbesserte sich die Spannungskontrolle der Zelle, das elektrische Rauschen wurde vermindert, und der Seal konnte sich stabilisieren. Danach wurde der Puls $-80/-40\text{mV}$ nochmals angelegt. Der Verstärker legt den Spannungssprung nun an die gesamte Zellmembran an, so daß ein deutlicher Na^+ -Einstrom durch Öffnen der Na^+ -Kanäle am Oszilloskop sichtbar wurde. Der Na^+ -Einstrom ist Resultat der Spannungskontrolle über die gesamte Zellmembran, und zeigte somit die Etablierung der Whole-Cell-Konfiguration an. Dann wurde der Puls $-40/-50\text{mV}$ aktiviert, um die Na^+ -Kanäle elektrisch zu inaktivieren, so daß die passiven elektrischen Eigenschaften der Zelle sichtbar wurden. Die kapazitiven Ladeströme zeigten nun den Umladeprozess der gesamten Zellmembran, weswegen sie deutlich zunahm. Daraus ließ sich die Zellkapazität und die Größe der Zellmembran berechnen. Aus der Größe des Peaks konnte der Serienwiderstand berechnet werden, da in dieser Phase der Membranwiderstand kurz geschaltet war. Aus dem Offsetstrom wurde der Membranwiderstand berechnet. Der Quotient aus Serienwiderstand und Membranwiderstand erlaubte eine Einschätzung der Güte der Whole-Cell-Konfiguration [Numberger und Draguhn 1996]. Deswegen wurden diese Kontrollmessungen jeder Gap-Junction-Messung vorangestellt.

Zu Beginn eines Experimentes mußte der maximal mögliche Verstärkungsfaktor (gain) eingestellt werden. Das wurde erreicht, indem der „gain“ so gewählt wurde, daß das Signal gerade nicht oszillierte. Ein weiteres Problem stellte die Zunahme der Kapazitäten dar. Dadurch rundeten sich die Ecken des rechteckigen Spannungssignals deutlich ab. Dem wurde durch Zuschalten des Proportional-Integral-Controllers („integrator time constant“) und der „rise time“ entgegengewirkt, die eine sehr exakte Spannungskontrolle ermöglichten (steady state – Fehler $< 1\%$, [Polder 1996]). Anschließend wurde das Filter auf 2kHz eingestellt. Das gewährleistete ein optimales Herauslösen des bioelektrischen Signals vom

Hintergrundrauschen ohne es wesentlich zu verändern. Das System war nun zur Messung des Gap-Junction-Stromes bereit.

Gap-Junction-Strommessung

Das Zellpaar befand sich in der „double-whole-cell-patch-clamp“-Konfiguration (Abb. 11). Beide Verstärker generierten am Zellpaar ein Haltepotential von -40mV , um die Na^+ -Kanäle der Zellmembran zu inaktivieren. Für die Gap-Junction-Strommessung wurde die Zelle 2 des Zellpaares ausgehend vom Haltepotential (-40mV) auf Werte zwischen -130 bis 50mV in 10mV -Schritten für 200ms geklemmt. An der Zelle 1 des Zellpaares lag weiterhin das Haltepotential von -40mV an der Membran an. Das führte zu einer transjunctionalen Spannungsdifferenz von -90 bis 90mV zwischen Zelle 1 und Zelle 2. Abhängig von der Spannungsdifferenz floß ein Strom, der zwei unterschiedliche Wege nahm. Der Strom kann einerseits über den Membranwiderstand zum Erdleiter fließen, oder andererseits über den Gap-Junction-Widerstand in die gekoppelte Zelle strömen. Aus der Messung der Ströme ließ sich die Gap-Junction-Leitfähigkeit berechnen.

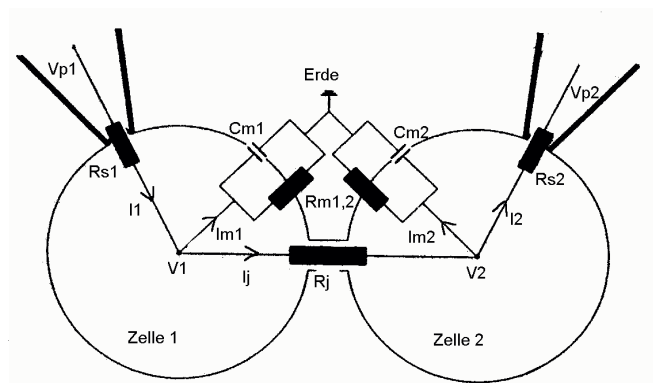


Abb.: 11: Ersatzschaltbild der „double-whole-cell-patch-clamp“-Konfiguration, nach Kolb [1992]. ($V_{p1,2}$) Pipettenpotential, ($V_{1,2}$) Membranpotential, ($I_{1,2}$) Strom durch die Pipette, ($I_{m1,2}$) Strom durch die Zellmembran, (I_j) Strom durch den G_j-Widerstand, ($R_{s1,2}$) Serienwiderstand, ($R_{m1,2}$) Membranwiderstand, ($C_{m1,2}$) Membrankapazität, (R_j) Gap-Junction-Widerstand

Nach dem Ohmschen Gesetz gilt:

$$R=U/I \text{ in } [\Omega] \text{ Ohm}$$

Der elektrische Widerstand ist das Verhältnis der angelegten Spannung zum fließenden Strom. Nach Umformen der Gleichung kommt man zum Gesetz der elektrischen Leitfähigkeit:

$$G=1/R=I/U \text{ in [S] Siemens}$$

Man versteht darunter den Kehrwert des Widerstandes.

Der Strom der Zelle 1 (I_1) kann mit folgender Gleichung beschrieben werden:

$$I_1=V_1/R_{m1}+(V_1-V_2)/R_j$$

Der erste Summand der Formel berechnet den Stromfluß über die Zellmembran. Der zweite Summand berechnet den Strom über die Gap Junctions.

Entsprechend dazu ist der Strom in Zelle 2:

$$I_2=V_2/R_{m2}+(V_2-V_1)/R_j$$

Befindet sich Zelle 2 auf ein gleichbleibendes Haltepotential, so daß $V_2=V_h$, gelten für I_1 und I_2 folgende vereinfachende Gleichungen:

$$I_1=V_1/R_{m1}+V_1/R_j$$

$$I_2=V_1/R_j$$

Aus der letzten Gleichung ist ersichtlich, das I_2 eine direkte Messung des Stromflusses durch die Gap-Junction-Kanäle darstellt, die eine Berechnung des Gap-Junction-Widerstandes und der Gap-Junction-Leitfähigkeit ermöglichen.

An einem Zellpaar wurden innerhalb eines Versuches 6 Gap-Junction-Strommessungen in einem Abstand von jeweils 10 Minuten durchgeführt. Daraus resultierte eine Versuchsdauer von insgesamt 50 Minuten, die in 4 verschiedene Meßphasen eingeteilt wurde (Tab. 3). Da während der ersten 20 Minuten vermehrt Schwankungen des Sealwiderstandes auftraten, bedurfte es einer Stabilisierungsphase (0. bis 20. Minute), in der sich der Seal weiter festigte. Am Anfang, zum Zeitpunkt $t=0\text{min}$, wurde die Initialleitfähigkeit bestimmt. In der anschließenden Kontrollphase (20. bis 30. Minute) erfolgte die Bestimmung des „run down“ der Gap-Junction-Kanäle. Dazu wurde die Differenz der Leitfähigkeiten der Gap-Junction-Strommessungen der 20. und 30. Minute gebildet. Danach folgte eine 9-minütige Perfusion des Bades mit modifizierter Tyrodelösung $+1\text{mM BaCl}_2 + 50\text{nmol/l AAP10}$ bei 2ml/min Perfusionsgeschwindigkeit. Laut Numberger und Draguhn [1996] muß das fünf- bis zehnfache des Kammervolumens eingewaschen werden, um die gewünschte Konzentration

des Perfusats im Bad zu erhalten. In der Meßkammer befanden sich 2ml Lösung, so daß die Perfusionsmenge von 18ml das neunfache der Badlösung darstellte. Schließlich wurde nach Einwaschen des AAP10 (40. Minute) der Effekt des Antiarrhythmischen Peptides bei einer Konzentration von 50 nM durch die Differenz der Leitfähigkeiten der 30. und 40. Minute bestimmt. Anschließend wurde AAP10 ausgewaschen (9 Minuten bei 2ml/min, mit modifizierter Tyrodelösung + 1mM BaCl₂), so daß die Gap-Junction-Strommessung am Ende der Auswaschphase (50.Minute) ohne AAP10 erfolgte. Der Auswascheffekt wurde durch Bildung der Differenz der Leitfähigkeiten der 40. und 50. Minute ermittelt.

Zeit	Meßphase	Ziel
0-20min	Stabilisierungsphase	Stabilisierung des Seals
20-30min	Kontrollphase	Messung des „run down“
30-40min	AAP10-Phase	Messung des AAP10-Effektes
40-50min	Auswaschphase	Messung des Auswascheffektes

Tab. 3: Meßprotokoll der Gap-Junction-Messungen

3.3 Auswertung der Versuchsergebnisse und Statistik

Die Meßpunkte lagen digitalisiert als Wertepaare von Strom und Spannung vor. Es wurden die Stromwerte für jede Messung und jeden Spannungssprung durch Mittelwertbildung der einzelnen Strommeßpunkte innerhalb des „steady state“ ermittelt. Der „steady state“ ist gekennzeichnet durch den linearen Verlauf der Geraden der Strom-Spannungsbeziehung, und befindet sich am Ende der Stromspur (die letzten 50ms der 200ms langen Stromspur). Aus jedem Meßzyklus erhielt man 19 Stromwerte die in einem Diagramm gegen die dazugehörigen transjunctionalen Spannungen abgetragen wurden. Durch lineare Regression wurde die Steigung der Geraden ermittelt, die den junctionalen Leitfähigkeitswert (g_j) angab. Die Leitfähigkeitswerte einer Versuchsgruppe wurden durch Bildung des Mittelwertes und den dazugehörigen Standardfehler des Mittelwertes aus den einzelnen Leitfähigkeiten der Versuche gebildet. Mit Hilfe der Varianzanalyse für wiederholte Messungen und des post hoc Wilcoxon-Testes wurden die einzelnen Meßphasen innerhalb einer Versuchsgruppe, und die Versuchsgruppen innerhalb der AAP10-Phase, auf signifikante Unterschiede untersucht.